

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 924 731**

51 Int. Cl.:

C07H 19/04 (2006.01)

C07D 241/46 (2006.01)

C07F 9/09 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2016 PCT/US2016/027964**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2016 WO16168750**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2016 E 16780937 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2022 EP 3283499**

54 Título: **Sondas con extintor doble**

30 Prioridad:

15.04.2015 US 201562147695 P

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

10.10.2022

73 Titular/es:

**BIOSEARCH TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
2199 South McDowell Blvd.
Petaluma, CA 94954-6904, US**

72 Inventor/es:

**COOK, RONALD, M.;
SOWERS, BEN y
BEAL, MARC, P.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 924 731 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sondas con extintor doble

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio según 35 USC 119(e) de la solicitud provisional estadounidense n.º 62/147.695, presentada el 15 de abril de 2015.

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de las sondas de ácido nucleico marcadas y a los métodos para detectar estas sondas o fragmentos de las sondas. Especies a modo de ejemplo de la invención son oligómeros de ácido nucleico marcados con dos o más restos de extinción que pueden extinguir la energía emitida por uno o más restos fluorescentes, que también está(n) conjugado(s) con el oligómero de ácido nucleico. En general, al menos uno de los restos de extinción y uno de los restos fluorescentes se unen en ubicaciones del oligómero que están lo suficientemente próximas como para que se produzca una transferencia de energía detectable desde el fluoróforo hasta el extintor.

Antecedentes de la invención

El tipo de sonda predominante en el mercado de qPCR son las sondas de hidrólisis lineal para su uso en el ensayo de 5'-nucleasa. Se marcan tradicionalmente con dos tintes, generalmente ubicados en los extremos terminales de un oligómero de ácido nucleico, por ejemplo, un indicador fluorescente en 5' y un extintor en 3', por ejemplo, un extintor oscuro. La modificación en 3' puede cumplir el doble propósito de prohibir la extensión de la polimerasa desde la sonda tras la hibridación; y la señal de extinción del fluoróforo antes de que la sonda se hibride con su secuencia diana.

El extintor y el fluoróforo pueden interactuar a través de o bien la transferencia de energía por resonancia de Forster (FRET) y/o bien la extinción estática, que se supone que se ponen en contacto entre sí para formar un complejo de estado fundamental que no es fluorescente (Marras, S.A.E., Kramer, F.R., y Tyagi, S. (2002) *Nucleic Acids Res.* 30, e122; Johansson, MK (2006). *Methods Mol. Biol.* 335, 17-29). Esta interacción suprime la señal cuando la sonda está libre en disolución. Tras la hibridación del oligo, el dúplex formado es bastante rígido y, por tanto, aumenta la longitud efectiva en comparación con el oligo monocatenario, que es mucho más flexible. Por tanto, la unión de la sonda a la secuencia diana es suficiente para alterar la interacción entre los tintes colocados en los extremos opuestos de un oligo y liberar la señal fluorescente (Parkhurst, KM y Parkhurst, LJ (1995). *Biochemistry* 34, 285-292).

La liberación de la señal tras la hibridación puede hacerse permanente hidrolizando el oligo entre el fluoróforo y el extintor. De hecho, la escisión se logra cuando la polimerasa Taq se extiende desde un cebador y encuentra la sonda en su camino (figura 1). La actividad nucleasa de la polimerasa escinde la sonda en una o varias bases desde su extremo 5' hasta que la sonda pierde la estabilidad de unión y se desplaza de la cadena. Esta hidrólisis es la base del mecanismo de señalización en sondas TaqMan®.

La figura 1 es una ilustración de un ensayo de 5'-nucleasa (TaqMan®). En resumen, después de la desnaturalización, la sonda y los cebadores se aparean con las cadenas disociadas. Durante el alargamiento, la polimerasa se extiende desde el cebador, se encuentra con la sonda e hidroliza los fragmentos de nucleótidos que se desplazan de la cadena. La escisión de la sonda separa el fluoróforo y el extintor, lo que hace que la liberación de la señal sea permanente.

El rendimiento de la sonda puede cuantificarse en un sentido general mediante una relación señal/ruido: la fluorescencia final tras la amplificación dividida entre la fluorescencia inicial que precede a la amplificación. La fluorescencia inicial representa la eficiencia de extinción, por lo que duplicar esta señal de fondo reduce la S:N en un factor de dos. La eficiencia de extinción depende, en parte, de la longitud del oligo. Esto se debe a que la extinción de FRET disminuye con bastante rapidez al aumentar la separación entre los tintes según una relación de $(1/r)^6$, en la que r es la distancia a través del espacio (Cardullo *et al.* (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 8790-8794.). Se cree que los oligos monocatenarios se comportan como una hélice al azar y, por tanto, la distancia efectiva es el promedio de muchas conformaciones, pero el principio sigue siendo el mismo: el aumento de la longitud de la secuencia disminuye la eficiencia de extinción, lo que da como resultado sondas con una fluorescencia de referencia elevada y malos valores de señal/ruido. Por este motivo, los diseños de sonda se limitan normalmente a 30 bases o menos para lograr una eficiencia de extinción suficiente para la aplicación final.

Las longitudes de ácido oligonucleico se seleccionan teniendo en cuenta no sólo la eficiencia de extinción, sino también su estabilidad de unión. Una pauta de diseño común es seleccionar secuencias de sonda con una T_M de 70 °C, elevada por encima de la de los cebadores. Las sondas normalmente deben tener más de 20 bases para lograr esa T_M dependiendo de la composición de las bases, y en ausencia de modificaciones especiales para promover la hibridación. Por tanto, el diseño de la secuencia es un compromiso cuidadoso entre la estabilidad de la unión y la eficiencia de extinción, pero esa ventana de 20-30 bases es inadecuada para muchas dianas difíciles. Por ejemplo,

el genotipado de SNP requiere sondas de menos de 20 bases para lograr la especificidad mejorada necesaria para la discriminación de apareamientos erróneos. A una T_M tan baja las sondas SNP no serían funcionales sin el uso de restos químicos para aumentar su estabilidad de unión: un agente de unión al surco menor (MGB) (Kutiavin *et al.* (2000). *Nucleic Acids Res.* 28, 655-661) o los residuos de propinilo usados en las sondas BHQplus, entre otros.

Estas modificaciones químicas sirven para relajar la limitación inferior, lo que permite el diseño de secuencias compactas de menos de 20 bases de longitud.

Muchos genes diana son particularmente ricos en AT y requieren secuencias más largas para obtener la T_M adecuada. La limitación superior de la longitud de la secuencia puede relajarse colocando el extintor en una ubicación interna más cercana al indicador fluorescente, en lugar de en el extremo terminal 3'. De hecho, algunos de los primeros diseños de sondas TaqMan tenían el extintor en una ubicación interna por este motivo, para mejorar su eficiencia de extinción (Lee *et al.* (1993) *Nucleic Acids Res.* 21(16): 3761-3766). Sin embargo, la posición 3' ahora vacante todavía debe modificarse con un bloqueador, tal como un fosfato terminal o un espaciador de carbono alifático, para evitar que la sonda se comporte como un cebador y desencadene la extensión.

Las sondas con un extintor interno mejoran la eficiencia de extinción para secuencias de más de 30 bases. Los extintores internos se colocan tradicionalmente fuera de una base de timidina para conservar la estructura principal de azúcar-fosfato y, presumiblemente, minimizar cualquier alteración del apareamiento de bases. Sin embargo, para determinados ensayos, esta estrategia disminuirá la magnitud de la liberación de la señal tras la amplificación. Los motivos de esta supresión no están del todo claros, pero el resultado reduce efectivamente el numerador de la relación S:N, lo que compromete el rendimiento de la sonda. Las figuras 2A-C muestran resultados representativos cuando se coloca Black Hole Quencher-1 (BHQ1) sobre un residuo de T interno, en tres longitudes de sonda diferentes.

Figuras 2A-C. Los perfiles de amplificación señalados con una sonda marcada en el extremo se muestran como líneas discontinuas. Los perfiles de amplificación señalados con una sonda T-BHQ1 interna se muestran como líneas continuas. La mejora en la eficiencia de extinción es más pronunciada con secuencias de sonda más largas, mientras que la sonda corta de 21 bases tiene una magnitud reducida de liberación de señal en comparación con la sonda marcada en el extremo.

Anclar el BHQ1 a una timidina restringe el diseño de la sonda a aquellas secuencias que tienen una T hacia el extremo 5', ya que el precursor reactivo usado para incorporar el extintor durante la síntesis de oligos implica una fosforamidita unida a T. Esta dependencia de la base es una limitación significativa, como lo es la liberación de señal reducida de ensayos seleccionados, particularmente aquellos con secuencias de sonda más cortas. El diseño de ensayos de qPCR puede hacerse más fácil y su amplificación de señal más robusta:

1. Mejorando tanto la magnitud de liberación de señal como la eficiencia de extinción.
2. Eliminando cualquier dependencia de la base que restrinja la posición del extintor.
3. Una orientación de marcador que permite el diseño tanto de secuencias cortas como largas con una mejora de rendimiento similar.

La presente invención proporciona sondas de ácido nucleico que cumplen estos tres puntos y que también tienen otras ventajas.

El documento WO 2011/120049 describe compuestos de oligonucleótido con propiedades de hibridación mejoradas. El documento US 8946404 describe BHQ que son extintores eficientes de la energía en estado excitado y sondas que incorporar los BHQ.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona sondas de ácido nucleico que comprenden dos extintores de energía en estado excitado, y métodos de su uso.

Otros objetos, ventajas y aspectos de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una ilustración de un ensayo de 5'-nucleasa (TaqMan®).

Las figuras 2A-C muestran los perfiles de amplificación para sondas marcadas en el extremo (líneas discontinuas) y sondas marcadas con T-BHQ1 interno (líneas continuas) a diversas longitudes de sonda.

La figura 3 muestra la estructura de una sonda con doble extintor a modo de ejemplo de la invención.

Las figuras 4A-C muestran los perfiles de amplificación para sondas marcadas en el extremo (líneas discontinuas) y sondas con extintor doble (líneas continuas) a diversas longitudes de sonda.

Las figuras 5A-F muestran los perfiles de amplificación (en bruto y normalizados) para sondas marcadas en el extremo (líneas discontinuas) y sondas con extintor doble (líneas continuas) a diversas longitudes de sonda.

La figura 6A muestra los perfiles de amplificación para una sonda marcada en el extremo (líneas discontinuas) y una sonda I-TBHQ1 + 3-BHQ1 (líneas continuas). La figura 6B muestra los perfiles de amplificación para una sonda marcada en el extremo (líneas discontinuas) y una sonda I-BHQ1 + 3-BHQ1 (líneas continuas).

La figura 7A muestra los perfiles de amplificación para una sonda marcada en el extremo (líneas discontinuas), una sonda I-BHQ0 + 3-BHQ1 (líneas continuas) y una sonda I-TDAB + 3-BHQ1 (líneas huecas). La figura 7B muestra los perfiles de amplificación para una sonda marcada en el extremo (líneas discontinuas), una sonda I-BHQ0 + 3-BHQ1 (líneas continuas), y una sonda I-anilina + 3-BHQ1 (líneas huecas).

La figura 8A muestra los perfiles de amplificación para una sonda marcada en el extremo (líneas discontinuas), una sonda I-BHQ0 + 3-BHQ1 (líneas continuas) y una sonda 1-dRBHQ0 + 3-BHQ1 (líneas huecas). La figura 8B muestra los perfiles de amplificación para una sonda marcada en el extremo (líneas discontinuas), una sonda I-BHQ0 + 3-BHQ1 (líneas continuas) y una sonda 1-gBHQ0 + 3-BHQ1 (líneas huecas).

La figura 9A muestra los perfiles de amplificación para una sonda marcada en el extremo (líneas discontinuas), una sonda I-BHQ0 + 3-BHQ1 (líneas continuas) y una sonda I-BHQ0 + 3-Sp3 (líneas huecas). La figura 9B muestra los perfiles de amplificación para una sonda marcada en el extremo (líneas discontinuas), una sonda I-BHQ0 + 3-BHQ1 (líneas continuas) y una sonda I-BHQ1 + 3-BHQ0 (líneas huecas).

La figura 10 muestra los perfiles de amplificación para una sonda marcada en el extremo (líneas discontinuas) y diversas sondas I-BHQ0 + 3-BHQ1.

Las figuras 11A-L muestran las curvas de fusión para sondas marcadas en el extremo (líneas discontinuas), sondas I-BHQ0 + 3-BHQ1 (líneas continuas) y sondas sin complemento (líneas huecas), respectivamente, para diferentes secuencias de sondas.

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas

“BHQ”, tal como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a los extintores oscuros que incluyen uno o más enlaces diazo y específicamente a los “Black Hole Quenchers™”. Los BHQ a modo de ejemplo se describen en la patente estadounidense n.º 7.019.129. “FET”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a “transferencia de energía de fluorescencia”. “FRET”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a “transferencia de energía por resonancia de fluorescencia”. Estos términos se usan en el presente documento para referirse a procesos de transferencia de energía radiante y no radiante. Por ejemplo, los procesos en los que se emite un fotón y los que implican la transferencia de electrones de largo alcance se incluyen dentro de estos términos. En toda esta solicitud, ambos fenómenos se incluyen bajo el término general “transferencia de energía donador-aceptor”. “SNP” se refiere a “polimorfismo de un solo nucleótido”.

Definiciones

Antes de que se describa la invención con mayor detalle, debe entenderse que la invención no se limita a realizaciones particulares descritas en el presente documento, ya que tales realizaciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares únicamente, y la terminología no pretende ser limitativa. El alcance de la invención estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo indicado, está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también están abarcados dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen uno o ambos límites incluidos también se incluyen en la invención. Determinados intervalos se presentan en el presente documento con valores numéricos precedidos por el término “aproximadamente”. El término “aproximadamente” se usa en el presente documento para brindar soporte literal para el número exacto al que precede, así como un número que está cerca o aproximadamente del número al que precede el término. Al determinar si un número está cerca o aproximadamente de un número específicamente mencionado, el número cercano o que se aproxima no mencionado puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporciona el equivalente sustancial del número específicamente mencionado. La mención de cualquier publicación es para su divulgación antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la invención descrita en el presente documento no está legitimada para ser anterior a tal publicación en virtud de una invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden diferir de las fechas de publicación reales, lo que puede necesitar una confirmación independiente.

Se observa que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de terminología exclusiva como "únicamente", "sólo" y similares en relación con la mención de los elementos de las reivindicaciones o el uso de una limitación "negativa". Como resultará evidente para los expertos en la técnica al leer esta divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en el presente documento tiene componentes y características discretos que pueden separarse fácilmente o combinarse con las características de cualquiera de las otras varias realizaciones sin apartarse del alcance o espíritu de la invención. Cualquier método mencionado puede llevarse a cabo en el orden de los acontecimientos mencionados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento también puede usarse en la práctica o prueba de la invención, ahora se describen métodos y materiales ilustrativos representativos.

Las siguientes definiciones son ampliamente aplicables a cada una de las realizaciones de la presente invención expuestas a continuación en el presente documento. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen generalmente el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química de ácidos nucleicos e hibridación descritos a continuación son bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se usan técnicas convencionales para la síntesis de ácidos nucleicos y péptidos. Las técnicas y procedimientos de biología molecular se realizan generalmente según métodos convencionales en la técnica y diversas referencias generales (véase en general, Sambrook *et al.* MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2.^a ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York.). La nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en química analítica y síntesis orgánica son bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se usan técnicas convencionales, o modificaciones de las mismas, para síntesis químicas y análisis químicos.

El término "alquilo," por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada o cíclico, o una combinación de los mismos, que puede estar completamente saturado, monoinsaturado o poliinsaturado y puede incluir radicales mono-, di-, tri- y tetravalentes que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir, C₁-C₁₀ significa de uno a diez carbonos). Los ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Los ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butenilo, y los isómeros y homólogos superiores. El término "alquilo," a menos que se indique lo contrario, también incluye opcionalmente los derivados de alquilo definidos con más detalle a continuación, tal como "heteroalquilo". Los grupos alquilo que se limitan a grupos hidrocarbonados se denominan "homoalquilo". El término "alquilo", tal como se usa en el presente documento se refiere a restos alquilo, alquenoilo y alquinilo, cada uno de los cuales puede ser especies mono-, di- o polivalentes según sea apropiado para satisfacer los requisitos de valencia. Los grupos alquilo están opcionalmente sustituidos, por ejemplo, con uno o más grupos a los que se denomina en el presente documento "sustituyente de grupo alquilo".

El término "alquilenio" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de un resto de alquilo, tal como se ejemplifica, pero sin limitarse a, -CH₂CH₂CH₂CH₂-, e incluye además los grupos descritos a continuación como "heteroalquilenio." Normalmente, un grupo alquilo (o alquilenio) tendrá desde 1 hasta 24 átomos de carbono, prefiriéndose los grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono en la presente invención. Para los grupos ligadores de alquilenio y heteroalquilenio, es opcional que no esté implicada ninguna orientación del grupo ligador por la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo ligador. Por ejemplo, la fórmula -C(O)₂R' representa -C(O)₂R' y, opcionalmente, -R'C(O)₂-. Un "alquilo inferior" o "alquilenio inferior" es un grupo alquilo o alquilenio de cadena más corta, que tiene generalmente ocho, siete, seis, cinco o menos átomos de carbono.

Los términos "alcoxilo," "alquilamino" y "alquiltio" (o tioalcoxilo) se usan en su sentido convencional, y se refieren a los grupos alquilo unidos al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, un grupo amino o un átomo de azufre, respectivamente.

El término "heteroalquilo," por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical alquilo de cadena lineal o ramificada o cíclico estable que consiste en el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en B, O, N, Si y S, en el que el heteroátomo puede oxidarse opcionalmente y el átomo de nitrógeno puede cuaternizarse opcionalmente. El/los heteroátomo(s) puede(n) colocarse en cualquier posición interna del grupo heteroalquilo o en un extremo terminal de la cadena, por ejemplo, la posición a través de la cual el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de grupos "heteroalquilo" incluyen, pero no se limitan a, -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃ y -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. Dos o más heteroátomos puede ser consecutivos, tal como, por ejemplo, -CH₂-NH-OCH₃ y -CH₂-O-Si(CH₃)₃. De manera similar, el término "heteroalquilenio" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un radical heteroalquilo divalente sustituido o no sustituido, tal como se ejemplifica, pero no se limita a, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- y -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. Para los grupos heteroalquilenio, los heteroátomos

pueden ocupar cualquiera o ambos de los extremos terminales de la cadena (por ejemplo, alquilenoxilo, alquilendioxilo, alquilenamino, alquilendiamino, y similares).

Los términos “cicloalquilo” y “heterocicloalquilo”, por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a menos que se indique lo contrario, versiones cíclicas de “alquilo” y “heteroalquilo”, respectivamente. De manera adicional, para el heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero no se limitan a, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y similares.

Los términos “halo” o “halógeno,” por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. De manera adicional, términos tales como “haloalquilo,” deben incluir monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término “halo-alquilo (C₁-C₄)” debe incluir, pero sin limitarse a, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo, y similares.

El término “arilo” significa, a menos que se indique lo contrario, un sustituyente poliinsaturado, aromático que puede ser un único anillo o múltiples anillos (preferiblemente desde 1 hasta 3 anillos, uno o más de los cuales es opcionalmente un cicloalquilo o heterocicloalquilo), que se condensan entre sí o se unen covalentemente. El término “heteroarilo” se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen desde uno hasta cuatro heteroátomos seleccionados de N, O, y S, en el que los átomos de nitrógeno y azufre se oxidan opcionalmente y el/los átomo(s) de nitrógeno se cuaternizan opcionalmente. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitativos de los grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalino, 5-quinoxalino, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillo de arilo y heteroarilo indicados anteriormente se seleccionan del grupo de “sustituyentes del grupo arilo” descritos a continuación.

Por brevedad, el término “arilo” cuando se usa en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxilo, ariltioxilo, arilalquilo) opcionalmente incluye tanto anillos homoarilo y heteroarilo tal como se definieron anteriormente. Por tanto, el término “arilalquilo” incluye opcionalmente los radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) que incluyen los grupos alquilo en los que un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno) se ha reemplazado por, por ejemplo, un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluyendo los grupos denominados a menudo alquilenilo, alquenilo, heteroalquilenilo, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo y heterocicloalquenilo) se denominan genéricamente “sustituyentes de grupo alquilo” y puede ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados de, pero sin limitarse a: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -halógeno, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R''', -NR'C(O)₂R', -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂ en un número que oscila desde cero hasta (2m'+1), en la que m' es el número total de átomos de carbono en tal radical. R', R'', R''' y R'''' cada uno se refiere de manera preferible independientemente a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo sustituido o no sustituido, grupos alcoxilo o tioalcoxilo, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como que son cada uno grupos R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el mismo átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' se entiende que incluye, pero no se limita a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir del análisis anterior de los sustituyentes, un experto en la técnica entenderá que el término “alquilo” incluye grupos con átomos de carbono unidos a grupos distintos de hidrógeno, tal como haloalquilo (por ejemplo, -CF₃ y -CH₂CF₃) y acilo (por ejemplo, -C(O)CH₃, -C(O)CF₃, -C(O)CH₂OCH₃, y similares). Los sustituyentes de grupo alquilo a modo de ejemplo incluyen los grupos denominados en el presente documento “grupos funcionales reactivos” y “sitios de unión”. En diversas realizaciones, el sustituyente de grupo alquilo es un resto que contiene fósforo, por ejemplo, un fosfodiéster o una modificación de fosfodiéster tal como las descritas en el presente documento.

Similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo se denominan en general “sustituyentes de grupo arilo”. Los sustituyentes a modo de ejemplo se selecciona de la lista de sustituyentes de grupo alquilo y otros, por ejemplo: halógeno, -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R''', -NR'C(O)₂R', -NR-C(NR'R''R''')=NR''', -NR-C(NR'R'')=NR''', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN y -NO₂, -R', -N₃, -CH(Ph)₂, fluoro-alcoxilo (C₁-C₄), y fluoro-alquilo (C₁-C₄), en un número que oscila desde cero hasta el número total de valencias abiertas en el sistema de anillos aromático; y en el que R', R'', R''' y R'''' se seleccionan de manera preferible independientemente de hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido y no sustituido. Cuando un compuesto de la

invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada de uno de los grupos R se selecciona independientemente como que son cada uno de los grupos R', R'', R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente.

Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de fórmula $-T-C(O)-(CRR')_q-U-$, en la que T y U son independientemente $-NR-$, $-O-$, $-CRR'-$ o un enlace sencillo, y q es un número entero desde 0 hasta 3. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de fórmula $-A-(CH_2)_r-B-$, en la que A y B son independientemente $-CRR'-$, $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2NR'-$ o un enlace sencillo, y r es un número entero de desde 1 hasta 4. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado puede reemplazarse opcionalmente con un doble enlace. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo puede reemplazarse opcionalmente con un sustituyente de fórmula $-(CRR')_s-X-(CR''R''')_d-$, en la que s y d son independientemente números enteros de desde 0 hasta 3, y X es $-O-$, $-NR'-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, o $-S(O)_2NR'-$. Los sustituyentes R, R', R'' y R''' se seleccionan de manera preferible independientemente de hidrógeno o alquilo (C_1-C_{16}) sustituido o no sustituido. Los sustituyentes de grupo arilo a modo de ejemplo incluyen los grupos a los que se les denomina en el presente documento "grupos funcionales reactivos" y "sitios de unión".

Tal como se usa en el presente documento, el término "heteroátomo" incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S) y silicio (Si).

El símbolo "R" es una abreviatura general que representa un grupo sustituyente que se selecciona de H, grupos alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido y no sustituido y heterociclilo sustituido o no sustituido. R también puede referirse a sustituyentes de grupo alquilo y sustituyentes de grupo arilo.

El término "sal(es)" incluye sales de los compuestos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares hallados en los compuestos descritos en el presente documento. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente ácidas, las sales de adición de base pueden obtenerse poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, ya sea pura o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de base incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funcionalidades relativamente básicas, las sales de adición de ácido pueden obtenerse poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea puro o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico o fosforoso, y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, butírico, maleico, málico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato, y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónicos o galactunónicos y similares (véase, por ejemplo, Berge *et al.*, Journal of Pharmaceutical Science, 66: 1-19 (1977)). Determinados compuestos específicos de la presente invención contienen funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten que los compuestos se conviertan en sales de adición de base o de ácido. También se incluyen los hidratos de las sales.

Tal como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" significa nucleósidos, nucleótidos y oligonucleótidos, por ejemplo, ADN, ARN, ya sean monocatenarios, bicatenarios o en motivos de hibridación más altamente agregados, y cualquier modificación química de los mismos. Las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, aquellas que proporcionan grupos químicos que incorporan carga adicional, capacidad de polarización, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática y reactividad a las nucleobases del ligando de ácido nucleico o al ligando de ácido nucleico como un todo. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, modificaciones del grupo fosfodiéster (por ejemplo, fosforotioatos, metilfosfonatos), modificaciones de azúcar, modificaciones de pirimidina en posición 5, modificaciones de purina en posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución con nucleobases no convencionales o no naturales tales como 4-tiouridina, 5-bromo o 5-yodo-uracilo; modificaciones de estructura principal tales como ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos de glicol (GNA), morfolinos; metilaciones tales como nucleósidos de 2'-O-metilo, 5-metil-2'-desoxicitidina; combinaciones inusuales de apareamiento de bases tales como las isobases, isocitidina e isoguanidina y similares. Un "nucleomonómero" se refiere a una sola unidad de ácido nucleico, que puede ser un nucleósido, un nucleótido o una modificación del mismo.

"Nucleobase", tal como se usa en el presente documento, incluye los restos que contienen no sólo los heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también análogos de heterociclo y tautómeros de los mismos. Las purinas incluyen adenina, guanina y xantina y los análogos de purina a modo de ejemplo incluyen 8-oxo-N⁶-metiladenina y 7-desazaxantina. Las pirimidinas incluyen uracilo y citosina y sus análogos, tales como 5-metilcitosina, 5-metiluracilo y 4,4-etanocitosina. Este término también abarca nucleobases no naturales. Las nucleobases no naturales representativas incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo,

dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracilo-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, 5

queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracilo-5-oxiacético, ácido uracilo-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, nitroindol y 2,6-diaminopurina.

En diversas realizaciones, los compuestos de la invención incluyen pirimidinas derivatizadas en la posición 5. Los derivados son modificaciones 1-alquenil-, 1-alquinil-, heteroarómicas y 1-alquinilheteroarómicas. "1-alquenilo" significa un grupo acíclico olefinicamente insaturado (que contiene doble enlace). "1-alquinilo" significa un grupo acíclico acetilénicamente insaturado (que contiene triple enlace)

Tal como se usa en el presente documento, "nucleósido" significa un subconjunto de ácido nucleico en el que una nucleobase está unida covalentemente a un azúcar o análogo de azúcar y que opcionalmente incluye un fosfito, fosforamidita o fosfina. El término nucleósido incluye ribonucleósidos, desoxirribonucleósidos o cualquier otro nucleósido que sea un N-glicósido o C-glicósido de una nucleobase. La estereoquímica de los carbonos del azúcar puede ser diferente a la de la D-ribosa. Los nucleósidos también incluyen aquellas especies que contienen modificaciones del resto de azúcar, por ejemplo, en los que uno o más de los grupos hidroxilo se reemplazan con un halógeno, un heteroátomo, un grupo alifático, o se funcionalizan como éteres, aminas, tioles, y similares. El resto de pentosa puede reemplazarse por una hexosa o una estructura alternativa tal como un anillo de ciclopentano, un anillo de morfolino de 6 miembros y similares. Los nucleósidos tal como se definen en el presente documento también incluyen una nucleobase unida a un aminoácido y/o un análogo de aminoácido que tiene un grupo carboxilo libre y/o un grupo amino libre y/o formas protegidas de los mismos. Los nucleósidos también incluyen opcionalmente una o más modificaciones de nucleobases, por ejemplo, modificadas con un resto fluorocarbilo, alquenilo o alquinilo. Un nucleósido que incluye un fosfodiéster o una modificación de fosfodiéster se denomina en el presente documento nucleótido.

"Modificación de azúcar", tal como se usa en el presente documento, significa cualquier resto de pentosa o hexosa que no sea 2'-desoxirribosa. Los azúcares modificados incluyen, por ejemplo, D-ribosa, pentosas funcionalizadas con 2'-O-alquilo, 2'-amino, 2'-halo, hexosas y similares. Las modificaciones de azúcar a modo de ejemplo incluyen los azúcares en los que uno o más de los grupos hidroxilo se reemplazan con un halógeno, un heteroátomo, un resto de alquilo, o se funcionalizan como éteres, ésteres, y similares. El resto de pentosa puede reemplazarse por una hexosa o una estructura alternativa tal como un anillo de ciclopentano, un anillo de morfolino de 6 miembros y similares. Los nucleósidos tal como se definen en el presente documento también pretenden incluir una nucleobase unida a un aminoácido y/o un análogo de aminoácido que tiene un grupo carboxilo libre y/o un grupo amino libre y/o formas protegidas de los mismos. También se incluyen los azúcares que tienen una estereoquímica distinta a la de una D-ribosa.

"Modificación del grupo fosfodiéster" significa cualquier análogo del grupo fosfodiéster nativo que se acopla covalentemente a nucleomonómeros adyacentes. Las uniones sustitutas incluyen análogos de fosfodiéster, por ejemplo, tales como fosforotioato y metilfosfonato, y uniones que no contienen fósforo, por ejemplo, tal como acetales y amidas.

La modificación del ácido nucleico también incluye modificaciones en 3', en 5' y de bases, tales como el marcaje con un extintor (por ejemplo, un BHQ), un fluoróforo, un intercalador, un agente de unión al surco menor, un fluorocarbano, un grupo estabilizante u otro resto. En diversas realizaciones, la modificación o marcador se conjuga covalentemente con el oligómero a través de un grupo ligador.

Los oligómeros se definen en el presente documento como dos o más nucleomonómeros acoplados covalentemente entre sí mediante un resto de fosfodiéster o fosfodiéster modificado. Por tanto, un oligómero puede tener tan sólo dos nucleomonómeros (un dímero) y esencialmente no tiene un límite superior de nucleomonómeros. Los oligómeros pueden ser competentes para la unión y, por tanto, pueden formar pares de bases con secuencias de ácido nucleico monocatenarias o bicatenarias (o de agregación de orden superior) relacionadas. Los oligómeros también son útiles como sintones para oligómeros más largos, tal como se describe en el presente documento. Los oligómeros también pueden contener sitios abásicos y pseudonucleósidos. En diversas realizaciones, los oligómeros de la invención se funcionalizan. Los restos que funcionalizan los oligómeros se analizan a continuación. Al describir determinadas realizaciones, el término "oligómero" se usa de manera intercambiable para referirse a la secuencia de ácido nucleico del oligómero, la secuencia de ácido nucleico modificada que proporciona una sonda de la invención o la secuencia de ácido nucleico modificada que proporciona un soporte sólido de la invención.

"Péptido" se refiere a un oligómero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen entre sí mediante enlaces amida, denominado alternativamente como polipéptido. Cuando los aminoácidos son α -aminoácidos, puede usarse o bien el isómero L-óptico o el isómero D-óptico. De manera adicional, también se incluyen aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homocisteína. Los aminoácidos comúnmente encontrados que no están codificados por genes también pueden usarse en la presente invención. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser los isómeros D o L. Se prefieren generalmente los isómeros L. Además, otros

peptidomiméticos también son útiles en la presente invención. Para una revisión general, véase, Spatola, A. F., en CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINOACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, pág. 267 (1983)).

Un "soporte sólido" es un material sólido que tiene una superficie para la unión de moléculas, compuestos, células u otras entidades, o a cuya superficie se unen tales especies. La superficie de un soporte sólido puede ser plana o estar configurada de otra manera. Un soporte sólido puede ser poroso o no poroso. Un soporte sólido puede ser un chip o matriz que comprende una superficie, y que puede comprender vidrio, silicio, nailon, polímeros, plásticos, cerámica o metales. Un soporte sólido también puede ser una membrana, tal como una membrana de nailon, nitrocelulosa o polimérica, o una placa o cápsula y puede estar compuesto por vidrio, cerámica, metales o plásticos, tales como, por ejemplo, una placa de 96 pocillos elaborada de, por ejemplo, poliestireno, polipropileno, policarbonato o polialómero. Un soporte sólido también puede ser una perla o partícula de cualquier forma, y es preferiblemente esférica o casi esférica, y preferiblemente una perla o partícula tiene un diámetro o ancho máximo de 1 milímetro o menos, más preferiblemente de entre 0,1 y 100 micrómetros. Tales partículas o perlas pueden estar compuestas por cualquier material adecuado, por ejemplo, vidrio o cerámica, y/o uno o más polímeros, tales como, por ejemplo, nailon, politetrafluoroetileno, TEFLON™, poliestireno, poliácridamida, Sepharose, agarosa, celulosa, derivados de celulosa o dextrano, y/o puede comprender metales, particularmente metales paramagnéticos, tales como hierro.

En la técnica se conocen soportes para la síntesis en fase sólida e incluyen, pero no se limitan a, poliestireno altamente reticulado (McCollum, *et al.*, Tetrahedron Lett. 32: 4069-4072 (1991), copolímero de poliestireno/PEG (Gao, *et al.*, Tetrahedron Lett. 32: 5477-5480 (1991), gel de sílice (Chow, *et al.*, Nucl. Acids Res. 9: 2807-2817 (1981)), gel de sílice unido a poliamida (Gait, *et al.*, Nucl. Acids Res. 10: 6243-6254 (1982)), celulosa (Crea, *et al.*, Nucl. Acids Res. 8: 2331-2348 (1980)), y vidrio de poro controlado (CPG) (Koster, *et al.*, Tetrahedron Lett. 24: 747-750 (1983). Un soporte sólido a modo de ejemplo son las perlas de CPG. Las perlas de CPG pueden derivatizarse para la unión de un nucleomonomero u oligómero en una variedad de maneras. Por ejemplo, las perlas de CPG pueden tratarse con 3-aminopropiltrietoxisilano para añadir un asidero ligador de aminopropilo para la unión de monómeros o dímeros de análogos de oligonucleótidos (Koster, *et al.*, Tetrahedron Lett. 24: 747-750 (1983), o, preferiblemente, un grupo alquilamina de cadena larga, que incluya lo más preferiblemente un nucleósido terminal, puede unirse a CPG (Adams, *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 105: 661-663 (1983)). Los soportes para la síntesis de oligonucleótidos o síntesis de péptidos, por ejemplo, dT-LCAA-CPG (Applied Biosystems), están disponibles comercialmente.

Un "intercalador" se refiere a un resto aromático o heteroaromático plano que es capaz de inserción y apilamiento parcial entre nucleobases adyacentes. Estos restos pueden ser moléculas pequeñas o parte de una entidad más grande, tal como una proteína. Los ejemplos no limitativos de intercaladores incluyen acridinas, antracenos, antraciclina, antraciclina, azul de metileno, indol, antraquinona, quinolina, isoquinolina, dihidroquinonas, tetraciclina, psoralenos, cumarinas, haluros de etidio, homodímeros de etidio, amarillo de oxazol homodimérico (YOYO), naranja de tiazol (TOTO), dinemicinas, 1,10-fenantrolina-cobre, calqueamicina, porfirinas, distamicinas, netropsinas y viológenos.

Un "agente de unión al surco menor" se refiere a un resto que tiene normalmente un peso molecular de aproximadamente 150 a aproximadamente 2000 Dalton. El resto se une de manera no intercalante en el surco menor de ADN, ARN bicatenario (o de orden de agregación superior) o híbridos de los mismos, preferiblemente, con una constante de asociación mayor de aproximadamente 10^3 M^{-1} . Los compuestos de unión al surco menor tienen estructuras químicas ampliamente variables, sin embargo, los agentes de unión al surco menor a modo de ejemplo tienen una estructura tridimensional en forma de media luna. Los ejemplos incluyen determinados compuestos que se producen de manera natural tales como netropsina, distamicina y lexitropsina, mitramicina, cromomicina A₃, olivomicina, antramycin, sibiromicina, así como antibióticos y derivados sintéticos relacionados adicionales. Determinados compuestos heterocíclicos de amonio biscuaternario, diarilamidinas tales como pentamidina, estilbamidina y berenilo, CC-1065 y polipéptidos de pirroloindol e indol relacionados, Hoechst 33258, 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), así como varios oligopéptidos que consisten en aminoácidos que se producen de manera natural o sintéticos son compuestos de unión al surco menor. Los agentes de unión al surco menor a modo de ejemplo se describen en la patente estadounidense n.º 6.084.102. Este tipo de unión puede detectarse mediante métodos espectrofotométricos, tales como espectroscopia ultravioleta (u.v.) y de resonancia magnética nuclear (RMN) y también mediante electroforesis en gel. Los desplazamientos en los espectros u.v. tras la unión de una molécula de agente de unión al surco menor, y la espectroscopia de RMN que utiliza el efecto "nuclear Overhauser" (NOSEY) son técnicas particularmente bien conocidas y útiles para este fin. La electroforesis en gel detecta la unión de un agente de unión al surco menor a ADN bicatenario o un fragmento del mismo, porque tras tal unión cambia la movilidad del ADN bicatenario.

El agente de unión al surco menor está unido normalmente al oligómero o soporte sólido a través de un ligador que comprende una cadena de aproximadamente 20, aproximadamente 15 átomos, aproximadamente 10 o aproximadamente 5 átomos.

Los agentes o restos intercalantes se distinguen fácilmente de los agentes de unión al surco menor basándose en que los agentes intercalantes son moléculas aromáticas (preferiblemente policíclicas) planas frente a la "forma de

media luna" o geometría análoga de los agentes de unión al surco menor. También puede realizarse una distinción experimental mediante espectroscopia de RMN que utiliza el efecto nuclear Overhauser.

El término "ligador" o "L", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un enlace covalente sencillo ("de orden cero") o una serie de enlaces covalentes estables que incorporan de 1-30 átomos que no son de hidrógeno seleccionados del grupo que consiste en C, N, O, S, Si y P que se unen covalentemente junto con los componentes de los compuestos de la invención, por ejemplo, uniendo un soporte sólido a un agente estabilizante, un extintor, un nucleomonomero u oligómero de la invención; o uniendo un extintor o resto estabilizante a una nucleobase en una amidita de la invención. Los ligadores a modo de ejemplo incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 átomos que son de hidrógeno. A menos que se especifique lo contrario, "que une", "unido", "unión", "que conjuga", "conjugado" y términos relacionados con la unión se refieren a técnicas que utilizan y a especies que incorporan ligadores. Los ligadores a modo de ejemplo incluyen un sitio de unión tal como se define en el presente documento. Además, un ligador es de uso para unir un oligómero u oligómero naciente (durante la síntesis de oligómeros) al soporte sólido de la invención. Por tanto, la invención también proporciona un oligómero de la invención unido covalentemente a un soporte sólido (por ejemplo, un soporte sólido de la invención) a través de un ligador. Los soportes sólidos y oligómeros de la invención incluyen opcionalmente un ligador escindible entre dos componentes del soporte sólido y el oligómero (por ejemplo, entre el oligómero y el soporte sólido, entre el fluoróforo y el oligómero, entre el extintor y el oligómero, entre el fluoróforo y el extintor, etc.). En diversas realizaciones, el ligador que une el soporte sólido al oligómero es un ligador escindible.

Un "ligador escindible" es un ligador que tiene uno o más grupos escindibles que pueden romperse como resultado de una reacción o condición. Un ligador escindible a modo de ejemplo está ubicado dentro de R^8 de fórmula I o II, que sirve para la separación conveniente de un oligómero sintetizado de la invención del soporte sólido sobre el que se sintetizó. El término "grupo escindible" se refiere a un resto que permite la liberación de un componente del soporte sólido u oligómero de la invención escindiendo un enlace que une el resto liberado al resto del conjugado. Los mecanismos de escisión de uso tanto en la preparación como en el uso de los oligómeros y soportes sólidos de la invención están mediados enzimática o químicamente de otro modo.

Además de grupos enzimáticamente escindibles, está dentro del alcance de la presente invención incluir uno o más sitios que se escinden mediante la acción de un agente distinto de una enzima. Los agentes de escisión no enzimáticos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ácidos, bases, luz (por ejemplo, derivados de nitrobenzilo, grupos fenacilo, ésteres de orto-hidroxycinamato, ésteres de benzoína) y calor. En la técnica se conocen muchos grupos escindibles. Véanse, por ejemplo, Jung *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 761: 152-162 (1983); Joshi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265: 14518-14525 (1990); Zarlring *et al.*, *J. Immunol.*, 124: 913-920 (1980); Bouiziar *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 155: 141-147 (1986); Park *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 261: 205-210 (1986); Browning *et al.*, *J. Immunol.*, 143: 1859-1867 (1989). Además, están disponibles comercialmente una amplia de brazos espaciadores bifuncionales (tanto homo- como heterobifuncionales) escindibles.

Un grupo escindible a modo de ejemplo puede escindir mediante un reactivo, por ejemplo, hidróxido de sodio, amoníaco u otra amina. En diversas realizaciones, el ligador escindible se escinde fácilmente a temperatura ambiente o con calor. En una realización, R^8 de fórmula I o II comprende un ligador escindible que se escinde mediante un tratamiento con una amina, por ejemplo, amoníaco o una amina esencialmente anhidra en un disolvente orgánico.

Un "sitio de unión" es un resto que conecta dos o más componentes (por ejemplo, componente funcional, soporte sólido, oligonucleótido o ligador). Este término se refiere a un enlace covalente que se forma mediante reacción de parejas de reacción complementarias, cada una de las cuales tiene un grupo funcional de reactividad complementaria a la de su pareja. Se seleccionan independientemente sitios de unión en el soporte sólido y oligómeros de la invención. Los sitios de unión a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), (O)CNH y NHC(O)O y OC(O)NH, CH₂S, CH₂O, CH₂CH₂O, CH₂CH₂S, (CH₂)₆O, (CH₂)₆S o (CH₂)₆Y^x-PEG en el que, Y^x es S, NH, NHC(O), C(O)NH, NHC(O)O, OC(O)NH u O y o es un número entero desde 1 hasta 50. En cada uno de estos sitios de unión a modo de ejemplo, NH puede ser NRⁱ en el que Rⁱ es alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido. Un sitio de unión también puede ser un grupo fosfodiéster. En diversas realizaciones, el sitio de unión está entre un ligador y un fluoróforo, un ligador y un extintor, un ligador y un resto estabilizante o un ligador y un soporte sólido. En una realización a modo de ejemplo de los oligómeros y el soporte sólido de la invención, cada sitio de unión es diferente.

El término "fluoróforo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un resto que es inherentemente fluorescente o muestra un cambio en la fluorescencia al unirse a un compuesto biológico o ion metálico, o al metabolismo por una enzima, es decir, fluorogénico. Los fluoróforos pueden sustituirse para alterar la solubilidad, las propiedades espectrales o las propiedades físicas del fluoróforo. Los expertos en la técnica conocen numerosos fluoróforos e incluyen, pero no se limitan a, cumarinas, acridinas, furanos, dansilos, cianinas, pirenos, naftalenos, benzofuranos, quinolinas, quinazolinonas, indoles, benzazoles, borapoliazaindacenos, oxazinas y xantenos, incluyendo los últimos fluoresceínas, rodaminas, rosaminas y rodeos. Estos y otros fluoróforos de uso en la invención se describen en Haugland, *MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS*. Otros fluoróforos útiles se describen en las publicaciones de solicitud de patente estadounidense n.º 2005/0214833 y 2005/0170363 de titularidad común y a continuación en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, “extintor” se refiere a cualquier resto modificador de la fluorescencia de la invención que puede atenuar al menos parcialmente la luz emitida por un fluoróforo. Esta atenuación se denomina en el presente documento “extinción”. Por tanto, en diversas realizaciones, la excitación del fluoróforo en presencia del grupo de extinción conduce a una señal de emisión que es menos intensa de lo esperado, o incluso completamente ausente. La extinción se produce normalmente a través de la transferencia de energía entre el fluoróforo excitado y el grupo de extinción.

