



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 341 669**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06705275 .3**

96 Fecha de presentación : **03.03.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1853722**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2007**

54 Título: **Métodos y composiciones para la detección y el análisis de ácidos nucleicos por amplificación de señal.**

30 Prioridad: **03.03.2005 US 657717 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.06.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.06.2010

73 Titular/es:
**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
Building M58, 1200 Montreal Road
Ottawa, Ontario K1A 0R6, CA**

72 Inventor/es: **Leclerc, Mario y
Ho, Hoang-Anh**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 341 669 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para la detección y el análisis de ácidos nucleicos por amplificación de señal.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos, artículos y composiciones para la detección y el análisis de ácidos nucleicos en una muestra. Más específicamente, la invención se refiere a un sistema integrado novedoso de detección de polinucleótido por amplificación de señal exento de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que combina un receptor específico, un transductor óptico y un mecanismo de amplificación. El sistema de la presente invención es altamente sensible, permitiendo la detección específica de oligonucleótidos y polinucleótidos presentes en pequeñas cantidades (concretamente, del orden de aproximadamente 20 copias).

Antecedentes de la invención

15 Son necesarios biosensores de ADN sencillos y ultrasensibles específicos de secuencia para el diagnóstico rápido de infecciones y enfermedades genéticas, así como para aplicaciones ambientales y forensicas¹. Con este fin, se han propuesto diversos sensores de ADN ópticos y electroquímicos²⁻⁸. Sin embargo, la mayoría de estos sensores de ADN propuestos se basan en alguna forma de amplificación química tal como PCR⁹, que a su vez puede requerir el uso de mezclas complejas y aparatos sofisticados para efectuar las reacciones enzimáticas necesarias.

Más recientemente, se han descrito métodos rápidos de detección de ADN basados en fluorescencia basados en polímeros catiónicos conjugados hidrosolubles^{10-14, 23-26}. En este caso, se usa un polímero policatiónico como multicromóforo que recoge la luz (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n° US 2004/0219556 A1 (4 de noviembre de 2004) (Bazan *et al.*)). Se proporciona un sensor basado en un ácido nucleico peptídico neutro (PNA) y que tiene un cromóforo de señalización que tiene una secuencia de bases complementaria de un polinucleótido diana de interés. Tras la puesta en contacto del polinucleótido diana en una muestra, se lleva el multicromóforo policatiónico a la proximidad del cromóforo de señalización mediante interacciones electrostáticas con el polinucleótido diana. La excitación del multicromóforo produce entonces la emisión de luz del cromóforo de señalización. Aunque este método proporciona un modo rápido y fiable para medir la cantidad de polinucleótidos en una muestra, no permite por sí mismo la detección de cantidades muy pequeñas de nucleótidos en la muestra.

Por tanto, sigue habiendo necesidad de un método que permita una detección rápida y altamente sensible de polinucleótidos en una muestra sin recurrir a técnicas de amplificación de nucleótidos tales como PCR. Además, sigue habiendo la necesidad de composiciones y artículos de fabricación útiles en dicho método.

La presente invención busca satisfacer estas y otras necesidades.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método que proporciona una detección rápida y específica de oligonucleótidos y polinucleótidos monocatenarios o bicatenarios, y a composiciones y artículos de fabricación útiles para efectuar dichos métodos.

La presente invención se refiere adicionalmente a un método que proporciona la detección rápida y específica de oligonucleótidos y polinucleótidos monocatenarios o bicatenarios en muestras, y a composiciones y artículos de fabricación útiles para efectuar dichos métodos.

En una realización, la presente invención se refiere a un sistema de detección de ácido nucleico que comprende una sonda oligonucleotídica aniónica, un transductor polimérico catiónico conjugado hidrosoluble y un mecanismo de amplificación fotónica intrínseco. El transductor polimérico catiónico conjugado hidrosoluble sirve también como contraíon localizado, promoviendo la hibridación específica. Además, el transductor polimérico, cuando se combina con sondas de captura marcadas con un fluoróforo, proporciona una amplificación de señal y límites de detección mejorados.

El sistema de detección de ácido nucleico de la presente invención es capaz de detectar específica y rápidamente del orden de 20 oligonucleótidos monocatenarios. En una realización de la presente invención, los oligonucleótidos monocatenarios a detectar pueden extraerse de muestras clínicas.

Ventajosamente, el sistema de detección de ácido nucleico de la presente invención es adecuado para una evaluación rápida de la identidad de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), genes y patógenos sin necesidad de amplificación de ácido nucleico.

En una realización, la presente invención se refiere a un sistema de detección de ácido nucleico que comprende un politiofeno catiónico crómico por afinidad hidrosoluble; una sonda de captura oligonucleotídica aniónica marcada con un fluoróforo para formar una doble cadena con el politiofeno catiónico crómico por afinidad hidrosoluble y una muestra sospechosa de contener un oligonucleótido diana complementario.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para detectar moléculas de ácido nucleico de poca longitud que comprende: proporcionar un poliofenol catiónico crómico por afinidad hidrosoluble; poner en contacto el poliofenol catiónico crómico por afinidad hidrosoluble con una sonda de captura oligonucleotídica aniónica marcada con un fluoróforo para formar una doble cadena y poner en contacto la doble cadena con una muestra sospechosa de contener un oligonucleótido diana complementario.

Resultarán evidentes alcances y aplicabilidades adicionales a partir de la descripción detallada dada a continuación en la presente memoria. Sin embargo, se entenderá que esta descripción detallada, aunque indica realizaciones preferidas de la invención, se da sólo a modo de ejemplo, puesto que resultarán evidentes diversos cambios y modificaciones para los expertos en la técnica.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos adjuntos:

La Figura 1 ilustra: A. Estructura química del polímero 1 y espectros de absorción UV-visible de (a) polímero de triple cadena 1/X1/Y1 (coincidencia perfecta), (b) polímero de doble cadena 1/[X1+Alexa Fluor (AF) 546] y (c) polímero de triple cadena 1/X1+AF546/Y1 (coincidencia perfecta) en agua a 55°C. B. Espectros de fluorescencia con excitación a 420 nm, de (a) polímero de triple cadena 1/X1/Y1 (coincidencia perfecta), (b) polímero de doble cadena 1/[X1+AF546]; (c) polímero de triple cadena 1/X1+AF546/Y1 (coincidencia perfecta) en agua a 55°C;

la Figura 2 ilustra la intensidad de fluorescencia corregida (después de la resta de la señal debida a la doble cadena inicial) medida a 572 nm en agua a 55°C, con excitación a 420 nm, en función del número de copias de oligonucleótido diana de 20 unidades: (cuadrados) coincidencia perfecta; (círculos) dos desapareamientos; (triángulos) un desapareamiento;

la Figura 3 ilustra una descripción esquemática del mecanismo de detección de la amplificación de señal de la presente invención, basado en los cambios conformacionales del poliofenol catiónico y la transferencia de energía para una detección de ADN ultrasensible, selectiva y rápida;

la Figura 4 ilustra: A. Intensidad de fluorescencia corregida (después de la resta de la señal debida a la doble cadena inicial) medida a 572 nm, con excitación a 420 nm, en función del número de copias de ADN genómico: (línea oscura) TAN 101 + ADN genómico de tipo silvestre (coincidencia perfecta); (línea clara) TAN 100 + ADN genómico de tipo silvestre (un desapareamiento). B. Intensidad de fluorescencia corregida (después de la resta de la señal debida a la doble cadena inicial) medida a 572 nm, con excitación a 420 nm, en función del número de copias de ADN genómico: (línea oscura) TAN 101 + ADN genómico mutado (coincidencia perfecta); (línea clara) TAN 100 + ADN genómico mutado (un desapareamiento);

la Figura 5 ilustra la intensidad de fluorescencia corregida (después de la resta de la señal debida a la doble cadena inicial) medida a 572 nm, con excitación a 420 nm, en agua pura a 55°C, en función del número de copias de oligonucleótido diana de 20 unidades: (línea oscura) coincidencia perfecta; (línea clara) dos desapareamientos;

la Figura 6 ilustra la intensidad de fluorescencia corregida (después de la resta de la señal debida a la doble cadena inicial) medida a 572 nm, con excitación a 420 nm, en agua pura a 65°C, en función del número de copias de amplicón diana de 150 pb; (línea oscura) coincidencia perfecta (amplicón de *C. albicans*); (línea clara) dos desapareamientos (amplicón de *C. dubliniensis*); y

la Figura 7 ilustra la intensidad de fluorescencia corregida (después de la resta de la señal debida a la doble cadena inicial) medida a 572 nm, con excitación a 420 nm, en agua pura a 65°C, en función del número de copias de ADN genómico: (línea oscura) TAN 102a + ADN genómico de tipo silvestre (coincidencia perfecta); (línea clara) TAN 103a + ADN genómico de tipo silvestre (un desapareamiento).

