



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 287 956**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12P 19/34** (2006.01)  
**C07H 21/02** (2006.01)  
**C07H 21/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97938010 .2**  
86 Fecha de presentación : **21.07.1997**  
87 Número de publicación de la solicitud: **0918885**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.06.1999**

54 Título: **Nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas y usos de las mismas.**

30 Prioridad: **29.07.1996 US 31809 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.12.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.12.2007**

73 Titular/es: **Nanosphere Inc.**  
**9744 Crawford Avenue**  
**Skokie, Illinois 60076, US**

72 Inventor/es: **Mirkin, Chad, A.;**  
**Letsinger, Robert, L.;**  
**Mucic, Robert, C.;**  
**Storhoff, James J. y**  
**Elghanian, Robert**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 287 956 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

Nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas y usos de las mismas.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a métodos para detectar ácidos nucleicos, sean naturales o sintéticos, y estén modificados o no modificados. Esta invención también se refiere a métodos de nanofabricación. Finalmente, la invención se refiere a métodos para separar un ácido nucleico seleccionado de otros ácidos nucleicos.

10 **Antecedentes de la invención**

El desarrollo de métodos para detectar y secuenciar ácidos nucleicos es crítico para el diagnóstico de enfermedades genéticas, bacterianas, y virales. Véase Mansfield, E.S. *et al. Molecular and Cellular Probes*, **9**, 145-156 (1995). Actualmente, hay una diversidad de métodos usados para detectar secuencias de ácido nucleico específicas. *Id.* Sin embargo, estos métodos son complicados, consumen mucho tiempo y/o requieren el uso de un equipo especializado y caro. Un método simple, rápido para detectar ácidos nucleicos que no requiera el uso de dicho equipo sería claramente deseable.

Se ha desarrollado una diversidad de métodos para ensamblar coloides metálicos y semiconductores en nanomateriales. Estos métodos se han centrado en el uso de moléculas enlazadoras covalentes que tienen funcionalidades en extremos opuestos con afinidades químicas por los coloides de interés. Uno de los enfoques más satisfactorios hasta la fecha, Brust *et al.*, *Adv. Mater.*, **7**, 795-797 (1995), implica el uso de coloides de oro y química de adsorción de tiol bien establecida, Bain & Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 506-512 (1989) y Dubois & Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **43**, 437-464 (1992). En este enfoque, se usan alcanoditioles lineales como moléculas enlazadoras de partículas. Los grupos tiol en cada extremo de la molécula enlazadora se unen covalentemente por sí mismos a las partículas coloidales para formar estructuras agregadas. Los inconvenientes de este método son que el proceso es difícil de controlar y los ensamblajes se forman de forma irreversible. Son necesarios métodos para controlar sistemáticamente el proceso de ensamblaje si las propiedades de los materiales de estas estructuras tienen que explotarse completamente.

Se ha reconocido la utilidad potencial del ADN para la preparación de biomateriales y en métodos de nanofabricación. En este trabajo, los investigadores se han centrado en el uso de propiedades de reconocimiento molecular específicas de secuencia de oligonucleótidos para diseñar estructuras de impresión con formas geométricas y tamaños bien definidos. Shekhtman *et al.*, *New J. Chem.*, **17**, 757-763 (1993); Shaw & Wang, *Science*, **260**, 533-536 (1993); Chen *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6402-6407 (1989); Chen & Seeman, *Nature*, **350**, 631-633 (1991); Smith y Feigon, *Nature*, **356**, 164-168 (1992); Wang *et al.*, *Biochem.*, **32**, 1899-1904 (1993); Chen *et al.*, *Biochem.*, **33**, 13540-13546 (1994); Marsh *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **23**, 696-700 (1995); Mirkin, *Annu. Review Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 541-576 (1994); Wells, *J. Biol. Chem.*, **263**, 1095-1098 (1988); Wang *et al.*, *Biochem.*, **30**, 5667-5674 (1991). Sin embargo, la teoría para producir estructuras de ADN lleva la ventaja de confirmación experimental. Seeman *et al.*, *New J. Chem.*, **17**, 739-755 (1993).

El documento US5384265 (Geo-Centers, Inc.) describe la detección de dianas de ácido nucleico con la ayuda de moléculas de ADN que están marcadas con partículas metálicas coloidales. La detección se realiza por la actividad catalítica de dichas partículas.

El documento US5521289 (Nanoprobes, Inc.) describe el uso de pequeñas nanopartículas fabricadas por ejemplo de oro como marcadores en la detección de por ejemplo ácidos nucleicos.

El documento EP0526912A2 (Enzo Biochem, Inc.) describe un método para la detección de material genético diana basado en dos segmentos polinucleotídicos monocatenarios marcados. Se usan micro- y macropartículas.

El documento US5508164 (Dekalb Genetics Corporation) describe un método para el marcaje magnético de un cromosoma. Las partículas magnéticas pueden comprender oro coloidal.

55 **Sumario de la invención**

La invención proporciona métodos para detectar ácidos nucleicos. En una realización, el método comprende poner en contacto un ácido nucleico con uno o más tipos de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas (conjugados nanopartícula-oligonucleótido). El ácido nucleico tiene al menos dos partes, y los oligonucleótidos en cada uno de los tipos de nanopartículas tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una de las partes del ácido nucleico. El contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con el ácido nucleico. La hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con el ácido nucleico provoca un cambio detectable.

En otra realización, el método comprende poner en contacto un ácido nucleico con al menos dos tipos de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Los oligonucleótidos son el primer tipo de nanopartículas tienen una secuencia complementaria a una primera parte de la secuencia del ácido nucleico. Los oligonucleótidos en

el segundo tipo de nanopartículas tienen una secuencia complementaria a una segunda parte de la secuencia del ácido nucleico. El contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con el ácido nucleico, y se observa un cambio detectable conseguido por esta hibridación.

5 En una realización adicional, el método comprende proporcionar un sustrato que tenga un primer tipo de nanopartículas unidas al mismo. El primer tipo de nanopartículas tiene oligonucleótidos unidos a las mismas, y los oligonucleótidos tienen una secuencia complementaria a una primera parte de la secuencia de un ácido nucleico. El sustrato se pone en contacto con el ácido nucleico en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con el ácido nucleico. Después, se proporciona un segundo tipo de nanopartículas que  
10 tiene oligonucleótidos unidos a las mismas. Los oligonucleótidos tienen una secuencia complementaria a una o más partes diferentes de la secuencia del ácido nucleico, y el ácido nucleico unido al sustrato se pone en contacto con el segundo tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas con el ácido nucleico. Puede observarse un cambio detectable en este punto. El método puede comprender adicionalmente proporcionar un oligonucleótido de unión que tenga una  
15 secuencia seleccionada que tenga al menos dos partes, siendo la primera parte complementaria a al menos una parte de la secuencia de los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas. El oligonucleótido de unión se pone en contacto con el segundo tipo de conjugados de nanopartícula-oligonucleótido unidos al sustrato en condiciones eficaces para permitir la hibridación del oligonucleótido de unión a los oligonucleótidos en las nanopartículas. Después, un tercer tipo de nanopartículas que tiene oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo los oligonucleótidos una  
20 secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del oligonucleótido de unión, se pone en contacto con el oligonucleótido de unión unido al sustrato en condiciones eficaces para permitir la hibridación del oligonucleótido de unión con los oligonucleótidos en las nanopartículas. Finalmente, se observa el cambio detectable producido por estas hibridaciones.

25 En otra realización más, el método comprende poner en contacto un ácido nucleico con un sustrato que tenga oligonucleótidos unidos al mismo, teniendo los oligonucleótidos una secuencia complementaria a una primera parte de la secuencia del ácido nucleico. El contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en el sustrato con el ácido nucleico. Después, el ácido nucleico unido al sustrato se pone en contacto con un primer tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo los oligonucleótidos  
30 una secuencia complementaria a una segunda parte de la secuencia del ácido nucleico. El contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con el ácido nucleico. A continuación, el primer tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido unidos al sustrato se pone en contacto con un segundo tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas una secuencia complementaria a al menos una parte de la secuencia de los  
35 oligonucleótidos en el primer tipo de nanopartículas, teniendo lugar el contacto en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en el primer y segundo tipos de nanopartículas. Finalmente, se observa un cambio detectable producido por estas hibridaciones.

40 En otra realización, el método comprende poner en contacto un ácido nucleico con un sustrato que tenga oligonucleótidos unidos al mismo, teniendo los oligonucleótidos una secuencia complementaria a una primera parte de la secuencia del ácido nucleico. El contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en el sustrato con el ácido nucleico. Después, el ácido nucleico unido al sustrato se pone en contacto con liposomas que tienen oligonucleótidos unidos a los mismos, teniendo los oligonucleótidos una secuencia complementaria a una parte de la secuencia del ácido nucleico. Este contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la  
45 hibridación de los oligonucleótidos en los liposomas con el ácido nucleico. A continuación, los conjugados liposoma-oligonucleótido unidos al sustrato se ponen en contacto con un primer tipo de nanopartículas que tienen al menos un primer tipo de oligonucleótidos unidos a las mismas. El primer tipo de oligonucleótidos tiene un grupo hidrófobo unido al extremo no unido a las nanopartículas, y el contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la unión de los oligonucleótidos en las nanopartículas a los liposomas como resultado de interacciones hidrófobas. Puede observarse un cambio detectable en este punto. El método puede comprender adicionalmente poner en contacto el primer  
50 de conjugados nanopartícula-oligonucleótido unidos a los liposomas con un segundo tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. El primer tipo de nanopartículas tiene un segundo tipo de oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a al menos una parte de la secuencia de los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas, y teniendo los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas una  
55 secuencia complementaria a al menos una parte de la secuencia del segundo tipo de oligonucleótidos en el primer tipo de nanopartículas. El contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en el primer y segundo tipos de nanopartículas. Después, se observa un cambio detectable.

60 En otra realización más, el método comprende proporcionar nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas y proporcionar uno o más tipos de oligonucleótidos de unión. Cada uno de los oligonucleótidos de unión tiene dos partes. La secuencia de una parte es complementaria a la secuencia de una de las partes del ácido nucleico, y la secuencia de la otra parte es complementaria a la secuencia de los oligonucleótidos en las nanopartículas. Los conjugados nanopartícula-oligonucleótido y los oligonucleótidos de unión se ponen en contacto en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con los oligonucleótidos de unión.  
65 El ácido nucleico y los oligonucleótidos de unión se ponen en contacto en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos de unión con el ácido nucleico. Después, se observa un cambio detectable. Los conjugados nanopartícula-oligonucleótido pueden ponerse en contacto con los oligonucleótidos de unión antes de ponerse en contacto con el ácido nucleico, o los tres pueden ponerse en contacto simultáneamente.

## ES 2 287 956 T3

En otra realización, el método comprende poner en contacto un ácido nucleico con al menos dos tipos de partículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Los oligonucleótidos en el primer tipo de partículas tienen una secuencia complementaria a una primera parte de la secuencia del ácido nucleico y tienen moléculas donantes de energía en los extremos no unidos a las partículas. Los oligonucleótidos en el segundo tipo de partículas tienen una secuencia complementaria a una segunda parte de la secuencia del ácido nucleico y tienen moléculasceptoras de energía en los extremos no unidos a las partículas. El contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en las partículas con el ácido nucleico, y se observa un cambio detectable conseguido por esta hibridación. Las moléculas donantes y receptoras de energía pueden ser moléculas fluorescentes.

La invención proporciona adicionalmente kits para detectar ácidos nucleicos. En una realización, el kit comprende al menos un recipiente, albergando el recipiente al menos dos tipos de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Los oligonucleótidos en el primer tipo de nanopartículas tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico. Los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del ácido nucleico.

Como alternativa, el kit puede comprender al menos dos recipientes. El primer recipiente alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico. El segundo recipiente alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del ácido nucleico.

En una realización adicional, el kit comprende al menos un recipiente. El recipiente alberga nanopartículas metálicas o semiconductoras que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Los oligonucleótidos tienen una secuencia complementaria aparte de un ácido nucleico y tienen moléculas fluorescentes unidas a los extremos de los oligonucleótidos no unidos a las nanopartículas.

En otra realización más, el kit comprende un sustrato, teniendo el sustrato unido al mismo nanopartículas, teniendo las nanopartículas oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico. El kit también incluye un primer recipiente que alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del ácido nucleico. El kit incluye adicionalmente un segundo recipiente que alberga un oligonucleótido de unión que tiene una secuencia seleccionada que tiene al menos dos partes, siendo la primera parte complementaria a al menos una parte de la secuencia de los oligonucleótidos en las nanopartículas en el primer recipiente. El kit también incluye un tercer recipiente que alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo los oligonucleótidos una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del oligonucleótido de unión.

En otra realización, el kit comprende un sustrato que tiene oligonucleótidos unidos al mismo que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico, un primer recipiente que alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del ácido nucleico, y un segundo recipiente que alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a al menos una parte de los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas en el primer recipiente.

En otra realización más, el kit comprende un sustrato, un primer recipiente que alberga nanopartículas, un segundo recipiente que alberga un primer tipo de oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico, un tercer recipiente que alberga un segundo tipo de oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del ácido nucleico, y un cuarto recipiente que alberga un tercer tipo de oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria a al menos una parte de la secuencia del segundo tipo de oligonucleótidos.

En una realización adicional, el kit comprende un sustrato que tiene oligonucleótidos unidos al mismo que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico. El kit también incluye un primer recipiente que alberga liposomas que tienen oligonucleótidos unidos a los mismos que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del ácido nucleico y un segundo recipiente que alberga nanopartículas que tienen al menos un primer tipo de oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo el primer tipo de oligonucleótidos un grupo hidrófobo unido al extremo no unido a las nanopartículas de modo que las nanopartículas puedan unirse a los liposomas por interacciones hidrófobas. El kit puede comprender adicionalmente un tercer recipiente que alberga un segundo tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo los oligonucleótidos una secuencia complementaria a al menos una parte de la secuencia de un segundo tipo de oligonucleótidos unidos al primer tipo de nanopartículas. El segundo tipo de oligonucleótidos unidos al primer tipo de nanopartículas tiene una secuencia complementaria a la secuencia de los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas.

En una realización adicional, el kit comprende un primer recipiente que alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. El kit también incluye uno o más recipientes adicionales, albergando cada recipiente un oligonucleótido de unión. Cada oligonucleótido de unión tiene una primera parte que tiene una secuencia complementaria a al menos una parte de la secuencia de oligonucleótidos en las nanopartículas y una segunda parte que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de una parte de un ácido nucleico a detectar. Las secuencias de las segundas

## ES 2 287 956 T3

partes de los oligonucleótidos de unión pueden ser diferentes siempre que cada secuencia sea complementaria a una parte de la secuencia del ácido nucleico a detectar.

En otra realización más, el kit comprende un recipiente que alberga un tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas y uno o más tipos de oligonucleótidos de unión. Cada uno de los tipos de oligonucleótidos de unión tiene una secuencia que comprende al menos dos partes. La primera parte es complementaria a la secuencia de los oligonucleótidos en las nanopartículas, por lo que los oligonucleótidos de unión se hibridan con los oligonucleótidos en las nanopartículas en el recipiente o recipientes. La segunda parte es complementaria a la secuencia de una parte del ácido nucleico.

En otra realización alternativa, el kit comprende al menos tres recipientes. El primer recipiente alberga nanopartículas. El segundo recipiente alberga un primer oligonucleótido que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico. El tercer recipiente alberga un segundo oligonucleótido que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del ácido nucleico. El kit puede comprender adicionalmente un cuarto recipiente que alberga un oligonucleótido de unión que tiene una secuencia seleccionada que tiene al menos dos partes, siendo la primera parte complementaria a al menos una parte de la secuencia del segundo oligonucleótido, y un quinto recipiente que alberga un oligonucleótido que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del oligonucleótido de unión.

En otra realización, el kit comprende uno o dos recipientes, albergando el recipientes o recipientes dos tipos de partículas. El primer tipo de partículas que tiene oligonucleótidos unidos a las mismas que tiene una secuencia complementaria a una primera parte de la secuencia de un ácido nucleico y tiene moléculas donantes de energía unidas a los extremos no unidos a las nanopartículas. El segundo tipo de partículas que tiene oligonucleótidos unidos a los mismos que tiene una secuencia complementaria a una segunda parte de la secuencia de un ácido nucleico y tiene moléculasceptoras de energía unidas a los extremos no unidos a las nanopartículas. Los donantes y aceptores de energía pueden ser moléculas fluorescentes.

La invención también proporciona un sustrato que tiene nanopartículas unidas al mismo. Las nanopartículas pueden tener oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico.

La invención proporciona adicionalmente un método de nanofabricación. El método comprende proporcionar al menos un tipo de oligonucleótido de enlace que tenga una secuencia seleccionada, teniendo la secuencia de cada tipo de oligonucleótido de enlace al menos dos partes. El método comprende adicionalmente proporcionar uno o más tipos de nanopartículas que tengan oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo los oligonucleótidos en cada tipo de nanopartículas una secuencia complementaria a una parte de la secuencia de un oligonucleótido de enlace. Los oligonucleótidos de enlace y las nanopartículas se ponen en contacto en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas a los oligonucleótidos de enlace de modo que se forme un nanomaterial o nanoestructura deseado.

La invención proporciona otro método de nanofabricación. Este método comprende proporcionar al menos dos tipos de nanopartículas que tengan oligonucleótidos unidos a las mismas. Los oligonucleótidos en el primer tipo de nanopartículas tienen una secuencia complementaria a la de los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas. Los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas tienen una secuencia complementaria a la de los oligonucleótidos en el primer tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido. El primer y segundo tipos de nanopartículas se ponen en contacto en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas entre sí de modo que se forme un nanomaterial o nanoestructura deseado.

La invención proporciona adicionalmente nanomateriales o nanoestructuras compuestos de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas, manteniéndose las nanopartículas juntas por conectores oligonucleotídicos.

La invención también proporciona una composición que comprende al menos dos tipos de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Los oligonucleótidos en el primer tipo de nanopartículas tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico o un oligonucleótido de enlace. Los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del ácido nucleico u oligonucleótido de enlace.

La invención proporciona adicionalmente un ensamblaje de recipientes que comprenden un primer recipiente que alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas, y un segundo recipiente que alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas en el primer recipiente tienen una secuencia complementaria a la de los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas en el segundo recipiente. Los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas en el segundo recipiente tienen una secuencia complementaria a la de los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas en el primer recipiente.

La invención también proporciona una nanopartícula que tiene una pluralidad de diferentes oligonucleótidos unidos a la misma.

Finalmente, la invención proporciona un método para separar un ácido nucleico seleccionado que tiene al menos dos partes de otros ácidos nucleicos. El método comprende proporcionar uno o más tipos de nanopartículas que tengan oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo los oligonucleótidos en cada uno de los tipos de nanopartículas una secuencia complementaria a la secuencia de una de las partes del ácido nucleico seleccionado. Los ácidos nucleicos seleccionados y otros ácidos nucleicos se ponen en contacto con las nanopartículas en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con el ácido nucleico seleccionado de modo que las nanopartículas hibridadas con el ácido nucleico seleccionado se agreguen y precipiten.

Como se usa en este documento, un “tipo de oligonucleótidos” se refiere a una pluralidad de moléculas oligonucleotídicas que tienen la misma secuencia. Un “tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas” se refiere a una pluralidad de nanopartículas que tienen el mismo tipo o tipos de oligonucleótidos unidos a ellas. “Nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas” algunas veces también se refiere a “conjugados nanopartícula-oligonucleótido” o, en el caso de los métodos de detección de la invención, “sondas nanopartícula-oligonucleótido”, “sondas de nanopartículas”, o sólo “sondas”.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Diagrama esquemático que ilustra la formación de agregados de nanopartículas combinando nanopartículas que tienen oligonucleótidos complementarios unidos a las mismas, estando mantenidas las nanopartículas mantenidas juntas en los agregados como resultado de la hibridación de los oligonucleótidos complementarios. X representa cualquier anclaje covalente (tal como  $-S(CH_2)_3OP(O)(O^-)-$ , donde S está unido a una nanopartícula de oro). En busca de simplicidad de la Figura 1 y algunas figuras posteriores, solamente se muestra un oligonucleótido a unir a cada partícula pero, de hecho, cada partícula tiene varios oligonucleótidos unidos a la misma. Además, es importante observar que en la Figura 1 y en posteriores figuras, los tamaños relativos de las nanopartículas de oro en los oligonucleótidos no están dibujados a escala.

Figura 2: Diagrama esquemático que ilustra un sistema para detectar ácido nucleico usando nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Los oligonucleótidos en las dos nanopartículas tienen secuencias complementarias a dos partes diferentes del ADN monocatenario mostrado. Como consecuencia, hibridan con el ADN que produce cambios detectables (que forma agregados y produce un cambio de color).

Figura 3: Diagrama esquemático de una variación del sistema mostrado en la Figura 2. Los oligonucleótidos en las dos nanopartículas tienen secuencias complementarias a las dos partes diferentes del ADN monocatenario mostrado que están separadas por una tercera parte que no es complementaria a los oligonucleótidos en las nanopartículas. También se muestra un oligonucleótido de relleno opcional que puede usarse para hibridar con la parte no complementaria del ADN monocatenario. Cuando el ADN, las nanopartículas y los oligonucleótidos de relleno se combinan, las nanopartículas se agregan, con la formación de conectores oligonucleótidos con mella, bicatenarios.

Figura 4: Diagrama esquemático que ilustra la agregación reversible de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas como resultado de la hibridación y deshibridación con un oligonucleótido de enlace. El oligonucleótido de enlace ilustrado es un ADN bicatenario que tiene extremos sobresalientes (extremos adhesivos) que son complementarios a los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas.

Figura 5: Diagrama esquemático que ilustra la formación de agregados de nanopartículas combinando nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas con oligonucleótidos de enlace que tienen secuencias complementarias a los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas.

Figura 6: Cubetas que contienen dos tipos de coloides de oro, que tienen cada uno un oligonucleótido diferente unido a los mismos y un oligonucleótido bicatenario de enlace con extremos adhesivos complementarios a los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas (véase la Figura 4). Cubeta A - a  $80^\circ\text{C}$ , que está por encima de la  $T_m$  del ADN de enlace; deshibridado (térmicamente desnaturalizado). El color es rojo oscuro. Cubeta B - después de enfriar a temperatura ambiente, que está por debajo de la  $T_m$  del ADN de enlace; tiene lugar la hibridación, y las nanopartículas se han agregado, pero los agregados no han precipitado. El color es púrpura. Cubeta C - después de varias horas a temperatura ambiente, las nanopartículas agregadas se han sedimentado en la parte inferior de la cubeta. La solución es transparente, y el precipitado es gris rosáceo. El calentamiento de B o C provocará A.

Figura 7: Un gráfico de absorbancia frente a longitud de onda en nm que muestran los cambios en la absorbancia cuando las nanopartículas de oro que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas se agregan debido a la hibridación con oligonucleótidos de enlace después de bajar la temperatura, como se ilustra en la Figura 4.

Figuras 8A-B: La Figura 8A es un gráfico del cambio en la absorbancia frente a la temperatura/tiempo para el sistema ilustrado en la Figura 4. A bajas temperaturas, las nanopartículas de oro que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas se agregan debido a la hibridación con oligonucleótidos de enlace (véase la Figura 4). A elevada temperatura ( $80^\circ\text{C}$ ), las nanopartículas se deshibridan. El cambio de la temperatura en el tiempo muestra que esto es un proceso reversible. La Figura 8B es un gráfico de cambio en la absorbancia frente a la temperatura/tiempo realizado del mismo modo usando una solución acuosa de nanopartículas de oro no modificadas. Los cambios reversibles observados en la Figura 8A no se observan.

## ES 2 287 956 T3

Figuras 9A-B: Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). La Figura 9A es una imagen TEM de nanopartículas de oro agregadas mantenidas juntas por hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas de oro con oligonucleótidos de enlace. La Figura 9B es una imagen TEM de un agregado bidimensional que muestra el orden de las nanopartículas unidas.

5

Figura 10: Diagrama esquemático que ilustra la formación de conectores oligonucleotídicos de triple cadena térmicamente estables entre nanopartículas que tienen un motivo pirimidina:purina:pirimidina. Dichos conectores de triple cadena son más adhesivos que los conectores bicatenarios. En la Figura 10, una nanopartícula tiene un oligonucleótido unido a la misma que está compuesto todo de purinas, y la otra nanopartícula tiene un oligonucleótido unido a la misma que está compuesto todo de pirimidinas. El tercer oligonucleótido para formar el conector de triple cadena (no unido a una nanopartícula) está compuesto de pirimidinas.

10

Figura 11: Diagrama esquemático que ilustra la formación de agregados de nanopartículas combinando nanopartículas que tienen oligonucleótidos complementarios unidos a las mismas, estando mantenidas las nanopartículas juntas en los agregados como resultado de la hibridación de los oligonucleótidos complementarios. En la Figura 11, los círculos representan las nanopartículas, las fórmulas son secuencias oligonucleotídicas, S es un enlace tio-alquilo, y los garabatos en los círculos representan otras moléculas oligonucleotídicas de la misma secuencia que la indicada que cubren la superficie de las nanopartículas. Los múltiples oligonucleótidos en los dos tipos de nanopartículas pueden hibridar entre sí, conduciendo a la formación de una estructura agregada.

15

20

Figura 12: Diagramas esquemáticos que ilustran sistemas para detectar ácido nucleico usando nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Se ilustran los conjugados 1 y 2 oligonucleótido-nanopartícula y las dianas oligonucleotídicas monocatenarias 3, 4, 5, 6 y 7. En la Figura 12, los círculos representan las nanopartículas, las fórmulas son secuencias oligonucleotídicas, y las líneas discontinuas representan enlaces de conexión de nucleótidos.

25

Figuras 13A-B: Diagramas esquemáticos que ilustran sistemas para detectar ADN (ADN analito) usando nanopartículas y un sustrato transparente.

30

Figuras 14A-B: La Figura 14A es un gráfico de absorbancia frente a longitud de onda en nm que muestra los cambios en la absorbancia cuando nanopartículas de oro que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas (una población de la cual está en solución y una población de la cual está unida a un sustrato transparente como se ilustra en la Figura 13B) se agregan debido a la hibridación con oligonucleótidos de enlace. La Figura 14B es un gráfico del cambio en la absorbancia para el sistema hibridado mencionado en la Figura 14A según aumenta la temperatura (fusión).

35

Figura 15: Diagramas esquemáticos que ilustran sistemas para detectar ácido nucleico usando nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Se ilustran los conjugados 1 y 2 oligonucleótido-nanopartícula y las dianas oligonucleotídicas monocatenarias 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En la Figura 15, los círculos representan las nanopartículas, las fórmulas son secuencias oligonucleotídicas, y S representa el enlazador tio-alquilo.

40

Figura 16: Diagramas esquemáticos que ilustran sistemas para detectar ácido nucleico usando nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Se ilustran los conjugados 1 y 2 oligonucleótido-nanopartícula, las dianas oligonucleotídicas monocatenarias de diferentes longitudes, y los oligonucleótidos de relleno de diferentes longitudes. En la Figura 16, los círculos representan las nanopartículas, las fórmulas son secuencias oligonucleotídicas, y S representa el enlace tio-alquilo.

45

Figura 17: Diagramas esquemáticos que ilustran conjugados nanopartícula-oligonucleótido y sistemas para detectar ácido nucleico usando nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. En la Figura 17, los círculos representan las nanopartículas, las líneas rectas representan cadenas oligonucleotídicas (bases no mostradas), dos líneas paralelas poco espaciadas representan segmentos dúplex, y las letras en minúscula indican secuencias de nucleótidos específicas (a es complementario a a', b es complementario a b', etc.).