El fluoróforo o extintor puede incluir sustituyentes que mejoran una propiedad deseable, por ejemplo, la solubilidad en agua, la permeabilidad celular o un espectro alterado de absorción y emisión, en relación con el compuesto “original” en ausencia de tal sustituyente. Como tal, el fluoróforo o extintor de uso en la invención incluye sustituyentes que mejoran una propiedad deseable en relación con un compuesto original idéntico en ausencia del sustituyente de mejora.

Un “componente funcional” es un término genérico para un resto en un compuesto de la invención que tiene una estructura seleccionada de un extintor, un fluoróforo o un resto estabilizante (incluyendo, pero sin limitarse a, intercaladores, restos de unión al surco menor, nucleobases modificadas con un resto estabilizante (por ejemplo, restos alquilino y restos fluoroalquilo) y restos estabilizantes conformacionales, tales como los descritos en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2007/0059752 de titularidad común).

La expresión “amplificación de polinucleótidos” incluye, pero no se limita a, métodos tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por ligamiento (o reacción en cadena de la ligasa, LCR) y métodos de amplificación basados en el uso de Q-beta replicasa. Estos métodos son bien conocidos y se practican ampliamente en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.683.195 y 4.683.202 e Innis *et al.*, 1990 (para PCR); y Wu *et al.*, 1989a (para LCR). Los reactivos y el hardware para realizar PCR están disponibles comercialmente. Los cebadores útiles para amplificar secuencias de una región génica particular son preferiblemente complementarios y se hibridan específicamente con secuencias en la región diana o en sus regiones flanqueantes. Las secuencias de ácido nucleico generadas mediante amplificación pueden secuenciarse directamente. Alternativamente, la(s) secuencia(s) amplificada(s) puede(n) clonarse antes del análisis de la secuencia. Scharf (1986) ha descrito un método para la clonación directa y el análisis de secuencias de segmentos genómicos amplificados enzimáticamente. La presente invención proporciona cebadores oligoméricos de uso en procedimientos de amplificación. Además, se proporciona un soporte sólido de uso en la síntesis de tales cebadores. Además de los cebadores, la invención proporciona sondas y métodos de uso de tales sondas, para detectar, caracterizar y/o cuantificar los productos de amplificación: también se proporcionan soportes sólidos de uso en la síntesis de estas sondas oligoméricas.

El término “perturbaciones del apilamiento de bases” se refiere a cualquier acontecimiento que provoque una perturbación en el apilamiento de bases tal como, por ejemplo, un apareamiento erróneo de los pares de bases, una proteína que se une a su sitio de reconocimiento o cualquier otra entidad que forme aductos de oligonucleótidos. Diversas sondas de la invención pueden detectar, caracterizar y/o cuantificar tales perturbaciones de apilamiento de bases. Además, la invención proporciona soportes sólidos de uso en la síntesis de sondas que pueden detectar, caracterizar y/o cuantificar tales perturbaciones de apilamiento de bases.

El término “hibridado” se refiere a dos cadenas de ácido nucleico asociadas entre sí que pueden o no estar completamente apareadas en sus bases: generalmente, este término se refiere a una asociación que incluye un oligómero de la invención ya sea unido a un soporte sólido o en disolución.

El término “desnaturalización” se refiere al proceso mediante el cual las cadenas de los dúplex de ácidos nucleicos (o agregados de orden superior) ya no están apareados en sus bases mediante enlaces de hidrógeno y se separan en moléculas monocatenarias. Los métodos de desnaturalización son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen la desnaturalización térmica y la desnaturalización alcalina. Este término generalmente se refiere a la disociación de una sonda de la invención de su ácido nucleico diana.

El término “apareamientos erróneos” se refiere a nucleobases de ácidos nucleicos dentro de los dúplex de ácidos nucleicos hibridados (o agregados de orden superior) que no son al 100% complementarios. Un apareamiento erróneo incluye cualquier apareamiento incorrecto entre las nucleobases de dos nucleobases ubicadas en cadenas complementarias de ácido nucleico que no son los pares de bases de Watson-Crick, por ejemplo, A:T o G:C. La falta de homología total puede deberse a deleciones, inserciones, inversiones, sustituciones o mutaciones del marco de lectura. En diversas realizaciones, el oligómero de la invención incluye un apareamiento erróneo relativo a su ácido nucleico diana, lo que preferiblemente permite la detección y/o caracterización y/o cuantificación del apareamiento erróneo en su diana. En determinadas realizaciones, el apareamiento erróneo es un apareamiento erróneo de un solo nucleótido.

Tal como se usa en el presente documento, el término “polimorfismo” se refiere a una variación de secuencia en un gen, y “mutación” se refiere a una variación de secuencia en un gen que está asociado o se cree que está asociado con un fenotipo. El término “gen” se refiere a un segmento del genoma que codifica para una región de control de proteína de producto funcional. Los marcadores polimórficos usados según la presente invención para la identificación de sujetos pueden ubicarse en regiones codificantes o no codificantes del genoma, y diversas sondas

de la invención están diseñadas para hibridarse con regiones de ácido nucleico que incluyen estos marcadores. El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto que proporciona una muestra de prueba a partir de la cual se obtienen los ácidos nucleicos diana con el fin de realizar pruebas genéticas. Los oligómeros de la invención son útiles para detectar y/o caracterizar y/o cuantificar polimorfismos y mutaciones. Además, los soportes sólidos de la invención son útiles para sintetizar oligómeros de uso para detectar y/o caracterizar y/o cuantificar polimorfismos y mutaciones.

El término "sonda", tal como se usa en el presente documento, se refiere a oligómeros de ácido nucleico preparados usando un soporte sólido o amidita de la invención. En diversas realizaciones, las sondas producen una respuesta detectable tras la interacción con una pareja de unión. Las sondas incluyen al menos un resto detectable, o un par de restos que forman un par de transferencia de energía detectable tras algún cambio de estado de la sonda en respuesta a su interacción con una pareja de unión. La presente invención proporciona sondas y amiditas y soportes sólidos de uso para sintetizar sondas. Las sondas a modo de ejemplo de la invención son de uso para detectar un polimorfismo. En diversas realizaciones, el polimorfismo es un polimorfismo de un solo ácido nucleico (SNP).

El término "respuesta detectable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un cambio o una aparición de una señal que es directa o indirectamente detectable o bien mediante observación o mediante instrumentación y la presencia o, preferiblemente, la magnitud de la cual es una función de la presencia de una pareja de unión diana para una sonda en la muestra de prueba. Normalmente, la respuesta detectable es una respuesta óptica de un fluoróforo que da como resultado un cambio en los patrones de distribución de longitud de onda o la intensidad de la absorbancia o la fluorescencia o un cambio en la dispersión de la luz, el rendimiento cuántico de la fluorescencia, la vida útil de la fluorescencia, la polarización de la fluorescencia, un cambio en la longitud de onda de excitación o emisión o una combinación de los parámetros anteriores. El cambio detectable en una propiedad espectral dada es generalmente un aumento o una disminución. Sin embargo, también son útiles los cambios espectrales que dan como resultado un aumento de la intensidad de la fluorescencia y/o un cambio en la longitud de onda de emisión o excitación de fluorescencia. El cambio en la fluorescencia en la unión de iones se debe habitualmente a cambios conformacionales o electrónicos en el indicador que pueden producirse en el estado excitado o fundamental del fluoróforo, debido a cambios en la densidad de electrones en el sitio de unión de iones, debido a la extinción de la fluorescencia por el ion metálico diana unido, o debido a cualquier combinación de estos u otros efectos. Alternativamente, la respuesta detectable es la aparición de una señal en la que el fluoróforo es inherentemente fluorescente y no produce un cambio en la señal tras la unión a un ion metálico o compuesto biológico. La presente invención proporciona sondas que proporcionan una respuesta detectable y soportes sólidos de uso para sintetizar tales sondas.

El término "molécula portadora" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier molécula a la que está unido un compuesto de la invención. Las moléculas portadoras representativas incluyen una proteína (por ejemplo, enzima, anticuerpo), glicoproteína, péptido, sacárido (por ejemplo, mono-, oligo- y polisacáridos), hormona, receptor, antígeno, sustrato, metabolito, análogo de estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, tinte, nutriente, factor de crecimiento, etc., sin limitación. "Molécula portadora" también se refiere a especie que no puede considerarse que están dentro de la definición clásica de "una molécula," por ejemplo, soporte sólido (por ejemplo, soporte de síntesis, soporte cromatográfico, membrana), virus y microorganismo.

El símbolo , representado perpendicular a un enlace, indica el punto en el que el resto representado está unido al resto de la molécula.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden tener uno o más centros o planos asimétricos. Los compuestos de la presente invención que contienen un átomo asimétricamente sustituido pueden aislarse en formas ópticamente activa o racémicas. Es bien conocido en la técnica cómo preparar formas ópticamente activas, tales como mediante resolución de formas racémicas (racematos), mediante síntesis asimétrica, o mediante síntesis a partir de materiales de partida ópticamente activos. La resolución de los racematos puede lograrse, por ejemplo, mediante métodos convencionales tales como cristalización en presencia de un agente de resolución, o cromatografía, usando, por ejemplo, una columna de HPLC quiral. También pueden estar presentes muchos isómeros geométricos de olefinas, dobles enlaces C=N, y similares en los compuestos descritos en el presente documento, y todos de tales isómeros se contemplan en la presente invención. Se describen los isómeros geométricos cis y trans de los compuestos de la presente invención y puede aislarse como una mezcla de isómeros o como formas isoméricas individuales. Todas las formas quirales (enantioméricas y diastereoméricas), y racémicas, así como todas las formas de isómeros geométricos de una estructura están previstas, a menos que se indique específicamente la forma estereoquímica o isomérica específica.

Las representaciones gráficas de compuestos racémicos, ambiescalémicos y escalémicos o enantioméricamente puros usados en el presente documento se toman de Maehr, J. Chem. Ed., 62: 114-120 (1985): se usan cuñas continuas y discontinuas para indicar la configuración absoluta de un elemento quiral; las líneas onduladas indican negación de cualquier implicación estereoquímica que pudiera generar el enlace que representa; las líneas continuas y discontinuas en negrita son descriptores geométricos que indican la configuración relativa mostrada, pero que no implican ninguna estereoquímica absoluta; y los contornos en cuña y las líneas punteadas o discontinuas indican compuestos enantioméricamente puros de configuración absoluta indeterminada.

El término "grupo cargado" se refiere a un grupo que porta una carga negativa o una carga positiva. La carga negativa o carga positiva pueden tener un número de carga que es un número entero seleccionado de 1, 2, 3 o mayor o que es un número fraccionario. Los grupos cargados a modo de ejemplo incluyen por ejemplo $-\text{OPO}_3^{2-}$, $-\text{OPO}_2^-$, $-\text{P}^+\text{Ph}_3$, $-\text{N}^+\text{R}^1\text{R}^2\text{R}^3$, $-\text{S}^+\text{R}$ y $-\text{C}(\text{O})\text{O}^-$.

- 5 Los compuestos descritos en el presente documento pueden tener uno o más grupos cargados. Por ejemplo, los compuestos pueden ser zwitteriónicos, pero pueden ser globalmente neutros. Otras realizaciones pueden tener uno o más grupos cargados, dependiendo del pH y otros factores. En estas realizaciones, el compuesto puede asociarse con un contraión adecuado. Se conoce bien en la técnica cómo preparar sales o intercambiar contraiones. Generalmente, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar formas de ácido libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base apropiada (tal como hidróxido, carbonato, bicarbonato de Na, Ca, Mg o K, o similares), o haciendo reaccionar formas de base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido apropiado. Tales reacciones se llevan a cabo normalmente agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos. Pueden cambiarse contraiones, por ejemplo, mediante técnicas de intercambio iónico tales como cromatografía de intercambio iónico. Están previstos todos los zwitteriones, sales y contraiones, a menos que se indique específicamente el contraión o la sal. En determinadas realizaciones, la sal o el contraión pueden ser farmacéuticamente aceptables, para la administración a un sujeto. Las sales farmacéuticamente aceptables se comentan más adelante.

Alternativamente, los compuestos de la invención pueden formar un compuesto que incluye uno o más grupos cargados tras la escisión del resto lábil ácido.

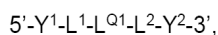
- 20 En algunas realizaciones, la definición de términos usados en el presente documento es según IUPAC.

Sondas con extintor doble

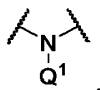
- En un aspecto, la invención proporciona una sonda de ácido nucleico que comprende un oligonucleótido que tiene unido al mismo un primer extintor y un segundo extintor, en la que el primer extintor está unido en una posición interna del oligonucleótido. El primer extintor y el segundo extintor son tal como se definen en el presente documento.

El oligonucleótido comprende además un fluoróforo. El fluoróforo es tal como se define en el presente documento.

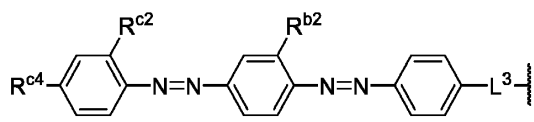
La invención proporciona una sonda de ácido nucleico que comprende un oligonucleótido que tiene la estructura:



- en la que Y^1 comprende una secuencia de dos o más nucleótidos de ADN o ARN; Y^2 comprende una secuencia de dos o más nucleótidos de ADN o ARN. Uno de Y^1 e Y^2 tiene un fluoróforo unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a su secuencia de nucleótidos, y el otro de Y^1 e Y^2 tiene un segundo extintor unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a su secuencia de nucleótidos. L^1 y L^2 se seleccionan independientemente de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido. L^{Q1} es:



- en la que Q^1 es un primer extintor que tiene una estructura:



en la que:

R^{b2} y R^{c2} son independientemente metilo o etilo o n-propilo o isopropilo o n-butilo o isobutilo o sec-butilo o terc-butilo;

- 40 R^{c4} es H; y L^3 es un enlace.

El segundo extintor y el fluoróforo son tal como se definen en el presente documento.

Cualquiera de las combinaciones de Y^1 , Y^2 , L^1 , L^2 y L^{Q1} están abarcadas por esta divulgación y se proporcionan específicamente por la invención.

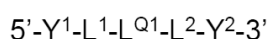
- En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de Y^1 incluye un primer nucleótido N^1 que tiene un fosfato en 5' unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a un fluoróforo o un segundo extintor, y un segundo

nucleótido N² que tiene un fosfato en 3' unido covalentemente a L¹.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos de Y² incluye un tercer nucleótido N³ que tiene un fosfato en 5' unido covalentemente a L², y un cuarto nucleótido N⁴ que tiene un fosfato en 3' unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a un segundo extintor o un fluoróforo.

- 5 En algunas realizaciones, cuando el fosfato en 5' del primer nucleótido N¹ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo, el fosfato en 3' del cuarto nucleótido N⁴ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al segundo extintor; y cuando el fosfato en 5' del primer nucleótido N¹ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al segundo extintor, el fosfato en 3' del cuarto nucleótido N⁴ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo.
- 10 En algunas realizaciones, la sonda de ácido nucleico comprende además uno o más nucleótidos de ADN o ARN unidos al ligador que conecta el fosfato en 5' del primer nucleótido N¹ al fluoróforo o segundo extintor. En algunas realizaciones, la sonda de ácido nucleico comprende además uno o más nucleótidos de ADN o ARN unidos al ligador que conecta el fosfato en 3' del cuarto nucleótido N⁴ al segundo extintor o fluoróforo.
- 15 En algunas realizaciones, el oligonucleótido comprende desde 15 hasta 45 (es decir, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45) nucleótidos. En algunas realizaciones, el oligonucleótido comprende desde 20 hasta 30 (es decir, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) nucleótidos. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene desde 15 hasta 45 (es decir, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45) nucleótidos (totales). En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene desde 20 hasta 30 (es decir, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30) nucleótidos (totales).
- 20 En algunas realizaciones, el fosfato en 5' del primer nucleótido N¹ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo; y el fosfato en 3' del cuarto nucleótido N⁴ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al segundo extintor.
- 25 En algunas realizaciones, cuando el fosfato en 5' del primer nucleótido N¹ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo, Y¹ es una secuencia de desde 8 hasta 11 (es decir, 8, 9, 10 u 11) nucleótidos. En algunas realizaciones, cuando el fosfato en 5' del primer nucleótido N¹ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo, Y¹ es una secuencia de 9 nucleótidos.
- 30 En algunas realizaciones, cuando el fosfato en 5' del primer nucleótido N¹ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo, Y¹ es una secuencia de desde 8 hasta 11 nucleótidos, e Y² es una secuencia de desde 6 hasta 24 (es decir, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24) nucleótidos.
- 35 En algunas realizaciones, el fosfato en 5' del primer nucleótido N¹ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al segundo extintor; y el fosfato en 3' del cuarto nucleótido N⁴ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo.
- 40 En algunas realizaciones, cuando el fosfato en 3' del cuarto nucleótido N⁴ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo, Y² es una secuencia de desde 8 hasta 11 (es decir, 8, 9, 10 u 11) nucleótidos. En algunas realizaciones, cuando el fosfato en 3' del cuarto nucleótido N⁴ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo, Y² es una secuencia de 9 nucleótidos.
- 45 En algunas realizaciones, cuando el fosfato en 3' del cuarto nucleótido N⁴ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo, Y² es una secuencia de desde 8 hasta 11 nucleótidos, e Y¹ es una secuencia de desde 6 hasta 24 (es decir, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24) nucleótidos.
- 50 En algunas realizaciones, L¹ es alquilo no sustituido. En algunas realizaciones, L¹ es alquilo C₁-C₇ (es decir, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆ o C₇) no sustituido. En algunas realizaciones, L¹ es alquilo C₁-C₃ (es decir, C₁, C₂ o C₃) no sustituido. En algunas realizaciones, L¹ es metilo. En algunas realizaciones, L¹ es etilo. En algunas realizaciones, L¹ es n-propilo.
- En algunas realizaciones, L² es alquilo no sustituido. En algunas realizaciones, L² es alquilo C₁-C₇ (es decir, C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆ o C₇) no sustituido. En algunas realizaciones, L² es alquilo C₁-C₃ (es decir, C₁, C₂ o C₃) no sustituido. En algunas realizaciones, L² es metilo. En algunas realizaciones, L² es etilo. En algunas realizaciones, L² es n-propilo.
- En algunas realizaciones, L¹ y L² son cada uno iguales. En algunas realizaciones, L¹ y L² son diferentes. En algunas realizaciones, L¹ y L² son cada uno metilo. En algunas realizaciones, L¹ y L² son cada uno etilo. En algunas realizaciones, L¹ y L² son cada uno n-propilo.

La sonda de ácido nucleico es un oligonucleótido que tiene la estructura:



en la que Y^1 , Y^2 , L^1 , L^2 y L^{Q1} son tal como se definen en el presente documento.

Extintores

Primer extintor (interno)

5 Se describe en el presente documento un primer extintor (Q^1) que tiene una estructura que comprende al menos tres residuos seleccionados de arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido y no sustituido, y combinaciones de los mismos, en el que al menos dos de los residuos están unidos covalentemente a través de un enlace diazo exocíclico.

Cada uno de los al menos tres residuos puede ser fenilo sustituido o no sustituido.

10 Al menos dos de los al menos tres residuos pueden ser fenilo sustituido con al menos un resto de alquilo C_1 - C_6 no sustituido.

Según la invención, el primer extintor (Q^1) está unido al oligonucleótido a través de L^3 . L^3 es tal como se define en el presente documento.

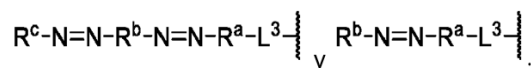
En algunas realizaciones, el primer extintor (Q^1) está unido a un nucleótido, que está 8, 9, 10 u 11 nucleótidos hacia el extremo terminal 3' desde el extremo terminal 5' del oligonucleótido.

15 En algunas realizaciones, el primer extintor (Q^1) está unido entre el 8° y el 9° o el 9° y el 10° o el 10° y el 11° o el 11° y el 12° nucleótidos hacia el extremo terminal 3' desde el extremo terminal 5' del oligonucleótido. En algunas realizaciones, el primer extintor (Q^1) está unido entre los nucleótidos 9° y 10° hacia el extremo terminal 3' desde el extremo terminal 5' del oligonucleótido.

20 En algunas realizaciones, el primer extintor (Q^1) está unido a un nucleótido, que está 8, 9, 10 u 11 nucleótidos hacia el extremo terminal 5' desde el extremo terminal 3' del oligonucleótido.

En algunas realizaciones, el primer extintor (Q^1) está unido entre el 8° y el 9° o el 9° y el 10° o el 10° y el 11° o el 11° y el 12° nucleótidos hacia el extremo terminal 5' desde el extremo terminal 3' del oligonucleótido. En algunas realizaciones, el primer extintor (Q^1) está unido entre los nucleótidos 9° y 10° hacia el extremo terminal 5' desde el extremo terminal 3' del oligonucleótido.

25 También se describe en el presente documento un primer extintor (Q^1) que tiene una estructura seleccionada de:



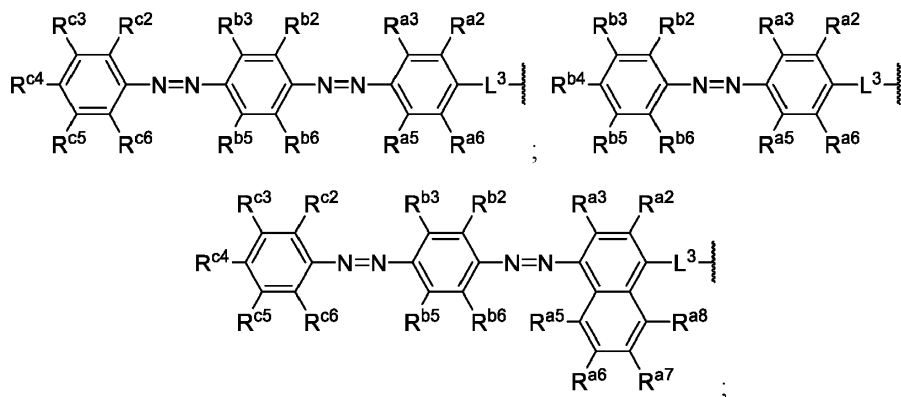
R^a , R^b y R^c se seleccionan independientemente de arilo sustituido o no sustituido.

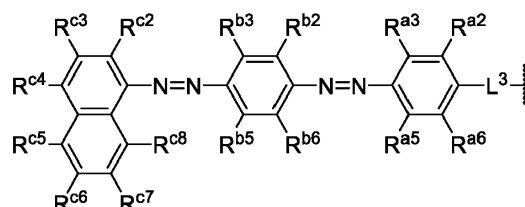
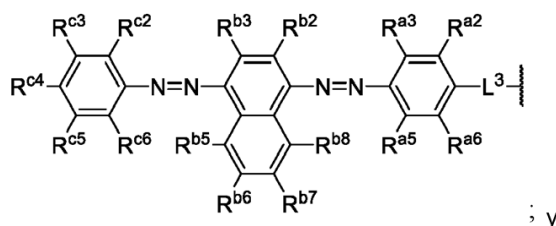
L^3 se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

30 R^a , R^b y R^c pueden seleccionarse independientemente de fenilo sustituido o no sustituido.

L^3 puede ser un enlace.

También se describe en el presente documento un primer extintor (Q^1) que tiene una estructura seleccionada de:





en las que, R^{a2} , R^{a3} , R^{a5} , R^{a6} , R^{a7} , R^{a8} , R^{b2} , R^{b3} , R^{b4} , R^{b5} , R^{b6} , R^{b7} , R^{b8} , R^{c2} , R^{c3} , R^{c4} , R^{c5} , R^{c6} , R^{c7} y R^{c8} se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoilo sustituido o no sustituido y nitro. L^3 es tal como se define en el presente documento.

R^{a2} , R^{a3} , R^{a5} , R^{a6} , R^{a7} , R^{a8} , R^{b2} , R^{b3} , R^{b4} , R^{b5} , R^{b6} , R^{b7} , R^{b8} , R^{c2} , R^{c3} , R^{c4} , R^{c5} , R^{c6} , R^{c7} y R^{c8} pueden seleccionarse independientemente de H, alquilo no sustituido y nitro.

R^{a2} , R^{a3} , R^{a5} , R^{a6} , R^{a7} , R^{a8} , R^{b2} , R^{b3} , R^{b4} , R^{b5} , R^{b6} , R^{b7} , R^{b8} , R^{c2} , R^{c3} , R^{c4} , R^{c5} , R^{c6} , R^{c7} y R^{c8} pueden seleccionarse independientemente de H, alquilo C_1 - C_4 (es decir, C_1 , C_2 , C_3 o C_4) no sustituido y nitro.

R^{a2} , R^{a3} , R^{a5} , R^{a6} , R^{a7} , R^{a8} , R^{b2} , R^{b3} , R^{b4} , R^{b5} , R^{b6} , R^{b7} , R^{b8} , R^{c2} , R^{c3} , R^{c4} , R^{c5} , R^{c6} , R^{c7} y R^{c8} pueden seleccionarse independientemente de H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo y nitro.

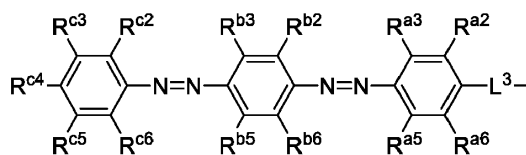
R^{a2} , R^{a3} , R^{a5} , R^{a6} , R^{a7} (si están presentes) y R^{a8} (si está presente) puede ser H.

R^{b2} , R^{b3} , R^{b4} (si están presentes), R^{b5} , R^{b6} , R^{b7} (si están presentes) y R^{b8} (si está presente) pueden seleccionarse independientemente de H, alquilo C_1 - C_4 (es decir, C_1 , C_2 , C_3 o C_4) no sustituido y nitro. R^{b2} , R^{b3} , R^{b5} , R^{b6} , R^{b7} (si están presentes) y R^{b8} (si está presente) también pueden seleccionarse independientemente de H y alquilo C_1 - C_4 (es decir, C_1 , C_2 , C_3 o C_4) no sustituido. R^{b4} puede ser nitro.

R^{c2} , R^{c3} , R^{c4} , R^{c5} , R^{c6} , R^{c7} (si están presentes) y R^{c8} (si está presente) pueden seleccionarse independientemente de H, alquilo C_1 - C_4 (es decir, C_1 , C_2 , C_3 o C_4) no sustituido y nitro. R^{c2} , R^{c3} , R^{c5} , R^{c6} , R^{c7} (si están presentes) y R^{c8} (si está presente) pueden seleccionarse independientemente de H y alquilo C_1 - C_4 (es decir, C_1 , C_2 , C_3 o C_4) no sustituido.

Cualquiera de las combinaciones de R^{a2} , R^{a3} , R^{a5} , R^{a6} , R^{a7} , R^{a8} , R^{b2} , R^{b3} , R^{b4} , R^{b5} , R^{b6} , R^{b7} , R^{b8} , R^{c2} , R^{c3} , R^{c4} , R^{c5} , R^{c6} , R^{c7} , R^{c8} y L^3 están abarcadas por esta divulgación.

También se describe en el presente documento Q^1 que tiene la estructura:

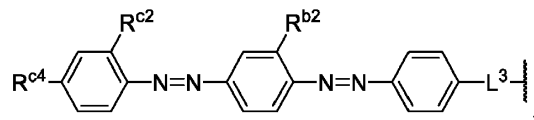


en la que R^{a2} , R^{a3} , R^{a5} , y R^{a6} son H; y R^{b2} , R^{b3} , R^{b5} , R^{b6} , R^{c2} , R^{c3} , R^{c4} , R^{c5} , R^{c6} y L^3 son tal como se definen en el presente documento.

Al menos uno (es decir, uno, dos, tres o todos) de R^{b2} , R^{b3} , R^{b5} y R^{b6} pueden ser independientemente metilo o etilo o n-propilo o isopropilo o n-butilo o isobutilo o *sec*-butilo o *terc*-butilo, y el resto de R^{b2} , R^{b3} , R^{b5} y R^{b6} pueden ser H. Uno de R^{b2} , R^{b3} , R^{b5} y R^{b6} pueden ser metilo o etilo o n-propilo o isopropilo o n-butilo o isobutilo o *sec*-butilo o *terc*-butilo, y el resto de R^{b2} , R^{b3} , R^{b5} y R^{b6} pueden ser H.

Al menos uno (es decir, uno, dos, tres, cuatro o todos) de R^{c2} , R^{c3} , R^{c4} , R^{c5} y R^{c6} pueden ser independientemente metilo o etilo o n-propilo o isopropilo o n-butilo o isobutilo o *sec*-butilo o *terc*-butilo, y el resto de R^{c2} , R^{c3} , R^{c4} , R^{c5} y R^{c6} pueden ser H. Uno de R^{c2} , R^{c3} , R^{c4} , R^{c5} y R^{c6} pueden ser metilo o etilo o n-propilo o isopropilo o n-butilo o isobutilo o *sec*-butilo o *terc*-butilo, y el resto de R^{c2} , R^{c3} , R^{c4} , R^{c5} y R^{c6} puede ser H.

Según la invención, el primer extintor (Q^1) tiene la estructura:



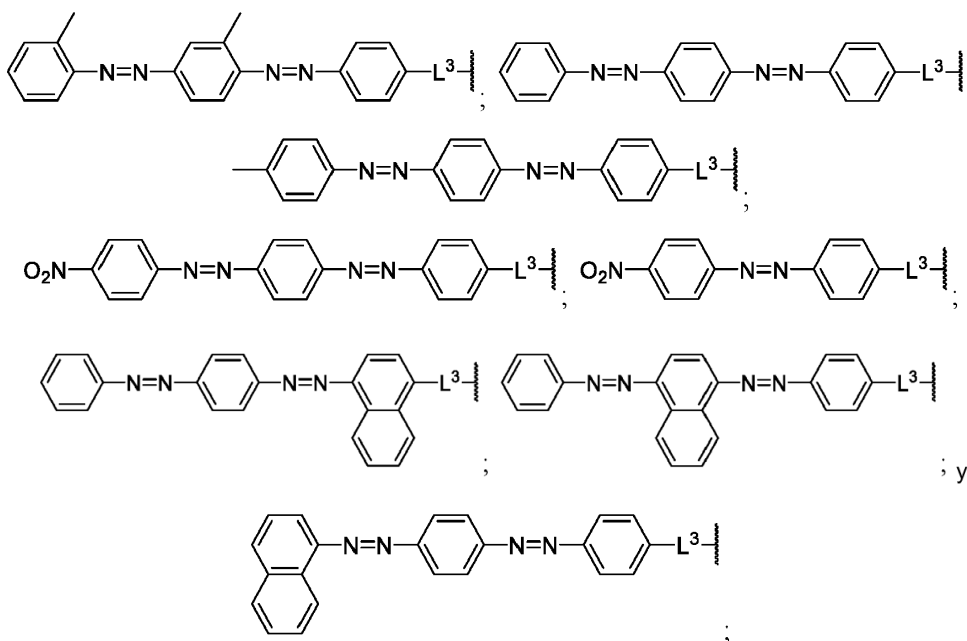
en la que:

R^{b2} y R^{c2} son independientemente metilo o etilo o n-propilo o isopropilo o n-butilo o isobutilo o *sec*-butilo o *terc*-butilo;

5 R^{c4} es H; y L^3 es un enlace.

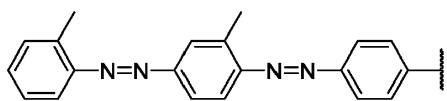
En algunas realizaciones, R^{o4} es H. En algunas realizaciones, R^{b2} y R^{c2} son independientemente metilo o etilo o n-propilo o isopropilo o n-butilo o isobutilo o *sec*-butilo o *terc*-butilo; y R^{o4} es H.

También se describe en el presente documento un primer extintor (Q¹) que tiene una estructura seleccionada de:



en las que L^3 es tal como se define en el presente documento.

15 En algunas realizaciones, el primer extintor (Q^1) tiene la estructura:

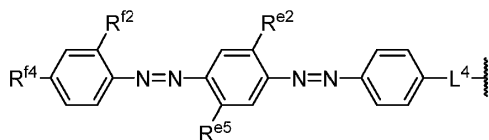


Segundo extintor

20 En algunas realizaciones, el segundo extintor tiene una estructura que comprende al menos tres residuos seleccionados de arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido y no sustituido, y combinaciones de los mismos, en el que al menos dos de los residuos están unidos covalentemente a través de un enlace diazo exocíclico.

En algunas realizaciones, el segundo extintor está unido al oligonucleótido a través de L⁴. L⁴ es tal como se define en el presente documento.

En algunas realizaciones, el segundo extintor tiene la estructura:



en la que R^{e2} , R^{e5} , R^{f2} y R^{f4} se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoilo sustituido o no sustituido y nitro; y L^4 se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

5 En algunas realizaciones, R^{e2} y R^{e5} se seleccionan independientemente de H, alquilo no sustituido, y no sustituido alcoilo. En algunas realizaciones, R^{e2} y R^{e5} se seleccionan independientemente de H, alquilo C_1-C_4 (es decir, C_1 , C_2 , C_3 o C_4) no sustituido y alcoilo C_1-C_4 (es decir, C_1 , C_2 , C_3 o C_4) no sustituido. En algunas realizaciones, R^{e2} y R^{e5} se seleccionan independientemente de H, metilo y metoxilo.

10 En algunas realizaciones, R^{f2} y R^{f4} se seleccionan independientemente de H, alquilo no sustituido y nitro. En algunas realizaciones, R^{f2} y R^{f4} se seleccionan independientemente de H, alquilo C_1-C_4 (es decir, C_1 , C_2 , C_3 o C_4) no sustituido y nitro. En algunas realizaciones, R^{f2} y R^{f4} se seleccionan independientemente de H, metilo y nitro.

En algunas realizaciones, R^{e2} es alquilo C_1-C_4 no sustituido; R^{e5} es H; R^{f2} es alquilo C_1-C_4 no sustituido; y R^{f4} es H.

En algunas realizaciones, R^{e2} es alcoilo C_1-C_4 no sustituido; R^{e5} es alquilo C_1-C_4 no sustituido; R^{f2} es nitro; y R^{f4} es alquilo C_1-C_4 no sustituido.

15 En algunas realizaciones, R^{e2} es alcoilo C_1-C_4 no sustituido; R^{e5} es alcoilo C_1-C_4 no sustituido; R^{f2} es H; y R^{f4} es nitro.

En algunas realizaciones, L^4 es una dialquilamina sustituida o no sustituida.

En algunas realizaciones, L^4 tiene la estructura:

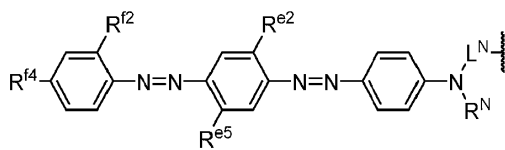


20 en la que L^N se selecciona de alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido; y R^N se selecciona de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

En algunas realizaciones, el punto de unión al átomo de nitrógeno mostrado en la fórmula anterior es el punto de unión al resto fenilo del segundo extintor. En algunas realizaciones, L^N es alquilo no sustituido. En algunas realizaciones, L^N es alquilo C_1-C_4 (es decir, C_1 , C_2 , C_3 o C_4) no sustituido. En algunas realizaciones, L^N es etilo.

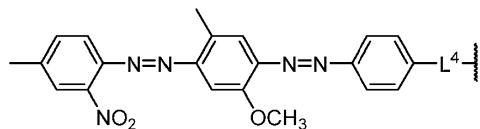
25 En algunas realizaciones, R^N es alquilo sustituido o no sustituido. En algunas realizaciones, R^N es alquilo C_1-C_4 (es decir, C_1 , C_2 , C_3 o C_4) sustituido o no sustituido. En algunas realizaciones, R^N es hidroalquilo C_1-C_4 (es decir, C_1 , C_2 , C_3 o C_4) no sustituido. En algunas realizaciones, R^N es etilo. En algunas realizaciones, R^N es 2-hidroxietilo.

En algunas realizaciones, el segundo extintor tiene la estructura:



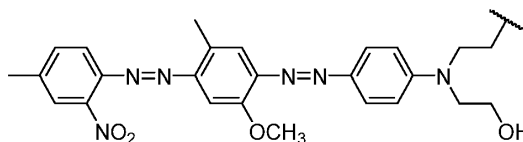
en la que R^{e2} , R^{e5} , R^{f2} , R^{f4} , L^N y R^N son tal como se definen en el presente documento.

30 En algunas realizaciones, el segundo extintor tiene la estructura:



en la que L^4 es tal como se define en el presente documento.

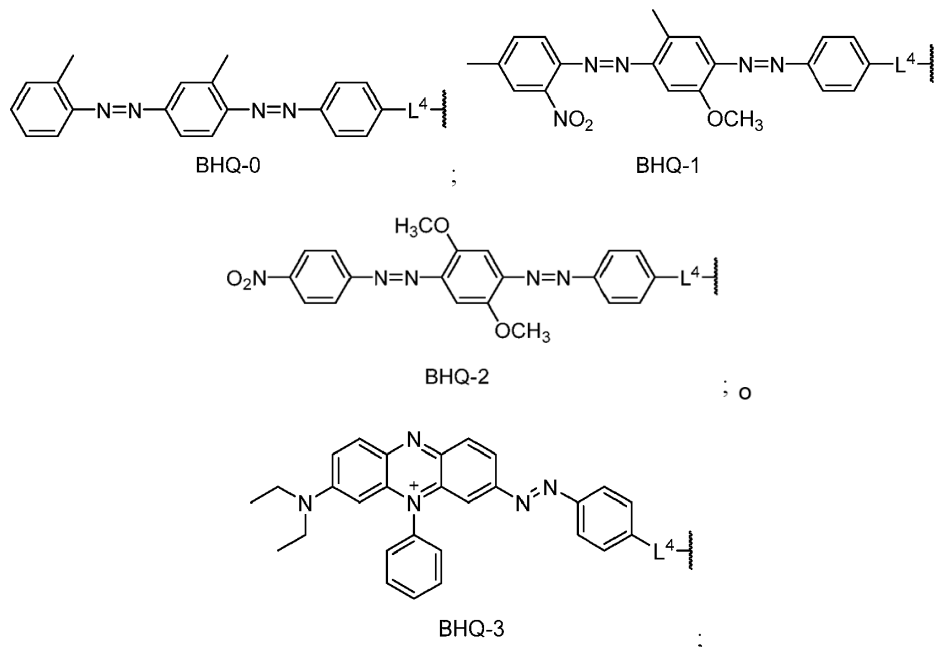
En algunas realizaciones, el segundo extintor tiene la estructura:



35 El segundo extintor puede derivarse de un reactivo extintor, por ejemplo, a través de la reacción de un grupo

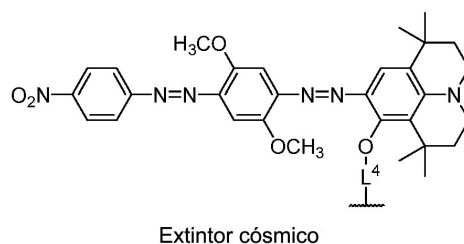
funcional reactivo en el reactivo extintor con un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria en el oligonucleótido o en un ligador unido al oligonucleótido.

En algunas realizaciones, el segundo extintor es (se deriva de) un BHQ (Black Hole Quencher®; Biosearch Technologies, Inc.), tal como un extintor descrito en la patente estadounidense n.º 7.019.129. En algunas realizaciones, el segundo extintor es un derivado de BHQ-0, BHQ-1, BHQ-2 o BHQ-3 que tiene la estructura:



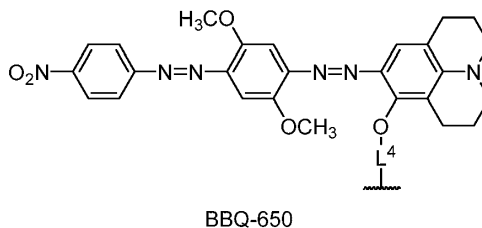
en las que L^4 es tal como se define en el presente documento.

- 10 En algunas realizaciones, el segundo extintor es (se deriva de) un extintor descrito en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/990.913; presentada el 9 de mayo de 2014; titulada "Extintores cósmicos". En algunas realizaciones, el segundo extintor tiene la estructura:



en la que L^4 es tal como se define en el presente documento.

- 15 En algunas realizaciones, el segundo extintor es (se deriva de) un extintor BlackBerry (BBQ-650®; Berry & Associates, Inc.; descritos en la patente estadounidense n.º 7.879.986). En algunas realizaciones, el segundo extintor tiene la estructura:



en la que L^4 es tal como se define en el presente documento.

- 20 En algunas realizaciones, la estructura del segundo extintor es cualquiera de las estructuras mostradas en el presente documento para el primer extintor (Q^1).

En algunas realizaciones, el segundo extintor es (se deriva de) dabculo, dabsilo, extintor Eclipse®, Iowa Black® FQ, Iowa Black® RQ-n1 o Iowa Black® RQ-n2.

En algunas realizaciones, el segundo extintor está unido en el extremo terminal 3' o 5' del oligonucleótido. En algunas realizaciones, el segundo extintor está unido al extremo terminal 3' del oligonucleótido.

- 5 En algunas realizaciones, el segundo extintor está unido al fosfato en 3' del cuarto nucleótido N⁴ o al fosfato en 5' del primer nucleótido N¹. En algunas realizaciones, el segundo extintor está unido al fosfato en 3' del cuarto nucleótido N⁴.

Fluoróforo

- 10 Una de las ventajas de los compuestos de la invención es que puede usarse una amplia gama de moléculas donadoras de energía junto con las sondas de ácido nucleico funcionalizadas con extintor y los oligonucleótidos. Los expertos en la técnica conocen una amplia gama de fluoróforos. Véanse, por ejemplo, Cardullo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8790-8794 (1988); Dexter, D.L., J. of Chemical Physics 21: 836- 850 (1953); Hochstrasser *et al.*, Biophysical Chemistry 45: 133-141 (1992); Selvin, P., Methods in Enzymology 246: 300-334 (1995); Steinberg, I. Ann. Rev. Biochem., 40: 83- 114 (1971); Stryer, L. Ann. Rev. Biochem., 47: 819-846 (1978); Wang *et al.*, Tetrahedron Letters 31: 6493-6496 (1990); Wang *et al.*, Anal. Chem. 67: 1197-1203 (1995).
- 15

Una lista no limitativa de donadores a modo de ejemplo que pueden usarse junto con los extintores de la invención se proporciona en la tabla 1.