Definiciones y términos

La terminología usada en la presente memoria es sólo con el fin de describir realizaciones particulares y no se pretende que limite el alcance de la presente invención.

El uso de las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluye las referencias plurales a menos que el contexto disponga claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “un polinucleótido diana” incluye una pluralidad de polinucleótidos diana.

Como se usa en esta memoria descriptiva y reivindicaciones, las palabras “comprender” (y cualquier forma de comprender, tal como “comprende” y “comprendiendo”), “tener” (y cualquier forma de tener tal como “tiene” y “teniendo”), “incluir” (y cualquier forma de incluir tal como “incluye” e “incluyendo”) o “contener” (y cualquier forma de contener tal como “contiene” y “conteniendo”) son incluyentes o de extremos abiertos y no excluyen elementos o etapas de proceso adicionales no indicados.

ES 2 341 669 T3

El término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye una variación inherente de error por el dispositivo o método que se esté empleando para determinar el valor.

5 Términos tales como “conectado”, “unido” y “ligado” pueden usarse intercambiamente en la presente memoria y comprenden la conexión, unión, ligamiento o conjugación directos así como indirectos a menos que el contexto disponga claramente otra cosa.

10 Cuando un valor se indica explícitamente, ha de entenderse que los valores que son de aproximadamente la misma cantidad o cuantía que el valor indicado están también dentro del alcance de la invención, así como los intervalos basados en ellos.

15 A menos que se defina otra cosa o el contexto disponga claramente otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la invención, se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

20 Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria se incorporan por la presente como referencia con fines de dar a conocer y describir los materiales y metodologías particulares por los que se citó la referencia. Las publicaciones examinadas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente memoria ha de considerarse como una admisión de que la invención no está autorizada a antedatar dicha divulgación en virtud de la invención anterior.

25 Los términos “polinucleótido”, “oligonucleótido”, “ácido nucleico” y “molécula de ácido nucleico” se usan intercambiamente en la presente memoria para designar una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, y pueden comprender ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de los mismos o mezclas de los mismos. Estos términos designan sólo la estructura primaria de la molécula. Por tanto, los términos incluyen ácido desoxirribonucleico tri-, bi- y monocatenario (“ADN”) así como ácido ribonucleico tri-, bi- y monocatenario (“ARN”). Incluyen también formas modificadas (por ejemplo, mediante alquilación y/o adición de casquete) y no modificadas del polinucleótido.

30 Más particularmente, los términos “polinucleótido”, “oligonucleótido”, “ácido nucleico” y “molécula de ácido nucleico” incluyen polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), incluyendo ARNt, ARNr, ARNh y ARNm, cortados y empalmados o no, cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N- o C-glucósido de una base de purina o pirimidina, y otros polímeros que contengan un esqueleto de fosfato u otro polianiónico, y otros polímeros de ácido nucleico específicos de secuencia sintéticos, a condición de que los polímeros contengan nucleobases en una configuración que permita el apareamiento de bases y el apilamiento de bases, tal como se encuentra en ADN y ARN. No se pretende una distinción en longitud entre los términos “polinucleótido”, “oligonucleótido”, “ácido nucleico” y “molécula de ácido nucleico” y estos términos se usan intercambiamente en la presente memoria. Por tanto, estos términos incluyen, por ejemplo, 3'-desoxi-2',5'-ADN, N3',P5'-fosforamidatos de oligodesoxirribonucleótido, ARN sustituido con 2'-O-alkilo, ADN bi- y monocatenario, así como ARN bi- y monocatenario e híbridos de los mismos incluyendo, por ejemplo, híbridos entre ADN y ARN, e incluyen también tipos conocidos de modificaciones, por ejemplo, marcajes, alquilación, “casquetes”, sustitución de uno o más de los nucleótidos por un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como, por ejemplo, aquellas con ligamientos cargados negativamente (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen restos pendientes tales como, por ejemplo, proteínas (incluyendo enzimas (por ejemplo proteasas), toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellas con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellas que contienen quelatos (por ejemplo, de metales, metales radiactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con ligamientos modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido u oligonucleótido.

55 Como se usan en la presente memoria, los términos “nucleósido” y “nucleótido” incluirán aquellos restos que contengan no sólo las bases de purina y pirimidina conocidas, sino también otras bases heterocíclicas que se hayan modificado. Dichas modificaciones incluyen purinas o pirimidinas metiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros heterociclos. Los nucleósidos o nucleótidos modificados pueden incluir también modificaciones en el resto de azúcar, por ejemplo, en el que uno o más de los grupos hidroxilo se reemplazan por halógeno, grupos alifáticos o se funcionalizan en forma de éteres, aminas o similares. El término “unidad nucleotídica” se pretende que comprenda los nucleósidos y nucleótidos.

60 Adicionalmente, las modificaciones de unidades nucleotídicas incluyen transposición, adición, sustitución o alteración de otro modo de grupos funcionales en la base de purina o pirimidina que formen enlaces de hidrógeno con una pirimidina o purina complementaria respectiva. La unidad nucleotídica modificada resultante puede formar opcionalmente un par de bases con otras de dichas unidades nucleotídicas modificadas, pero no con A, T, C, G o U. Pueden incorporarse sitios abásicos que no eviten la función del polinucleótido; preferiblemente, el polinucleótido no comprende sitios abásicos. Algunos o todos los residuos del polinucleótido pueden modificarse opcionalmente de una o más maneras.

Las pares de bases estándar A-T y G-C se forman en condiciones que permiten la formación de puentes de hidrógeno entre N3-H y C4-oxi de timidina y N1 y C6-NH₂, respectivamente, de adenosina, y entre C2-oxi, N3 y C4-NH₂ de citidina y C2-NH₂, N'-H y C6-oxi, respectivamente, de guanosina. Por tanto, por ejemplo, la guanosina (2-amino-6-oxi-9-beta-D-ribofuranosilpurina) puede modificarse para formar isoguanosina (2-oxi-6-amino-9-beta-D-ribofuranosilpurina). Dicha modificación da como resultado una base nucleosídica que no formará ya eficazmente un par de bases estándar con citosina. Sin embargo, la modificación de la citosina (1-beta-D-ribofuranosil-2-oxi-4-aminopirimidina) para formar isocitosina (1-beta-D-ribofuranosil-2-amino-4-oxipirimidina) da como resultado un nucleótido modificado que no formará eficazmente un par de bases con guanosina, sino que formará un par de bases con isoguanosina. La isocitosina está disponible en Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.); la isocitidina puede prepararse mediante el método descrito por Switzer *et al.* (1993) *Biochemistry* 32: 10489-10496 y las referencias citadas en la misma; la 2'-desoxi-5-metilisocitidina puede prepararse mediante el método de Tor *et al.* (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115: 4461-4467 y las referencias citadas en la misma; y los nucleótidos de isoguanina pueden prepararse usando el método descrito por Switzer *et al.* (1993), *supra* y Mantsch *et al.* (1993) *Biochem.* 14: 5593-5601, o mediante el método descrito en la patente de EE.UU. n° 5.780.610 de Collins *et al.* Pueden sintetizarse otros pares de bases no naturales mediante el método descrito en Piccirilli *et al.* (1990) *Nature* 343: 33-37 para la síntesis de 2,6-diaminopirimidina y su complemento (1-metilpirazolo-[4,3]pirimidin-5,7-(4H,6H)-diona). Son conocidas otras de dichas unidades nucleotídicas modificadas que forman pares de bases únicas, tales como las descritas en Leach *et al.* (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114: 3675-3683 y Switzer *et al.*, *supra*.

