



Modalidade e n.º (11)		T D	Data do pedido: (22)	Classificação Internacional (51)
97580				
Requerente (71): CHIRON CORPORATION, norte americana (Estado de Delaware), industrial e comercial, com sede em 4560 Horton Street, Emeryville, California 94608, Estados Unidos da América				
Inventores (72): Michael S. Urdea, cientista norte americano, residente em 100 Bunce Meadow Road, Alamo, California 94507, Estados Unidos da América.				
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)	
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido		
4. Maio. 1990	E.U.A.	519.212		
Epigrafe: (54) "PROCESSO DE PREPARAÇÃO DE SONDAS DE PROTEÍNA-ÁCIDO NUCLEÍCO E IMUNOENSAIOS QUE UTILIZAM AS MESMAS"				
Resumo: (máx. 150 palavras) (57) Esta invenção refere-se a um processo de preparação de várias sondas híbridas de proteína/ácido nucleico que podem ser usadas para amplificar o sinal detectável em imunoensaios. A metade proteica é capaz de funcionar quer como um anticorpo ou um antigénio. A metade de ácido nucleico funciona como amplificador de sinal. Num outro aspecto, esta invenção refere-se a vários métodos de amplificação de sinal detectável, em imunoensaios, pela utilização de sondas híbridas e sondas polinucleotídicas relacionadas.				

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º. 97.580

REQUERENTE: CHIRON CORPORATION

EPÍGRAFE: "SONDAS DE PROTEINA-ACIDO NUCLEICO E IMUNOENSAIOS
QUE UTILIZAM AS MESMAS"

INVENTORES: Michael S. Urdea, cientista norte americano,
residente em 100 Bunce Meadow Road, Alamo,
California 94507, Estados Unidos da América

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.

4 de Maio de 1990, nos Estados Unidos da América, sob
o N.º. 519.212



Titular: CHIRON CORPORATION

Epigrafe: "SONDAS DE PROTEINA-ACIDO NUCLEICO E IMUNOENSAIOS QUE
UTILIZAM AS MESMAS"

M E M O R I A D E S C R I T I V A

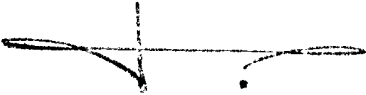
Campo do invento

O presente invento relaciona-se de maneira geral com os campos da imunologia e química dos ácidos nucleicos. Mais especificamente, relaciona-se com o uso da hibridação de ácidos nucleicos como um meio de amplificar o sinal detectável em imunoensaios.

Antecedentes do invento

As hibridizações de ácidos nucleicos são agora vulgarmente utilizadas na investigação genética, investigação biomédica e diagnóstico clínico, para detectar e quantificar sequências de nucleótidos particulares que estão presentes em misturas heterogéneas de DNA, RNA, e/ou outros materiais. Num ensaio básico de hibridação de ácidos nucleicos, um analisado de ácido nucleico de cadeia simples (ou DNA ou RNA) é hibridizado, directa ou indirectamente a uma sonda de ácido nucleico marcada, e os duplexes que contêm a marcação são quantificados. Foram usados tanto marcadores radioactivos como não radioactivos.

Ao ensaio básico falta sensibilidade. Quando o



analisado está presente num baixo número de cópias ou em concentração diluída, o sinal não pode ser distinguido do ruído do "background". Foram desenvolvidas variações do esquema básico para facilitar a separação dos duplexes alvo do material estranho, e/ou para amplificar as sequências de analisado com o objectivo de facilitar a detecção, mas estas variações pecam em geral por serem processos complexos e dispende-se muito tempo, por um elevado "background", baixa sensibilidade, e dificuldade na quantificação. Para uma discussão geral destas variações ver a patente internacional com o número de publicação 89/03891.

Os imunoensaios são também vulgarmente utilizados na investigação genética, investigação biomédica e diagnóstico clínico para detectar e quantificar epitopos de antígenos particular que estão presentes em amostras heterogéneas de sangue, extractos celulares e outros materiais. Um imunoensaio básico envolve a ligação específica de um anticorpo, ou monoclonal ou policlonal, a um antígeno alvo, e meios para detectar a reacção. Estes meios foram incorporados em vários ensaios incluindo imunoensaios directos, indirectos, e de "sandwich". Contudo, a sensibilidade da detecção da interacção essencial antígeno/anticorpo apresentou muitos problemas semelhantes aos descritos acima para as hibridizações de ácidos nucleicos.

Várias técnicas, tais como radioimunoensaios, imunoperoxidase e ELISA são presentemente utilizados para imunoensaios. Contudo, os radioimunoensaios são desvantajosos por necessitarem da utilização de reagentes perigosos e prejudiciais ao ambiente e a imunoperoxidase e ELISA pecam pela baixa taxa de



sinal/ruído e estão limitados na amplificação de sinais.

O primeiro objectivo do presente invento é fornecer métodos para a amplificação de sinal utilizando moléculas únicas de polinucleótidos, que mostraram ser úteis em ensaios de hibridação de ácidos nucleicos, para usar em imunoenaios. Estas sondas amplificadoras fornecem um ganho altamente reproduzível em sinal, uma taxa sinal-ruído altamente reproduzível, são por si mesmas quantificáveis e reproduzíveis, e são capazes de se combinar especificamente com um analisado de antígeno presente a baixas concentrações, e também com metades de ácidos nucleicos "universais" registadoras para formar moléculas estáveis.

A patente norte americana de pertença comum da requerente com o número de série 4.868.105, emitida em 19 de Setembro de 1989, cuja descrição se encontra aqui incorporada para referência, descreve um ensaio de hibridação "sandwich" em fase solução no qual o analisado de ácido nucleico é hibridizado a uma "sonda de marcação" e a uma "sonda de captura". O complexo sonda-analisado é acoplado por hibridação a um suporte sólido. Isto permite que o oligonucleótido do analisado seja removido da solução como um complexo de fase sólida, concentrando assim o analisado, facilitando a sua separação de outros reagentes, e incrementando a sua subsequente detecção.

O pedido de patente PCT, de pertença comum da requerente, publicação nº WO90/13667, publicada a 15 de Novembro de 1990, reivindica sondas polinucleotídicas multiméricas lineares e ramificadas que têm dois domínios, e métodos de utilização dessas sondas como amplificadoras de sinal em ensaios de hibridação de ácidos nucleicos. O primeiro domínio é

complementar a uma sequência de oligonucleótidos de cadeia simples de interesse, e o segundo domínio compreende uma multiplicidade de sub-unidades oligonucleotídicas de cadeia simples que são complementares a um oligonucleótido de cadeia simples marcado.

O pedido de patente PCT, No. PCT/US91/00213, reivindica sondas polinucleotídicas que têm três domínios, e métodos de utilização destas sondas como amplificadoras de sinal em ensaios de hibridação de ácidos nucleicos. O primeiro domínio é complementar a uma sequência de oligonucleótidos de cadeia simples de interesse, o segundo domínio é capaz de funcionar como um promotor para a actividade da enzima RNA polimerase dependente de DNA de um fago bacteriano, e o terceiro domínio é capaz de funcionar como um modelo para a transcrição da actividade polimerásica.

Moléculas híbridas de DNA/proteína têm sido usadas como sondas em ensaios de hibridação de ácidos nucleicos em que metade da proteína funciona como um componente marcador (Czichos, J., et al, Nucl. Acids. Res. (1989) 17:1563; patente norte americana com o No. 4.873.187; Patente Norte Americana com o No. 4.737.454.

As moléculas híbridas de DNA/proteína têm sido também utilizadas como sondas em imunoensaios. A Patente Norte Americana No. 4.692.509 descreve uma sonda híbrida, radioactivamente marcada, compreendendo uma proteína e um oligonucleótido radioactivo ligado covalentemente. A metade radioactiva é usada para indicar a presença da metade da proteína num ensaio biológico. A E.P.A. No 154.884 descreve uma molécula híbrida de DNA/proteína em que a metade da proteína reconhece

especificamente uma proteína alvo e a metade de ácido nucleico fornece a função de marcação.

Sumário do invento

Num aspecto, o invento refere-se a uma sonda molecular híbrida de polipéptido/polinucleótido, para ser utilizada como um amplificador dos sinais detectáveis em imunoensaios. Numa configuração a "sonda polimerásica" compreende três domínios:

(a) um primeiro domínio (A) que é um polipéptido e que funciona como um anticorpo específico para um antígeno conhecido;


(b) um segundo domínio (B) que é um polidesoxiribonucleótido de cadeia dupla, capaz de funcionar como um promotor para a actividade da enzima RNA polimerase dependente de DNA; e

(c) um terceiro domínio (C) que é de cadeia simples ou dupla e adjacente ao segundo domínio, de forma a que o terceiro domínio seja capaz de funcionar como um modelo para a actividade promotora do segundo domínio.

Uma segunda modalidade refere-se a uma sonda molecular híbrida de polipéptido/polinucleótido, para ser utilizada como um amplificador de um sinal detectável em imunoensaios. Esta "sonda multimérica" compreende dois domínios:

(a) um primeiro domínio (A) que é um polipéptido capaz de funcionar como um anticorpo e que se liga especificamente a um antígeno conhecido;

(b) um segundo domínio (M) compreendendo uma multiplicidade de sub-unidades oligonucleotídicas de cadeia



simples que são capazes de se ligar especificamente a uma sequência de ácido nucleico de cadeia simples de interesse; e

(c) um meio de conjugar o primeiro e segundo domínios.

Um outro aspecto do invento é um método de amplificar um sinal detectável num imunoensaio através do uso das sondas polimerásicas descritas acima. Este método compreende:

(a) a imobilização do analisado antigénico, directa ou indirectamente, num substrato sólido;

(b) a ligação directa ou indirecta ao analisado de uma primeira sonda molecular compreendendo:

(i) um domínio de ligação (A);

(ii) um segundo domínio (B) que é uma sequência de DNA de cadeia dupla capaz de funcionar como um promotor para a actividade da enzima RNA polimerase dependente de DNA; e

(iii) Um terceiro domínio (C) que é de cadeia simples ou dupla e adjacente ao domínio B, de forma a que o terceiro domínio seja capaz de funcionar como um modelo para a actividade promotora do segundo domínio;

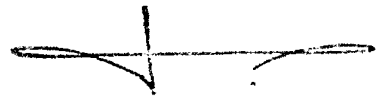
(c) remoção da sonda não ligada;

(d) transcrição de múltiplas cópias de oligómeros de RNA que são complementares à sequência modelo, c', do terceiro domínio, C, da sonda construída pela via da actividade da RNA polimerase dependente de DNA; e

(e) quantificação dos transcritos.

Um outro aspecto do invento é um outro método para amplificar um sinal detectável num imunoensaio através do uso das sondas multiméricas descritas acima. Este método compreende:

(a) a imobilização do analisado, directa ou



indirectamente num substrato sólido;

(b) ligação directa ou indirecta ao analisado de uma sonda molecular híbrida compreendendo:

(i) um domínio de ligação (A) que é um polipeptido capaz de funcionar como um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno de interesse; e

(ii) um segundo domínio (M) compreendendo uma multiplicidade de sub-unidades de oligonucleótidos de DNA de cadeia simples que são capazes de se ligar especificamente a um oligonucleótido marcado de cadeia simples; e

(iii) um meio de conjugar o primeiro e segundo domínios;

(c) remoção da sonda não ligada;

(d) hibridação de oligonucleótidos marcados de cadeia simples que compreendem uma sequência nucleotídica que é substancialmente complementar à sequência da sub-unidade do domínio M da sonda, com as sub-unidades do segundo domínio;

(e) remoção do oligonucleótido marcado não ligado; e

(f) quantificação da quantidade de oligonucleótido marcado ligado à sonda.

Ainda outra configuração é um método de amplificação de um sinal detectável num imunoensaio competitivo que compreende:

(a) construção de uma molécula híbrida em que o domínio A é um polipeptido capaz de funcionar como um "haptén", e este domínio é conjugado ou com o domínio B/C da sonda polimérica ou com o domínio M da sonda multimérica;

(b) imobilização da molécula híbrida, directa ou indirectamente num substrato sólido, na presença de um analisado



competitivo;

(c) remoção da sonda não ligada; e ou

(d) transcrição de múltiplas cópias de oligómeros de RNA pela via da actividade da RNA polimerase dependente de DNA e quantificação dos transcritos - isto na circunstância de ser utilizada uma sonda polimerásica; ou

(e) hibridizar oligonucleotidos marcados de cadeia simples, às subunidades do dominio M, remover a marcação não ligada e quantificar a marcação ligada - isto na circunstância de ser utilizada uma sonda multimérica.

Breve descrição dos desenhos

A figura 1A é uma representação esquemática de uma sonda amplificadora monomérica do tipo polimerase. As letras maiúsculas designam os dominios, e as letras minúsculas designam cadeias dentro dos dominios. A letra impressa contínua A designa uma cadeia baixa (lida da extremidade 3' para a 5', da esquerda para a direita). O dominio A é um anticorpo que reconhece o epitopo alvo. O dominio B é o promotor para a RNA polimerase. A sequência c' é o modelo para a RNA polimerase. A sonda é sintetizada como uma cadeia simples. A sequência AAAAAA na extremidade da região C representa o "linker" poli-A adicionado para permitir a auto-hibridação. A região A/T entre o dominio A e B é requerida opcionalmente para reter a totalidade da actividade do anticorpo.

A Figura 1B é a sequência de DNA de uma configuração da sonda amplificadora do tipo polimerásica. O dominio do promotor, B, consiste na sequência de consenso do promotor do bacteriófago T7 (5'-TAATACGACTCACTATA-3') mais 15 resíduos 5' adicionais à

sequência promotora.

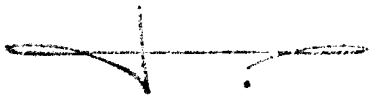
A Figura 1C é uma representação esquemática de uma sonda amplificadora multimérica do tipo polimerásica na qual o domínio A funciona como um anticorpo e os domínios B e C de dupla cadeia são auto-hibridizados.