TABLA 1

Restos adecuados que pueden seleccionarse como donadores o aceptores en pares de transferencia de energía donador-aceptor
ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico
acridina y derivados:
acridina
isotiocianato de acridina
ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS)
disulfonato de 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5
N-(4-anilino-1-naftil)maleimida
antranilamida
BODIPY
amarillo brillante
cumarina y derivados:
cumarina
7-amino-4-metilcumarina (AMC, cumarina 120)
7-amino-4-trifluorometilcumarina (cumarán 151)
tintes de cianina
cianosina
4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI)
5',5"-dibromopirogalol-sulfonaftaleína (rojo de bromopirogalol)
7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina
pentaacetato de dietilentriamina
ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico
ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico
cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo)
ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCILO)
4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC)
eosina y derivados:
Eosina
isotiocianato de eosina
eritrosina y derivados:

eritrosina B
isotiocianato de eritrosina
etidio
fluoresceína y derivados:
 5-carboxifluoresceína (FAM)
 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF)
 2',7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE)
 fluoresceína
 isotiocianato de fluoresceína
 QFITC (XRITC)
fluorescamina
IR144
IR1446
isotiocianato de verde malaquita
4-metilumbeliferona
orto-cresolftaleína
nitrotirosina
pararosanilina
rojo de fenol
B-ficoeritrina
o-ftaldialdehído
pireno y derivados:
 pireno
 butirato de pireno
 butirato de succinimidil-1-pireno
puntos cuánticos
rojo reactivo 4 (Cibacron™ rojo brillante 3B-A)
rodamina y derivados:
 6-carboxi-X-rodamina (ROX)
 6-carboxirodamina (R6G)
 cloruro de sulfonilo de rodamina B de lisamina, rodamina (Rhod)
 rodamina B
 rodamina 123
 isotiocianato de rodamina X
 sulforodamina B
 sulforodamina 101
derivado de cloruro de sulfonilo de sulforodamina 101 (rojo Texas)
N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA)
tetrametilrodamina
 isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC)
riboflavina
ácido rosólico
quelatos de metales, por ejemplo, quelatos de lantánidos (por ejemplo, quelatos de europio terbio),
quelatos de rutenio

Existe una gran cantidad de orientación práctica disponible en la bibliografía para la selección de pares donador-aceptor apropiados para sondas particulares, tal como se ejemplifica en las siguientes referencias: Pesce *et al.*, Eds., FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (Marcel Dekker, Nueva York, 1971); White *et al.*, FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH (Marcel Dekker, Nueva York, 1970); y similares. La bibliografía también incluye referencias que proporcionan listas exhaustivas de moléculas fluorescentes y cromógenas y sus propiedades ópticas relevantes para la elección de los pares indicador-extintor (véase, por ejemplo, Berlman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2ª edición (Academic Press, Nueva York, 1971); Griffiths, COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES (Academic Press, Nueva York, 1976); Bishop, Ed., INDICATORS (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (Molecular Probes, Eugene, 1992) Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE (Interscience Publishers, Nueva York, 1949); y similares. Además, existe una amplia orientación en la bibliografía para derivatizar moléculas indicadoras y extintoras para la unión covalente a través de grupos reactivos comunes que pueden añadirse a un ácido nucleico, tal como se ejemplifica en las siguientes referencias: Haugland (citado anteriormente); Ullman *et al.*, patente estadounidense n.º 3.996.345; Khanna *et al.*, patente estadounidense n.º 4.351.760. Por tanto, está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica de elegir un par de intercambio de energía para una aplicación particular y conjugar los miembros de este par con una molécula de sonda, tal como, por ejemplo, un ácido nucleico, un péptido u otro polímero.

Generalmente, se prefiere que una banda de absorbancia del extintor se superponga sustancialmente a la banda de emisión de fluorescencia del donador. Cuando el donador (fluoróforo) es un componente de una sonda que usa la transferencia de energía donador-aceptor, el resto de fluorescente donador y el extintor (aceptor) de la invención se seleccionan preferiblemente para que los restos de donador y acepto presenten transferencia de energía donador-aceptor cuando se excita el resto de donador. Un factor a considerar en la elección del par fluoróforo-extintor es la eficiencia de la transferencia de energía donador-aceptor entre ellos. Preferiblemente, la eficiencia de FRET entre los restos de donador y acepto es de al menos el 10%, más preferiblemente de al menos el 50% e incluso más preferiblemente de al menos el 80%. La eficiencia de FRET puede someterse a prueba fácilmente de manera empírica usando los métodos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica.

La eficiencia de la transferencia de energía entre el par donador-aceptor también puede ajustarse cambiando la capacidad de los grupos donador y acepto para dimerizar o asociarse estrechamente. Si se sabe o se determina que los restos de donador y acepto se asocian estrechamente, puede promoverse un aumento o una disminución de la asociación ajustando la longitud de un resto de ligador, o de la propia sonda, entre el donador y el acepto. La capacidad de asociación del par donador-aceptor puede aumentarse o disminuirse ajustando las interacciones hidrófobas o iónicas, o las repulsiones estéricas en el constructo de la sonda. Por tanto, las interacciones intramoleculares responsables de la asociación del par donador-aceptor pueden potenciarse o atenuarse. Por tanto, por ejemplo, la asociación entre el par donador-aceptor puede aumentarse, por ejemplo, usando un donador con una carga global negativa y un acepto con una carga global positiva.

Además de los fluoróforos que se unen directamente a una sonda, los fluoróforos también pueden unirse por medios indirectos. En esta realización, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) se une generalmente de manera covalente a la especie de sonda. Luego el ligando se une a otra molécula (por ejemplo, estreptavidina), que es o bien inherentemente detectable o bien está unida covalentemente a un sistema de señales, tal como un compuesto fluorescente, o una enzima que produce un compuesto fluorescente por conversión de un compuesto no fluorescente. Las enzimas útiles de interés como marcadores incluyen, por ejemplo, hidrolasas, particularmente fosfatasa, esterasas y glicosidasas, hidrolasas, peptidasas u oxidasas, particularmente peroxidasas, y. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc., tal como se comentó anteriormente. Para una revisión de diversos sistemas de marcaje o de producción de señales que pueden usarse, véase, la patente estadounidense n.º 4.391.904.

Los donadores de uso junto con los extintores de la invención incluyen, por ejemplo, tintes de xanteno, incluyendo fluoresceínas, tintes de cianina y tintes de rodamina. Muchas formas adecuadas de estos compuestos están ampliamente disponibles comercialmente con sustituyentes en sus restos de fenilo, que pueden usarse como sitio de unión o como funcionalidad de unión para la unión a un ácido nucleico. Otro grupo de compuestos fluorescentes de uso junto con los extintores de la invención son las naftilaminas, que tienen un grupo amino en la posición alfa o beta. Entre tales compuestos de naftilamino se incluyen 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, sulfonato de 1-anilino-8-naftaleno y sulfonato de 2-p-touidil-6-naftaleno. Otros donadores incluyen 3-fenil-7-isocianatocumarina, acridinas, tales como 9-isotiocianatoacridina y naranja de acridina; N-(p-(2-benzoxazolil)fenil)maleimida; benzoxadiazoles, estilbenos, pirenos y similares.

En una realización a modo de ejemplo, en la que la sonda es una sonda de ácido nucleico, el fluoróforo es una fluoresceína (por ejemplo, FAM). El fluoróforo está unido preferiblemente o bien al extremo terminal en 3' o al extremo terminal 5' del ácido nucleico, aunque los sitios internos también son accesibles y tienen utilidad para determinados fines. Cualquiera que sea el extremo terminal al que esté unido el fluoróforo, el extintor estará generalmente unido a su antípoda, o en una posición interna a la cadena de ácido nucleico. Los grupos donadores se introducen preferiblemente usando un derivado de amidita del donador. Alternativamente, los grupos donadores que comprenden grupos funcionales reactivos (por ejemplo, isotiocianatos, ésteres activos, etc.) pueden introducirse mediante la reacción con un grupo funcional reactivo en un brazo de anclaje o ligador unido al ácido nucleico (por

ejemplo, hexilamina).

En aún otra realización preferida, el resto de donador puede unirse al extremo terminal 3' de un ácido nucleico mediante el uso de un soporte de síntesis derivatizado. Por ejemplo, TAMRA (ácido carboxílico de tetrametilrodamina) se une a un extremo terminal 3' de ácido nucleico usando un soporte sólido que se derivatiza con un análogo de este fluoróforo (Biosearch Technologies, Inc.)

A la vista de la bien desarrollada bibliografía sobre la conjugación de pequeñas moléculas con ácidos nucleicos, muchos otros métodos de unir pares donador/aceptor a ácidos nucleicos serán evidentes para los expertos en la técnica. Por ejemplo, los tintes de rodamina y fluoresceína se unen convenientemente al 5'-hidroxilo de un ácido nucleico al final de la síntesis en fase sólida mediante tintes derivatizados con resto de fosforamida (véase, por ejemplo, Woo *et al.*, patente estadounidense n.º 5.231.191; y Hobbs, Jr., patente estadounidense n.º 4.997.928).

Más específicamente, existen muchos restos de ligador y metodologías para unir grupos a los extremos terminales 5' o 3' de los ácidos nucleicos, tal como se ejemplifica en las siguientes referencias: Eckstein, editor, *Nucleic acids and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckerman *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 15: 5305-5321 (1987) (grupo 3'-tiol en ácido nucleico); Sharma *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 19: 3019 (1991) (3'-sulfhidrido); Giusti *et al.*, *PCR Methods and Applications*, 2: 223-227 (1993) y Fung *et al.*, patente estadounidense n.º 4.757.141 (grupo 5'-fosfoamino mediante Aminolink TM II disponible en P.E. Biosystems, CA.) Stabinsky, patente estadounidense n.º 4.739.044 (grupo 3-aminoalquilfosforilo); Agrawal *et al.*, *Tetrahedron Letters*, 31: 1543-1546 (1990) (unión a través de uniones fosforamidato); Sproat *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 15: 4837 (1987) (grupo 5-mercaptop); Nelson *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 17: 7187-7194 (1989) (grupo 3'-amino), y similares.

Los medios de detección de marcadores fluorescentes se conocen bien por los expertos en la técnica. Por tanto, por ejemplo, los marcadores fluorescentes pueden detectarse excitando el fluoróforo con la longitud de onda de luz adecuada y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia puede detectarse visualmente, mediante una película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de carga acoplada (CCD) o fotomultiplicadores y similares. Del mismo modo, los marcadores enzimáticos pueden detectarse proporcionando los sustratos adecuados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante.

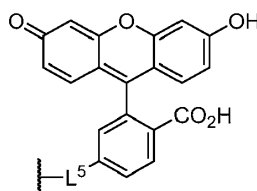
El fluoróforo puede ser un fluoróforo orgánico no proteico o una proteína fluorescente. Familias a modo de ejemplo de fluoróforos orgánicos no proteicos son: derivados de xanteno (tales como fluoresceína, rodamina, Oregon Green, eosina y rojo Texas), derivados de cianina (tales como cianina, indocarbocianina, oxacarbocianina, tiacarbocianina y merocianina), derivados de escuarina y escuarina sustituidas por anillos (incluyendo los tintes Seta, SeTau y Square), derivados de naftaleno (tales como los derivados de dansilo y de prodano), derivados de cumarina, derivados de oxadiazol (tales como piridoxazol, nitrobenzoxadiazol y benzoxadiazol), derivados de antraceno (tales como antraquinonas, incluyendo DRAQ5, DRAQ7 y CyTRAK Orange), derivados de pireno (tales como Cascade Blue), derivados de oxazina (tales como rojo Nilo, azul Nilo, violeta de cresilo y oxazina 170), derivados de acridina (tales como proflavina, naranja de acridina y amarillo de acridina), derivados de arilmetina (tales como auramina, violeta de cristal y verde malaquita) y derivados de tetrapirrol (tales como porfina, ftalocianina y bilirrubina).

En algunas realizaciones, el fluoróforo es (se deriva de) 6-carboxifluoresceína (FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), tetraclorofluoresceína (TET), 6-carboxirodamina (R6G), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, sulfonato de 1-anilino-8-naftaleno, sulfonato de 2-p-toluidinil-6-naftaleno, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), un tinte de cumarina, un tinte de acridina, indodicarbocianina 3 (Cy3), indodicarbocianina 5 (Cy5), indodicarbocianina 5.5 (Cy5.5), 3-(1-carboxi-pentil)-3'-etil-5,5'-dimetiloxacarbocianina (CyA), 1H,5H,11H,15H-xanteno[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']diquinolizin-18-io, 9-[2(o 4)-[[[6-[2,5-dioxo-1-pirrolidinil]oxi]-6-oxohexil]amino]sulfonil]-4(o 2)-sulfofenil]-2,3,6,7,12,13,16,17-octahidro-sal interna (TR o rojo Texas), un tinte de BODIPY, benzoxaazol, estilbeno o pireno.

En algunas realizaciones, el fluoróforo se deriva de 6-carboxifluoresceína (FAM). En algunas realizaciones, el fluoróforo comprende un resto de fluoresceína.

En algunas realizaciones, el fluoróforo está unido al oligonucleótido a través de L⁵. L⁵ es tal como se define en el presente documento.

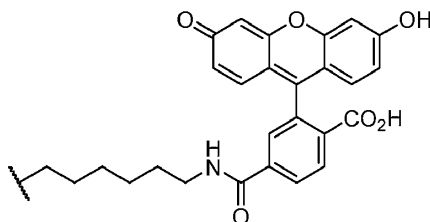
En algunas realizaciones, el fluoróforo tiene la estructura:



en la que L⁵ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

En algunas realizaciones, L⁵ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

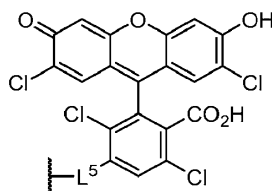
En algunas realizaciones, el fluoróforo tiene la estructura:



- 5 En algunas realizaciones, el fluoróforo se deriva de 6-carboxitetraclorofluoresceína. En algunas realizaciones, el fluoróforo comprende un resto de tetraclorofluoresceína (TET).

En algunas realizaciones, el fluoróforo está unido al oligonucleótido a través de L⁵. L⁵ es tal como se define en el presente documento.

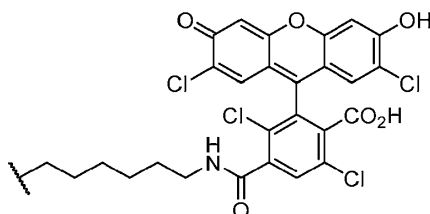
En algunas realizaciones, el fluoróforo tiene la estructura:



- 10 en la que L⁵ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

En algunas realizaciones, L⁵ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

- 15 En algunas realizaciones, el fluoróforo tiene la estructura:

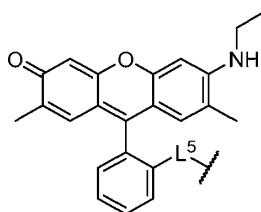


En algunas realizaciones, el fluoróforo es (se deriva de) un tinte de xanteno descrito en la patente estadounidense n.º 7.344.701.

- 20 En algunas realizaciones, el fluoróforo es (se deriva de) CAL Fluor[®] Gold 540 (LGC Biosearch Technologies). En algunas realizaciones, el fluoróforo comprende un resto de CAL Fluor[®] Gold 540 (LGC Biosearch Technologies).

En algunas realizaciones, el fluoróforo está unido al oligonucleótido a través de L⁵. L⁵ es tal como se define en el presente documento.

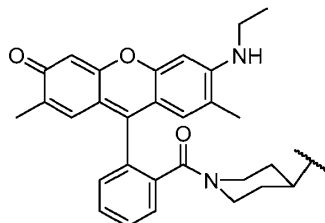
En algunas realizaciones, el fluoróforo tiene la estructura:



- 25 en la que L⁵ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

En algunas realizaciones, L^5 se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

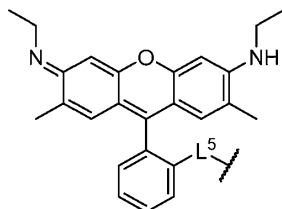
En algunas realizaciones, el fluoróforo tiene la estructura:



- 5 En algunas realizaciones, el fluoróforo es (se deriva de) CAL Fluor® Orange 560 (LGC Biosearch Technologies). En algunas realizaciones, el fluoróforo comprende un resto de CAL Fluor® Orange 560 (LGC Biosearch Technologies).

En algunas realizaciones, el fluoróforo está unido al oligonucleótido a través de L^5 . L^5 es tal como se define en el presente documento.

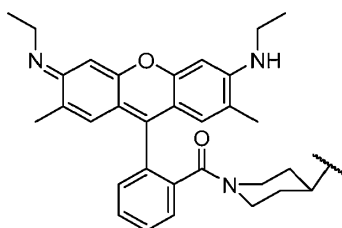
En algunas realizaciones, el fluoróforo tiene la estructura:



- 10 en la que L^5 se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

En algunas realizaciones, L^5 se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

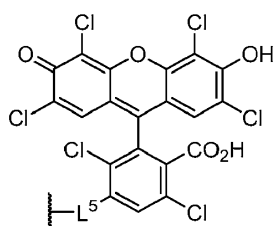
- 15 En algunas realizaciones, el fluoróforo tiene la estructura:



En algunas realizaciones, el fluoróforo se deriva de 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (HEX). En algunas realizaciones, el fluoróforo comprende un resto de 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (HEX).

- 20 En algunas realizaciones, el fluoróforo está unido al oligonucleótido a través de L^5 . L^5 es tal como se define en el presente documento.

En algunas realizaciones, el fluoróforo tiene la estructura:

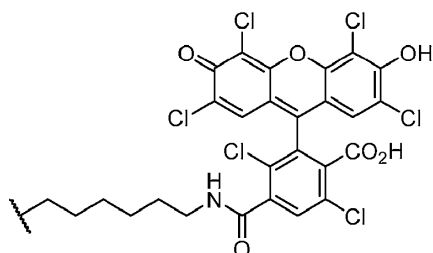


en la que L^5 se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

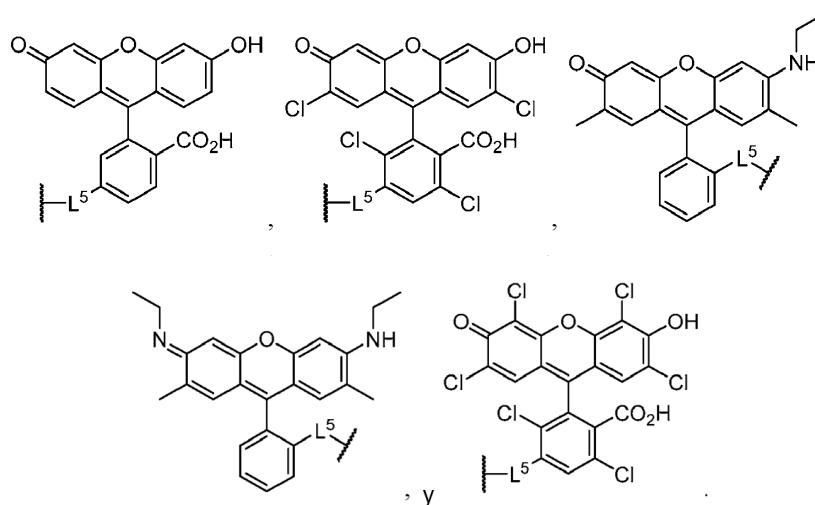
- 25 En algunas realizaciones, L^5 se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

no sustituido.

En algunas realizaciones, el fluoróforo tiene la estructura:

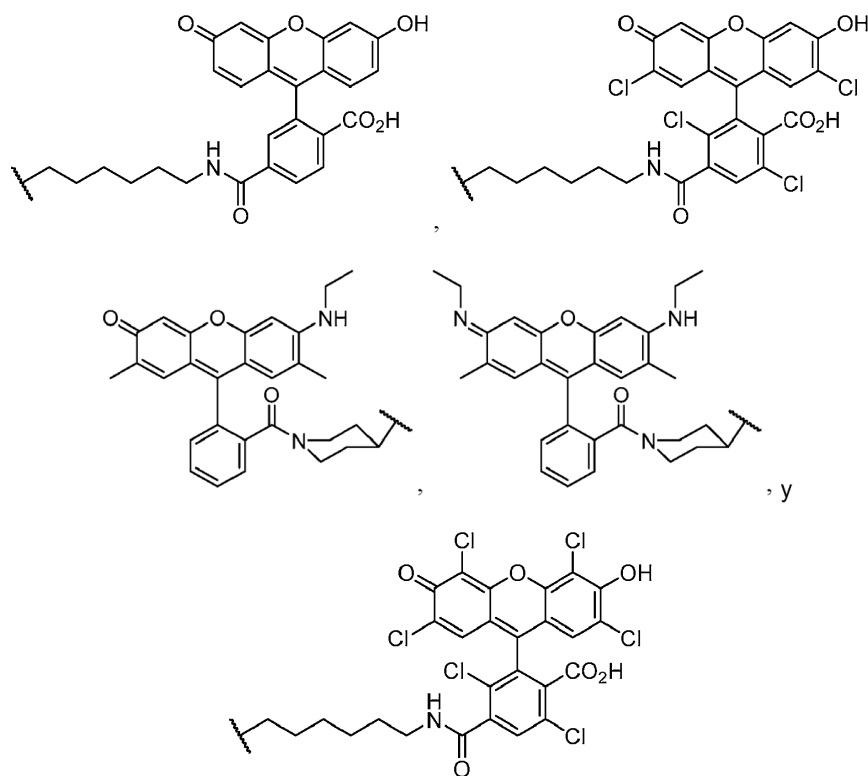


En algunas realizaciones, el fluoróforo tiene una estructura seleccionada de:



L^5 es tal como se define en el presente documento.

En algunas realizaciones, el fluoróforo tiene una estructura seleccionada de:

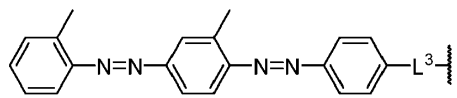


En algunas realizaciones, el fluoróforo está unido al extremo terminal 5' o 3' del oligonucleótido. En algunas realizaciones, el fluoróforo está unido al extremo terminal 5' del oligonucleótido. En algunas realizaciones, el fluoróforo está unido al fosfato en 5' del primer nucleótido N¹ o al fosfato en 3' del cuarto nucleótido N⁴. En algunas realizaciones, el fluoróforo está unido al fosfato en 5' del primer nucleótido N¹.

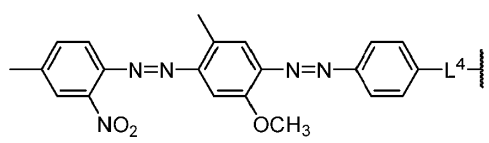
5 Combinaciones de extintor/fluoróforo a modo de ejemplo

Cualquiera de las combinaciones del primer extintor (Q¹), el segundo extintor, y el fluoróforo tal como se define en el presente documento están abarcados por esta divulgación y específicamente proporcionados por la invención.

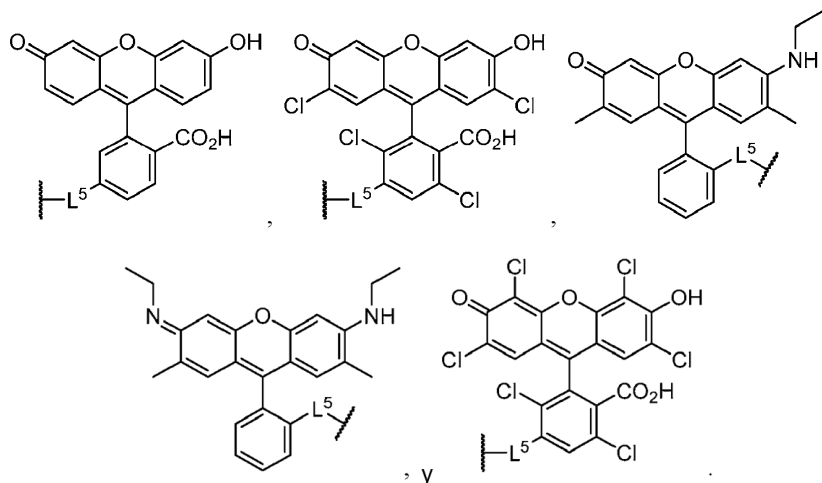
En algunas realizaciones, el primer extintor (Q¹) tiene la estructura:



10 el segundo extintor tiene la estructura:

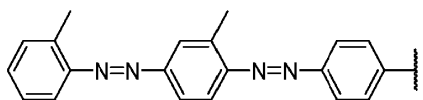


y el fluoróforo tiene una estructura seleccionada de:

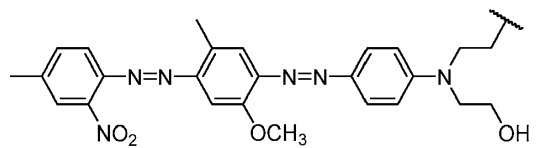


15 L³, L⁴ y L⁵ son tal como se definen en el presente documento.

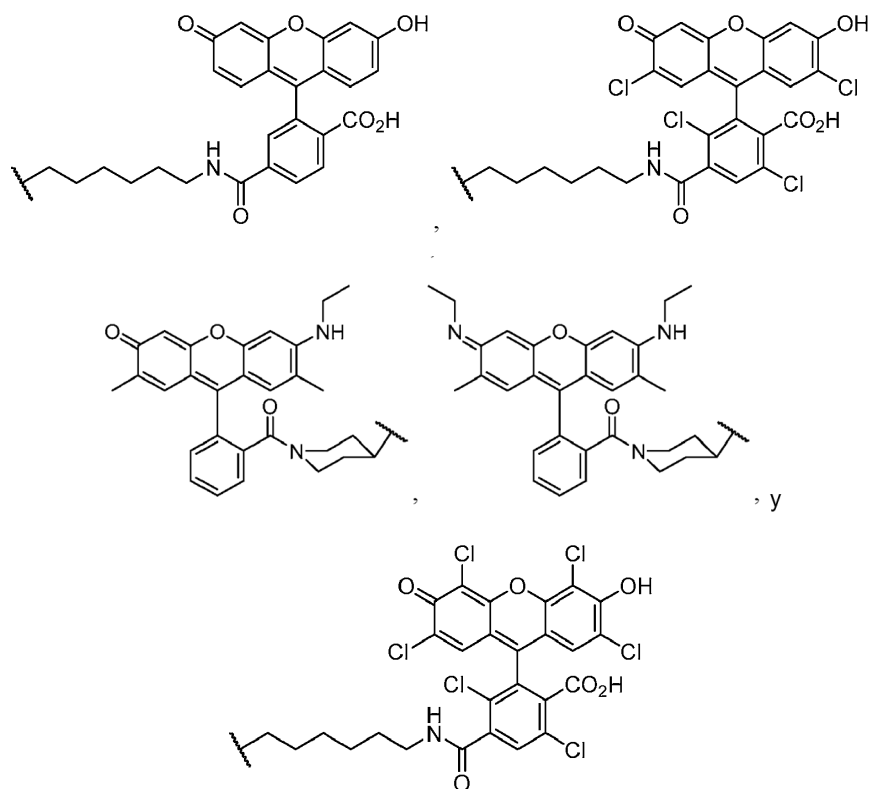
En algunas realizaciones, el primer extintor (Q¹) tiene la estructura:



el segundo extintor tiene la estructura:

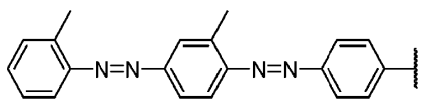


20 y el fluoróforo tiene una estructura seleccionada de:

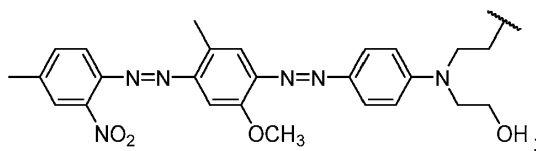


En algunas realizaciones, el primer extintor (Q¹) tiene la estructura:

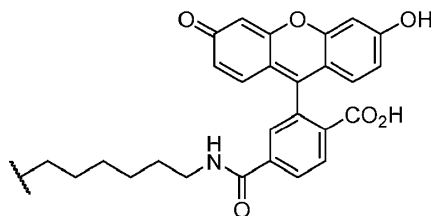
5



el segundo extintor tiene la estructura:



y el fluoróforo tiene la estructura:



10 Oligómeros

También se proporciona un oligómero de ácido nucleico, por ejemplo, una sonda. Los oligómeros a modo de ejemplo incluyen dos extintores (es decir, un primer y un segundo extintor) unidos covalentemente a ellos, cada uno opcionalmente a través de un ligador. Los oligómeros a modo de ejemplo incluyen dos extintores (es decir, un primer y un segundo extintor) y un fluoróforo unido covalentemente a ellos, cada uno opcionalmente a través de un ligador.

15 Los oligómeros a modo de ejemplo incluyen oligonucleótidos, oligonucleósidos, oligodesoxirribonucleótidos (que contienen 2'-desoxi-D-ribosa o formas modificadas de la misma), es decir, ADN, oligorribonucleótidos (que contienen D-ribosa o formas modificadas de la misma), es decir, ARN, y cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N-glicósido o C-glicósido de una nucleobase de purina o pirimidina, o una nucleobase de purina o pirimidina modificada. El oligómero, tal como se usa en el presente documento, también incluye compuestos en los que los

nucleomonómeros adyacentes están unidos a través de uniones amida, tal como se describió anteriormente (Nielsen *et al.*, Science (1991) 254:1497-1500). Los elementos encontrados normalmente en los oligómeros, tales como el anillo de furanosa y/o la unión fosfodiéster, pueden reemplazarse con cualquier elemento adecuado funcionalmente equivalente. Por tanto, el término "oligómero" pretende incluir cualquier estructura que sirva de andamiaje o soporte para las nucleobases, en la que el andamiaje permite la unión a los ácidos nucleicos diana de manera dependiente de la secuencia.

Los grupos a modo de ejemplo que unen los nucleomonómeros en un oligómero de la invención incluyen (i) fosfodiéster y modificaciones de fosfodiéster (fosforotioato, metilfosfonato, etc.), (ii) uniones sustitutivas que contienen un isómero no fosforado (formacetal, ribocetal, carbamato, etc.), (iii) residuos de morfolino, residuos carbocíclicos u otros azúcares de furanosa, tales como arabinosa, o una hexosa en lugar de ribosa o desoxirribosa y (iv) nucleomonómeros unidos mediante enlaces amida o nucleomonómeros acíclicos unidos mediante cualquier unión sustitutiva adecuada.

Los oligómeros de la invención pueden formarse usando nucleomonómeros modificados y convencionales y sintetizarse usando técnicas convencionales de síntesis de oligómeros en fase sólida (o en fase de disolución), que ya están disponibles comercialmente. En general, los oligómeros pueden sintetizarse mediante un método que comprende las etapas de: sintetizar un nucleomonómero o un sintón de oligómero que tenga un grupo protector y una nucleobase y un grupo de acoplamiento que pueda acoplarse a un nucleomonómero u oligómero; acoplar el nucleomonómero o el sintón de oligómero a un nucleomonómero aceptor o a un oligómero aceptor; retirar el grupo protector; y repetir el ciclo según sea necesario hasta que se sintetice el oligómero deseado.

Los oligómeros de la presente invención pueden ser de cualquier longitud, incluyendo los de más de 40, 50 o 100 nucleomonómeros. En diversas realizaciones, los oligómeros contienen 2-100 nucleomonómeros. Las longitudes mayores o iguales a aproximadamente de 10 a 40 nucleomonómeros son útiles para aplicaciones terapéuticas o de diagnóstico. Los oligómeros cortos que contienen 2, 3, 4 o 5 nucleomonómeros se incluyen específicamente en la presente invención y son útiles, por ejemplo, como sintones.

Los oligómeros que tienen una secuencia al azar y que contienen menos de 20, menos de 15 o menos de 10 nucleomonómeros son útiles para los cebadores, por ejemplo, en los protocolos de clonación o amplificación que usan cebadores de secuencia al azar, siempre que el oligómero contenga residuos que puedan servir como cebador para las polimerasas o transcriptasas inversas.

Los oligómeros pueden contener uniones fosfodiéster convencionales o pueden contener modificaciones de fosfodiéster como uniones fosforamidata. Estas uniones sustitutivas incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que un resto de la fórmula $-O-P(O)(S)-O-$ ("fosforotioato"), $-O-P(S)(S)-O-$ ("fosforoditioato"), $-O-P(O)-(NR_2)-X-$, $-O-P(O)(R^o)-O-P(S)(R^o)-O-$ ("tioalquilfosfonato"), $-P(O)(OR^p)-X-$, $-O-C(O)-X-$ o $-O-C(O)(NR^p_2)-X-$, en las que R^o es H (o una sal) o alquilo (C_1 - C_{12}) y R^p es alquilo (C_1 - C_9) y la unión se une a nucleomonómeros adyacentes a través de un $-O-$ o $-S-$ unido a un carbono del nucleomonómero. En diversas realizaciones, las uniones sustitutivas para su uso en los oligómeros de la presente invención incluyen uniones fosfodiéster, fosforotioato, metilfosfonato y tionometilfosfonato. Las uniones fosforotioato y metilfosfonato confieren una mayor estabilidad al oligómero en entornos fisiológicos. Aunque no es necesario que todas estas uniones en el mismo oligómero sean idénticas, los oligómeros de la invención particularmente preferidos contienen uniones fosforotioato uniformes o uniones metilfosfonato uniformes.

Los oligómeros o los segmentos de los mismos se sintetizan convencionalmente, y pueden prepararse usando un compuesto de la invención. Los métodos de síntesis conocidos en la técnica y descritos en el presente documento pueden usarse para sintetizar oligómeros que contengan compuestos de la invención, así como otras nucleobases conocidas en la técnica, usando nucleomonómeros adecuadamente protegidos. Los métodos para la síntesis de oligómeros se encuentran, por ejemplo, en Froehler, B., *et al.*, Nucleic Acids Res. (1986) 14:5399-5467; Nucleic Acids Res. (1988) 16:4831-4839; Nucleosides and Nucleotides (1987) 6:287-291; Froehler, B., Tetrahedron Lett. (1986) 27:5575-5578; Caruthers, M. H. en Oligodeoxynucleotides-Antisense Inhibitions of Gene Expression (1989), J. S. Cohen, editor, CRC Press, Boca Raton, págs. 7-24; Reese, C. B. *et al.*, Tetrahedron Lett. (1985) 26:2245-2248. También se ha descrito la síntesis de los oligómeros unidos con metilfosfonato mediante la química de la metilfosfonamidata (Agrawal, S. *et al.*, Tetrahedron Lett. (1987) 28:3539-3542; Klem, R. E., *et al.*, número de publicación internacional WO 92/07864).

Tal como se da a conocer en el presente documento, la invención proporciona "conjugados" de oligómeros. Por ejemplo, los oligómeros pueden estar unidos covalentemente a diversos componentes funcionales, tales como, por ejemplo, restos estabilizantes, fluoróforos, extintores, intercaladores y sustancias que interactúan específicamente con el surco menor de la doble hélice de ADN (agentes de unión al surco menor, "MGB"). Otros restos de conjugación elegidos pueden ser marcadores radiactivos, fluorescentes, enzimáticos o restos que facilitan la asociación celular usando ligadores de escisión y similares. Los marcadores radiactivos adecuados incluyen ^{32}P , ^{35}S , ^3H y ^{14}C ; y los marcadores fluorescentes adecuados incluyen fluoresceína, resorufina, rodamina, BODIPY (Molecular Probes) y rojo Texas; las enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano. Fluoróforos adicionales se exponen en el presente documento y son generalmente reconocidos en la técnica. Otras moléculas unidas covalentemente incluyen biotina, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y proteínas, por ejemplo,

transferrina y la proteína Tat del VIH.

Tal como se comenta en el presente documento y se reconoce en la técnica, los oligómeros pueden derivarse a través de cualquier unión conveniente. Por ejemplo, los agentes de unión al surco menor, los fluoróforos, los extintores y los intercaladores, tales como la acridina o el psoraleno, pueden unirse a los oligómeros de la invención a través de cualquier -OH o -SH disponible, por ejemplo, en la posición terminal 5' del oligómero, las posiciones 2' del ARN, o un OH, NH₂, COOH o SH incorporado en la posición 5 de las pirimidinas. Una forma derivatizada que contiene, por ejemplo, -CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂OH o -CH₂CH₂CH₂SH en la posición 5 es de uso en la presente invención. Los conjugados que incluyen polilisina o lisina pueden sintetizarse tal como se describe y pueden potenciar adicionalmente la afinidad de unión de un oligómero a su secuencia de ácido nucleico diana (Lemaitre, M. *et al.*, Proc Natl Acad Sci (1987) 84:648-652; Lemaitre, M. *et al.*, Nucleosides and Nucleotides (1987) 6:311-315).

Puede unirse una amplia variedad de sustituyentes, incluyendo aquellos unidos a través de uniones o uniones sustitutivas. Los restos de -OH en las uniones fosfodiéster de los oligómeros pueden reemplazarse por grupos fosfato, protegidos por grupos protectores convencionales, o grupos de acoplamiento para preparar uniones adicionales a otros nucleomonómeros, o pueden estar unidos al sustituyente conjugado. El OH terminal en 5' puede estar fosforilado; los sustituyentes 2'-OH u OH en el extremo terminal 3' también pueden estar fosforilados. Los hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales.

Los oligómeros de la invención pueden derivatizarse covalentemente a restos que faciliten la asociación celular usando ligadores escindibles. Los ligadores usados para tales conjugados pueden incluir uniones disulfuro que se reducen después de que el conjugado oligómero-agente de transporte haya entrado en una célula. Los ligadores que contienen disulfuro de este tipo tienen una semivida controlable. Tales ligadores son estables en condiciones extracelulares en relación con las condiciones intracelulares debido al potencial redox de la unión disulfuro.

Grupos funcionales reactivos

Los componentes de los compuestos de la invención (por ejemplo, ligadores, nucleósido, nucleótido, oligonucleótido, ácido nucleico, molécula portadora y soporte sólido) pueden unirse a través de sitios de unión formados por la reacción de un primer y un segundo grupo funcional reactivo. Los grupos funcionales reactivos son de reactividad complementaria, y reaccionan para formar un enlace covalente entre dos componentes de los compuestos, denominado en el presente documento sitio de unión. Por ejemplo, los compuestos según la fórmula (I) o (II) en los que R^x o R^s es un grupo funcional reactivo pueden reaccionar con un grupo funcional reactivo de reactividad complementaria en otro componente (tal como un ligador, nucleósido, nucleótido, oligonucleótido, ácido nucleico, molécula portadora y soporte sólido) para unir covalentemente los componentes a través del sitio de unión resultante. El grupo funcional reactivo de reactividad complementaria puede estar situado en cualquier posición del otro componente (ligador, nucleósido, etc.), por ejemplo, un alquilo o heteroalquilo un núcleo de arilo o heteroarilo o un sustituyente en un núcleo de arilo o heteroarilo. En diversas realizaciones, cuando el grupo reactivo está unido a una cadena de alquilo (o heteroalquilo), o de alquilo (o heteroalquilo) sustituido, el grupo reactivo está situado preferiblemente en una posición terminal de la cadena.

Los grupos reactivos y las clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente aquellos que se conocen bien en la técnica de la química de bioconjugados. Las clases de reacciones actualmente favorecidas disponibles con precursores reactivos de los oligómeros de la invención son las que avanzan en condiciones relativamente suaves. Estas incluyen, pero no se limitan a sustituciones nucleófilas (por ejemplo, reacciones de aminas y alcoholes con haluros de acilo, ésteres activos), sustituciones electrófilas (por ejemplo, reacciones de enamina) y adiciones a enlaces múltiples carbono-carbono y carbono-heteroátomo (por ejemplo, reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se comentan, por ejemplo, en March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY, 3ª ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney *et al.*, MODIFICATION OF PROTEINS; Advances in Chemistry Series, vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

A modo de ejemplo, los grupos funcionales reactivos de uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a olefinas, acetilenos, alcoholes, fenoles, éteres, óxidos, haluros, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, cianatos, isocianatos, tiocianatos, isotiocianatos, aminas, hidrazinas, hidrazonas, hidrazidas, diazo, diazonio, nitro, nitrilos, mercaptanos, sulfuros, disulfuros, sulfóxidos, sulfonas, ácidos sulfónicos, ácidos sulfínicos, acetales, cetales, anhídridos, sulfatos, ácidos sulfénicos isonitrilos, amidinas, imidas, imidatos, nitrones, hidroxilaminas, oximas, ácidos hidroxámicos ácidos tiohidroxámicos, alenos, ortoésteres, sulfitos, enaminas, inaminas, ureas, pseudoureas, semicarbazidas, carbodiimidas, carbamatos, iminas, azidas, compuestos azoicos, compuestos azoxi y compuestos nitrosos. Los grupos funcionales reactivos también incluyen los usados para preparar bioconjugados, por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidas y similares. Los métodos para preparar cada uno de estos grupos funcionales se conocen bien en la técnica y su aplicación o modificación para un propósito particular está dentro de la capacidad de un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sandler y Karo, eds. ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS, Academic Press, San Diego, 1989).

Las conversiones útiles de grupos funcionales reactivos incluyen, por ejemplo:

(a) grupos carboxilo que se convierten fácilmente en diversos derivados incluyendo, pero sin limitarse a, ésteres activos (por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo), haluros de ácido, imidazoles de acilo, ésteres de alquilo, alquenilo, alquinilo y aromáticos;

(b) grupos hidroxilo, que pueden convertirse en ésteres, éteres, haluros, aldehídos, etc.

5 (c) grupos haloalquilo, en los que el haluro puede desplazarse posteriormente con un grupo nucleófilo tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, un anión tiol, un carbanión o un ion alcóxido, dando como resultado de ese modo la unión covalente de un nuevo grupo en el lugar del átomo de halógeno;

(d) grupos dienofilo, que pueden participar en reacciones de Diels-Alder tales como, por ejemplo, grupos maleimido;

10 (e) grupos aldehído o cetona, de manera que la derivatización posterior sea posible mediante la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o mediante mecanismos tales como adición de Grignard o adición de alquil-litio;

(f) grupos haluro de sulfonilo para su posterior reacción con aminas, por ejemplo, para formar sulfonamidas;

(g) grupos tiol, que pueden, por ejemplo, convertirse en disulfuros o reaccionar con haluros de acilo;

(h) grupos amina o sulfhidrilo, que pueden estar, por ejemplo, acilados, alquilados u oxidados;

15 (i) alquenos, que pueden experimentar, por ejemplo, cicloadiciones, acilación, adición de Michael, etc;

(j) epóxidos, que pueden reaccionar, por ejemplo, con compuestos de hidroxilo y aminas; y

(k) fosforamiditas y otros grupos funcionales convencionales útiles en la síntesis de ácidos nucleicos.

20 Los grupos funcionales reactivos pueden elegirse de manera que no participen o interfieran con las reacciones necesarias para ensamblar el oligómero de la invención. Alternativamente, un grupo funcional reactivo puede protegerse de la participación en la reacción por la presencia de un grupo protector. Los expertos en la técnica saben cómo proteger un grupo funcional particular para que no interfiera con un conjunto de condiciones de reacción elegidas. Para ejemplos de grupos protectores útiles, véase, por ejemplo, Greene *et al.*, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

Resto de unión covalente

25 En algunos de los oligómeros de la invención se incluye un resto de grupo funcional reactivo que puede efectuar al menos un enlace covalente entre el oligómero y una secuencia diana. También pueden formarse múltiples enlaces covalentes proporcionando una multiplicidad de tales restos. El enlace covalente es preferiblemente a un residuo de nucleobase en la cadena diana, pero también puede realizarse con otras porciones de la diana, incluyendo el azúcar o el fosfodiéster. La naturaleza de la reacción del resto que afecta al agente reticulante determina la naturaleza de la
30 diana en el dúplex. Los restos reticulantes preferidos incluyen agentes acilantes y alquilantes y, en particular, aquellos posicionados en relación con la porción que confiere la especificidad de la secuencia para permitir la reacción con la ubicación de la diana en la cadena.

35 El resto reticulante puede colocarse convenientemente como un residuo análogo de pirimidina o purina en la secuencia del oligómero. La colocación puede ser en los extremos 5' y/o 3', en las porciones internas de la secuencia, o en combinaciones de lo anterior. Se prefiere la colocación en los extremos terminales para permitir una mayor flexibilidad. También pueden unirse restos análogos a las estructuras principales de los péptidos.