Las condiciones de hibridación incluirán típicamente concentraciones de sal de menos de aproximadamente 1 M, más habitualmente de menos de aproximadamente 500 mM y preferiblemente de menos de aproximadamente 200 mM. Las temperaturas de hibridación pueden ser del orden de 5°C, pero son típicamente mayores de 22°C, más típicamente mayores de aproximadamente 30°C y preferiblemente superiores a aproximadamente 37°C. Los fragmentos más largos pueden requerir temperaturas de hibridación mayores para hibridación específica. Otros factores pueden afectar al rigor de la hibridación, incluyendo la composición de bases y la longitud de las cadenas complementarias, la presencia de disolventes orgánicos y la extensión del desapareamiento de bases, y la combinación de parámetros usada es más importante que la medida absoluta de cualquiera de ellos solo. Las condiciones de hibridación adecuadas para un formato de ensayo dado pueden determinarse por un experto en la técnica; los parámetros no limitantes que pueden ajustarse incluyen las concentraciones de componentes de ensayo, las sales usadas y su concentración, fuerza iónica, temperatura, tipo y concentración de tampón, pH de la disolución, presencia y concentración de reactivos de bloqueo para reducir la unión al fondo tal como secuencias repetidas o disoluciones de proteína de bloqueo, los tipos y concentraciones de detergentes, moléculas tales como polímeros que aumentan la concentración relativa de los polinucleótidos, iones metálicos y sus concentraciones, quelantes y sus concentraciones y otras condiciones conocidas en la técnica.

“Determinación multiparamétrica” designa en la presente memoria un ensayo u otro método analítico en el que pueden ensayarse simultáneamente múltiples analitos.

La muestra que comprende o se sospecha que comprende el polinucleótido diana puede ser cualquier fuente de material biológico que comprenda polinucleótidos que pueda obtenerse de un organismo vivo directa o indirectamente, incluyendo células, tejido o fluido, y los depósitos dejados por ese organismo, incluyendo virus, micoplasmas y fósiles. La muestra puede comprender un polinucleótido diana preparado total o parcialmente mediante medios sintéticos. Típicamente, la muestra se obtiene en forma de o se dispersa en un medio predominantemente acuoso. Los ejemplos no limitantes de la muestra incluyen sangre, orina, semen, leche, esputo, moco, torunda bucal, torunda vaginal, torunda rectal, aspirado, aguja de biopsia, sección de tejido obtenida por ejemplo mediante cirugía o autopsia, plasma, suero, fluido espinal, fluido linfático, secreciones externas de la piel, tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, lágrimas, saliva, tumores, órganos, muestras de constituyentes de cultivo celular *in vitro* (incluyendo, pero sin limitación, medio acondicionado resultante del crecimiento de células en el medio de cultivo celular, células supuestamente infectadas por virus, células recombinantes y componentes celulares), y una colección recombinante que comprenda secuencias polinucleotídicas.

La muestra puede diluirse, disolverse, suspenderse, extraerse o tratarse de otro modo para solubilizar y/o purificar cualquier polinucleótido diana presente o volverlo accesible a los reactivos que se usan en un esquema de amplificación o a reactivos de detección. Cuando la muestra contiene células, las células pueden lisarse o permeabilizarse para liberar los polinucleótidos de las células. Pueden usarse tampones de permeabilización de una etapa para lisar células que permitan efectuar etapas adicionales directamente después de la lisis, por ejemplo una reacción en cadena de la polimerasa.

El polinucleótido diana puede ser monocatenario, bicatenario o de orden superior, y puede ser lineal o circular. Los polinucleótidos diana monocatenarios ejemplares incluyen genomas víricos de ARNm, ARNr, ARNt, ARNhn, ARNmc o ADNmc, aunque estos polinucleótidos pueden contener secuencias complementarias internamente y estructura secundaria significativa. Los polinucleótidos diana bicatenarios ejemplares incluyen ADN genómico, ADN mitocondrial, ADN de cloroplasto, genomas víricos de ARNbc o ADNbc, plásmidos, fagos y viroides. El polinucleótido diana puede prepararse sintéticamente o purificarse a partir de una fuente biológica. El polinucleótido diana puede purificarse para eliminar o reducir uno o más componentes indeseados de la muestra o para concentrar el polinucleótido diana. A la inversa, cuando el polinucleótido diana está demasiado concentrado para el ensayo particular, puede diluirse el polinucleótido diana.

Parte experimental

Material

5 Se sintetizó el polímero 1 según el trabajo publicado anteriormente^{10,13}. Basándose en medidas de cromatografía de permeación en gel calibrada con muestras de polivinilpiridinio monodispersado, el polímero tenía un peso molecular numérico medio de 11.000 con un índice de polidispersidad de 2,0. Se adquirieron los oligonucleótidos marcados y no marcados en Integrated DNA Technologies, Inc. Para los estudios de oligonucleótidos de 20 unidades, la sonda (X1) y dianas (Y1, Y2 y Y3) derivaban de sondas diseñadas para la detección de la especie de levadura *Candida*¹⁰.
 10 Para la detección de la mutación de corte y empalme de tirosinemia de tipo I IVS12+5 G->A²¹, la secuencia de sonda de captura de 15 unidades complementaria de la secuencia mutada en el genoma era (TAN 100) 5'-CCG GTG AAT ATC TGG-3', y la sonda de captura complementaria de ADN de tipo silvestre era (TAN 101) 5'-CCG GTG AGT ATC TGG-3'. Se unió Alexa Fluor 546 al extremo 5' de las sondas oligonucleotídicas. Se diluyeron todas las disoluciones oligonucleotídicas con agua esterilizada y se efectuaron todas las diluciones y manejos de disolución con recipientes
 15 de plástico.

Extracción y purificación de ADN de la sangre

20 Se extrajo ADN genómico humano de sangre de paciente como se describe anteriormente²² y se almacenó congelado a -20°C hasta su uso²².

Procedimiento general para medidas ópticas

25 Se registraron los espectros de absorción UV-visible (Figura 1A) usando un espectrofotómetro Hewlett-Packard (modelo 8452A). Se registraron los espectros de fluorescencia (Figura 1B) usando un espectrofluorómetro Varian Cary Eclipse. Se obtuvieron las curvas de calibración de fluorescencia (Figuras 2 y 4) usando un fluorómetro portátil corriente¹³ modificado para la medida de la emisión de Alexa Fluor a 572 nm. En todos los casos, se efectuó la
 30 excitación a 420 nm y se obtuvieron los puntos de datos de fluorescencia en las curvas de calibración a partir de la media de 5 medidas ópticas a 572 nm. Se obtuvo cada medida óptica mediante la integración de la señal fluorescente durante un periodo de 10 segundos. Para todas las medidas ópticas, se utilizaron celdas de cuarzo de 3 ml con una longitud del camino óptico de 1,0 cm. Se calculó el límite de detección por ser tres veces la desviación estándar de las medidas ópticas para la señal de blanco dividida entre la pendiente de la curva de calibración. Se prepararon
 35 dobles cadenas mezclando cantidades estequiométricas del polímero y de la sonda de captura oligonucleotídica, dando una concentración de 2,14 μ M (disolución madre). Se diluyó entonces el complejo resultante a las concentraciones deseadas. Se llevaron a cabo experimentos de hibridación a 55°C para los oligonucleótidos de 20 unidades y a 65°C para la detección de SNP de tirosinemia. Para los estudios de tirosinemia, se desnaturalizaron las muestras en primer lugar a 100°C.
 40

Preparación de amplicones de 150 pb de una porción del gen *EF-1a* de *C. albicans* y *C. dubliniensis*

45 Se transfirieron 350 pg de preparación de ADN genómico a una concentración de 350 pg/ μ l a una mezcla de PCR de 19 μ l que contenía KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 9,1), 0,1% de Triton X-100, MgCl₂ 2,5 mM, concentraciones 0,4 μ M de los cebadores ECal61 [5'-CAAGAAGGTTGGTTACAACCCAAAGA-3'] y Ecal184 [5'-AGGTCTTAC CAGTAACTTTACCGGAT-3']), trifosfato de desoxinucleósido 200 μ M (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.), 3,3 μ g de albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canadá) por μ l y 0,025 U de ADN polimerasa Taq (Promega, Madison, Wis.) combinado con el anticuerpo TaqStart (BD Biosciences Clontech,
 50 Palo Alto, Calif.). Se sometieron las mezclas de PCR a ciclación térmica (3 min a 95°C y después 40 ciclos de 30 s a 95°C para la etapa de desnaturalización, 30 s a 55°C para la etapa de reasociación y 30 s a 72°C para la etapa de extensión) en un ciclador térmico PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, Mass.). Se purificaron los productos de la amplificación por PCR mediante el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen Inc., Mississauga, Ontario, Canadá) usando agua desionizada para eluir los amplicones.
 55