A Figura 1D é uma representação esquemática de sondas amplificadoras multiméricas nas quais o domínio A funciona como um anticorpo e o domínio M é compreendido de múltiplas sub-unidades oligoméricas. São descritos multímeros ramificados e combinados.

A Figura 2A é uma representação esquemática de um sistema de imunoensaio "sandwich" que incorpora a sonda amplificadora do tipo polimerásica. A proteína do analisado é indirectamente imobilizada num substrato sólido através da complexação com um primeiro anticorpo (por exemplo um anticorpo "rab" (coelho)); e juntada indirectamente à sonda amplificadora através da complexação com um segundo anticorpo (por exemplo um anticorpo de rato).

A Figura 2B é uma representação esquemática de um sistema de "sandwich" hibridação/imunoensaio. A proteína analisada é indirectamente imobilizada como descrito acima. O segundo anticorpo (de rato anti-analisado) é complexado com uma molécula híbrida de anticorpo/polinucleótido, no qual a metade da proteína funciona como um anticorpo anti-rato e a metade do polinucleótido é complementar à região a' do nucleótido da sonda amplificadora (neste caso uma sonda multimérica).

A Figura 3 descreve o uso dos transcritos da RNA polimerase como moléculas registadoras em imunoensaios. Após se



ter formado o complexo "sandwich" que incorpora a sonda polimerásica, é adicionada RNA polimerase e múltiplos transcritos de RNA (c) complementares à sequência modelo (c') são produzidos. Estas sequências têm dois sub-dominios: c1 que é complementar à sonda de captura, imobilizada num substrato sólido; e c2 que é complementar à sonda marcadora. Isto permite a imobilização indirecta da marcação e fácil quantificação do sinal de hibridação do ensaio. "*" designa a marcação incorporada que pode ser radioactiva, quimioluminescente, fluorescente ou enzimática.

A Figura 4 (partes A-F) ilustra procedimentos utilizados para fazer multimeros tendo estruturas do "tipo pente" e/ou bifurcadas.

Descrição Detalhada do Invento


Definições

Um "sinal detectável" é um indicio transmissível da ocorrência de um evento bioquímico, tal como a hibridação de um ácido nucleico ou a ligação de um antigénio a um anticorpo. Este pedido descreve métodos de amplificação do sinal detectável em imunoensaios.

A "RNA polimerase dependente de DNA" é uma enzima que facilita a polimerização de RNA de sequências específicas a partir de um modelo de DNA complementar.

Um "domínio" é uma região particular de uma molécula bioquímica caracterizada pela sua função.

Um "epitopo" é a porção de uma molécula imunogénica que



é especificamente reconhecida pelo, e se complexa com o seu anticorpo correspondente numa reacção imunológica.

Uma molécula "híbrida" de nucleótido/péptido compreende tanto resíduos de ácido nucleico como resíduos de aminoácidos, cada um num domínio funcional separado na molécula.

Um "imunogénio" é uma substância que pode reagir, de uma forma específica, com um anticorpo.

Uma "reacção imunológica" é o reconhecimento específico e ligação de um anticorpo ao epitopo do imunogénio. Um "imunoensaio" é um método de determinar a presença de um epitopo através da combinação de uma reacção imunológica com um meio para detectar e quantificar a reacção.

Um "polidesoxiribonucleótido" é uma molécula de DNA polimérica. Um "polinucleótido" é uma molécula de DNA ou RNA polimérica.

Um "promotor" é o local num polidesoxiribonucleótido a que se liga a enzima RNA polimerase para preparar a iniciação da transcrição.

A "RNA polimerase dependente de RNA" é uma enzima que facilita a polimerização de RNA de sequências específicas, a partir de um modelo de RNA complementar.

A "transcrição" é um processo, mediado por enzima, pelo qual o RNA é formado a partir de um modelo polinucleótido complementar.

A "cadeia a montante" de uma molécula de DNA de dupla cadeia é a cadeia cuja extremidade 5' está à esquerda, quando se lê a sequência da esquerda para a direita. A sequência desta cadeia está sempre presente acima da cadeia que lhe é

complementar, a cadeia baixa, que é lida da extremidade 3' para a 5', da esquerda para a direita.

Modos de realização do invento


I-Sondas de amplificação.

A-Sondas polimerásicas

Um aspecto deste invento é uma sonda de amplificação de DNA (referida como "sonda polimerase") contendo três domínios funcionais. Esta sonda é utilizada para incrementar o sinal detectável em imunoenaios.

O primeiro domínio (A - Figura 1A) é um polipeptido que funciona como um anticorpo com especificidade para o antígeno escolhido. A região funcional do polipeptido é seguida de uma região ou de resíduos de aminoácidos ou de resíduos de ácidos nucleicos, isto é, uma região espaçadora que não interfere substancialmente com a actividade do anticorpo. A actividade do anticorpo pode ser específica para um epitopo do próprio analisado; contudo, numa configuração preferida, o anticorpo é direccionado para um determinante antigénico da imunoglobulina particular utilizada no ensaio descrito infra (por exemplo, IgG anti coelho, ou IgG anti humana - ver Figura 2A). Como requerido, o analisado entra em contacto com um anticorpo específico, o excesso de anticorpo é removido e depois deixa-se a sonda de amplificação reagir com o anticorpo ligado.

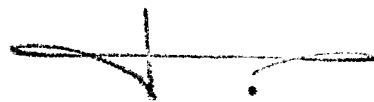
Preferencialmente, o analisado é primeiramente imobilizado num substrato sólido para facilitar subsequentes procedimentos de lavagem. Esta imobilização pode ser directa (por exemplo, preparações biológicas contendo o analisado podem ser



ligadas a um filtro de nitrocelulose) ou indirectamente (por exemplo, um anticorpo específico pode ser imobilizado num substrato sólido e o analisado é subsequentemente ligado ao anticorpo imobilizado).

O segundo domínio (B - Figura 1A), usualmente com um comprimento de 10 a 40 pares de bases, preferencialmente de 20 a 35 pares de bases, mais preferencialmente de 30 a 35 pares de bases, é de dupla cadeia, e funciona como um promotor de RNA polimerase directa do DNA. Este promotor é usualmente derivado de uma sequência promotora de um fago bacteriano, preferencialmente qualquer um dos fagos T3, T7 ou SP6, mais preferencialmente a partir do bacteriófago T7. Esta classe de RNA polimerases é altamente específica para o promotor. O promotor T7 é provavelmente o melhor caracterizado (Figura 1B). São conhecidas as sequências de DNA de 17 promotores T7 e foi deduzida uma sequência de consenso: 5'-TAATACGACTCACTATA-3' (Oakley e Coleman, Proc. Nat. Acad. Sci. (1977) 74:4266; Dunn e Studier, J. Molec. Biol. (1983) 166:477). As sequências 3' do promotor na cadeia complementar (o segmento c', cuja extremidade 3' é adjacente à extremidade 5' do segmento b'), servem como modelo para transcrição e pode ser realizada a transcrição de muitas variações da sequência modelo (Figura 1B). Só a própria região promotora tem de ser de dupla cadeia (Milligan et al, Nuc. Acids. Res. (1987) 15:8783).

Extensões na extremidade 5' do promotor têm um reduzido efeito na transcrição. Por exemplo, numa configuração preferida, a região B consiste na sequência de consenso do promotor T7, mais as bases adicionais 5' à sequência de consenso, que são idênticas

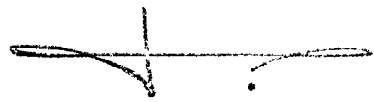


à sequência dos plasmídeos pT7 (disponíveis pela US Biochemicals), até ao local de restrição PvuII (Figura 1B). Estas sequências podem ou não ser exteriores.

O terceiro domínio (C - Figura 1A) tem a direcção 3' para o segundo domínio e a cadeia c' deste domínio serve como modelo para o promotor do domínio B. O domínio C tem usualmente 30 a 80 nucleótidos de comprimento, preferencialmente de 35 a 50 nucleótidos, mais preferencialmente de 40 a 45 nucleótidos. Este domínio pode ser de cadeia simples ou dupla. A extremidade 3' da cadeia modelo c' (directamente adjacente ao promotor) é usualmente um residuo de citosina e, conseqüentemente, a extremidade 5' da cadeia acima é usualmente um residuo de guanosina.

O produto da transcrição de RNA (c) do domínio C funciona como uma molécula registadora para a presença e quantidade de analísado (Figura 3). A amplificação de sinal ocorre porque cada modelo produz de 10^1 a 10^4 transcritos. A sequência deste domínio é concebida com sequências aleatórias, avaliadas por análise de computador para minimizar a possibilidade de reacções cruzadas com outras sondas no sistema.

A sequência do domínio C é concebida para detectar esquemas específicos e vários desses esquemas podem ser empregues para quantificar os transcritos. Por exemplo, o produto de transcrição (c) do domínio C pode ser dividido em dois sub-dominios - c₁ e c₂ (Figura 3). O sub-domínio c₁ é complementar a um transcrito da sonda de captura que foi imobilizado num substrato sólido. o sub-domínio c₂ é complementar a uma sonda de marcação. Após a hibridação, a quantidade de marcação retida é



linearmente proporcional à quantidade de analisado presente na amostra original.


Numa configuração alternativa, o transcrito do domínio C tem apenas um único sub-domínio c_1 . O domínio C é transcrito na presença de ribonucleótidos trifosfatados marcados, e o transcrito marcado é subsequentemente ligado a um transcrito de sonda de captura imobilizado através do seu sub-domínio complementar c_1 e quantificado.

Ainda noutra configuração, o transcrito do domínio C tem apenas o sub-domínio c_2 . O domínio C é transcrito na presença de ribonucleósidos trifosfatados biotinilados, e os transcritos são capturados em contas de avidina. O transcrito é depois hibridizado com uma sonda marcadora, através do seu sub-domínio complementar c_2 , e quantificado.

Vários outros métodos de marcação e quantificação de transcritos da sonda amplificadora são possíveis, incluindo o uso simultâneo de ribonucleótidos marcados e acoplamento com avidina/biotina, e serão óbvios para os especialistas na técnica.

Os domínios B e C das sondas polimerásicas podem ser preparados por clonagem, montagem enzimática, técnicas químicas de ligações cruzadas, síntese química directa ou combinações destes. Quando preparadas por clonagem, as sequências de ácidos nucleicos que codificam a totalidade dos domínio B/C ou fragmentos destes podem ser feitas na forma de cadeia simples ou dupla por procedimentos convencionais de clonagem.

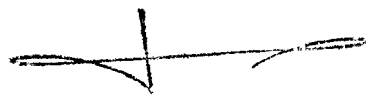
O domínio B é de dupla cadeia, e o domínio C pode ser de cadeia simples ou dupla. Os domínios de dupla cadeia podem ser criados de duas formas: as cadeias podem ser clonadas



separadamente e hibridizadas subsequentemente as cadeias complementares; ou alternativamente, a sonda pode ser clonada como uma cadeia simples, autohibridizando-se o polinucleótido (por exemplo - b' c' c b). Neste caso, quatro a dez nucleótidos adicionais, preferencialmente 5 a 7 nucleótidos, são adicionados à sequência como um espaçador entre c e c' para permitir um contorno adequado da região da dupla cadeia quando é autohibridizada. O espaçador é usualmente poli-A, mas pode ser modificado para minimizar as reacções cruzadas de hibridação entre várias sondas no ensaio.

O domínio A pode ser conjugado com os domínios B/C, através de agentes de ligação "interposta" tais como ácidos nucleicos, aminoácidos, pontes de hidratos de carbono ou poliol, ou através de outros agentes de ligações cruzadas. O domínio B/C pode ser sintetizado com um residuo 5' de ácido nucleico que sofreu uma derivação para ter um grupo funcional que fornece um local de ligação para o domínio A, ou o residuo pode sofrer derivação após o oligonucleótido ter sido sintetizado para fornecer tal local. Um procedimento preferido para ligações químicas cruzadas é incorporar uma base de citosina modificada N⁴ na extremidade 5' do polinucleótido, como descrito na publicação E.P.A., de pertença comum da requerente, com a publicação no 0225807.

Numa configuração mais preferida a conjugação do domínio B/C do DNA com o domínio A do anticorpo pode ser realizada de uma forma análoga à conjugação enzimática. O domínio B/C é sintetizado de forma a conter uma metade alquilamina. A alquilamina reage com um agente de ligações cruzadas



heterobifuncional tal como o succinimidil 4-(maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC). Após a purificação em coluna, o DNA pode reagir especificamente com funções sulfidrilicas (tal como o F(ab')₂, ou pode ser modificado de forma a conter sulfidrilo (tal como quando modificado com N-succinimidil 3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) e depois reduzido). A conjugação directa da amina-DNA e amina-anticorpo também é possível com reagentes homobifuncionais, mas é tipicamente mais difícil de controlar.

B-Sondas multiméricas

Uma outra configuração do invento, é uma sonda de amplificação de DNA (referida como "sonda multimérica") contendo dois domínios funcionais, um primeiro domínio, A, que é o mesmo que o domínio A da sonda polimerásica descrita acima, e um segundo (M-Figura 1D) que compreende várias subunidades repetitivas. Esta sonda, tal como sonda polimerásica descrita acima, é também utilizada para a amplificação de sinal em imunoensaios.

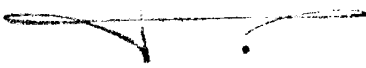
O polinucleótido do domínio M pode ser um polímero linear ou ramificado da mesma sub-unidade repetitiva oligonucleotídica de cadeia simples ou diferentes subunidades oligonucleotídicas de cadeia simples. Estas sub-unidades são capazes de hibridizar especificamente e estavelmente com um nucleótido de cadeia simples de interesse, tipicamente um oligonucleótido marcado ou outro multímero. Estas unidades terão normalmente 15 a 50, preferencialmente de 15 a 30 nucleótidos de comprimento e têm um conteúdo de GC na ordem dos 40 a 60%. O



número total de unidades de oligonucleótidos num multímero será geralmente da ordem dos 3 a 50, mais usualmente de 10 a 20. As unidades oligonucleotídicas do multímero podem ser compostas de RNA, DNA, nucleótidos modificados e combinações destes.