50

Figura 18: Diagrama esquemático que ilustra un sistema para detectar ácido nucleico usando liposomas (círculo doble grande), nanopartículas (círculos oscuros pequeños) y un sustrato transparente. En la Figura 18, los cuadrados rellenos representan grupos colesterilo, los garabatos representan oligonucleótidos, y las escaleras representan oligonucleótidos bicatenarios (hibridados).

55

Figuras 19A-B: La Figura 19A es un gráfico de absorbancia frente a longitud de onda en nm que muestra cambios en la absorbancia cuando conjugados nanopartícula de oro-oligonucleótido se ensamblan en múltiples capas en el sustrato transparente como se ilustra en la Figura 13A. La Figura 19B es un gráfico del cambio en la absorbancia para el sistema hibridado mencionado en la Figura 19A según aumenta la temperatura (fusión).

60

Figuras 20A-B: Ilustraciones de esquemas usando oligonucleótidos marcados con fluorescencia unidos a nanopartículas de inactivación metálicas o semiconductoras (Figura 20A) o a partículas no semiconductoras, no metálicas (Figura 20B).

65

**Descripción detallada de las realizaciones actualmente preferidas**

Las nanopartículas útiles en la práctica de la invención incluyen materiales coloidales metálicos (por ejemplo, oro, plata, cobre y platino), semiconductores (por ejemplo CdS y CdSe) y magnéticos (por ejemplo, ferromagnetita). Otras nanopartículas útiles en la práctica de la invención incluyen ZnS, ZnO, TiO<sub>2</sub>, AgI, AgBr, HgI<sub>2</sub>, PbS, PbSe, ZnTe, CdTe, In<sub>2</sub>S<sub>3</sub>, In<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>, Cd<sub>3</sub>P<sub>2</sub>, Cd<sub>3</sub>As<sub>2</sub>, InAs y GaAs. El tamaño de las nanopartículas es preferiblemente de aproximadamente 5 nm a aproximadamente 150 nm (diámetro medio), más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 nm, mucho más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 nm.

Los métodos para fabricar nanopartículas metálicas, semiconductoras y magnéticas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Schmid, G. (ed.) *Clusters and Colloids* (VCH, Weinheim, 1994); Hayat, M.A. (ed.) *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications* (Academic Press, San Diego, 1991); Massart, R., *IEEE Transactions On Magnetics*, **17**, 1247 (1981); Ahmadi, T.S. *et al.*, *Science*, **272**, 1924 (1996); Henglein, A. *et al.*, *J. Phys. Chem.*, **99**, 14129 (1995); Curtis, A.C., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27**, 1530 (1988).

Los métodos para fabricar nanopartículas de ZnS, ZnO, TiO<sub>2</sub>, AgI, AgBr, HgI<sub>2</sub>, PbS, PbSe, ZnTe, CdTe, In<sub>2</sub>S<sub>3</sub>, In<sub>2</sub>Se<sub>3</sub>, Cd<sub>3</sub>P<sub>2</sub>, Cd<sub>3</sub>As<sub>2</sub>, InAs y GaAs son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Weller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 41 (1993); Henglein, *Top. Curr. Chem.*, **143**, 113 (1988); Henglein, *Chem. Rev.*, **89**, 1861 (1989); Brus, *Appl. Phys. A.*, **53**, 465 (1991); Bahncmann, en *Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy* (eds. Pelizzetti and Schiavello 1991), página 251; Wang y Herron, *J. Phys. Chem.*, **95**, 525 (1991); Olshavsky *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9438 (1990); Ushida *et al.*, *J. Phys. Chem.*, **95**, 5382 (1992).

Las nanopartículas adecuadas también están disponibles en el mercado de, por ejemplo, Ted Pella, Inc. (oro), Amersham Corporation (oro) y Nanoprobes, Inc. (oro).

Actualmente se prefieren nanopartículas de oro para su uso en la detección de ácidos nucleicos. Las partículas coloidales de oro tienen elevados coeficientes de extinción para las bandas que dan lugar a sus colores preciosos. Estos colores intensos cambian con el tamaño de partícula, concentración, distancia entre partículas, y grado de agregación y forma (geometría) de los agregados, haciendo a estos materiales particularmente atractivos para ensayos colorimétricos. Por ejemplo, la hibridación de oligonucleótidos unidos a nanopartículas de oro con oligonucleótidos y ácidos nucleicos provoca un cambio de color inmediato visible a simple vista (véanse, por ejemplo, los Ejemplos).

Las nanopartículas de oro también se prefieren actualmente para su uso en la nanofabricación por las mismas razones dadas anteriormente y a causa de su estabilidad, facilidad de formación de imágenes por microscopía electrónica, y modificación bien caracterizada con funcionalidades tiol (véase a continuación).

Las nanopartículas, los oligonucleótidos o ambos se funcionalizan para unir los oligonucleótidos a las nanopartículas. Dichos métodos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los oligonucleótidos funcionalizados con alcanotioles en sus extremos 3' o extremos 5' se unen fácilmente a nanopartículas de oro. Véase Whitesides, *Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanophase Chemistry*, Houston, TX, páginas 109-121 (1995). Véase también, Mucic *et al.* *Chem. Commun.* 555-557 (1996) (describe un método para unir ADN 3' tiol a superficies de oro planas; este método puede usarse para unir oligonucleótidos a nanopartículas). El método de alcanotiol también puede usarse para unir oligonucleótidos a otros coloides metálicos, semiconductores y magnéticos y a las otras nanopartículas numeradas anteriormente. Otros grupos funcionales para unir oligonucleótidos a superficies sólidas incluyen grupos fosforotioato (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.472.881 para la unión de oligonucleótido-fosforotioatos a superficies de oro), alquilsiloxanos sustituidos (véase, por ejemplo, Burwell, *Chemical Technology*, **4**, 370-377 (1974) y Matteucci y Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3185-3191 (1981) para unir oligonucleótidos a superficies de sílice y vidrio, y Grabar *et al.*, *Anal. Chem.*, **67**, 735-743 para unir aminoalquilsiloxanos y para una unión similar de mercaptoalquilsiloxanos). Los oligonucleótidos terminados con un tionucleósido 5' o un tionucleósido 3' también pueden usarse para unir oligonucleótidos a superficies sólidas. Las nanopartículas de oro pueden unirse a oligonucleótidos usando oligonucleótidos marcados con biotina y coloides de oro conjugados con estreptavidina; la interacción biotina-estreptavidina une los coloides al oligonucleótido. Shaiu *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, **21**, 99 (1993). Las siguientes referencias describen otros métodos que pueden emplearse para unir oligonucleótidos a nanopartículas: Nuzzo *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 2358 (1987) (disulfuros en oro); Allara y Nuzzo, *Langmuir*, **1**, 45 (1985) (ácidos carboxílicos en aluminio); Allara y Tompkins, *J. Colloid Interface Sci.*, **49**, 410-421 (1974) (ácidos carboxílicos en cobre), Iler, *The Chemistry Of Silica*, Capítulo 6, (Wiley 1979) (ácidos carboxílicos en sílice); Timmons y Zisman, *J. Phys. Chem.*, **69**, 984-990 (1965) (ácidos carboxílicos en platino); Soriaga y Hubbard, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3937 (1982) (compuestos de anillo aromático en platino); Hubbard, *Acc. Chem. Res.*, **13**, 177 (1980) (sulfolanos, sulfóxidos y otros disolventes funcionalizados en platino); Hickman *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 7271 (1989) (isonitrilos en platino) Maoz y Sagiv, *Langmuir*, **3**, 1045 (1987) (silanos en sílice); Maoz y Sagiv, *Langmuir*, **3**, 1034 (1987) (silanos en sílice); Wasserman *et al.*, *Langmuir*, **5**, 1074 (1989) (silanos en sílice); Eltekova y Eltekov, *Langmuir*, **3**, 951 (1987) (ácidos carboxílicos aromáticos, aldehídos, alcoholes y grupos metoxi en dióxido de titanio y sílice); Lec *et al.*, *J. Phys. Chem.*, **92**, 2597 (1988) (fosfatos rígidos en metales).

Cada nanopartícula tendrá una pluralidad de oligonucleótidos unidos a la misma. Como resultado, cada conjugado nanopartícula-oligonucleótido puede unirse a una pluralidad de oligonucleótidos o ácidos nucleicos que tienen la secuencia complementaria.

Los oligonucleótidos de secuencias definidas se usan para una diversidad de propósitos en la práctica de la invención. Los métodos para preparar oligonucleótidos de una secuencia predeterminada son bien conocidos. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989) y F. Eckstein (ed.) *Oligonucleotides and Analogues*, 1ª Ed. (Oxford University Press, Nueva York, 1991). Se prefieren métodos de síntesis en fase sólida tanto para oligorribonucleótidos como oligodesoxirribonucleótidos (los métodos bien conocidos para sintetizar ADN también son útiles para sintetizar ARN). Los oligorribonucleótidos y oligodesoxirribonucleótidos también pueden prepararse enzimáticamente.

La invención proporciona métodos para detectar ácidos nucleicos. Puede detectarse cualquier tipo de ácido nucleico, y los métodos pueden usarse, por ejemplo, para el diagnóstico de una enfermedad y para secuenciar ácidos nucleicos. Los ejemplos de ácidos nucleicos que pueden detectarse por los métodos de la invención incluyen genes (por ejemplo, un gen asociado con una enfermedad particular), ARN y ADN viral, ADN bacteriano, ADN fúngico, ADNc, ARNm, ARN y fragmentos de ADN, oligonucleótidos, oligonucleótidos sintéticos, oligonucleótidos modificados, ácidos nucleicos monocatenarios y bicatenarios, ácidos nucleicos naturales y sintéticos, etc. Por tanto, ejemplos de los usos de los métodos para detectar ácidos nucleicos incluyen: el diagnóstico y/o control de enfermedades virales (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis, herpes virus, citomegalovirus, y virus de Epstein-Barr), enfermedades bacterianas (por ejemplo, tuberculosis, enfermedad de Lyme, *H. pylori*, infecciones por *Escherichia coli*, infecciones por *Legionella*, infecciones por *Mycoplasma*, infecciones por *Salmonella*), enfermedades transmitidas por vía sexual (por ejemplo, gonorrea), trastornos hereditarios (por ejemplo, fibrosis quística, distrofia muscular de Duchene, fenilcetonuria, anemia de células falciformes), y cánceres (por ejemplo, genes asociados con el desarrollo del cáncer); en medicina forense; en secuenciación de ADN; para pruebas de paternidad, para la autenticación de líneas celulares; para controlar la terapia génica, y para muchos otros propósitos.

Los métodos para detectar ácidos nucleicos basados en observar un cambio de color a simple vista son baratos, rápidos, simples, robustos (los reactivos son estables), no requieren equipo especializado o caro, y no requieren ningún instrumento. Estos los hace particularmente adecuados para su uso en, por ejemplo, laboratorios de investigación y analíticos en secuenciación de ADN, en el campo para detectar la presencia de patógenos específicos, en el consultorio del doctor para una identificación rápida de una infección para ayudar a prescribir un fármaco para el tratamiento, y en los hogares y centros de salud para exploración de primera línea barata.

El ácido nucleico a detectar puede aislarse por métodos conocidos, o puede detectarse directamente en células, muestras tisulares, fluidos biológicos (por ejemplo, saliva, orina, sangre, suero), soluciones que contienen componentes de PCR, soluciones que contienen grandes excesos de oligonucleótidos o ADN de elevado peso molecular, y otras muestras, como también se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989) y B.D. Hames and S.J. Higgins, Eds., *Gene Probes 1* (IRL Press, Nueva York, 1995). Los métodos para preparar ácidos nucleicos para la detección con sondas de hibridación son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989) y B.D. Hames y S.J. Higgins, Eds., *Gene Probes 1* (IRL Press, Nueva York, 1995).

Si un ácido nucleico está presente en pequeñas cantidades, puede amplificarse por métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989) y B.D. Hames and S.J. Higgins, Eds., *Gene Probes 1* (IRL Press, Nueva York, 1995). Se prefiere la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Un método de acuerdo con la invención para detectar ácido nucleico comprende poner en contacto un ácido nucleico con uno o más tipos de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. El ácido nucleico a detectar tiene al menos dos partes. Las longitudes de estas partes y la distancia o distancias, si las hay, entre ellas se eligen de modo que cuando los oligonucleótidos en las nanopartículas hibriden con el ácido nucleico, suceda un cambio detectable. Estas longitudes y distancias pueden determinarse empíricamente y dependerán del tipo de partícula usada y su tamaño y el tipo de electrolito que estará presente en soluciones usadas en el ensayo (ciertos electrolitos afectan a la conformación de los ácidos nucleicos).

Además, cuando tiene que detectarse un ácido nucleico en presencia de otros ácidos nucleicos, las partes del ácido nucleico a las que los oligonucleótidos en las nanopartículas tienen que unirse deben elegirse de modo que contengan suficiente secuencia única de modo que la detección del ácido nucleico sea específica. También se conocen en la técnica directrices para hacer esto.

Aunque los ácidos nucleicos pueden contener secuencias de repetición suficientemente cercanas entre sí de modo que sólo necesite usarse un tipo de conjugado oligonucleótido-nanopartícula, esto será un caso raro. En general, las partes elegidas del ácido nucleico tendrán diferentes secuencias y se pondrán en contacto con nanopartículas que llevan dos o más oligonucleótidos diferentes, preferiblemente unidos a diferentes nanopartículas. Un ejemplo de un sistema para la detección de ácido nucleico se ilustra en la Figura 2. Como puede observarse, un primer oligonucleótido unido a una primera nanopartícula tiene una secuencia complementaria a una primera parte de la secuencia diana en el ADN monocatenario. Un segundo oligonucleótido unido a una segunda nanopartícula tiene una secuencia complementaria a una segunda parte de la secuencia diana en el ADN. Podrían dirigirse partes adicionales del ADN con nanopartículas correspondientes. Véase la Figura 17. Dirigir varias partes de un ácido nucleico aumenta la magnitud del cambio detectable.

## ES 2 287 956 T3

El contacto de los conjugados nanopartícula-oligonucleótido con el ácido nucleico tiene lugar en condiciones eficaces para la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con la secuencia o secuencias diana del ácido nucleico. Estas condiciones de hibridación son bien conocidas en la técnica y pueden optimizarse para el sistema particular empleado. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989).  
5 Preferiblemente se emplean condiciones de hibridación rigurosas.

Puede obtenerse una hibridación más rápida congelando y descongelando una solución que contenga el ácido nucleico a detectar y los conjugados nanopartícula-oligonucleótido. La solución puede congelarse de cualquier modo conveniente, tal como colocándolo en un baño de alcohol con hielo seco durante un tiempo suficiente para que la solución se congele (generalmente aproximadamente 1 minuto para 100  $\mu$ l de solución). La solución debe descongelarse a una temperatura por debajo de la temperatura de desnaturalización térmica, que puede ser convenientemente temperatura ambiente para la mayoría de las combinaciones de conjugados nanopartícula-oligonucleótido y ácidos nucleicos. La hibridación se completa y puede observarse el cambio detectable, después de descongelar la solución.  
10

La velocidad de hibridación también puede aumentarse calentando la solución que contiene el ácido nucleico a detectar y los conjugados nanopartícula-oligonucleótido a una temperatura por debajo de la temperatura de disociación ( $T_m$ ) para el complejo formado entre los oligonucleótidos en las nanopartículas y el ácido nucleico diana. Como alternativa, puede conseguirse una hibridación rápida calentando por encima de la temperatura de disociación ( $T_m$ ) y permitiendo que se enfríe la solución.  
15

La velocidad de hibridación también puede aumentarse aumentando la concentración salina (por ejemplo, NaCl de 0,1 M a 0,3 M).  
20

El cambio detectable que sucede después de la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con el ácido nucleico puede ser un cambio de color, la formación de agregados de las nanopartículas, o la precipitación de las nanopartículas agregadas. Los cambios de color pueden observarse a simple vista o espectroscópicamente. La formación de agregados de las nanopartículas puede observarse por microscopía electrónica o por nefelometría. La precipitación de las nanopartículas agregadas puede observarse a simple vista o microscópicamente. Los cambios preferidos son observables a simple vista. Es particularmente preferido un cambio de color observable a simple vista.  
25

La observación de un cambio de color a simple vista puede hacerse más fácilmente frente a un fondo de color de contraste. Por ejemplo, cuando se usan nanopartículas de oro, la observación de un cambio de color se ve facilitada aplicando puntualmente una muestra de la solución de hibridación sobre una superficie blanca sólida (tal como placas TLC de sílice o aluminio, papel de filtro, membranas de nitrato de celulosa, y membranas de nylon, preferiblemente una placa TLC de sílice C-18) y permitiendo que la mancha se seque. Inicialmente, la mancha retiene el color de la solución de hibridación (que varía de rosa/rojo, y en ausencia de hibridación, purpúreo-rojo/púrpura, si ha habido hibridación). Al secarse a temperatura ambiente u 80°C (la temperatura no es crítica), se desarrolla una mancha azul si los conjugados nanopartícula-oligonucleótido se han unido por hibridación con el ácido nucleico diana antes de formar la mancha. En ausencia de hibridación (por ejemplo, porque el ácido nucleico no está presente), la mancha es rosa. Las manchas azul y rosa son estables y no cambian con enfriamiento o calentamiento posterior o con el tiempo. Proporcionan un registro permanente adecuado del ensayo. No son necesarias otras etapas (tales como separación de conjugados nanopartícula-oligonucleótido hibridados y no hibridados) para observar el cambio de color.  
30

Un método alternativo para visualizar fácilmente los resultados de ensayo sería aplicar puntualmente una muestra de sondas de nanopartículas hibridadas con un ácido nucleico diana en un filtro de fibra de vidrio (por ejemplo, Borosilicate Microfiber Filter, tamaño de poro de 0,7  $\mu$ m, calidad FG75, para su uso con nanopartículas de oro de 13 nm de tamaño), retirando el líquido a través del filtro. El posterior aclarado con agua lava el exceso de sondas no hibridadas a través del filtro, dejando detrás una mancha observable que comprende los agregados generados por hibridación de las sondas de nanopartícula con el ácido nucleico diana (retenidas porque estos agregados son mayores que los poros del filtro). Esta técnica puede proporcionar mayor sensibilidad, ya que puede usarse un exceso de sondas de nanopartícula. Desafortunadamente, las sondas de nanopartícula se adhieren a todas las demás superficies que se han intentado (portaobjetos de sílice, placas de fase inversa, y membranas de nylon, nitrocelulosa, celulosa y otras membranas), haciendo de los filtros de fibra de vidrio la única superficie sólida conocida hasta la fecha que puede emplearse en dicho formato de lavado.  
35

Un aspecto importante del sistema de detección ilustrado en la Figura 2 es que obtener un cambio detectable depende de la hibridación cooperativa de dos oligonucleótidos diferentes a una secuencia diana dada en el ácido nucleico. Los desapareamientos en cualquiera de los dos oligonucleótidos desestabilizarán la conexión entre partículas. Es bien sabido que un desapareamiento en el apareamiento de bases tiene un efecto desestabilizante mucho mayor en la unión de una corta sonda oligonucleotídica que en la unión de una sonda oligonucleotídica larga. La ventaja de este sistema ilustrado en la Figura 2 es que utiliza la discriminación de bases asociada con una secuencia diana y una sonda largas (dieciocho pares de bases en el ejemplo ilustrado en la Figura 2), que aún tiene la sensibilidad característica de una corta sonda oligonucleotídica (nueve pares de bases en el ejemplo ilustrado en la Figura 2).  
40

La secuencia diana del ácido nucleico puede ser contigua, como la Figura 2, o las dos partes de la secuencia diana pueden separarse por una tercera parte que no es complementaria a los oligonucleótidos en las nanopartículas, como se ilustra en la Figura 3. En el último caso, se tiene la opción de usar un oligonucleótido de relleno que está libre en solución y que tiene una secuencia complementaria a la de esta tercera parte (véase la Figura 3). Cuando el  
45

## ES 2 287 956 T3

oligonucleótido de relleno hibrida con la tercera parte del ácido nucleico, se crea un segmento bicatenario, alterando de este modo la distancia media entre las nanopartículas y, por consiguiente, el color. El sistema ilustrado en la Figura 3 puede aumentar la sensibilidad del método de detección.

5 Algunas realizaciones del método para detectar ácido nucleico utilizan un sustrato. Empleando un sustrato, el cambio detectable (la señal) puede amplificarse y aumentarse la sensibilidad del ensayo.

10 Puede usarse cualquier sustrato que permita la observación del cambio detectable. Los sustratos adecuados incluyen superficies sólidas transparentes (por ejemplo, vidrio, cuarzo, plástico y otros polímeros), una superficie sólida opaca (por ejemplo, superficies sólidas blancas, tales como placas de sílice TLC, papel de filtro, filtros de fibra de vidrio, membranas de nitrato de celulosa, membranas de nylon), y superficies sólidas conductoras (por ejemplo, óxido de indio-estaño (ITO)). El sustrato puede ser de cualquier forma o grosor, pero generalmente será plano y delgado. Se prefieren sustratos transparentes tales como vidrio (por ejemplo, portaobjetos de vidrio) o plástico (por ejemplo, pocillos de placas de microtitulación).

15 En una realización, los oligonucleótidos se unen al sustrato. Los oligonucleótidos pueden unirse a los sustratos como se describe en, por ejemplo, Chrisey *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3031-3039 (1996); Chrisey *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3040-3047 (1996); Mucic *et al.*, *Chem. Commun.*, **555** (1996); Zimmermann y Cox, *Nucleic Acids Res.*, **22**, 492 (1994); Bottomley *et al.*, *J. Vac. Sci. Technol. A*, **10**, 591 (1992); y Hegner *et al.*, *FEBS Lett.*, **336**, 452 (1993).

20 Los oligonucleótidos unidos al sustrato tienen una secuencia complementaria a una primera parte de la secuencia del ácido nucleico a detectar. El ácido nucleico se pone en contacto con el sustrato en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en el sustrato con el ácido nucleico. De este modo, el ácido nucleico llega a unirse al sustrato. Preferiblemente se lava cualquier ácido nucleico no unido del sustrato antes de añadir conjugados nanopartícula-oligonucleótido.

25 A continuación, el ácido nucleico unido al sustrato se pone en contacto con un primer tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Los oligonucleótidos tienen una secuencia complementaria a una segunda parte de la secuencia del ácido nucleico, y el contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con el ácido nucleico. De este modo, el primer tipo de nanopartícula llega a unirse al sustrato. Después de que los conjugados nanopartícula-oligonucleótido se hayan unido al sustrato, el sustrato se lava para retirar cualquier conjugado nanopartícula-oligonucleótido y ácido nucleico no unidos.

30 Los oligonucleótidos en el primer tipo de nanopartículas pueden tener todos la misma secuencia o pueden tener diferentes secuencias que hibriden con diferentes partes del ácido nucleico a detectar. Cuando se usan oligonucleótidos que tienen diferentes secuencias, cada nanopartícula puede tener todos los diferentes oligonucleótidos unidos a la misma o, preferiblemente, los diferentes oligonucleótidos se unen a diferentes nanopartículas. La Figura 17 ilustra el uso de conjugados nanopartícula-oligonucleótido diseñados para hibridar con múltiples partes de un ácido nucleico.

35 Finalmente, el primer tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido unidos al sustrato se pone en contacto con un segundo tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Estos oligonucleótidos tienen una secuencia complementaria a al menos una parte de la secuencia o secuencias de los oligonucleótidos unidos al primer tipo de nanopartículas, y el contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en el primer tipo de nanopartículas con las del segundo tipo de nanopartículas. Después de que las nanopartículas se hayan unido, el sustrato se lava preferiblemente para retirar cualquier conjugado nanopartícula-oligonucleótido no unido.

40 La combinación de hibridaciones produce un cambio detectable. Los cambios detectables son iguales que los descritos anteriormente, excepto en que las múltiples hibridaciones provocan una amplificación del cambio detectable. En particular, como cada una del primer tipo de nanopartículas tiene múltiples oligonucleótidos (que tienen la misma o diferente secuencias) unidos a las mismas, cada uno del primer tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido puede hibridar con una pluralidad del segundo tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido. Además, el primer tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido puede hibridar con más de una parte del ácido nucleico a detectar. La amplificación proporcionada por las múltiples hibridaciones puede hacer al cambio detectable desde el primer momento o puede aumentar la magnitud del cambio detectable. Esta amplificación aumenta la sensibilidad del ensayo, permitiendo la detección de pequeñas cantidades de ácido nucleico.

45 Si se desea, pueden formarse capas adicionales de nanopartículas por adiciones sucesivas del primer y segundo tipos de conjugados nanopartícula-oligonucleótido. De este modo, la cantidad de nanopartículas inmovilizada por molécula de ácido nucleico diana puede aumentarse adicionalmente con un aumento correspondiente a la intensidad de la señal.

50 Además, en lugar de usar el primer y segundo tipos de conjugados nanopartícula-oligonucleótido diseñados para hibridar entre sí directamente, podrían usarse nanopartículas que tienen oligonucleótidos que servirían para unirse a nanopartículas juntos como consecuencia de la hibridación con oligonucleótidos de unión.

## ES 2 287 956 T3

Los métodos para fabricar las nanopartículas y los oligonucleótidos y para la unión de los oligonucleótidos a las nanopartículas se han descrito anteriormente. Las condiciones de hibridación son bien conocidas en la técnica y pueden optimizarse fácilmente para el sistema particular empleado (véase anteriormente).

5 Un ejemplo de este método para detectar ácido nucleico (ADN analito) se ilustra en la Figura 13A. La combinación de hibridaciones produce áreas oscuras donde los agregados de nanopartícula se unen al sustrato por el ADN analito. Estas áreas oscuras pueden observarse fácilmente a simple vista usando luz ambiental, preferiblemente viendo el sustrato contra un fondo blanco. Como puede observarse fácilmente a partir de la Figura 13, este medio proporciona un método para amplificar un cambio detectable.

10 En otra realización, las nanopartículas se unen al sustrato. Las nanopartículas pueden unirse a sustratos como se describe en, por ejemplo, Grabar *et al.*, *Analyt. Chem.*, **67**, 73-743 (1995); Bethell *et al.*, *J. Electroanal. Chem.*, **409**, 137 (1996); Bar *et al.*, *Langmuir*, **12**, 1172 (1996); Colvin *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 5221 (1992).

15 Después de que las nanopartículas se hayan unido al sustrato, los oligonucleótidos se unen a las nanopartículas. Esto puede conseguirse del mismo modo descrito anteriormente para la unión de los oligonucleótidos a nanopartículas en solución. Los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas tienen una secuencia complementaria a una primera parte de la secuencia de un ácido nucleico.

20 El sustrato se pone en contacto con el ácido nucleico en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con el ácido nucleico. De este modo, el ácido nucleico llega a unirse al sustrato. El ácido nucleico no unido se lava preferiblemente del sustrato antes de añadir conjugados nanopartícula-oligonucleótido adicionales.

25 Después, se proporciona un segundo tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Estos oligonucleótidos tienen una secuencia complementaria a una segunda parte de la secuencia del ácido nucleico, y el ácido nucleico unido al sustrato se pone en contacto con el segundo tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en el segundo tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido con el ácido nucleico. De este modo, el segundo tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido llega a unirse al sustrato. Después de que se hayan unido las nanopartículas, se lava cualquier conjugado nanopartícula-oligonucleótido y ácido nucleico no unidos del sustrato. Puede detectarse un cambio (por ejemplo, cambio de color) en este punto.

30 Los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas pueden tener todos la misma secuencia o pueden tener diferentes secuencias que hibridan con diferentes partes del ácido nucleico a detectar. Cuando se usan oligonucleótidos que tienen diferentes secuencias, cada nanopartícula puede tener todos los diferentes oligonucleótidos unidos a ella o, preferiblemente, los diferentes oligonucleótidos pueden unirse a diferentes nanopartículas. Véase la Figura 17.