Purificación de ADN de la sangre de voluntarios sanos humanos

60 Se tomaron 7 ml de sangre de voluntarios sanos usando tubos VacutainerTM que contenían (K3)EDTA (tapones de color lavándula, número de orden 366450, Becton Dickinson). Se usaron 200 μ l de esta sangre para la extracción y purificación de ADN usando el MagneSil KF Genomic System (nº de cat. MD1460) de Promega. Se efectuaron las preparaciones de muestra según las instrucciones del fabricante (MagneSilTM, KF Genomic System, MD1460rev01) excepto por una ligera modificación: en la etapa IVb del protocolo de Promega, se usaron 200 μ l de TE en lugar de 200 μ l de agua exenta de nucleasa. Se manejaron las partículas magnéticas usando un procesador de partículas magnéticas KingFisherTM de Thermo Labsystems controlado por el programa "PromegaGenomic" versión 1.0 (MagneSilTM KF Genomic System, programa descargado del sitio web como "KfmLMagGenomv1_0").
 65

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un sistema integrado novedoso de detección de ADN con amplificación de señal exento de PCR que combina un receptor específico, un transductor óptico y un mecanismo de amplificación. Este sistema de detección novedoso está basado en las diferentes interacciones electrostáticas y conformaciones entre un polítiofeno catiónico (concretamente, polímero 1) y un ADNmc o ADNbc y la transferencia de energía eficaz entre la triple cadena (complejación entre el polítiofeno catiónico y el ADNbc) y los fluoróforos vecinos unidos a sondas de ADNmc o ADNbc. Ha de entenderse que, en el caso de ADNmc, la formación de cadenas triples ocurre mediante la hibridación de cadenas de ADNmc complementarias, combinado con la complejación con el polítiofeno catiónico. El presente sistema de detección permite la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de muestras clínicas en sólo unos pocos minutos, sin necesidad de amplificación de ácido nucleico. En una realización adicional de la presente invención, el sistema de detección polimérico puede adaptarse fácilmente para detección multiparamétrica en disolución usando diferentes fluoróforos unidos a sondas de ADNmc o usando micromatrices sobre soportes sólidos.

En una realización, la presente invención se refiere a un sistema de detección de ácido nucleico novedoso que comprende una sonda oligonucleotídica aniónica, un transductor polimérico catiónico crómico por afinidad conjugado hidrosoluble y un mecanismo de amplificación fotónica intrínseco. El transductor polimérico catiónico crómico por afinidad conjugado hidrosoluble sirve también como contraión localizado que promueve la hibridación específica. En una realización de la presente invención, el transductor polimérico catiónico comprende un polítiofeno catiónico crómico por afinidad conjugado hidrosoluble (Figura 1; polímero 1). Dicho polítiofeno catiónico se ha descrito anteriormente y se preparó siguiendo procedimientos conocidos en la bibliografía^{10,13}.

El polítiofeno catiónico conjugado hidrosoluble como se usa en la presente memoria exhibe propiedades crómicas por afinidad (cambios del espectro de absorción UV-visible tras la unión que provienen de cambios conformacionales), cuando se pone en presencia de ácidos nucleicos monocatenarios (mc) o bicatenarios (bc)^{10,13}. Por ejemplo, el polímero 1 en medios acuosos proporciona una disolución amarilla ($\lambda_{\text{máx}} = 397$ nm) correspondiente a una conformación de ovillo aleatorio poco conjugada del polítiofeno. Cuando se añade una cantidad estequiométrica (basada en una unidad repetida) de una sonda de captura no marcada de 20 unidades (concretamente X1: 5'-CATGATTGMCCATCCACCA-3'), la mezcla se vuelve roja ($\lambda_{\text{máx}} = 527$ nm), correspondiente a una forma plana altamente conjugada del polítiofeno. Esto es indicativo de la formación de la denominada "doble cadena" neutra (cadena de captura) entre el polítiofeno catiónico y la sonda oligonucleotídica aniónica. Tras la adición de un oligonucleótido complementario (concretamente Y1: 3'-GTACTAACTTGGTAGGTGGT-5') a la cadena de captura, se forma una triple cadena. La formación de la triple cadena da como resultado un cambio de color adicional de la mezcla, volviendo la mezcla a un color amarillo ($\lambda_{\text{máx}} = 421$ nm; Figura 1A, a). Se observan ligeros cambios en los espectros de absorción (datos no mostrados) con la adición de oligonucleótidos que tienen dos desapareamientos (concretamente Y2: 3'-GTACTAACTTCGAAGGTGGT-5') o sólo un desapareamiento (concretamente Y3: 3'-GTACTAACTTCGTAGGTGGT-5').

La detección fluorimétrica de ácidos nucleicos es también posible usando el sistema de detección de ADN novedoso de la presente invención. La detección fluorimétrica es posible debido a que la fluorescencia del poli-(3-alcóxi-4-metilíofenos) está inactivada en la forma plana agregada (doble cadena), mientras que la forma de triple cadena amarilla es fluorescente, teniendo un máximo de emisión a 530 nm (Figura 1B, a) cuando se excita a 420 nm.

Se mejoró adicionalmente la especificidad y sensibilidad del transductor polimérico combinándolo con sondas de captura marcadas con un fluoróforo (por ejemplo, Alexa Fluor 546) para inducir una transferencia de energía de resonancia Förster (FRET). Usando este transductor mejorado, la doble cadena estequiométrica sigue exhibiendo un color rojo (Figura 1A, b) y fluorescencia inactivada (Figura 1B, b). Cuando hibrida esta doble cadena con su oligonucleótido complementario, puede observarse una nueva banda de absorción a 420 nm, correspondiente a la formación de una triple cadena (Figura 1A, c). El máximo de emisión de la triple cadena resultante (530 nm) se superpone claramente con el espectro de absorción del fluoróforo (Alexa Fluor 546) que tiene bandas de absorción a 516 y 556 nm (Figura 1A, c) y que emite entonces a longitudes de onda más largas (máximo de emisión a 572 nm; Figura 1B, c). Cuando se añade un ADN no complementario o desapareado a la doble cadena, no se detecta cambio de color: la disolución de doble cadena permanece roja. Esto es indicativo de una inhibición del mecanismo de FRET. En consecuencia, la intensidad de fluorescencia medida con la cadena de ADNmc complementaria perfecta (condiciones experimentales idénticas) es siempre mayor comparada con las obtenidas con dianas que tienen uno o dos desapareamientos.

Sorprendentemente, partiendo de una gran cantidad de sondas de doble cadena estequiométricas (aprox. 10^{10} copias), pudieron detectarse fácil y específicamente en una muestra (3 ml) del orden de aproximadamente 30 copias de un oligonucleótido de 20 unidades usando el presente sistema de detección de ADN novedoso. Además, las dianas complementarias perfectas podían distinguirse todavía a dichas bajas concentraciones de las secuencias que tenían dos o únicamente un desapareamiento. El límite de detección que se calcula a partir de estos datos usando un fluorómetro de LED azul habitual fue sólo de 5 copias en un volumen de 3 ml, lo que es igual a una concentración 3 zM (3×10^{-21} M). Se obtuvo un límite de detección algo mayor (30 copias en un volumen de 3 ml; 18 zM) usando un espectrofluorómetro comercial (Varian Cary Eclipse). El uso de sondas de captura marcadas con un fluoróforo en el sistema de detección de ADN de la presente invención proporciona una señal amplificada "conectada"¹⁵ que puede describirse como un proceso de "superiluminación" o "reacción en cadena de fluorescencia" (FCR). Como se ilustra en la FIG. 3, se cree que esta transferencia de energía altamente eficaz es debida principalmente a la formación de agregados de cadenas dobles en disolución antes de la introducción de la diana^{10,13}. Estos agregados darían entonces lugar a una

transferencia de energía muy eficaz entre una triple cadena dada y un gran número de cromóforos Alexa Fluor vecinos. Es más, este cromóforo muestra un desplazamiento de Stokes de sólo 16 nm y un rendimiento cuántico de fluorescencia del 95% con una vida útil de fluorescencia de 3,6 ns. Estos son parámetros excelentes para una transferencia de energía intermolecular altamente eficaz entre moléculas conjugadas agregadas¹⁶⁻²⁰.

