



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 812**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99932220 .9**
96 Fecha de presentación : **01.07.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1092047**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2001**

54 Título: **Antorchas moleculares.**

30 Prioridad: **02.07.1998 US 91616 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.12.2009

73 Titular/es: **GEN-PROBE INCORPORATED**
10210 Genetic Center Drive
San Diego, California 92121-4362, US

72 Inventor/es: **Becker, Michael, M. y**
Schroth, Gary

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Antorchas moleculares.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a los procedimientos y composiciones para detectar la presencia o la cantidad de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra.

10 **Antecedentes de la invención**

Una secuencia de ácido nucleico diana se puede detectar mediante varios procedimientos que utilizan sondas de ácido nucleico concebidas para hibridar preferentemente con la secuencia diana y no con otras secuencias que pueden estar presentes en una muestra. Los ejemplos de secuencias diana incluyen secuencias que pueden estar presentes inicialmente en una muestra, o producidas como parte de un procedimiento de amplificación, como una secuencia característica de un microorganismo, un virus, un gen vegetal, o un gen animal como un gen humano. También se puede detectar una secuencia trazadora que se produce como parte de un procedimiento de detección en presencia de una secuencia diana, pero que presenta una secuencia que no es dependiente de la secuencia diana.

La hibridación de sondas para detectar secuencias diana de ácido nucleico puede formar dúplex de sonda: diana detectable en unas condiciones adecuadas. La detección de estos dúplex se facilita utilizando una sonda marcada. Existen diferentes técnicas para reducir el ruido de fondo debido a la señal de sondas marcadas no hibridadas en una secuencia diana. Estas técnicas incluyen la utilización de una etapa de separación física, una etiqueta preferencialmente alterada en un dúplex sonda: diana versus una sonda no hibridada, y/o unos marcadores de interacción.

Los marcadores de interacción son dos o más marcadores que cooperan cuando se encuentran próximos uno al otro para producir una señal que es distinta a la señal producida por dichos marcadores cuando están más separados de forma que su cooperación disminuye. Los marcadores se pueden asociar con una o más entidades moleculares. Los sistemas de detección se pueden designar de forma que los marcadores interactúen tanto en presencia de una secuencia diana como en ausencia de una secuencia diana.

La patente US nº 4.820.630 de Taub *et al.* describe marcadores de interacción presentes en dos moléculas distintas de ácido nucleico que cooperan para producir una señal detectable en presencia de una secuencia de ácido nucleico diana. La hibridación de ambas moléculas con la secuencia diana lleva a los marcadores a una distancia corta de forma que pueden cooperar para producir una señal distinta a los marcadores que no cooperan a corta distancia.

La solicitud europea número 87300195.2, de Morrison, número de publicación 0 232 967, describe un sistema de detección que implica un reactivo constituido por dos sondas complementarias de ácidos nucleicos. Una de las sondas complementarias contiene un primer marcador, y la otra sonda complementaria contiene un segundo marcador. Los primer y segundo marcadores pueden interactuar entre sí. La formación de un complejo entre la secuencia diana y una de las dos sondas complementarias cambia la interacción entre los dos marcadores.

Las patentes US nº 5.118.801 y nº 5.312.728 de Lizardi *et al.* describen una sonda de ácido nucleico que contiene una secuencia diana complementaria flanqueada por secuencias “cambiadas” que son complementarias entre sí. En ausencia de una secuencia diana, las secuencias cambiadas se hibridan conjuntamente. En presencia de una secuencia diana, la sonda hibrida con la secuencia diana, separando mecánicamente las secuencias cambiadas y produciendo, de este modo, un “cambio abierto”. El estado de la secuencia cambiada, tanto abierta como cerrada, está indicada por ser útil para generar selectivamente una señal detectable si la sonda hibrida con la secuencia diana.

La solicitud internacional número PCT/US94/13415 de Lizardi *et al.*, publicación internacional WO 95/13399, describe una sonda de hibridación “unitaria”. La sonda contiene una secuencia diana complementaria, un par de afinidad que mantiene la sonda en una conformación cerrada en ausencia de una secuencia diana, y un par marcador que interactúa cuando la sonda se presenta en una conformación cerrada. La hibridación de la sonda con la secuencia diana cambia la sonda a una conformación abierta que reduce la interacción entre el par marcador.