35 A continuación, se pone en contacto un oligonucleótido de unión que tiene una secuencia seleccionada que tiene al menos dos partes, siendo la primera parte complementaria a al menos una parte de la secuencia de los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas, con el segundo tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido unidos al sustrato en condiciones eficaces para permitir la hibridación del oligonucleótido de unión a los oligonucleótidos en las nanopartículas. De este modo, el oligonucleótido de unión llega a unirse al sustrato. Después de que se hayan unido los oligonucleótidos de unión, se lavan los oligonucleótidos de unión no unidos del sustrato.

40 Finalmente, se proporciona un tercer tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Los oligonucleótidos tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del oligonucleótido de unión. Los conjugados nanopartícula-oligonucleótido se ponen en contacto con el oligonucleótido de unión unido al sustrato en condiciones eficaces para permitir la hibridación del oligonucleótido de unión a los oligonucleótidos en las nanopartículas. Después de que se hayan unido las nanopartículas, se lavan los conjugados nanopartícula-oligonucleótido no unidos del sustrato.

45 La combinación de hibridaciones produce un cambio detectable. Los cambios detectables son iguales que los descritos anteriormente, excepto en que las múltiples hibridaciones provocan una amplificación del cambio detectable. En particular, como cada una del segundo tipo de nanopartículas tiene múltiples oligonucleótidos (que tienen la misma o diferentes secuencias) unidos a las mismas, cada uno del segundo tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido puede hibridar con una pluralidad del tercer tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido (a través del oligonucleótido de unión). Además, el segundo tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido puede hibridar con más de una parte del ácido nucleico a detectar. La amplificación proporcionada por las múltiples hibridaciones puede hacer al cambio detectable desde el primer momento o puede aumentar la magnitud del cambio detectable. La amplificación aumenta la sensibilidad del ensayo, permitiendo la detección de pequeñas cantidades de ácido nucleico.

50 Si se desea, pueden formarse capas adicionales de nanopartículas por adiciones sucesivas de los oligonucleótidos de unión y el segundo y tercer tipos de conjugados nanopartícula-oligonucleótido. De este modo, las nanopartículas inmovilizadas por molécula de ácido nucleico diana pueden aumentarse adicionalmente con un aumento correspondiente en la intensidad de la señal.

Además, el uso del oligonucleótido de unión puede eliminarse, y el segundo y tercer tipos de conjugados nanopartícula-oligonucleótido puede diseñarse de modo que hibriden directamente entre sí.

Los métodos para fabricar las nanopartículas y los oligonucleótidos y para unir los oligonucleótidos a las nanopartículas se han descrito anteriormente. Las condiciones de hibridación son bien conocidas en la técnica y pueden optimizarse fácilmente para el sistema particular empleado (véase anteriormente).

Un ejemplo de este método para detectar ácido nucleico (ADN analito) se ilustra en la Figura 13B. La combinación de hibridaciones produce áreas oscuras donde los agregados de nanopartículas se unen al sustrato por ADN analito. Estas áreas oscuras pueden observarse fácilmente a simple vista como se ha descrito anteriormente. Como puede observarse a partir de la Figura 13B, esta realización del método de la invención proporciona otro medio para amplificar el cambio detectable.

Otro esquema de amplificación emplea liposomas. En este esquema, los oligonucleótidos se unen a un sustrato. Los sustratos adecuados son los descritos anteriormente, y los oligonucleótidos pueden unirse a los sustratos como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, cuando el sustrato es vidrio, esto puede conseguirse condensando los oligonucleótidos a través de grupos fosforilo o ácido carboxílico con grupos aminoalquilo en la superficie del sustrato (para una química relacionada véase Grabar *et al.*, *Anal. Chem.*, **67**, 735-743 (1995)).

Los oligonucleótidos unidos al sustrato tienen una secuencia complementaria a una primera parte de la secuencia del ácido nucleico a detectar. El ácido nucleico se pone en contacto con el sustrato en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en el sustrato con el ácido nucleico. De este modo el ácido nucleico llega a unirse al sustrato. Cualquier ácido nucleico no unido se lava preferiblemente del sustrato antes de añadir componentes adicionales del sistema.

A continuación, el ácido nucleico unido al sustrato se pone en contacto con liposomas que tienen oligonucleótidos unidos a los mismos. Los oligonucleótidos tienen una secuencia complementaria a una segunda parte de la secuencia del ácido nucleico, y el contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en los liposomas con el ácido nucleico. De este modo los liposomas llegan a unirse al sustrato. Después de que los liposomas se hayan unido al sustrato, el sustrato se lava para retirar cualquier liposoma y ácido nucleico no unidos.

Los oligonucleótidos en los liposomas pueden tener todos la misma secuencia o pueden tener diferentes secuencias que hibriden con diferentes partes del ácido nucleico a detectar. Cuando se usan oligonucleótidos que tienen diferentes secuencias, cada liposoma puede tener todos los oligonucleótidos diferentes unidos al mismo o los diferentes oligonucleótidos pueden unirse a diferentes liposomas.

Para preparar conjugados oligonucleótido-liposoma, los oligonucleótidos se unen a un grupo hidrófobo, tal como colesterilo (véase, Letsinger *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7535-7536 (1993)), y los conjugados oligonucleotídicos hidrófobos se mezclan con una solución de liposomas para formar liposomas con conjugados oligonucleotídicos hidrófobos anclados en la membrana (véase, Zhang *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 6243-6246 (1996)). La carga de los conjugados oligonucleotídicos hidrófobos en la superficie de los liposomas puede controlarse controlando la proporción de conjugados oligonucleotídicos hidrófobos a liposomas en la mezcla. Se ha observado que los liposomas que tienen oligonucleótidos unidos por interacción hidrófoba de grupos colesterilo colgantes son eficaces para dirigir polinucleótidos inmovilizados en una membrana de nitrocelulosa (Id.). Se usaron grupos de fluoresceína anclados en la membrana de liposoma como grupo informador. Sirvieron de forma eficaz, pero su sensibilidad estaba limitada por el hecho de que la señal desde la fluoresceína en regiones de elevada concentración local (por ejemplo, en la superficie del liposoma) está debilitada por auto-inactivación.

Los liposomas se preparan por métodos bien conocidos en la técnica. Véase, Zhang *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **37**, 6243 (1996). Los liposomas generalmente son aproximadamente 5-50 veces el tamaño (diámetro) de las nanopartículas usadas en posteriores etapas. Por ejemplo, para nanopartículas de aproximadamente 13 nm de diámetro, preferiblemente se usan liposomas de aproximadamente 100 nm de diámetro.

Los liposomas unidos al sustrato se ponen en contacto con un primer tipo de nanopartículas que tienen al menos un primer tipo de oligonucleótidos unidos a las mismas. El primer tipo de oligonucleótidos tiene un grupo hidrófobo unido al extremo no unido a las nanopartículas, y el contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la unión de los oligonucleótidos en las nanopartículas a los liposomas como resultado de interacciones hidrófobas. Puede observarse un cambio detectable en este punto.

El método puede comprender adicionalmente poner en contacto el primer tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido unidos a los liposomas con el segundo tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. El primer tipo de nanopartículas tiene un segundo tipo de oligonucleótidos unidos a las mismas que tiene una secuencia complementaria a al menos una parte de la secuencia de los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas, y los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas tienen una secuencia complementaria a al menos una parte de la secuencia del segundo tipo de oligonucleótidos en el primer tipo de nanopartículas. El contacto tiene lugar en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en el primer y segundo tipos de nanopartículas. Esta hibridación generalmente se realizará a temperaturas suaves (por ejemplo, 5°C a 60°C), de mo-

do que se emplean condiciones (por ejemplo, NaCl 0,3-1,0 M) que conducen a hibridación a temperatura ambiente. Después de la hibridación, se lavan los conjugados nanopartícula-oligonucleótido no unidos del sustrato.

5 La combinación de hibridaciones produce un cambio detectable. Los cambios detectables son iguales que los descritos anteriormente, excepto en que las múltiples hibridaciones provocan la amplificación del cambio detectable. En particular, como cada uno de los liposomas tiene múltiples oligonucleótidos (que tienen la misma o diferentes secuencias) unidos a los mismos, cada uno de los liposomas puede hibridar con una pluralidad del primer tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido. De forma similar, como cada una del primer tipo de nanopartículas tiene múltiples oligonucleótidos unidos a las mismas, cada uno del primer tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido puede  
10 hibridar con una pluralidad del segundo tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido. Además, los liposomas pueden hibridar con más de una parte del ácido nucleico a detectar. La amplificación proporcionada por las múltiples hibridaciones puede hacer al cambio detectable desde el primer momento o puede aumentar la magnitud del cambio detectable. Esta amplificación aumenta la sensibilidad del ensayo, permitiendo la detección de pequeñas cantidades de ácido nucleico.

15 Si se desea, pueden formarse capas adicionales de nanopartículas por adiciones sucesivas del primer y segundo tipos de conjugados nanopartícula-oligonucleótido. De este modo, la cantidad de nanopartículas inmovilizada por molécula de ácido nucleico diana puede aumentarse adicionalmente con un aumento correspondiente en la intensidad de la señal. También puede obtenerse una potenciación adicional empleando tinción con plata de nanopartículas de oro (Bassell, *et al.*, *J. Cell Biol.*, **126**, 863-876 (1994); Braun-Howland *et al.*, *Biotechniques*, **13**, 928-931 (1992)).  
20

Además, en lugar de usar el segundo y tercer tipos de conjugados nanopartícula-oligonucleótido diseñados para hibridar entre sí directamente, podrían usarse nanopartículas que tienen oligonucleótidos que servirían para poner las nanopartículas juntas como consecuencia de la hibridación con oligonucleótidos de unión.  
25

Los métodos para fabricar las nanopartículas y los oligonucleótidos y para unir los oligonucleótidos a las nanopartículas se han descrito anteriormente. Puede usarse una mezcla de oligonucleótidos funcionalizados en un extremo para la unión a las nanopartículas y con o sin un grupo hidrófobo en el otro extremo en el primer tipo de nanopartículas. La proporción relativa de estos oligonucleótidos unidos a la nanopartícula promedio se controlará por la proporción de las concentraciones de los dos oligonucleótidos en la mezcla. Las condiciones de hibridación son bien conocidas en la técnica y pueden optimizarse fácilmente para el sistema particular empleado (véase anteriormente).  
30

Un ejemplo de este método para detectar ácido nucleico se ilustra en la Figura 18. La hibridación del primer tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido con los liposomas puede producir un cambio detectable. En el caso de nanopartículas de oro, puede observarse un color rosa/rojo o un color púrpura/azul si las nanopartículas están suficientemente cerca entre sí. La hibridación del segundo tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido al primer tipo de conjugados nanopartícula-oligonucleótido producirá un cambio detectable. En el caso de nanopartículas de oro, se observará un color púrpura/azul. Todos estos cambios de color pueden observarse a simple vista.  
35

40 Cuando se emplea un sustrato, puede unirse una pluralidad de los tipos iniciales de conjugados nanopartícula-oligonucleótido u oligonucleótidos al sustrato en una serie para detectar múltiples partes de un ácido nucleico diana, para detectar múltiples ácidos nucleicos diferentes, o ambos. Por ejemplo, puede proporcionarse un sustrato con filas de manchas, conteniendo cada mancha un diferente tipo de oligonucleótido o conjugado oligonucleótido-nanopartícula diseñado para unirse a una parte de un ácido nucleico diana. Se aplica una muestra que contiene uno o más ácidos nucleicos a cada mancha, y el resto del ensayo se realiza en uno de los modos descritos anteriormente usando conjugados oligonucleótido-nanopartícula apropiados, conjugados oligonucleótido-liposoma y oligonucleótidos de unión.  
45

Un conjugado nanopartícula-oligonucleótido que puede usarse en un ensayo para cualquier ácido nucleico se ilustra en la Figura 17, partes IV y V. Esta "sonda universal" tiene oligonucleótidos de una única secuencia unida a la misma. Estos oligonucleótidos pueden hibridar con un oligonucleótido de unión que tiene una secuencia que comprende al menos dos partes. La primera parte es complementaria a al menos una parte de la secuencia de los oligonucleótidos en las nanopartículas. La segunda parte es complementaria a una parte de la secuencia del ácido nucleico a detectar. Puede usarse una pluralidad de oligonucleótidos de unión que tienen la misma primera parte y diferentes segundas partes, en cuyo caso la "sonda universal", después de la hibridación con los oligonucleótidos de unión, puede unirse a múltiples partes del ácido nucleico a detectar o a diferentes dianas de ácido nucleico.  
50  
55

En otra realización más, los oligonucleótidos unidos a nanopartículas metálicas y semiconductoras pueden tener una molécula fluorescente unida al extremo no unido a las nanopartículas. Las nanopartículas metálicas y semiconductoras son inactivadores de fluorescencia conocidos, dependiendo la magnitud del efecto de inactivación de la distancia entre las nanopartículas y la molécula fluorescente. En el estado no hibridado, los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas interactúan con las nanopartículas, de modo que se observará una inactivación significativa. Véase la Figura 20A. Después de la hibridación con un ácido nucleico diana, la molécula fluorescente llegará a espaciarse desde las nanopartículas, disminuyendo la inactivación de la fluorescencia. Véase la Figura 20A. Oligonucleótidos más largos deben dar lugar a cambios mayores en la fluorescencia, al menos hasta que los grupos fluorescentes se hayan movido suficientemente lejos de las superficies de las nanopartículas de modo que ya no se observe un aumento en el cambio. Las longitudes útiles de los oligonucleótidos pueden determinarse empíricamente. Pueden usarse nanopartículas metálicas y semiconductoras que tengan oligonucleótidos marcados con fluorescencia unidos a las mismas en cualquiera de los formatos de ensayo descritos anteriormente, incluyendo los realizados en solución o en sustratos.  
60  
65

Los métodos para marcar oligonucleótidos con moléculas fluorescentes y medir la fluorescencia son bien conocidos en la técnica. Las moléculas fluorescentes adecuadas también son bien conocidas en la técnica e incluyen las fluoresceínas, rodaminas y Rojo Texas. Los oligonucleótidos se unirán a las nanopartículas como se ha descrito anteriormente.

5

En otra realización más, pueden usarse dos tipos de oligonucleótidos marcados con fluorescencia unidos a dos partículas diferentes. Las partículas adecuadas incluyen partículas poliméricas, tales como partículas de poliestireno, partículas de polivinilo, partículas de acrilato y metacrilato, partículas de vidrio, partículas de látex, perlas de Sepharose y otras partículas similares bien conocidas en la técnica. Los métodos para unir oligonucleótidos a dichas partículas son bien conocidos en la técnica. En particular, está disponible una amplia diversidad de grupos funcionales en las partículas o pueden incorporarse en dichas partículas. Los grupos funcionales incluyen ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos amino, grupos ciano, grupos etileno, grupos hidroxilo, grupos mercapto, y similares. También pueden usarse nanopartículas, incluyendo nanopartículas metálicas y semiconductoras.

10

Los dos fluoróforos se denominan *d* y *a* para donante y aceptor. Es bien conocida en la técnica una diversidad de moléculas fluorescentes útiles en dichas combinaciones y están disponibles en, por ejemplo, Molecular Probes. Una combinación atractiva es fluoresceína como donante y Rojo Texas como aceptor. Los dos tipos de conjugados nanopartícula-oligonucleótido con *d* y *a* unidos se mezclan con el ácido nucleico diana, y se mide la fluorescencia en un fluorímetro. La mezcla se excitará con luz de longitud de onda que excita *d*, y la mezcla se controlará para la fluorescencia de *a*. Después de la hibridación, *d* y *a* se pondrán en proximidad (véase la Figura 20B).

15

20

En el caso de partículas no metálicas, no semiconductoras, la hibridación se mostrará por un cambio en la fluorescencia de la de *d* a la de *a* y por la aparición de fluorescencia para *a* además de la de *d*. En ausencia de hibridación los fluoróforos estarán demasiado alejados para que la transferencia de energía sea significativa, y solamente se observará la fluorescencia de *d*.

25

En el caso de nanopartículas metálicas y semiconductoras, se mostrará ausencia de hibridación por la ausencia de fluorescencia debida a *d* o a *a* causa de la inactivación (véase anteriormente). La hibridación se mostrará por un aumento en la fluorescencia debida a *a*.

30

Como se apreciará, las partículas y nanopartículas descritas anteriormente que tienen oligonucleótidos marcados con moléculas fluorescentes aceptoras y donantes unidas pueden usarse en los formatos de ensayo descritos anteriormente, incluyendo los realizados en solución y en sustratos. Para formatos en solución, las secuencias oligonucleotídicas se eligen preferiblemente de modo que se unan al ácido nucleico diana como se ilustra en la Figura 15. En los formatos mostrados en las Figuras 13A-B y 18, los oligonucleótidos de unión pueden usarse para unir las moléculas fluorescentes aceptoras y donantes en las dos nanopartículas en proximidad. Además, en el formato ilustrado en la Figura 13A, los oligonucleótidos unidos al sustrato pueden marcarse con *d*. Además, en principio, pueden usarse otros marcadores además de las moléculas fluorescentes, tales como moléculas quimioluminiscentes, que darán una señal detectable o un cambio en la señal detectable después de la hibridación.

35

40

La invención también proporciona kits para detectar ácidos nucleicos. En una realización, el kit comprende al menos un recipiente, albergando el recipiente al menos dos tipos de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Los oligonucleótidos en el primer tipo nanopartículas tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico. Los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del ácido nucleico. El recipiente puede comprender adicionalmente oligonucleótidos de relleno que tienen una secuencia complementaria a una tercera parte del ácido nucleico, estando localizada la tercera parte entre la primera y segunda partes. El oligonucleótido de relleno también puede proporcionarse en un recipiente diferente.

45

En una segunda realización, el kit comprende al menos dos recipientes. El primer recipiente alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico. El segundo recipiente alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del ácido nucleico. El kit puede comprender adicionalmente un tercer recipiente que alberga un oligonucleótido de relleno que tiene una secuencia complementaria a una tercera parte del ácido nucleico, estando localizada la tercera parte entre la primera y segunda partes.

50

55

En otra realización alternativa, los kits pueden tener los oligonucleótidos y nanopartículas en recipientes diferentes, y los oligonucleótidos tendrían que unirse a las nanopartículas antes de realizar un ensayo para detectar un ácido nucleico. Los oligonucleótidos y/o las nanopartículas pueden funcionalizarse de modo que los oligonucleótidos puedan unirse a las nanopartículas. Como alternativa, los oligonucleótidos y/o nanopartículas pueden proporcionarse en el kit sin grupos funcionales, en cuyo caso deben funcionalizarse antes de realizar el ensayo.

60

En otra realización, el kit comprende al menos un recipiente. El recipiente alberga nanopartículas metálicas o semiconductoras que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. Los oligonucleótidos tienen una secuencia complementaria a una parte de un ácido nucleico y tienen moléculas fluorescentes unidas a los extremos de los nucleótidos no unidos a las nanopartículas.

65

## ES 2 287 956 T3

En otra realización más, el kit comprende un sustrato, teniendo el sustrato unido al mismo nanopartículas. Las nanopartículas tienen oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico. El kit también incluye un primer recipiente que alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del ácido nucleico. Los oligonucleótidos pueden tener la misma o diferentes secuencias, pero cada uno de los oligonucleótidos tiene una secuencia complementaria a una parte del ácido nucleico. El kit incluye adicionalmente un segundo recipiente que alberga un oligonucleótido de unión que tiene una secuencia seleccionada que tiene al menos dos partes, siendo la primera parte complementaria a al menos una parte de la secuencia de los oligonucleótidos en las nanopartículas en el primer recipiente. El kit también incluye un tercer recipiente que alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo los oligonucleótidos una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del oligonucleótido de unión.

En otra realización, el kit comprende un sustrato que tiene oligonucleótidos unidos al mismo que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico. El kit también incluye un primer recipiente que alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del ácido nucleico. Los oligonucleótidos pueden tener la misma o diferentes secuencias, pero cada uno de los oligonucleótidos tiene una secuencia complementaria a una parte del ácido nucleico. El kit incluye adicionalmente un segundo recipiente que alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas que tienen una secuencia complementaria a al menos una parte de los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas en el primer recipiente.

En otra realización más, los kits pueden tener el sustrato, oligonucleótidos y nanopartículas en recipientes diferentes. El sustrato, oligonucleótidos y nanopartículas tendrían que unirse apropiadamente entre sí antes de realizar un ensayo para detectar un ácido nucleico. El sustrato, oligonucleótidos y/o las nanopartículas pueden funcionalizarse para facilitar esta unión. Como alternativa, el sustrato, oligonucleótidos y/o nanopartículas puede proporcionarse en el kit sin grupos funcionales, en cuyo caso deben funcionalizarse antes de realizar el ensayo.

En una realización adicional, el kit comprende un sustrato que tiene oligonucleótidos unidos al mismo que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico. El kit también incluye un primer recipiente que alberga liposomas que tienen oligonucleótidos unidos a los mismos que tienen una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte del ácido nucleico y un segundo recipiente que alberga nanopartículas que tienen al menos un primer tipo de oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo el primer tipo de oligonucleótidos un grupo coleserilo unido al extremo no unido a las nanopartículas de modo que las nanopartículas puedan unirse a los liposomas por interacciones hidrófobas. El kit puede comprender adicionalmente un tercer recipiente que alberga un segundo tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo los oligonucleótidos una secuencia complementaria a al menos una parte de la secuencia de un segundo tipo de oligonucleótidos unidos al primer tipo de nanopartículas. El segundo tipo de oligonucleótidos unidos al primer tipo de nanopartículas tiene una secuencia complementaria a la secuencia de los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas.

En una realización adicional, el kit puede comprender un primer recipiente que alberga nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas. El kit también incluye uno o más recipientes adicionales, albergando cada recipiente un oligonucleótido de unión. Cada oligonucleótido de unión tiene una primera parte que tiene una secuencia complementaria a al menos una parte de la secuencia de oligonucleótidos en las nanopartículas y una segunda parte que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de una parte de un ácido nucleico a detectar. Las secuencias de las segundas partes de los oligonucleótidos de unión pueden ser diferentes siempre que cada secuencia sea complementaria a una parte de la secuencia del ácido nucleico a detectar.

En otra realización, el kit comprende un recipiente que alberga un tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas y uno o más tipos de oligonucleótidos de unión. Cada uno de los tipos de oligonucleótidos de unión tiene una secuencia que comprende al menos dos partes. La primera parte es complementaria a la secuencia de los oligonucleótidos en las nanopartículas, por lo que los oligonucleótidos de unión hibridan con los oligonucleótidos en las nanopartículas en el o los recipientes. La segunda parte es complementaria a la secuencia de una parte del ácido nucleico.

En otra realización, los kits pueden comprender uno o dos recipientes que albergan dos tipos de partículas. El primer tipo de partículas que tiene oligonucleótidos unidos a las mismas que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de una primera parte de un ácido nucleico. Los oligonucleótidos se marcan con un donante de energía en los extremos no unidos a las partículas. El segundo tipo de partículas que tiene oligonucleótidos unidos a las mismas que tiene una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda parte de un ácido nucleico. Los oligonucleótidos se marcan con un aceptor de energía en los extremos no unidos a las partículas. Los donantes y aceptores de energía pueden ser moléculas fluorescentes.

Los kits también pueden contener otros reactivos y artículos útiles para detectar ácido nucleico. Los reactivos pueden incluir reactivos de PCR, reactivos de hibridación, tampones, etc. Otros artículos que pueden proporcionarse como parte del kit incluyen una superficie sólida (para visualizar la hibridación) tal como una placa de sílice TLC, jeringas, pipetas, cubetas, recipientes, y un termociclador (para controlar las temperaturas de hibridación y deshibridación). Los reactivos para funcionalizar los nucleótidos o nanopartículas también pueden incluirse en el kit.

La precipitación de nanopartículas agregadas proporciona un medio para separar un ácido nucleico seleccionado de otros ácidos nucleicos. Esta separación puede usarse como una etapa en la purificación del ácido nucleico. Las condiciones de hibridación son las descritas anteriormente para detectar un ácido nucleico. Si la temperatura está por debajo de la  $T_m$  (la temperatura a la que la mitad del oligonucleótido está unido a su cadena complementaria) para la unión de los oligonucleótidos en las nanopartículas al ácido nucleico, entonces se necesita tiempo suficiente para que el agregado sedimente. La temperatura de hibridación (por ejemplo, medida por  $T_m$ ) varía con el tipo de sal ( $\text{NaCl}$  o  $\text{MgCl}_2$ ) y su concentración. Las composiciones salinas y concentraciones se seleccionan para promover la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas al ácido nucleico a temperaturas de trabajo adecuadas sin inducir la agregación de los coloides en ausencia del ácido nucleico.

La invención también proporciona un método de nanofabricación. El método comprender proporcionar al menos un tipo de oligonucleótido de enlace que tenga una secuencia seleccionada. Un oligonucleótido de enlace usado para la nanofabricación puede tener cualquier secuencia deseada o puede ser monocatenario o bicatenario. También puede contener modificaciones químicas en la base, azúcar, o secciones de la estructura. Las secuencias elegidas para los oligonucleótidos de enlace y sus longitudes y cadenas contribuirán a la rigidez o flexibilidad del nanomaterial o nanoestructura resultante, o una parte del nanomaterial o nanoestructura. Se contempla el uso de un único tipo de oligonucleótido de enlace, así como mezclas de dos o más diferentes tipos de oligonucleótidos de enlace. La cantidad de diferentes oligonucleótidos de enlace usados y sus longitudes contribuirá a las formas, tamaños de poro y otras características estructurales de los nanomateriales y nanoestructuras resultantes.

La secuencia de un oligonucleótido de enlace tendrá al menos una primera parte y una segunda parte para la unión a oligonucleótidos en nanopartículas. La primera, segunda o más partes de unión del oligonucleótidos de enlace pueden tener la mismas o diferentes secuencias.

Si todas las partes de unión de un oligonucleótido de enlace tienen la misma secuencia, solamente necesitará usarse un único tipo de nanopartícula con oligonucleótidos que tengan una secuencia complementaria unidos a la misma para formar un nanomaterial o nanoestructura. Si las dos o más partes de unión de un oligonucleótido de enlace tienen diferentes secuencias, entonces deben usarse dos o más conjugados nanopartícula-oligonucleótido. Véase, por ejemplo, la Figura 17. Los oligonucleótidos en cada una de las nanopartículas tendrán una secuencia complementaria a una de las dos o más partes de unión de la secuencia del oligonucleótido de unión. La cantidad, secuencia o secuencias y longitud o longitudes de las partes de unión y la distancia o distancias, si las hay, entre ellas contribuirá a las propiedades estructurales y físicas de los nanomateriales y nanoestructuras resultantes. Por supuesto, si el oligonucleótido de unión comprende dos o más partes, las secuencias de las partes de unión deben elegirse de modo que no sean complementarias entre sí para evitar que tengan una parte del nucleótido de enlace unida a otra parte.

Los oligonucleótidos de enlace y conjugados nanopartícula-oligonucleótido se ponen en contacto en condiciones eficaces para la hibridación de los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas con los oligonucleótidos de enlace de modo que se forma un nanomaterial o nanoestructura deseado donde las nanopartículas se mantengan juntas por conectores oligonucleotídicos. Estas condiciones de hibridación son bien conocidas en la técnica y pueden optimizarse para un esquema de nanofabricación particular (véase anteriormente). Se prefieren condiciones de hibridación rigurosas.