En una realización de la presente invención, el sistema de detección de ácido nucleico novedoso puede usarse también para la detección ultrasensible de ADNbc. Cuando se usan sondas de captura marcadas con un fluoróforo para inducir la amplificación de señal, pueden detectarse niveles de concentración extremadamente bajos de ADNbc. Debido a que la reacción de hibridación de sonda-diana está en competición con la rehibridación del ADNbc, la mayoría de técnicas de detección directa de ADN reseñadas anteriormente se basan en la disponibilidad de la secuencia diana como ADNmc. En el caso del transductor de politiofeno usado en la presente invención, estudios previos han mostrado que la presencia de ADNbc no complementario puede conducir a señales falsas positivas puesto que el transductor de politiofeno tiene una mayor afinidad, en comparación con las sondas de ADNmc, por ADNbc^{10,13}.

Se han elaborado condiciones experimentales que potencian selectivamente la reacción de reconocimiento entre la sonda de captura de ADN y la diana de ADN. Específicamente, en agua pura a 65°C, todo el material de ADN desnaturalizado permanece desnaturalizado y la hibridación ocurre esencialmente sólo con las sondas de ADNmc marcadas en las cadenas dobles, promovida por el transductor de politiofeno catiónico unido electrostáticamente que sirve también como contraión localizado para las cargas negativas de los restos fosfato.

En una realización de la presente invención, el sistema de detección de ácido nucleico novedoso puede usarse también para distinguir polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en muestras de ADN genómico humano no amplificado. En una realización adicional, el sistema de detección de ácido nucleico novedoso puede usarse para distinguir SNP asociados a enfermedad en muestras de ADN genómico humano no amplificado. La alta especificidad y sensibilidad de la detección potenciada por (FRET), combinado con la capacidad del transductor de politiofeno de promover la hibridación en condiciones por lo demás desfavorables, permite distinguir los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) asociados a enfermedad en muestras de ADN genómico humano no amplificado. La Figura 4A muestra curvas de calibración obtenidas ensayando ADN genómico humano normal (concretamente de tipo silvestre) con secuencias de sonda complementarias del tipo silvestre (TAN 101: 5'-CCG GTG AGT ATC TGG-3') y con secuencias mutadas (TAN 100: 5'-CCG GTG AAT ATC TGG-3')²¹. De forma similar, la Figura 4B muestra curvas de calibración obtenidas ensayando ADN genómico humano mutado (de pacientes enfermos) con secuencias de sonda complementarias del tipo silvestre (TAN 101: 5'-CCG GTG AGT ATC TGG-3'), y con secuencias mutadas (TAN 100: 5'-CCG GTG AAT ATC TGG-3'). Se obtuvieron estos datos en aproximadamente 5 minutos, ilustrando la facilidad y rapidez con que el sistema de detección de ácido nucleico de la presente invención permite distinguir al ADN de tipo silvestre aproximadamente del ADN mutado. El sistema de detección de ácido nucleico de la presente invención permite la detección de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en un genoma completo, sin amplificación ni enriquecimiento previos de la diana, y a niveles de concentración similares a los conseguidos con oligonucleótidos de 20 unidades (Figura 2). Por ejemplo, aunque se diseñaron únicamente oligonucleótidos de 15 unidades para sondear tirosinemia en el genoma humano, es conocido que existen en la naturaleza numerosos loci que presentan sólo un desapareamiento con estas sondas, sobre todo en los extremos del gen. Sorprendentemente, no pudo detectarse una señal de hibridación significativa usando estas secuencias diana no específicas.

Se obtienen condiciones de hibridación muy rigurosas llevando a cabo las reacciones de hibridación en agua pura a 65°C. En estas condiciones rigurosas, el transductor de politiofeno catiónico localizado en la sonda de captura es el único contraión disponible para neutralizar el esqueleto de fosfato de los ácidos nucleicos, permitiendo así una excelente especificidad. Estos rasgos sugieren una amplia aplicabilidad del sistema de detección de ácido nucleico de la presente invención. En una realización, el sistema de detección de ácido nucleico podría usarse para detectar selectivamente secuencias de ácido nucleico en mezclas complejas.

Se efectuaron experimentos similares a los descritos en relación con la Figura 2 en un espectrofluorómetro comercial (Varian Cay Eclipse). Se obtuvo también una detección altamente sensible y selectiva de oligonucleótidos mc, como se muestra en la Figura 5. En este caso, el límite de detección es de aproximadamente 30 copias en 3 ml de agua pura a 55°C.

Se ensayó también la aplicabilidad del método para diversos tipos de material genético, concretamente productos de PCR (amplicones) y ADN genómico humano. Aunque el método de la presente invención se dirige a eliminar la necesidad de amplificación por PCR, los productos de amplicón son una elección obvia porque se usan ampliamente en la investigación biotecnológica. Además, son también un modelo de ADN bicatenario y sirven por tanto como un buen intermedio entre los oligonucleótidos y el genoma humano completo. Para este estudio, se usó la sonda X1+AF546 (véase la Figura 2) con amplicones de *C. albicans* y *C. dubliniensis*.

Se obtuvo la Figura 6 usando el mismo procedimiento que se describe anteriormente. Esta figura muestra que el método de la presente invención puede distinguir fácilmente amplicones perfectamente coincidentes de los que difieren en sólo dos nucleótidos en un ADNbc de 150 nucleótidos de longitud. Este alto grado de selectividad se obtuvo usando el proceso de amplificación de señal intrínseca descrito anteriormente y condiciones experimentales optimizadas (agua pura a 65°C).

ES 2 341 669 T3

Para ADN humano, y usando los mismos cálculos y bases de datos que los descritos en la sección experimental, se ensayó el método de la presente invención usando otra secuencia de sonda, esta vez específica de la mutación E357X, que se reseña también como causante de tirosinemia hereditaria [ref. 21 en el texto]. Se diseñaron y sintetizaron específicamente nuevas sondas específicas de la mutación E357X, concretamente, TAN 102a: 5'-/5Alex546N/AGGAGCCAGAAAACCTTCG-3 y TAN 103a: 5'-/5Alex546N/AGGAGCCATAAAAACCTTCG-3 por IDT DNA Technologies Inc. Para ensayar la aplicabilidad del método de la presente invención a ADN genómico humano extraído usando diversas técnicas de extracción, se eligió ADN genómico humano extraído usando otro método ampliamente usado, a saber, el protocolo de Promega.

La Figura 7 se obtuvo usando el mismo protocolo experimental que se describe anteriormente. Las curvas obtenidas con las sondas TAN102a y TAN103a específicas de la mutación E357X son muy similares a las obtenidas para la mutación IVS12 (Figura 4). La mayor sensibilidad de detección en el presente caso es debida al número aumentado de unidades cromofóricas poliméricas cuando se trabaja con sondas más largas de 18 unidades (en comparación con las sondas de 15 unidades usadas para la mutación IVS12). Este ejemplo adicional de detección de SNP en ADN genómico humano no amplificado completo confirma la capacidad del método de la presente invención de detectar selectiva y específicamente unas pocas copias de cadenas de ADN en presencia de una cantidad mucho más grande de material de ADN no específico.

Referencias

1. Daar, A. S. *et al.* "Top ten biotechnologies for improving health in developing countries". *Nat. Genet.* 32, 229-232 (2002).

2. Fodor, S. P. A. *et al.* "Light-directed spatially addressable parallel chemical synthesis". *Science* 251, 767-773 (1991).

3. Tyagi, S. & Kramer, F. R. "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization". *Nat. Biotechnology* 14, 303-308 (1996).

4. Leclerc, M. "Optical and electrochemical transducers based on functionalized conjugated polymers". *Adv. Mater.* 11, 1491-1498 (1999).

5. McQuade, D. T., Pullen, A. E. & Swager, T. M. "Conjugated polymer-based chemical sensors". *Chem. Rev.* 100, 2537-2574 (2000).

6. Drummond, T. G., Hill, M. G. & Barton, J. K. "Electrochemical DNA sensors". *Nat. Biotechnology* 21, 1192-1199 (2003).

7. Nam, J. M., Stoeva, S. I. & Mirkin, C. A. "Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity". *J. Am. Chem. Soc.* 126, 5932-5933 (2004).

8. Liu, R. H., Yang, J., Lenigk, R., Bonanno, J. & Grodzinski, P. "Self-contained, fully integrated biochip for sample preparation, polymerase chain reaction amplification, and DNA microarray detection". *Anal. Chem.* 76, 1824-1831 (2004).