Los ejemplos de restos alquilantes que son útiles en la invención incluyen N⁴,N⁴-etanocitosina y N⁶,N⁶-etanoadenina.

40 Resulta evidente que la nucleobase no tiene por qué ser una purina o una pirimidina; de hecho, el resto al que se une la función reactiva no tiene por qué ser una nucleobase en absoluto y puede ser un azúcar, un ligador, un extintor, un resto estabilizante, un fluoróforo o alguna combinación de estos componentes de los oligómeros de la invención. Cualquier medio de unión del grupo reactivo es satisfactorio siempre que la colocación sea correcta.

Síntesis

45 Los compuestos de la invención (tales como soportes sólidos, monómeros (por ejemplo, fosforamiditas) y oligómeros de la invención o los segmentos de los mismos) se sintetizan generalmente de manera convencional. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.019.129; la patente estadounidense n.º 8.466.266; y la patente estadounidense n.º 7.879.986. Los métodos de síntesis conocidos en la técnica y descritos en el presente documento pueden usarse para sintetizar oligómeros que contengan compuestos de la invención, así como otras nucleobases conocidas en la técnica, usando nucleomonómeros adecuadamente protegidos. Los métodos para la síntesis de oligómeros se encuentran, por ejemplo, en Froehler, B., *et al.*, Nucleic Acids Res. (1986) 14:5399-5467;
50 Nucleic Acids Res. (1988) 16:4831-4839; Nucleosides and Nucleotides (1987) 6:287-291; Froehler, B., Tetrahedron Letters (1986) 27:5575-5578; Caruthers, M. H. en Oligodeoxynucleotides-Antisense Inhibitions of Gene Expression

(1989), J. S. Cohen, editor, CRC Press, Boca Raton, págs.. 7-24; Reese, C. B. *et al.*, Tetrahedron Letters (1985) 28:2245-2248. También se ha descrito la síntesis de los oligómeros unidos con metilfosfonato mediante la química de la metilfosfonamida (Agrawal, S. *et al.*, Tetrahedron Letters (1987) 28:3539-3542; Klem, R. E., *et al.*, número de publicación internacional WO 92/07864).

- 5 En una realización a modo de ejemplo, los nucleomonómeros se incorporan directamente a los oligómeros o a un fragmento conveniente de los mismos usando condiciones de síntesis y reactivos convencionales. Las uniones a modo de ejemplo realizadas por este método incluyen fosfodiéster, fosforotioato, fosforoamidado, metilfosfonato, fosforoditioato, carbonato, morfolino carbamato y sulfonato.

- 10 En diversas realizaciones, la síntesis implica la síntesis de sintones cortos (dímeros, trímeros, etc.) a partir de un precursor apropiado. Este enfoque es adecuado para la síntesis de uniones que incluyen N-metilhidroxilamina, dimetilhidrozo, sulfamato, carbamato, sulfonato, sulfonamida, formacetal tioformacetal y carbonato.

- Los oligómeros de la invención pueden sintetizarse mediante cualquier química adecuada, incluyendo métodos y condiciones de acoplamiento de amidita, triéster o fosfonato de hidrógeno. Los oligómeros se sintetizan preferiblemente a partir de sintones de partida apropiados que se protegen preferiblemente en la posición 5' con DMT, MMT, Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonilo), PACO (fenoxiacetilo), un silil éter tal como TBDMS (t-butilidifenilsililo) o TMS (trimetilsililo) y se activa en la posición 3' es un éster, un H-fosfonato, una amidita tal como β-cianoetilfosforamidita, un silil éter tal como TBDMS o TMS o t-butilidifenilo. Alternativamente, precursores apropiados de uridina o citidina tales como 5-yodo-2'-desoxiuridina, 5-yodo-2'-O-alquiluridina, 5-bromo-2'-desoxiuridina, 5-trifluorometanosulfonato-2'-desoxiuridina, 5-bromo-2'-O-alquiluridina bloqueadas o 5-yodo-2'-desoxicitidina, 5-bromo-2'-desoxicitidina, 5-trifluorometanosulfonato-2'-desoxicitidina, 5-yodo-2'-O-alquilitidina, 5-bromo-2'-O-alquilitidina bloqueadas y protegidas pueden incorporarse convenientemente a oligómeros cortos tales como el dímero, el trímero, el tetramero, el pentámero o sintones más largos que se derivatizan posteriormente para producir sintones adecuados y oligómeros más largos.

- 25 La síntesis a modo de ejemplo de oligómeros que contienen aproximadamente 4 o más residuos de nucleomonómero se logra usando sintones tales como monómeros, dímeros o trímeros que portan un grupo de acoplamiento adecuado para su uso con las químicas de amidita, H-fosfonato o triéster. El sintón puede usarse para unir los componentes del oligómero a través de una unión fosfodiéster o que contenga fósforo que no sea fosfodiéster (por ejemplo, fosforotioato, metilfosfonato, tionometilfosfonato, fosforamidado y similares).

- 30 La síntesis de uniones sustituidas que no contengan fósforo puede llevarse a cabo usando precursores apropiados conocidos en la técnica.

- Una vez sintetizado el ácido nucleico deseado, se separa preferiblemente del soporte sólido en el que se sintetizó y se trata, mediante métodos conocidos en la técnica, para retirar cualquier grupo protector presente (por ejemplo, 60 °C, 5 h, amoníaco concentrado). En aquellas realizaciones en las que un grupo sensible a las bases está unido a los ácidos nucleicos (por ejemplo, TAMRA), la desprotección usará preferiblemente condiciones más suaves (por ejemplo, butilamina: agua 1:3, 8 horas, 70 °C). La desprotección en estas condiciones se facilita con el uso de amiditas de desprotección rápida (por ejemplo, dC-acetilo, dG-dmf).

- Tras la separación del soporte y la desprotección, el ácido nucleico se purifica por cualquier método conocido en la técnica, incluyendo la cromatografía, la extracción y la purificación en gel. En una realización preferida, el ácido nucleico se purifica mediante HPLC. La concentración y pureza del ácido nucleico aislado se determina preferiblemente midiendo la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro.

Ensayos y sondas oligoméricas de la invención

- En diversas realizaciones, la presente invención proporciona un oligómero de uso en uno o más formatos de ensayo. En realizaciones seleccionadas, el oligómero participa en la generación de una señal detectable al asociarse o disociarse de su diana. Las sondas oligoméricas de la invención no están limitadas en su uso a ningún formato de ensayo particular. Por consiguiente, la siguiente descripción pretende ilustrar formatos de ensayo a modo de ejemplo en los que los oligómeros de la invención encuentran uso, y no pretende ser limitativa de los formatos de ensayo en los que los oligómeros son de uso.

Ensayos

- 50 La siguiente descripción es generalmente relevante para los ensayos descritos en el presente documento. Esta descripción pretende ilustrar la invención por referencia a determinadas realizaciones preferidas y no debe interpretarse como que limita el alcance de las sondas y los tipos de ensayo en los que los compuestos de la invención encuentran uso. Otros formatos de ensayo que usan los compuestos de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica.

- 55 En general, para determinar la concentración de una molécula diana, tal como, por ejemplo, un ácido nucleico de cantidad desconocida, es preferible obtener en primer lugar datos de referencia en los que se ponen en contacto cantidades constantes de sonda con patrones de ácido nucleico que abarcan un intervalo de cantidades conocidas.

La intensidad de la emisión de fluorescencia de cada una de las mezclas de referencia se usa para obtener un gráfico o curva de calibración, en la que la concentración desconocida se compara con la intensidad de los patrones conocidos. Por ejemplo, puede usarse una sonda que: a) se hibrida con una secuencia dentro del ácido nucleico diana; b) tiene modificaciones de fluoróforo y extintor en los extremos terminales 5' y 3' que son los sitios de marcaje; y c) tiene carácter fluorogénico que se extingue en una conformación no unida y luego libera la señal al unirse al ácido nucleico diana, para obtener tales datos de referencia. Una sonda de este tipo da una emisión de fluorescencia característica en la que la señal aumenta a medida que aumenta la concentración del ácido nucleico diana. Luego, se pone en contacto una muestra con una cantidad desconocida de diana con la sonda, y se determina la intensidad de fluorescencia de la mezcla. La intensidad de la emisión de fluorescencia se compara luego con los patrones de referencia para obtener la concentración de la diana en la mezcla de prueba.

Análisis múltiples

En otra realización, los soportes sólidos y los oligómeros de la invención se usan como una sonda o un componente de una o más sondas usadas en un ensayo múltiple para detectar una o más especies en una mezcla.

Las sondas basadas en los soportes sólidos u oligómeros de la invención son particularmente útiles para realizar análisis y ensayos de tipo múltiple. En un análisis múltiple típico, se detectan dos o más especies distintas (o regiones de una o más especies) usando dos o más sondas, en las que cada una de las sondas está marcada con un fluoróforo diferente. Las especies preferidas usadas en los análisis múltiples que dependen de la transferencia de energía donador-aceptor cumplen al menos dos criterios: la especie fluorescente es brillante y espectralmente bien resuelta; y la transferencia de energía entre la especie fluorescente y el extintor es eficiente.

Los soportes sólidos y los oligómeros de la invención permiten el diseño de ensayos múltiples en los que más de un indicador fluorescente se asocia con una o más estructuras de extintor. Varios ensayos múltiples diferentes que usan los soportes sólidos u oligómeros de la invención serán evidentes para un experto en la técnica. En un ensayo a modo de ejemplo, cada uno de al menos dos indicadores fluorescentes distintos se empareja con el mismo tipo de estructura de extintor en sus respectivos oligómeros, para modular la señal a través de o bien FRET o bien extinción de contacto. Alternativamente, puede practicarse un ensayo en el que al menos dos indicadores fluorescentes distintos se asocian con estructuras de extintor distintas, a las que las propiedades fluorescentes estén mejor "emparejadas". Los fluoróforos pueden estar unidos a la misma molécula que el extintor o a una molécula diferente. Además, al igual que el extintor y los fluoróforos, las moléculas portadoras de uso en un sistema de ensayo particular, tal como la secuencia de oligo que ancla covalentemente el fluoróforo y el extintor, pueden ser o bien iguales o bien diferentes.

Además de las mezclas descritas anteriormente, la presente invención también proporciona un método cualitativo para detectar la presencia de una especie molecular particular. El método incluye: (a) poner en contacto la especie con una mezcla que contiene un soporte sólido u oligómero de la invención; y (b) detectar un cambio en una propiedad fluorescente de uno o más componentes de la mezcla resultante, detectando de ese modo la presencia la especie molecular.

El uso simultáneo de dos o más sondas que usan la transferencia de energía donador-aceptor es conocido en la técnica. Por ejemplo, se han descrito ensayos múltiples que usan sondas de ácido nucleico con diferentes especificidades de secuencia. Las sondas fluorescentes se han usado para determinar si un individuo es silvestre homocigótico, mutante homocigótico o heterocigótico para una mutación particular. Por ejemplo, usando una baliza molecular de fluoresceína extinguida que reconoce la secuencia silvestre y otra baliza molecular de rodamina extinguida que reconoce un alelo mutante, es posible genotipar a los individuos para el receptor de β -quimiocina (Kostrikis *et al.* Science 279:1228-1229 (1998)). La presencia de sólo una señal de fluoresceína indica que el individuo es silvestre, y la presencia de señal de rodamina sólo indica que el individuo es un mutante homocigótico. La presencia de la señal de rodamina y fluoresceína es un diagnóstico de un heterocigoto. Tyagi *et al.* Nature Biotechnology 16: 49-53 (1998)) han descrito el uso simultáneo de cuatro balizas moleculares marcadas de manera diferente para la discriminación de alelos, y Lee *et al.*, BioTechniques 27: 342-349 (1999) han descrito la detección homogénea en siete colores de seis productos de PCR.

Los extintores de la presente invención pueden usarse en ensayos múltiples diseñados para detectar y/o cuantificar sustancialmente cualquier especie, incluyendo, por ejemplo, células enteras, virus, proteínas (por ejemplo, enzimas, anticuerpos, receptores), glicoproteínas, lipoproteínas, partículas subcelulares, organismos (por ejemplo, *Salmonella*), ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN y análogos de los mismos), polisacáridos, lipopolisacáridos, lípidos, ácidos grasos, polímeros no biológicos y pequeñas moléculas (por ejemplo, toxinas, fármacos, pesticidas, metabolitos, hormonas, alcaloides, esteroides).

Sondas de ácido nucleico

Los soportes sólidos y los oligómeros de la invención son sondas de ácidos nucleicos útiles y pueden usarse como componentes de agentes de detección en una variedad de estrategias de amplificación/cuantificación de ADN que incluyen, por ejemplo, el ensayo de 5'-nucleasas, la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA), la amplificación en círculo rodante (RCA), así

como para la detección directa de dianas en ensayos en fase de disolución o en fase sólida (por ejemplo, matriz). Además, los soportes sólidos y los oligómeros pueden usarse en sondas de prácticamente cualquier formato, incluyendo, por ejemplo, formatos seleccionados entre balizas moleculares, sondas Scorpion™, sondas Sunrise™, sondas asistidas por conformación, sondas Light Up, sondas Invader Detection y sondas TaqMan™. Véase, por ejemplo, Cardullo, R., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8790-8794 (1988); Dexter, D.L., J. Chem. Physics, 21:836-850 (1953); Hochstrasser, R.A., *et al.*, Biophysical Chemistry, 45:133-141 (1992); Selvin, P., Methods in Enzymology, 246:300-334 (1995); Steinberg, I., Ann. Rev. Biochem., 40:83-114 (1971); Stryer, L., Ann. Rev. Biochem., 47:819-846 (1978); Wang, G., *et al.*, Tetrahedron Letters, 31:6493-6496 (1990); Wang, Y., *et al.*, Anal. Chem., 67:1197-1203 (1995); Debouck, C., *et al.*, en suplemento a Nature Genetics, 21:48-50 (1999); Rehman, F.N., *et al.*, Nucleic Acids Research, 27:649-655 (1999); Cooper, J.P., *et al.*, Biochemistry, 29:9261-9268 (1990); Gibson, E.M., *et al.*, Genome Methods, 6:995-1001 (1996); Hochstrasser, R.A., *et al.*, Biophysical Chemistry, 45:133-141 (1992); Holland, P.M., *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci USA, 88:7276-7289 (1991); Lee, L.G., *et al.*, Nucleic Acids Rsch., 21:3761-3766 (1993); Livak, K.J., *et al.*, PCR Methods and Applications, Cold Spring Harbor Press (1995); Vamosi, G., *et al.*, Biophysical Journal, 71:972-994 (1996); Wittwer, C.T., *et al.*, Biotechniques, 22:176-181 (1997); Wittwer, C.T., *et al.*, Biotechniques, 22:130-38 (1997); Giesendorf, B.A.J., *et al.*, Clinical Chemistry, 44:482-486 (1998); Kostrikis, L.G., *et al.*, Science, 279:1228-1229 (1998); Matsuo, T., Biochemica et Biophysica Acta, 1379:178-184 (1998); Piatek, A.S., *et al.*, Nature Biotechnology, 16:359-363 (1998); Schofield, P., *et al.*, Appl. Environ. Microbiology, 63:1143-1147 (1997); Tyagi S., *et al.*, Nature Biotechnology, 16:49-53 (1998); Tyagi, S., *et al.*, Nature Biotechnology, 14:303-308 (1996); Nazarenko, I.A., *et al.*, Nucleic Acids Research, 25:2516-2521 (1997); Uehara, H., *et al.*, Biotechniques, 26:552-558 (1999); D. Whitcombe, *et al.*, Nature Biotechnology, 17:804-807 (1999); Lyamichev, V., *et al.*, Nature Biotechnology, 17:292 (1999); Daubendiek, *et al.*, Nature Biotechnology, 15:273-277 (1997); Lizardi, P.M., *et al.*, Nature Genetics, 19:225-232 (1998); Walker, G., *et al.*, Nucleic Acids Res., 20:1691-1696 (1992); Walker, G.T., *et al.*, Clinical Chemistry, 42:9-13 (1996); y Compton, J., Nature, 350:91-92 (1991).

En el presente documento se describe un método para detectar una secuencia diana de ácido nucleico. El método incluye: (a) poner en contacto la secuencia diana con un ácido nucleico detector (por ejemplo, un oligómero de la invención); (b) hibridar la secuencia de unión con la diana a la secuencia diana, alterando de ese modo la conformación del ácido nucleico detector, provocando un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (c) detectar el cambio en el parámetro de fluorescencia, detectando de ese modo la secuencia diana de ácido nucleico.

En los métodos descritos en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, un ácido nucleico detector preferido incluye una secuencia de unión a la diana monocatenaria. La secuencia de unión tiene unidos a la misma: i) un fluoróforo, ii) un primer extintor, y iii) un segundo extintor. La secuencia de unión tiene opcionalmente unida a la misma un resto estabilizante. Además, antes de su hibridación con una secuencia complementaria, el ácido nucleico detector se encuentra preferiblemente en una conformación que permite la transferencia de energía donador-aceptor entre el fluoróforo y el extintor cuando el fluoróforo se excita. Además, en cada uno de los métodos descritos en esta sección, se detecta un cambio en la fluorescencia como indicación de la presencia de la secuencia diana. El cambio de fluorescencia se detecta preferiblemente en tiempo real.

Las sondas de ácido nucleico actualmente preferidas no requieren que el ácido nucleico adopte una estructura secundaria para que la sonda funcione. En este método, y a menos que se indique lo contrario, los otros métodos descritos en esta sección, el ácido nucleico detector puede asumir sustancialmente cualquier estructura secundaria intramolecularmente asociada, pero esta estructura es preferiblemente un miembro seleccionado de horquillas, estructuras de tallo-bucle, pseudonudos, triples hélices y estructuras conformacionalmente asistidas. Además, la estructura secundaria intramolecularmente emparejada con bases comprende preferiblemente una porción de la secuencia de unión a la diana.

En el presente documento se describe un método para detectar la amplificación de una secuencia diana. El método implica el uso de una reacción de amplificación como la PCR. Una reacción de amplificación a modo de ejemplo incluye una o más de las siguientes etapas:

(a) hibridar un ácido nucleico de muestra que comprende la secuencia diana de interés con cebadores de PCR que flanquean la secuencia diana;

(b) extender los cebadores hibridados con una polimerasa para producir el producto de PCR, y separar las dos cadenas del producto de PCR para hacer accesibles las cadenas sentido y antisentido de la secuencia diana;

(c) hibridar un ácido nucleico detector con la cadena sentido o antisentido de la secuencia diana en el producto de PCR, en el que el ácido nucleico detector incluye:

i) una secuencia de unión a la diana monocatenaria que es complementaria a al menos una parte de la cadena sentido o antisentido de la secuencia diana en el producto de PCR, y que se hibrida con una región entre los cebadores de la PCR;

ii) un fluoróforo; y

iii) un primer extintor y un segundo extintor;

en el que, antes de su hibridación con la secuencia diana, el ácido nucleico detector se encuentra en una conformación que permite la transferencia de energía donador-aceptor entre el fluoróforo y el extintor cuando el fluoróforo está excitado;

5 alterando de ese modo la conformación del ácido nucleico detector (por ejemplo, linealizando cualquier estructura secundaria o conformaciones de hélices al azar que contribuyan a la eficiencia de extinción), provocando un cambio en un parámetro de fluorescencia (tal como la intensidad de la señal); y

(d) medir el cambio en el parámetro de fluorescencia para detectar la secuencia diana y su amplificación.

10 Opcionalmente, el cambio en el parámetro de fluorescencia puede hacerse permanente si la polimerasa encuentra el ácido nucleico detector hibridado durante la extensión del cebador (etapa (b) anterior) e hidroliza el oligómero que ancla el fluoróforo y el extintor, tal como por ejemplo a través de una actividad de nucleasa secundaria de la polimerasa.

15 En el presente documento se describe también un método para determinar si un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico se hibridan. En este método, el primer ácido nucleico es un oligómero (en disolución o unido a un soporte sólido) según la invención. El método incluye: (a) poner en contacto el primer ácido nucleico con el segundo ácido nucleico; (b) detectar una alteración en una propiedad fluorescente de un miembro seleccionado del primer ácido nucleico, el segundo ácido nucleico y una combinación de los mismos, determinando de ese modo si se produce la hibridación.

20 En el presente documento se describen sondas y métodos de uso para detectar el polimorfismo en secuencias diana de ácidos nucleicos. El polimorfismo se refiere a la aparición de dos o más secuencias o alelos alternativos determinados genéticamente en una población. Un marcador o sitio polimórfico es el locus en el que se produce la divergencia. Los marcadores preferidos tienen al menos dos alelos, cada uno de ellos con una frecuencia superior al 1%, y más preferiblemente superior al 10% o al 20% de una población seleccionada. Un locus polimórfico puede ser tan pequeño como un par de bases. Los marcadores polimórficos incluyen polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, número variable de repeticiones en tándem (VNTR), regiones hipervariables, minisatélites, repeticiones de dinucleótidos, repeticiones de trinucleótidos, repeticiones de tetranucleótidos, repeticiones de secuencias simples y elementos de inserción tales como Alu. La primera forma alélica identificada se designa arbitrariamente como la forma de referencia y las otras formas alélicas se designan como alelos alternativos o variantes. La forma alélica que se da con mayor frecuencia en una población seleccionada se denomina a veces forma silvestre. Los organismos diploides pueden ser homocigóticos o heterocigóticos para las formas alélicas. Un polimorfismo dialélico tiene dos formas. Un polimorfismo trialélico tiene tres formas.

30 Una sonda de la invención puede utilizarse para detectar un polimorfismo de un solo nucleótido. Un polimorfismo de un solo nucleótido se produce en un sitio polimórfico ocupado por un solo nucleótido, que es el sitio de variación entre las secuencias alélicas. El sitio suele ir precedido y seguido de secuencias muy conservadas del alelo (por ejemplo, secuencias que varían en menos de 1/100 o 1/1000 miembros de las poblaciones). Un polimorfismo de un solo nucleótido suele surgir debido a la sustitución de un nucleótido por otro en el sitio polimórfico. Una transición es el reemplazamiento de una purina por otra purina o de una pirimidina por otra pirimidina. Una transversión es el reemplazamiento de una purina por una pirimidina o viceversa. Los polimorfismos de un solo nucleótido también pueden surgir de la delección de un nucleótido o de la inserción de un nucleótido en relación con un alelo de referencia.

40 Puede usarse un oligómero de la invención que porta dos extintores y un fluoróforo o, alternativamente, uno o más de los ácidos nucleicos pueden estar marcados con miembros de un par de transferencia de energía (por ejemplo, un extintor o un fluoróforo). Cuando la sonda es un ácido nucleico marcado con extintores, la interacción entre el primer y el segundo ácido nucleico puede detectarse observando la interacción entre los extintores y el ácido nucleico o, más preferiblemente, la extinción por los extintores de la fluorescencia de un fluoróforo unido al segundo ácido nucleico.

Puede formarse un complejo de estado fundamental entre los extintores y un fluoróforo. Tanto los extintores como el fluoróforo pueden estar conjugados con el mismo oligómero de ácido nucleico.

50 Además de su utilidad general en sondas diseñadas para investigar la amplificación de ácidos nucleicos, el polimorfismo y la detección y cuantificación, los presentes soportes sólidos y oligómeros pueden usarse en prácticamente cualquier formato de sonda de ácidos nucleicos conocido actualmente o descubierto posteriormente. Por ejemplo, los soportes sólidos y los oligómeros de la invención pueden incorporarse a motivos de sonda, tales como las sondas Taqman™ (Held *et al.*, Genome Res. 6: 986-994 (1996), Holland *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280 (1991), Lee *et al.*, Nucleic Acids Res. 21: 3761-3766 (1993)), balizas moleculares (Tyagi *et al.*, Nature Biotechnology 14:303-308 (1996), Jayasena *et al.*, patente estadounidense n.º 5.989.823, expedida el 23 de noviembre de 1999) sondas Scorpion (Whitcomb *et al.*, Nature Biotechnology 17: 804-807 (1999)), sondas Sunrise (Nazarenko *et al.*, Nucleic Acids Res. 25: 2516-2521 (1997)), sondas asistidas conformacionalmente (Cook, R., publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2007/0059752, publicada el 15 de marzo de 2007), sondas Light Up basadas en ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (Kubista *et al.*, documento WO 97/45539, diciembre de

1997), tintes de ADN bicatenario específicos (Higuchi *et al.*, Bio/Technology 10: 413-417 (1992), Wittwer *et al.*, BioTechniques 22: 130-138 (1997)) y similares. Estos y otros motivos de sonda con los que pueden usarse los presentes extintores se revisan en NONISOTOPIC DNA PROBE TECHNIQUES, Academic Press, Inc. 1992.

- 5 Los oligómeros para su uso en las sondas de la invención pueden ser de cualquier tamaño adecuado, y están preferiblemente en el intervalo de desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 100 nucleótidos, más preferiblemente de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 80 nucleótidos y más preferiblemente todavía, de desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 40 nucleótidos. En las sondas con doble marcaje (fluoróforo-extintor), el resto de donador está preferiblemente separado del extintor en al menos aproximadamente 6, preferiblemente en al menos aproximadamente 8, preferiblemente en al menos aproximadamente 10 nucleótidos, y
- 10 más preferiblemente en al menos aproximadamente 15 nucleótidos. En diversas realizaciones, el resto de donador se une preferiblemente a los nucleótidos terminales o bien en 3' o bien en 5' de la sonda. También es preferible que el resto de extintor esté unido a los nucleótidos terminales o bien en 3' o bien en 5' de la sonda. Más preferiblemente, los restos de donador y aceptor están unidos a los nucleótidos terminales en 3' y en 5' o en 5' y en 3' de la sonda, respectivamente, aunque también es útil su colocación interna.
- 15 La secuencia y la longitud precisas de una sonda de ácido nucleico de la invención dependen en parte de la naturaleza del polinucleótido diana al que se une. El lugar de unión y la longitud pueden variarse para conseguir las propiedades de apareamiento y fusión adecuadas para una realización particular. En muchas referencias reconocidas en la técnica puede encontrarse una guía para realizar tales elecciones de diseño.
- 20 En algunas realizaciones, el nucleótido terminal en 3' de la sonda de ácido nucleico se bloquea o se hace incapaz de extensión por una polimerasa de ácido nucleico. Dicho bloqueo se lleva a cabo convenientemente mediante la unión de un resto de donador o aceptor a la posición terminal en 3' de la sonda de ácido nucleico, o bien directamente o bien mediante resto de ligador.
- 25 El ácido nucleico puede comprender ADN, ARN o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos. Tanto la sonda como el ácido nucleico diana pueden estar presentes como una sola cadena, dúplex, tríplex, etc. Además, el ácido nucleico puede modificarse en el resto de nucleobase, resto de azúcar o estructura principal de fosfato con otros grupos, tales como marcadores radiactivos, agentes de unión al surco menor, agentes intercalantes, hidrocarburos acetilínicamente insaturados, grupos fluoralkilo, restos de donador y/o aceptor y similares.
- 30 Los oligómeros de la invención son útiles como cebadores de secuencia discreta o como cebadores de secuencia al azar. Los cebadores de secuencia al azar tienen generalmente una longitud de aproximadamente 6 o 7 nucleomonomeros. Tales cebadores pueden usarse en diversos protocolos de amplificación de ácidos nucleicos (PCR, reacción en cadena de la ligasa, etc.) o en protocolos de clonación. Las sustituciones en el extremo 5' de la invención generalmente no interfieren con la capacidad del oligómero para funcionar como cebador. Los oligómeros de la invención que tienen modificaciones 2' en sitios distintos del residuo terminal en 3', otras modificaciones que
- 35 hacen que el oligómero sea incompetente para la ARNasa H o que sea estable para las nucleasas, pueden usarse ventajosamente como sondas o cebadores para secuencias de ARN o ADN en extractos celulares u otras disoluciones que contengan nucleasas. Por tanto, los oligómeros pueden usarse en protocolos para amplificar el ácido nucleico en una muestra mezclando el oligómero con una muestra que contenga ácido nucleico diana, seguido de la hibridación del oligómero con el ácido nucleico diana y la amplificación del ácido nucleico diana por PCR, LCR u otros métodos adecuados.
- 40 Los oligómeros derivatizados con agentes quelantes tales como EDTA, DTPA o análogos del ácido 1,2-diaminociclohexanoacético pueden usarse en diversos ensayos de diagnóstico *in vitro* tal como se describe (patentes estadounidenses n.ºs 4.772.548, 4.707.440 y 4.707.352). Alternativamente, los oligómeros de la invención pueden derivarse con agentes reticulantes tales como 5-(3-yodoacetamidoprop-1-il)-2'-desoxiuridina o 5-(3-(4-bromobutiramido)prop-1-il)-2'-desoxiuridina y usarse en diversos métodos de ensayo o kits tal como se describe (publicación internacional n.º WO 90/14353).
- 45 Además de los usos anteriores, la capacidad de los oligómeros para inhibir la expresión génica puede verificarse en sistemas *in vitro* midiendo los niveles de expresión en las células del sujeto o en sistemas recombinantes, mediante cualquier método adecuado (Graessmann, M., *et al.*, Nucleic Acids Res. (1991) 19:53-59).
- 50 Las condiciones que favorecen la hibridación entre el oligómero de la presente invención y las moléculas de ácido nucleico diana pueden determinarse empíricamente por los expertos en la técnica, y pueden incluir las temperaturas de incubación óptimas, las concentraciones de sal, la longitud y las composiciones de nucleobase de las sondas de análogos de oligonucleótidos, y las concentraciones de oligómero y moléculas de ácido nucleico de la muestra. Preferiblemente, la hibridación se realiza en presencia de al menos magnesio uno milimolar y a un pH que está por encima de 6,0. En algunas realizaciones, puede ser necesario o deseable tratar una muestra para que las moléculas de ácido nucleico de la muestra sean monocatenarias antes de la hibridación. Los ejemplos de tales tratamientos incluyen, pero no se limitan a, el tratamiento con base (preferiblemente seguido de neutralización), la incubación a alta temperatura, o el tratamiento con nucleasas.
- 55

Además, debido a que la dependencia de la sal de la hibridación a los ácidos nucleicos está determinada en gran medida por la densidad de carga de la estructura principal de un análogo de oligonucleótido hibridante, la incorporación de análogos de nucleótidos no convencionales en el oligómero de la presente invención puede aumentar o disminuir la dependencia de la sal de la hibridación. Esta modulación puede usarse con ventaja en los métodos de la presente invención, donde en algunos aspectos puede ser deseable poder aumentar la rigurosidad de la hibridación cambiando las condiciones de sal, por ejemplo, o liberar un ácido nucleico hibridado reduciendo la concentración de sal. En aún otros aspectos de la presente invención, puede ser deseable tener una unión de alta afinidad de un análogo de oligonucleótido de la presente invención a un ácido nucleico en muy poca sal. En este caso, resulta ventajosa la colocación de monómeros de nucleótidos con restos de estructura principal no cargados en un oligonucleótido de la presente invención.

El alto grado de especificidad de los oligómeros de la presente invención en la unión a las moléculas de ácido nucleico diana permite al profesional seleccionar las condiciones de hibridación que pueden favorecer la discriminación entre las secuencias de ácido nucleico que comprenden un tramo de secuencia que es completamente complementario a al menos una parte de uno o más oligómeros y las moléculas de ácido nucleico diana que comprenden un tramo de secuencia que comprende un pequeño número de nucleobases no complementarias dentro de una secuencia sustancialmente complementaria. Por ejemplo, pueden seleccionarse temperaturas de hibridación o de lavado que permitan híbridos estables entre el oligómero de la presente invención y las moléculas de ácido nucleico diana que son completamente complementarias a lo largo de un tramo de secuencia, pero que promuevan la disociación de los híbridos entre el oligómero de la presente invención y las moléculas de ácido nucleico diana que no son completamente complementarias, incluyendo aquellas que comprenden uno o dos apareamientos erróneos de nucleobase a lo largo de un tramo de secuencia complementaria. La selección de una temperatura para la hibridación y los lavados puede depender, al menos en parte, de otras condiciones, tales como la concentración de sal, la concentración de oligómero y las moléculas de ácido nucleico diana, las proporciones relativas de oligómero con respecto a moléculas de ácido nucleico diana, la longitud de los oligómeros que van a hibridarse, la composición de nucleobase del oligómero y de las moléculas de ácido nucleico diana, la composición de monómero de las moléculas de análogos de oligonucleótidos, etc. Además, cuando se seleccionan las condiciones que favorecen los híbridos estables de moléculas completamente complementarias y desfavorecen los híbridos estables entre el oligómero y las moléculas de ácido nucleico diana que están apareadas erróneamente por una o más nucleobases, pueden tenerse en cuenta condiciones adicionales y, cuando sea deseable, alterarlas, incluyendo, pero sin limitarse a, la longitud del análogo de oligonucleótido que va a hibridarse, la longitud del tramo de secuencia de complementariedad entre el oligómero y las moléculas de ácido nucleico diana, el número de nucleobases no complementarias dentro de un tramo de secuencia de complementariedad, la identidad de las nucleobases con apareamiento erróneo, la identidad de las nucleobases en las proximidades de las nucleobases con apareamiento erróneo y la posición relativa de cualquier nucleobase con apareamiento erróneo a lo largo de un tramo de complementariedad. Los expertos en la técnica de la hibridación de ácidos nucleicos pueden determinar las condiciones favorables de hibridación y lavado al usar el oligómero de la presente invención para la hibridación con moléculas de ácido nucleico diana, dependiendo de la aplicación particular. "Condiciones favorables" pueden ser aquellas que favorecen los híbridos estables entre el oligómero y las moléculas de ácido nucleico diana que son, al menos en parte, sustancialmente complementarias, incluyendo aquellas que comprenden uno o más apareamientos erróneos.

"Condiciones favorables" pueden ser aquellas que favorecen los híbridos estables entre el oligómero y las moléculas de ácido nucleico diana que son, al menos en parte, completamente complementarias y desfavorecen o desestabilizan los híbridos entre moléculas que no son completamente complementarias.

Usando métodos tales como los dados a conocer en el presente documento, puede determinarse la temperatura de fusión del oligómero de la presente invención hibridado con moléculas de ácido nucleico diana de diferentes secuencias y puede usarse para determinar las condiciones favorables para una aplicación dada. También es posible determinar empíricamente las condiciones favorables de hibridación mediante, por ejemplo, la hibridación de moléculas de ácido nucleico diana con el oligómero unido a un soporte sólido y la detección de los complejos hibridados.

Las moléculas de ácido nucleico diana que están unidas a los soportes sólidos o a las sondas oligoméricas de la presente invención pueden separarse cómoda y eficazmente de las moléculas de ácido nucleico no unidas de la población en investigación mediante la unión directa o indirecta de las sondas de oligómero a un soporte sólido. Un soporte sólido puede lavarse a alta rigurosidad para retirar las moléculas de ácido nucleico que no están unidas a las sondas de oligómero. Sin embargo, la unión de las sondas de oligómero a un soporte sólido no es un requisito de la presente invención. Por ejemplo, en algunas aplicaciones las moléculas de ácido nucleico unidas y no unidas pueden separarse por centrifugación a través de una matriz o por separación de fases o algunas por otras formas de separación (por ejemplo, precipitación diferencial) que pueden ser opcionalmente ayudadas por grupos químicos incorporados a las sondas de oligómero (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.060.242 expedida el 9 de mayo de 2000, de Nie *et al.*).

Sondas de captura de ácido nucleico

En una realización, se usa como sonda de captura un ácido nucleico inmovilizado que comprende un primer extintor

y un segundo extintor. El ácido nucleico inmovilizado comprende además, opcionalmente, un resto estabilizante. La sonda de ácido nucleico puede unirse directamente a un soporte sólido, por ejemplo, mediante la unión del nucleótido terminal en 3' o en 5' de la sonda al soporte sólido. Sin embargo, más preferiblemente, la sonda está unida al soporte sólido mediante un ligador (citado anteriormente). El ligador sirve para distanciar la sonda del soporte sólido. El ligador es lo más preferiblemente de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 30 átomos de longitud, más preferiblemente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 átomos de longitud.

En diversas realizaciones, el soporte sólido se usa también como soporte de síntesis en la preparación del oligómero (sonda). La longitud y la estabilidad química del ligador entre el soporte sólido y la primera unidad en 3' del ácido nucleico desempeñan un papel importante en la síntesis e hibridación eficientes de los ácidos nucleicos unidos al soporte. Es preferible que el brazo del ligador sea lo suficientemente largo para que pueda conseguirse un alto rendimiento (> 97%) durante la síntesis automatizada. La longitud requerida del ligador dependerá del soporte sólido particular usado. Por ejemplo, un ligador de seis átomos es generalmente suficiente para lograr un rendimiento > 97% durante la síntesis automatizada de ácidos nucleicos cuando se usa poliestireno de alta reticulación como soporte sólido. El brazo del ligador es preferiblemente de al menos 20 átomos de longitud para lograr un alto rendimiento (> 97%) durante la síntesis automatizada cuando se usa CPG como soporte sólido.

La hibridación de una sonda inmovilizada en un soporte sólido requiere generalmente que la sonda esté separada del soporte sólido por al menos 30 átomos, más preferiblemente por al menos 50 átomos. Para lograr esta separación, el ligador generalmente incluye un espaciador colocado entre el ligador y el extremo terminal 3'. Para la síntesis de ácidos nucleicos, el brazo del ligador está unido normalmente al 3'-OH del extremo terminal 3' mediante una unión éster que puede escindirse con reactivos básicos para liberar el ácido nucleico del soporte sólido.

Se conoce una amplia variedad de ligadores en la técnica, que pueden usarse para unir la sonda de ácido nucleico al soporte sólido. El ligador puede estar formado por cualquier compuesto que no interfiera significativamente en la hibridación de la secuencia diana con la sonda unida al soporte sólido. El ligador puede estar formado, por ejemplo, por un ácido nucleico homopolimérico, que puede añadirse fácilmente al ligador mediante síntesis automatizada. Alternativamente, pueden usarse como ligador polímeros tales como polietilenglicol funcionalizado. Tales polímeros se prefieren actualmente a los ácidos nucleicos homopoliméricos porque no interfieren significativamente con la hibridación de la sonda con el ácido nucleico diana. El polietilenglicol es particularmente preferido porque está disponible comercialmente, es soluble tanto en medios orgánicos como acuosos, es fácil de funcionalizar y es completamente estable en condiciones de síntesis y tras la síntesis de ácidos nucleicos.

Los sitios de unión entre el soporte sólido, el ligador y la sonda no se escinden preferiblemente durante la síntesis o la retirada de grupos protectores de nucleobases en condiciones básicas a alta temperatura. Sin embargo, estas uniones pueden seleccionarse de grupos que sean escindibles en una variedad de condiciones. Los ejemplos de uniones preferidas actualmente incluyen uniones carbamato, éster y amida.

Detección de ácidos nucleicos en muestras

Los soportes sólidos y los oligómeros de la presente invención pueden usarse para la detección de ácidos nucleicos. Tales métodos de detección incluyen: proporcionar una muestra, poner en contacto al menos un análogo de oligonucleótido de la presente invención con la muestra en condiciones que permitan la hibridación del oligómero con las moléculas de ácido nucleico, y detectar una o más moléculas de ácido nucleico de la muestra que se hayan hibridado con uno o más oligómeros de la presente invención.

Una muestra puede proceder de cualquier fuente, y puede ser una muestra biológica, tal como una muestra de un organismo o de un grupo de organismos de la misma o de diferentes especies. Una muestra biológica puede ser una muestra de líquido corporal, por ejemplo, una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de linfa, una muestra de médula ósea, un líquido de ascitis, un líquido pleural, un líquido de lavado pélvico, un líquido ocular, orina, semen, esputo o saliva. Una muestra biológica también puede ser un extracto de hisopos cutáneos, nasales, de garganta o genitales, o extractos de material fecal. Las muestras biológicas también pueden ser muestras de órganos o tejidos, incluyendo tumores. Las muestras biológicas también pueden ser muestras de cultivos celulares, incluyendo tanto líneas celulares como cultivos primarios de células procariotas y eucariotas.

Una muestra puede proceder del medio ambiente, por ejemplo, de una masa de agua o del suelo, o de una fuente de alimentos, bebidas o agua, una fuente industrial, un área de trabajo, un área pública o un área de vivienda. Una muestra puede ser un extracto, por ejemplo, un extracto líquido de una muestra de suelo o de alimentos. Una muestra puede ser una disolución elaborada a partir del lavado o remojo, o la suspensión de un hisopo, de artículos tales como herramientas, artículos de ropa, artefactos u otros materiales.

Una muestra puede ser una muestra sin procesar o procesada; el procesamiento puede incluir etapas que aumenten la pureza, la concentración o la accesibilidad de los componentes de la muestra para facilitar el análisis de la muestra. Como ejemplos no limitativos, el procesamiento puede incluir etapas que reducen el volumen de una muestra, retiran o separan componentes de una muestra, solubilizan una muestra o uno o más componentes de la muestra, o alteran, modifican, exponen, liberan o aíslan componentes de una muestra. Ejemplos no limitativos de

tales procedimientos son centrifugación, precipitación, filtración, homogeneización, lisis celular, unión de anticuerpos, separación celular, etc. Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas de la presente invención, la muestra es una muestra de sangre que se procesa, al menos parcialmente, por ejemplo, mediante la retirada de glóbulos rojos, por concentración, por selección de uno o más tipos de células o virus (por ejemplo, glóbulos blancos o células patógenas), o por lisis de células, etc.

Las muestras a modo de ejemplo incluyen una disolución de moléculas de ácido nucleico al menos parcialmente purificadas. Las moléculas de ácido nucleico pueden ser de una sola fuente o de múltiples fuentes, y pueden comprender ADN, ARN o ambos. Por ejemplo, una disolución de moléculas de ácido nucleico puede ser una muestra que se sometió a cualquiera de las etapas de lisis celular, concentración, extracción, precipitación, selección de ácido nucleico (tal como, por ejemplo, selección de ARN de poli A o selección de secuencias de ADN que comprenden elementos Alu), o tratamiento con una o más enzimas. La muestra también puede ser una disolución que comprende moléculas de ácido nucleico sintético.

Un oligómero o soporte sólido de la presente invención puede ser cualquier formato de oligómero dado a conocer en el presente documento, o cualquier oligómero que comprenda un monómero, un dímero o un componente que no sea de ácido nucleico (por ejemplo, un ligador, un fluoróforo, un extintor, un resto estabilizante) dado a conocer en el presente documento. Un análogo de oligonucleótido usado en los métodos de la presente invención puede ser de cualquier longitud y de cualquier composición de nucleobase, y puede comprender uno o más restos de ácido nucleico, péptidos, proteínas, lípidos, hidratos de carbono, esteroides y otros restos bioquímicos y químicos. Un análogo de oligonucleótido de la presente invención puede proporcionarse en disolución o unido a un soporte sólido. En algunas realizaciones preferidas de la presente invención, el oligómero comprende análogos de nucleótidos no convencionales.