La invención también proporciona otro método de nanofabricación. Este método comprende proporcionar al menos dos tipos de conjugados nanopartícula-oligonucleótido. Los oligonucleótidos en el primer tipo de nanopartículas tienen una secuencia complementaria a la de los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas. Los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas tienen una secuencia complementaria a la de los oligonucleótidos en el primer tipo de nanopartículas. Los conjugados nanopartícula-oligonucleótido se ponen en contacto en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas entre sí de modo que se forme un nanomaterial o nanoestructura deseado donde las nanopartículas se mantienen juntas por conectores oligonucleotídicos. De nuevo, estas condiciones de hibridación son bien conocidas en la técnica y pueden optimizarse para un esquema de nanofabricación particular.

En ambos métodos de nanofabricación de la invención, se contempla el uso de nanopartículas que tienen uno o más tipos diferentes de oligonucleótidos unidos a las mismas. La cantidad de diferentes oligonucleótidos unidos a una nanopartícula y las longitudes y secuencias de uno o más oligonucleótidos contribuirá a la rigidez y características estructurales de los nanomateriales y nanoestructuras resultantes.

Además, el tamaño, forma y composición química de las nanopartículas contribuirá a las propiedades de los nanomateriales y nanoestructuras resultantes. Estas propiedades incluyen propiedades ópticas, propiedades opto-electrónicas, estabilidad en diversas soluciones, variación del tamaño de poro y de canal, capacidad de separar moléculas bioactivas funcionando como filtro, etc. Se contempla el uso de mezclas de nanopartículas que tienen diferentes tamaños, formas y/o composiciones químicas, así como el uso de nanopartículas que tienen tamaños, formas y composición química uniformes.

En cualquier método de fabricación, las nanopartículas en el nanomaterial o nanoestructura resultante se mantienen juntas por conectores oligonucleotídicos. Las secuencias, longitudes, y cadenas de los conectores oligonucleotídicos, y la cantidad de diferentes conectores oligonucleotídicos presentes contribuirán a la rigidez y propiedades estructurales del nanomaterial o nanoestructura. Si un conector oligonucleotídico es parcialmente bicatenario, su rigidez puede

5 aumentarse por el uso de un oligonucleótido de relleno como se ha descrito anteriormente en relación al método de detección de ácido nucleico. La rigidez de un conector oligonucleotídico completamente bicatenario puede aumentarse por el uso de uno o más oligonucleótidos de refuerzo que tienen secuencias complementarias de modo que se unan al conector oligonucleotídico bicatenario para formar conectores oligonucleotídicos de triple cadena. También se contempla el uso de conectores oligonucleotídicos de cuatro cadenas basados en cuartetos de desoxiguanosina y desoxicitidina.

10 Se ilustran en las figuras varios de una diversidad de sistemas para organizar nanopartículas basados en hibridación de oligonucleótidos. En un sistema simple (Figura 1) un conjunto de nanopartículas tiene oligonucleótidos con una secuencia definida y otro conjunto de nanopartículas tiene oligonucleótidos con una secuencia complementaria. Al mezclar los dos conjuntos de conjugados nanopartícula-oligonucleótido en condiciones de hibridación, los dos tipos de partículas se enlazan por conectores oligonucleotídicos bicatenarios que sirven como espaciadores para colocar las nanopartículas a distancias seleccionadas.

15 Un sistema atractivo para espaciar nanopartículas implica la adición de un oligonucleótido de unión libre como se ilustra en la Figura 2. La secuencia del oligonucleótido de enlace tendrá al menos una primera parte y una segunda parte para unir los oligonucleótidos en las nanopartículas. Este sistema es básicamente igual que el utilizado en el método de detección de ácido nucleico, excepto en que la longitud del oligonucleótido de enlace añadido puede seleccionarse para que sea igual a las longitudes combinadas de los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas. El sistema relacionado 20 ilustrado en la Figura 3 proporciona un medio adecuado para adaptar la distancia entre las nanopartículas sin tener que cambiar los conjuntos de conjugados nanopartícula-oligonucleótido empleados.

25 Una elaboración adicional del esquema para crear espacios definidos entre nanopartículas se ilustra en la Figura 4. En este caso se emplea un segmento bicatenario de ADN o ARN que contiene extremos sobresalientes como el oligonucleótido de enlace. La hibridación de los segmentos monocatenarios, sobresalientes del oligonucleótido de enlace con los oligonucleótidos unidos a las nanopartículas produce múltiples enlaces cruzados de los oligonucleótidos bicatenarios entre las nanopartículas.

30 Pueden generarse nanomateriales y nanoestructuras más rígidos, o partes de los mismos, empleando conectores oligonucleotídicos de triple cadena entre nanopartículas. En la formación de la cadena triple, se puede explotar el motivo pirimidina:purina:pirimidina (Moser, H.E. y Dervan, P.B. *Science*, **283**, 645-650 (1987)) o el motivo purina:purina:pirimidina (Pilch, D.S. *et al. Biochemistry*, **30**, 6081-6087 (1991)). Un ejemplo de la organización de las nanopartículas generando conectores de triple cadena por el motivo pirimidina:purina:pirimidina se ilustra en la Figura 10. En el sistema mostrado en la Figura 10, se conjuga un conjunto de nanopartículas con una cadena definida que 35 contiene nucleósidos de pirimidina y el otro conjunto se conjuga con un oligonucleótido complementario que contiene nucleósidos de purina. La unión de los oligonucleótidos está diseñada de modo que las nanopartículas se separen por el oligonucleótido bicatenario formado en la hibridación. Después, se añade al sistema un oligonucleótido de pirimidina libre con una orientación opuesta a la de la cadena de pirimidina unida a la nanopartícula antes de, simultáneamente con, o justo después de mezclar las nanopartículas. Como la tercera cadena en este sistema se mantiene por apareamiento de bases de Hoogsteen, la triple cadena es relativamente inestable térmicamente. Los enlaces covalentes que abarcan la anchura del dúplex son conocidos por estabilizar los complejos de triple cadena (Salunke, M., Wu, T., Letsinger, R.L., *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 8768-8772, (1992). Letsinger, R.L. y Wu, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 7323-7328 (1995). Prakash, G. y Kool, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3523-3527 (1992).

45 Para la construcción de nanomateriales y nanoestructuras, puede ser deseable en algunos casos “bloquear” el ensamblaje en el sitio por enlaces cruzados covalentes después de la formación del nanomaterial o nanoestructura por hibridación de los componentes oligonucleotídicos. Esto puede conseguirse incorporando grupos funcionales que experimenten una reacción irreversible desencadenada en los oligonucleótidos. Un ejemplo de un grupo funcional para este propósito es un grupo estilbenodicarboxamida. Se ha demostrado que dos grupos de estilbenodicarboxamida 50 alineados con oligonucleótidos hibridados experimentan fácilmente reticulación con irradiación con luz ultravioleta (340 nm) (Lewis, F.D. *et al.* (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 8785-8792).

55 Como alternativa, podría emplearse el desplazamiento de un grupo 5'-O-tosilo de un oligonucleótido, mantenido en la posición 3' a una nanopartícula por un grupo mercaptoalquilo, con un grupo tiofosforilo en el extremo 3' de un oligonucleótido mantenido en una nanopartícula por un grupo mercaptoalquilo. En presencia de un oligonucleótido que hibrida con ambos oligonucleótidos y, por lo tanto, pone el grupo tiofosforilo en proximidad del grupo tosilo, el grupo tosilo se desplazará por el grupo tiofosforilo, generando un oligonucleótido unido en los extremos a dos nanopartículas diferentes. Para reacciones de desplazamiento de este tipo, véase Herrlein *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 10151-10152 (1995). El hecho de que los oligonucleótidos tiofosforilo no reaccionen con nanopartículas de oro en las condiciones empleadas para unir mercaptoalquil-oligonucleótidos a nanopartículas de oro posibilita que se preparen conjugados nanopartícula de oro-oligonucleótido anclados a través del grupo mercapto a las nanopartículas y que contengan un grupo tiofosforilo terminal libre para la reacción de acoplamiento.

65 Una reacción de acoplamiento relacionada para bloquear el sistema de nanopartícula ensamblado en el sitio utiliza el desplazamiento de bromuro de un bromoacetilaminonucleósido terminal por un tiofosforil-oligonucleótido terminal como se describe en Gryaznov y Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3808. Esta reacción procede de forma mucho más parecida al desplazamiento de tosilo descrito anteriormente, excepto en que la reacción es más rápida. Las nanopartículas que tienen oligonucleótidos terminados con grupos tiofosforilo se preparan como se ha descrito anteriormente.

Para la preparación de nanopartículas que tienen oligonucleótidos terminados con grupos bromoacetilamino, primero se prepara un oligonucleótido terminado en un extremo por un aminonucleósido (por ejemplo, 5'-amino-5'-desoxi-  
 5 timidina o 3'-amino-3'-desoxitimidina) y en el otro extremo por un grupo mercaptoalquilo. Las moléculas de este oligonucleótido después se anclan a las nanopartículas a través de los grupos mercapto, y el conjugado nanopartícula-oligonucleótido después se convierte en el derivado N-bromoacetilamino por reacción con un agente acilante de bromoacetilo.

Un cuarto esquema de acoplamiento para bloquear los ensamblajes en el sitio utiliza la oxidación de las nanopartículas que llevan oligonucleótidos terminados por grupos tiofosforilo. Se prefieren agentes oxidantes suaves, tales  
 10 como trioduro potásico, ferricianuro potásico (véase, Gryaznov y Letsinger, *Nucleic Acids Research*, **21**, 1403) u oxígeno.

Además, las propiedades de los nanomateriales y nanoestructuras pueden alterarse incorporando en las cadenas oligonucleotídicas de interconexión funciones orgánicas e inorgánicas que se mantengan en el sitio por unión covalente  
 15 a las cadenas oligonucleotídicas. Se conoce bien una amplia diversidad de estructuras, modificaciones de bases y azúcares (véase, por ejemplo, Uhlmann, E., y Peyman, A. *Chemical Reviews*, **90**, 544-584 (1990)). También, las cadenas oligonucleotídicas podrían reemplazarse por cadenas "de Ácido Péptido Nucleico" (PNA), en la que las bases nucleotídicas se mantienen por una estructura polipeptídica (véase, Wittung, P. *et al.*, *Nature*, **368**, 561-563 (1994)).

Como puede observarse a partir de lo anterior, el método de nanofabricación de la invención es extremadamente versátil. Variando la longitud, secuencia y cadena de los oligonucleótidos de unión, la cantidad, longitud y secuencia de las partes de unión de los oligonucleótidos de enlace, de longitud, secuencia y cantidad de los oligonucleótidos  
 20 unidos a las nanopartículas, el tamaño, forma y composición química de las nanopartículas, la cantidad y tipos de diferentes oligonucleótidos de enlace y nanopartículas usadas, y las cadenas de los conectores oligonucleotídicos, pueden prepararse nanomateriales y nanoestructuras que tienen un amplio intervalo de estructuras y propiedades. Estas estructuras y propiedades pueden variarse adicionalmente por reticulación adicional de los conectores oligonucleotídicos, funcionalizando los oligonucleótidos, por modificaciones en la estructura, base o azúcar de los oligonucleótidos, o por  
 25 el uso de ácidos péptido-nucleicos.

Los nanomateriales y nanoestructuras que pueden fabricarse por el método de nanofabricación de la invención incluyen dispositivos mecánicos a nanoescala, membranas de separación, bio-filtros, y biochips. Se contempla que los nanomateriales y nanoestructuras de la invención pueden usarse como detectores químicos, en ordenadores, para el suministro de fármacos, para modificación de proteínas, y como moldes para la biosíntesis/fabricación de nanoestructuras/ensamblaje dirigido de otras estructuras. Véase en líneas generales, Seeman *et al.*, *New J. Chem.*, **17**, 739 (1993)  
 30 para otras posibles aplicaciones.

Debe observarse que el término "un" o "una" entidad se refiere a uno o más de esa entidad. Por ejemplo, "una característica" se refiere a una o más características de al menos una característica. Por tanto, los términos "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" se usan de forma intercambiable en este documento. También debe observarse  
 40 que los términos "comprendiendo", "incluyendo", y "teniendo" se han usado de forma intercambiable.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Preparación de Nanopartículas de Oro Modificadas con Oligonucleótido

##### A. Preparación de Nanopartículas de Oro

Se prepararon coloides de oro (13 nm de diámetro) por reducción de H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> con citrato como se describe en Frens, *Nature Phys. Sci.*, **241**, 20 (1973) y Grabar, *Anal. Chem.*, **67**, 735 (1995). En resumen, se lavaron todos los objetos de cristal en agua regia (3 partes de HCl, 1 parte de HNO<sub>3</sub>), se aclararon con H<sub>2</sub>O Nanopura, después se secaron en horno antes de su uso. Se adquirió H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> y citrato sódico de Aldrich Chemical Company. H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> acuoso (1 mM, 500 ml) se llevó a reflujo con agitación. Después, se añadió rápidamente citrato sódico 38,8 mM (50 ml). El color de la solución cambió de amarillo pálido a borgoña, y se continuó el reflujo durante 15 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente, la solución roja se filtró a través de un filtro de 1 micrómetro Micron Separations Inc. Los coloides de Au se caracterizaron por espectroscopía UV-vis usando un espectrofotómetro de serie de diodos Hewlett Packard 8452A y por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) usando un microscopio electrónico de transmisión Hitachi 8100. Las partículas de oro con diámetros de 13 nm producirán un cambio de color visible cuando se agregan con las secuencias oligonucleotídicas diana y sonda en el intervalo de 10-35 nucleótidos.  
 50

##### B. Síntesis de Oligonucleótidos

Se sintetizaron oligonucleótidos a una escala de 1 micromol usando un sintetizador de ADN Milligene Expedite en modo de una única columna usando química de fosforamida. Eckstein, F. (ed.) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991). Todas las soluciones se adquirieron de Milligene (calidad de síntesis de ADN). La eficacia de acoplamiento media varió del 98 al 99,8%, y el grupo protector dimetoxitritilo (DMT) final no se escindió de los oligonucleótidos para ayudar en la purificación.  
 65

## ES 2 287 956 T3

Para 3'-tiol-oligonucleótidos, se adquirió un soporte Tiol-Modifier C3 S-S CPG de Glen Research y se usó en el sintetizador automático. Durante la escisión normal del soporte sólido (16 h a 55°C), se añadió ditioneitol (DTT) 0,05 M a la solución de NH<sub>4</sub>OH para reducir el 3' disulfuro al tiol. Antes de la purificación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase inversa, se retiró el exceso de DTT por extracción con acetato de etilo.

5 Para 5'-tiol-oligonucleótidos, se adquirió el reactivo 5'-Tiol-Modifier C<sub>6</sub>-fosforamidita de Glen Research, 44901 Falcon Place, Sterling, Va 20166. Los oligonucleótidos se sintetizaron y el grupo protector DMT final se retiró. Después, se añadió 1 ml de acetonitrilo seco a 100 μmoles del 5'-Tiol Modifier C<sub>6</sub>-fosforamidita. Se mezclaron 200 μl de la solución de amidita y 200 μl de activador (reciente del sintetizador) y se introdujeron en la columna que contenía los oligonucleótidos sintetizados aún en el soporte sólido por una jeringa y bombeando hacia delante y hacia atrás a través de la columna durante 10 minutos. Después se lavó el soporte (2 x 1 ml) con acetonitrilo seco durante 30 segundos. Se introdujeron 700 μl de una mezcla de I<sub>2</sub> 0,016 M/H<sub>2</sub>O/piridina (solución oxidante) en la columna, y después se bombeó hacia delante y hacia atrás a través de la columna con dos jeringas durante 30 segundos. El soporte después se lavó con una mezcla 1:1 de CH<sub>3</sub>CN/piridina (2 x 1 ml) durante 1 minuto, seguido por un lavado final con acetonitrilo seco (2 x 1 ml) con posterior secado de la columna con un chorro de nitrógeno. El grupo protector de tritilo no se retiró, que ayuda a la purificación.

Se realizó HPLC en fase inversa con un sistema Dionex DX500 equipado con una columna hypersil Hewlett Packard ODS (4,6 x 200 mm, 5 mm de tamaño de partícula) usando tampón Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup> OAc<sup>-</sup> 0,03 M (TEAA), pH 7, con un gradiente del 1%/min del 95% de CH<sub>3</sub>CN/5% de TEAA. El caudal fue 1 ml/min con detección UV a 260 nm. Se usó HPLC preparativa para purificar los oligonucleótidos no modificados protegidos con DMT (elución a 27 min). Después de recoger y evaporar el tampón, se escindió el DMT de los oligonucleótidos por tratamiento con ácido acético al 80% durante 30 min a temperatura ambiente. La solución después se evaporó casi a sequedad, se añadió agua, y se extrajo el DMT escindido de la solución acuosa de oligonucleótido usando acetato de etilo. La cantidad de oligonucleótidos se determinó por absorbancia a 260 nm, y se evaluó la pureza final por HPLC en fase inversa (tiempo de elución 14,5 min).

Se usó el mismo protocolo para la purificación de los 3'-tiol-oligonucleótidos, excepto en que se añadió DTT después de la extracción de DMT para reducir la cantidad de disulfuro formado. Después de seis horas a 40°C, se extrajo el DTT usando acetato de etilo, y se volvieron a purificar los oligonucleótidos por HPLC (tiempo de elución 15 minutos).

Para la purificación de los oligonucleótidos modificados con 5' tiol, se realizó HPLC preparativa en las mismas condiciones que para los oligonucleótidos no modificados. Después de la purificación, se retiró el grupo protector de tritilo añadiendo 150 μl de una solución de AgNO<sub>3</sub> 50 mM a la muestra de oligonucleótido seca. La muestra se volvió de color blanco lechoso cuando sucedió la escisión. Después de 20 minutos, se añadieron 200 μl de una solución de 10 mg/ml de DTT para formar complejo con Ag (tiempo de reacción de cinco minutos), y la muestra se centrifugó para precipitar el complejo amarillo. La solución de oligonucleótido (<50 OD) después se transfirió en la columna NAP-5 de desalación (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) para la purificación (contiene medio Sephadex G-25 de Calidad ADN para desalar o intercambio de tampón de oligonucleótidos de más de 10 bases). La cantidad de oligonucleótido modificado con 5' tiol se determinó por espectroscopía UV-vis midiendo la magnitud de la absorbancia a 260 nm. La pureza final se evaluó realizando HPLC de intercambio iónico con una columna Dionex Nucleopac PA-100 (4 x 250) usando una solución de NaOH 10 mM (pH 12) con un gradiente al 2%/min de NaOH 10 mM, solución de NaCl 1 M. Típicamente, se produjeron dos picos con tiempos de elución de aproximadamente 19 minutos y 25 minutos (los tiempos de elución dependen de la longitud de la cadena oligonucleotídica). Estos picos corresponden a los oligonucleótidos tiol y disulfuro respectivamente.

### C. Unión de Oligonucleótidos a Nanopartículas de Oro

50 Se mezcló una solución acuosa de coloides de Au 17 nM (150 μl), preparados como se ha descrito en la parte A anterior, con 3'-tiol-TTTGCTGA 3,75 μM (46 μl), preparado como se ha descrito en la parte B y se dejó reposar durante 24 h a temperatura ambiente en viales con tapón Eppendorf de 1 ml. Se hizo reaccionar una segunda solución de coloides con 3'-tiol-TACCGTTG 3,74 μM (46 μl). Obsérvese que estos oligonucleótidos son no complementarios. Poco antes de su uso, se combinaron cantidades iguales de cada una de las dos soluciones de nanopartículas. Como los oligonucleótidos son no complementarios, no tuvo lugar la reacción.

Las nanopartículas modificadas con oligonucleótidos son estables a elevadas temperaturas (80°C) y elevadas concentraciones salinas (NaCl 1 M) durante días y no se ha observado que experimenten crecimiento de partículas. La estabilidad en las elevadas concentraciones salinas es importante, ya que dichas condiciones son necesarias para las reacciones de hibridación que forman la base de los métodos de detección y nanofabricación de la invención.

65

## Ejemplo 2

*Formación de Agregados de Nanopartículas*

## 5 A. Preparación de Oligonucleótido de Enlace

Se sintetizaron dos oligonucleótidos (no tiolados) como se ha descrito en la parte B del Ejemplo 1. Tenían las siguientes secuencias:

10 3' ATATGCGCGA TCTCAGCAAA [SEC ID N° 1]; y

3' GATCGCGCAT ATCAACGGTA [SEC ID N° 2].

15 La mezcla de estos dos oligonucleótidos en una solución tamponada con fosfato 10 mM, de NaCl 1 M (pH 7,0), produjo hibridación para formar un dúplex que tenía un saliente de 12 pares de bases y dos extremos adhesivos de 8 pares de bases. Cada uno de los extremos adhesivos tenía una secuencia que era complementaria a la de uno de los oligonucleótidos unido a los coloides de Au preparados en la parte C del Ejemplo 1.

## 20 B. Formación de Agregados de Nanopartículas

Los oligonucleótidos de enlace preparados en la parte A de este ejemplo (concentración final de 0,17  $\mu$ M después de dilución con NaCl) se añadieron a los conjugados nanopartícula-oligonucleótido preparados en la parte C del Ejemplo 1 (concentración final 5,1 nM después de dilución con NaCl) a temperatura ambiente. La solución después se diluyó con NaCl acuoso (a una concentración final de 1 M) y se tamponó a pH 7 con fosfato 10 mM, condiciones que son adecuadas para la hibridación de los oligonucleótidos. Se observó un cambio de color inmediato de rojo a púrpura, y se produjo una reacción de precipitación. Véase la Figura 6. Después del transcurso de varias horas, la solución llegó a ser transparente y se sedimentó un precipitado gris rosáceo en la parte inferior del recipiente del vaso de reacción. Véase la Figura 6.

Para verificar que este proceso implicaba tanto los oligonucleótidos como los coloides, el precipitado se recogió y resuspendió (agitando) en NaCl acuoso 1 M tamponado a pH 7. Cualquiera de los oligonucleótidos no hibridados con las nanopartículas se retiró de este modo. Después, se realizó un experimento de disociación por temperatura/tiempo controlando la absorbancia característica para los oligodesoxinucleótidos hibridados (260 nm) y para los coloides agregados que reflejan la distancia entre partículas de oro (700 nm). Véase la Figura 7. Se registraron cambios en la absorbancia a 260 y 700 nm en un Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 UV-vis usando un Peltier PTP-1 Temperature Controlled Cell Holder ciclando la temperatura a un índice de 1°C /minuto entre 0°C y 80°C. Las soluciones de ADN eran de aproximadamente 1 unidad de absorbancia (OD), tamponadas a pH 7 usando tampón fosfato 10 mM y una concentración de NaCl 1 M.

Los resultados se muestran en la Figura 8A. Como la temperatura se cicló entre 0°C y 80°C (que está 38°C por encima de la temperatura de disociación ( $T_m$ ) para el dúplex ( $T_m = 42^\circ\text{C}$ )), hubo una excelente correlación entre las señales ópticas tanto para los coloides como para los oligonucleótidos. El espectro UV-vis para coloides de Au desnudos fue mucho menos dependiente de la temperatura, Figura 8B.

Hubo un cambio óptico visible sustancial cuando se calentó el precipitado oligonucleótido polimérico-coloiide por encima de su punto de fusión. Esta solución transparente se volvió rojo oscuro según se deshibridó el biomaterial polimérico para generar los coloides no unidos que son solubles en la solución acuosa. El proceso fue reversible, como se evidencia por los rastreos de temperatura en la Figura 8A.

En un experimento de control, se demostró que un dúplex 14-T:14-A era ineficaz para inducir una agregación reversible de las partículas coloides de Au. En otro experimento de control, se descubrió que un dúplex oligonucleotídico de enlace con cuatro desapareamientos de pares de bases en los extremos adhesivos no inducía agregación de partículas reversible de nanopartículas modificadas con oligonucleótido (preparadas como se describe en la parte C del Ejemplo 1 y que reaccionaron como se ha descrito anteriormente). En un tercer experimento de control, oligonucleótidos no tiolados que tienen secuencias complementarias a los extremos adhesivos del oligonucleótido de enlace y que reaccionaron con nanopartículas no produjeron agregación reversible cuando se combinaron las nanopartículas con el oligonucleótido de enlace.

Se obtienen evidencias adicionales del proceso de polimerización/ensamblaje de estudios de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) del precipitado. Se realizó TEM en un Microscopio Electrónico de Transmisión Hitachi 8100. Se preparó una muestra típica echando gota a gota 100  $\mu$ l de solución de coloiide en una rejilla de carbono con agujeros. La rejilla, después, se secó al vacío y se formaron imágenes de ella. Las imágenes TEM de coloides de Au unidos por oligonucleótidos hibridados mostraron grandes redes ensambladas de los coloides de Au, Figura 9. Los coloides de Au desnudos no se agregan en condiciones comparables sino que se dispersan o experimentan reacciones de crecimiento de partículas. Hayat, *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications* (Academic Press, San Diego, 1991). Obsérvese que no hay evidencias de crecimiento de las partículas coloidales en los experimentos rea-

## ES 2 287 956 T3

lizados hasta la fecha; los coloides hibridados parecen ser remarcadamente regulares en el tamaño con un diámetro medio de 13 nm.

5 Con TEM, se obtiene una superposición de capas, haciendo difícil evaluar el grado de orden para los agregados tridimensionales. Sin embargo, imágenes a escala más pequeña de agregados una única capa, bidimensionales proporcionaron más evidencias del proceso de auto-ensamblaje, Figura 9B. Pueden observarse ensamblajes compactados estrechamente de los agregados con separaciones de partículas uniformes de aproximadamente 60 Å. Esta distancia es algo más corta que el espaciado estimado de 95 Å esperado para coloides conectados por híbridos oligonucleotídicos rígidos con las secuencias que se usaron. Sin embargo, a causa de las mellas del dúplex obtenido después de hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con los oligonucleótidos de enlace, estos no eran híbridos rígidos y eran bastante flexibles. Debe observarse que esto es una variable que puede controlarse reduciendo el sistema de cuadro cadenas sobresalientes a tres (reduciendo de este modo la cantidad de mellas) o usando triples cadenas en lugar de dúplex.

### 15 Ejemplo 3

#### *Preparación de Nanopartículas de Oro Modificadas con Oligonucleótido*

20 Se prepararon coloides de oro (diámetro de 13 nm) como se ha descrito en el Ejemplo 1. También se prepararon tiol-oligonucleótidos [HS(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>OP(O)(O<sup>-</sup>)-oligonucleótido] como se ha descrito en el Ejemplo 1.

25 Se descubrió que el método para unir tiol-oligonucleótidos a nanopartículas de oro descrito en el Ejemplo 1 no producía resultados satisfactorios en algunos casos. En particular, cuando se usaban oligonucleótidos largos, los conjugados oligonucleótido-coloides no eran estables en presencia de un gran exceso de ADN de esperma de salmón de elevado peso molecular usado como modelo para el ADN de fondo que normalmente estaría presente en un sistema de diagnóstico. La mayor exposición de los coloides a los tiol-oligonucleótidos produjo conjugados oligonucleótido-coloides que eran estables para el ADN de esperma de salmón, pero los conjugados resultantes no lograron hibridar satisfactoriamente. La experimentación adicional condujo al siguiente procedimiento para unir tiol-oligonucleótidos de cualquier longitud a coloides de oro de modo que los conjugados fueran estables para un ADN de elevado peso molecular e hibridaran satisfactoriamente.