9. Saiki, R. K. *et al.* "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis from diagnostic sickle-cell anemia". *Science* 230, 1350-1354 (1985).

10. Ho, H. A. *et al.* "Colorimetric and fluorometric detection of nucleic acids using cationic polythiophene derivatives". *Angew. Chem. Int Ed.* 41, 1548-1551 (2002).

11. Gaylord, B. S., Heeger, A. J. & Bazan, G. C. "DNA detection using water-soluble conjugated polymers and peptide nucleic acid probes". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10954-10957 (2002).

12. Nilson, K. P. R. & Inganäs, O. "Chip and solution detection of DNA hybridization using a luminescent zwitterionic polythiophene derivative". *Nat. Mater.* 2, 419-424 (2003).

13. Dore, K. *et al.* "Fluorescent polymeric transducer for the rapid, simple, and specific detection of nucleic acids at the zeptomole level". *J. Am. Chem. Soc.* 126, 4240-4244 (2004).

14. Liu, B. & Bazan, G. C. "Homogeneous fluorescence-based DNA detection with water-soluble conjugated polymers". *Chem. Mater.* 16, 4467-4476 (2004).

15. McQuade, D. T., Hegedus, A. H. & Swager, T. M. "Signal amplification of a "turn-on" sensor: Harvesting the light captured by a conjugated polymer". *J. Am. Chem. Soc.* 122, 12389-12390 (2000).

ES 2 341 669 T3

16. **Levitsky, I. A., Kim, J. & Swager, T. M.** "Energy migration in a poly(phenylene ethynylene): Determination of interpolymer transport in anisotropic Langmuir-Blodgett films". *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1466-1472 (1999).
17. **Nguyen, T.-Q., Wu, J., Doan, V., Schwartz, B. J. & Tolbert, S. H.** "Control of energy transfer in oriented conjugated polymer-mesoporous silica composites". *Science* 288, 652-656 (2000).
18. **Kim, J. & Swager, T. M.** "Control of conformational and interpolymer effects in conjugated polymers". *Nature* 411, 1030-1034 (2001).
19. **Beljonne, D. et al.** "Interchain vs. intrachain energy transfer in acceptor-capped conjugated polymers". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10982-10987 (2002).
20. **Chen, L. et al.** "Highly sensitive biological and chemical sensors based on reversible fluorescence quenching in a conjugated polymer". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12287-12292 (1999).
21. **St-Louis, M. & Tanguay, R. M.** "Mutations in the fumarylacetoacetate hydrolase gene causing hereditary tyrosinemia type I: overview". *Hum. Mutat.* 9, 291-299 (1997).
22. **Phaneuf, D., Lambert, M., Laframboise R., Mitchell G., Lettre F. & Tanguay R. M.** "Type 1 hereditary tyrosinemia. Evidence for molecular heterogeneity and identification of a causal mutation in a French Canadian patient". *J. Clin. Invest.* 90, 1185-1192 (1992).
23. Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n° US 2005/0003386 A1 (6 de enero de 2005) (Bazan *et al.*)
24. Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n° US 2004/0219556 A1 (4 de noviembre de 2004) (Bazan *et al.*).
25. Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n° US 2004/0142344 A1 (22 de julio de 2004) (Bazan *et al.*).
26. Publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n° US 2004/0142206 A1 (22 de julio de 2004).

ES 2 341 669 T3

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de detección de ácido nucleico que comprende:

5 una sonda oligonucleotídica aniónica marcada con un fluoróforo; y

un politiofeno catiónico crómico por afinidad hidrosoluble que interacciona con dicha sonda formando una doble cadena neutra;

10 en el que dicha doble cadena neutra exhibe cambios en su espectro de absorción en presencia de un polinucleótido diana.

15 2. Un kit que comprende un recipiente o recipientes que comprenden:

una sonda oligonucleotídica aniónica marcada con un fluoróforo; y

20 un politiofeno catiónico crómico por afinidad hidrosoluble que interacciona con dicha sonda formando una doble cadena neutra;

en el que dicha doble cadena neutra exhibe cambios en su espectro de absorción en presencia de un polinucleótido diana.

25 3. Un artículo de fabricación que comprende:

30 un vial que contiene una sonda oligonucleotídica aniónica marcada con un fluoróforo y que contiene un politiofeno catiónico crómico por afinidad que interacciona con dicha sonda formando una doble cadena neutra, en el que dicha doble cadena neutra exhibe cambios en su espectro de absorción en presencia de un polinucleótido diana; o

35 envasados conjuntamente, un vial que contiene una sonda oligonucleotídica aniónica marcada con un fluoróforo y un vial que contiene un politiofeno catiónico crómico por afinidad que interacciona con dicha sonda formando una doble cadena neutra, en el que dicha doble cadena neutra exhibe cambios en su espectro de absorción en presencia de un polinucleótido diana.

4. Un método de medida de la presencia de un polinucleótido diana que comprende:

40 proporcionar una sonda oligonucleotídica aniónica marcada con un fluoróforo y un politiofeno catiónico crómico por afinidad que interacciona con dicha sonda formando una doble cadena neutra, en el que dicha doble cadena neutra exhibe cambios en su espectro de absorción en presencia de un polinucleótido diana;

poner en contacto un polinucleótido diana con dicha doble cadena neutra; y

45 medir los cambios en el espectro de absorción de dicha doble cadena neutra en presencia de dicho polinucleótido diana para cuantificar o analizar la complementariedad de dicho polinucleótido diana respecto a dicha sonda.

50 5. Un ensayo basado en el método de la reivindicación 4.

6. El sistema de detección de ácido nucleico como se define en la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido diana deriva del genoma humano, una fuente bacteriana o una fuente vírica o es un amplicón.

55 7. El sistema de detección de ácido nucleico como se define en la reivindicación 6, en el que dicho polinucleótido diana se desnaturaliza antes de su uso en el sistema.

8. El kit como se define en la reivindicación 2, en el que dicho polinucleótido diana deriva del genoma humano, una fuente bacteriana o una fuente vírica o es un amplicón.

60 9. El kit como se define en la reivindicación 8, en el que dicho polinucleótido diana se desnaturaliza antes de su uso en el sistema.

10. El artículo de fabricación como se define en la reivindicación 3, en el que dicho polinucleótido diana deriva del genoma humano, una fuente bacteriana o una fuente vírica o es un amplicón.

65 11. El artículo de fabricación como se define en la reivindicación 10, en el que dicho polinucleótido diana se desnaturaliza antes de su uso en el sistema.

ES 2 341 669 T3

12. El método como se define en la reivindicación 4, en el que dicho polinucleótido diana deriva del genoma humano, una fuente bacteriana o una fuente vírica o es un amplicón.

5 13. El método como se define en la reivindicación 12, en el que dicho polinucleótido diana se desnaturaliza antes de su uso en el sistema.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