As sub-unidades oligonucleotídicas do multímero podem estar ligadas covalentemente em direcção umas às outras através de pontes fosfodiéster ou através de agentes de ligação interposta, tais como ácidos nucleicos, aminoácidos, pontes de hidratos de carbono ou poliol, ou através de outros agentes de ligação cruzada que são capazes de entrecruzar cadeias de ácidos nucleicos ou de ácidos nucleicos modificados. O(s) sitio(s) de ligação podem ser nas extremidades da sub-unidade (com orientação normal 3'-5' ou com orientação aleatória), e/ou num ou mais nucleótidos internos na cadeia.

Em multímeros lineares as sub-unidades individuais são ligadas extremidade a extremidade de modo a formar um polímero linear. Num tipo de multímero ramificado emanam três ou mais unidades oligonucleotídicas, a partir do ponto de origem para formar uma estrutura ramificada. O ponto de origem pode ser outra sub-unidade oligonucleotídica ou uma molécula multifuncional à qual podem ser ligadas covalentemente pelos menos três unidades. Num outro tipo, há uma sub-unidade oligonucleotídica da cadeia principal com uma ou mais sub-unidades oligonucleotídicas pendentes. Este último tipo de multímeros são do "tipo garfo", do "tipo pente" ou uma combinação dos "tipo garfo" e "pente" em estrutura. As unidades pendentes dependerão normalmente de nucleótidos modificados ou outra metade orgânica contendo grupos funcionais apropriados com os quais os oligonucleótidos possam



ser conjugados ou ligados de outra forma. Ver Figura 1D.

O multímero pode ser totalmente linear, totalmente ramificado, ou uma combinação de porções lineares e ramificadas. Preferencialmente haverá, pelo menos, dois pontos de ramificação no multímero, mais preferencialmente pelo menos 15, preferencialmente 15 a 50. O multímero pode incluir um ou mais segmentos de sequências de cadeia dupla.

O domínio M pode ser preparado por clonagem (se linear), por preparação enzimática, técnicas químicas de reacções cruzadas, síntese química directa ou combinação destes. Estes métodos de síntese estão totalmente descritos no Pedido de Patente Internacional, de pertença comum da requerente, publicação No. 89/03891, publicado a 5 de Maio de 1989. No caso dos multímeros lineares preparados por clonagem, as sequências de ácido nucleico que codificam a totalidade do multímero ou fragmentos deste podem ser feitas na forma de cadeia simples ou dupla, através de procedimentos convencionais de clonagem. Quando feitos na forma de dupla cadeia, os multímeros/fragmentos são por fim desnaturados para fornecer multímeros/fragmentos de cadeia simples. Os multímeros podem ser clonados na forma de cadeia simples usando um vector fago convencional de cadeia simples tal como o M13. Os fragmentos podem ser ligados enzimaticamente ou quimicamente para formar o multímero do domínio M. Quando preparadas enzimaticamente, as unidades individuais são ligadas com uma ligase como a ligase DNA T4 ou RNA, conforme o caso. Quando preparadas por entrecruzamento químico, as unidades individuais podem ser sintetizadas com um ou mais ácidos nucleicos que sofreram uma derivação, de forma a possuírem grupos

funcionais que fornecem os locais de ligação, ou derivados após o oligonucleótido ter sido sintetizado para fornecer tais locais. Um procedimento preferido para o entrecruzamento químico é incorporar bases de citosina modificadas N⁴ nos nucleótidos, como descrito na E.P.A. com o No 225.07, a descrição da qual se encontra aqui incorporada para referência.

Quando preparados por síntese química directa, oligonucleótidos contendo ácidos nucleicos derivados ou moléculas multifuncionais equivalentes cujos grupos funcionais estão bloqueados, são feitos por técnicas convencionais de síntese de oligonucleótidos. Os grupos funcionais não estão bloqueados e as unidades oligonucleotídicas são sintetizadas a partir do(s) local(ais) não bloqueado(s).

A estrutura genérica para as moléculas usadas para originar pontos de ramificação em multimeros é a seguinte:

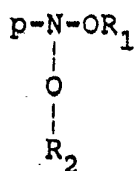


em que R é uma metade orgânica, preferencialmente um ácido nucleico, R¹ é um grupo hidróxilo protector que pode ser removido em condições que não provoquem a remoção do ácido nucleico sintético de uma fase sólida, e não removam os grupos protectores de nitrogénio ou fosfato exocíclicos, X é um grupo contendo fósforo que facilita a síntese de ácido nucleico, tal como um grupo protector de fosforamidita, fosfonato ou fosfato, Y é um radical derivado de um grupo nucleofílico tal como uma amina, hidróxilo, sulfidrilo ou fosfato protegido, e R² é R¹ ou

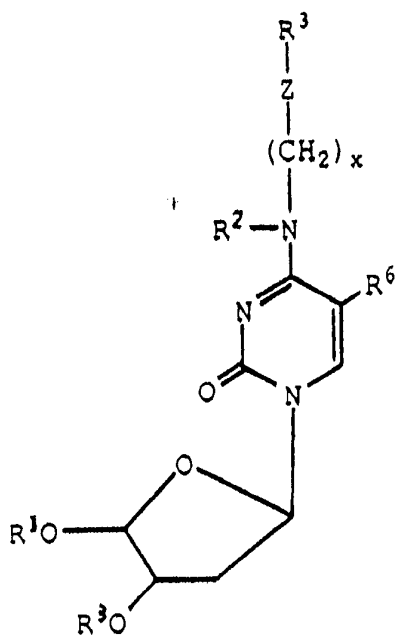
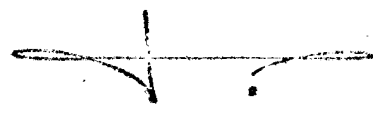
um grupo protector ou bloqueador que pode ser removido e substituído com hidrogénio sem afectar R^1 . Em moléculas usadas para originar ramificações bifurcadas ou "tipo-garfo", R^1 e R^2 são os mesmos; enquanto que, em moléculas usadas para originar ramificações do "tipo-pente", R^2 é um grupo bloqueador que é estável na presença de um reagente desbloqueador de R^1 . A Figura 4 ilustra esquematicamente o procedimento usado para a síntese de multimeros tendo ramos do "tipo-pente", ramificações do "tipo-garfo", ou combinações destes.

A parte A da Figura 4 descreve um esquema de síntese convencional de oligonucleótidos para preparar um oligonucleótido linear, tal como o método automatizado da fosforamidita (Warner et al., DNA (1984) 3:401). O bloco a escuro representa um suporte sólido, N representa um nucleótido e p-N-OR₁ (R_1 é equivalente ao R^1 abaixo), um convencional derivado de nucleótido tendo grupos protectores apropriados.

A parte B mostra o procedimento para fazer o multímero do tipo pente. O composto:



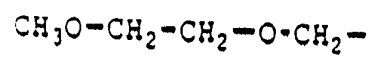
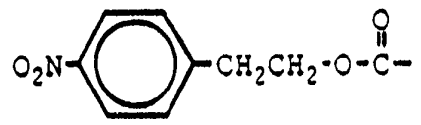
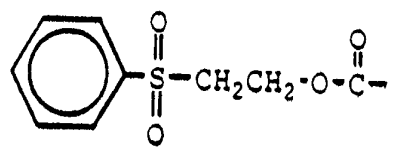
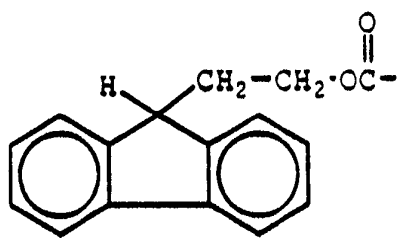
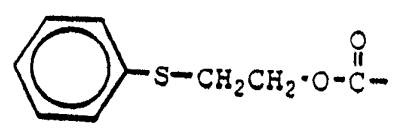
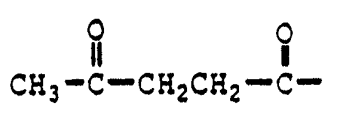
representa uma base modificada da fórmula (2) abaixo. Uma unidade oligomérica de tamanho e sequência desejada é sintetizada e deixada no suporte. Uma ou mais bases de citosina modificadas N^4 são depois incorporadas na cadeia pelo dito procedimento automático. Preferencialmente, a base modificada tem a fórmula:



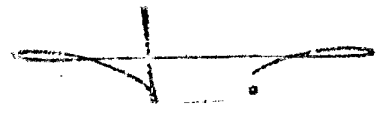
(2)

em que Z é um nucleófilo tal como -O-, -NH-, -S-, PO₄=, e

R¹ é um grupo bloqueante ou protector tal como um dimetoxitritil (DMT) ou pixil que é geralmente estabilizador de bases e sensível a ácidos, R² é hidrogénio ou metil, R³ é um grupo protector ou bloqueante que pode ser removido e substituído com hidrogénio sem afectar R¹, tal como:



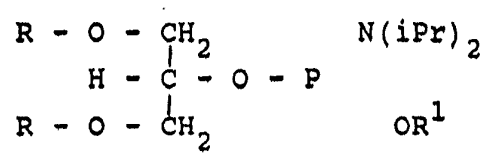
e,



R^5 é a fosforamidite ou outro derivado de fósforo que permite a adição de nucleótidos à posição 5' de uma cadeia oligonucleotídica durante a síntese química (por exemplo, um fosfodiéster, fosfotriéster, etc.), R^6 é metil, hidrogénio, I, Br ou F, e X é um no inteiro no intervalo de 1 a 8 inclusivé. Quando mais do que uma base modificada é incorporada, elas são preferencialmente espaçadas por bases intermediárias na cadeia, de preferência um dímero -TT-. Unidades oligonucleotídicas adicionais podem ser incorporadas na cadeia principal seguindo-se a adição de bases modificadas e assim por diante.

O grupo nucleófilo N^4 é depois desprotegido (o R^3 é removido) e são geradas a partir dele unidades oligonucleotídicas adicionais pelo procedimento automático. Grupos residuais R^1 na terminação da cadeia são removidos, e o multímero ramificado do "tipo-pente" é quebrado a partir do suporte.

A parte C da Figura 4 descreve o procedimento geral para a produção de multímeros do "tipo-pente". Mais uma vez, uma unidade oligomérica de tamanho e sequência desejada é sintetizada por técnicas convencionais e deixada no suporte. Um grupo bloqueado, bifuncional contendo fósforo (representado como XP na parte C), tal como uma fosforamidite bloqueada, é depois incorporado na cadeia por procedimento automático. Grupos preferidos bifuncionais contendo fósforo são fosforamiditas bloqueadas da fórmula





em que R é o dito grupo hidróxilo protector, iPr é isopropil, e R¹ é metil ou beta-cianoetil. Mais preferencialmente R é DMT e R¹ é beta-cianoetil.

Alternativamente, pode ser usada a base de citosina modificada N⁴ em que R₁=R₂ (por exemplo DMT).

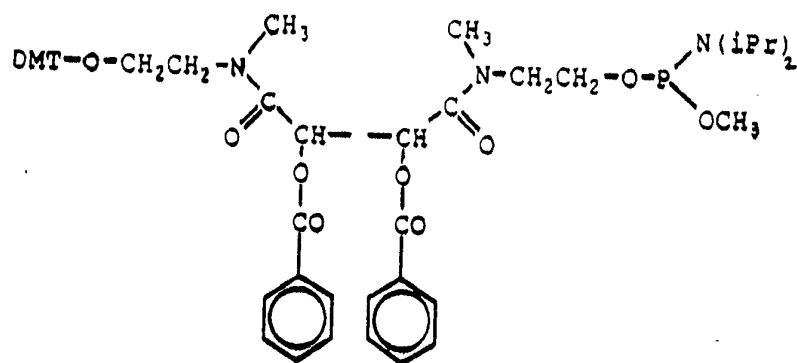
Os dois grupos protectores são depois removidos e são geradas a partir deles unidades oligonucleotídicas pelo procedimento automático. Os grupos residuais R¹ são removidos e o multímero bifurcado é quebrado a partir do suporte.

As partes D e E descrevem procedimentos em que dois ou mais multímeros bifurcados, multímeros do "tipo-pente" ou combinações destes são conjuntamente cortados enzimaticamente ou quimicamente. Geralmente, os multímeros bifurcados e/ou do "tipo-pente" são preparados como acima e removidos do suporte. São depois combinados em solução usando procedimentos de ligação enzimáticos ou químicos descritos acima.

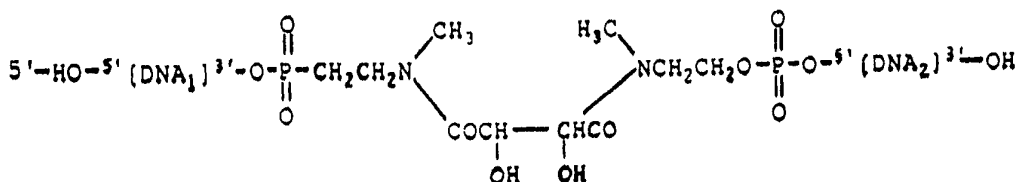
A parte F mostra o procedimento para sintetizar um multímero múltiplo do "tipo pente". Este procedimento é uma variação do procedimento ilustrado na parte B e envolve a incorporação de bases modificadas nas cadeias laterais dependentes e a criação de cadeias laterais secundárias de oligonucleótidos a partir delas.