30 Se mezcló 1 ml de solución de los coloides de oro (17 nm) en agua con exceso de tiol-oligonucleótido (de 28 bases de longitud) (3,68 μM) en agua, y se dejó que la mezcla reposara durante 12-24 horas a temperatura ambiente. Después, se premezclaron 100 μl de un tampón de hidrogenofosfato sódico 0,1 M, pH 7,0, y 100 μl de NaCl 1,0 M y se añadieron. Después de 10 minutos, se añadieron 10 μl de NaN<sub>3</sub> acuoso al 1%, y se dejó que la mezcla reposara durante 40 horas adicionales. Esta etapa "de envejecimiento" se diseñó para aumentar el cubrimiento de la superficie por los tiol-oligonucleótidos y para desplazar las bases de los oligonucleótidos de la superficie de oro. Se obtuvieron manchas rojas mejor definidas, algo más limpias en ensayos posteriores si la solución se congelaba en un baño de hielo seco después de 40 horas de incubación y después se descongelaba a temperatura ambiente. De cualquier modo, la solución después se centrifugó a 14.000 rpm en una centrifuga Eppendorf 5414 durante aproximadamente 15 minutos para dar un sobrenadante rosa muy pálido que contenía la mayoría del oligonucleótido (como se indica por la absorbancia a 260 nm) junto con un 7-10% del oro coloidal (como se indica por la absorbancia de 520 nm), y un residuo gelatinoso, oscuro, compacto en la parte inferior del tubo. Se retiró el sobrenadante, y se resuspendió el residuo en aproximadamente 200 μl de tampón (fosfato 10 mM, NaCl 0,1 M) y se volvieron a centrifugar. Después de la retirada de la solución sobrenadante, el residuo se captó en 1,0 ml de tampón (fosfato 10 mM, NaCl 0,1 M) y 10 μl de una solución acuosa al 1% de NaN<sub>3</sub>. Se ayudó a la disolución introduciéndola y sacándola de una pipeta varias veces. La solución maestra roja resultante era estable (es decir, permanecía roja y no se agregaba) en reposo durante meses a temperatura ambiente, al aplicarla puntualmente en placas de cromatografía de capa fina (TLC) de sílice (véase el Ejemplo 4), y al añadir la NaCl 2 M, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, o soluciones que contienen elevadas concentraciones de ADN de esperma de salmón.

### 50 Ejemplo 4

#### *Aceleración de Hibridación de Conjugados de Nanopartícula-Oligonucleótido*

55 Los conjugados de oligonucleótido-coloides de oro I y II ilustrados en la Figura 11 se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 3. La hibridación de estos dos conjugados fue extremadamente lenta. En particular, la mezcla de las muestras de conjugados I y II en NaCl acuoso 0,1 M o en MgCl<sub>2</sub> 10 mM más NaCl 0,1 M y permitiendo que la mezcla repose a temperatura ambiente durante un día produjo poco o ningún cambio de color.

60 Se descubrieron dos modos de mejorar la hibridación. En primer lugar, se obtuvieron resultados más rápidos congelando la mezcla de conjugados I y II (cada uno contenía 15 nM en una solución de NaCl 0,1 M) en un baño de alcohol isopropílico-hielo seco durante 5 minutos y después descongelando la mezcla a temperatura ambiente. La solución descongelada mostraba un color azulado. Cuando se aplicaba puntualmente 1 μl de la solución en una placa de sílice C-18 TLC convencional (Alltech Associates), se observó inmediatamente un color azul intenso. La hibridación y posterior cambio de color causado por el procedimiento de congelación-descongelación era reversible. Al calentar la solución hibridada a 80°C, la solución se volvía roja y producía una mancha rosa en una placa de TLC. La posterior congelación y descongelación volvió al sistema a un estado hibridado (azul) (tanto la solución como la

## ES 2 287 956 T3

mancha en una placa C-18 TLC). En un experimento similar en el que no se volvió a congelar la solución, la mancha obtenida en la placa C-18 TLC era rosa.

Un segundo modo para obtener resultados más rápidos es calentar los conjugados y la diana. Por ejemplo, en otro experimento, se calentaron los conjugados de oligonucleótido-coloide de oro y una secuencia diana oligonucleotídica en una solución de NaCl 0,1 M rápidamente a 65°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante un período de 20 minutos. Al aplicarla puntualmente sobre la placa de sílice C-18 y secarla, se obtuvo una mancha azul indicativa de hibridación. En contraste, la incubación de los conjugados y la diana a temperatura ambiente durante una hora en solución de NaCl 0,1 M no produjo un color azul indicativo de hibridación. La hibridación es más rápida en NaCl 0,3 M.

### Ejemplo 5

#### *Ensayos Usando Conjugados Nanopartícula-Oligonucleótido*

Los conjugados oligonucleótido-coloide de oro 1 y 2 ilustrados en la Figura 12 se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 3, y la diana oligonucleotídica 3 ilustrada en la Figura 12 se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se adquirieron dianas desapareadas y de delección 4, 5, 6 y 7 de Northwestern University Biotechnology Facility, Chicago, IL. Estos oligonucleótidos se sintetizaron a una escala de 40 nmol y se purificaron en un cartucho C18 de fase inversa (OPC). Su pureza se determinó realizando HPLC de intercambio iónico.

Se consiguió hibridación selectiva calentando rápidamente y después enfriando rápidamente a la temperatura rigurosa. Por ejemplo, se realizó hibridación en 100  $\mu$ l de NaCl 0,1 M más MgCl<sub>2</sub> 5 mM que contenía 15 nM de cada conjugado oligonucleótido-coloide 1 y 2, y 3 nanomoles del oligonucleótido diana 3, 4, 5, 6, ó 7, calentando a 74°C, enfriando a las temperaturas indicadas en la siguiente Tabla 1, e incubando la mezcla a esta temperatura durante 10 minutos. Después se aplicó puntualmente una muestra de 3  $\mu$ l de cada mezcla de reacción sobre una placa de sílice C-18 TLC. Al secarse (5 minutos), apareció color azul intenso si había tenido lugar la hibridación.

Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 1. Las manchas rosas significan un ensayo negativo (es decir, que las nanopartículas no se juntaron por hibridación), y las manchas azules significan un ensayo positivo (es decir, que las nanopartículas se pusieron en proximidad debido a la hibridación que implica los conjugados oligonucleótido-coloide).

TABLA 1

35

REACTIVOS	RESULTADOS (COLOR)			
	45°C	50°C	60°C	74°C
1 + 2	ROSA	ROSA	ROSA	ROSA
1 + 2 + 3 (coincidente)	AZUL	AZUL	AZUL	AZUL
1 + 2 + 4 (mitad de desapareamiento del complemento)	ROSA	ROSA	ROSA	ROSA
1 + 2 + 5 (-6 pb)	AZUL	ROSA	ROSA	ROSA
1 + 2 + 6 (desapareamiento de 1 pb)	AZUL	AZUL	ROSA	ROSA
1 + 2 + 7 (desapareamiento de 2 pb)	ROSA	ROSA	ROSA	ROSA

50

Como puede observarse en la Tabla 1, la hibridación a 60°C dio una mancha azul solamente para la diana 3 completamente apareada. La hibridación a 50°C produjo manchas azules con las dianas tanto 3 como 6. La hibridación a 45°C dio manchas azules con las dianas 3, 5 y 6.

55

En una serie relacionada, se descubrió una diana que contenía un único nucleótido desapareado T que da un ensayo positivo a 58°C (color azul) y un ensayo negativo (color rojo) a 64°C con conjugados 1 y 2. En las mismas condiciones, la diana completamente apareada (3) dio un ensayo positivo a ambas temperaturas, mostrando que el ensayo puede discriminar entre una diana que está completamente apareada y una que contiene una única base desapareada.

60

Se consiguieron resultados similares usando un método de hibridación diferente. En particular, se consiguió hibridación selectiva congelando, descongelando y después calentando rápidamente a la temperatura rigurosa. Por ejemplo, se realizó hibridación en 100  $\mu$ l de NaCl 0,1 M que contenía 15 nM de cada conjugado oligonucleótido-coloide 1 y 2, y 10 picomoles de oligonucleótido diana 3, 4, 5, 6, ó 7, congelando en un baño de alcohol isopropílico con hielo seco durante 5 minutos, descongelando a temperatura ambiente, después calentando rápidamente a las temperaturas indicadas en la siguiente Tabla 2, e incubando la mezcla a esta temperatura durante 10 minutos. Después se aplicó puntualmente una muestra de 3  $\mu$ l de cada mezcla de reacción en una placa de sílice C-18 TLC. Los resultados se presentan en la Tabla 2.

65

TABLA 2

Reactivos (sondas) + diana	Resultados (color)				
	TA	35°C	40°C	54°C	64°C
(1 + 2) + 3	azul	azul	azul	azul	rosa
(1 + 2)	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa
(1 + 2) + 4	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa
(1 + 2) + 5	azul	azul	rosa	rosa	rosa
(1 + 2) + 6	azul	azul	azul	rosa	rosa
(1 + 2) + 7	azul	rosa	rosa	rosa	rosa

Una importante característica de estos sistemas fue que el cambio de color asociado con el cambio de temperatura fue muy brusco, sucediendo sobre un intervalo de temperatura de aproximadamente 1°C. Esto indica una elevada cooperatividad en los procesos de fusión y asociación que implican los conjugados coloides y posibilitan que se discrimine fácilmente entre dianas oligonucleotídicas que contienen una secuencia completamente apareada y un único desapareamiento de par de bases.

El elevado grado de discriminación puede atribuirse a dos características. La primera es que la alineación de dos segmentos oligonucleotídicos de sonda relativamente corta (15 nucleótidos) en la diana es necesaria para una señal positiva. Un desapareamiento en cualquier segmento es más desestabilizante que un desapareamiento en una sonda más larga (por ejemplo, un oligonucleótido de 30 bases de longitud) en un sistema de detección de dos componentes comparable. En segunda lugar, la señal a 260 nm, obtenida en hibridación de los oligonucleótidos diana con los conjugados de nanopartícula en solución, se basa en nanopartícula, no en ADN. Depende de la disociación de un ensamblaje de nanopartículas organizado en una red polimérica por múltiples dúplex oligonucleotídicos. Esto provoca un estrechamiento del intervalo de temperatura que se observa para la disociación del agregado, en comparación con desnaturalización térmica de ADN convencional. En resumen, algunos dúplex en los agregados reticulados pueden disociarse sin dispersar las nanopartículas en solución. Por lo tanto, el intervalo de temperatura para la fusión del agregado es muy estrecha (4°C) en comparación con el intervalo de temperatura asociado con la fusión del sistema comparable sin nanopartículas (12°C). Incluso más llamativo y ventajoso para este enfoque de detección es el intervalo de temperatura para la respuesta colorimétrica (<1°C) que se observa en las placas de sílice C-18. En principio, esta estrategia basada en nanopartícula de tres componentes será más selectiva que cualquier sistema de detección de dos componentes basado en una sonda de una única cadena que hibrida con el ácido nucleico diana.

Se preparó una solución maestra que contenía 1 nmol de diana 3 en 100  $\mu$ l de tampón de hibridación (NaCl 0,3 M, fosfato 10 mM, pH 7). Un  $\mu$ l de esta solución corresponde a 10 picomoles de oligonucleótido diana. Se realizaron diluciones en serie tomando una alícuota de la solución maestra y diluyéndola a la concentración deseada con tampón de hibridación. La Tabla 3 muestra la sensibilidad obtenida usando 3  $\mu$ l de una mezcla de sondas 1 y 2 con diferentes cantidades de diana 3. Después de realizar la hibridación usando condiciones de congelación-descongelación, se aplicaron puntualmente alícuotas de 3  $\mu$ l de estas soluciones en placas TLC C-18 para determinar el color. En la siguiente Tabla 3, rosa significa un ensayo negativo, y azul significa un ensayo positivo.

TABLA 3

Cantidad de diana	Resultados
1 picomol	azul (positivo)
200 femtomoles	azul (positivo)
100 femtomoles	azul (positivo)
20 femtomoles	azul (positivo)
10 femtomoles	purpúreo (ambiguo)

## ES 2 287 956 T3

Este experimento indica que 10 femtomoles es el límite inferior de detección para este sistema particular.

### Ejemplo 6

#### 5 *Ensayos para Usar Conjugados Nanopartícula-Oligonucleótido*

Se adsorbieron nanopartículas modificadas con ADN en sustratos transparentes modificados como se muestra en la Figura 13B, paneles 1-6. Este método implicaba la unión de nanopartículas modificadas con ADN a nanopartículas que se unieron a un sustrato de vidrio, usando interacciones de hibridación de ADN.

10

Se adquirieron portaobjetos de microscopio de vidrio de Fisher. Los portaobjetos se cortaron en trozos de aproximadamente 5 x 15 mm, usando un lápiz de grabado con punta de diamante. Los portaobjetos se limpiaron impregnándolos durante 20 minutos en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4:1 a 50°C. Después se aclararon los portaobjetos con cantidades abundantes de agua, después etanol, y se secaron en un chorro de nitrógeno seco. Para funcionalizar la superficie del portaobjetos con un silano terminado en tiol, los portaobjetos se impregnaron en una solución etanólica de mercaptopropiltrimetoxisilano al 1% (en volumen) desgasificada durante 12 horas. Los portaobjetos se retiraron de las soluciones de etanol y se aclararon con etanol, después con agua. Las nanopartículas se adsorbieron en la superficie terminada en tiol de los portaobjetos impregnando en soluciones que contenían las nanopartículas de oro de 13 nanómetros de diámetro (preparación descrita en el Ejemplo 1). Después de 12 horas en las soluciones coloidales, se retiraron los portaobjetos y se aclararon con agua. Los portaobjetos resultantes tienen un aspecto rosa debido a las nanopartículas adsorbidas y muestran perfiles de absorbancia UV-vis similares (pico de absorbancia en plasmón superficial a 520 nm) a las soluciones coloidales acuosas de nanopartículas de oro. Véase la Figura 14A.

15

Se unió el ADN a la superficie modificada de las nanopartículas impregnando los portaobjetos de vidrio en solución 0,2 OD (1,7 μM) que contenía oligonucleótido 3' tiol recién purificado (3' tiol ATGCTCAACTCT [SEC ID N° 33]) (sintetizado como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 3). Después de 12 horas de tiempo de impregnado, los portaobjetos se retiraron y se aclararon con agua.

20

Para demostrar la capacidad de una cadena de ADN analito de unir nanopartículas al sustrato modificado, se preparó un oligonucleótido de enlace. El oligonucleótido de enlace (preparado como se describe en el Ejemplo 2) era de 24 pb de longitud (5'TACGAGTTGAGAATCCTGAATGCG [SEC ID N° 34]) con una secuencia que contenía un extremo de 12 pb que era complementario al ADN ya adsorbido en la superficie del sustrato (SEC ID N° 33). El sustrato después se impregnó en un tampón de hibridación (NaCl 0,5 M, tampón fosfato 10 mM pH 7) que contenía el oligonucleótido de enlace (0,4 OD, 1,7 μM) durante 12 horas. Después de la retirada y aclarar con tampón similar, el sustrato se impregnó en una solución que contenía nanopartículas de oro de 13 nm de diámetro que se habían modificado con un oligonucleótido (TAGGACTTACGC 5' tiol [SEC ID N° 35]) (preparado como se ha descrito en el Ejemplo 3) que es complementario a la parte no hibridada del oligonucleótido de enlace unido al sustrato. Después de 12 horas de impregnación, el sustrato se retiró y aclaró con el tampón de hibridación. El color del sustrato se había oscurecido a un color púrpura y la absorbancia UV-vis a 520 nm aproximadamente se dobló (Figura 14A).

30

Para verificar que las nanopartículas de oro modificadas con oligonucleótidos se unían a la superficie modificada del oligonucleótido/nanopartícula a través de interacciones de hibridación de ADN con el oligonucleótido de enlace, se realizó una curva de fusión. Para el experimento de fusión, se colocó el sustrato en una cubeta que contenía 1 ml de tampón de hibridación y se usó el mismo aparato usado en el Ejemplo 2, parte B. La señal de absorbancia debida a las nanopartículas (520 nm) se controló según aumentaba la temperatura del sustrato a un índice de 0,5°C por minuto. La señal de la nanopartícula disminuyó drásticamente cuando la temperatura pasó los 60°C. Véase la Figura 14B. Una primera derivada de la señal mostró una temperatura de fusión de 62°C, que corresponde con la temperatura observada en las tres secuencias de ADN hibridadas en solución sin nanopartículas. Véase la Figura 14B.

35

### 50 Ejemplo 7

#### *Ensayos Usando Conjugados Nanopartícula-Oligonucleótido*

El sistema de detección ilustrado en la Figura 15 se diseñó de modo que dos sondas 1 y 2 se alinearan de un modo cola-con-cola en una diana complementaria 4 (véase la Figura 15). Esto difiere del sistema descrito en el Ejemplo 5 donde las dos sondas se alinean de forma contigua en la cadena diana (véase la Figura 12).

55

Los conjugados 1 y 2 oligonucleótido-nanopartícula de oro ilustrados en la Figura 15 se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 3, excepto en que las nanopartículas se volvieron a dispersar en tampón de hibridación (NaCl 0,3 M, fosfato 10 mM, pH 7). La concentración final de conjugado nanopartícula-oligonucleótido se estimó a 13 nM midiendo la reducción en la intensidad de la banda de plasmón superficial a 522 nm que da lugar al color rojo de las nanopartículas. Las dianas oligonucleotídicas ilustradas en la Figura 15 se adquirieron del Northwestern University Biotechnology Facility, Evanston, IL.

60

Cuando se mezclaron 150 μl de tampón de hibridación que contenía los conjugados 1 y 2 oligonucleótido-nanopartícula 13 nM con 60 picomoles (6 μl) de diana 4, el color de la solución cambia inmediatamente de rojo a púrpura. Este cambio de color sucede como resultado de la formación de grandes redes poliméricas unidas al oligonucleótidos de nanopartículas de oro, que conduce a un cambio rojo en la resonancia de plasmón superficial de las nanopartículas.

65

## ES 2 287 956 T3

Cuando la solución se dejó reposar durante 2 horas, se observó precipitación de grandes agregados macroscópicos. Se realizó un “análisis de fusión” de la solución con los agregados suspendidos. Para realizar el “análisis de fusión”, la solución se diluyó a 1 ml con tampón de hibridación, y se registró la señal óptica de los agregados a 260 nm a intervalos de un minuto según se aumentaba la temperatura de 25°C a 75°C, con un tiempo de mantenimiento de 1 minuto/grado. Coherente con la caracterización del agregado como polímero de oligonucleótido-nanopartícula, se observó una transición brusca característica (anchura completa a la mitad del máximo,  $FW_{1/2}$  de la primera derivada = 3,5°C) con una “temperatura de fusión” ( $T_m$ ) de 53,5°C. Esto se compara bien con la  $T_m$  asociada con la transición más ancha observada para oligonucleótidos sin nanopartículas ( $T_m = 54^\circ\text{C}$ ,  $FW_{1/2} = \sim 13,5^\circ\text{C}$ ). El “análisis de fusión” de la solución de oligonucleótido sin nanopartículas se realizó en condiciones similares que el análisis con nanopartículas, excepto en que la temperatura se aumentó de 10-80°C. Además, la solución era de 1,04  $\mu\text{M}$  en cada componente de oligonucleotídico.

Para ensayar la selectividad del sistema, la  $T_m$  para el agregado formado a partir del complemento perfecto 4 de las sondas 1 y 2 se comparó con las  $T_m$  para agregados formados a partir de dianas que contenían desapareamientos de una base, delecciones o inserciones (Figura 15).

Significativamente, todos los agregados de nanopartícula de oro-oligonucleótido que contenían dianas imperfectas mostraban una desestabilización significativa, medible cuando se comparaba con los agregados formados a partir de complemento perfecto, como es evidente por los valores de  $T_m$  para los diversos agregados (véase Figura 15). Las soluciones que contienen las dianas imperfectas podrían distinguirse fácilmente de la solución que contiene el complemento perfecto por su color cuando se coloca en un baño de agua mantenido a 52,5°C. Esta temperatura está por encima de la  $T_m$  de los polinucleótidos desapareados, de modo que solamente la solución con la diana perfecta mostraba un color púrpura a esta temperatura. También se realizó un “análisis de fusión” en la solución de sonda que contenía la diana complementaria a la mitad. Se observó solamente un aumento de un minuto en la absorbancia 260 nm.

A continuación, se añadieron 2  $\mu\text{l}$  (20 picomoles) de cada una de las dianas oligonucleotídicas (Figura 15) a una solución que contenía 50  $\mu\text{l}$  de cada sonda (13 nM) en tampón de hibridación. Después de reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente, las soluciones se transfirieron a un baño de agua de temperatura controlada y se incubaron a las temperaturas indicadas en la siguiente Tabla 4 durante cinco minutos. Después se aplicó puntualmente una muestra de 3  $\mu\text{l}$  de cada mezcla de reacción en una placa de sílice C-18. Se realizaron dos experimentos de control para demostrar que la alineación de ambas sondas en la diana es necesaria para desencadenar la agregación y, por lo tanto, un cambio de color. El primer experimento de control constaba de ambas sondas 1 y 2 sin diana presente. El segundo experimento de control constaba de ambas sondas 1 y 2 con una diana 3 que es complementaria solamente a una de las secuencias de sonda (Figura 15). Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 4. Las manchas rosas significan un ensayo negativo, y las manchas azules significan un ensayo positivo.

Notablemente, la transición colorimétrica que puede detectarse a simple vista sucede sobre menos de 1°C, permitiendo de este modo distinguir fácilmente la diana perfecta 4 de las dianas con desapareamientos (5 y 6), una delección en el extremo (7), una inserción de una base en el punto de la diana donde coinciden las dos sondas oligonucleotídicas (8) (véase la Tabla 4). Obsérvese que la  $T_c$  de transición colorimétrica está cercana en temperatura, pero no idéntica, a la  $T_m$ . En ambos controles, no hubo signos de agregación de partículas o inestabilidad en las soluciones, como es evidente por el color rojo rosáceo que se observó a todas las temperaturas, y mostraron manchas negativas (rosas) en el ensayo de placa a todas las temperaturas (Tabla 4).

La observación de que la diana se inserción de una base 8 puede diferenciarse de la diana completamente complementaria 4 es verdaderamente remarcable dada la complementariedad completa de la cadena de inserción con las dos secuencias de sonda. La desestabilización del agregado formado a partir de 8 y las sondas de nanopartícula parece deberse al uso de dos sondas cortas y a la pérdida de adhesión de bases entre las dos bases de timidina donde la cola de la sonda coincide cuando hibrida con la diana completamente complementaria. Se observó un efecto similar cuando se hibridó una diana que contiene una inserción de tres pares de bases (CCC) a las sondas en condiciones comparables ( $T_m = 51^\circ\text{C}$ ). En el sistema descrito anteriormente en el Ejemplo 5, las dianas con inserciones de pares no podían distinguirse de la diana completamente complementaria. Por lo tanto, el sistema descrito en este ejemplo es muy favorable en términos de selectividad. Este sistema también mostró la misma sensibilidad que el sistema descrito en el Ejemplo 5, que es aproximadamente 10 femtomoles sin técnicas de amplificación.

Los resultados indican que cualquier desapareamiento de una base a lo largo de la cadena diana puede detectarse, junto con cualquier inserción en la cadena diana. Es importante observar que el intervalo de temperatura sobre el que puede detectarse un cambio de color es extremadamente brusco, y el cambio sucede sobre un intervalo de temperatura muy estrecho. Esta transición brusca indica que hay un gran grado de cooperatividad en el proceso de fusión que implica la gran red de coloides que se unen por las cadenas de oligonucleótido diana. Esto conduce la remarcable selectividad que se muestra por los datos.

TABLA 4

Reactivos (sondas) + diana	Resultados (color)					
	TA	47,6°C	50,5°C	51,4°C	52,7°C	54,5°C
(1+2)	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa
(1+2)+3	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa
(1+2)+4	azul	azul	azul	azul	azul	rosa
(1+2)+5	azul	azul	azul	rosa	rosa	rosa
(1+2)+6	azul	rosa	rosa	rosa	rosa	rosa
(1+2)+7	azul	azul	azul	azul	rosa	rosa
(1+2)+8	azul	azul	rosa	rosa	rosa	rosa

## Ejemplo 8

*Ensayos Usando Conjugado Nanopartícula-Oligonucleótido*

Se realizó un conjunto de experimentos que implican la hibridación con oligonucleótidos dúplex “de relleno”. Los conjugados 1 y 2 nanopartícula-oligonucleótido ilustrados en la Figura 16 se incubaron con dianas de diferentes longitudes (24, 48 y 72 bases de longitud) y oligonucleótidos de relleno complementarios, como se ilustra en la Figura 16. Para todo lo demás, las condiciones fueron como se han descrito en el Ejemplo 7. Además, los oligonucleótidos y conjugados nanopartícula-oligonucleótidos se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 7.

Como se esperaba, las diferentes *soluciones* de reacción tenían propiedades ópticas marcadamente diferentes después de la hibridación debido a las propiedades ópticas dependientes de la distancia de las nanopartículas de oro. Véase la siguiente Tabla 5. Sin embargo, cuando estas soluciones se aplicaron puntualmente sobre una placa C-18 TLC, se desarrolló un color azul después de secar a temperatura ambiente u 80°C, independientemente de la longitud del oligonucleótido diana y la distancia entre los nanopartículas de oro. Véase la Tabla 5. Esto sucede probablemente porque el soporte sólido potencia la agregación de los conjugados oligonucleótido-nanopartícula hibridados. Esto demuestra que aplicando puntualmente soluciones en la placa TLC, la distancia entre las nanopartículas de oro puede ser sustancial (al menos 72 bases), y la detección colorimétrica aún es posible.

TABLA 5

LONGITUD DE LA DIANA	RESULTADOS (COLOR)	
	SOLUCIÓN	PLACA TLC
24 BASES	AZUL	AZUL
48 BASES	ROSA	AZUL
72 BASES	ROSA	AZUL
SOLAMENTE SONDAS 1 + 2	ROSA	ROSA

Los cambios de color observados en este y otros ejemplos sucede cuando la distancia entre las nanopartículas de oro (la distancia entre partículas) es aproximadamente igual o menor que el diámetro de la nanopartícula. Por tanto, el tamaño de las nanopartículas, el tamaño de los oligonucleótidos unidos a las mismas, y el espaciado de las nanopartículas cuando están hibridadas al ácido nucleico diana afectan al cambio de color que se observará cuando los conjugados oligonucleótido-nanopartícula hibridan con las dianas de ácido nucleico para formar agregados. Por ejemplo, las nanopartículas de oro con diámetros de 13 nm producirán un cambio de color cuando se agregan usando oligonucleótidos unidos a las nanopartículas diseñadas para hibridar con secuencias diana de 10-35 nucleótidos de

## ES 2 287 956 T3

longitud. El espaciado de la nanopartículas cuando están hibridadas con el ácido nucleico diana adecuado para dar un cambio de color variará con el grado de agregación, como demuestran los resultados. Los resultados también indican que la superficie sólida potencia la agregación adicional de muestras ya agregadas, poniendo las nanopartículas de oro cercanamente juntas.

El cambio de color observado con las nanopartículas de oro se puede atribuir a un cambio y ensanchamiento de la resonancia de plasmón superficial del oro. Este cambio de color es poco probable para nanopartículas de oro de menos de aproximadamente 4 nm de diámetro porque las longitudes de los oligonucleótidos necesarias para la detección específica de ácido nucleico excederían el diámetro de la nanopartícula.

### Ejemplo 9

#### *Ensayos Usando Conjugados Nanopartícula-Oligonucleótido*

Se combinaron cinco microlitros de cada sonda 1 y 2 (Figura 12) a una concentración final de NaCl 0,1 M con tampón (fosfato 10 mM, pH 7), y se añadió 1 microlito de orina humana a la solución. Cuando esta solución se congeló, descongeló y después se aplicó puntualmente en una placa TLC C-18, no se desarrolló un color azul. A una solución similar que contenía 12,5 microlitros de cada sonda y 2,5 microlitros de orina humana, se añadieron 0,25 microlitros (10 picomoles) de diana 3 (Figura 12). La solución se congeló, descongeló y después se aplicó puntualmente en una placa TLC C-18 y se obtuvo una mancha azul.