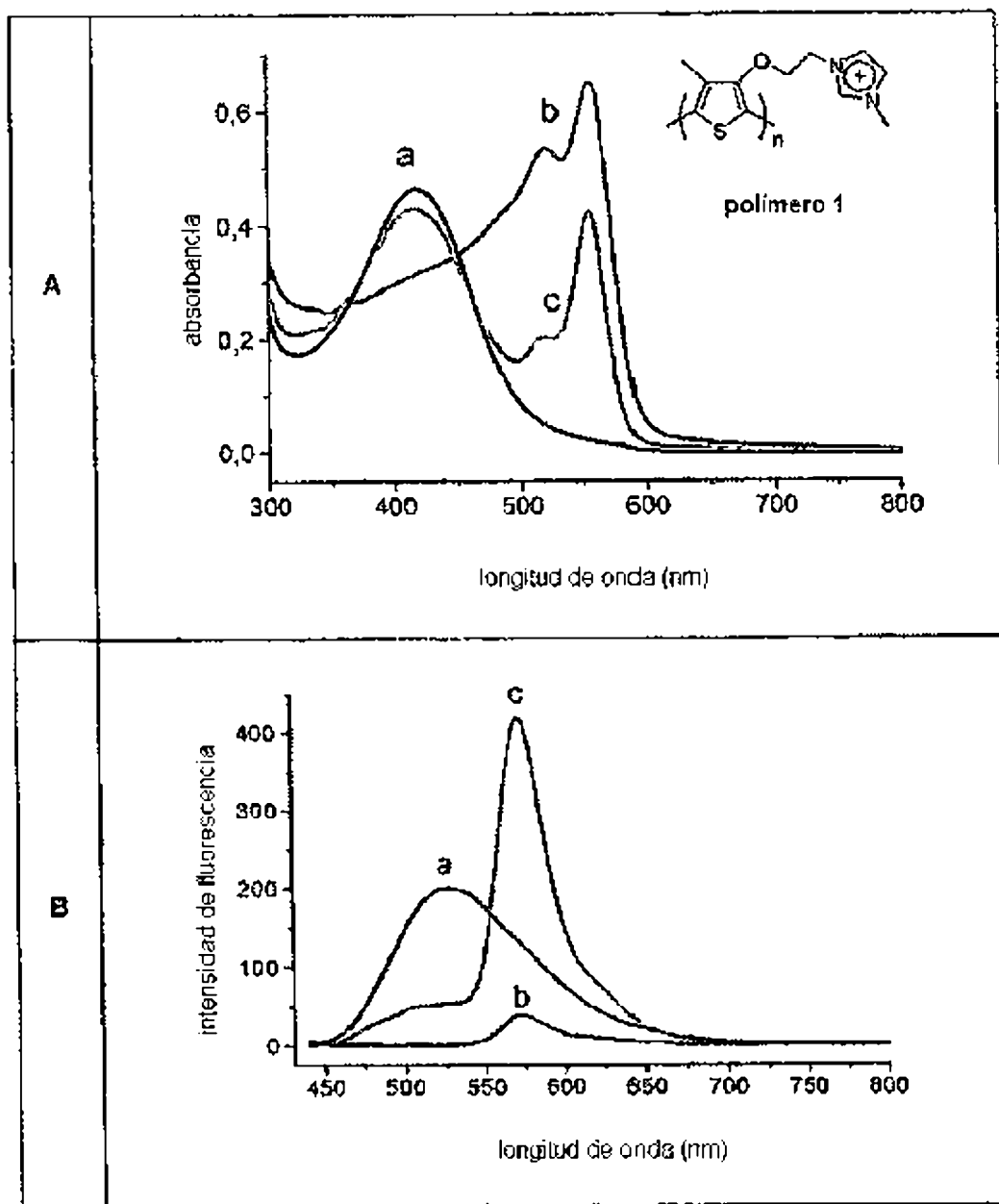


Figura 1

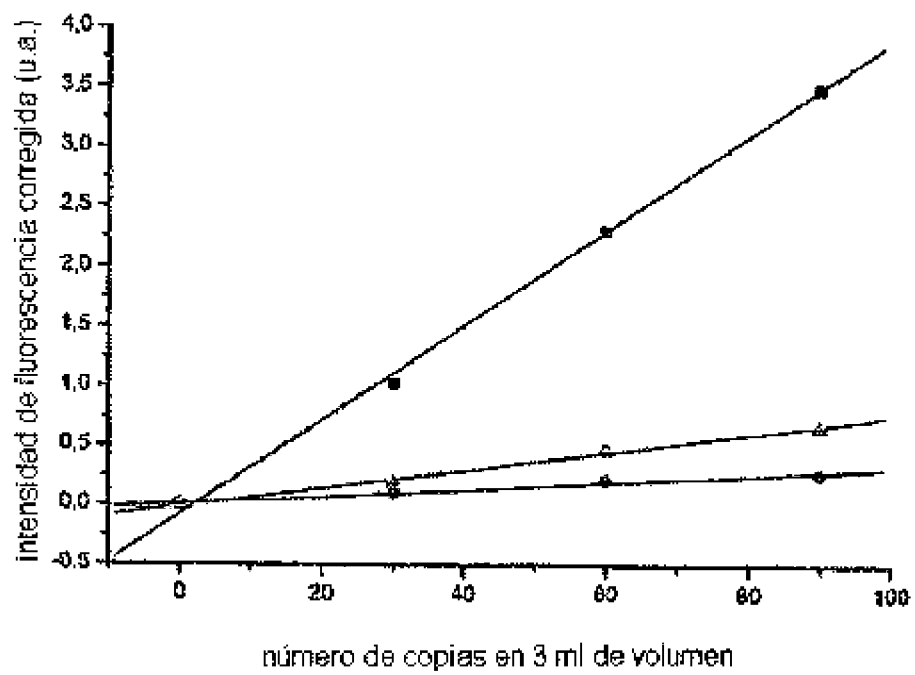


Figura 2

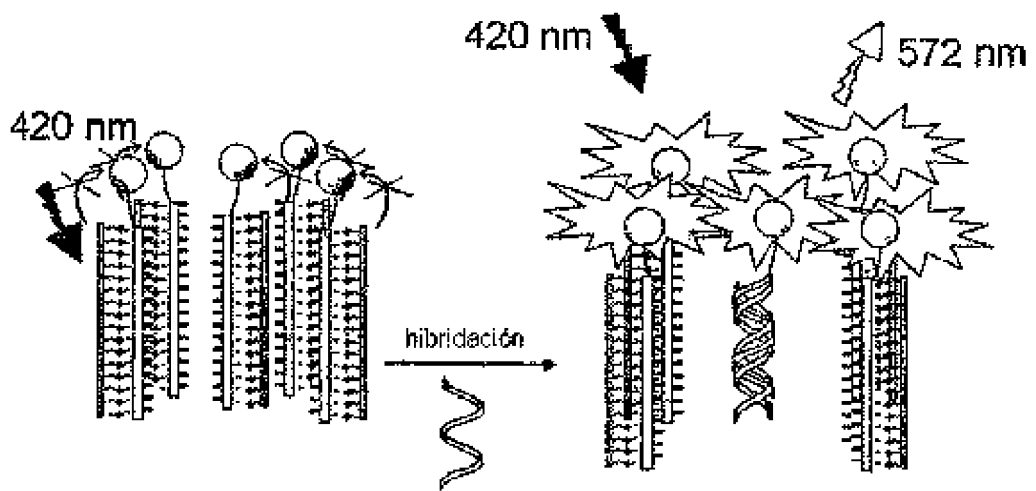


Figura 3

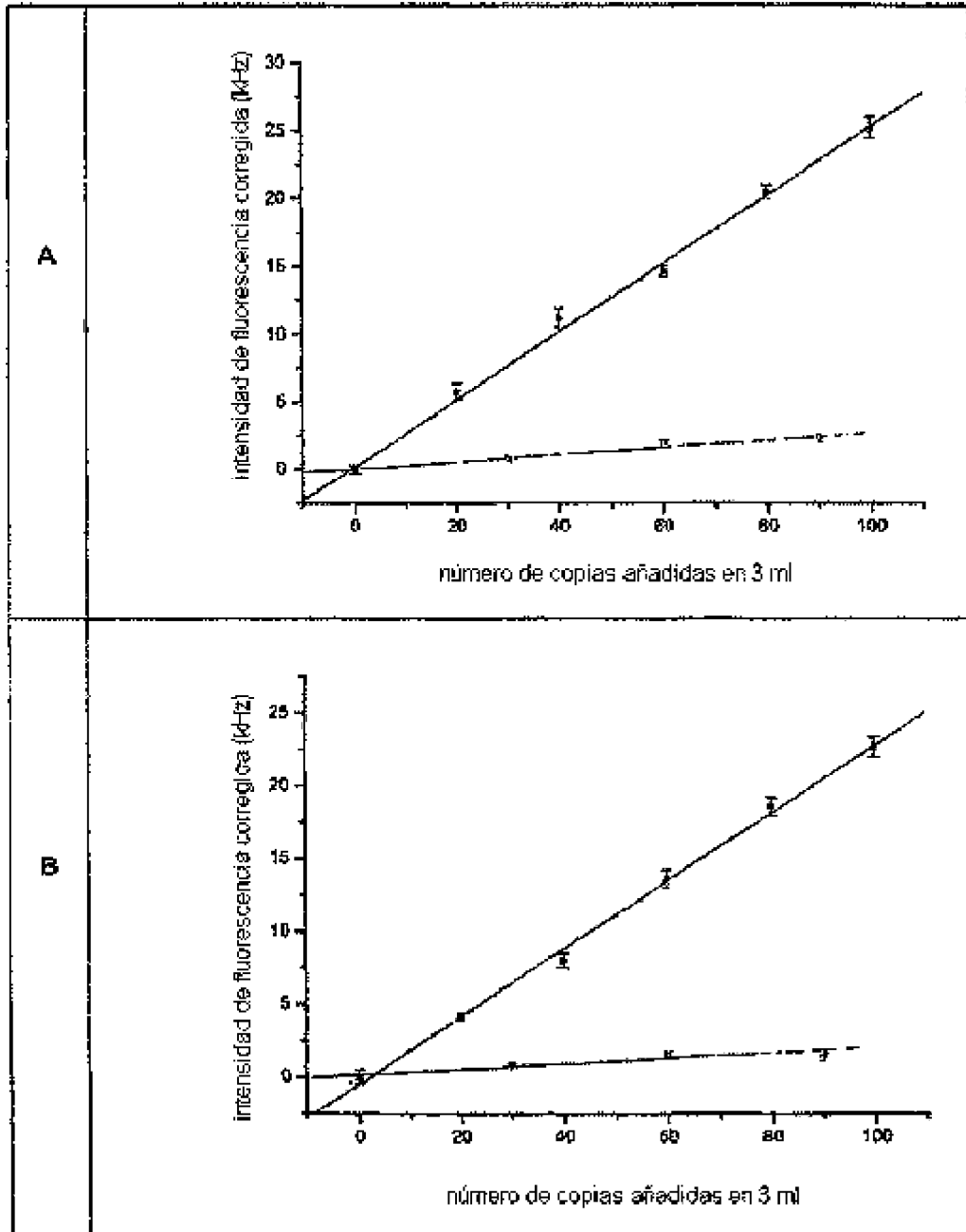