55 **Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones y se refiere a la utilización de antorchas moleculares para detectar la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana. Las antorchas moleculares contienen un dominio de unión diana, un dominio diana de cierre, y una región de unión. El dominio diana de unión está predispuesto a la secuencia diana de modo que el dominio diana de unión forma un híbrido más estable con la secuencia diana que con el dominio diana de cierre bajo las mismas condiciones de hibridación. La región de unión facilita la formación o mantenimiento de una antorcha cerrada.

La presencia de una secuencia diana se puede detectar utilizando una antorcha molecular mediante la medición tanto si la antorcha molecular está abierta o cerrada. En una “antorcha cerrada” el dominio diana de unión se hibrida al dominio diana de cierre. En una “antorcha abierta” el dominio diana de unión no hibrida con el dominio diana de cierre.

ES 2 330 812 T3

La secuencia diana sesgada del dominio diana de unión de la antorcha molecular y la región de unión, se puede utilizar para detectar una secuencia diana junto con (1) condiciones de desnaturalización del dominio diana de unión y condiciones de hibridación del dominio diana de unión, o (2) condiciones de desplazamiento de la cadena. Esta invención se refiere a estas condiciones últimas.

Bajo condiciones de desnaturalización del dominio diana de unión la antorcha está abierta y es fácilmente accesible para la hibridación con la secuencia diana. El dominio diana de unión sesgada a la secuencia diana permite que el dominio diana de unión permanezca abierto en presencia de una secuencia diana debido a la formación de un híbrido dominio diana de unión: secuencia diana incluso cuando se rebajan las condiciones de astringencia de la muestra.

Bajo condiciones de desplazamiento de la cadena la secuencia diana se puede hibridar con el dominio diana de unión presente en una antorcha cerrada para abrir así la antorcha. Los ensayos realizados utilizando condiciones de desplazamiento de la cadena se pueden realizar bajo condiciones medioambientales esencialmente constantes. Bajo unas condiciones medioambientales esencialmente constantes el medioambiente no cambia para conseguir primero la desnaturalización y después conseguir la hibridación, por ejemplo, aumentando y disminuyendo la temperatura.

La región de unión facilita la producción o mantenimiento de una antorcha cerrada mediante la producción de por lo menos uno de los siguientes: (1) un aumento en la tasa de formación de la antorcha cerrada; y (2) un aumento en la estabilidad de la antorcha cerrada. El aumento en la tasa de formación y/o estabilidad está en relación con dichas actividades en ausencia de una región de unión.

La región de unión está formada por uno o más grupos que enlazan covalentemente y/o no covalentemente los dominios diana de apertura y de cierre. Los grupos individuales presentes en la región de unión se unen mediante interacciones covalentes y/o no covalentes como interacción iónica, interacción hidrofóbica y puentes de hidrógeno.

La detección de la presencia de una antorcha abierta incluye directamente detectar si están presentes antorchas abiertas y/o detectar si están presentes antorchas cerradas. Los ejemplos de técnicas que se pueden utilizar para detectar marcadores abiertos incluyen las siguientes: (1) las que implican la utilización de marcadores de interacción para producir diferentes señales dependiendo de si la antorcha está abierta o cerrada; (2) las que implican la utilización de un dominio diana de cierre que comprende un marcador que produce una señal cuando se encuentra en un híbrido dominio diana de unión: dominio de cierre que es diferente de la señal producida cuando el dominio diana de cierre no se hibrida con el dominio diana de unión; y (3) las que implican la detección de información de la secuencia accesible mediante un dominio diana de unión abierto.

Los marcadores de interacción se utilizan para detectar la presencia de una antorcha abierta. Las técnicas que implican la utilización de marcadores de interacción se pueden llevar a cabo utilizando marcadores que producen una señal diferente cuando se posicionan cerca uno de otro debido a un dominio diana de unión cerrado que cuando no están próximos entre sí debido a un dominio diana de unión abierto. Los ejemplos de marcadores de interacción incluyen enzima/sustrato, enzima/cofactor, luminiscencia/inhibidor, luminiscencia/aducto, dímeros de tinción y pares Forrester de transferencia de energía.