Se realizaron experimentos similares en presencia de saliva humana. Se calentó una solución que contenía 12,5 microlitros de cada sonda 1 y 2 y 0,25 microlitros de diana 3 a 70°C. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadieron 2,5 microlitros de una solución de saliva (saliva humana diluida 1:10 con agua). Después de que la solución resultante se congelara, descongelara y se aplicara puntualmente en una placa TLC C-18, se obtuvo una mancha azul, que indica hibridación de las sondas con la diana. En experimentos de control sin diana añadida, no se observaron manchas azules.

### Ejemplo 10

#### *Ensayos Usando Conjugados Nanopartícula-Oligonucleótido*

Se realizó un ensayo como se ilustra en la Figura 13A. Primero, se cortaron portaobjetos de vidrio de microscopio, adquiridos de Fisher, en trozos de aproximadamente 5 x 15 mm, usando un lápiz de grabado con punta de diamante. Los portaobjetos se limpiaron impregnándolos durante 20 minutos en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4:1 a 50°C. Después se aclararon los portaobjetos con cantidades abundantes de agua, después etanol, y se secaron en un chorro de nitrógeno seco. El ADN modificado con tiol se adsorbió en los portaobjetos usando un procedimiento modificado presentado en la bibliografía (Chrissey *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3031-3039 (1996) y Chrissey *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3040-3047 (1996)). Primero, los portaobjetos se impregnaron en una solución al 1% de trimetoxisilpropildietiltriamina (DETA, adquirida de United Chemical Technologies, Bristol, PA) en ácido acético 1 mM en agua Nanopura durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se aclararon con agua, después etanol. Después de secar con un chorro de nitrógeno seco, los portaobjetos se cocieron a 120°C durante 5 minutos usando un bloque de calentamiento de temperatura controlada. Los portaobjetos se dejaron enfriar, después se impregnaron en una solución 1 mM de 4-(maleimidofenil)-butirato de succinimidilo (SMPB, adquirido de Sigma Chemicals) en metanol:dimetilsulfóxido 80:20 durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de SMPB y aclarar con etanol, los sitios amina que no se habían acoplado al reticulante SMPB se terminaron del siguiente modo. Primero, los portaobjetos se impregnaron durante 5 minutos en una solución de THF:piridina 8:1 que contenía 1-metilimidazol al 10%. Después los portaobjetos se impregnaron en solución de THF:anhídrido acético 9:1 durante cinco minutos. Estas soluciones de terminado se adquirieron de Glen Research, Sterling, VA. Los portaobjetos se aclararon con THF, después etanol, y finalmente agua.

El ADN se unió a las superficies impregnando los portaobjetos de vidrio modificados en una solución 0,2 OD (1,7 μM) que contenía oligonucleótido recién purificado (3' tiol ATGCTCAACTCT [SEC ID N° 33]). Después de 12 horas de tiempo de impregnación, los portaobjetos se retiraron y se aclararon con agua.

Para demostrar la capacidad de una cadena de ADN analito de unir nanopartículas al sustrato modificado, se preparó un oligonucleótido de enlace. El oligonucleótido de enlace era de 24 pb de longitud (5'TACGAGTTGA GAATCCTGAATGCG [SEC ID N°: 34]) con una secuencia que contenía un extremo de 12 pb que era complementario al ADN ya adsorbido en la superficie del sustrato. El sustrato después se impregnó en una solución de tampón de hibridación (NaCl 0,5 M, tampón fosfato 10 mM pH 7) que contenía el oligonucleótido de unión (0,4 OD, 1,7 μM) durante 12 horas. Después de retirar y aclarar con tampón similar, se impregnó el sustrato en una solución que contenía nanopartículas de oro de 13 nm de diámetro que se habían modificado con un oligonucleótido (TAGGACTTACGC 5' tiol [SEC ID N° 35]) que es complementario a la parte no hibridada del oligonucleótido de enlace unido al sustrato. Después de 12 horas de impregnación, se retiró el sustrato y se aclaró con el tampón de hibridación. El color del sustrato de vidrio había cambiado de transparente e incoloro a un color rosa transparente. Véase la Figura 19A.

## ES 2 287 956 T3

Se añadieron capas adicionales de nanopartículas a los portaobjetos impregnando los portaobjetos en una solución del oligonucleótido de enlace como se ha descrito anteriormente y después impregnando en una solución que contenía nanopartículas de oro de 13 nanómetros que tenían oligonucleótidos (3' tior ATGCTCAACTCT [SEC ID N° 33]) unidos a las mismas. Después de impregnar durante 12 horas, los portaobjetos se retiraron de la solución de nanopartículas y se aclararon e impregnaron en tampón de hibridación como se ha descrito anteriormente. El color del portaobjetos había llegado a ser notablemente más rojo. Véase la Figura 19A. Se añadió una capa final de nanopartículas repitiendo los procedimientos de impregnación de oligonucleótido de enlace y nanopartículas usando nanopartículas de oro de 13 nanómetros que se habían modificado con un oligonucleótido (TAGGACTTACGC 5' tior [SEC ID N°: 35]) como la capa final de nanopartículas. De nuevo, el color se oscureció, y aumentó la absorbancia UV-vis a 520 nm. Véase la Figura 19A.

Para verificar que las nanopartículas de oro modificadas con oligonucleótidos se habían unido a la superficie modificada con oligonucleótido a través de interacciones de hibridación de ADN con el oligonucleótido de enlace, se realiza una curva de fusión. Para el experimento de fusión, se colocó un portaobjetos en una cubeta que contenía 1,5 ml de tampón de hibridación, y se usó un aparato similar al usado en el Ejemplo 2, parte B. La señal de absorbancia debida a las nanopartículas (520 nm) se controló a cada grado según se aumentaba la temperatura del sustrato de 20°C a 80°C, con un tiempo de mantenimiento de 1 minuto a cada grado íntegro. La señal de las nanopartículas disminuyó drásticamente cuando la temperatura pasaba de 52°C. Véase la Figura 19B. Una primera derivada de la señal mostró una temperatura de fusión de 55°C, que corresponde con la temperatura observada para los conjugados oligonucleótido-nanopartícula y los oligonucleótidos de enlace hibridados en solución. Véase la Figura 19B.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar una diana de ácido nucleico que tiene al menos dos partes, que comprende:

5 proporcionar uno o más tipos de nanopartículas de oro que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo los oligonucleótidos una secuencia complementaria a las secuencias dos o más partes de la diana de ácido nucleico, y teniendo las nanopartículas un tamaño de 5 a 150 nm;

10 poner en contacto la diana de ácido nucleico y la nanopartículas en condiciones eficaces para permitir la hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con la diana de ácido nucleico; y

observar un cambio de color detectable provocado por la interacción entre las nanopartículas que se están poniendo en proximidad por hibridación de los oligonucleótidos en las nanopartículas con la diana de ácido nucleico.

15 2. El método de la reivindicación 1 que comprende:

proporcionar al menos dos tipos de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo los oligonucleótidos en el primer tipo de nanopartículas una secuencia complementaria a una primera parte de la secuencia de la diana de ácido nucleico, teniendo los oligonucleótidos en el segundo tipo de nanopartículas una secuencia complementaria a una segunda parte de la secuencia de la diana de ácido nucleico.

20 3. El método de la reivindicación 1 que comprende:

proporcionar al menos un tipo de nanopartículas que tienen oligonucleótidos unidos a las mismas, teniendo los oligonucleótidos secuencias que son complementarias a diferentes partes de la diana de ácido nucleico.

25 4. El método de la reivindicación 2, en el que las condiciones de contacto incluyen congelar y descongelar, o en el que las condiciones de contacto incluyen calentar.

30 5. El método de la reivindicación 2, en el que el cambio detectable se observa en una superficie sólida.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 2 ó 5, en el que cambio detectable es un cambio de color observable a simple vista.

35 7. El método de la reivindicación 2, en el que:

la diana de ácido nucleico tiene una tercera parte localiza entre la primera y segunda partes, y las secuencias de los oligonucleótidos en las nanopartículas no incluyen secuencias complementarias a esta tercera parte de la diana de ácido nucleico; y

40 la diana de ácido nucleico se pone en contacto adicionalmente con un oligonucleótido de relleno que tiene una secuencia complementaria a esta tercera parte de la diana de ácido nucleico, teniendo lugar el contacto en condiciones eficaces para permitir la hibridación del oligonucleótido de relleno con la diana de ácido nucleico.

45 8. El método de la reivindicación 2, en el que la diana de ácido nucleico es ARN o ADN viral, un gen asociado con una enfermedad, un ADN bacteriano, un ADN fúngico, un ADN sintético, un ARN sintético, un ARN natural o sintético estructuralmente modificado, o un ADN natural o sintético estructuralmente modificado.

50 9. El método de la reivindicación 2, en el que la diana de ácido nucleico es de una fuente biológica.

10. El método de la reivindicación 2, en el que la diana de ácido nucleico es un producto de una amplificación de reacción en cadena de la polimerasa.

55 11. El método de la reivindicación 2, en el que la diana de ácido nucleico es un fragmento obtenido por escisión de ADN con una enzima de restricción.

12. El método de la reivindicación 2, en el que la diana de ácido nucleico se pone en contacto con el primer y segundo tipos de nanopartículas simultáneamente.

60 13. El método de la reivindicación 2, en el que la diana de ácido nucleico se pone en contacto e hibrida con los oligonucleótidos en el primer tipo de nanopartículas antes de ponerse en contacto con el segundo tipo de nanopartículas.

65 14. El método de la reivindicación 14, en el que el primer tipo de nanopartículas está unido a un sustrato.

## ES 2 287 956 T3

15. El método de la reivindicación 1, en el que las diferentes partes de la diana de ácido nucleico tienen una secuencia de repetición.

5 16. El método de la reivindicación 1, en el que las partes diferente de la diana de ácido nucleico tienen diferentes secuencias.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

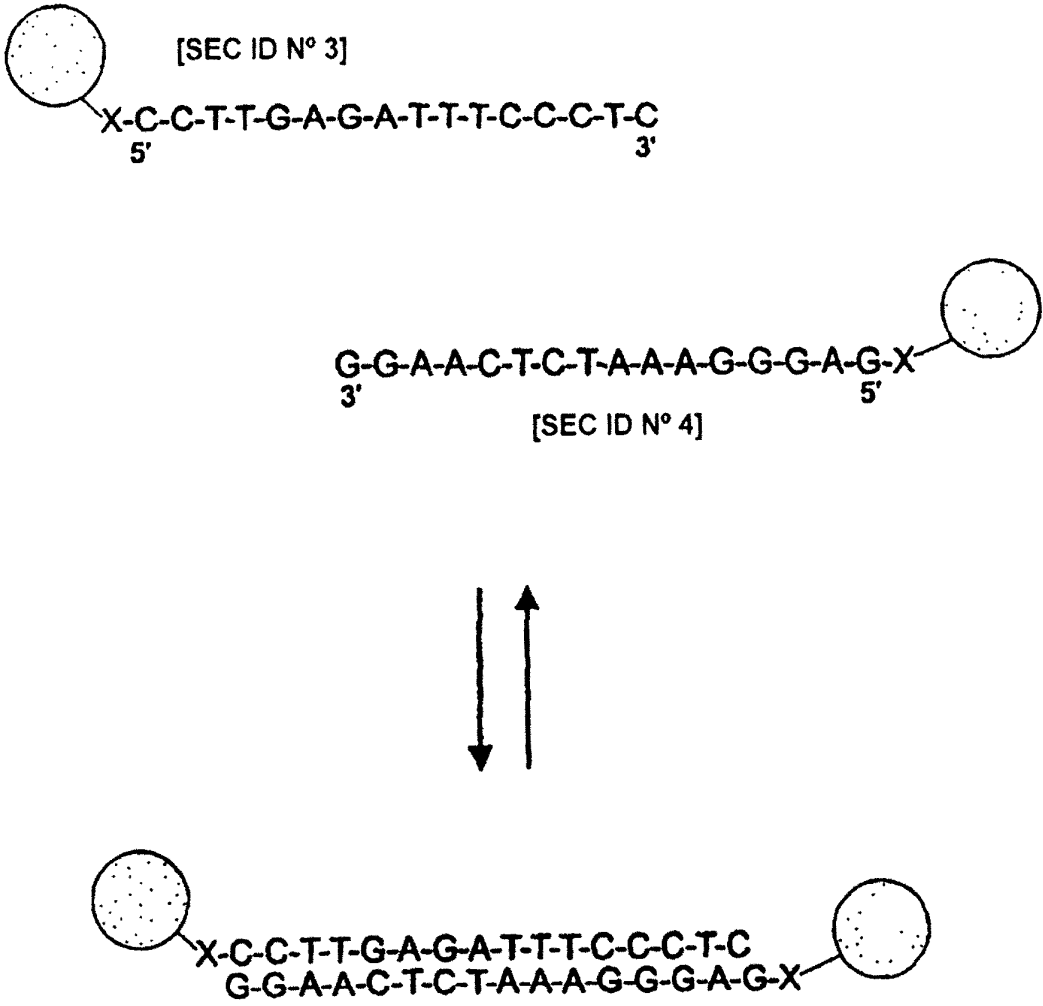


FIG.2

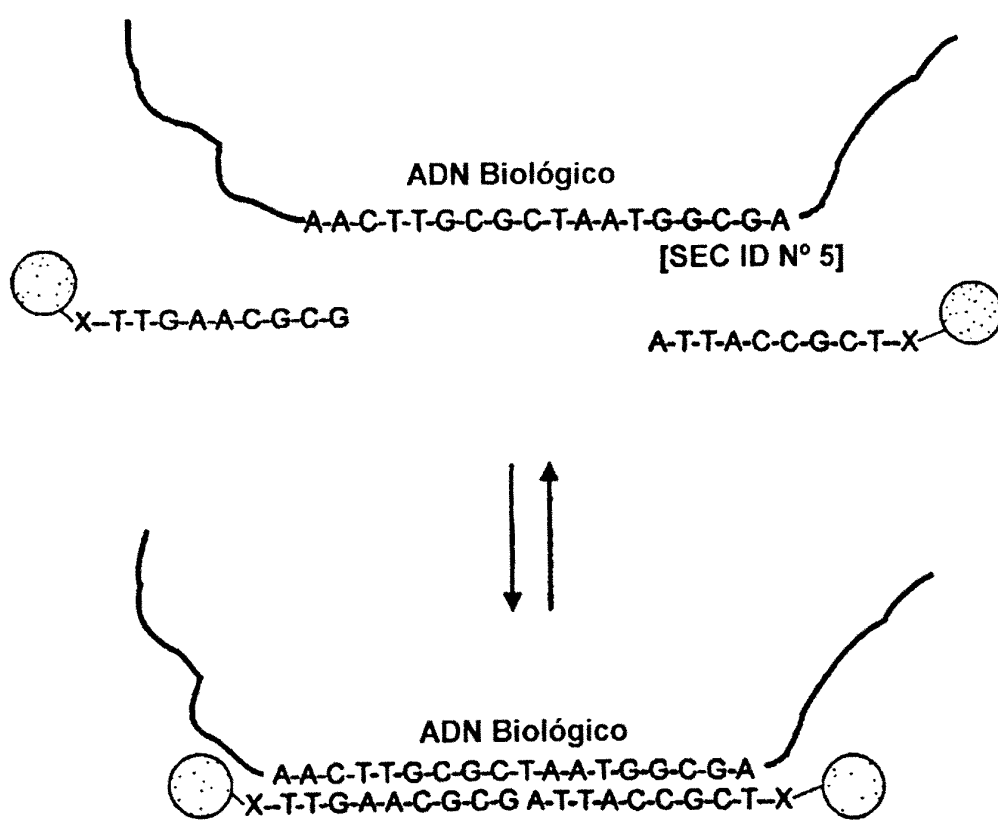
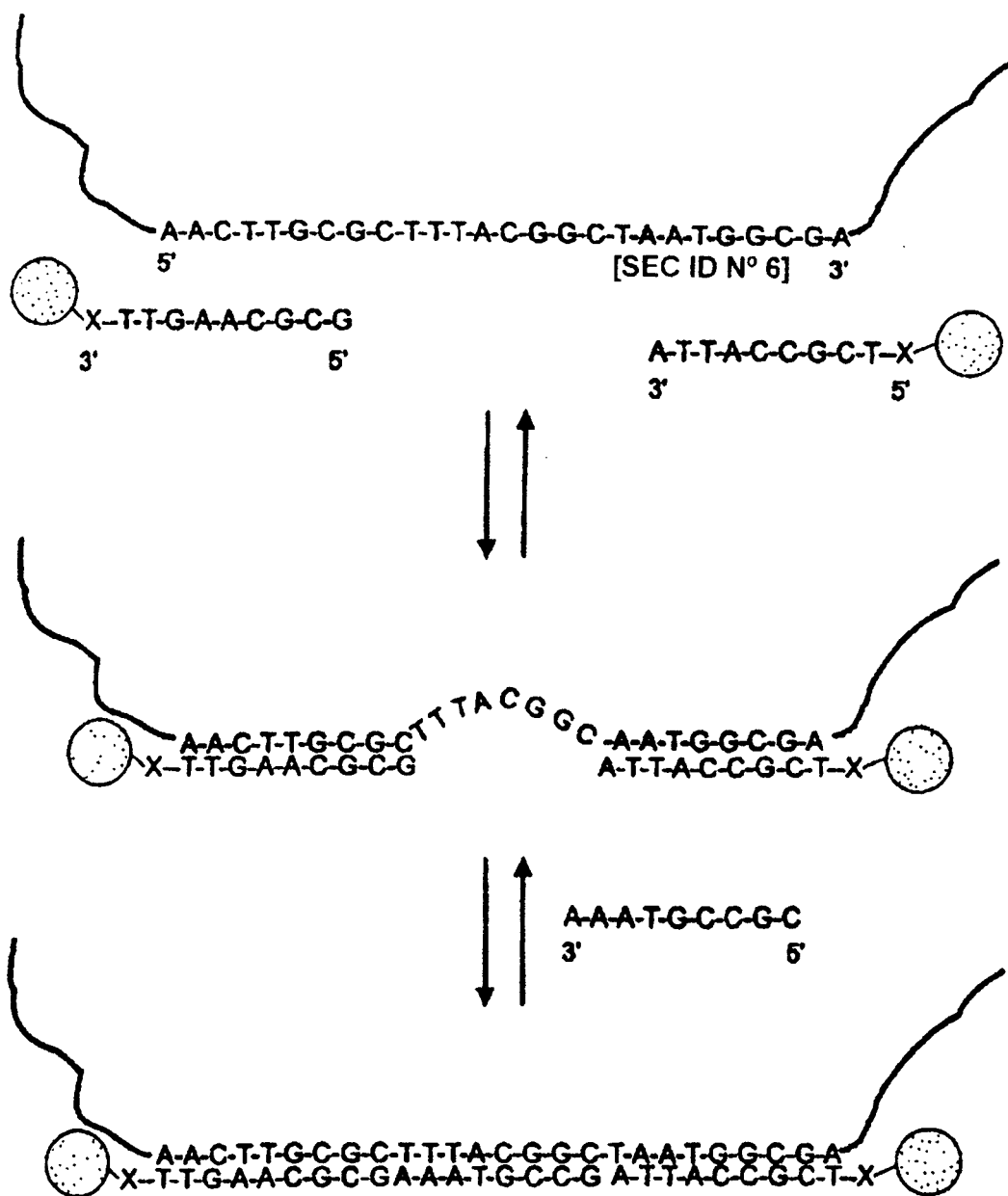


FIG.3



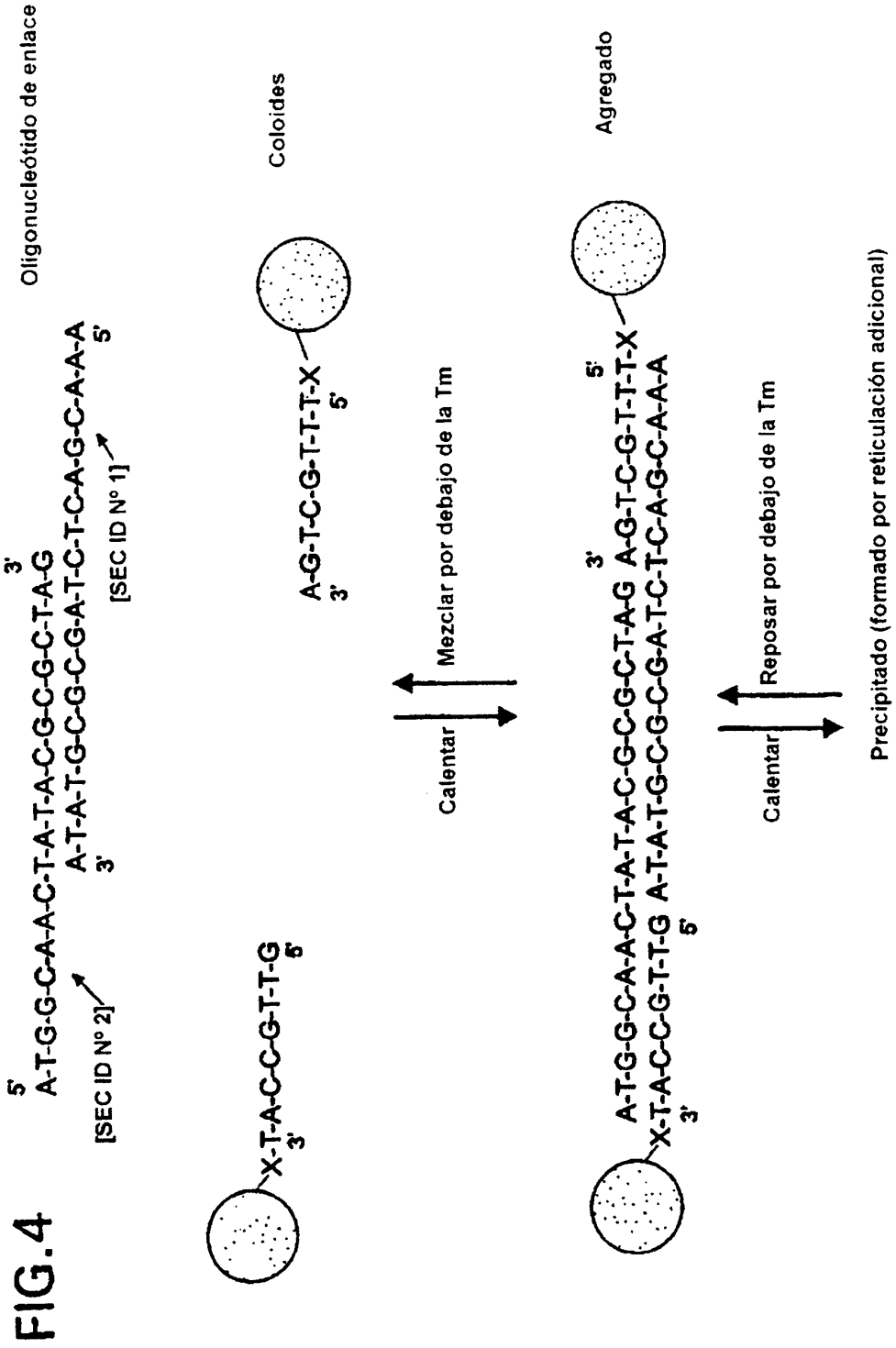
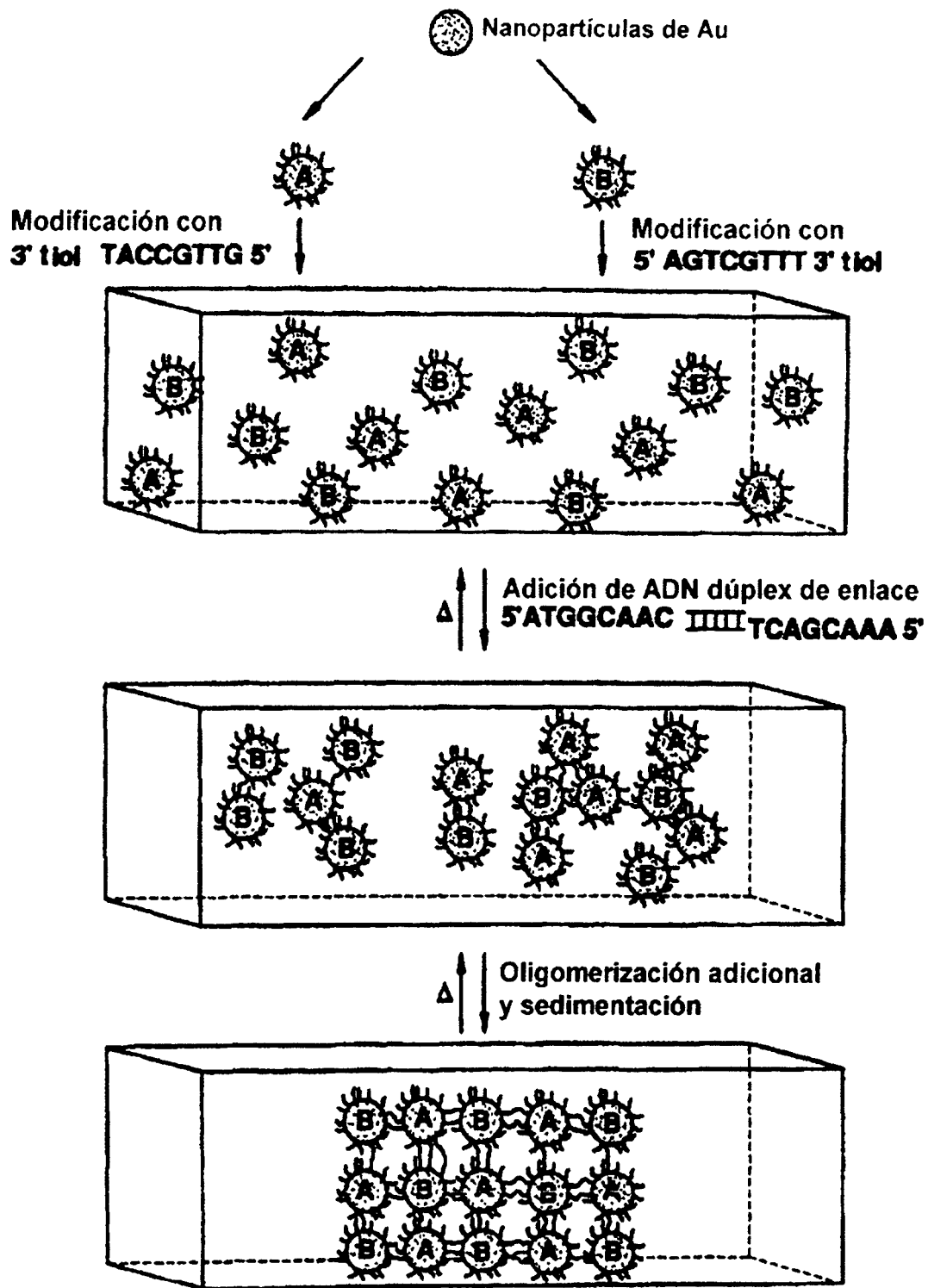
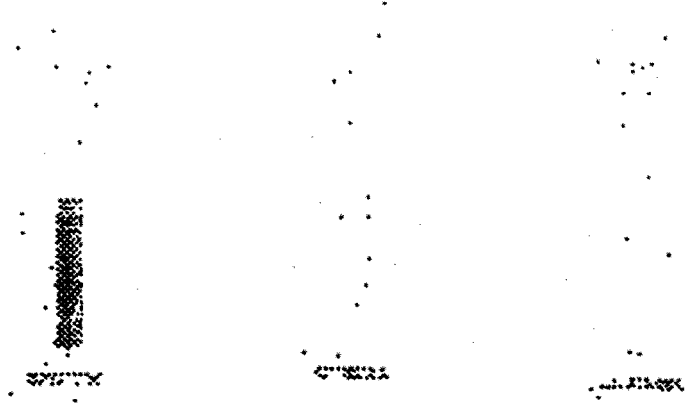