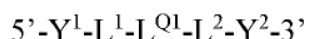
Los métodos de detección de ácidos nucleicos unidos se conocen bien en la técnica, y pueden incluir el uso de un marcador detectable que se une o se incorpora a las moléculas de ácido nucleico de la población en investigación o que se une o se incorpora a una molécula de ácido nucleico diana hibridada o a un complejo de moléculas de ácido nucleico diana hibridadas. Los marcadores detectables para las moléculas de ácido nucleico se conocen bien en la técnica, y comprenden moléculas fluorescentes tales como fluoróforos (incluyendo los que se exponen en el presente documento), radioisótopos, grupos químicos con masa alterada, miembros de unión específicos tales como biotina que pueden ser detectados por moléculas generadoras de señales, y similares. Los marcadores detectables también pueden incorporarse o unirse al oligómero de la presente invención, por ejemplo, en los casos en los que se usa la hibridación en sándwich usando un oligómero de señalización para la detección, o la detección se realiza usando un miembro de unión específico tal como un anticuerpo que reconoce los complejos oligómero/molécula de ácido nucleico diana. Los soportes sólidos pueden explorarse, exponerse a una película, inspeccionarse visualmente, etc. para determinar la presencia de un marcador detectable y determinar de ese modo la unión de una molécula de ácido nucleico diana a un oligómero inmovilizada en un soporte sólido tales como los de la invención.

Kits

En el presente documento se describe la formulación de kits que facilitan la práctica de síntesis usando los compuestos de la invención (tales como soportes sólidos de la invención o monómeros de la invención) y ensayos usando oligómeros de la invención, tal como se describió anteriormente. Los kits comprenden normalmente un compuesto de la invención (tal como un soporte sólido de la invención o un oligómero de la invención), o bien presente como una especie químicamente reactiva útil para preparar conjugados, o bien presente como un oligómero completado en el que el oligómero es un miembro del par de unión específico. El kit puede comprender opcionalmente uno o más agentes de tamponamiento, normalmente presentes como una disolución acuosa. Los kits pueden comprender opcionalmente reactivos de detección adicionales, un medio de purificación para purificar la sustancia marcada resultante, patrones de luminiscencia, enzimas, inhibidores de enzimas, disolvente orgánico o instrucciones para llevar a cabo un ensayo de la invención. Otros formatos de kits serán evidentes para los expertos en la técnica.

A modo de resumen, la presente divulgación proporciona:

Una sonda de ácido nucleico que comprende un oligonucleótido que tiene la estructura:



Y^1 comprende una secuencia de dos o más nucleótidos de ADN o ARN. Y^2 comprende una secuencia de dos o más nucleótidos de ADN o ARN. Uno de Y^1 e Y^2 tiene un fluoróforo unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a su secuencia de nucleótidos, y el otro de Y^1 e Y^2 tiene un segundo extintor unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a su secuencia de nucleótidos. L^1 y L^2 se seleccionan independientemente de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no

sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido. L^{Q^1} es . Q^1 es un primer extintor que tiene una

estructura seleccionada de $R^c-N=N-R^b-N=N-R^a-L^3$ y $R^b-N=N-R^a-L^3$. R^a , R^b , y R^c se seleccionan independientemente de arilo sustituido o no sustituido. L^3 se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

- 5 Una sonda de ácido nucleico según el párrafo anterior, en la que la secuencia de nucleótidos de Y^1 incluye: un primer nucleótido N^1 que tiene un fosfato en 5' unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo o al segundo extintor, y un segundo nucleótido N^2 que tiene un fosfato en 3' unido covalentemente a L^1 ; y la secuencia de nucleótidos de Y^2 incluye: un tercer nucleótido N^3 que tiene un fosfato en 5' unido covalentemente a L^2 , y un cuarto nucleótido N^4 que tiene un fosfato en 3' unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al segundo extintor o al fluoróforo; en el que cuando el fosfato en 5' del primer nucleótido N^1 está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo, el fosfato en 3' del cuarto nucleótido N^4 está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al segundo extintor; y cuando el fosfato en 5' del primer nucleótido N^1 está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al segundo extintor, el fosfato en 3' del cuarto nucleótido N^4 está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo.

- 15 Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, que comprende además uno o más nucleótidos de ADN o ARN unidos al ligador que conecta el fosfato en 5' del primer nucleótido N^1 al fluoróforo o segundo extintor.

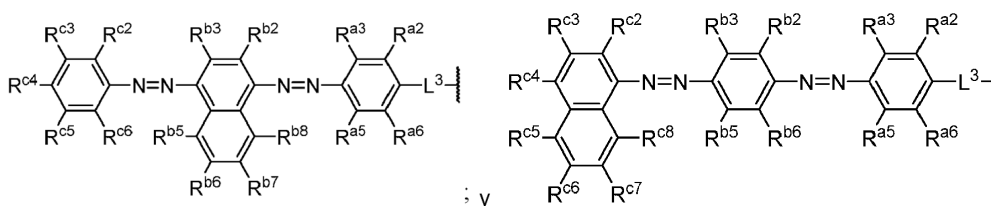
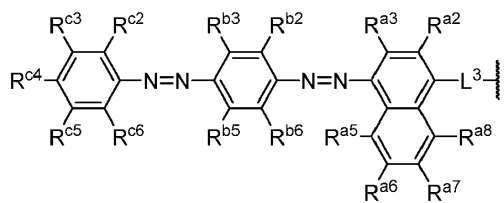
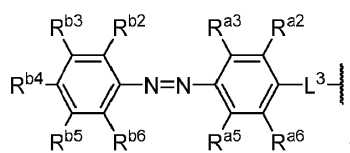
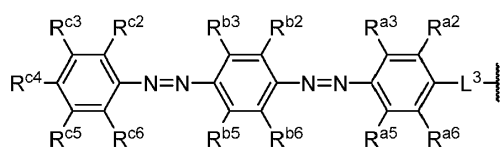
Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, que comprende además uno o más nucleótidos de ADN o ARN unidos al ligador que conecta el fosfato en 3' del cuarto nucleótido N^4 al segundo extintor o fluoróforo.

- 20 Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el fosfato en 5' del primer nucleótido N^1 está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo; y el fosfato en 3' del cuarto nucleótido N^4 está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al segundo extintor.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que Y^1 es una secuencia de 8, 9, 10 u 11 nucleótidos.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que Q^1 tiene una estructura seleccionada de:

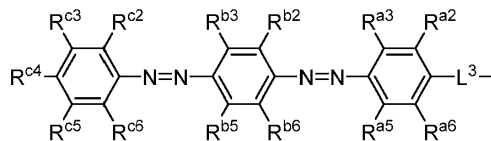
25



- 30 en las que R^{a2} , R^{a3} , R^{a5} , R^{a6} , R^{a7} , R^{a8} , R^{b2} , R^{b3} , R^{b4} , R^{b5} , R^{b6} , R^{b7} , R^{b8} , R^{c2} , R^{c3} , R^{c4} , R^{c5} , R^{c6} , R^{c7} y R^{c8} se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, alcóxilo sustituido o no sustituido y nitro.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que R^{a2} , R^{a3} , R^{a5} , R^{a6} , R^{a7} , R^{a8} , R^{b2} , R^{b3} , R^{b4} , R^{b5} , R^{b6} , R^{b7} , R^{b8} , R^{c2} , R^{c3} , R^{c4} , R^{c5} , R^{c6} , R^{c7} y R^{c8} se seleccionan independientemente de H, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo y nitro.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que Q¹ tiene la estructura:



en la que R^{a2}, R^{a3}, R^{a5} y R^{a6} son H; al menos uno de R^{b2}, R^{b3}, R^{b5} y R^{b6} es independientemente metilo o etilo o n-propilo o isopropilo o n-butilo o isobutilo o *sec*-butilo o *terc*-butilo, y el resto de R^{b2}, R^{b3}, R^{b5} y R^{b6} son H; y al menos uno de R^{c2}, R^{c3}, R^{c4}, R^{c5} y R^{c6} es independientemente metilo o etilo o n-propilo o isopropilo o n-butilo o isobutilo o *sec*-butilo o *terc*-butilo, y el resto de R^{c2}, R^{c3}, R^{c4}, R^{c5} y R^{c6} son H.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el oligonucleótido comprende desde 15 hasta 45 nucleótidos.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el oligonucleótido comprende desde 20 hasta 30 nucleótidos.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el oligonucleótido tiene desde 15 hasta 45 nucleótidos.

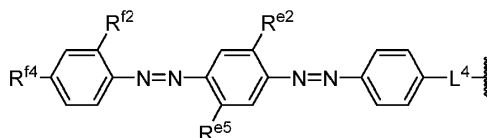
Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el oligonucleótido tiene desde 20 hasta 30 nucleótidos.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que L¹ y L² son cada uno alquilo C₁-C₇ no sustituido.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que L¹ y L² son cada uno alquilo C₁-C₃ no sustituido; y L¹ y L² son iguales.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que L¹ y L² son cada uno etilo.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el segundo extintor tiene la estructura:



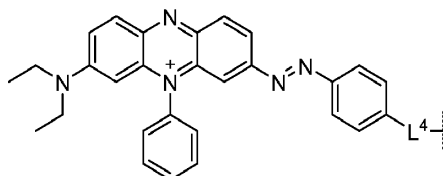
en la que R^{e2}, R^{e5}, R^{f2} y R^{f4} se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxilo sustituido o no sustituido y nitro; y L⁴ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que R^{e2} es alquilo C₁-C₄ no sustituido; R^{e5} es H; R^{f2} es alquilo C₁-C₄ no sustituido; y R^{f4} es H.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que R^{e2} es alcoxilo C₁-C₄ no sustituido; R^{e5} es alquilo C₁-C₄ no sustituido; R^{f2} es nitro; y R^{f4} es alquilo C₁-C₄ no sustituido.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que R^{e2} es alcoxilo C₁-C₄ no sustituido; R^{e5} es alcoxilo C₁-C₄ no sustituido; R^{f2} es H; y R^{f4} es nitro.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el segundo extintor tiene la estructura:



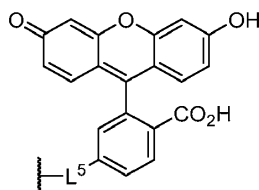
en la que L⁴ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el segundo extintor se deriva de BBQ-650®, dabcilo, dabsilo, extintor Eclipse®, Iowa Black® FQ, Iowa Black® RQ-nl o Iowa Black® RQ-n2.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el fluoróforo se deriva de 6-carboxifluoresceína (FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), tetracarboxifluoresceína (TET), 6-carboxirodamina (R6G), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, sulfonato de 1-anilino-8-naftaleno, sulfonato de 2-p-toluidinil-6-naftaleno, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), un tinte de cumarina, un tinte de acridina, indodicarbocianina 3 (Cy3), indodicarbocianina 5 (Cy5), indodicarbocianina 5.5 (Cy5.5), 3-(1-carboxi-pentil)-3'-etil-5,5'-dimetiloxacarbocianina (CyA), 1H,5H,11H,15H-xanteno[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']diquinolizina-18-io, 9-[2(o 4)-[[[6-[2,5-dioxo-1-pirrolidinil]oxi]-6-oxohexil]amino]sulfonil]-4(o 2)-sulfofenil]-2,3,6,7,12,13,16,17-octahidro-sal interna (TR o rojo Texas), un tinte de BODIPY, benzoxaazol, estilbeno o pireno.

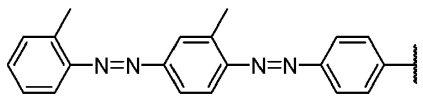
- 10 Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el fluoróforo se deriva de 6-carboxifluoresceína (FAM).

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el fluoróforo tiene la estructura:

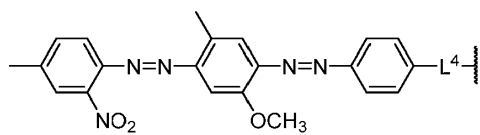


- 15 en la que L⁵ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que la secuencia de nucleótidos de Y¹ incluye: un primer nucleótido N¹ que tiene un fosfato en 5' unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al fluoróforo, y un segundo nucleótido N² que tiene un fosfato en 3' unido covalentemente a L¹; y la secuencia de nucleótidos de Y² incluye: un tercer nucleótido N³ que tiene un fosfato en 5' unido covalentemente a L², y un cuarto nucleótido N⁴ que tiene un fosfato en 3' unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) al segundo extintor; L¹ es alquilo C₂ no sustituido; L² es alquilo C₂ no sustituido; Q¹ tiene la estructura:

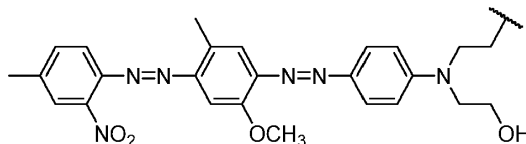


el segundo extintor tiene la estructura:



- 25 en la que L⁴ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; y el fluoróforo comprende un resto de fluoresceína.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el segundo extintor tiene la estructura:



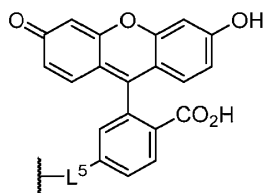
- 30 Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el oligonucleótido comprende desde 15 hasta 45 nucleótidos.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el oligonucleótido tiene desde 15 hasta 45 nucleótidos.

- 35 Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que Y¹ es una secuencia de desde 8 hasta 11 nucleótidos.

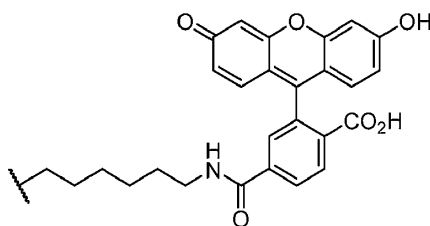
Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que Y² es una secuencia de desde 6 hasta 24 nucleótidos.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el fluoróforo tiene la estructura:

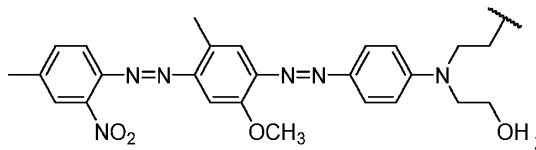


en la que L⁵ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

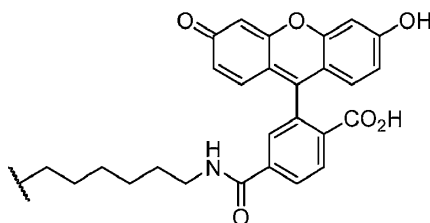
- 5 Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el fluoróforo tiene la estructura:



Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que Y¹ es una secuencia de desde 8 hasta 11 nucleótidos; Y² es una secuencia de desde 6 hasta 24 nucleótidos; el segundo extintor tiene la estructura:



- 10 y el fluoróforo tiene la estructura:



Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el oligonucleótido es un primer oligonucleótido, y el primer oligonucleótido se adapta para hibridarse con un segundo oligonucleótido que tiene la estructura 3'-Y³-Y⁴-5', en la que: Y³ comprende una secuencia de cuatro o más nucleótidos de ADN o ARN, que incluye un quinto nucleótido N⁵; e Y⁴ comprende una secuencia de cuatro o más nucleótidos de ADN o ARN, que incluye un sexto nucleótido N⁶ que está unido directamente al nucleótido N⁵; en la que si el primer oligonucleótido se hibrida con el segundo oligonucleótido, la base N² se empareja con N⁵ y la base N³ se empareja con N⁶ para formar un dúplex que tiene una T_m que es mayor que la T_m de un dúplex formado entre el segundo oligonucleótido y un tercer oligonucleótido que tiene la estructura 5'-Y¹-Y²-3'.

- 15 Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el oligonucleótido es un primer oligonucleótido, y el primer oligonucleótido se adapta para hibridarse con un segundo oligonucleótido que tiene la estructura 3'-Y³-Y⁴-5', en la que: Y³ comprende una secuencia de cuatro o más nucleótidos de ADN o ARN, que incluye un quinto nucleótido N⁵; e Y⁴ comprende una secuencia de cuatro o más nucleótidos de ADN o ARN, que incluye un sexto nucleótido N⁶ que está unido directamente al nucleótido N⁵; en la que si el primer oligonucleótido se hibrida con el segundo oligonucleótido, la base N² se empareja con N⁵ y la base N³ se empareja con N⁶ para formar un dúplex que tiene una T_m que es menor que la T_m de un dúplex formado entre el segundo oligonucleótido y un tercer oligonucleótido que tiene la estructura 5'-Y¹-Y²-3'.

Un método de detección de un segundo oligonucleótido en una muestra, que comprende: poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en el que la fluorescencia del fluoróforo se reduce mediante una transferencia de energía donador-aceptor a uno o ambos del primer extintor y el segundo extintor cuando el primer oligonucleótido no se hibrida con el segundo oligonucleótido; y detectar un aumento de fluorescencia que indica la presencia del segundo oligonucleótido en la muestra.

- 30

Un método según el párrafo anterior, en el que se reduce la fluorescencia mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia cuando el primer oligonucleótido no se hibrida con el segundo oligonucleótido.

Un método según cualquier párrafo anterior, en el que se reduce la fluorescencia mediante extinción de estado fundamental cuando el primer oligonucleótido no se hibrida con el segundo oligonucleótido.

- 5 Un método según cualquier párrafo anterior, en el que se reduce la fluorescencia mediante tanto transferencia de energía por resonancia de fluorescencia como extinción de estado fundamental cuando el primer oligonucleótido no se hibrida con el segundo oligonucleótido.

Un método según cualquier párrafo anterior, en el que el aumento de fluorescencia surge de la escisión del fluoróforo a partir del primer oligonucleótido.

- 10 Un método según cualquier párrafo anterior, en el que el primer oligonucleótido forma una conformación de hélices al azar cuando el primer oligonucleótido no se hibrida, de tal manera que se reduce la fluorescencia del fluoróforo.

Un método según cualquier párrafo anterior, en el que el primer oligonucleótido comprende una secuencia autocomplementaria y en el que el extintor y el fluoróforo están unidos al primer oligonucleótido de manera que la fluorescencia del fluoróforo se extingue mediante el extintor cuando el polímero de ácido nucleico se somete a apareamiento de bases intramolecular.

- 15

Un método según cualquier párrafo anterior, en el que el método se usa en una reacción PCR en el que la síntesis del producto de PCR da como resultado un aumento de fluorescencia.

Un método de detección de un segundo oligonucleótido en una muestra, que comprende: poner en contacto la muestra con una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en el que el oligonucleótido es un primer oligonucleótido, y el primer oligonucleótido se adapta para hibridarse con un segundo oligonucleótido, y la fluorescencia del fluoróforo se reduce mediante una transferencia de energía donador-aceptor a uno o ambos del primer extintor y el segundo extintor cuando el primer oligonucleótido no se hibrida con el segundo oligonucleótido; y detectar un aumento de fluorescencia que indica la presencia del segundo oligonucleótido en la muestra.

- 20

Un método según el párrafo anterior, en el que se reduce la fluorescencia mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia cuando el primer oligonucleótido no se hibrida con el segundo oligonucleótido.

- 25

Un método según cualquier párrafo anterior, en el que se reduce la fluorescencia mediante extinción de estado fundamental cuando el primer oligonucleótido no se hibrida con el segundo oligonucleótido.

Un método según cualquier párrafo anterior, en el que se reduce la fluorescencia mediante tanto transferencia de energía por resonancia de fluorescencia como extinción de estado fundamental cuando el primer oligonucleótido no se hibrida con el segundo oligonucleótido.

- 30

Un método según cualquier párrafo anterior, en el que el aumento de fluorescencia surge de la escisión del fluoróforo a partir del primer oligonucleótido.

Un método según cualquier párrafo anterior, en el que el primer oligonucleótido forma una conformación de hélices al azar cuando el primer oligonucleótido no se hibrida, de tal manera que se reduce la fluorescencia del fluoróforo.

- 35 Un método según cualquier párrafo anterior, en el que el primer oligonucleótido comprende una secuencia autocomplementaria y en el que los extintores y el fluoróforo están unidos al primer oligonucleótido de manera que la fluorescencia del fluoróforo se extingue mediante uno o ambos del primer extintor y el segundo extintor cuando el polímero de ácido nucleico se somete a apareamiento de bases intramolecular.

Un método según cualquier párrafo anterior, en el que el método se usa en una reacción PCR en el que la síntesis del producto de PCR da como resultado un aumento de fluorescencia.

- 40

Una sonda de ácido nucleico que comprende un oligonucleótido que tiene unido al mismo: un primer extintor que tiene una estructura que comprende al menos tres residuos seleccionados de arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y combinaciones de los mismos, en la que al menos dos de los residuos están unidos covalentemente mediante un enlace diazo exocíclico; y un segundo extintor; en la que el primer extintor está unido a un nucleótido, que es de 8, 9, 10 u 11 nucleótidos hacia el extremo terminal 3' desde el extremo terminal 5' del oligonucleótido; y el primer extintor y el segundo extintor están unidos al oligonucleótido a través de un miembro seleccionado independientemente de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

- 45

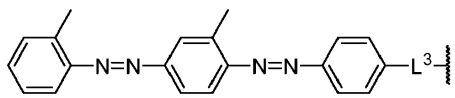
Una sonda de ácido nucleico según el párrafo anterior, en la que el oligonucleótido comprende además un fluoróforo unido al extremo terminal 5' del oligonucleótido a través de un miembro seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

- 50

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que cada uno de los al menos tres residuos es fenilo sustituido o no sustituido.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que al menos dos de los al menos tres residuos son fenilo sustituido con al menos un resto de alquilo C₁-C₆ no sustituido.

- 5 Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el primer extintor tiene la estructura:

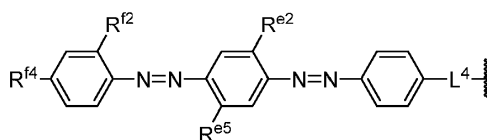


en la que L³ es un miembro seleccionado de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

- 10 Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el segundo extintor tiene una estructura que comprende al menos tres residuos seleccionados de arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, y combinaciones de los mismos, en la que al menos dos de los residuos están unidos covalentemente mediante un enlace diazo exocíclico.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el segundo extintor está unido al extremo terminal 3' del oligonucleótido.

- 15 Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el segundo extintor tiene la estructura:



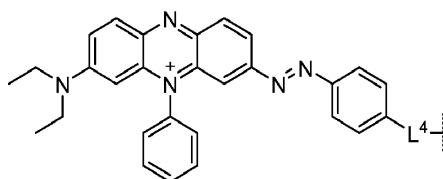
en la que R^{e2}, R^{e5}, R^{f2} y R^{f4} se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxilo sustituido o no sustituido y nitro; y L⁴ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

- 20 Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que R^{e2} es alquilo C₁-C₄ no sustituido; R^{e5} es H; R^{f2} es alquilo C₁-C₄ no sustituido; y R^{f4} es H.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que R^{e2} es alcoxilo C₁-C₄ no sustituido; R^{e5} es alquilo C₁-C₄ no sustituido; R^{f2} es nitro; y R^{f4} es alquilo C₁-C₄ no sustituido.

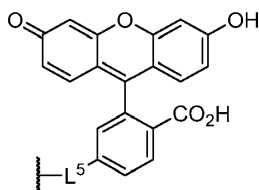
- 25 Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que R^{e2} es alcoxilo C₁-C₄ no sustituido; R^{e5} es alcoxilo C₁-C₄ no sustituido; R^{f2} es H; y R^{f4} es nitro.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el segundo extintor tiene la estructura:



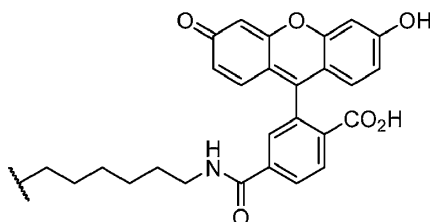
en la que L⁴ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

- 30 Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el fluoróforo tiene la estructura:



en la que L⁵ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

Una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, en la que el fluoróforo tiene la estructura:



Un método para detectar una secuencia diana de ácido nucleico, comprendiendo el método: (a) poner en contacto la secuencia diana con un ácido nucleico detector que comprende una secuencia de unión a la diana monocatenaria, en el que el ácido nucleico detector es una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, y el ácido nucleico detector está en una conformación que permite la transferencia de energía donador-aceptor entre el fluoróforo y uno o ambos del primer extintor y el segundo extintor cuando el fluoróforo se excita; (b) hibridar la secuencia de unión a la diana con la secuencia diana, alterando de ese modo la conformación del ácido nucleico detector, provocando un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (c) detectar el cambio en el parámetro de fluorescencia, detectando de ese modo la secuencia diana de ácido nucleico.

Un método para determinar si un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico se hibridan, en el que el primer ácido nucleico es una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior, comprendiendo el método: (a) poner en contacto el primer ácido nucleico con el segundo ácido nucleico; y (b) detectar una alteración en una propiedad fluorescente de un miembro seleccionado del primer ácido nucleico, el segundo ácido nucleico y una combinación de los mismos, determinado de ese modo si se produce la hibridación.

Un método para monitorizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, comprendiendo el método: (a) preparar una mezcla de reacción de amplificación que comprende un ácido nucleico detector, en el que el ácido nucleico detector es una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior; (b) someter la mezcla de reacción de amplificación a condiciones de amplificación; (c) monitorizar la mezcla de reacción para detectar una señal fluorescentes del ácido nucleico detector para obtener un resultado de ensayo; y (d) emplear el resultado de ensayo para monitorizar la reacción de amplificación de ácido nucleico.

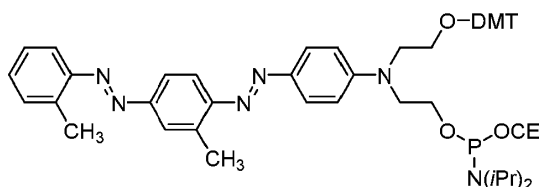
Un método para detectar la amplificación de una secuencia diana, comprendiendo el método: (a) hibridar un ácido nucleico de muestra que comprende la secuencia diana con cebadores de PCR que flanquean la secuencia diana; (b) extender los cebadores hibridados con una polimerasa para producir el producto de PCR, y separar las dos cadenas del producto de PCR para hacer accesibles las cadenas sentido y antisentido de la secuencia diana; (c) hibridar un ácido nucleico detector con la cadena sentido o antisentido de la secuencia diana en el producto de PCR, en el que el ácido nucleico detector es una sonda de ácido nucleico según cualquier párrafo anterior; en el que antes de su hibridación con la secuencia diana, el ácido nucleico detector está en una conformación que permite la transferencia de energía donador-aceptor entre el fluoróforo y uno o ambos del primer extintor y el segundo extintor cuando el fluoróforo se excita; alterando de ese modo la conformación del ácido nucleico detector, provocando un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (d) medir el cambio en el parámetro de fluorescencia para detectar la secuencia diana y su amplificación.

Los materiales y métodos de la presente invención se ilustran adicionalmente mediante los ejemplos que siguen. Estos ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

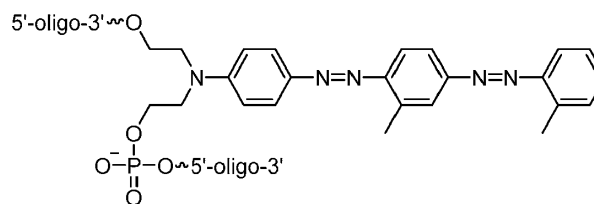
Ejemplos

Estructura

Las sondas con extinción interna siguen requiriendo un bloqueador en 3', por lo que un enfoque sensato para mejorar la eficiencia de la extinción es conservar el extintor terminal por su función de bloqueo mientras se incorpora un extintor adicional en una posición interna. Se encontró que las sondas marcadas con FAM obtuvieron un rendimiento óptimo con un resto de BHQ0 interno, lo que fue sorprendente ya que este emparejamiento de tintes tiene un solapamiento espectral mínimo. Puede incorporarse un BHQ0 interno sin tener en cuenta la composición de las bases, colocándolo entre residuos adyacentes usando una química de unión que altera la estructura principal de azúcar-fosfato. El precursor de fosforamidita usado para la incorporación es el número de catálogo BNS-5050 (Biosearch Technologies, Inc.) con la siguiente estructura química:



La incorporación del precursor reactivo en un oligo durante la síntesis culmina en una modificación de BHQ0 interno:



El BHQ0 interno se complementa con un resto adicional de BHQ1 en el extremo terminal 3'. La estructura completa de esta sonda marcada con FAM con doble extintor se muestra en la figura 3.

- 5 La orientación general del colorante dentro de una sonda con doble extintor puede representarse como una secuencia lineal: 5'-[FAM]-secuencia de oligo¹-[I-BHQ0]-secuencia de oligo²[BHQ1]-3'

Se encontró que la colocación del BHQ0 interno entre los residuos 9 y 10 era óptima. Cualquier posición más cerca o más retirada del extremo terminal 5' dio como resultado una liberación de la señal disminuida. La amplificación de la señal no sólo depende de la posición de la secuencia, sino también del tipo de extintor. Otros extintores tal como dabsilo no funcionaron tan bien, ni tampoco el cambio de orientación del tinte de BHQ0 / BHQ1. Incluso un cambio sutil en la unión entre el cromóforo de BHQ0 y el oligo es suficiente para alterar la liberación de la señal. Las pruebas empíricas revelaron un sistema de modificaciones exquisitamente sensible y una sinergia bastante inesperada. Todas estas dependencias se ilustran en la siguiente sección experimental.

Función

- 15 La combinación de las modificaciones de BHQ0 y BHQ1 produce tanto una mejor eficiencia de extinción como la liberación de la señal, independientemente de la longitud del oligo. Tal como se muestra en las figuras 4A-C, las mismas tres secuencias de sonda sometidas a prueba anteriormente con una modificación de T-BHQ1 (véanse las figuras 2A-C) han mejorado notablemente su rendimiento como sondas con doble extintor:

- 20 Figuras 4A-C. Los perfiles de amplificación señaladas con una sonda marcada en el extremo se muestran como líneas discontinuas. Los perfiles de amplificación señaladas con una sonda con doble extintor se muestran como líneas continuas. La mejora en la eficiencia de la extinción es más pronunciada con las secuencias de sonda más largas, mientras que las tres demuestran una mejor liberación de la señal. Las secuencias de sonda que se comparan son:

sonda de 21 bases (marcada en el extremo):

- 25 5'-[FAM]-TCCTTTGGGCTCCTGCCATCT-[BHQ1]-3'

sonda de 21 bases (I-BHQ0 + 3-BHQ1):

5'-[FAM]-TCCTTTGGG[I-BHQ0]CTCCTGCCATCT-[3-BHQ1]-3'

sonda de 29 bases (marcada en el extremo):

5'-[FAM]-AAACCACTTTATGAAAATCTAACTGGACA-[BHQ1]-3'

- 30 sonda de 29 bases (I-BHQ0 + 3-BHQ1):

5'-[FAM]-AAACCACTT[I-BHQ0]TATGAAAATCTAACTGGACA-[3-BHQ1]-3'

sonda de 35 bases (marcada en el extremo):

5'-[FAM]-AAGAGTAGTAGCCTAAGAGTGTGAGTTGTACATCA-[BHQ1]-3'

sonda de 35 bases (I-BHQ0 + 3-BHQ1):

5'-[FAM]-AAGAGTAGT[I-BHQ0]AGCCTAAGAGTGTGAGTTGTACATCA-[3-BHQ1]-

- 35 3'

La eficiencia de la extinción mejorada puede predecirse por la dependencia de la distancia de FRET, pero la señal mejorada no se explica fácilmente. Una posibilidad es que el extintor interno deba tener un pobre solapamiento espectral con el indicador fluorescente para señalar mejor la amplificación. Con una absorbancia máxima a 495 nm, el espectro de absorción de BHQ0 está un poco retirado de FAM con su emisión máxima a 520. Aunque todavía es

especulativo, es posible que el extintor interno deba tener una λ máxima a una longitud de onda más corta que la del indicador, o bien una longitud de onda más corta que la del extintor en el extremo terminal 3' (BHQ1) para obtener unas características de rendimiento óptimas.

- 5 También es posible que los dos extintores se asocien físicamente entre sí para producir un complejo que interactúe más eficazmente con FAM que cualquiera de los extintores actuando individualmente. De ser cierto, esto produciría una conformación estructurada de la sonda en la que el BHQ1 en 3' se acerca más al indicador fluorescente en 5', por lo que puede considerarse una sonda asistida por la conformación.

- 10 La liberación de la señal mejorada puede originarse a partir de las interacciones favorables entre el BHQ0 y la polimerasa *Taq*. Mientras que las sondas tradicionales marcadas en el extremo liberan la señal inmediatamente después de la hibridación, se demostró que en las sondas con doble extintor este mecanismo de señalización es realmente mínimo. Incluso tras la hibridación, la extinción de FRET sigue siendo significativa debido a la proximidad del indicador fluorescente y del extintor interno. Sólo cuando la polimerasa digiere la nucleasa, el fluoróforo se separa del oligo marcado con extintor, para liberar la señal fluorescente. Este tipo de dependencias enzimáticas son muy difíciles de predecir. Pueden implicar sutiles interacciones electrostáticas e hidrófobas con la propia proteína, y son difíciles de modelar sin la cristalografía de rayos X.

- 15 Aunque diversas hipótesis pueden explicar la amplificación de la señal mejorada, la estabilización del dúplex no es actualmente una de ellas. Se ha demostrado que el BHQ interno no mejora la fuerza de unión, sino que reduce la T_M de la sonda en 1 °C en promedio en comparación con las sondas tradicionales marcadas en el extremo. Esta desestabilización puede originarse a partir de la modificación interna que altera la estructura principal de azúcar-fosfato, introduciendo una especie de protuberancia al unirse a la secuencia diana. Estas hipótesis y su caracterización se detallan con más detalle en la sección experimental.

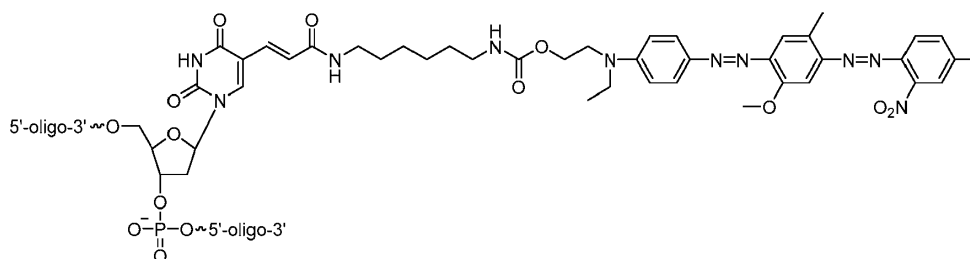
- 20 La mayoría de los candidatos se sometieron a prueba amplificando a partir de un único punto de dilución de la secuencia diana, para una mayor eficiencia del cribado. Para garantizar que no se pierda la sensibilidad cerca del límite de detección, las sondas con doble extintor se sometieron a prueba a través de una serie de dilución de 7 puntos, y su amplificación se presenta tras el análisis por los algoritmos de normalización del instrumento:

Figuras 5A-F. Los perfiles de amplificación señaladas con una sonda marcada en el extremo se muestran como líneas discontinuas. Los perfiles de amplificación señaladas con una sonda con doble extintor se muestran como líneas continuas.

Sección experimental

- 30 El rendimiento mejorado de las sondas con doble extintor puede lograrse a través de un sistema muy específico de modificaciones que dependen de la estructura del cromóforo, la unión al oligo, la orientación hacia ellos mismos y la ubicación dentro de la secuencia. La desviación de cualquiera de estas características precisas, por mínima que sea, produce un rendimiento inferior con respecto a la magnitud de la liberación de la señal, tal como se observa con la sonda modificada usando un BHQ1 unido a T.

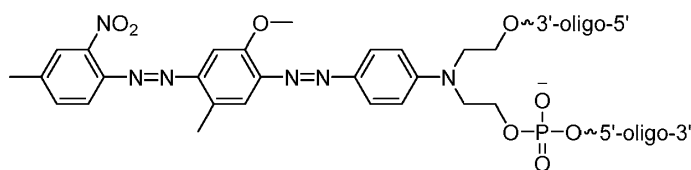
- 35 La estructura química de esta modificación I-TBHQ1 es:



Esa sonda contenía un único extintor en una posición interna mientras se bloqueaba con una modificación de espaciador-C3 en el extremo terminal 3':



- 40 Tal como se presenta en las figuras 2A-C, la eficiencia de extinción mejoró ligeramente mientras que la liberación de la señal se suprimió, con un rendimiento general comprometido como consecuencia. A continuación, se sometieron a prueba sondas con un segundo BHQ-1 que reemplaza al espaciador-C3 en 3', así como que reemplaza T-BHQ1 interno con una formulación abásica que altera la estructura principal de azúcar-fosfato:



Figuras 6A-B. Los perfiles de amplificación señaladas con una sonda marcada en el extremo se muestran como líneas discontinuas. Los perfiles de amplificación señaladas con una sonda con BHQ1 doble se muestran como líneas continuas. Ya sea la formulación unida a T en la figura 6A o la formulación abásica en la figura 6B, ambas configuraciones con extintores BHQ1 binarios tienen una respuesta de señal reducida y un rendimiento comprometido en general. Las secuencias de sonda que se comparan son:

sonda de 21 bases (marcada en el extremo):

5'-[FAM]-TCCTTTGGGCTCCTGCCATCT-[BHQ1]-3'

sonda de 21 bases (I-TBHQ1 + 3-BHQ1):

5'-[FAM]-TCCTTTGGGC[I-TBHQ1]CCTGCCATCT-[3-BHQ1]-3'

sonda de 21 bases (I-BHQ1 + 3-BHQ1):

5'-[FAM]-TCCTTTGGG[I-BHQ1]CTCCTGCCATCT-[3-BHQ1]-3'

La formulación abásica de I-BHQ1 + 3-BHQ1 se sometió a prueba en un sistema que, por lo demás, es idéntico a las sondas con doble extintor con la configuración de I-BHQ0 + 3-BHQ1, y sin embargo su rendimiento es muy inferior. Los resultados de un solo ensayo representativo se muestran por razones de brevedad, pero estas dos configuraciones se han comparado en un panel de más de 10 secuencias diferentes con un resultado similar al que se presenta en este caso: determinadas secuencias de sonda tienen una respuesta de señal muy reducida de I-BHQ1, mientras que I-BHQ0 mejora con mayor frecuencia.

Otras configuraciones binarias del extintor no tienen mejor rendimiento, así como modificaciones totalmente diferentes. Se sintetizaron sondas de 35 bases con T-dabsilo interno (I-TDAB), así como una versión truncada de BHQ0 que contenía sólo el primer resto de arilo (I-anilina), respectivamente, siempre en combinación con el 3-BHQ1.

Figuras 7A-B. Los perfiles discontinuos son las amplificaciones señaladas con una sonda marcada en el extremo. Los perfiles sólidos son la sonda con doble extintor I-BHQ0 + 3-BHQ1, a modo de comparación. Los perfiles huecos son la sonda I-TDAB + 3-BHQ1 en la figura 7A, e I-anilina + 3-BHQ1 en la figura 7B. I-TDAB tiene una mayor eficiencia de extinción, pero una respuesta de señal reducida. La I-anilina tiene una respuesta de señal equivalente a la de la sonda tradicional marcada en el extremo, pero una peor eficiencia de extinción, lo que indica que el resto de anilina no actúa como extintor. Ambas configuraciones de sonda tienen un rendimiento global inferior en comparación con el de I-BHQ0 + 3-BHQ1. Las secuencias de sonda que se comparan son:

sonda de 35 bases (marcada en el extremo):

5'-[FAM]-AAGAGTAGTAGCCTAAGAGTGTGTCAGTTGTACATCA-[BHQ1]-3'

sonda de 35 bases (I-BHQ0 + 3-BHQ1):

5'-[FAM]-AAGAGTAGT[I-BHQ0]AGCCTAAGAGTGTGTCAGTTGTACATCA-[3-BHQ1]-3'

sonda de 35 bases (I-TDAB + 3-BHQ1):

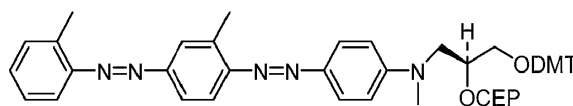
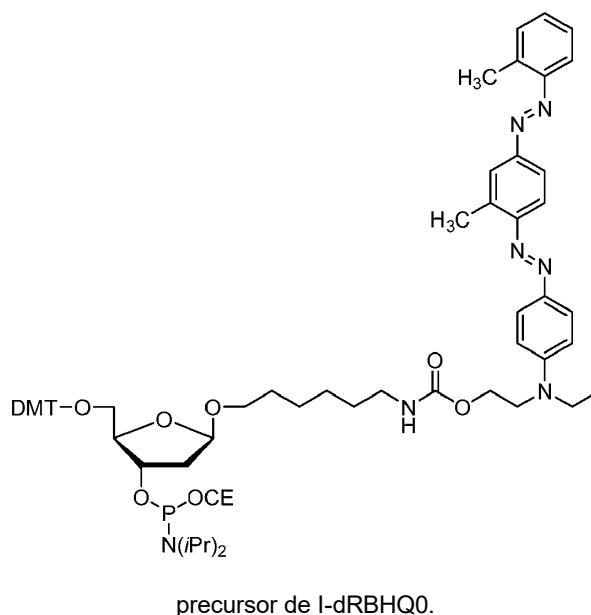
5'-[FAM]-AAGAGTAG[I-TDAB]AGCCTAAGAGTGTGTCAGTTGTACATCA-[3-BHQ1]-3'

sonda de 35 bases (I-anilina + 3-BHQ1):

5'-[FAM]-AAGAGTAGT[I-anilina]AGCCTAAGAGTGTGTCAGTTGTACATCA-[3-BHQ1]-3'

Incluso cambiar la unión entre el BHQ0 interno y el oligo alterará el rendimiento de esta configuración única de sonda con doble extintor. Se sintetizó una sonda de 35 bases con el BHQ0 anclado a un resto de desoxirribosa (I-dRBHQ0), y otra con el BHQ0 unido a través de una unión glicol que altera la estructura principal de fosfato del

azúcar (I-gBHQ0). Las estructuras químicas de los precursores reactivos de estas dos modificaciones se muestran a continuación.