Moléculas "linker" apropriadas para a clivagem podem ser incorporadas nos multímeros, em locais pré-determinados, com o propósito de analisar a estrutura do multímero ou como um meio para libertar segmentos pré-determinados (tal como a porção do multímero que se liga ao oligonucleótido marcado).

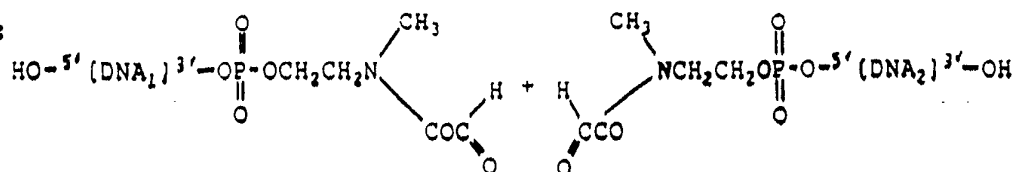
Subsequentemente à síntese e purificação do multímero estes "linkers" podem ser quebrados especificamente sem degradação adicional da estrutura de nucleótidos do multímero. Uma molécula "linker" do tipo preferido foi concebida para conter um grupo 1,2-diol (que pode ser quebrado selectivamente por periodatos), bem como um grupo hidróxilo protegido derivado de hidróxilo e fosforamidite para permitir que o "linker" seja incorporado em qualquer fragmento de DNA através de protocolos standard da química da fosforamidite. Uma configuração preferida de um tal "linker" é o composto:

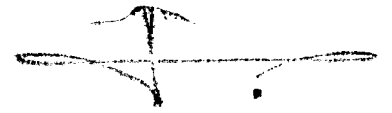


em que DMT e *iPr* estão definidos como previamente. Após a incorporação num fragmento de DNA e desprotecção completa, o fragmento contendo o "linker" tem a seguinte estrutura:



em que DNA₁ e DNA₂ representam sub-fragmentos de DNA que podem ser os mesmos ou diferentes. A reacção deste fragmento com periodato de sódio quebra o fragmento nos seguintes sub-fragmentos:





Alternativamente, o grupo 1,2-diol pode ser substituído por grupos "linker" que contêm uma ligação sensível hidroxilamina, uma ligação sulfona sensível à base, ou uma ligação disulfito sensível ao tiol. Tais grupos "linker" podem ser derivados a partir de agentes convencionais de entrecruzamentos que são usados para conjugar proteínas com outras entidades. Da mesma forma podem ser usados outros grupos protectores que não o DMT.

Os aspectos funcionais da sonda polimerase podem ser combinados com a estrutura da sonda multimérica através da síntese de uma sonda multimérica tendo um domínio M com sub-unidades compreendendo múltiplos dos domínios (B/C) do promotor/modelo da sonda polimerásica. Tal como as sondas multiméricas, as subunidades multiméricas podem ter um arranjo linear ou serem moléculas ramificadas.

Tal como nas sondas polimerásicas, o domínio A das sondas multiméricas pode ser conjugado com o domínio B através de agentes de ligação interposta tal com um ácido nucleico, um aminoácido, um hidrato de carbono ou pontes polioliol, ou através de outros agentes de entrecruzamento. O domínio M pode ser sintetizado com um resíduo de ácido nucleico 5' que sofreu um processo de derivação para ter um grupo funcional que fornece um local de ligação para o domínio A, ou o resíduo pode sofrer a derivação após o oligonucleótido ter sido sintetizado de forma a fornecer tal local. Um procedimento preferido para o entrecruzamento químico é incorporar uma base de citosina modificada N⁴ na extremidade 5' do polinucleótido como descrito nas vulgares publicações E.P.A. No 0225807 e na secção I(A),



acima.

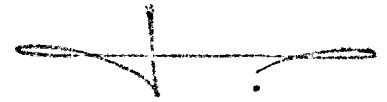
II-Imunoensaios

Um outro aspecto deste invento é a utilização de sondas amplificadoras em imunoensaios para detectar e quantificar a presença e concentração de analisado imunológico. Estas sondas amplificadoras são de duas classes: as sondas híbridas descritas na secção I acima (tanto as sondas polimerásicas como as multiméricas); ou as sondas polinucleotídicas descritas na Patentes Nortes Americanas com o Nos. de série 463.022 e 340.031. Estas sondas são semelhantes às sondas híbridas, mas os domínios A compreendem uma sequência polinucleotídica em vez de um polipéptido.

O analisado pode ser qualquer imunogénio conhecido de interesse. O analisado pode estar presente em baixas concentrações numa amostra preparada ou pode ser uma espécie minoritária numa mistura heterogénea de material biológico. O analisado pode estar presente numa variedade de fontes, por exemplo, fluidos biológicos ou tecidos, material alimentar, matérias ambientais, etc., ou pode ser sintetizado in vitro.

Numa primeira etapa, a amostra contendo o analisado é preparada por qualquer uma das variedades de métodos conhecidos pelos especialistas nesta técnica.

As sondas amplificadoras podem ser utilizadas para detectar um analisado em muitos protocolos de imunoensaios - realizados ou em solução ou imobilizados numa fase sólida. Se o imunoensaio é realizado em solução, a amostra contendo o analisado pode estar ou ligada directamente à sonda amplificadora; indirectamente através de um ou mais anticorpos



específicos para o analisado; ou, se é utilizada um sonda polinucleotídica, em conjugação com uma molécula "linker" híbrida (discutida na secção II(B), a seguir). As sondas amplificadoras podem ser utilizadas desta forma na maioria dos protocolos de imunoensaios em solução. Ver, por exemplo, a Patente Norte Americana com o No. 4.778.751.

Num imunoensaio que utilize uma fase sólida, o analisado (que pode ser um antigénio ou um anticorpo) ou é imobilizado directamente numa fase sólida; ou indirectamente através da ligação do analisado a um primeiro anticorpo que foi primeiramente ligado a uma fase sólida; ou por um ensaio "sandwich" (Figura 2A) no qual um segundo anticorpo reconhece o analisado e depois é reconhecido pelo primeiro anticorpo ligado à fase sólida.

Se o analisado vai ser directamente ligado à fase sólida, a amostra que contém o analisado é posta em contacto com um filtro de nitrocelulose ou meios semelhantes para não se ligar selectivamente às proteínas. Se o analisado é para ser ligado indirecta e selectivamente a uma fase sólida, um primeiro anticorpo, dirigido para um epitopo do analisado ou para um segundo anticorpo, é conjugado com a fase sólida e subsequentemente usado para ligar o analisado ou um segundo anticorpo ligado ao analisado.

A - Utilizando sondas híbridas

Um anticorpo adicional, dirigido para um segundo epitopo do analisado pode então ser usado como um "linker" entre o analisado e a sonda amplificadora. A sonda amplificadora, ou

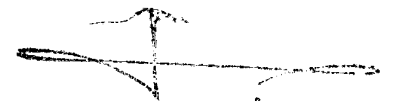


uma sonda polimerásica ou uma sonda multimérica, cujo domínio A está dirigido para o segundo anticorpo, pode depois ser conjugada com o anticorpo "linker", formando uma corda que consiste no primeiro anticorpo ligado à fase sólida, um segundo anticorpo, o analisado, o anticorpo "linker", e a sonda amplificadora (Figura 2A).

B -Utilizando sondas polinucleotídicas

Numa configuração alternativa, a sonda amplificadora é uma das sondas polinucleotídicas multiméricas descritas na publicação internacional no 89/03891. Estas sondas diferem das sondas multiméricas híbridas péptido/nucleótido do presente pedido na medida em que o domínio A é uma sequência polinucleotídica e não um polipéptido funcionando como anticorpo. Consequentemente, tem que ser utilizado um "linker" híbrido anticorpo/polinucleótido para juntar indirectamente o analisado à sonda amplificadora (Figura 2B). Este "linker" híbrido tem um primeiro domínio, que é um polipéptido que funciona como anticorpo específico para um epitopo do analisado ou um epitopo de um anticorpo que reconhece o analisado; e um segundo domínio que é uma sequência nucleotídica substancialmente complementar à sequência nucleotídica do domínio A da sonda amplificadora.

Da mesma forma, numa configuração alternativa, pode ser usada uma das sondas polimerásicas polinucleotídicas descritas no Pedido de Patente Norte Americano com o No de série 463.022. Estas sondas diferem das sondas polimerásicas híbridas do presente pedido na medida em que o domínio A é uma sequência polinucleotídica em vez de um polipéptido a funcionar como



anticorpo. Estas sondas também requerem o uso de um "linker" híbrido como descrito acima.

Através do uso de uma sonda amplificadora polinucleotídica e um "linker" híbrido em vez das sondas amplificadoras descritas na secção I, acima, a sonda amplificadora pode ser um reagente "universal", útil tanto para os ensaios de hibridação de ácidos nucleicos como para os imunoenaios.

C - Condições de hibridação e de ligação

Numa configuração preferida, o analisado é indirectamente imobilizado numa fase sólida, por exemplo uma placa de cúpulas 96 de cloreto de polivinilo (PVC). No ensaio "sandwich" descrito na Figura 2A, foram adicionados 50 µl do primeiro anticorpo (anti coelho a uma concentração de 20 µg/ml em NaHCO₃ 0,2 M) à cúpula. A cúpula é coberta e incubada por 2 horas à temperatura ambiente numa atmosfera humidificada. A solução é depois aspirada da cúpula. A cúpula é depois lavada duas vezes com tampão bloqueante contendo albumina de soro bovino, 3% em solução salina de tampão fosfato contendo azida de sódio 0,02%. A cúpula é de seguida incubada em tampão bloqueante durante 20 minutos à temperatura ambiente numa atmosfera humidificada e depois lavada mais duas vezes com o tampão bloqueante.

São adicionados 50 µl do segundo anticorpo (analisado anti-coelho também a uma concentração de 20 µg/ml) à cúpula e o procedimento descrito acima é repetido. De seguida são preparadas as séries de diluições do analisado, em tampão bloqueante. São adicionados 50 µl de cada diluição a uma cúpula. A placa é



coberta e levada a incubar durante duas horas à temperatura ambiente numa atmosfera humidificada. A seguir a esta incubação, as cúpulas são lavadas quatro vezes com o tampão bloqueante. O terceiro anticorpo (analisado anti rato) é de seguida adicionado da mesma forma, seguindo-se a adição da sonda amplificadora híbrida. Dado que preparações de tecidos ocasionais podem conter anticorpos anti DNA, o tampão bloqueante, utilizado para as lavagens que seguem a adição da sonda, também contém DNA de esperma de salmão 20 µg/ml.

Quando são usadas sondas amplificadoras polinucleotídicas ou sondas multiméricas híbridas, a etapa de hibridação de ácidos nucleicos é seguida da complexação do analisado e anticorpos. Usualmente, as condições de hibridação consistem num meio aquoso, preferencialmente um meio aquoso tamponado, o qual inclui vários aditivos. Estes aditivos podem incluir os polinucleótidos a serem hibridizados, sais (por exemplo, citrato de sódio de 0,017M a 0,17M e/ou cloreto de sódio de 0,17M a 1,7M), detergentes não iónicos tal como o NP-40 ou Triton X-100 (0,1 a 1%) que não interferem com o complexo antigénio/anticorpo, e ácidos nucleicos de transporte. A mistura foi a incubar durante 15 a 75 minutos e a uma temperatura que variou de 35° a 55°C.

Se as condições utilizadas para a hibridação dos nucleótidos marcados com as subunidades multiméricas causam instabilidade nos complexos antigénio/anticorpo, a etapa de hibridação pode ser precedida pelo tratamento do complexo com uma proteína de entrecruzamento tal como o gluteraldeído, ou um método similar de estabilizar o complexo. Uma vez estabilizado o



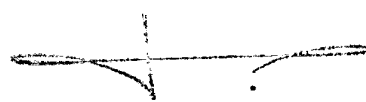
complexo proteico, as condições para a hibridação do ácido nucleico podem ser alteradas de forma a incluir SDS (até 1%); solventes não aquosos tais como a dimetilformamida, dimetilsulfóxido, e formamida; e temperaturas até 70°C.

É importante ajustar as condições de hibridação de ácidos nucleicos para manter a estabilidade dos complexos antigénio/anticorpo. Por exemplo, a hibridação de pequenos pedaços de sequências complementares pode ser conseguida a baixas temperaturas. Numa configuração preferida, as regiões complementares de cadeia simples têm 12 a 20 bases. Numa configuração preferida, a temperatura de hibridação é de 35 a 40°C. Além disso, dado que os únicos oligonucleótidos de cadeia simples presentes nesta etapa são as cadeias complementares, pode ser tolerada uma elevada rigidez e conseqüentemente baixas concentrações de sais (0,3 M Na).

1-Sonda multimérica

Se é utilizada uma sonda multimérica, o oligonucleótido marcado que é substancialmente complementar ao polinucleótido repetitivo do domínio M, é subseqüentemente adicionado sob condições que permitem que ele seja hibridizado com as unidades oligonucleotídicas complementares do multímero. O resultante complexo de ácido nucleico marcado de fase sólida é depois separado do excesso de oligonucleótido marcado, através de lavagens, para remover oligonucleótidos marcados não ligados, e lido.

A amplificação pode ser multiplicada através do uso de mais do que uma espécie de multímeros (como definido pela



sequência da sub-unidade) no ensaio. Nestas circunstâncias, é concebido um segundo multímero para se ligar à sequência repetitiva do primeiro multímero e o complexo é subsequentemente marcado com um oligonucleótido que é substancialmente complementar à sequência repetitiva do segundo multímero. Qualquer número de multímeros pode ser ligado em séries de forma a conseguir ainda uma maior amplificação.

2-Sonda polimerásica

Se é utilizada uma sonda polimerásica, a RNA polimerase específica para a região do promotor (domínio B) da sonda amplificadora é depois adicionada sob as condições de transcrição apropriadas e são produzidas múltiplas cópias de RNA (c) do modelo do domínio C (c'). A quantidade de transcrito é proporcional à quantidade de analisado na preparação inicial.