FIG.5





**FIG. 6A    FIG. 6B    FIG. 6C**

FIG.7

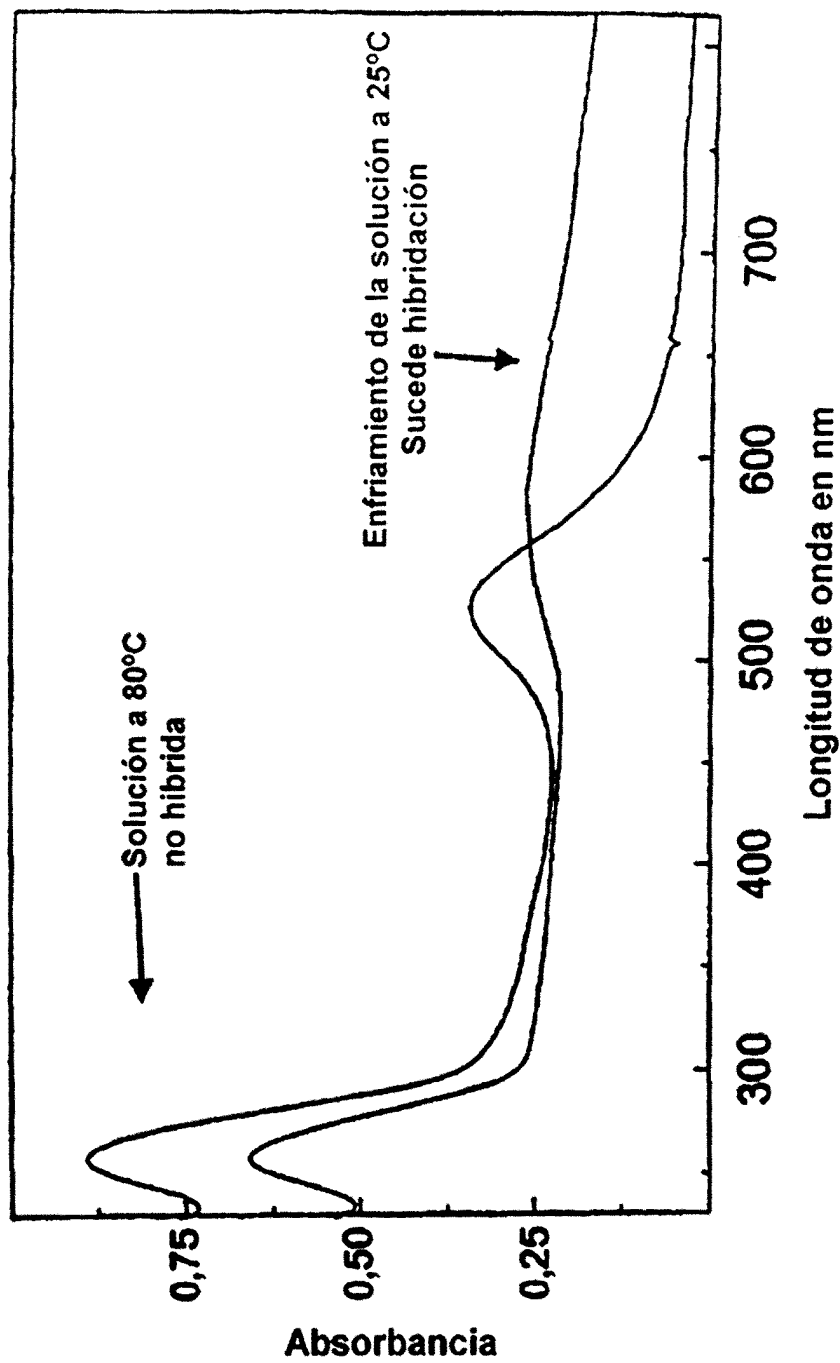


FIG.8B

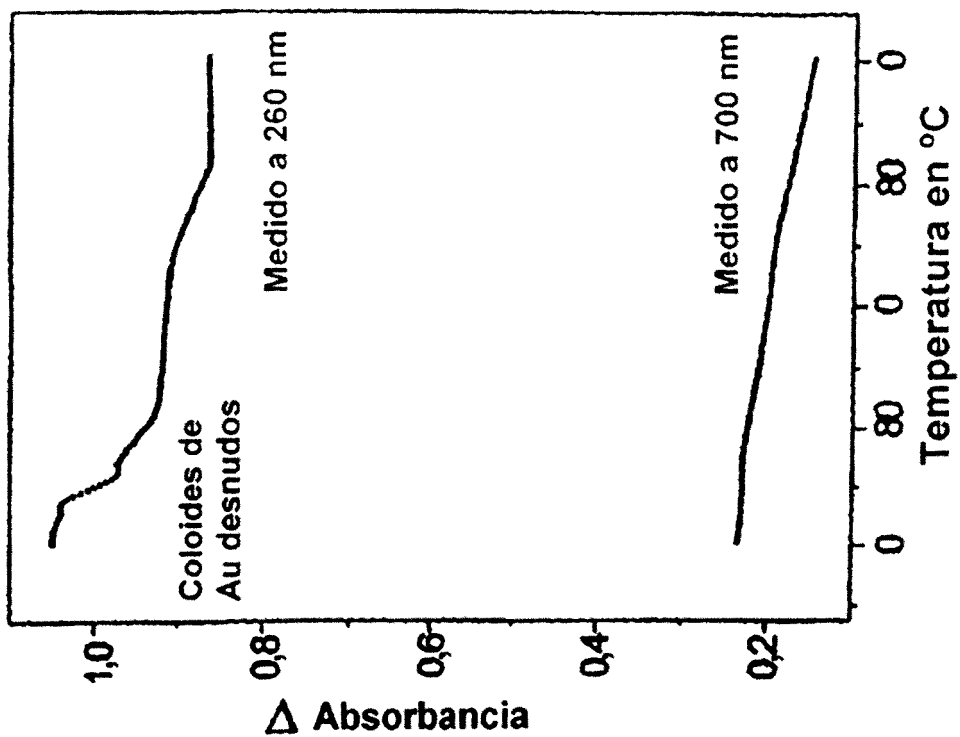


FIG.8A

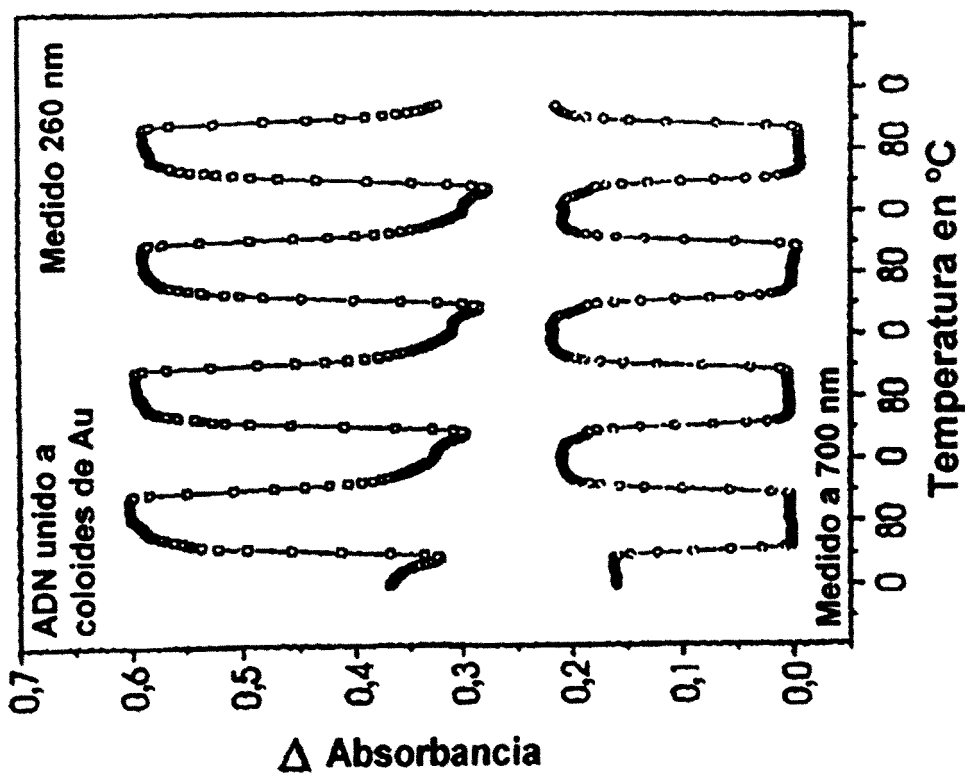




FIG.9A

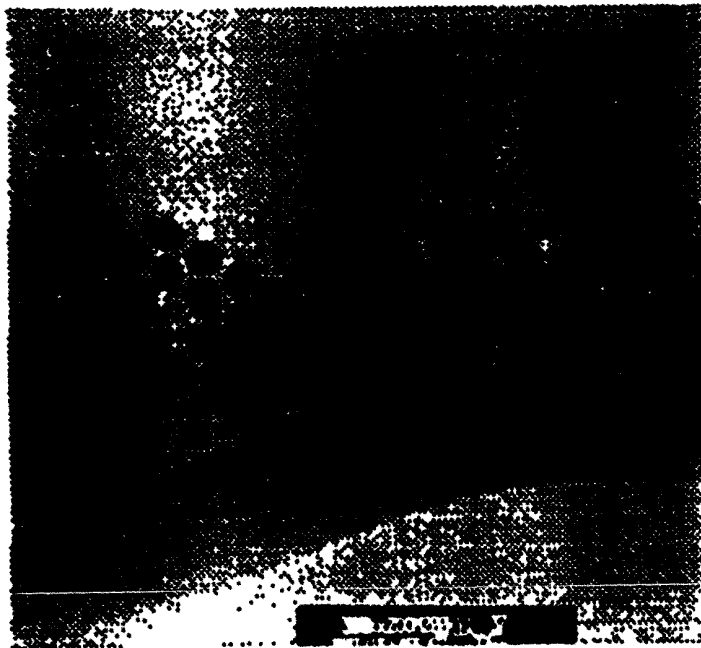


FIG.9B

FIG. 10

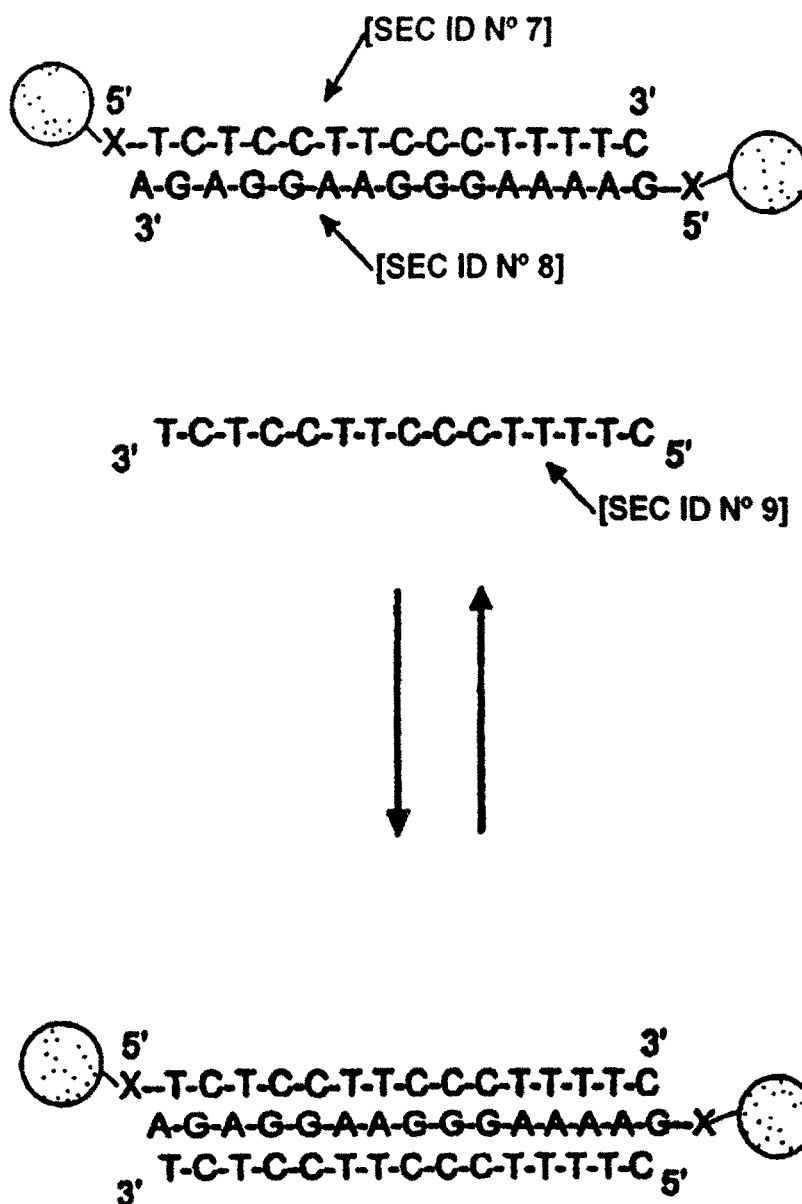
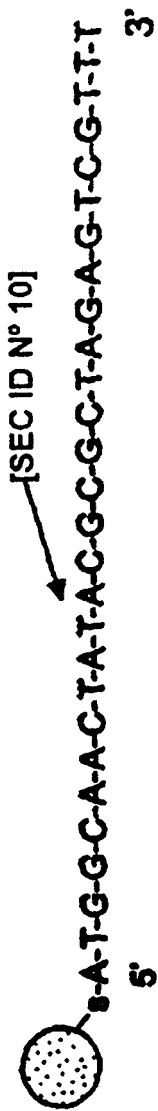


FIG. 11



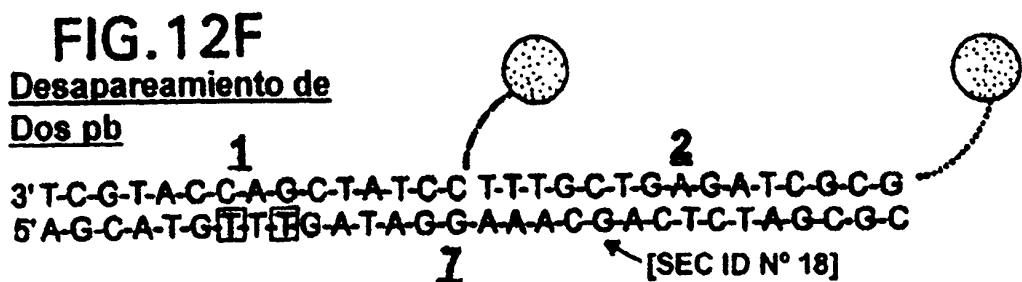
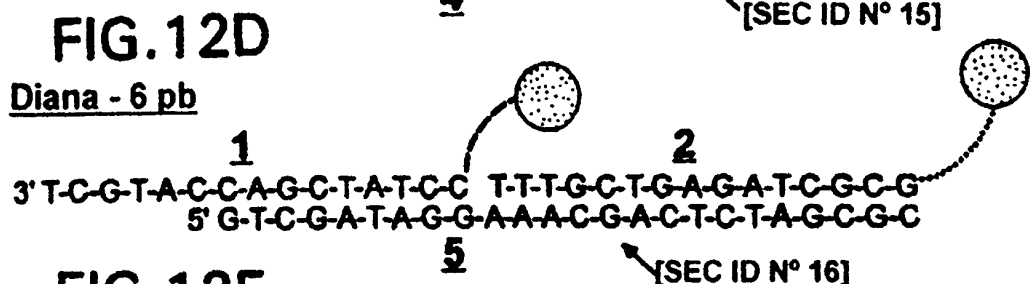
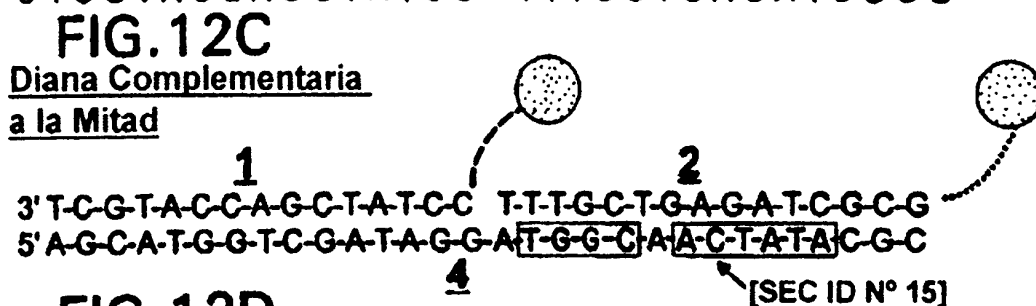
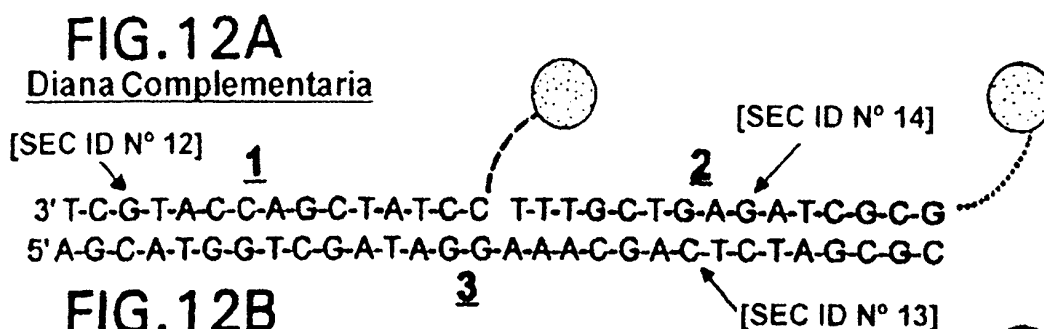


FIG.13A

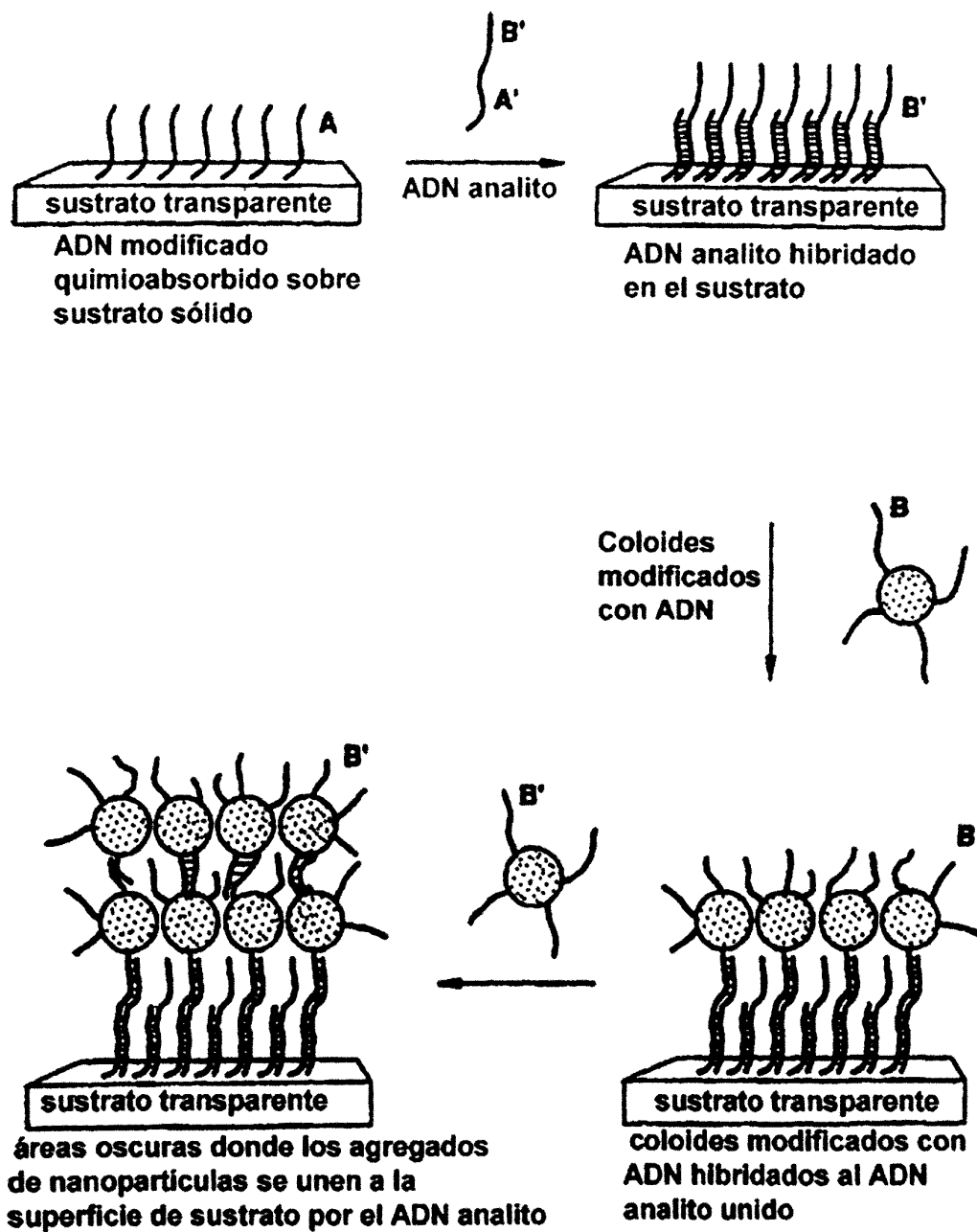


FIG.13B

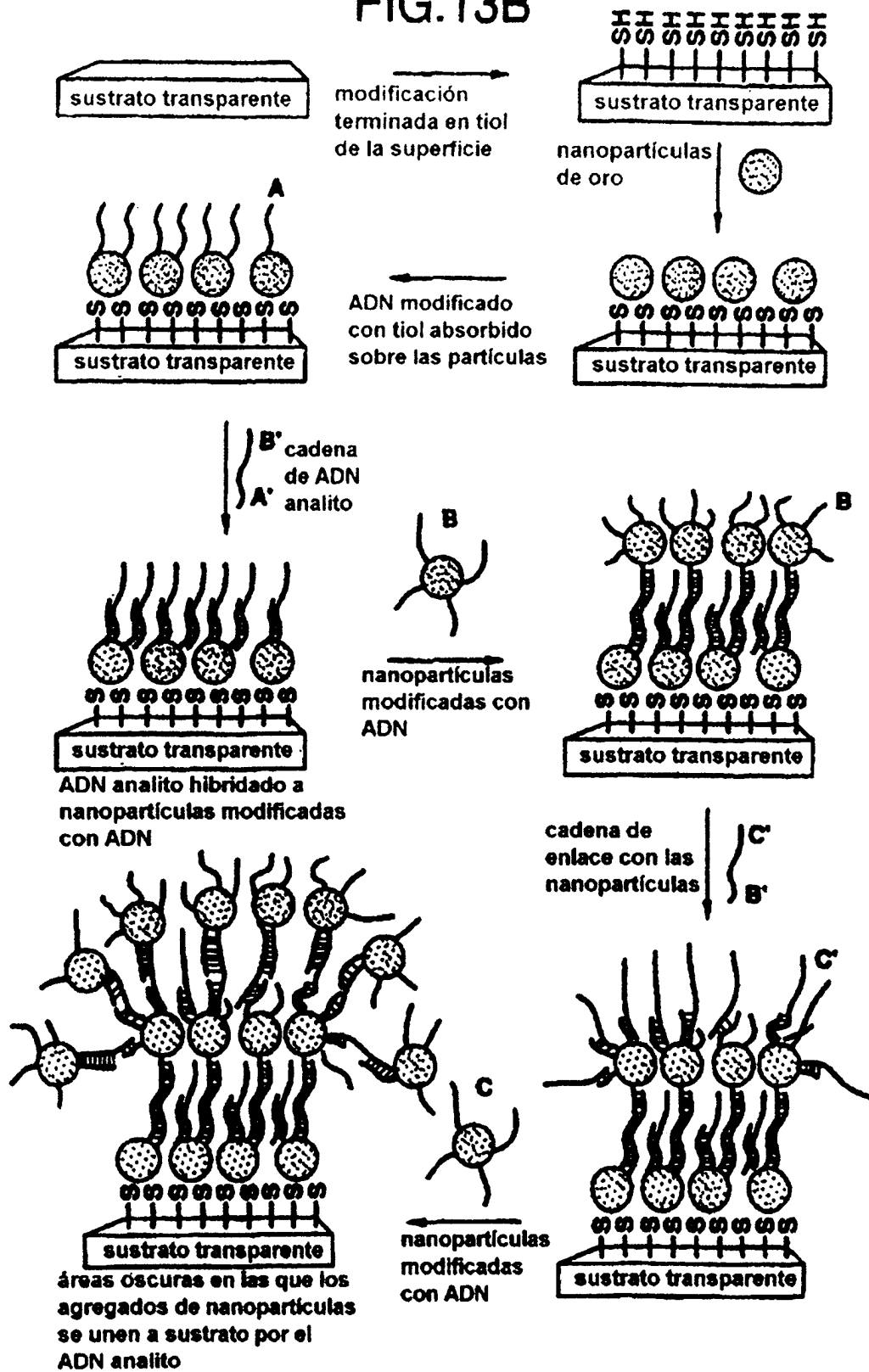


FIG.14A

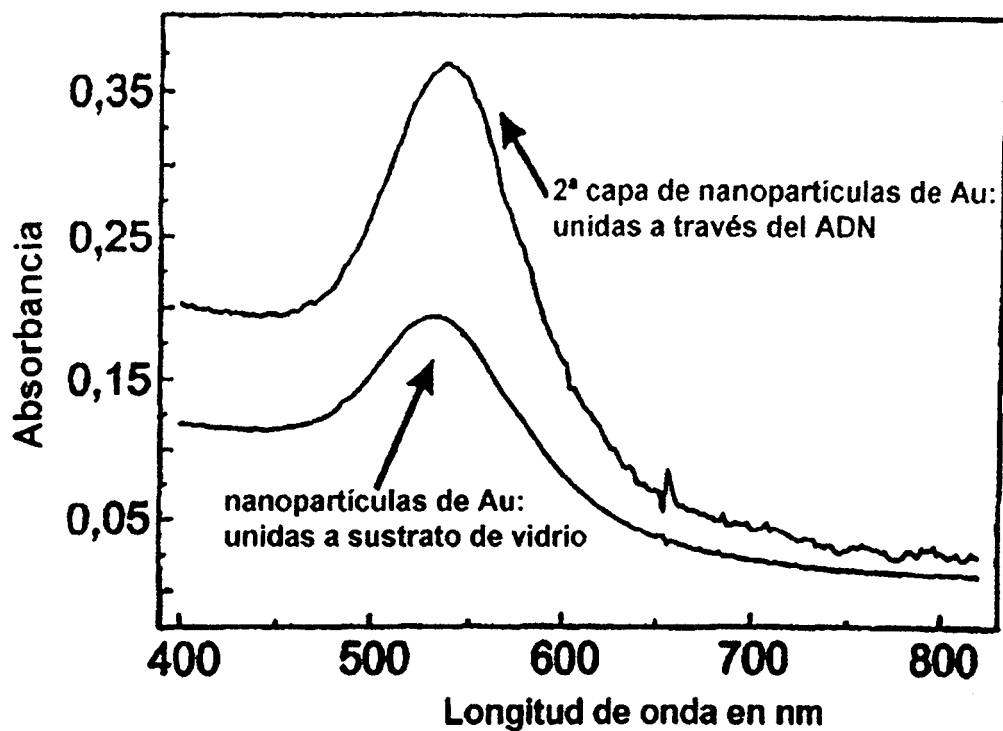
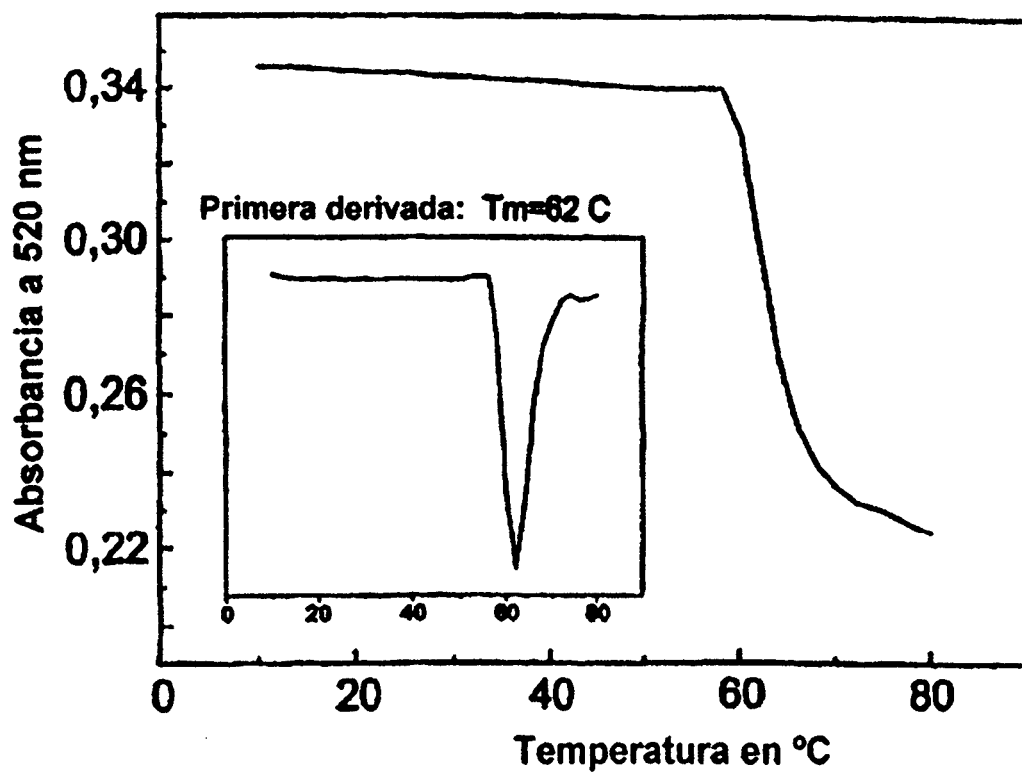
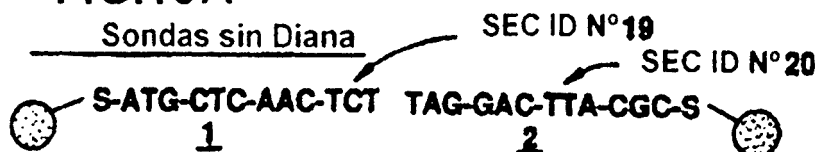