Figura 4

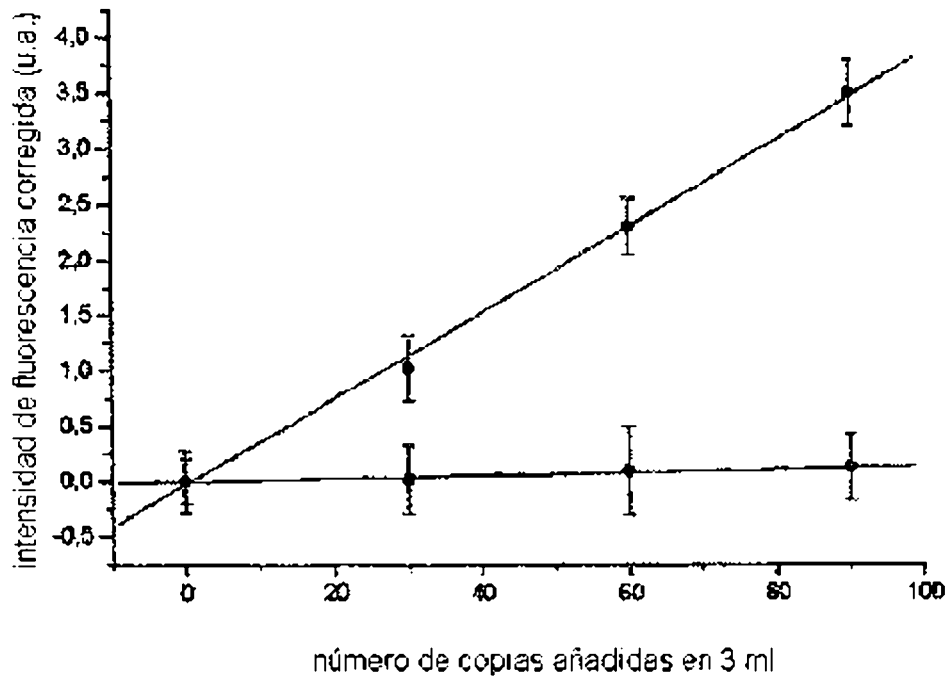


Figura 5

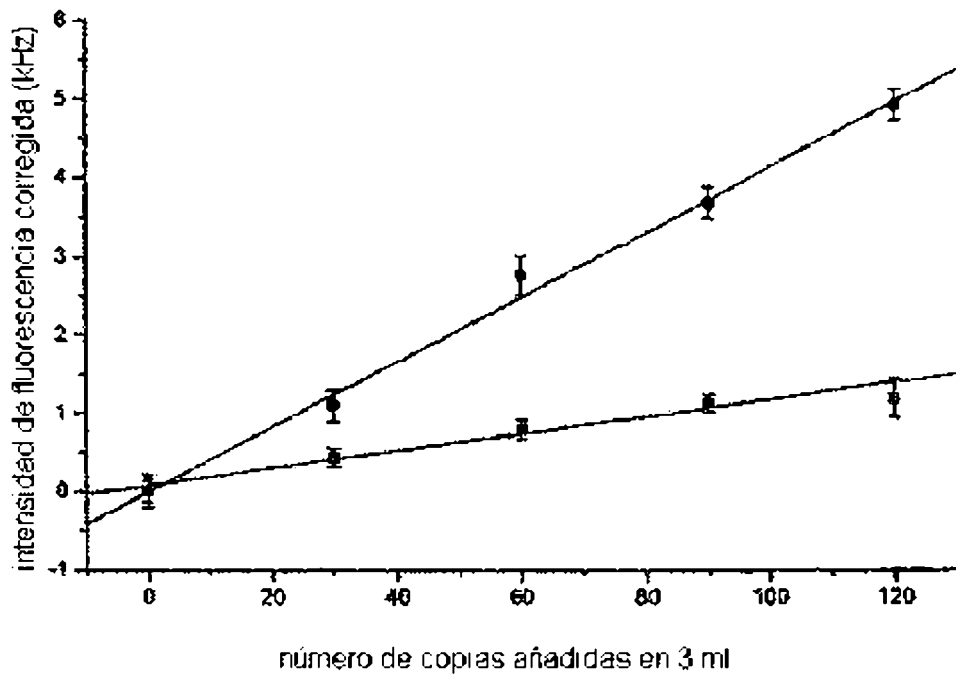


Figura 6

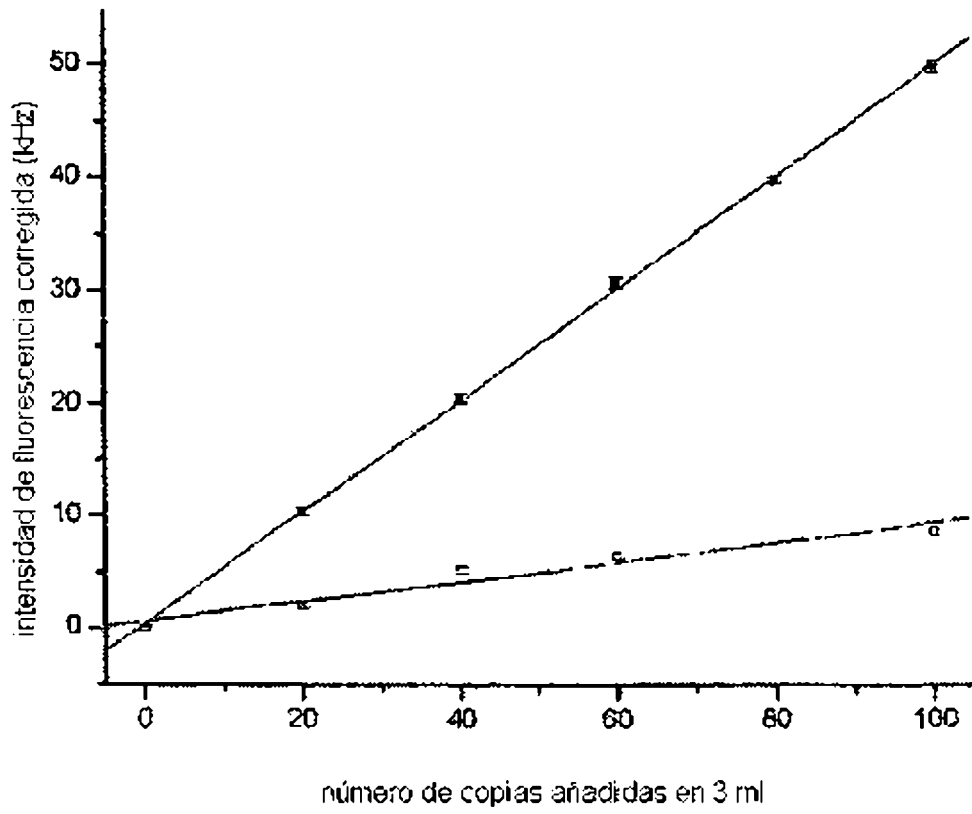


Figura 7