El dominio diana de unión y el dominio diana de cierre están formados por unas secuencias de reconocimiento de bases de nucleótidos que son sustancialmente complementarias una de otra. Una "secuencia de reconocimiento de bases de nucleótidos" se refiere a los grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos unidas covalentemente mediante un esqueleto central. Los grupos de reconocimiento de las bases de nucleótidos crean puentes de hidrógeno con, por lo menos, adenina, guanina, citosina, timina o uracilo. El "esqueleto" de una secuencia de reconocimiento de bases de nucleótidos está formada por uno o más grupos unidos covalentemente que proporcionan a los grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos una orientación adecuada para permitir la hibridación de nucleótidos complementarios presentes en el ácido nucleico.

Las "secuencias sustancialmente complementarias" son dos secuencias de reconocimiento de bases de nucleótidos que forman un híbrido estable en las condiciones utilizadas. Las secuencias sustancialmente complementarias pueden estar presentes en la misma molécula o en diferentes moléculas.

Las secuencias sustancialmente complementarias incluyen secuencias completamente complementarias entre ellas y secuencias con una complementariedad inferior, incluyendo las mal emparejadas y los enlaces. También pueden estar presentes los salientes como los originados debido a nucleótidos internos no complementarios, y a enlazadores no complementarios, situados entre dos grupos de reconocimiento hibridados conjuntamente. Preferentemente, las secuencias sustancialmente complementarias están formadas dos secuencias que contienen regiones que presentan preferentemente una longitud de por lo menos 10, por lo menos 15, o por lo menos 20 grupos de longitud. Preferentemente, por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 90%, o un 100% de los grupos presentes en una de las dos regiones crean puentes de hidrógeno con grupos presentes en las otras dos regiones. Más preferentemente, el puente de hidrógeno se forma entre bases complementarias de nucleótidos A-T, G-C o A-U.

Un "enlazador" se refiere a una cadena de átomos que unen covalentemente dos grupos. La cadena de átomos está unida covalentemente y puede incluir diferentes estructuras como ramificaciones y grupos cíclicos.

ES 2 330 812 T3

Por consiguiente, la presente invención describe la utilización de una antorcha molecular para determinar si una secuencia de ácido nucleico diana está presente en una muestra como se define en la reivindicación 1:

utilización de una antorcha molecular para detectar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra en un procedimiento de amplificación a una temperatura constante, la antorcha molecular que comprende:

un dominio diana de unión unido a un dominio diana de cierre mediante un enlazador no nucleótido, tanto el dominio diana de unión como el dominio diana de cierre comprenden unos grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos,

en el que el dominio diana de unión se hibrida con el dominio diana de cierre en ausencia del ácido nucleico diana,

en el que la utilización comprende el desplazamiento del dominio diana de unión del dominio diana de cierre mediante el ácido nucleico diana, de modo que el dominio diana de unión forma un híbrido más estable con el ácido nucleico diana que con dominio diana de cierre en la muestra,

en el que la antorcha molecular no presente un grupo OH 3' terminal disponible para la extensión del cebador, y

en el que la antorcha molecular comprende unos marcadores de interacción que producen señales diferentes dependiendo de si el dominio diana de unión se hibrida con el dominio diana de cierre o con el ácido nucleico diana.

La detección de la presencia de una antorcha abierta proporciona una indicación de la presencia de la secuencia diana.

“Medios de detección diana” se refiere al material descrito en la presente solicitud y a sus equivalentes que se pueden hibridar con la secuencia diana y a los medios de cierre de la antorcha. Los medios de detección diana están dirigidos hacia la secuencia diana, en comparación a los medios de cierre de la antorcha, de forma que en presencia de la secuencia diana los medios de detección diana se hibridan preferentemente con la secuencia diana.

Los “medios de cierre de la antorcha” se refieren al material descrito en la presente memoria y a sus equivalentes que se pueden hibridar con los medios de detección diana para proporcionar una antorcha cerrada.