As condições de transcrição consistem num meio aquoso, de preferência um meio aquoso tamponado, com sais apropriados, usualmente incluindo sal de magnésio, rATP, rUTP, rGTP, rCTP, uma enzima RNA polimerase e usualmente inclui vários agentes desnaturantes, transportadores proteicos e inibidores da RNAase. A incubação é usualmente durante 15 a 90 minutos, usualmente 60 minutos; e a uma temperatura que é óptima para a enzima escolhida, usualmente de 35°C a 42°C, usualmente 37°C.

A sequência do domínio C é concebida para um esquema de detecção específico e vários de tais esquemas podem ser utilizados para quantificar os transcritos. Por exemplo, o produto da transcrição (c) do domínio C pode ser sub-dividido em 2 sub-dominios - c_1 e c_2 (Figura 2B). O sub-domínio c_1 é

complementar a uma sonda de captura de transcrito que foi imobilizada num substrato sólido. O sub-domínio c_2 é complementar à sonda marcada. Após a hibridação, a quantidade de marcação retida é linearmente proporcional à quantidade de analisado presente na amostra original.

Numa configuração alternativa, o transcrito do domínio C tem apenas o sub-domínio c_1 . O domínio C é transcrito na presença de ribonucleótidos trifosfatados marcados, e o transcrito marcado é subseqüentemente ligado a uma sonda de captura de transcrito imobilizada através do seu sub-domínio complementar c_1 e quantificada.

Ainda noutra configuração, o transcrito do domínio C tem apenas o sub-domínio c_2 . O domínio C é transcrito na presença de ribonucleósidos trifosfatados biotinilados e o transcrito é capturado em contos de avidina. O transcrito é depois hibridizado a uma sonda marcada através do seu sub-domínio complementar c_2 e quantificado.

São possíveis muitos outros métodos de marcação e detecção de transcritos da sonda amplificadora, incluindo o uso simultâneo de ribonucleótidos marcados e acoplamento avidina/biotina, e serão óbvios para os especialistas nesta técnica.

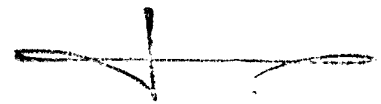
3-Considerações gerais

A fase sólida que é usada no ensaio pode ser em partículas ou ser a superfície sólida da parede de qualquer recipiente, por exemplo, tubos de centrifuga, colunas, placas de cúpulas de microtitulação, filtros, tubos, etc.



Preferencialmente, as partículas a serem utilizadas serão de um tamanho entre 0,4 e 200 microns, mais usualmente de 0,8 a 4,0 microns. As partículas podem ser de qualquer material conveniente, tal como latex ou vidro. O primeiro anticorpo específico para o analisado, ou para um segundo anticorpo que é específico para o analisado, pode estar estavelmente ligado à superfície sólida através de grupos funcionais por procedimentos conhecidos.

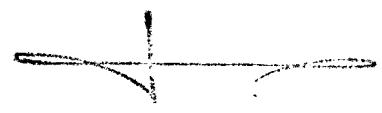
As sondas marcadas, se forem utilizadas sondas polimerásicas, incluirão sequências complementares ao subdomínio c_2 dos transcritos da sonda amplificadora; e se forem utilizadas sondas multiméricas, as sondas marcadas incluirão sequências complementares às unidades repetitivas do domínio B. A sonda marcada incluirá uma ou mais moléculas ("marcações"), que fornecerão directa ou indirectamente um sinal detectável. As marcações podem se ligar a membros individuais da sequência complementar, ou podem estar presentes como membros terminais ou caudas terminais tendo uma multiplicidade de marcações. Foram registados na literatura vários meios para fornecer marcações ligadas à sequência. Ver, por exemplo, Urdea et al., Nucl. Acids. Res. (1988) 16:4937, Leary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80:4045; Renz and Kurz, Nucl. Acids. Res. (1984) 12:3435; Richardson and Gumpert, Nucl. Acids. Res. (1983) 11:6167; Smith et al., Nucl. Acids. Res. (1985) 13:2399; Meinkoth and Wahl, Anal. Biochem. (1984) 138:267. As marcações podem se ligar ou covalentemente ou não covalentemente à sequência complementar. As marcações que podem ser utilizadas incluem radionuclídeos, fluorescentes, quimioluminescentes, corantes, enzimas, substratos



enzimáticos, cofactores enzimáticos, inibidores enzimáticos, subunidades enzimáticas, iões metálicos, e semelhantes. Marcações específicas ilustrativas incluem fluoresceína, rodamina, vermelho do Texas, ficoeritrina, umbeliferona, luminol, NADPH, galactosidase, peroxidase de rábano bastardo, etc. Ver Urdea et al para uma comparação com os métodos de marcação sem radioisótopos.

As sondas marcadas podem ser preparadas de forma conveniente por sínteses químicas tais como as descritas na publicação E.P.A. no 225807, de pertença da requerente. Através do fornecimento de um grupo terminal que tem uma funcionalidade conveniente, várias marcações podem ser agrupadas pela sua funcionalidade. Assim, podem fornecer-se diversas funcionalidades como carboxi, tiol, amina, hidrazina ou outra funcionalidade às quais as várias marcações se podem juntar sem afectar prejudicialmente a formação de duplexes com a sequência. Como já foi indicado, pode ter-se uma molécula com uma pluralidade de marcações agrupadas na sequência complementar à sequência marcadora. Alternativamente, pode ter-se um ligando ligado à sequência marcadora e usar um receptor marcado para se ligar ao ligando para fornecer o complexo do analisado marcado.

Dependendo da natureza da marcação, podem ser usadas várias técnicas para detectar a presença de marcação. Para fluorescentes, estão disponíveis um grande número de fluorómetros. Com enzimas, pode ser fornecido tanto um produto fluorescente como um colorido, e determinados fluorometricamente, espectrofotometricamente ou visualmente. As várias marcações que foram utilizadas em imunoensaios e as técnicas aplicáveis a



imunoensaios podem ser utilizadas com os ensaios referidos.

O procedimento utilizado nas etapas de separação do ensaio irá variar dependendo da natureza da fase sólida. Para partículas, a centrifugação ou filtração permitiram a separação das partículas, desprezando o sobrenadante ou isolando o sobrenadante. Quando as partículas são ensaiadas, as partículas serão completamente lavadas no local do ensaio, usualmente de uma a cinco vezes, com um meio tamponizado apropriado contendo detergente, por exemplo, PBS com SDS. Quando o meio de separação é uma parede ou suporte, o sobrenadante pode ser isolado ou desprezado e a parede é lavada da mesma forma que a indicada para as partículas.

D-Imunoensaios competitivos

As sondas amplificadoras híbridas do invento em questão podem também ser utilizadas como um meio para marcar antigénios em imunoensaios competitivos. No ensaio típico, excesso de anticorpo, policlonal ou monoclonal, preferencialmente monoclonal, que se liga especificamente ao analisado, é imobilizado numa fase sólida, usualmente numa placa de cúpulas múltiplas. Uma concentração padrão de antigénio marcado é misturada com uma série de diluições da amostra que se supõe conter uma quantidade desconhecida de analisado. As diluições separadas são depois expostas ao anticorpo imobilizado e é medida a quantidade de marcação ligada. A capacidade do analisado não marcado de competir com o analisado marcado é usada para calcular a quantidade de analisado na amostra.

Numa configuração, uma metade do polinucleótido do

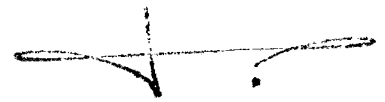


domínio B/C da sonda polimerásica é conjugado com um imunogénio competitivo. Esta molécula híbrida é depois usada como o antigénio marcador descrito acima. Após a ligação competitiva, a polimerase (específica para o domínio B do promotor) é adicionada e o produto da transcrição é ensaiado como descrito na secção I(A), acima.

Numa outra configuração, uma metade do polinucleótido do domínio M da sonda multimérica é conjugada com um imunogénio competitivo. Esta molécula híbrida é depois usada como o antigénio marcador descrito acima. Após a ligação competitiva, o domínio M é marcado e quantificado como descrito acima.

Para que o imunogénio se junte ao DNA, a utilização de reagentes homobifuncionais tais como o disuccinimidil suberato (DSS), etileno glicol bis(succinimidilsuccinato) (EGS), ou p-fenileno diisotiocianato (DITC), são provavelmente métodos de acoplamento mais úteis do que os descritos na secção I(A), acima.

Kits para realizar os imunoensaios de amplificação de acordo com o invento compreenderão, numa combinação empacotada, os seguintes reagentes: uma fase sólida que é capaz ou de se ligar ao analisado antigénio ou, alternativamente, tem ligado a si um primeiro anticorpo de ligação se o formato do ensaio é aquele em que o analisado é indirectamente ligado à fase sólida através de um primeiro anticorpo ligado ou através de um segundo anticorpo; opcionalmente um segundo "linker" e terceiros anticorpos que são específicos para o analisado, e uma sonda "linker" híbrida se o formato do ensaio é aquele em que se utiliza uma sonda amplificadora polinucleotídica; a sonda amplificadora; a apropriada RNA polimerase feita directamente de



DNA e sondas de captura de transcritos imobilizados (se é utilizada uma sonda amplificadora polimerásica). Estes reagentes estarão tipicamente em recipientes separados no kit. O kit pode também incluir tampões de hibridação, soluções de lavagem, controlos negativos e positivos e instruções escritas para realizar o ensaio.

Os exemplos que se seguem estão apresentados como ilustrações, não limitações, do presente invento. Outras configurações dentro do espírito e campo do invento surgirão para os especialistas destas técnicas.

Exemplo 1 - Imunoensaios para a presença de antigénio HCV em soro humano

Este ensaio está concebido para detectar directamente a presença do antigénio C-100 do vírus da Hepatite C. O protocolo geral para este imunoensaio está descrito acima. São preparadas placas de microtitulação utilizando rato-anti-cabra como o primeiro anticorpo. Este anticorpo é imobilizado nas cúpulas da placa de cúpulas de microtitulação 96. O segundo anticorpo é um anticorpo monoclonal de rato específico para um epitopo do C-100 do HCV. Diluições em duplicado do soro de indivíduos a serem visualizados para o HCV são preparadas em tampão bloqueante e incubadas em cúpulas de microtitulação juntamente com os controlos não infectados apropriados. O terceiro anticorpo é uma combinação de anticorpos policlonais de coelho que reconhecem cada um dos antigénios do HCV. O anticorpo final é uma sonda híbrida amplificadora de polimerase T7. A metade polipeptídica do domínio A funciona como um anticorpo coelho-anti-cabra e completa




o imunoenensaio "sandwish".

Após a adição da sonda polimerásica T7, a transcrição do domínio C é efectuada através da incubação do complexo em 20 µl de uma solução contendo Tris HCl 40 mM (pH 8), MgCl₂ 20 mM, NaCl 10 mM, Espermidina 1 mM, ditioneitol 10 mM, albumina de soro bovino 0,15 mg/ml, rATP, rCTP, rGTP, rUTP cada a 1,25 mM, RNasin 1600 unidades/ml, e RNA polimerase T7, 2000 unidades/ml. A mistura é incubada a 37°C durante uma hora. A transcrição termina com a adição de 20 µl de uma solução contendo 8xSSC e SDS 2% e toda a mistura é transferida para novas cúpulas contendo uma sonda de captura imobilizada com as sequências c₁'. A captura dos transcritos do domínio C (Figura 3) é efectuada através da incubação a 55°C durante uma hora seguida por duas lavagens com 0,1xSSC, SDS 0,1%.

Os transcritos do domínio C são depois marcados pela adição de 50 fmoles de sonda de enzima marcada (c₂') em 40 µl de 4xSSC, poli A 100µg/ml durante 15 minutos a 55°C. Finalmente o complexo foi lavado duas vezes com 0,1xSSC, SDS 0,1%, seguindo-se duas lavagens com 0,1xSSC.

Para a detecção AP, é utilizada uma reacção de dioxetano dirigido para o enzima (Schapp et al. (1987) Tet. Lett. 28:1159-1162, e Patente Norte Americana com o No. 4.857.652), obtida a partir da Lumigen Inc. O procedimento de detecção é o que se segue. Para a etapa de marcação são adicionados 20 µl de tampão HM com a sonda AP a cada cúpula e as cúpulas são incubadas a 55°C durante 15 minutos. O sobrenadante é removido e as cúpulas são depois lavadas duas vezes com 380 µl de 0,1xSSC e SDS 0,1%. As cúpulas são depois lavadas duas vezes com 380 µl de 0,1xSSC



para remover o SDS restante. São adicionados a cada cúpula 20 µl de dioxetano $3,3 \times 10^{-4} M$ em tampão CTAB. As cúpulas são batidas levemente de forma a que o reagente caia para o fundo e se espalhe gentilmente para distribuir o reagente ao longo de todo o fundo. As cúpulas são cobertas com o selador de placas de microtitulação e incubadas num forno a 37°C durante uma hora. As cúpulas são depois lidas num luminómetro, e quantificadas relativamente a uma curva padrão feita com quantidades conhecidas de antigénio.

Exemplo 2 - Imunoensaio para a presença de anticorpo para o HCV em soro humano

As placas de microtitulação são primeiramente cobertas com o antigénio C-100 de HCV do vírus da hepatite C. É preparada uma solução contendo tampão de cobertura (borato de Na 50 mM, pH 9,0), 21 ml/placa, BSA (25 µg/ml), HCV C-100 (2,50 µg/ml), imediatamente antes da adição. Após misturar durante 5 minutos, são adicionados 0,2 ml/cúpula de solução às placas, são cobertas e incubadas durante 2 horas a 37°C, após as quais a solução é removida por aspiração. As cúpulas são lavadas uma vez com 0,4 ml de tampão de lavagem (fosfato de Na 100mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, caseína 0,1%, Triton X-100 1% (p/v), hibitano 0,01% (p/v)). Após remover a solução de lavagem, são adicionados 200µl/cúpula de solução Postcoat (fosfato de Na 10mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, caseína 0,1% (p/v), sucrose 3% e fenilmetilsulfonilflureto (PMSF) 2mM, as placas são cobertas levemente para prevenir a evaporação, e permanecem à temperatura ambiente durante 30 minutos. As cúpulas são depois aspiradas para remover a solução, e secas por



liofilização ao longo da noite, sem prateleira de aquecimento.