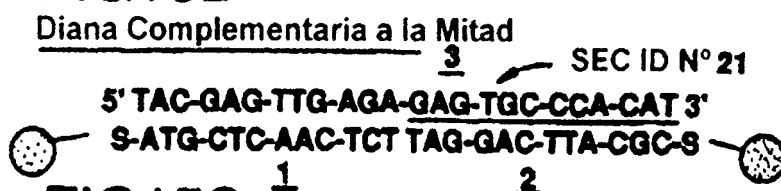
FIG.14B



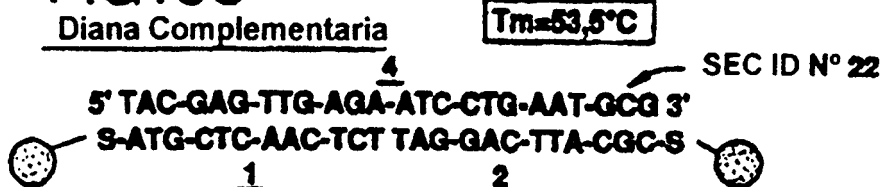
**FIG.15A**



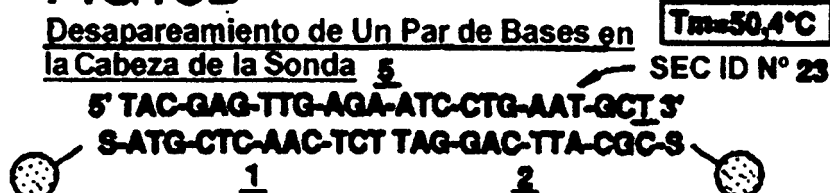
**FIG15B**



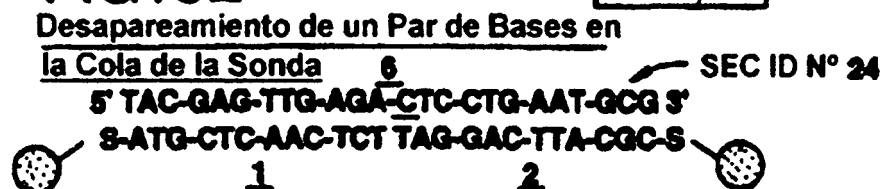
**FIG15C**



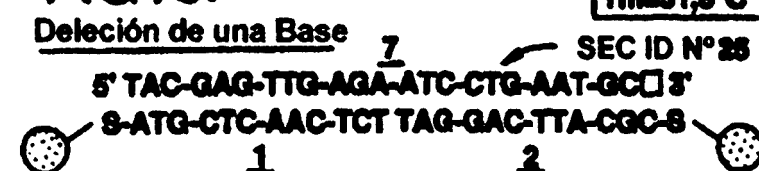
**FIG15D**



**FIG15E**



**FIG15F**



**FIG15G**

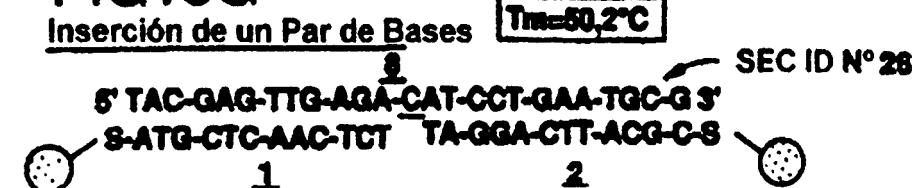




FIG.17B

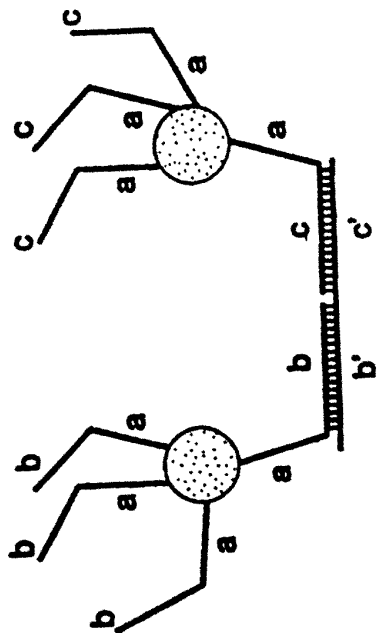


FIG.17A

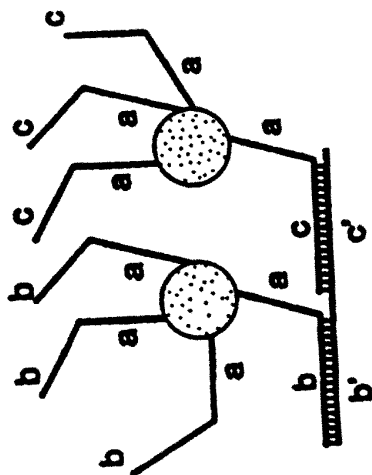


FIG.17C

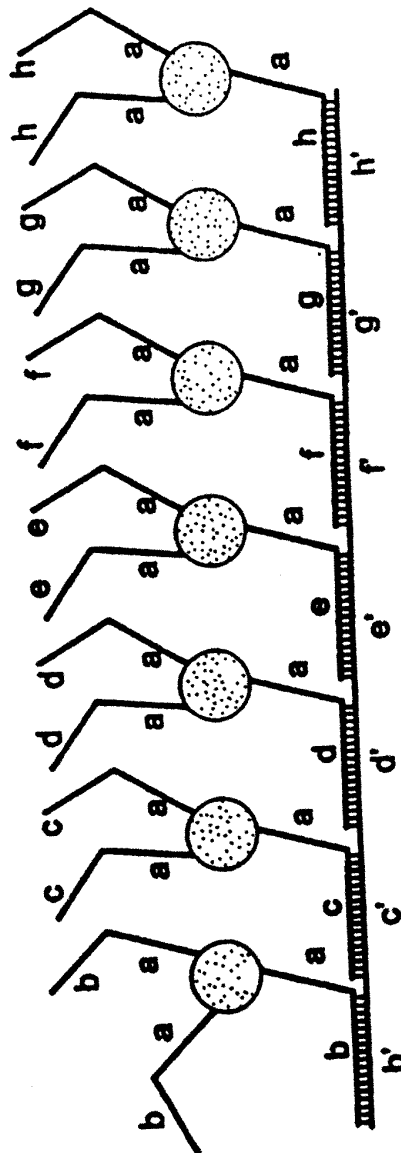


FIG.17D

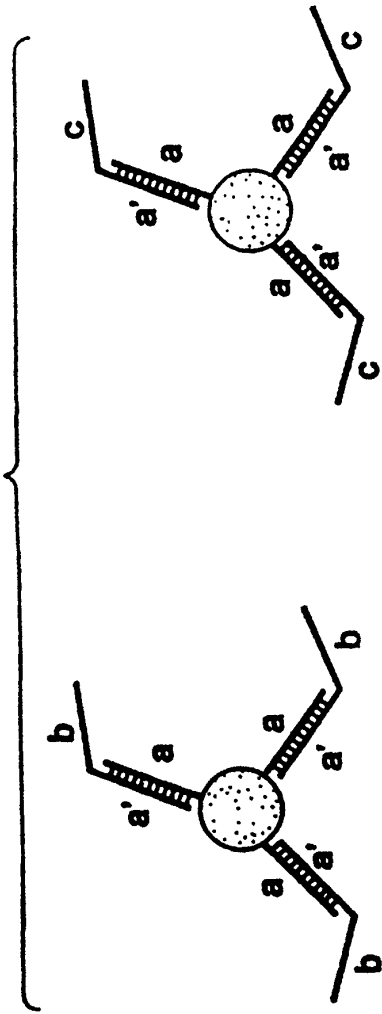


FIG.17E

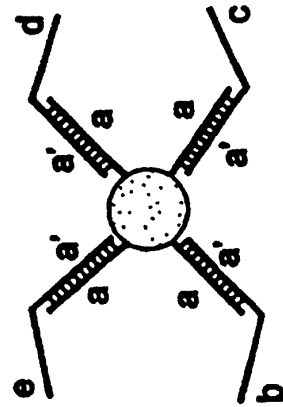


FIG.18

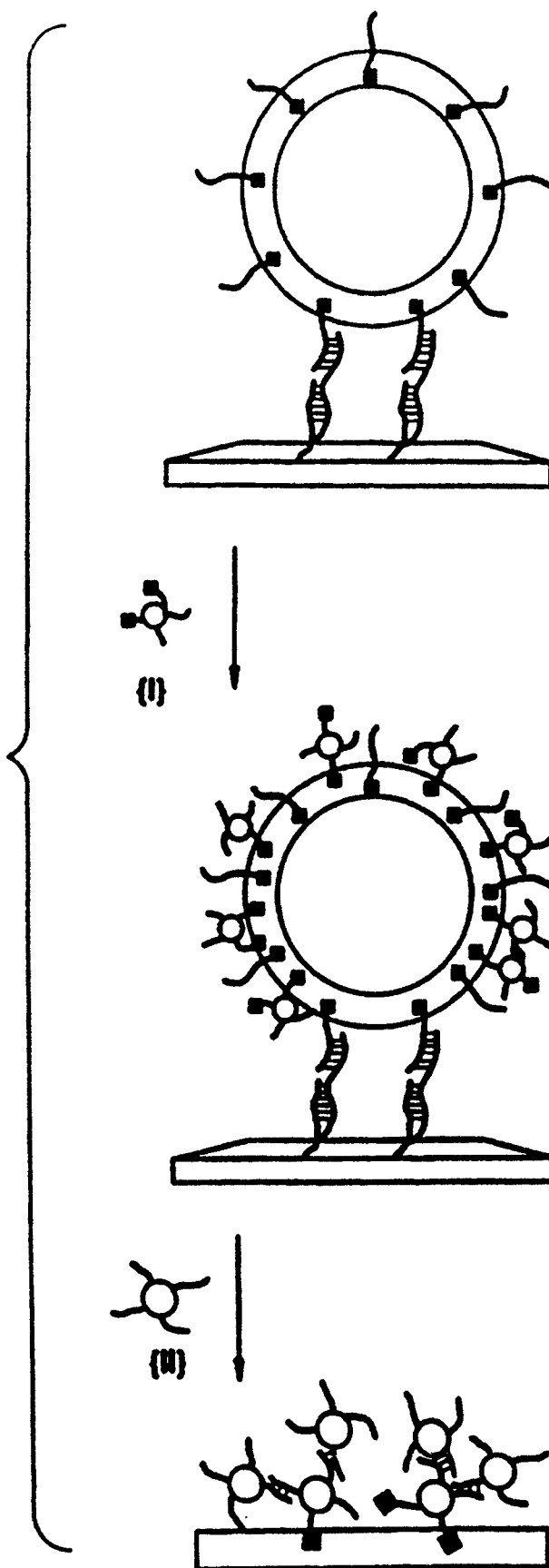


FIG. 19A

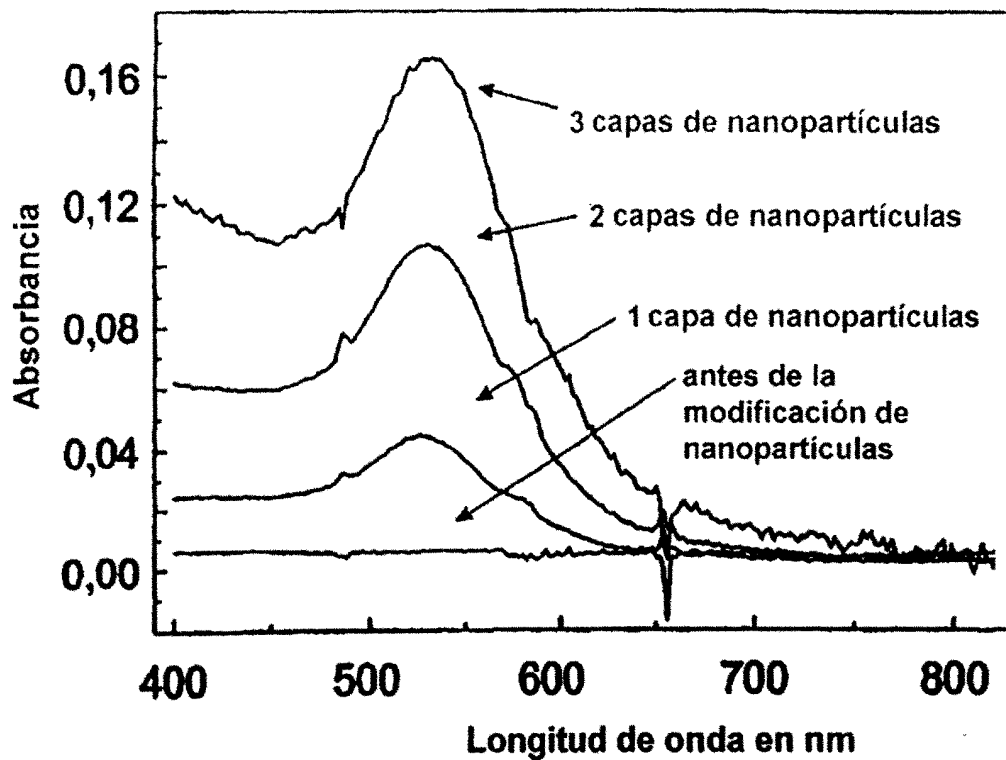


FIG. 19B

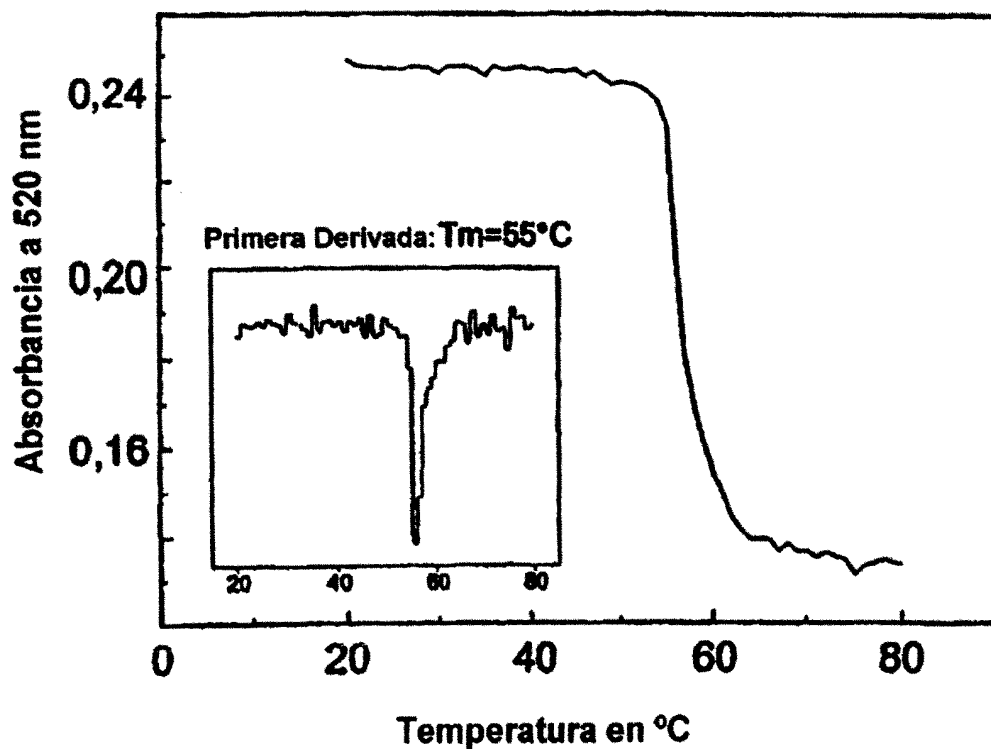


FIG.20A

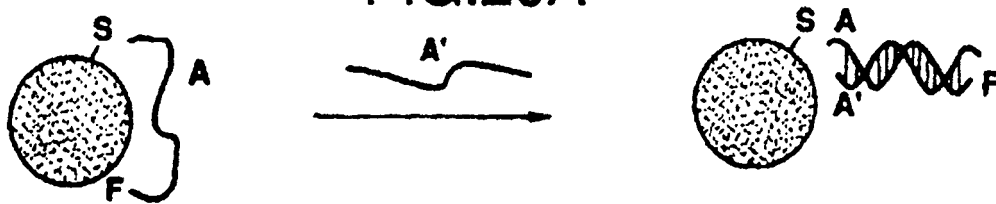
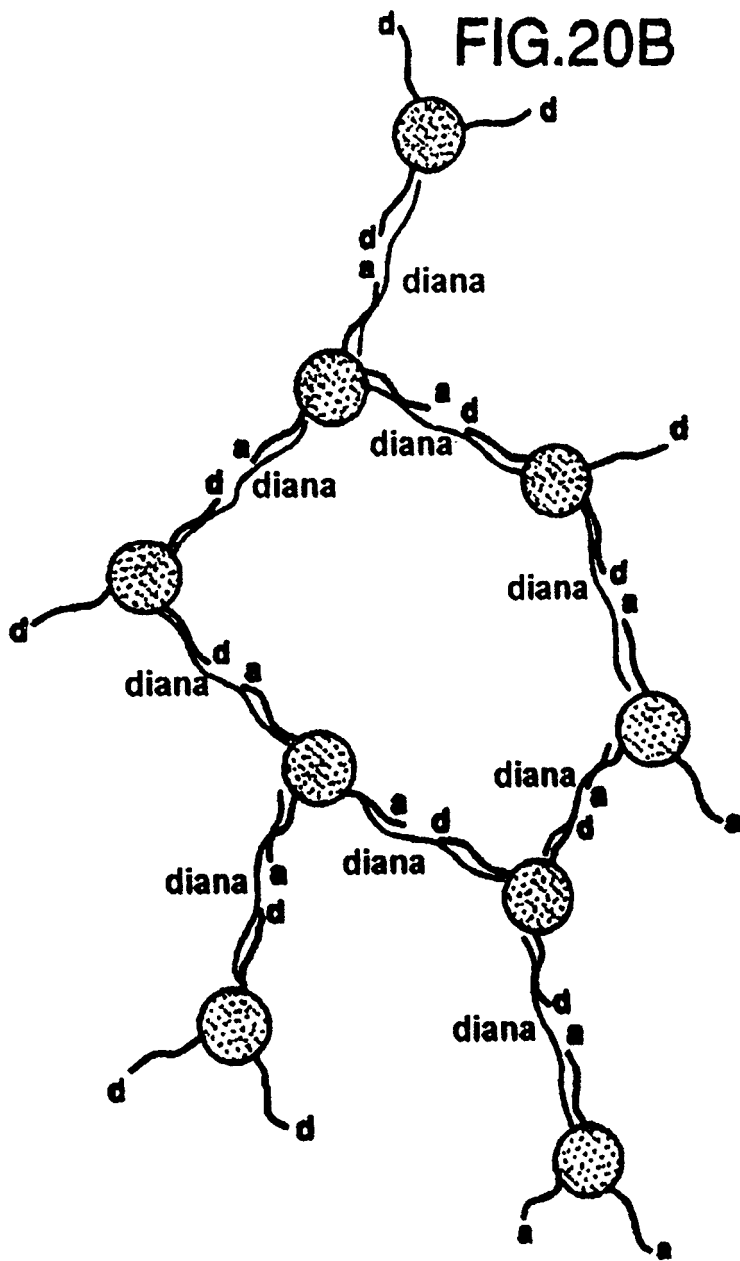


FIG.20B



# ES 2 287 956 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: MIRKIN, CHAD A.  
LETSINGER, ROBERT L.  
MUCIC, ROBERT C.
  - 10 STORHOFF, JAMES J.  
ELGHANIAN, ROBERT
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: NANOPARTÍCULAS QUE TIENEN OLIGONUCLEÓTIDOS UNIDOS  
15 A LAS MISMAS Y USOS DE LAS MISMAS
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 35
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 20 (A) DESTINATARIO: SHERIDAN ROSS P.C.
  - (B) CALLE: 1700 LINCOLN STREET, SUITE 3500
  - (C) CIUDAD: DENVER
  - 25 (D) ESTADO: COLORADO
  - (E) PAÍS: U.S.A.
  - (F) CÓDIGO POSTAL: 08203
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 30 (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
  - (B) ORDENADOR: PC IBM compatible
  - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
  - 35 (D) SOFTWARE: PatentIn Release N° 1.0, Versión N° 1.30
- (iv) DATOS DE SOLICITUD ACTUAL:
- 40 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
  - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
  - (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE:
- 45 (A) NOMBRE: CROOK, WANNELL M.
  - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 31.071
  - (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 3501-14-PCT
- 50 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- (A) TELÉFONO: (303) 863-9700
  - (B) TELEFAX: (303) 863-0223

### 55 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 60 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) CADENA: sencilla
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 65 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- (A) DESCRIPCIÓN: /des= "hipotética"

## ES 2 287 956 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 1:

AAACGACTCT AGCGCGTATA

20

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 2:

20

ATGGCAACTA TACGCGCTAG

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 3:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

35

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 3:

40

CCTTGAGATT TCCCTC

16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 4:

55

GAGGGAAATC TCAAGG

16

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 5:

60

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65

## ES 2 287 956 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 5:

AACTTGCGCT AATGGCGA

18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 6:

AAGTTGCGCT TTACGGCTAA TGGCGA

26

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 7:

TTCCTTCCC TTTTC

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /Desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 8:

GAAAAGGGAA GGAGA

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

## ES 2 287 956 T3

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 9:

10

CTTTTCCCTT CCTCT

15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 10:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

25

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 10:

30

AAACGACTCT AGCGCGTATA GTTGCCAT

28

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 11:

35

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

40

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

45

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 11:

ATGGCAACTA TACGCGCTAG AGTCGTTT

28

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 12:

55

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

60

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /Desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 12:

65

CCTATCGACC ATGCT

15

## ES 2 287 956 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 13:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 13:

AGCATGGTCG ATAGGAAACG ACTCTAGCGC

30

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 14:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 14:

GCGCTAGAGT CGTTT

15

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 15:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 15:

AGCATGGTCG ATAGGATGGC AACTATACGC

30

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 16:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

## ES 2 287 956 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 16:

GTCGATAGGA AACGACTCTA GCGC

24

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 17:

20

AGCATGGTTG ATAGGAAACG ACTCTAGCGC

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 18:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 30 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

35

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 18:

40

AGCATGTTTG ATAGGAAACG ACTCTAGCGC

30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

50

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 19:

55

TCTCAACTCG TA

12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 20:

60

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65

## ES 2 287 956 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 20:

CGCATTTCAGG AT

12

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: desc/ = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 21:

TACGAGTTGA GAGAGTGCCC ACAT

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 22:

TACGAGTTGA GAATCCTGAA TGCG

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 23:

TACGAGTTGA GAATCCTGAA TGCT

24

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

## ES 2 287 956 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico  
(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"
- 10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 24:  
TACGAGTTGA GACTCCTGAA TGCG 24
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 25:
- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 23 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
20 (C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico  
25 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 25:  
30 TACGAGTTGA GAATCCTGAA TGC 23
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 26:
- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 25 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
40 (C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico  
(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"
- 45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 26:  
TACGAGTTGA GACATCCTGA ATGCG 25
- (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 27:
- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 24 pares de bases  
55 (B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico  
60 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 27:  
65 TACGAGTTGA GAATCCTGAA TGCG 24

## ES 2 287 956 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 28:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 28:

CGCATTTCAGG AT

12

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 29:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 48 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 29:

TACGAGTTGA GACCGTTAAG ACGAGGCAAT CATGCAATCC TGAATGCG

48

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 30:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº 30:

TGCATGATTG CCTCGTCTTA ACGG

24

### (2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 31:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 72 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

## ES 2 287 956 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 31:

5 **TACGAGTTGA GACCGTTAAG ACGAGGCAAT CATGCATATA TTGGACGCTT TACGGACAAC 60**  
**ATCCTGAATG CG 72**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 32:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 48 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

20 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 32:

25 **GTTGTCCCGTA AAGCGTCCAA TATATGCATG ATTGCCTCGT CTTAACGG 48**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 33:

**TCTCAACTCG TA 12**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 34:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 24 pares de bases

50 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

55 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 34:

60 **TACGAGTTGA GAATCCTGAA TGCG 24**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N° 35:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

## ES 2 287 956 T3

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

5

(A) DESCRIPCIÓN: /desc = "hipotética"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N° 35:

10

CGCATTTCAGG AT

12

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65