Figuras 8A-B. Los perfiles de amplificación mostrados como líneas discontinuas están señalados con una sonda marcada en el extremo. Los perfiles continuos son la sonda con doble extintor I-BHQ0 + 3-BHQ1, a modo de comparación. Los perfiles huecos son la sonda I-dRBHQ0 + 3-BHQ1 en la figura 8A e I-gBHQ0 + 3-BHQ1 en la figura 8B. Estas modificaciones mantienen la misma estructura de cromóforo mientras que sólo difieren en su química de unión en comparación con el I-BHQ0 a modo de ejemplo, y sin embargo ambas tienen una respuesta de señal inferior. Las secuencias de sonda que se comparan son:

sonda de 35 bases (marcada en el extremo):

5'-[FAM]-AAGAGTAGTAGCCTAAGAGTGTGTCAGTTGTACATCA-[BHQ1]-3'

sonda de 35 bases (I-BHQ0 + 3-BHQ1):

5'-[FAM]-AAGAGTAGT[I-BHQ0]AGCCTAAGAGTGTGTCAGTTGTACATCA-[3-BHQ1]-3'

sonda de 35 bases (I-dRBHQ0 + 3-BHQ1):

5'-[FAM]-AAGAGTAGT[I-dRBHQ0]AGCCTAAGAGTGTGTCAGTTGTACATCA-[3-BHQ1]-3'

sonda de 35 bases (I-gBHQ0 + 3-BHQ1):

5'-[FAM]-AAGAGTAGT[I-gBHQ0]AGCCTAAGAGTGTGTCAGTTGTACATCA-[3-BHQ1]-3'

Estas dependencias funcionales no sólo se limitan al BHQ0 interno, sino también al extintor BHQ1 situado en el extremo terminal 3'. Para demostrar la importancia de este extintor terminal en la configuración global de la sonda, se sometieron a prueba sondas con un espaciador C3 en lugar de BHQ1, conservando el BHQ0 interno. También se sometió a prueba la orientación inversa de los dos extintores, de modo que el BHQ1 se sitúa en un lugar interno mientras que el BHQ-0 está en el extremo terminal 3':

Figuras 9A-B. Los perfiles discontinuos son las amplificaciones señaladas con una sonda marcada en el extremo. Los perfiles continuos son la sonda con doble extintor I-BHQ0 + 3-BHQ1, a modo de comparación. Los perfiles huecos son la sonda I-BHQ0 + 3-Sp3 en la figura 9A e I-BHQ1 + 3-BHQ0 en la figura 9B. Ambas configuraciones de sonda tienen una respuesta de señal inferior en comparación con I-BHQ0 + 3-BHQ1, lo que subraya el importante papel de BHQ1 dentro de la combinación, así como la orientación de los extintores entre sí. Las secuencias de sonda que se comparan son:

sonda de 35 bases (marcada en el extremo):

5'-[FAM]-AAGAGTAGTAGCCTAAGAGTGTTCAGTTGTACATCA-[BHQ1]-3'

sonda de 35 bases (I-BHQ0 + 3-BHQ1):

5'-[FAM]-AAGAGTAGT[I-BHQ0]AGCCTAAGAGTGTTCAGTTGTACATCA-[3-BHQ1]-

3'

sonda de 35 bases (I-BHQ0 + 3-Sp3):

5'-[FAM]-AAGAGTAGT[I-BHQ0]AGCCTAAGAGTGTTCAGTTGTACATCA-[3-Sp3]-3'

sonda de 35 bases (I-BHQ1 + 3-BHQ0):

5'-[FAM]-AAGAGTAGT[I-BHQ1]AGCCTAAGAGTGTTCAGTTGTACATCA-[3-BHQ0]-

3'

Cambiar la orientación del extintor tiene un efecto significativo sobre la funcionalidad, pero la ubicación de la secuencia es incluso más sensible que eso. La posición del BHQ0 interno se desplazó tanto más cerca como más lejos del indicador fluorescente en 5', y se sometió a prueba la consecuencia:

Figura 10. Si bien la fluorescencia de nivel inicial se reduce ligeramente al colocar el extintor más cerca del indicador en 5', esto representa sólo una mejora nominal sobre la eficiencia de extinción de la configuración 9/10 (líneas continuas), especialmente en comparación con la sonda tradicional marcada en el extremo (líneas discontinuas). Sin embargo, la liberación de la señal se ve comprometida cuando el BHQ0 interno se desplaza en cualquier dirección desde su posición a modo de ejemplo entre los residuos 9 y 10, por lo que todas las demás configuraciones tienen un rendimiento inferior. Las secuencias de sonda que se comparan son:

sonda de 35 bases (marcada en el extremo):

5'-[FAM]-AAGAGTAGTAGCCTAAGAGTGTTCAGTTGTACATCA-[BHQ1]-3'

6/7 I-BHQ0 + 3-BHQ1:

5'-[FAM]-AAGAGT[I-BHQ0]AGTAGCCTAAGAGTGTTCAGTTGTACATCA-[3-BHQ1]-
3'

7/8 I-BHQ0 + 3-BHQ1:

5'-[FAM]-AAGAGTA[I-BHQ0]GTAGCCTAAGAGTGTTCAGTTGTACATCA-[3-BHQ1]-
3'

8/9 I-BHQ0 + 3-BHQ1:

5'-[FAM]-AAGAGTAG[I-BHQ0]TAGCCTAAGAGTGTTCAGTTGTACATCA-[3-BHQ1]-
3'

9/10 I-BHQ0 + 3-BHQ1:

5'-[FAM]-AAGAGTAGT[I-BHQ0]AGCCTAAGAGTGTTCAGTTGTACATCA-[3-BHQ1]-
3'

11/12 I-BHQ0 + 3-BHQ1:

5'-[FAM]-AAGAGTAGTAG[I-BHQ0]CCTAAGAGTGTTCAGTTGTACATCA-[3-BHQ1]-
3'

La eficiencia de extinción mejorada puede explicarse fácilmente a través de la dependencia de la distancia de FRET, pero las diferencias de señal entre las diversas configuraciones de sonda son bastante inesperadas. En un intento de determinar el mecanismo de acción, se caracterizó la termodinámica de hibridación combinando cada sonda con su secuencia complementaria y luego fundiéndola lentamente a través de un gradiente de temperatura. Esta curva de fusión registra la temperatura de transición, o T_M , para revelar la estabilidad de unión de la sonda. Las sondas que se unen a una T_M demasiado baja, por debajo de la temperatura de apareamiento de la amplificación, proporcionan una respuesta de señal débil. Por el contrario, cualquier aumento de la estabilidad de unión debería tener el efecto contrario. Se sometieron a prueba de esta manera 12 diseños de sonda diferentes, comparando siempre la configuración I-BHQ0 + 3-BHQ1 con la sonda tradicional marcada en el extremo. La única diferencia entre ambas es el extintor interno, por lo que esta comparación revela cualquier contribución a la estabilidad de unión por parte del propio I-BHQ0:

Las curvas de fusión (figuras 11A-L) revelan una ligera desestabilización de -1,0 °C en promedio de la configuración de sonda con doble extintor I-BHQ0 + 3-BHQ1 en comparación con las sondas tradicionales. Aunque los resultados varían un poco entre las diferentes secuencias de sonda sometidas a prueba, y algunas secuencias registran una T_M más alta para la configuración con doble extintor, en general no hay una estabilización significativa que sea aportada por el BHQ0. Como tal, la termodinámica de la hibridación no parece ser un factor en el mecanismo de señalización de este tipo de sonda con doble extintor.

Más interesante es el cambio en la señal entre las conformaciones hibridadas y no hibridadas a 60 °C, tal como se mide comparando los perfiles discontinuos y continuos con sus correspondientes perfiles huecos. Estos perfiles huecos representan cada sonda en ausencia de su complemento a lo largo del mismo intervalo, y a temperaturas más altas se superpondrán a los perfiles discontinuos y continuos, ya que todas las cadenas están fundidas. A partir de las curvas de fusión, puede concluirse que la sonda tradicional es la que mejor funciona: tiene una liberación de señal mucho mayor tras la hibridación que la configuración de la sonda con doble extintor. Sin embargo, en contraste con este ensayo de hibridación, las amplificaciones por PCR producen un resultado muy diferente: la sonda con doble extintor tiene una liberación de señal equivalente o mayor que la sonda tradicional. El resultado de la PCR es sorprendente, ya que los datos de la curva de fusión a 60 °C revelan que, incluso tras la hibridación con su complemento, la sonda con doble extintor permanece eficazmente extinguida, mejor extinguida que todas las sondas tradicionales, excepto las más cortas, que se dejan sin hibridar. Todo esto sugiere que en el ensayo de PCR el mecanismo de señalización dominante es la hidrólisis y no la hibridación. La hidrólisis de la sonda se logra a través de la actividad exonucleasa 5' → 3' de la polimerasa, por lo que parecería que las sondas con doble extintor ganan potencia a través de sus interacciones con esta enzima. La sinergia de este sistema de modificaciones en combinación con la polimerasa sería muy difícil de anticipar o diseñar por ingeniería. Sólo se consigue a través de pruebas empíricas significativas, con docenas de configuraciones diferentes evaluadas para determinar su funcionalidad en el contexto de la qPCR.

Métodos

<u>Composición de reacción</u>			<u>Volumen</u>	<u>Concentración</u>	<u>Rutina de clicado térmico de qPCR</u>			
Agua libre de nucleasa			6,4 µl	N/A	Activación enzimática	95°C durante minutos	10	
2X Bioline ImmoMix (con MgCl ₂ 3 mM)			10,0 µl	1×		seguido de:		
MgCl ₂ adicional (50 mM)			1,2 µl	6 mM total	50 ciclos de	95°C durante segundos	20	
Cebador directo de reserva (10 µM)			0,6 µl	300 nM		60°C durante segundos	60	
Cebador inverso de reserva (10 µM)			0,6 µl	300 nM	con la señal detectada a	temp. de apareamiento de 60°C		
Sonda de reserva (10 µM)			0,2 µl	100 nM				
ADN de muestra			1,0 µl	variable				
Total: 20,0 µl								
<u>Composición de reacción de la curva de fusión</u>					<u>Gradiente de temperatura de la curva de fusión</u>			
Tris 10 mM					Desnaturalización 95°C durante 5 minutos inicial			
NaCl 50 mM					seguido de:			
MgCl ₂ 5 mM					rampa de temperatura	de de 25°C a 95°C		
Sonda 2 µM					elevar 0,1°C en cada etapa, y			
Complemento 2 µ (o agua)					esperar 2 segundos en cada etapa			

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritas en el presente documento tienen únicamente fines ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos a los expertos en la técnica dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una sonda de ácido nucleico que comprende:

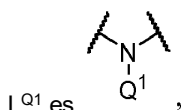
un oligonucleótido que tiene la estructura 5'-Y¹-L¹-L^{Q1}-L²-Y²-3', en la que

Y¹ comprende una secuencia de dos o más nucleótidos de ADN o ARN;

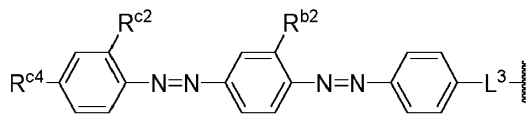
- 5 Y² comprende una secuencia de dos o más nucleótidos de ADN o ARN;

en la que uno de Y¹ e Y² tiene un fluoróforo unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a su secuencia de nucleótidos, y el otro de Y¹ e Y² tiene un segundo extintor unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a su secuencia de nucleótidos;

- 10 L¹ y L² se seleccionan independientemente de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; y



en la que Q¹ es un primer extintor que tiene una estructura:



- 15 en la que:

R^{b2} y R^{c2} son independientemente metilo o etilo o n-propilo o isopropilo o n-butilo o isobutilo o sec-butilo o terc-butilo;

R^{c4} es H; y L³ es un enlace.

2. La sonda de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que

- 20 la secuencia de nucleótidos de Y¹ incluye:

un primer nucleótido N¹ que tiene un fosfato en 5' unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a dicho fluoróforo o dicho segundo extintor, y

un segundo nucleótido N² que tiene un fosfato en 3' unido covalentemente a L¹; y

la secuencia de nucleótidos de Y² incluye:

- 25 un tercer nucleótido N³ que tiene un fosfato en 5' unido covalentemente a L², y

un cuarto nucleótido N⁴ que tiene un fosfato en 3' unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a dicho segundo extintor o dicho fluoróforo;

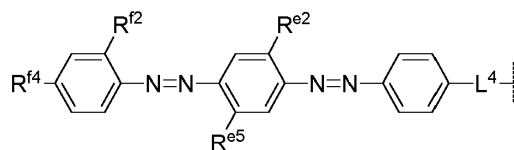
- 30 en la que cuando el fosfato en 5' de dicho primer nucleótido N¹ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a dicho fluoróforo, el fosfato en 3' de dicho cuarto nucleótido N⁴ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a dicho segundo extintor; y cuando el fosfato en 5' de dicho primer nucleótido N¹ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a dicho segundo extintor, el fosfato en 3' de dicho cuarto nucleótido N⁴ está unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a dicho fluoróforo.

- 35 3. La sonda de ácido nucleico según cualquier reivindicación anterior, en la que dicho oligonucleótido comprende desde 15 hasta 45 nucleótidos.

4. La sonda de ácido nucleico según cualquier reivindicación anterior, en la que:

(a) L¹ y L² son cada uno alquilo C₁-C₇ no sustituido; y/o

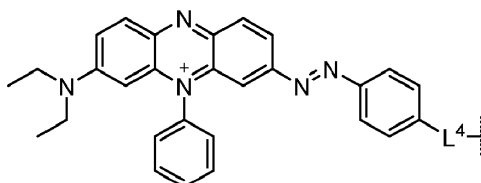
(b)(i) el segundo extintor tiene la estructura:



en la que R^{e2} , R^{e5} , R^{f2} y R^{f4} se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido, alcoxilo sustituido o no sustituido y nitro; y

5 L^4 se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; o

(ii) el segundo extintor tiene la estructura:



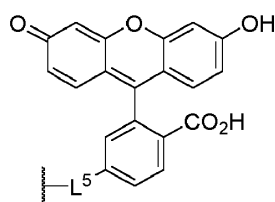
en la que L^4 se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; o

10 (iii) el segundo extintor se deriva de BBQ-650®, dabcilo, dabsilo, extintor Eclipse®, Iowa Black® FQ, Iowa Black® RQ-nl o Iowa Black® RQ-n2.

5. La sonda de ácido nucleico según cualquier reivindicación anterior, en la que:

15 (a) el fluoróforo se deriva de 6-carboxifluoresceína (FAM), 2'7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), tetraclorofluoresceína (TET), 6-carboxirodamina (R6G), N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, sulfonato de 1-anilino-8-naftaleno, sulfonato de 2-p-toluidinil-6-naftaleno, ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), un tinte de cumarina, un tinte de acridina, indodicarbocianina 3 (Cy3), indodicarbocianina 5 (Cy5), indodicarbocianina 5.5 (Cy5.5), 3-(1-carboxi-pentil)-3'-etil-5,5'-dimetiloxacarbocianina (CyA), 1H,5H,11H,15H-xanteno[2,3,4-ij:5,6,7-i'j']diquinolizín-18-io, 9-[2(o 4)-[[[6-[2,5-dioxo-1-pirrolidinil]oxi]-6-oxohexil]amino]sulfonil]-4(ó 2)-sulfofenil]-2,3,6,7,12,13,16,17-octahidro-sal interna (TR o rojo Texas), un tinte de BODIPY, benzoxaazol, estilbena o pireno; o

(b) el fluoróforo tiene la estructura:



25 en la que L^5 se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido.

6. La sonda de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que

la secuencia de nucleótidos de Y^1 incluye:

un primer nucleótido N^1 que tiene un fosfato en 5' unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a dicho fluoróforo, y

30 un segundo nucleótido N^2 que tiene un fosfato en 3' unido covalentemente a L^1 ; y

la secuencia de nucleótidos de Y^2 incluye:

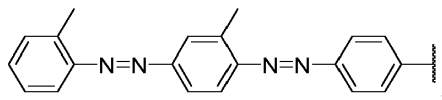
un tercer nucleótido N^3 que tiene un fosfato en 5' unido covalentemente a L^2 , y

un cuarto nucleótido N^4 que tiene un fosfato en 3' unido covalentemente (directamente o a través de un ligador) a dicho segundo extintor;

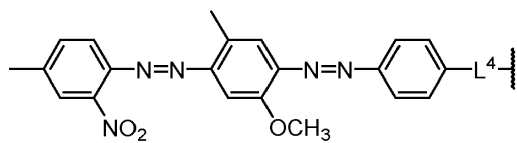
L¹ es alquilo C₂ no sustituido;

L² es alquilo C₂ no sustituido;

Q¹ tiene la estructura:



5 dicho segundo extintor tiene la estructura:



en la que L⁴ se selecciona de un enlace, alquilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido; y

dicho fluoróforo comprende un resto de fluoresceína.

10 7. La sonda de ácido nucleico según la reivindicación 2, en la que el oligonucleótido es un primer oligonucleótido, y el primer oligonucleótido se adapta para hibridarse con un segundo oligonucleótido que tiene la estructura 3'-Y³-Y⁴-5', en la que:

Y³ comprende una secuencia de cuatro o más nucleótidos de ADN o ARN, que incluye un quinto nucleótido N⁵; y

15 Y⁴ comprende una secuencia de cuatro o más nucleótidos de ADN o ARN, que incluye un sexto nucleótido N⁶ que está unido directamente al nucleótido N⁵;

en la que si el primer oligonucleótido se hibrida con el segundo oligonucleótido, los pares de bases de N² con los pares de bases de N⁵ y N³ con N⁶ para formar un dúplex que tiene una T_m que es (a) mayor que la T_m de un dúplex formado entre el segundo oligonucleótido y un tercer oligonucleótido que tiene la estructura 5'-Y¹-Y²-3' o (b) menor que la T_m de un dúplex formado entre el segundo oligonucleótido y un tercer oligonucleótido que tiene la estructura 5'-Y¹-Y²-3'.

8. La sonda de ácido nucleico según cualquier reivindicación anterior, en la que Q¹ está unido entre los nucleótidos 9° y 10° hacia el extremo terminal 5' desde el extremo terminal 3' del oligonucleótido.

9. Un método de detección de un segundo oligonucleótido en una muestra, que comprende:

25 poner en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico según la reivindicación 7, en el que la fluorescencia del fluoróforo se reduce mediante una transferencia de energía donador-aceptor a uno o ambos del primer extintor y el segundo extintor cuando el primer oligonucleótido no se hibrida con el segundo oligonucleótido; y

detectar un aumento en la fluorescencia que indica la presencia del segundo oligonucleótido en la muestra.

30 10. Un método de detección de un segundo oligonucleótido en una muestra, que comprende:

poner en contacto la muestra con la sonda de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el oligonucleótido es un primer oligonucleótido, y el primer oligonucleótido se adapta para hibridarse con un segundo oligonucleótido, y la fluorescencia del fluoróforo se reduce mediante una transferencia de energía donador-aceptor a uno o ambos del primer extintor y el segundo extintor cuando el primer oligonucleótido no se hibrida con el segundo oligonucleótido; y

detectar un aumento en la fluorescencia que indica la presencia del segundo oligonucleótido en la muestra.

11. El método según la reivindicación 9 o 10, en el que (a) se reduce la fluorescencia mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia cuando el primer oligonucleótido no se hibrida con el segundo oligonucleótido, (b) se reduce la fluorescencia mediante extinción de estado fundamental cuando el primer oligonucleótido no se hibrida con el segundo oligonucleótido, o (c) se reduce la fluorescencia mediante tanto transferencia de energía por resonancia de fluorescencia como extinción de estado fundamental cuando el primer oligonucleótido no se hibrida con el segundo oligonucleótido.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en el que el aumento de fluorescencia surge de la escisión del fluoróforo a partir del primer oligonucleótido.
- 5 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9-12, en el que (a) el primer oligonucleótido forma una conformación de hélice al azar cuando el primer oligonucleótido no se hibrida, de tal manera que se reduce la fluorescencia del fluoróforo, o (b) en el que el primer oligonucleótido comprende una secuencia autocomplementaria y en el que el extintor y el fluoróforo están unidos al primer oligonucleótido de tal manera que la fluorescencia del fluoróforo se extingue mediante el extintor cuando el polímero de ácido nucleico se somete a apareamiento de bases intramolecular.
- 10 14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, en el que el método se usa en una reacción PCR en el que la síntesis del producto de PCR da como resultado un aumento de la fluorescencia.

FIG. 1

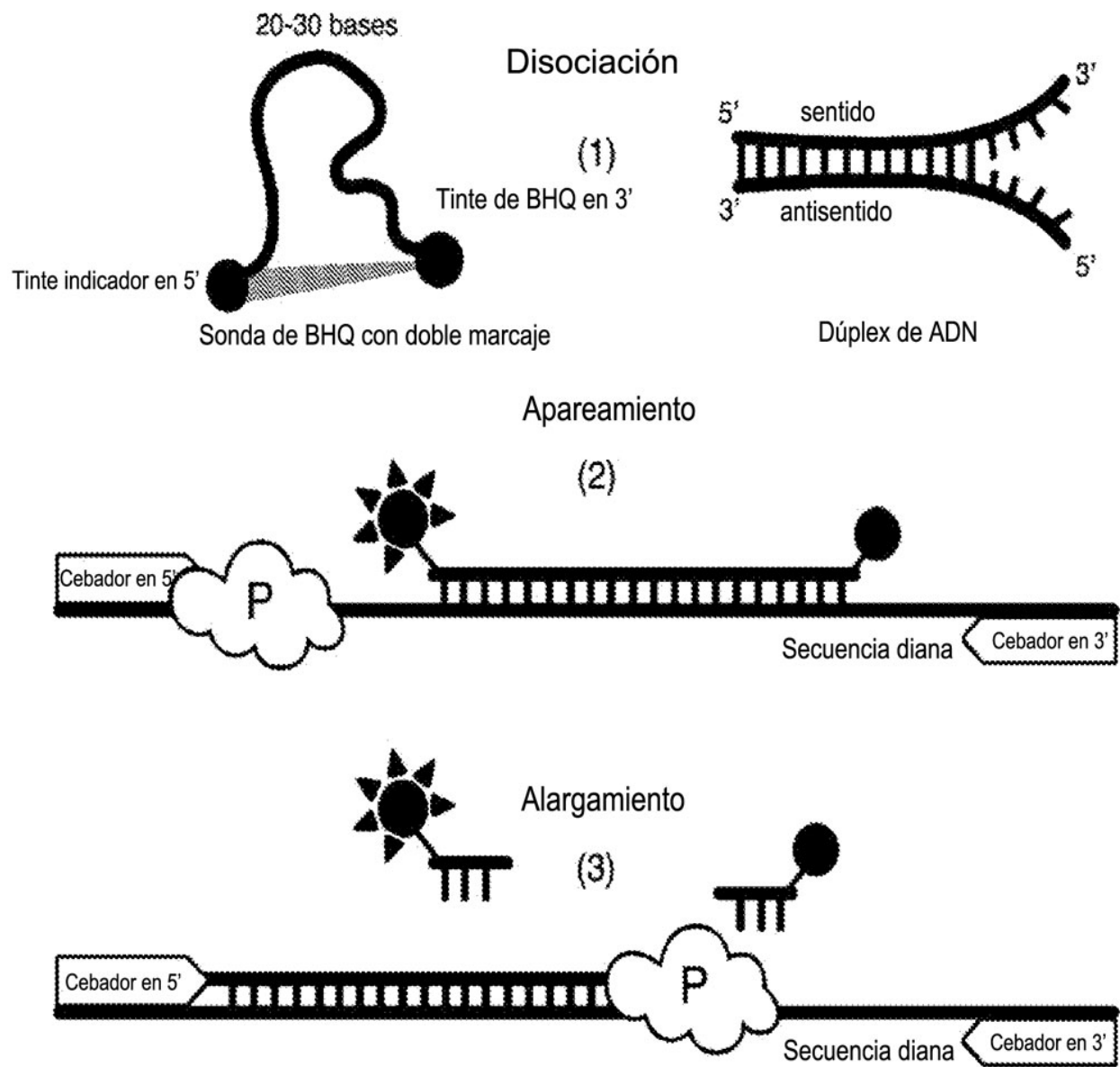


FIG. 2A

Sonda de 21 bases - Datos de amplificación en bruto

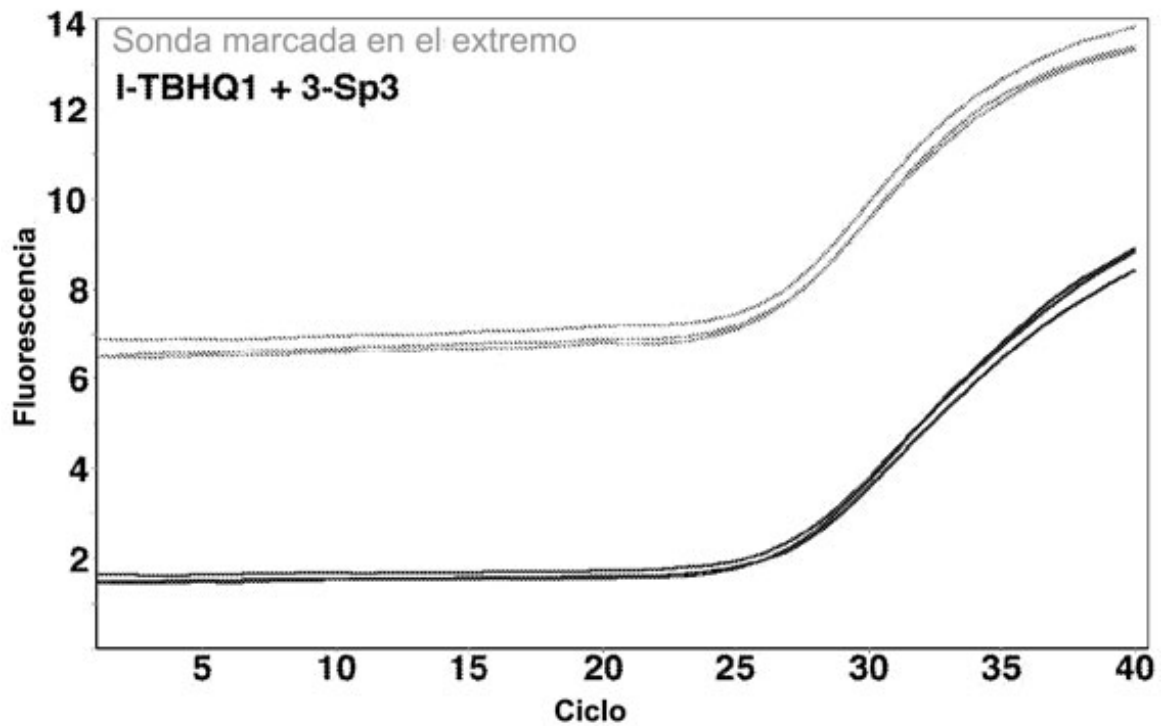
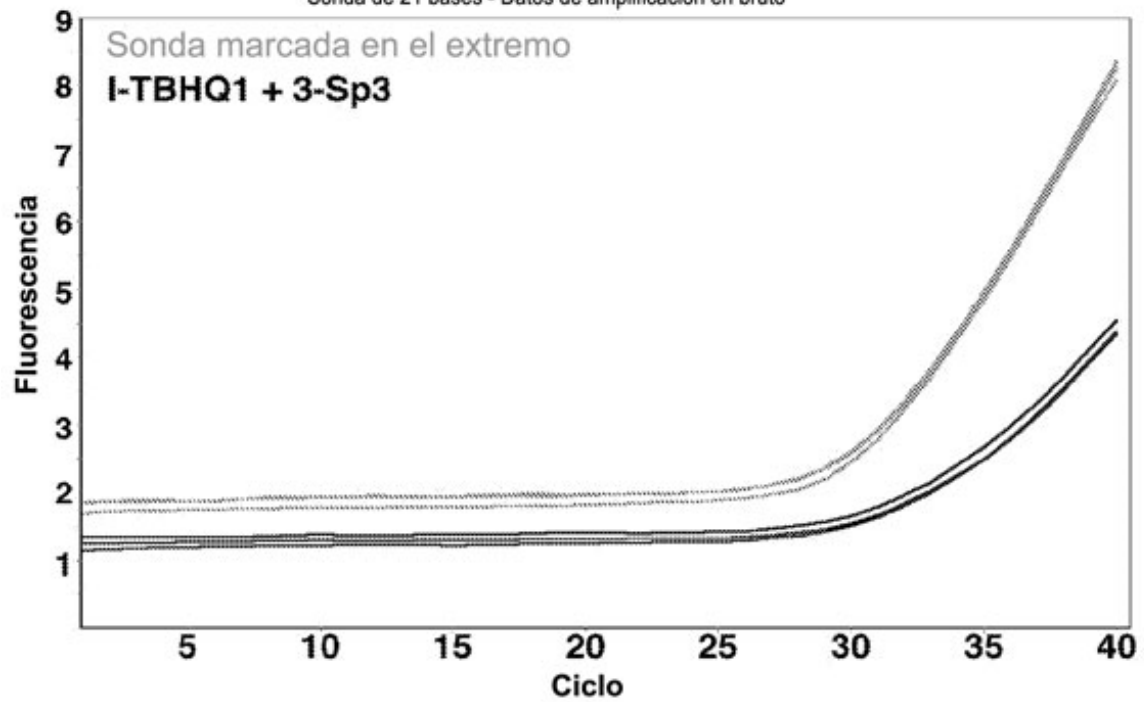


FIG. 2B

Sonda de 29 bases - Datos de amplificación en bruto

FIG. 2C

Sonda de 35 bases - Datos de amplificación en bruto

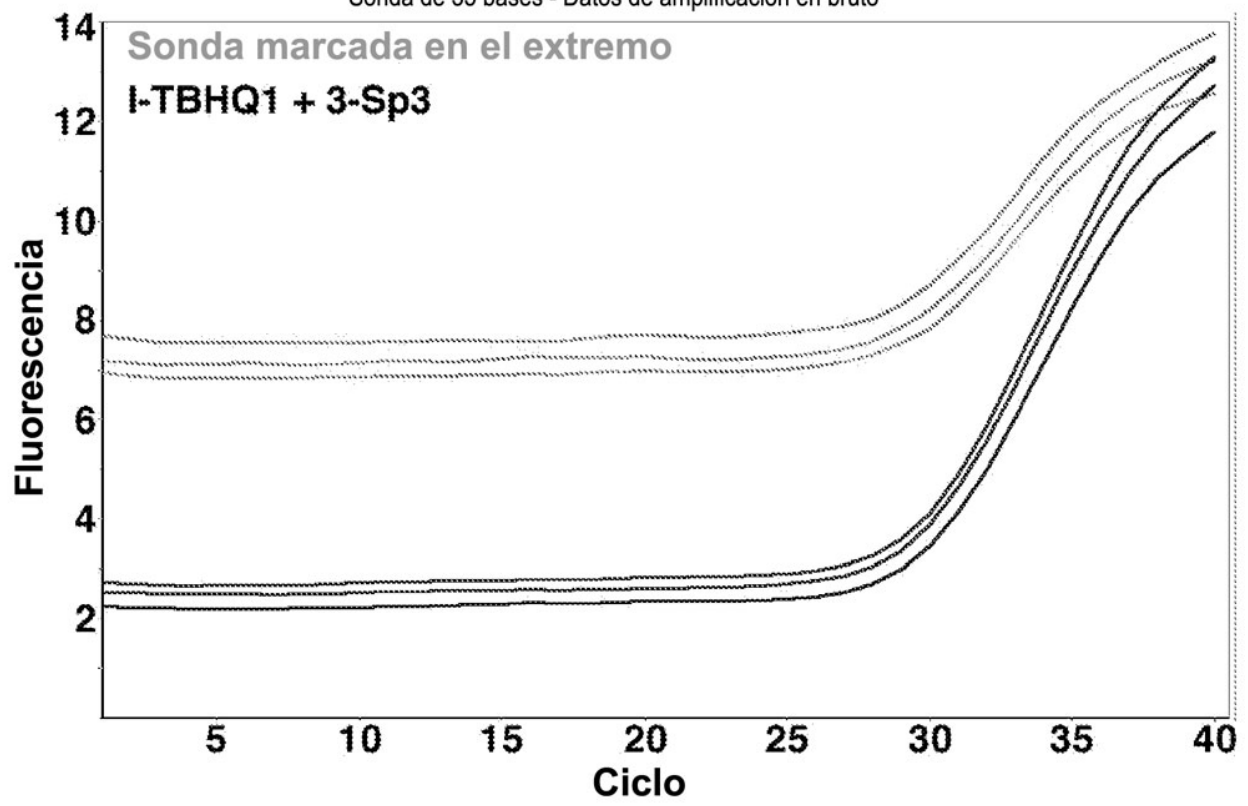


FIG. 3

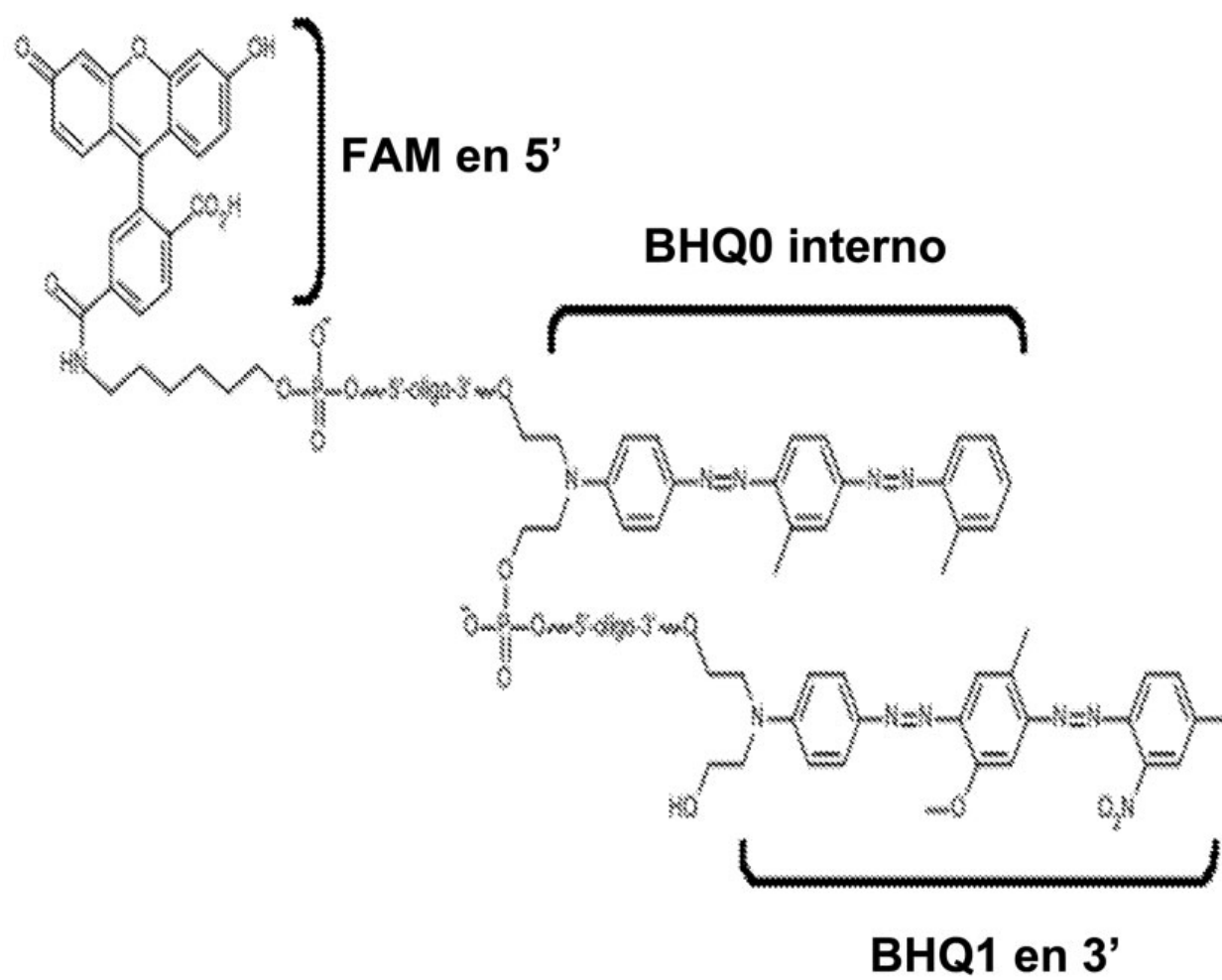


FIG. 4A

Sonda de 21 bases - Datos de amplificación en bruto

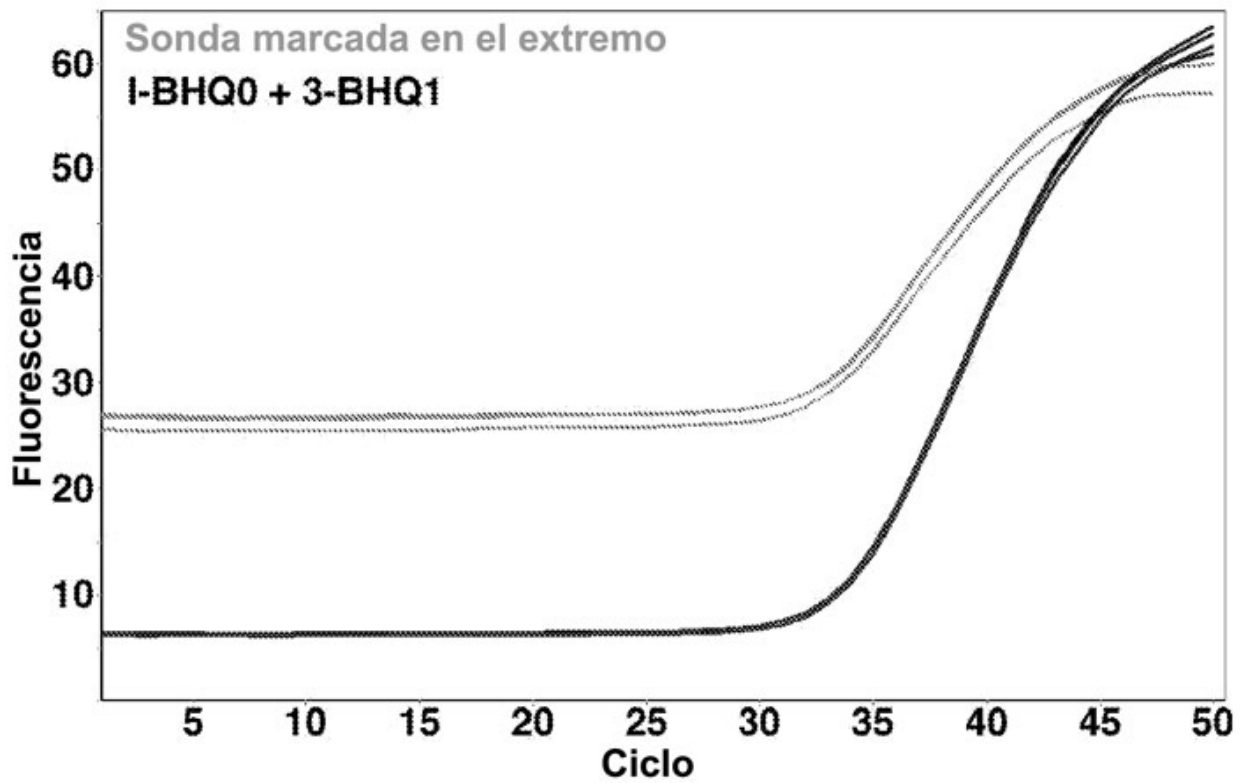
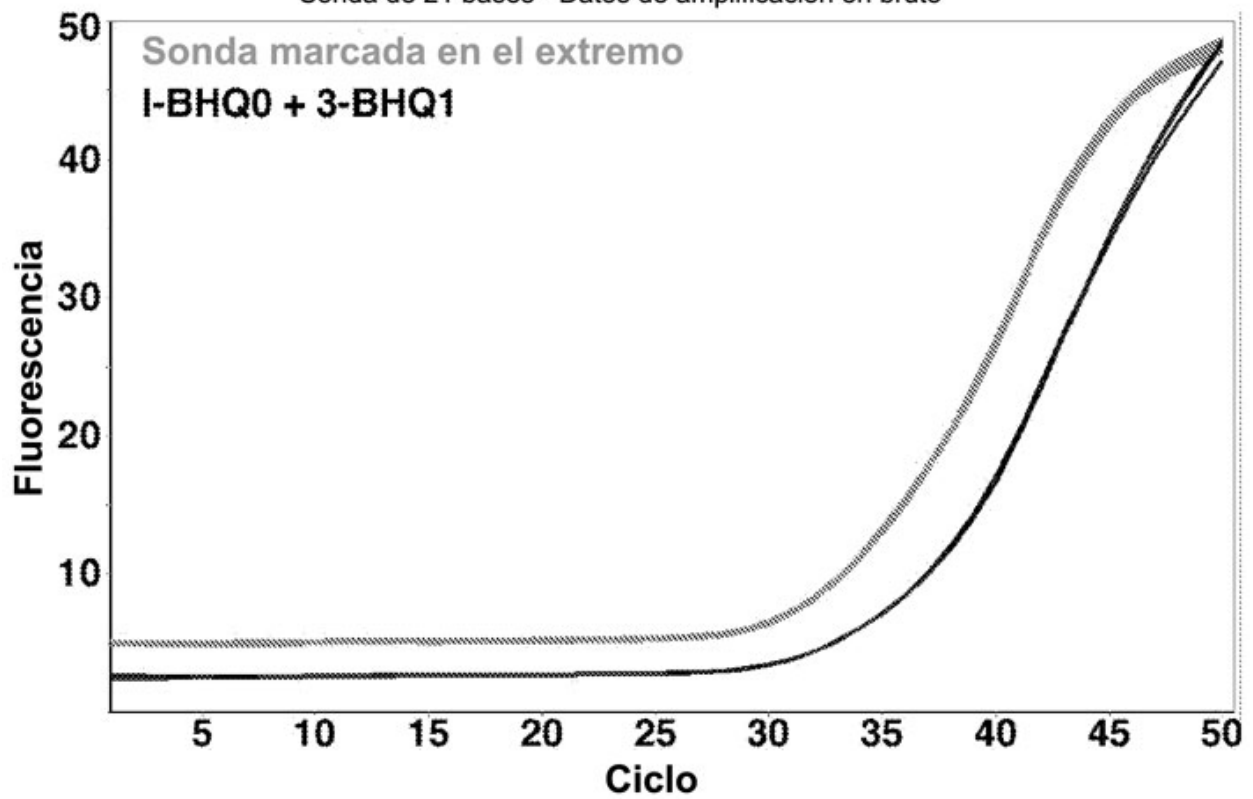