Para realizar o imunoensaio, são adicionados 20 μ l de duplicados de diluições das amostras de soro ou controles, às cúpulas contendo 20 μ l de diluente de amostra (fosfato de Na 100 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, caseína 0,1% (p/v), hibitano 0,01% (p/v), Triton X-100 1% (p/v), extrato de levedura 100 μ g/ml). As placas são seladas, e incubadas a 37°C durante 2 horas, após as quais a solução é removida por aspiração, e as cúpulas são lavadas 3 vezes com 400 μ l de tampão de lavagem (PBS contendo Tween 20 0,05%).

Subsequentemente à adição das amostras de soro, as cúpulas são tratadas como no Exemplo 1, acima, com a exceção de que o soro de coelho anti humano é substituído pelo terceiro anticorpo (coelho anti-analisado).

Exemplo 3 - Uso de sondas multiméricas na detecção da infecção por HCV

Em qualquer um dos dois exemplos acima, as sondas multiméricas podem ser substituídas por sondas polimerásicas. Todas as etapas são as mesmas de cada exemplo até à adição da sonda amplificadora, com a exceção óbvia de que é usada uma sonda multimérica em vez de uma sonda polimerásica. Subsequentemente à ligação da sonda amplificadora, é adicionada uma solução com 50 fmoles de uma sequência de oligonucleótidos marcados com homologia substancial para a subunidade multimérica do domínio M. Esta sonda enzimática marcada foi adicionada em 40 μ l de 4xSSC, poli A 100 μ g/ml durante 15 minutos a 55°C. Finalmente o complexo foi lavado duas vezes com 0,1xSSC, SDS 0,1%, seguindo-se duas

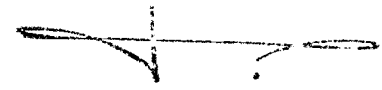


lavagens com 0,1xSSC.

Para a detecção AP, é utilizada uma reação de dioxetano dirigido para o enzima (Schapp et al. (1987) Tet. Lett. 28: 1159-1162 e Patente Norte Americana com o No. 4.857.652), obtida a partir da Lumigen Inc. O procedimento de detecção é o que se segue. Para a etapa de marcação são adicionados 20 µl de tampão HM com a sonda AP a cada cúpula e as cúpulas são incubadas a 55°C durante 15 minutos. O sobrenadante é removido e as cúpulas são depois lavadas duas vezes com 380 µl de 0,1xSSC e SDS 0,1%. As cúpulas são depois lavadas duas vezes com 380 µl de 0,1xSSC para remover o SDS restante. São adicionados a cada cúpula 20 µl de dioxetano $3,3 \times 10^{-4} M$ em tampão CTAB. As cúpulas são batidas levemente de forma a que o reagente caia para o fundo e se espalhe gentilmente para distribuir o reagente ao longo de todo o fundo. As cúpulas são cobertas com o selador de placas de microtitulação e incubadas num forno a 37°C durante uma hora. As cúpulas são depois lidas num luminómetro, e quantificadas relativamente a uma curva padrão feita com quantidades conhecidas de antigénio.

Exemplo 4 - Uso de sondas polimerásicas polinucleotídicas na detecção de infecção por HCV

Em ambos os Exemplos 1 e 2 acima, as sondas polimerásicas polinucleotídicas podem ser substituídas pelas sondas polimerásicas híbridas. Todas as etapas são as mesmas em cada exemplo até à adição do terceiro anticorpo que é uma combinação de anticorpos policlonais de coelho que reconhecem cada antigénio do HCV. Isto é seguido da adição de 50 µl de uma



molécula "linker" híbrida a uma concentração de 20 µg/ml em NaHCO₃ 0,2 M. Esta incubação é conduzida de acordo com os mesmos protocolos de todas as incubações de anticorpos anteriores. A molécula "linker" híbrida tem um primeiro domínio que funciona como um anti-corpo anti-coelho e se liga com todos os terceiros anticorpos de coelho ligados anteriormente. O segundo domínio do "linker" híbrido é um oligonucleótido com 15 resíduos, a sequência dos quais é substancialmente complementar ao domínio A da sonda polimerásica polinucleotídica. Após a incubação e lavagem, a sonda polimerásica é adicionada em 50 µl de tampão de hibridação (NaCl 0,3 M, NP-40 0,1%) e incubada durante 60 minutos a 40 °C. Após a incubação, o excesso de sonda é removido e o complexo é lavado 3 vezes com o tampão de hibridação. O domínio B é transcrito e o transcrito é quantificado como descrito no Exemplo 1.

Exemplo 5 - Uso de sondas multiméricas polinucleotídicas na detecção de infecções por HCV

Este ensaio é idêntico ao descrito no Exemplo 4, até à adição da sonda polinucleotídica. A subsequente hibridação da marcação com as sub-unidades do domínio M e quantificação da marcação são as mesmas que no Exemplo 3.

Exemplo 6 - Uso de sondas multiméricas polinucleotídicas na detecção de IgG humana imobilizada

Foi preparado um polinucleótido ramificado do tipo pente tendo 15 cadeias laterais dependentes, cada uma contendo três locais (total de 45 locais) complementares a uma sonda

marcada e uma molécula terminal de biotina ligada à cadeia principal, como descrito acima.

Foi imobilizada a IgG humana a várias concentrações num suporte sólido. A IgG imobilizada foi incubada em IgG anti humana de cabra biotinilada purificada por afinidade (concentração de biotina 40 ng), e o excesso de antisoro foi retirado do suporte por lavagem. O suporte foi depois incubado em 200 ng de avidina-D e depois em 100 fm ou 500 fm do polinucleótido ramificado tipo "pente", com as lavagens apropriadas. O suporte foi depois incubado com sonda oligonucleotídica marcada de peroxidase de rábano bastardo complementar aos locais de ligação da sonda marcada no polinucleótido. As leituras de densidade óptica (D.O) foram feitas a 492/620 nm.

Com o propósito de comparar, foram feitos ensaios como os acima usando um polinucleótido com apenas um local de ligação na sonda marcada.

A tabela a seguir apresenta os resultados deste teste.

Concentração IgG humana (ng/ml)	45 locais		1 local	
	100@fm	100@fm	500@fm	500@fm
100	1,116	0,005	2,505	0,002
50	1,089	0,002	1,564	0,001
25	0,432	0,001	1,295	0,001
12,5	0,303	0,001	0,451	0

Como referido, o polinucleótido com 45 locais fornece um sinal mais elevado do que o polinucleótido apenas com um local.

Outras variações e aplicações das várias sondas de amplificação descritas neste pedido a métodos de imunoenaios

serão óbvias para os especialistas nesta técnica, e pretende-se que estejam dentro do espírito do presente invento.

REIVINDICAÇÕES

1- Uma sonda molecular para uso como um amplificador de sinal em imunoensaios, caracterizada pelo facto de compreender:

(a) um primeiro domínio (A) que é um polipéptido e funciona como um anticorpo específico para um antígeno conhecido;

(b) um segundo domínio (B) que é um polinucleótido de cadeia dupla, capaz de funcionar como um promotor para a actividade da enzima de polimerase de RNA dependente de DNA; e

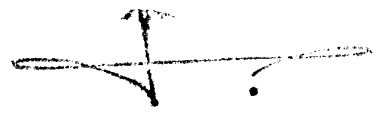
(c) um terceiro domínio (C) que é quer de cadeia simples ou dupla, e é adjacente ao segundo domínio, de tal forma que o terceiro domínio é capaz de funcionar como um padrão para a actividade promotora do segundo domínio.

2- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizada pelo facto de a actividade da polimerase de RNA dependente do DNA é proveniente do bacteriófago T7.

3- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo facto de o segundo domínio B ter, pelo menos, 10, e não mais do que 40 nucleótidos em comprimento.

4- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 3, caracterizada pelo facto de o terceiro domínio C ter, pelo menos, 30, e não mais do que 80 nucleótidos em comprimento.

5- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 2,



caracterizada pelo facto de a actividade da polimerase ser proveniente do bacteriófago T7 e a sequência para o segundo domínio B compreender a sequência:

5'-TAA TAC GAC TCA CTA TA-3'

3'-ATT ATG CTG AGT GAT AT-5'

6- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 2, caracterizada pelo facto de a actividade da polimerase ser proveniente do bacteriófago T7, e sendo a sequência nucleotídica do segundo domínio B:

5'-CTG GCT TAT CGA AAT TAA TAC GAC TCA CTA TA-3'

3'-GAC CGA ATA GCT TTA ATT ATG CTG AGT GAT AT-5'

7- Uma sonda, conforme reivindicado nas reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, ou 6, caracterizada pelo facto de o residuo 5' da cadeia superior da sequência nucleotídica do terceiro domínio C, ser adjacente ao segundo domínio B, e ser um residuo guanósina.

8- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou 7, caracterizada pelo facto da sequência do terceiro domínio C ser:

5'-GGG AGA TGT GGT TGT CGT ACT TAG CGA AAT ACT GTC CGA GTC G-3'

3'-CCC TCT ACA CCA ACA GCA TGA ATC GCT TTA TGA CAG GCT CAG C-5'

9- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 8, caracterizada pelo facto da extremidade 3' da cadeia superior da sequência nucleotídica de DNA do segundo domínio B ser ligada à extremidade 5' da cadeia superior da sequência nucleotídica do domínio C.

10- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizada pelo facto de o transcrito do terceiro domínio C possuir dois sub-dominios:



(a) um primeiro sub-domínio, c_1 , que é capaz de hibridizar com um linker de captura de oligonucleótido, sendo este linker capaz de hibridizar com um polinucleótido imobilizado num substrato sólido; e

(b) um segundo sub-domínio, c_2 , que é capaz de se ligar a um linker de marcação oligonucleotídico, sendo este capaz de se ligar a uma sonda quantificável.

11- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 1, caracterizada pelo facto de uma unidade funcional com o segundo e terceiro domínios, B e C, estar presente em múltiplas unidades de repetição.

12- Um método de amplificação de um sinal detectável, num immunoensaio, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) ligação directa ou indirecta, a um analito, de uma sonda molecular bioquímica, compreendendo um primeiro domínio (A), um segundo domínio (B), que é uma sequência de DNA de cadeia dupla capaz de funcionar como um promotor para a actividade da enzima da polimerase de RNA dependente de DNA, e um terceiro domínio (C) que é de cadeia simples ou dupla, e adjacente ao domínio B, de tal forma que o terceiro domínio seja capaz de funcionar como um padrão para a actividade do promotor do segundo domínio;

(b) remoção da sonda não ligada;

(c) transcrição de múltiplas cópias de oligómeros de RNA, que são complementares à sequência padrão, c' , do terceiro domínio C, da construção da sonda através de uma actividade da polimerase de RNA dependente de DNA; e

(d) quantificação dos transcritos de RNA.



13- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 12, caracterizado pelo facto de o analito ser primeiro immobilizado, directa ou indirectamente, sobre um substrato sólido.

14- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo facto de o terceiro domínio A ser um polipéptido capaz de funcionar como um anticorpo, e sendo a sonda ligada directa ou indirectamente ao analito através do domínio A.

15- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo facto de:

(a) o domínio A da sonda ser um polinucleótido de cadeia simples; e

(b) o analito ser indirectamente ligado à sonda molecular através de uma molécula linker híbrida proteína/polinucleótido com dois domínios:

(I) um primeiro domínio, que é uma sequência polinucleotídica de cadeia simples, substancialmente complementar à sequência do domínio A da sonda; e

(II) um segundo domínio que funciona como um anticorpo, específico para o analito, ou para um epitopo de um anticorpo que é específico para o analito.

16- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 12, 13, 14 ou 15, caracterizado pelo facto de o segundo domínio B ser proveniente de uma polimerase de RNA dependente de DNA do bacteriófago T7.

17- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 12, 13, 14, 15 ou 16, caracterizado pelo facto de:

(a) um terceiro domínio C da sonda ser transcrito na

presença de trifosfatos ribonucleotídicos marcados;

(b) os transcritos do terceiro domínio possuírem um primeiro sub-domínio, c_1 , complementar a uma sonda de captura oligonucleotídica que está imobilizada sobre um substrato sólido; e

(c) os ditos transcritos são imobilizados e quantificados.

18- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 12, 13, 14, 15 ou 16, caracterizado pelo facto de:

(a) um terceiro domínio C da primeira sonda ser transcrito na presença de trifosfatos ribonucleotídicos biotinilados;

(b) o transcrito do terceiro domínio possuir um primeiro sub-domínio, c_2 , que é complementar de uma sonda oligonucleotídica marcada;

(c) os transcritos são imobilizados sobre um substrato sólido avidinilatado; e

(d) os transcritos são quantificados.

19- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 12, 13, 14, 15 ou 16, caracterizado pelo facto de:

(a) o terceiro domínio, C, da sonda, ser transcrito na presença de trifosfatos ribonucleotídicos, quer marcados, quer biotinilatados;

(b) os transcritos são imobilizados sobre um substrato sólido avidinilatado; e

(c) os transcritos são quantificados.

20- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 12, 13, 14, 15 ou 16, caracterizado pelo facto de:

(a) o transcrito do terceiro dominio, C, da sonda, possuir dois sub-dominios:

(I) um primeiro sub-dominio, c1, que é complementar de uma sonda oligonucleotidica de captura, sendo esta imobilizada num substrato sólido; e

(II) um segundo sub-dominio, c2, que é complementar de uma sonda oligonucleotidica marcada;

(b) o transcrito é hibridizado com a sonda de captura;

(c) a sonda marcada é hibridizada com o referido transcrito; e

(d) a sonda marcada é quantificada.

21- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 12, caracterizado pelo facto de uma unidade que compreende o segundo e terceiro dominios, B e C, da primeira sonda estarem presentes em múltiplas unidades de repetição B/C.

22- Uma sonda molecular para uso como um amplificador de sinal, em imunoensaios, caracterizada pelo facto de compreender:

(a) um primeiro dominio, (A), compreendendo um polipéptido capaz de funcionar como um anticorpo que se liga especificamente a um analito conhecido; e

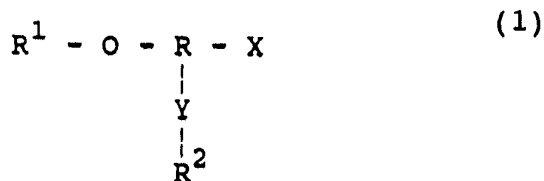
(b) um segundo dominio, (M), compreendendo uma multiplicidade de sub-unidades de oligonucleótidos de cadeia simples que são capazes de se ligar, especificamente, a uma sequência de ácido nucleico de cadeia simples, de interesse.

23- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 22, caracterizada pelo facto de em cada unidade de oligonucleótido do segundo dominio, M, compreender cerca de 15 a 50 bases, e possuindo um teor de GC na gama de cerca de 40% a cerca de 60%.

24- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 22, caracterizada pelo facto de a molécula possuir uma estrutura linear.

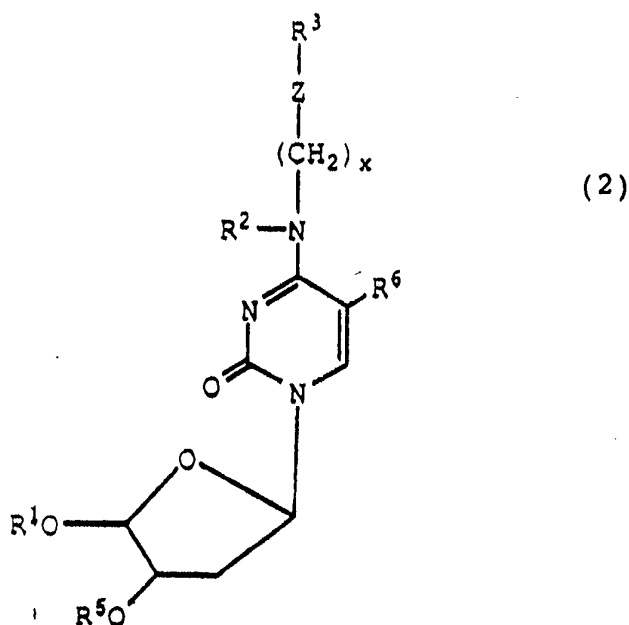
25- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 22, caracterizada pelo facto de a molécula possuir uma estrutura ramificada.

26- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 22, caracterizada pelo facto de, pelo menos, uma porção das unidades oligonucleotídicas do segundo domínio estarem ligadas através de uma metade multifuncional proveniente dum composto da fórmula:



em que R é uma metade orgânica, preferivelmente um ácido nucleico, R¹, é um grupo protector hidroxilo que pode ser removido sob condições que não removam o ácido nucleico sintético de uma fase sólida, e não removam grupos protectores de fosfato ou nitrogénio exocíclicos, X é um grupo contendo fósforo que facilita a síntese de ácido nucleico, Y é um radical derivado de um grupo nucleocíclico, e R² é R¹ ou um grupo bloqueador ou protector que pode ser removido e substituído por nitrogénio sem afectar o R¹.

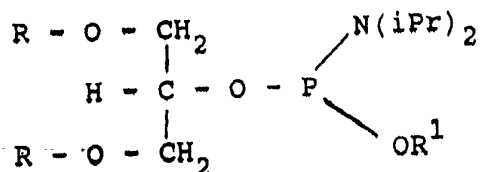
27- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 22, caracterizada pelo facto de, pelo menos, uma porção das sub-unidades de oligonucleótidos estarem ligadas através de uma metade multi-funcional proveniente de um composto da fórmula:



em que Z é um nucleófilo, R^1 é um grupo protector que é geralmente base-estável, e sensível aos ácidos, R^2 é hidrogénio ou metilo, R^3 é um grupo protector que pode ser removido e substituído por hidrogénio, sem afectar o R^1 , R^5 é um derivado do fósforo que possibilita a adição dos nucleótidos à posição 5' de uma cadeia oligonucleotídica durante a síntese química, R^6 é metilo, hidrogénio, I, Br, ou F, e X é um número inteiro de 1 a 8, inclusivé.

28- Uma sonda, conforme reivindicado na reivindicação 22, caracterizada pelo facto de, pelo menos, uma porção das sub-unidades de oligonucleótidos estar ligada, através de uma metade

multi-funcional, proveniente de um composto da fórmula:



em que R é o referido grupo protector hidroxilo, iPr é isopropilo, e R¹ é metilo ou beta-cianoetilo. Esta sonda serve para detectar e quantificar o antigénio num imunoensaio, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) a ligação directa ou indirecta, a um analito, de uma sonda molecular bioquímica, compreendendo um domínio de ligação (A), e um segundo domínio (M), que compreende uma multiplicidade de sub-unidades oligoméricas de DNA de cadeia simples capaz de hibridizar com um oligonucleótido marcado por cadeia simples;

(b) remoção da sonda não ligada;

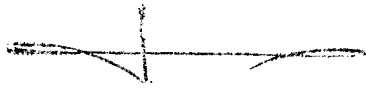
(c) hibridização de oligonucleótidos marcados de cadeia simples, que compreendem uma sequência de nucleótido que é substancialmente complementar à sequência da sub-unidade da sonda do domínio M, e às sub-unidades do segundo domínio;

(d) remoção do oligonucleótido marcado e não ligado; e

(e) quantificação da quantidade de oligonucleótido marcado ligado à sonda.

30- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 29, caracterizado pelo facto de o analito ser primeiramente imobilizado, directa ou indirectamente, num substrato sólido.

31- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 30,



caracterizado pelo facto do dominio A ser um polipeptido capaz de funcionar como um anticorpo, e sendo a sonda ligada, directa ou indirectamente, ao analito, através do dominio A.

32- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 31, caracterizado pelo facto do polipeptido do dominio A se ligar especificamente a um epitopo de um anticorpo, que se liga especificamente ao analito.

33- Um método, conforme reivindicado na reivindicação 29, caracterizado pelo facto de:

(a) o dominio A da sonda ser um polinucleótido de cadeia simples; e

(b) o analito ser indirectamente ligado à sonda molecular através de uma molécula linker hibrida proteina/polinucleótido com dois dominios:

(I) um primeiro dominio que é uma sequência polinucleotidea de cadeia simples, substancialmente complementar à sequência do dominio A da sonda; e

(II) um segundo dominio que funciona como um anticorpo, especifico para o analito.

34- Um método de amplificação de um sinal detectável num immunoensaio competitivo, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) construção de uma sonda molecular, compreendendo:

(I) um primeiro dominio (A), que é capaz de funcionar como um imunogénio;

(II) um segundo dominio (B) que é um polinucleótido de cadeia dupla, capaz de funcionar como um promotor para a actividade da enzima da polimerase de RNA dependente de DNA; e



(III) um terceiro domínio (C), que é, quer de cadeia simples ou dupla, ou adjacente ao segundo domínio, de tal modo que o terceiro domínio seja capaz de funcionar como um padrão para a actividade promotora do segundo domínio;

(b) imobilização da sonda, directa ou indirectamente, sobre um substrato sólido, na presença de um analito de competição;

(c) remoção da sonda não ligada;

(d) transcrição de múltiplas cópias de oligómeros de RNA, que são complementares da sequência padrão, c', do terceiro domínio C, da construção da sonda através da actividade da polimerase de RNA, dependente de DNA; e

(e) quantificação dos transcritos de RNA.

35- Um método de amplificação de um sinal detectável num immunoensaio competitivo, caracterizado pelo facto de compreender:

(a) construção de uma sonda molecular, compreendendo:

(I) um primeiro domínio (A), que é capaz de funcionar como um imunogénio; e

(II) um segundo domínio (M), compreendendo uma multiplicidade de sub-unidades de oligonucleótidos de cadeia simples, que são capazes de se ligar especificamente a uma sequência de ácido nucleico de cadeia simples, de interesse.

(b) imobilização da sonda, directa ou indirectamente, num substrato sólido, na presença de um analito de competição;

(c) remoção da sonda não ligada;

(d) hibridização de oligonucleótidos marcados, de cadeia simples, que compreendem uma sequência nucleotídica que é substancialmente complementar da sequência sub-unitária da sonda

do domínio M, e às sub-unidades do segundo domínio;

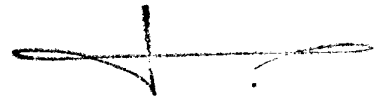
(e) remoção do oligonucleótido marcado não ligado; e

(f) quantificação da quantidade de oligonucleótido marcado, ligado à sonda.

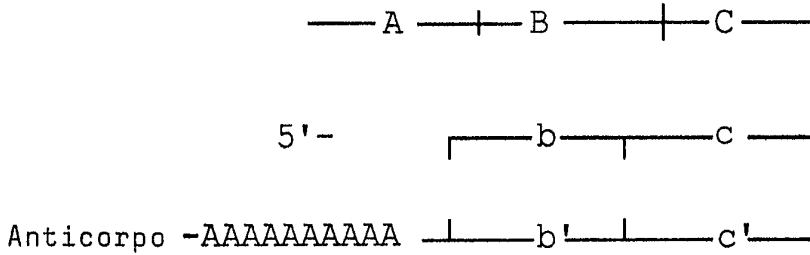
Lisboa, 6 de Maio de 1991

PELO AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
O ADJUNTO

A handwritten signature in black ink, consisting of a long horizontal stroke with a vertical line crossing it near the left end, and a small flourish at the right end.



A -



B -

< A >

< B (promotor T7) >

>

5'-TTTTTTTTTCTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATA...

Anticorpo -3'-AAAAAAAAAGACCGAATAGCTTTAATTATGCTGAGTGATAT...

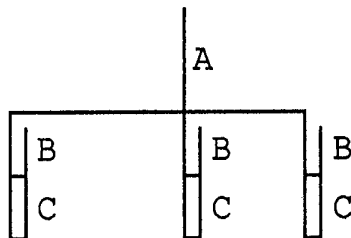
< C (Região Transcrita) >

...GGGAGATGTGGTTGTCGTA C TTAGCGAAATACTGTCCGAGTCG

...CCCTCTACACCAACAGCATGAATCGCTTTATGACAGGCTCAGC

Cadeia Padrão

C -



D -

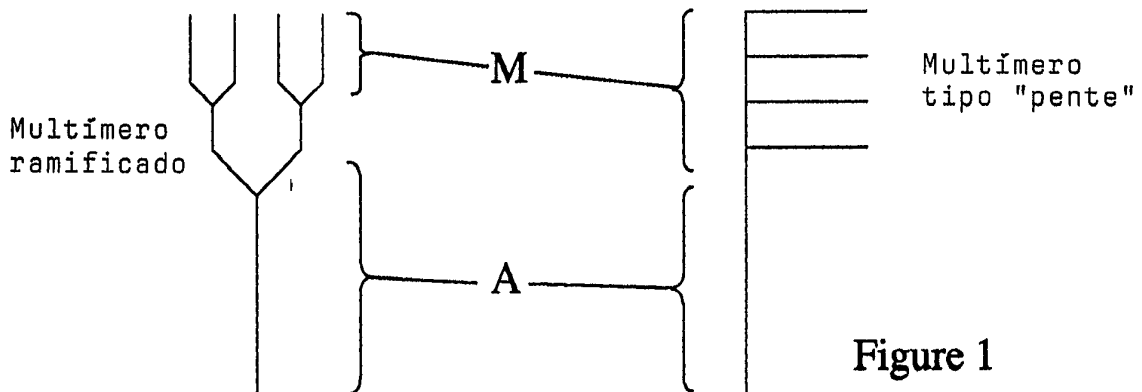


Figure 1

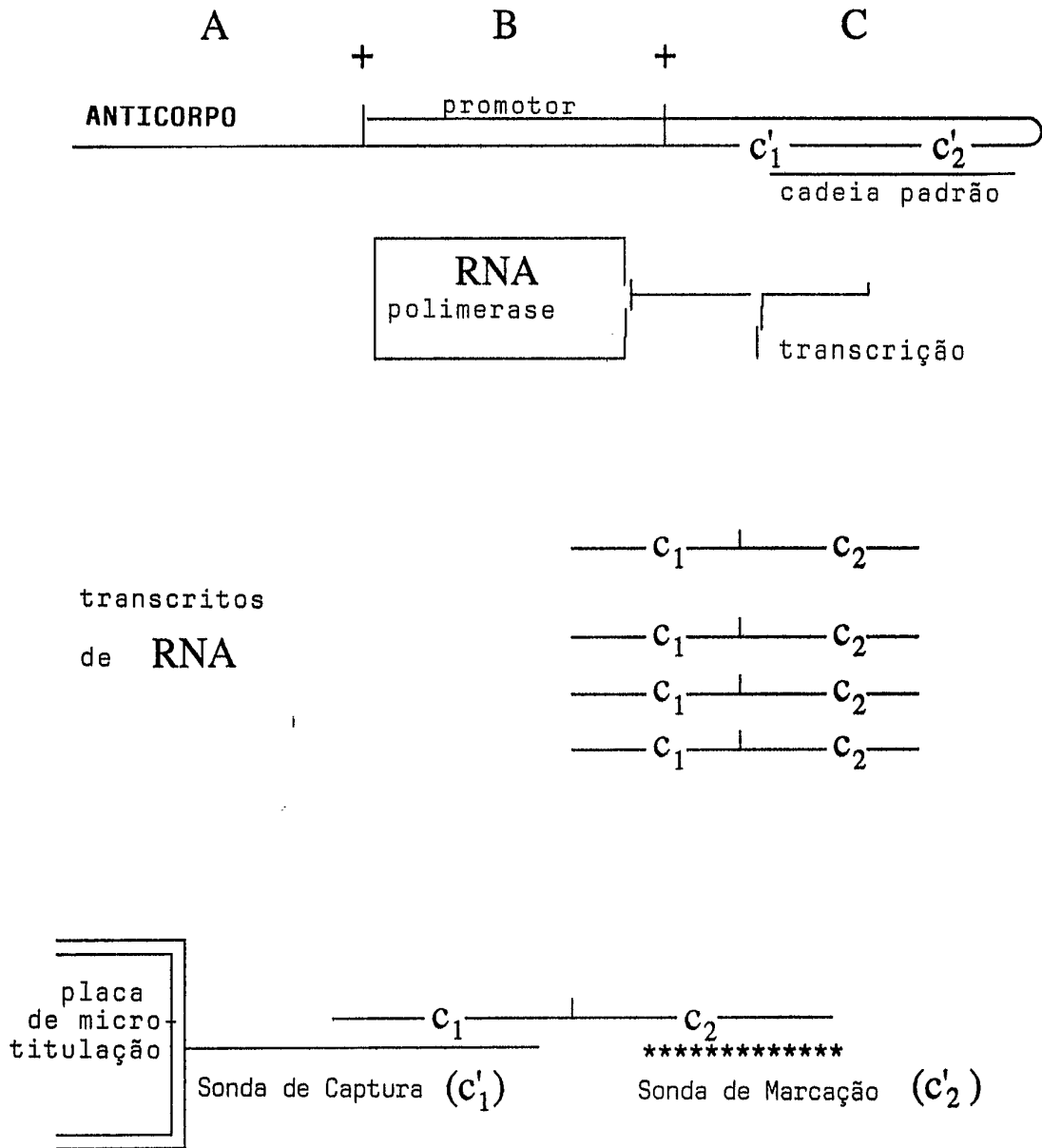
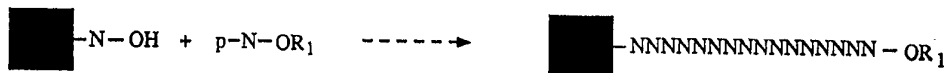


Figure 3



A. DNA sintético linear



B. DNA ramificado, estruturas tipo "pente"

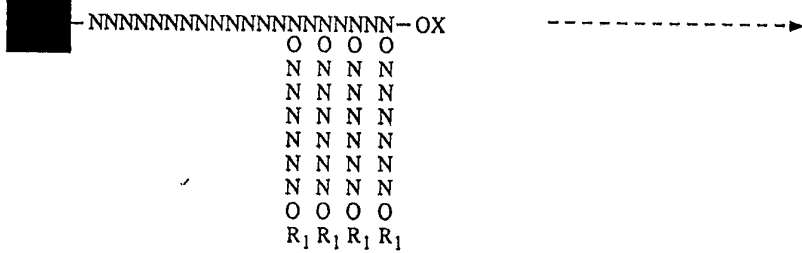
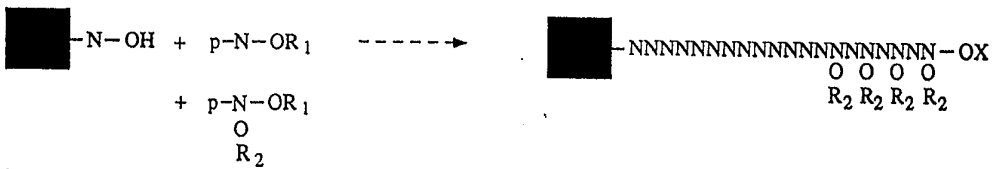


Figure 4a

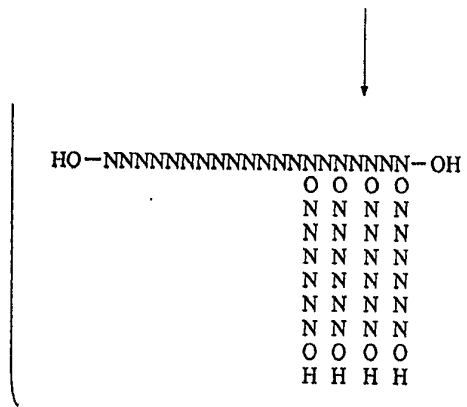


Figure 4b

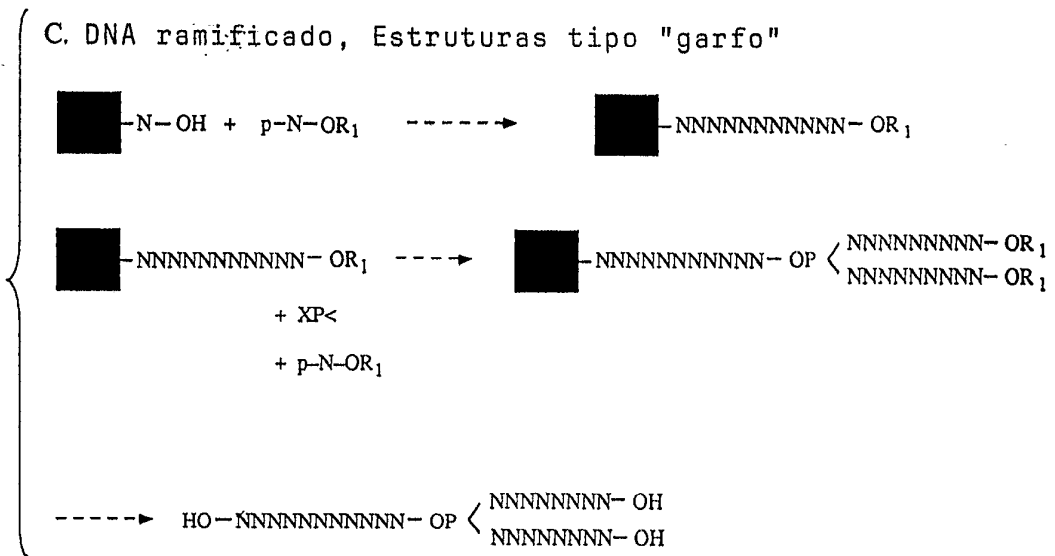


Figure 4c

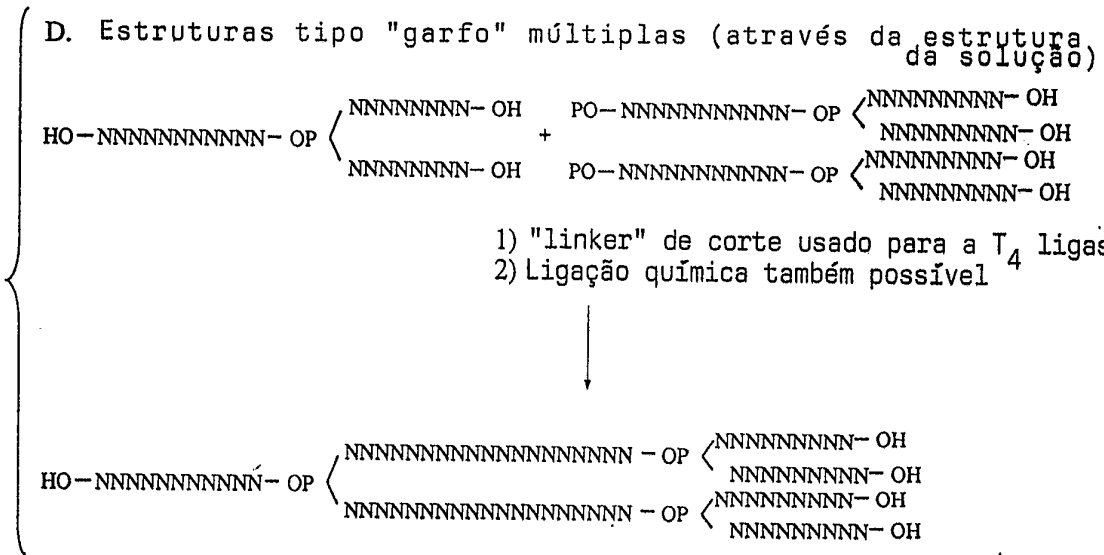
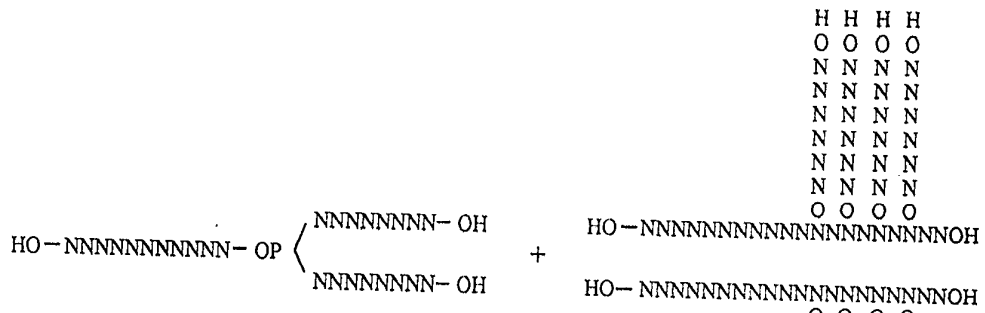


Figure 4d



E. Estrutura tipo "garfo-pente"



- 1) "linker" de corte usado para a estrutura da t_A ligase
- 2) Estrutura química também possível

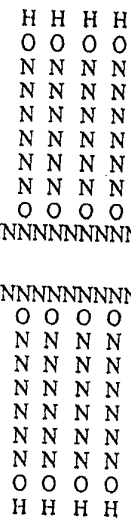


Figure 4e

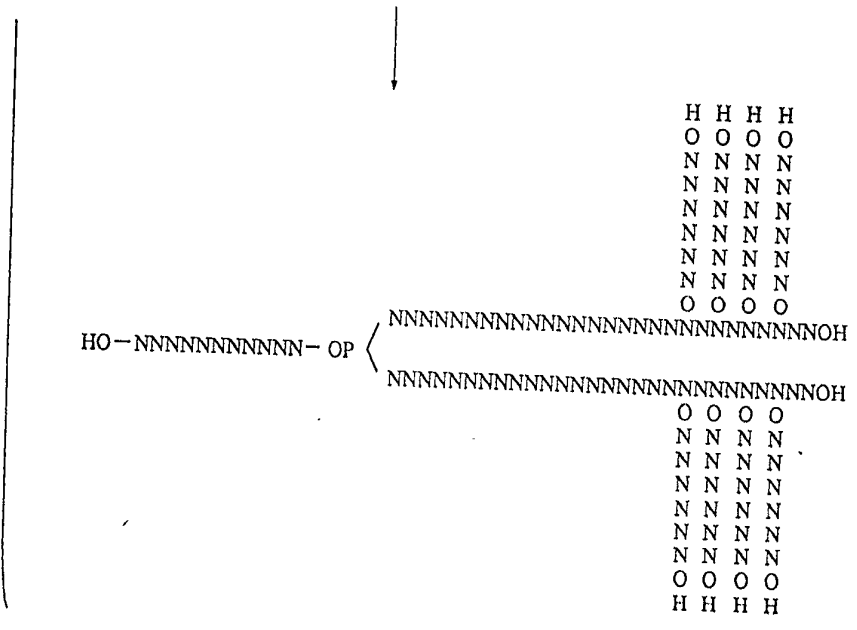


Figure 4f



D. Estrutura tipo "pente" múltipla

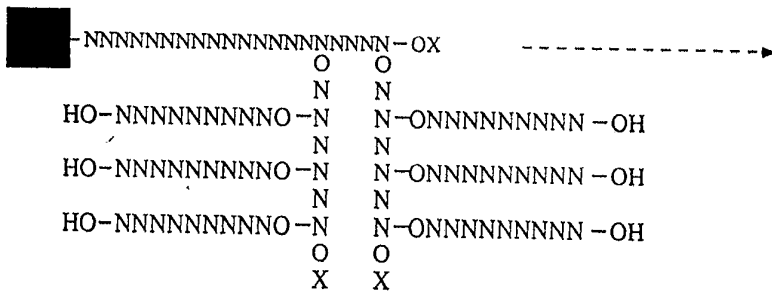
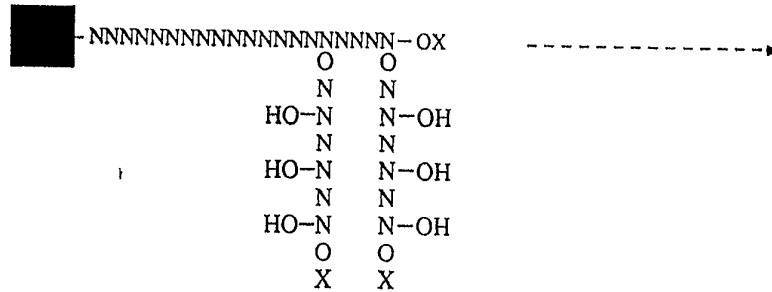


Figure 4g

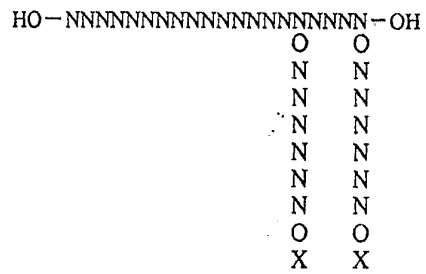
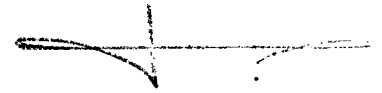


Figure 4h