FIG. 4B

Sonda de 29 bases - Datos de amplificación en bruto

FIG. 4C

Sonda de 35 bases - Datos de amplificación en bruto

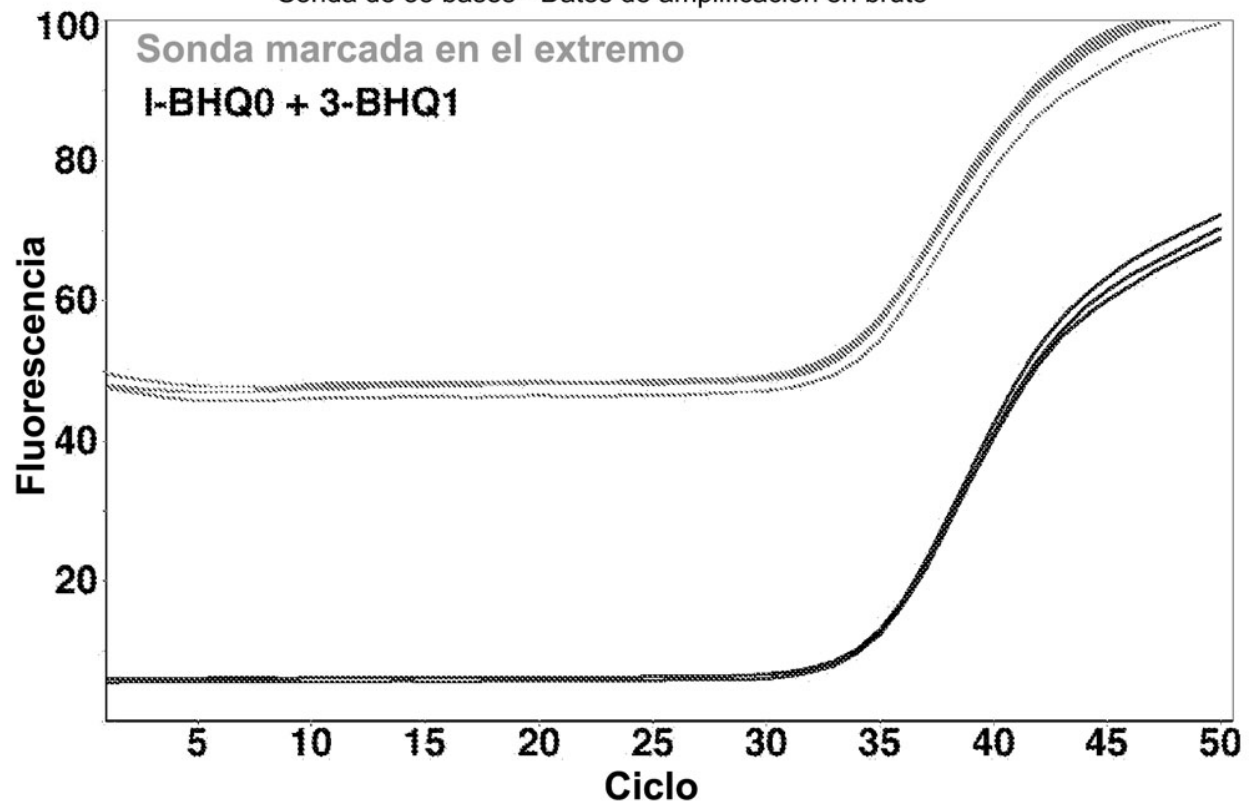


FIG. 5A

Sonda de 21 bases - Datos de amplificación en bruto

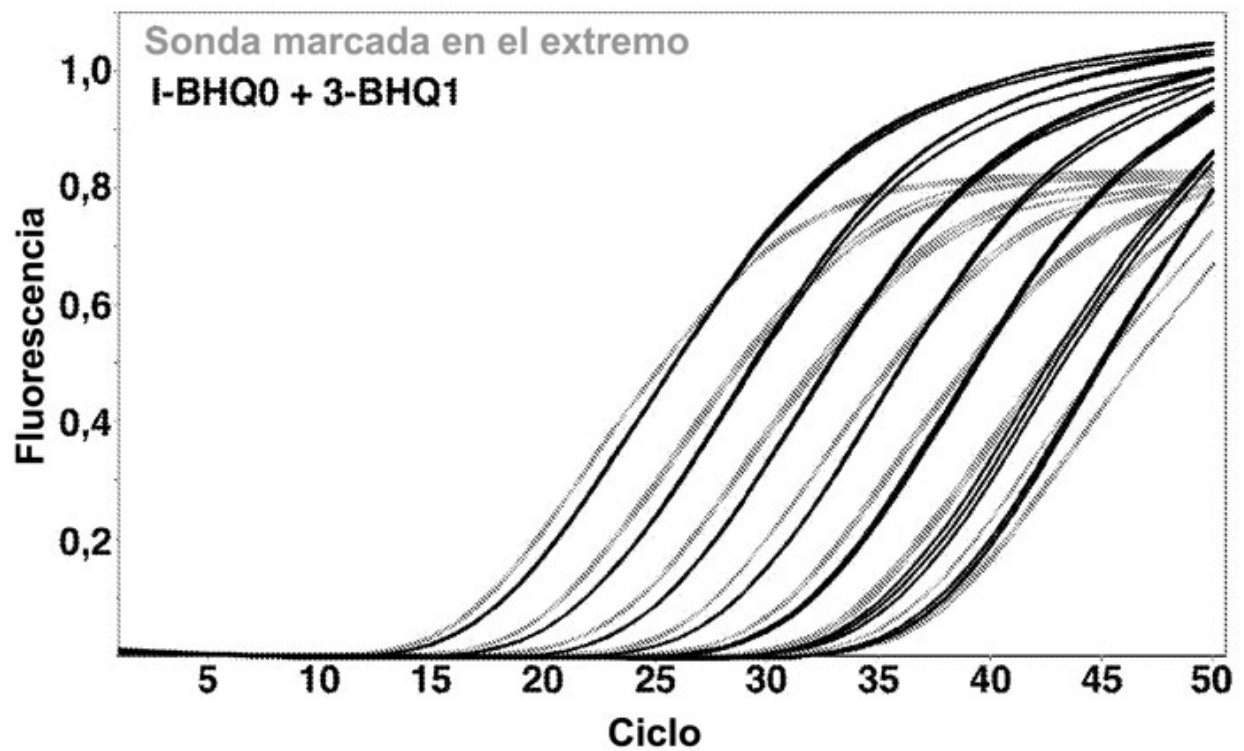
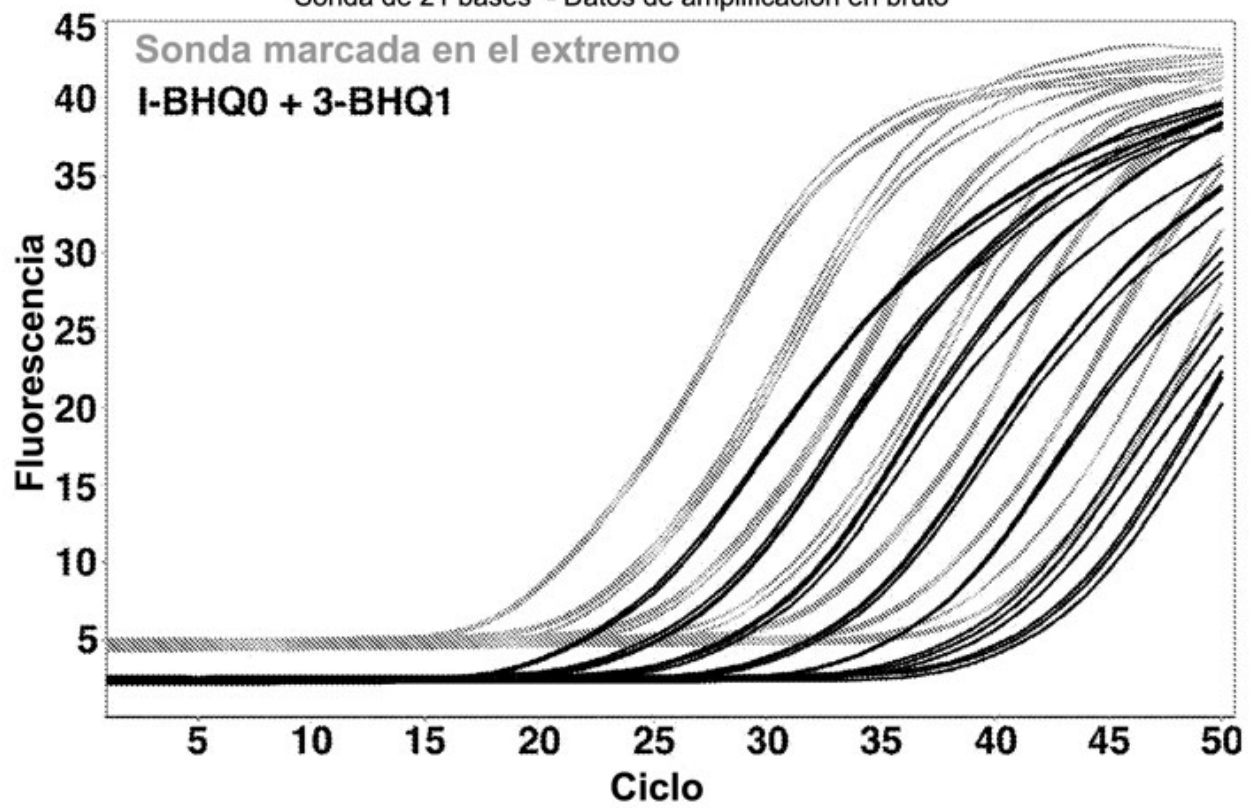


FIG. 5B

Sonda de 21 bases - Datos normalizados de amplificación

FIG. 5C

Sonda de 29 bases - Datos de amplificación en bruto

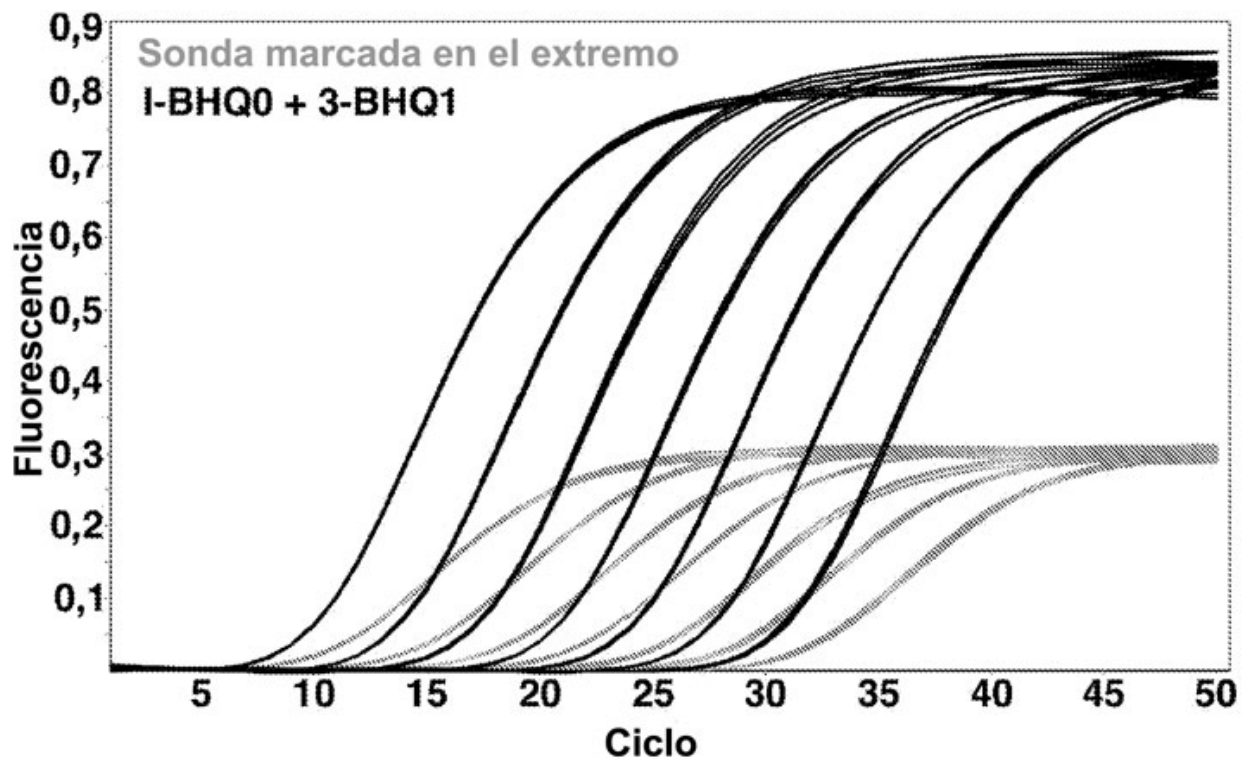
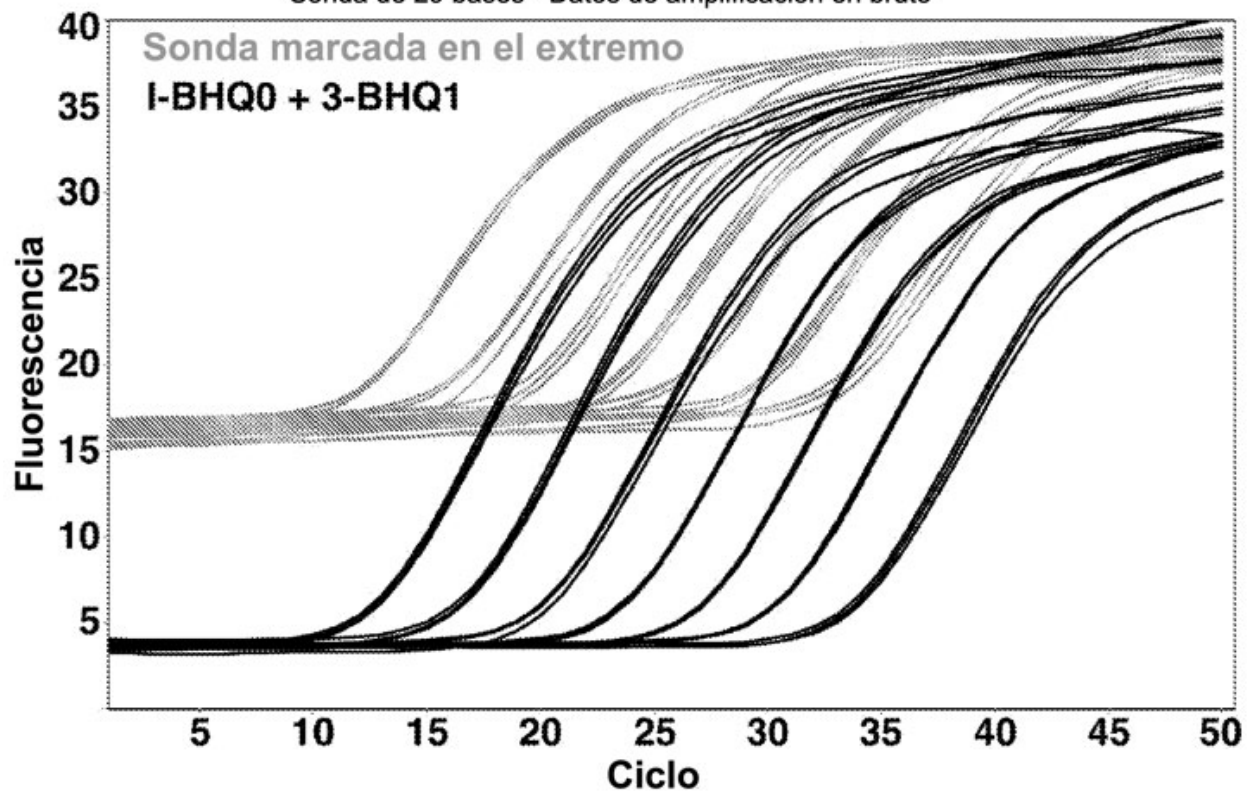


FIG. 5D

Sonda de 29 bases - Datos normalizados de amplificación

FIG. 5E

Sonda de 35 bases - Datos de amplificación en bruto

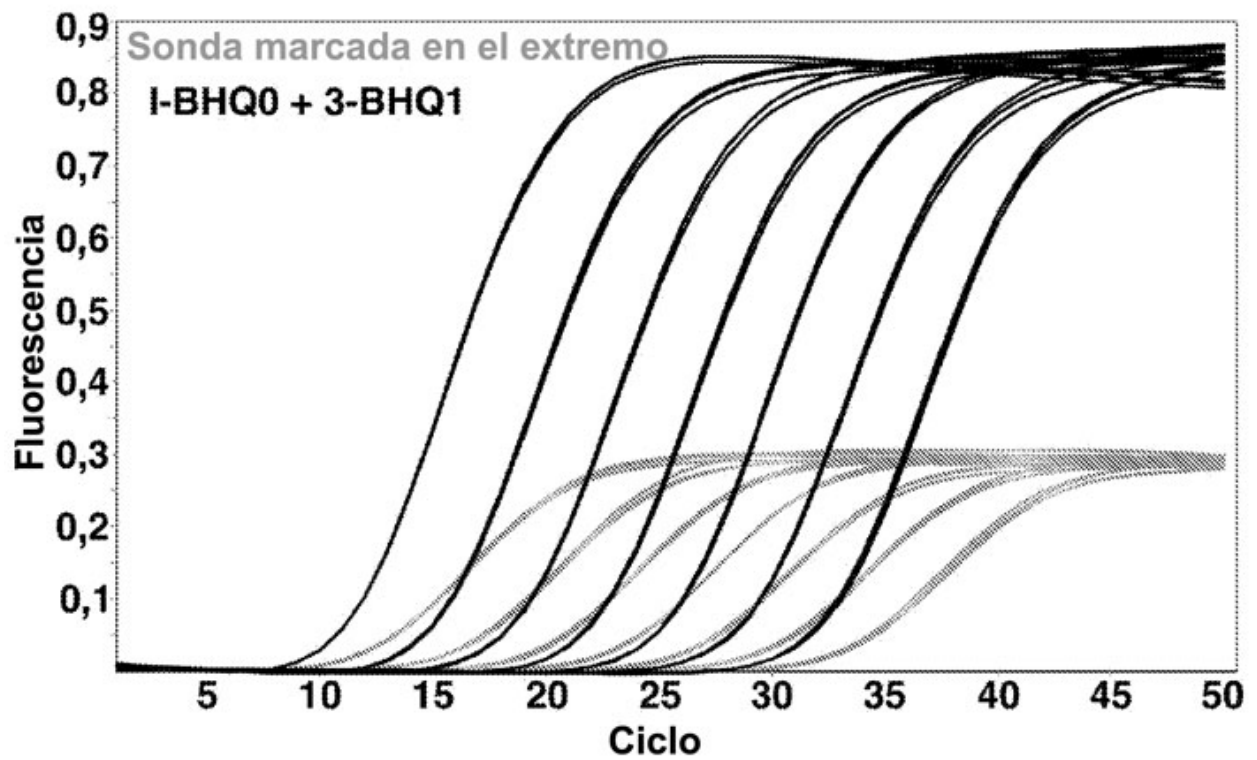
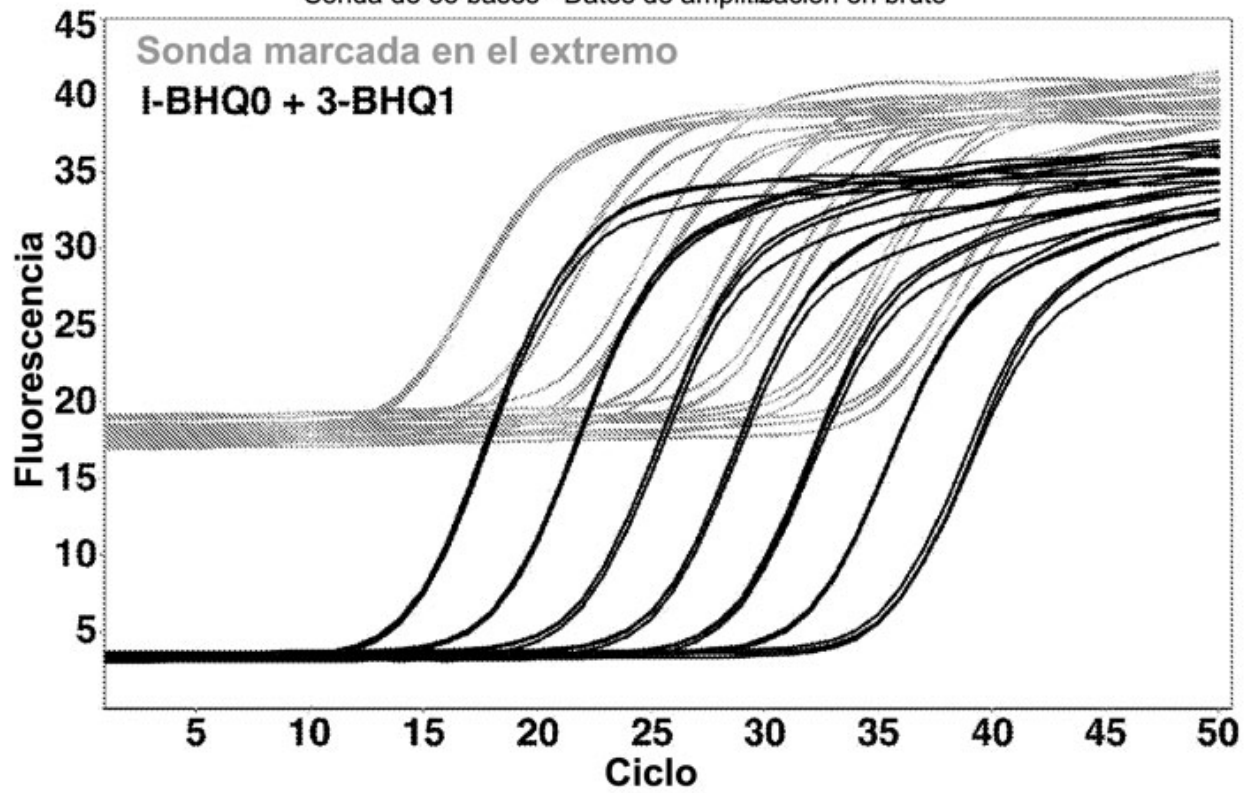


FIG. 5F

Sonda de 35 bases - Datos normalizados de amplificación

FIG. 6A

Sonda de 21 bases – I-TBHQ1 + 3-BHQ1 – Datos de amplificación en bruto

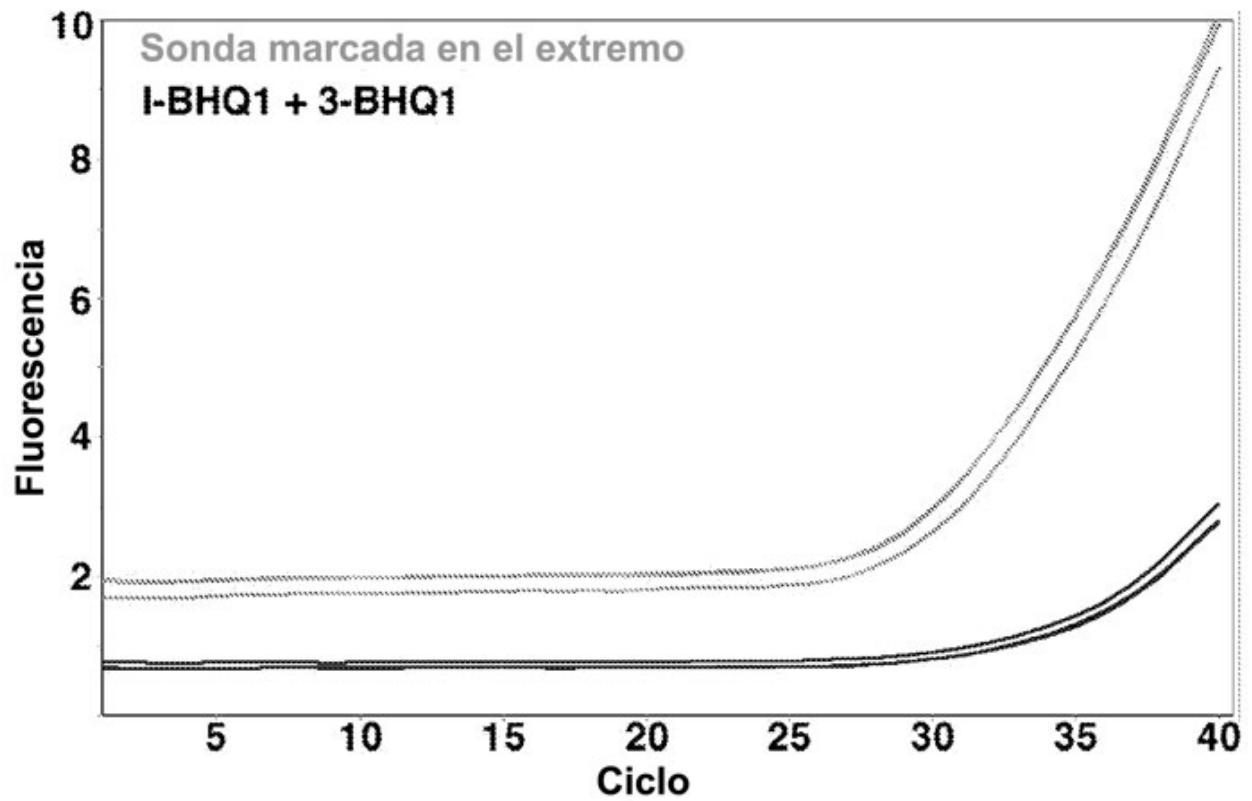
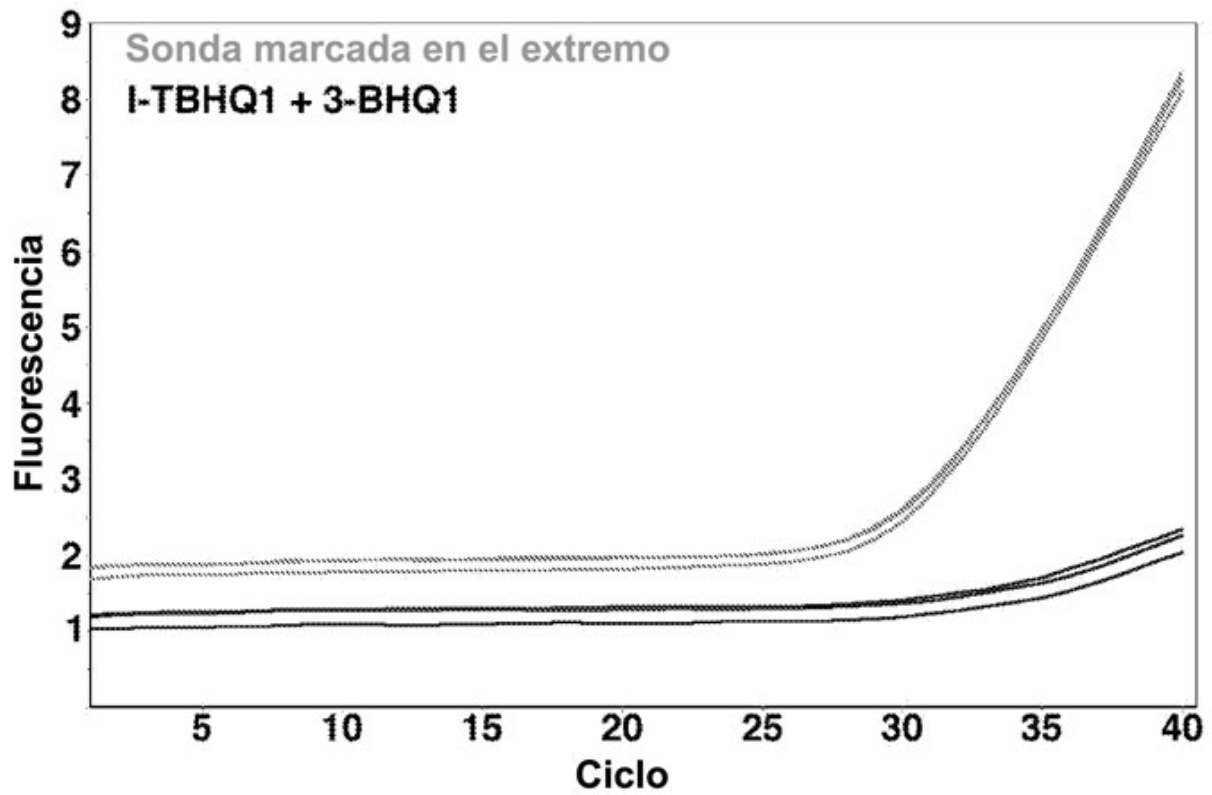


FIG. 6B

Sonda de 21 bases – I-BHQ1 + 3-BHQ1 – Datos de amplificación en bruto

FIG. 7A

Sonda de 35 bases – I-TDAB + 3-BHQ1 – Datos de amplificación en bruto

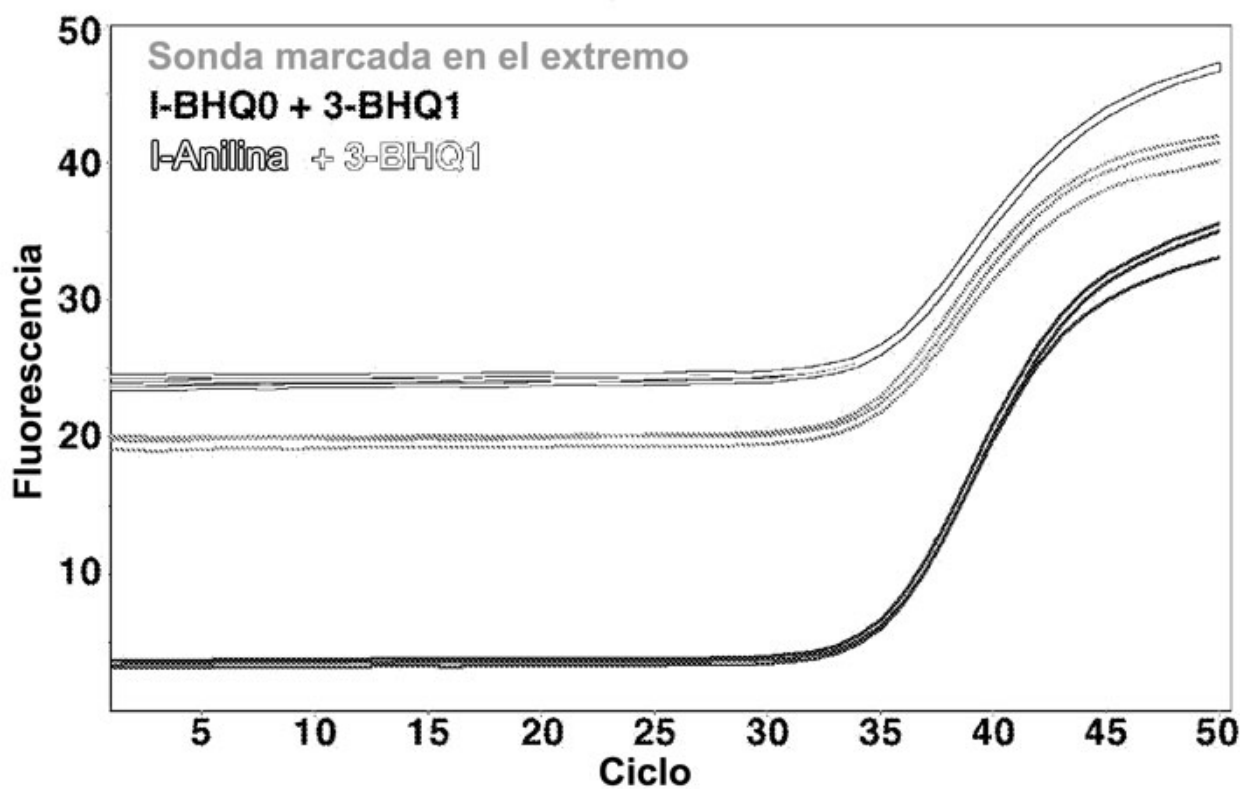
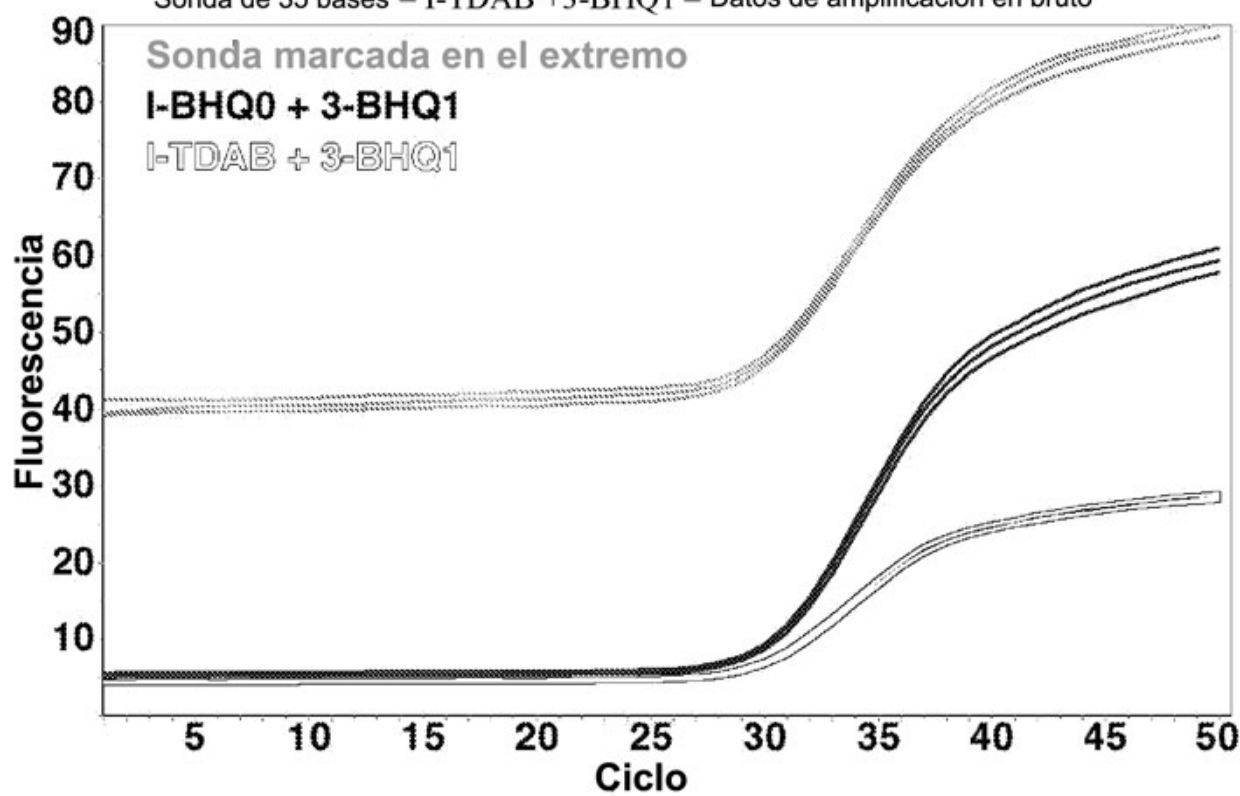


FIG. 7B

Sonda de 35 bases - I-anilina + 3-BHQ1 – Datos de amplificación en bruto

FIG. 8A

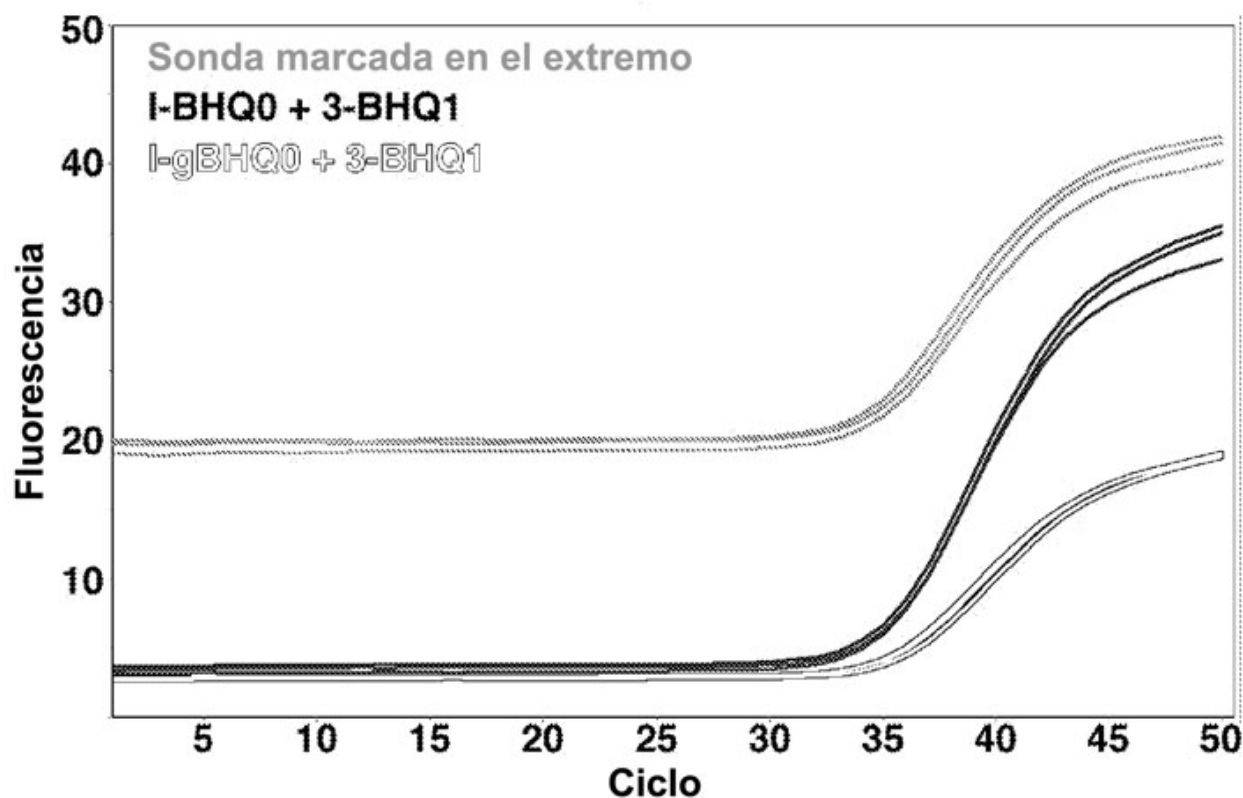
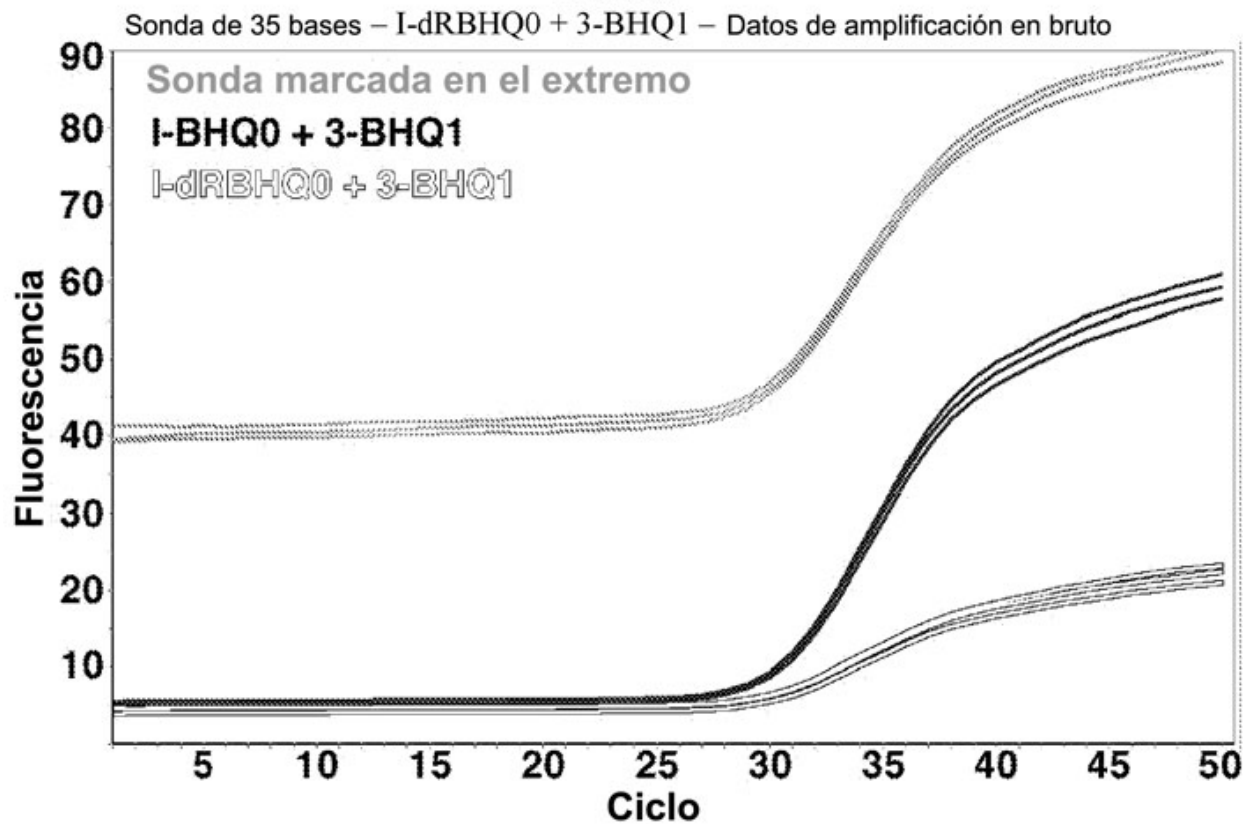


FIG. 8B

Sonda de 35 bases – I-gBHQ0 + 3-BHQ1 – Datos de amplificación en bruto

FIG. 9A

Sonda de 35 bases – I-BHQ0 + 3-Sp3 – Datos de amplificación en bruto

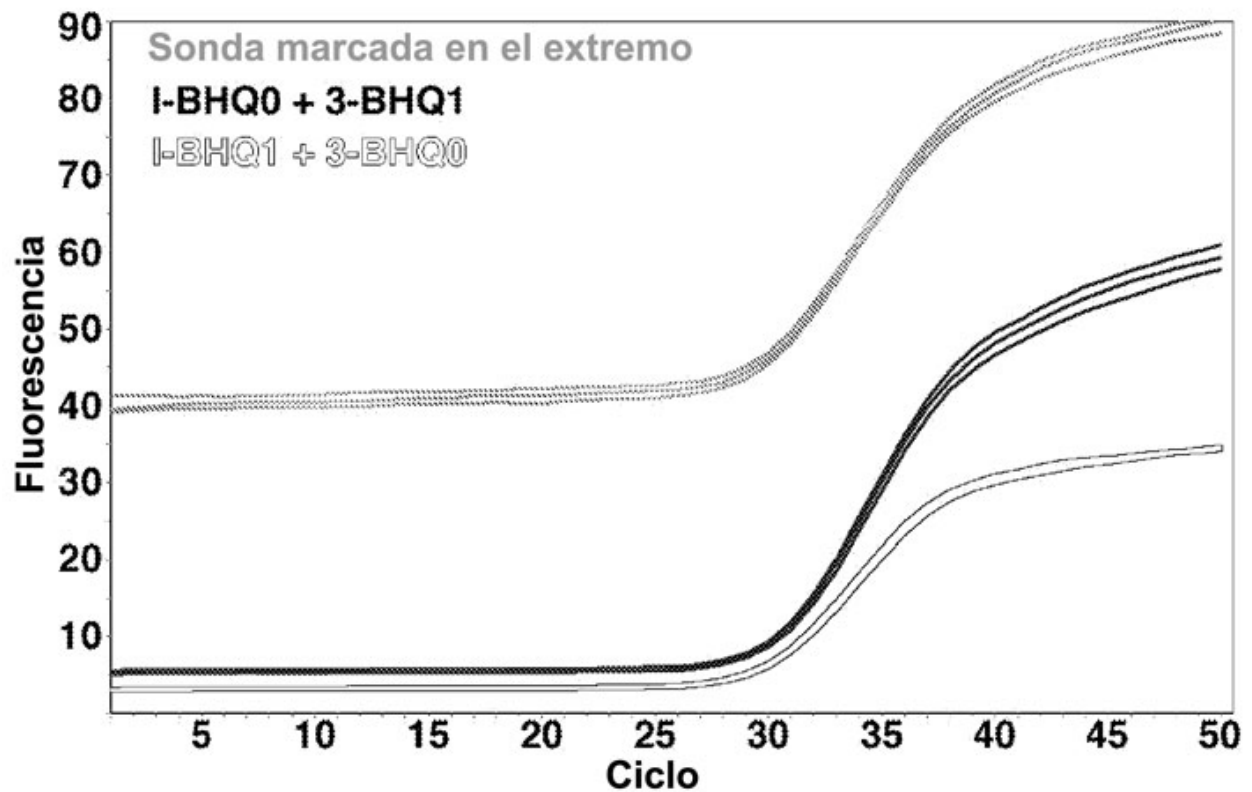
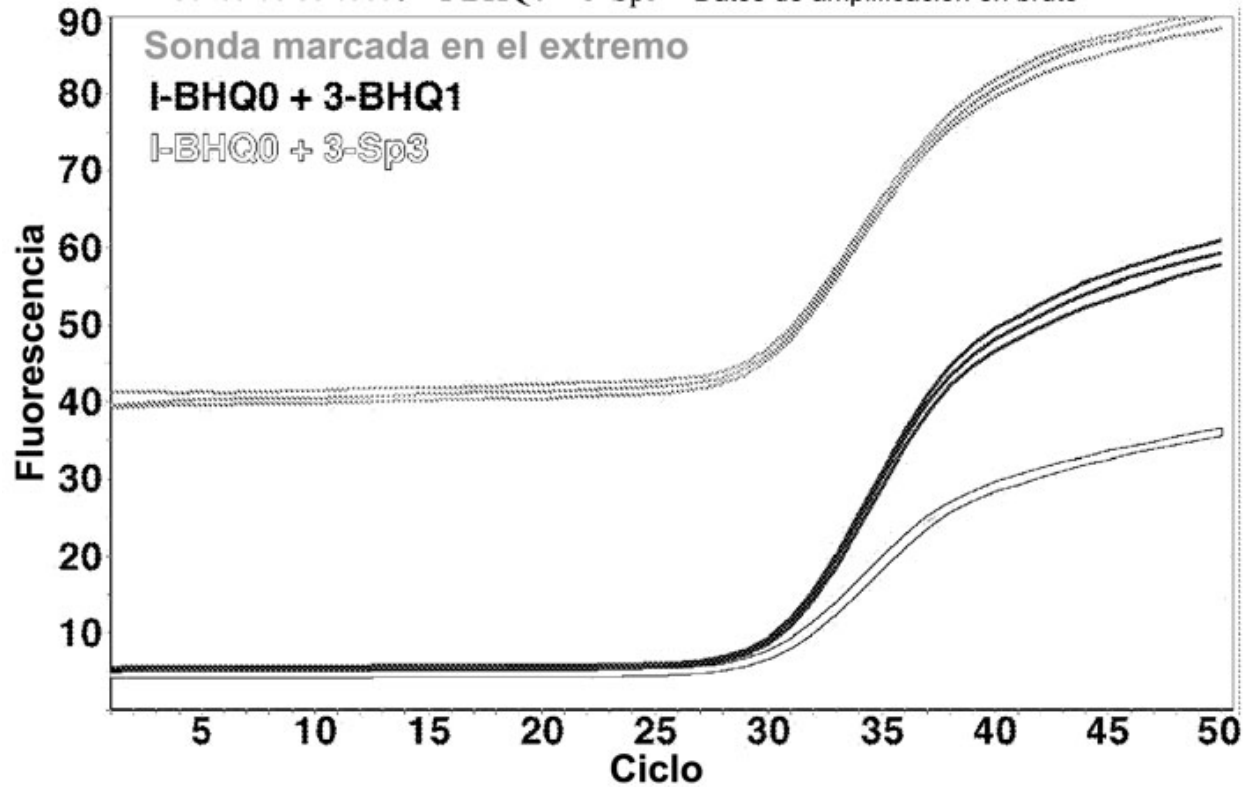


FIG. 9B

Sonda de 35 bases – I-BHQ1 + 3-BHQ0 – Datos de amplificación en bruto

FIG. 10

Sonda de 35 bases - I-BHQ0+ 3-BHQ1 - Datos de amplificación en bruto

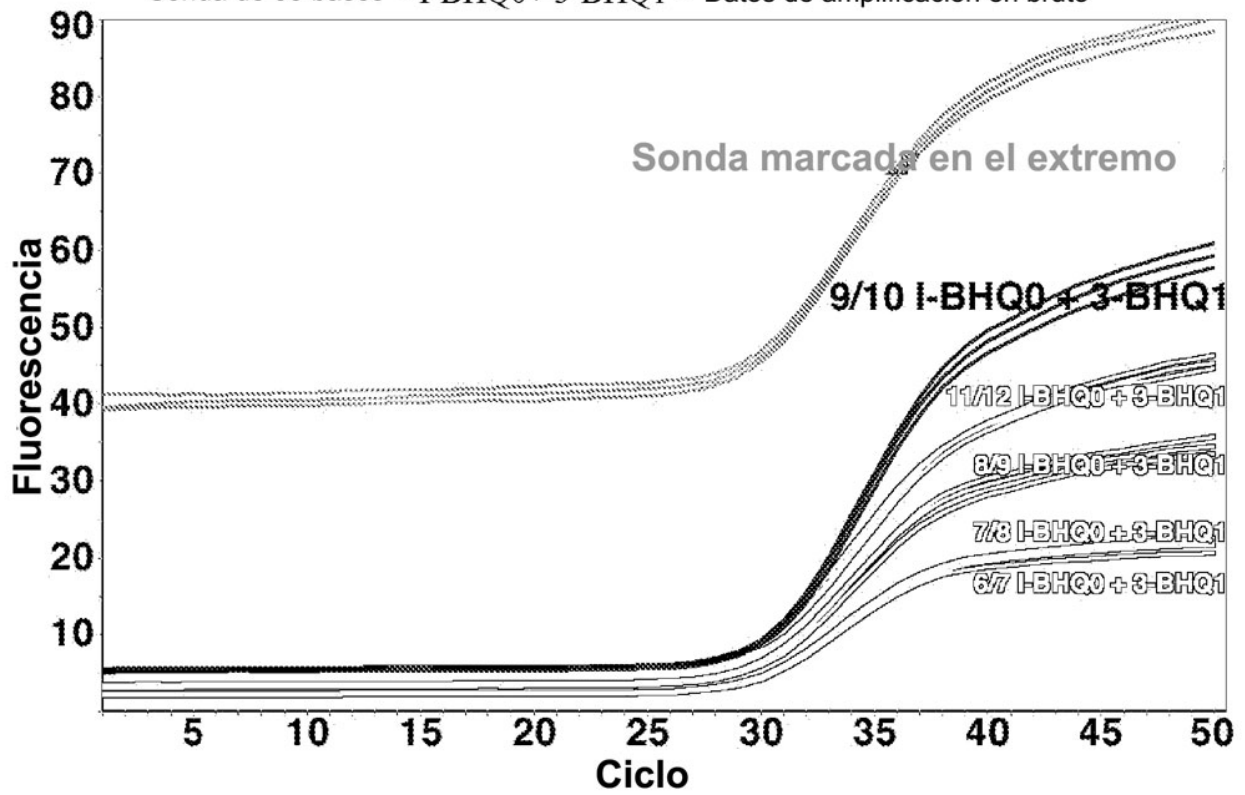


FIG. 11A

Sonda de 21 bases - Datos en bruto de la curva de fusión

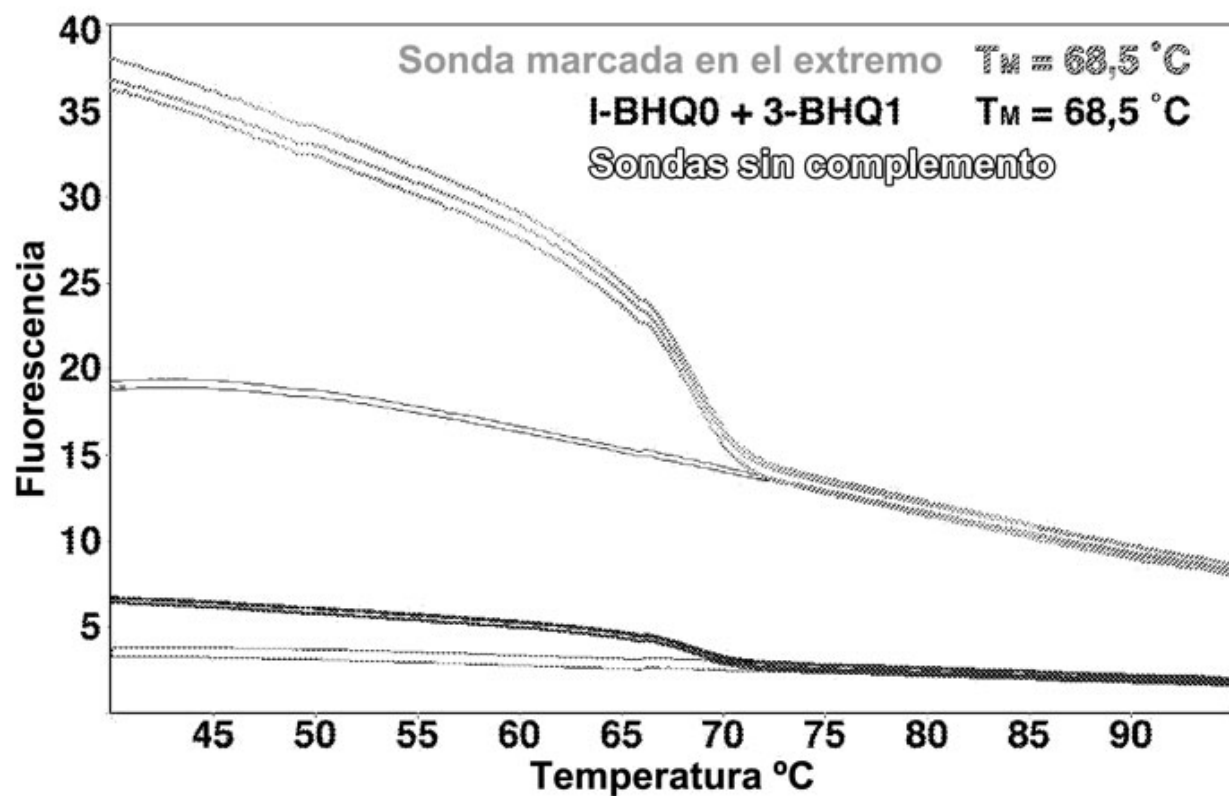
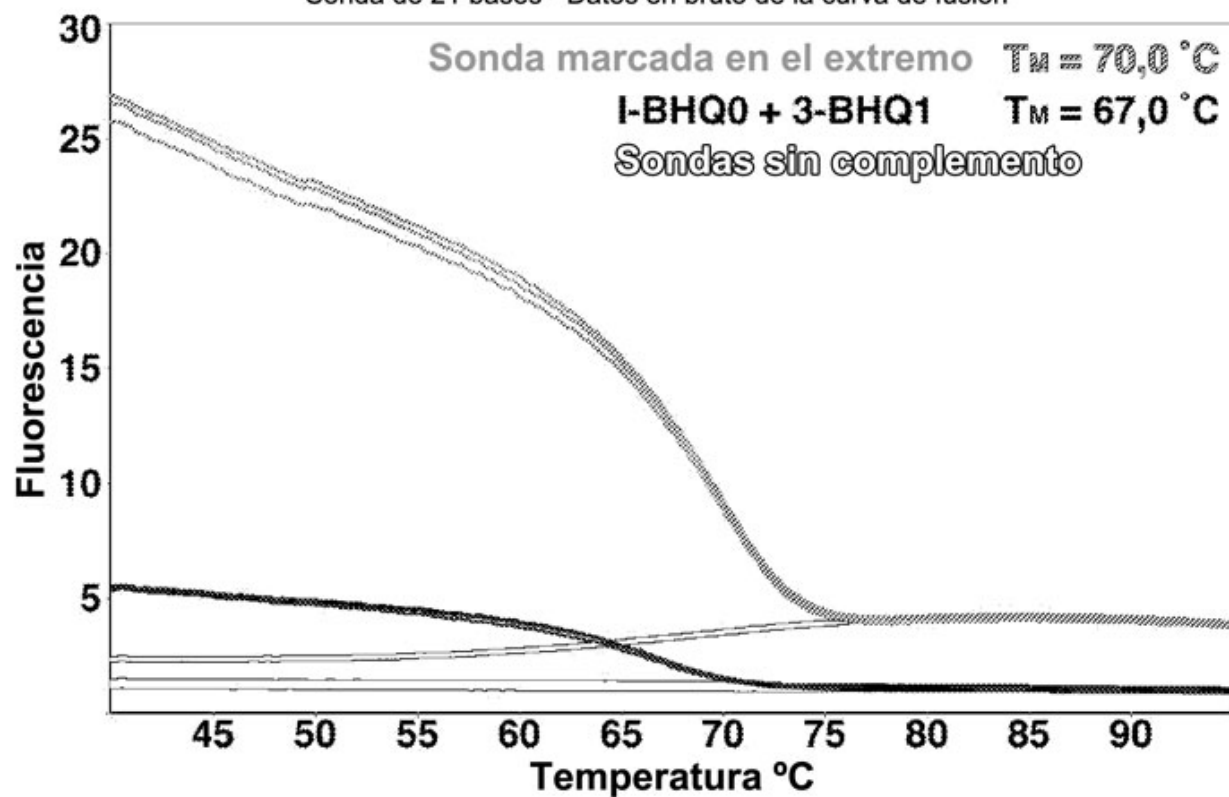


FIG. 11B

Sonda de 29 bases - Datos en bruto de la curva de fusión

FIG. 11C

Sonda de 35 bases - Datos en bruto de la curva de fusión

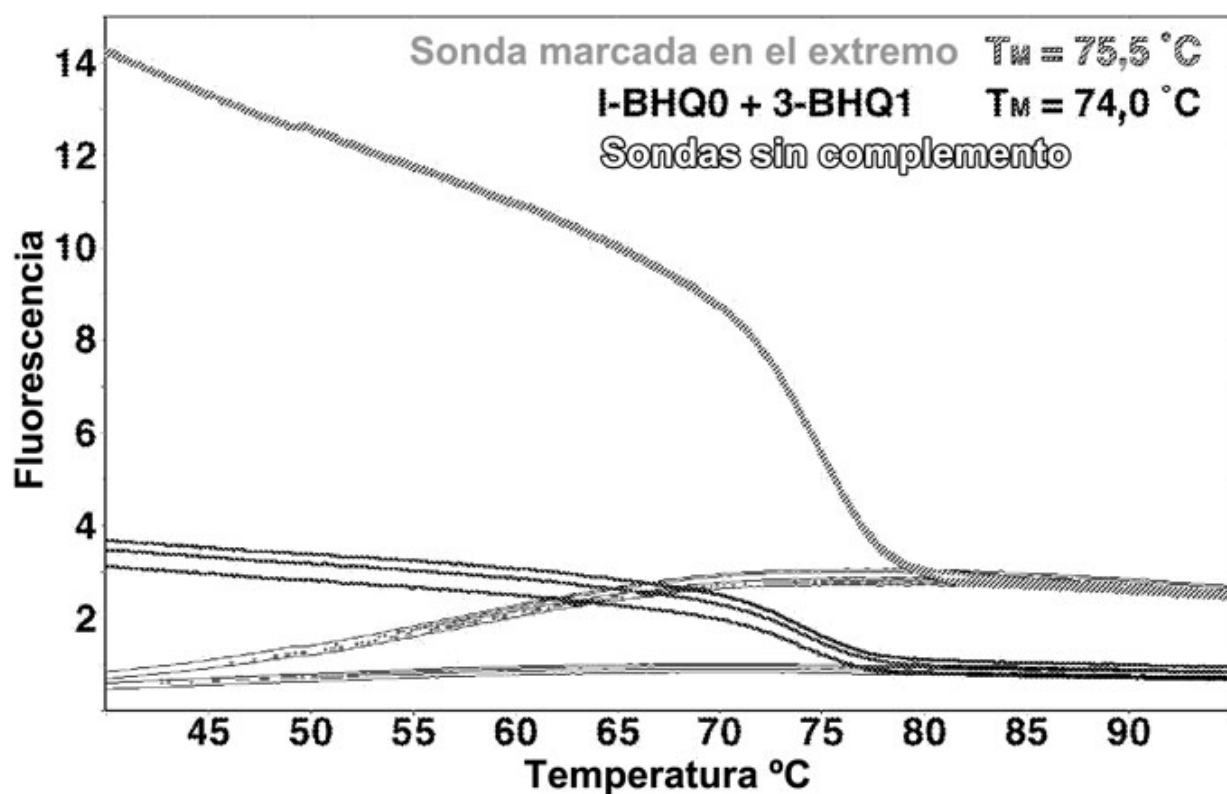
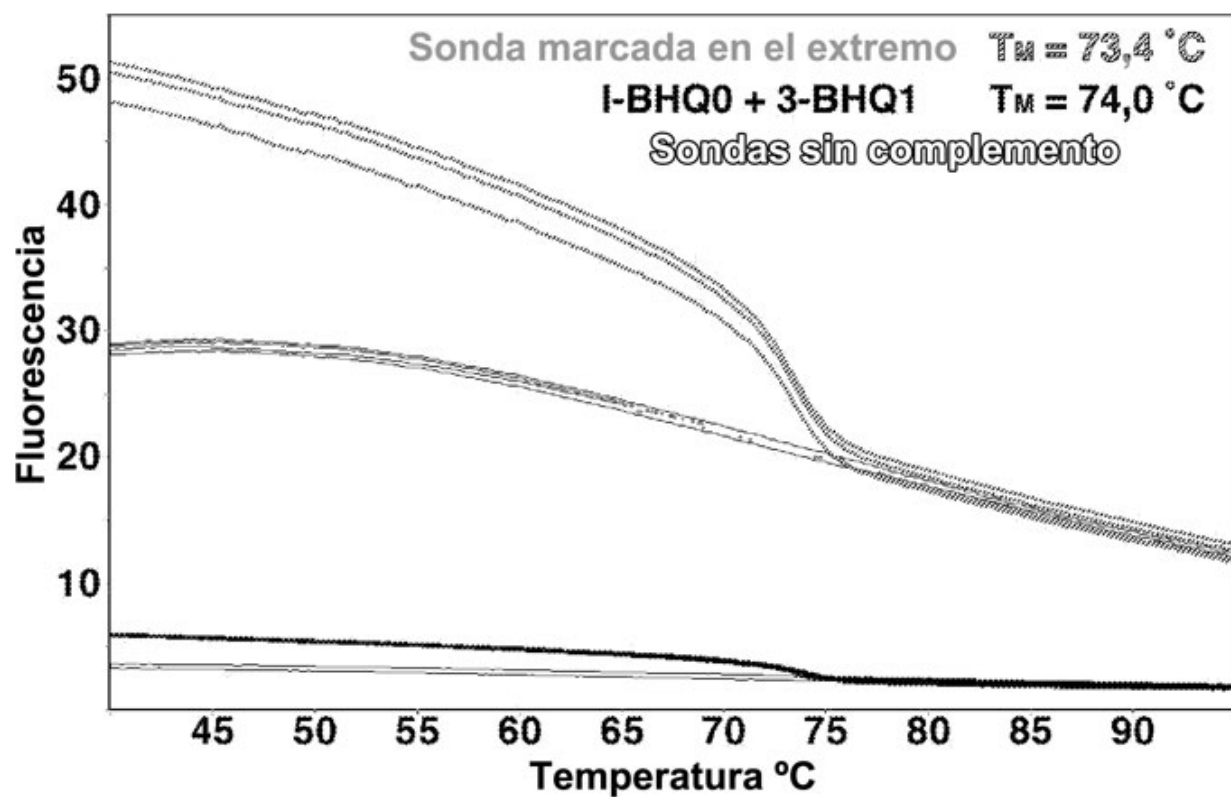


FIG. 11D

Sonda de 20 bases - Secuencia 10000TU - Datos en bruto de la curva de fusión

FIG. 11E

Sonda de 20 bases - Secuencia 10004TD - Datos en bruto de la curva de fusión

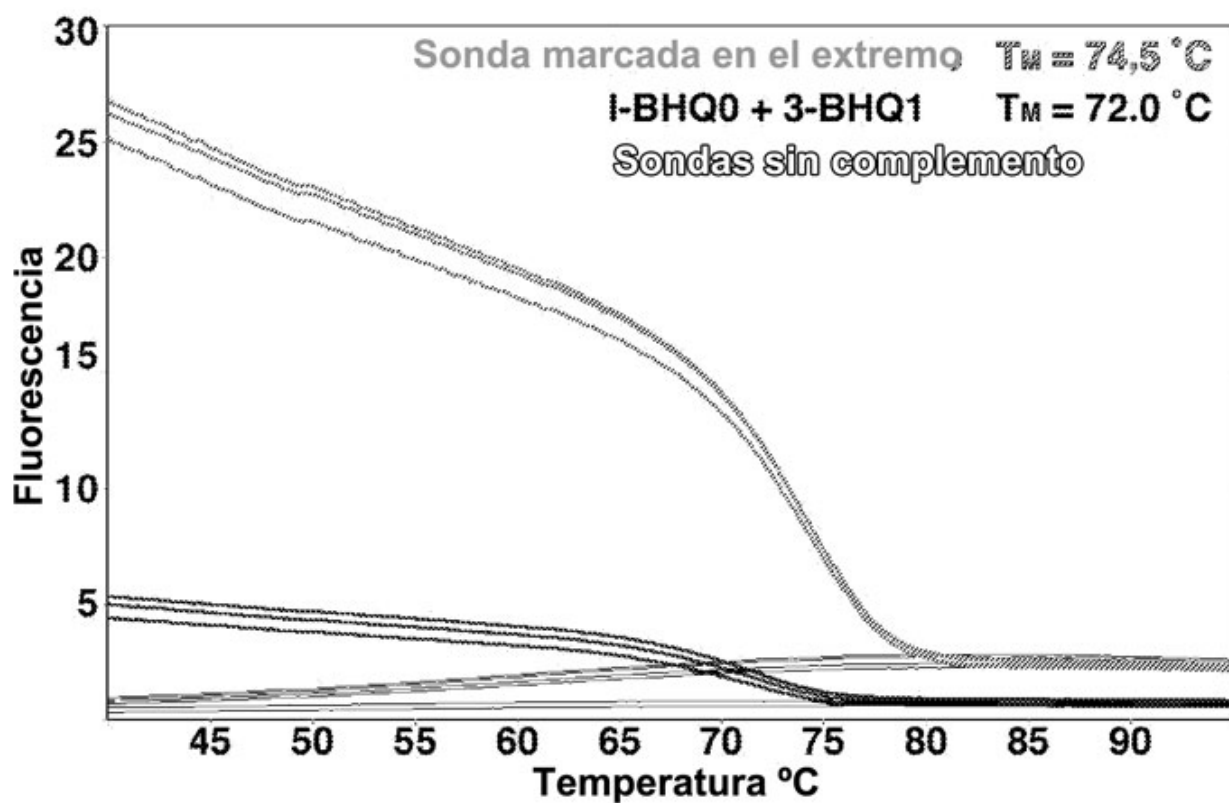
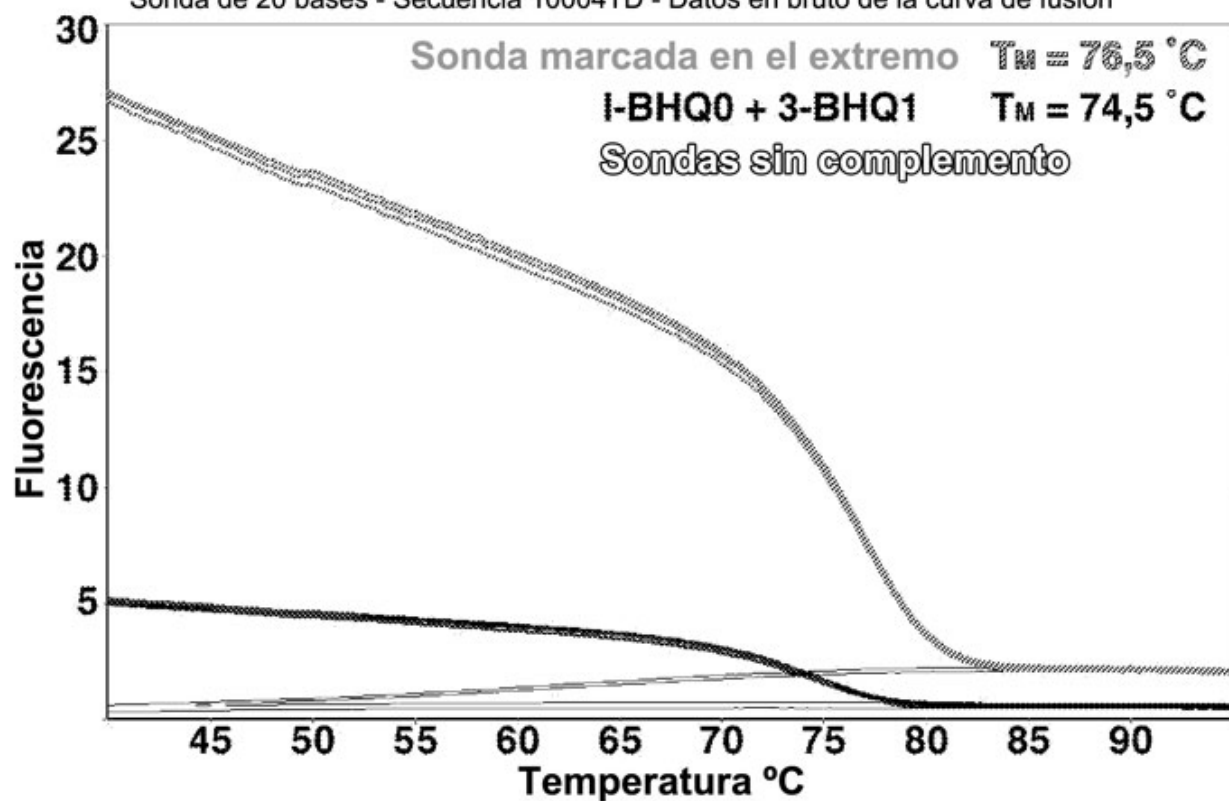


FIG. 11F

Sonda de 20 bases - Secuencia 10007TU - Datos en bruto de la curva de fusión

FIG. 11G

Sonda de 25 bases - Secuencia 10005TD - Datos en bruto de la curva de fusión

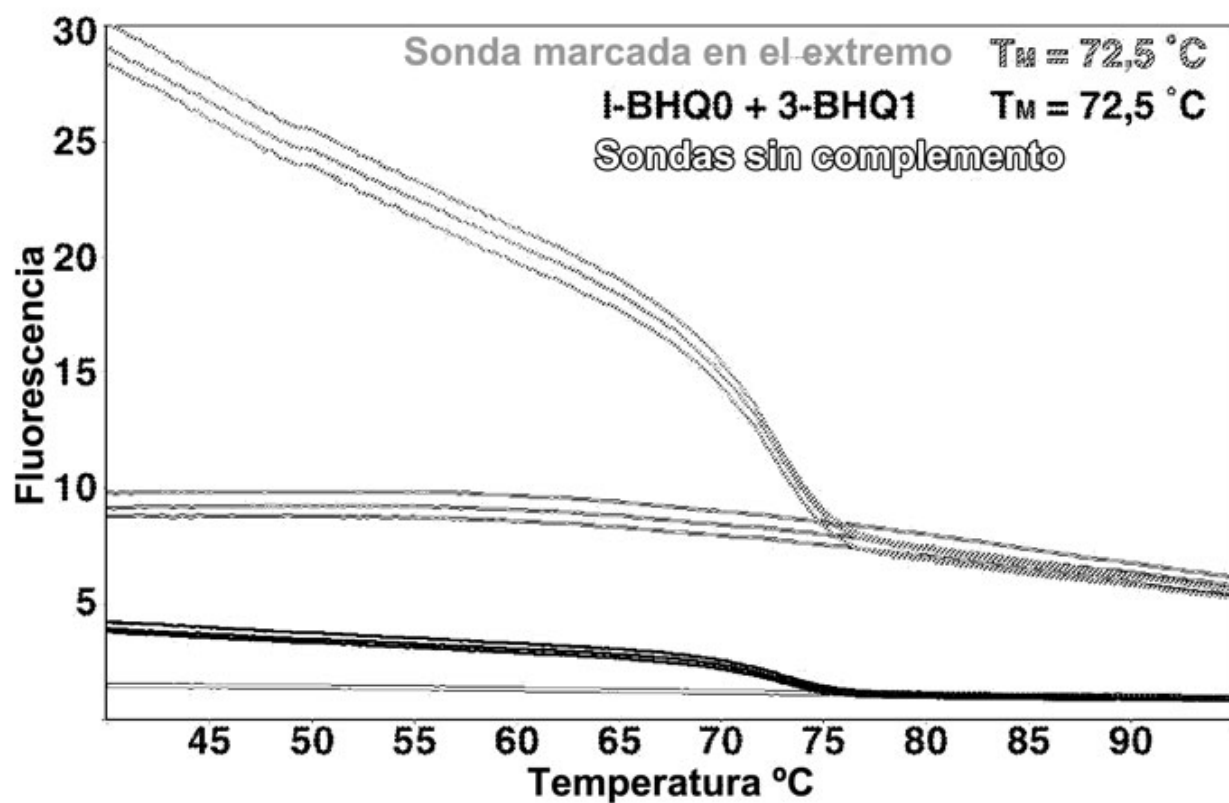
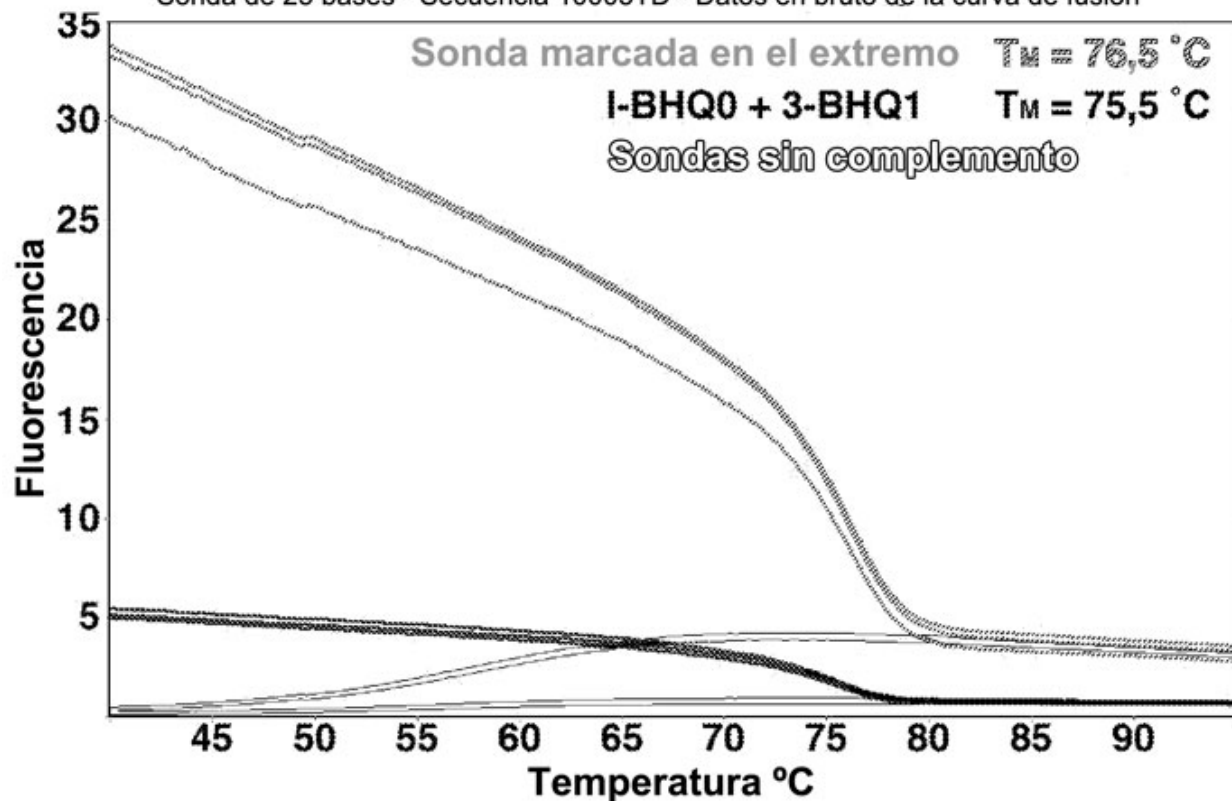


FIG. 11H

Sonda de 25 bases - Secuencia 10009TD - Datos en bruto de la curva de fusión

FIG. 11I

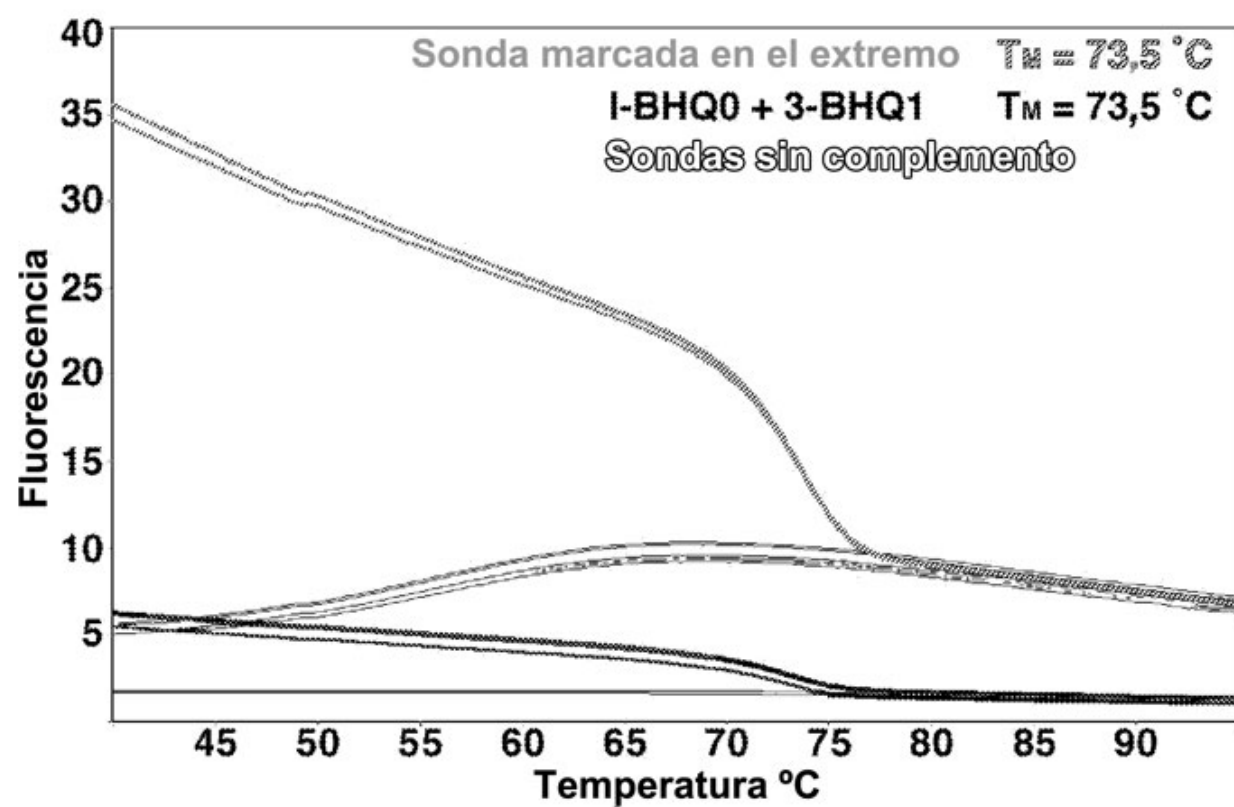
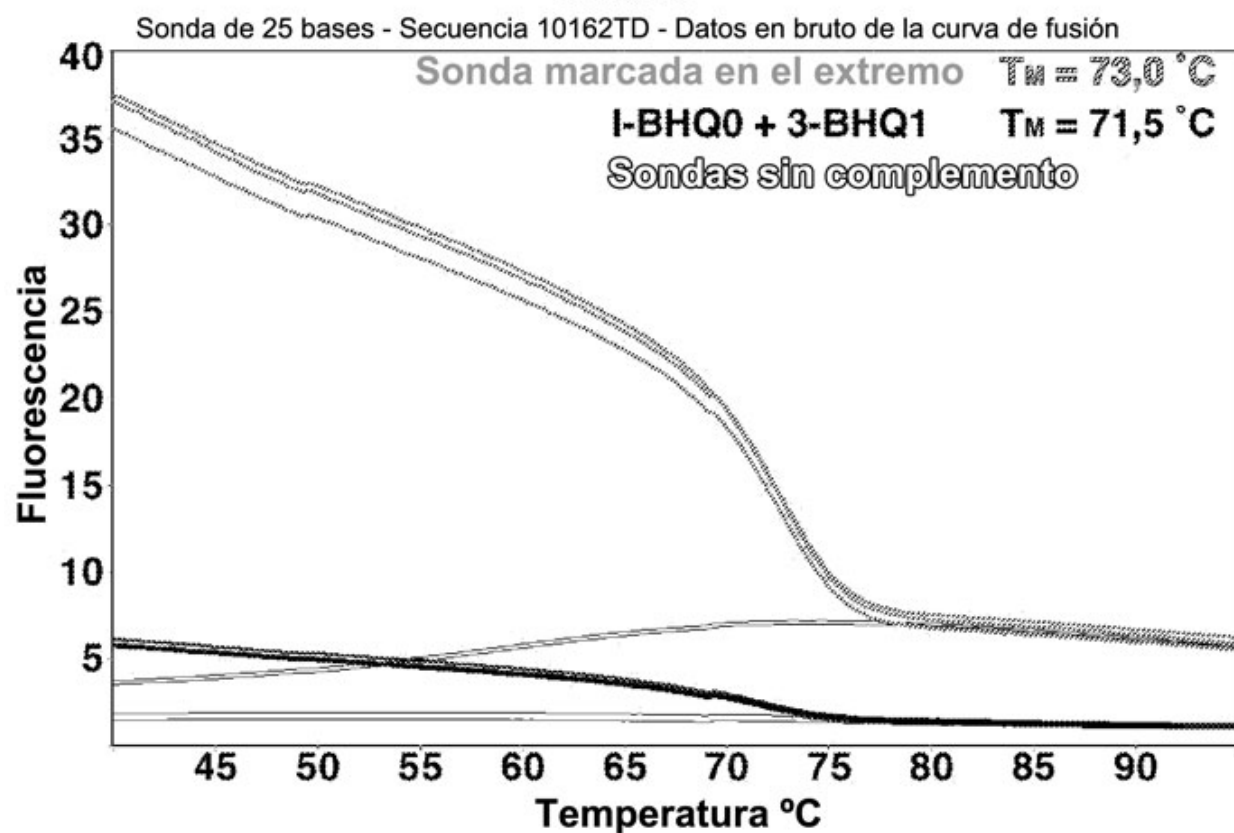


FIG. 11J

Sonda de 30 bases - Secuencia 10002TD - Datos en bruto de la curva de fusión

FIG. 11K

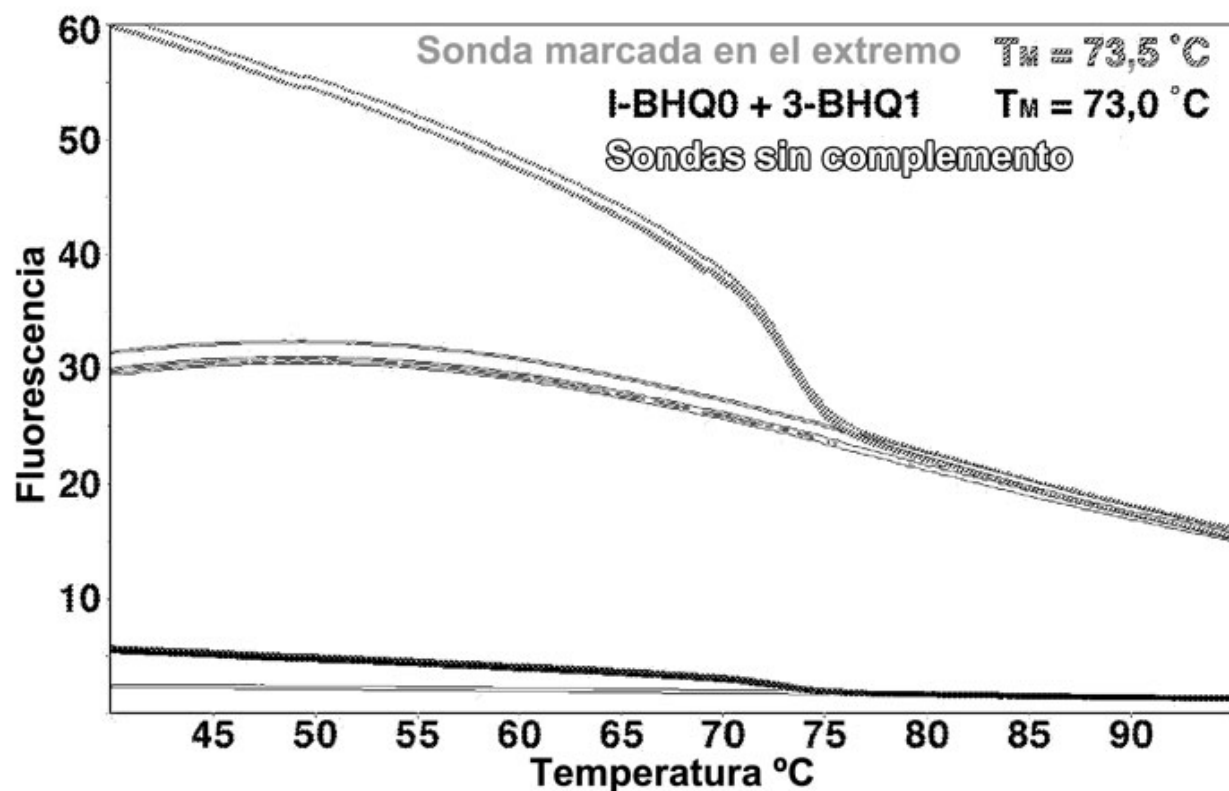
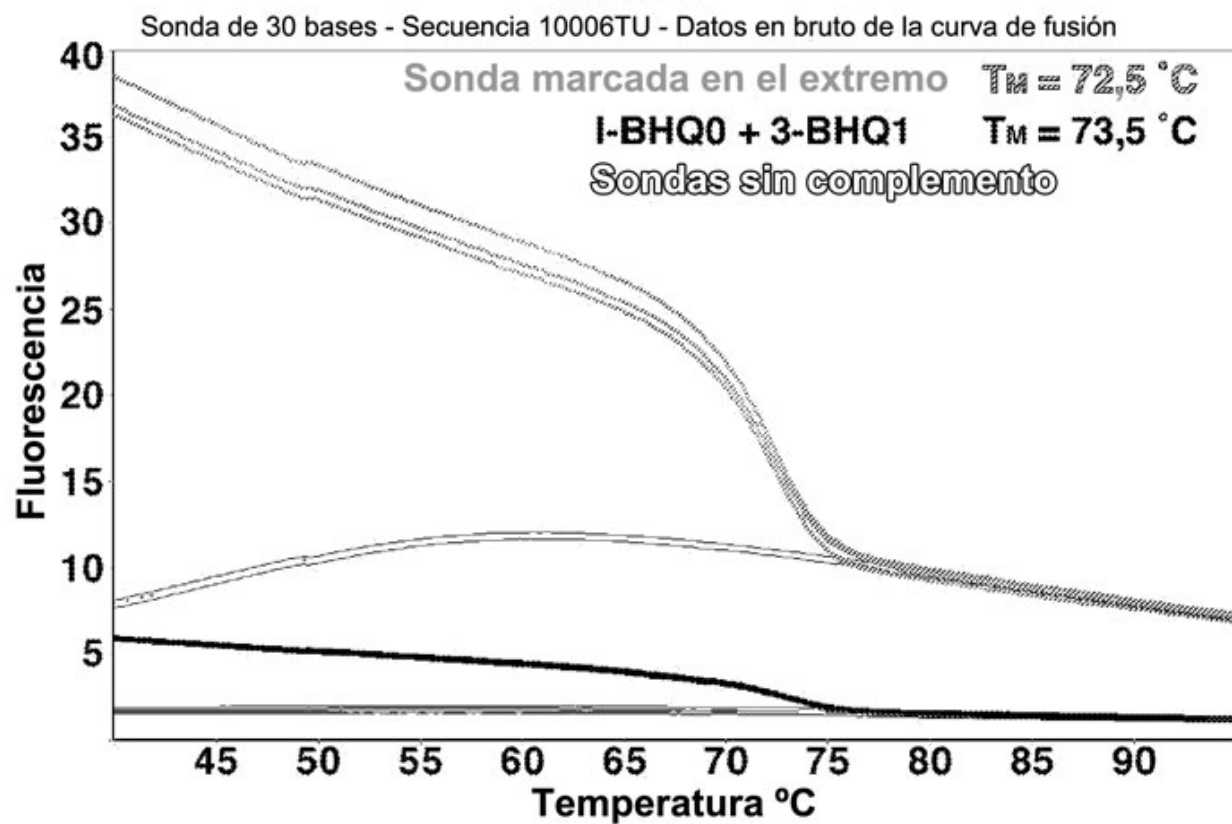


FIG. 11L

Sonda de 30 bases - Secuencia 10014TU - Datos en bruto de la curva de fusión