Los “medios de unión” se refiere al material descrito en la presente solicitud y a sus equivalentes que se unen a los medios de detección diana y a los medios de cierre de la antorcha, y que facilitan la producción o el mantenimiento de una antorcha cerrada en ausencia de una secuencia diana.

Otro aspecto de la presente invención presenta la utilización de una antorcha molecular para determinar si una secuencia diana está presente y que implica las etapas siguientes: (a) el contacto de una muestra con la antorcha molecular que contiene un dominio diana de unión y un dominio diana de cierre conectados uno al otro por una región de unión; y (b) la detección de la presencia de una antorcha abierta como indicación de la presencia de la secuencia diana.

El dominio diana de unión está dirigido hacia la secuencia diana de forma que un híbrido dominio diana de unión: secuencia diana es más estable que un híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre. Si la secuencia diana no está presente, favorece la conformación de una antorcha cerrada.

Antes de exponerlo a la muestra, el dominio diana de unión de la antorcha molecular puede estar abierto o cerrado dependiendo del medio en el que se guarde. Según la presente exposición, se pueden utilizar condiciones de desnaturalización para abrir el dominio diana de unión. Preferentemente, la desnaturalización se realiza utilizando calor.

Alternativamente, se pueden utilizar las condiciones de desplazamiento de cadena. Si se utilizan las condiciones de desplazamiento de la cadena, entonces la antorcha molecular no necesita abrirse antes de su unión a la secuencia diana.

Otro aspecto de la presente exposición describe un procedimiento para la detección de la presencia de una secuencia diana en la que una mezcla que contiene una muestra y una antorcha molecular se expone primero a condiciones de desnaturalización y después a condiciones de hibridación. La presencia de una antorcha abierta se utiliza como indicación de la presencia de la secuencia diana.

La “condiciones de desnaturalización” son unas condiciones bajo las cuales el híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre no es estable y la antorcha está abierta. En una forma de realización preferida, la región de unión permanece intacta bajo condiciones de desnaturalización. Por consiguiente, en esta forma de realización, en condiciones de desnaturalización el dominio diana de unión resulta asequible para la hibridación a la secuencia diana, pero también se mantiene cercano al dominio diana de cierre para la posterior hibridación en ausencia de una secuencia diana.

Las “condiciones de hibridación” son condiciones bajo las cuales tanto el híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre como el híbrido dominio diana de unión: secuencia diana son estables. Bajo estas condiciones, en

ausencia de una secuencia diana, no se inhibe por la hibridación con la secuencia diana que el dominio diana de unión esté presente en un híbrido con el dominio diana de cierre.

Otro aspecto de la presente exposición se refiere a una antorcha molecular. La antorcha molecular contiene (1) un medio de detección diana para hibridarse con una secuencia diana, si está presente, para producir una antorcha abierta; (2) un medio de cierre de la antorcha para hibridarse al medio de detección diana en ausencia de la secuencia diana para proporcionar una antorcha cerrada; y (3) un medio de unión para facilitar una conformación de antorcha cerrada en ausencia de la secuencia diana.

Otro aspecto de la presente exposición se refiere a un marcador molecular que contiene un dominio diana de unión y un dominio diana de cierre unidos mediante una región de unión. Los dominios diana de unión y de cierre son sustancialmente complementarios entre ellos. El dominio diana de unión está dirigido a una secuencia diana que es un complemento perfecto de ADN o ARN, preferentemente un complemento de ARN, del dominio diana de unión. El dominio de unión diana forma así un dúplex más estable con su complemento de ADN y ARN perfecto que con el dominio de cierre diana.

Un “complemento perfecto de ADN o ARN del dominio diana de unión” es una secuencia de ADN o ARN que contiene una base de nucleótido purina o pirimidina complementaria opuesta a cada grupo de reconocimiento presente en el dominio diana de unión. Las bases de nucleótidos de purina o pirimidina pueden estar unidas entre sí mediante un puente de hidrógeno.

En la presente memoria se describen varios ejemplos. Estos ejemplos no pretenden limitar de forma alguna la invención reivindicada.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de las figuras, la descripción de la invención, los ejemplos, y las reivindicaciones siguientes.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona un diagrama de energía que ilustra la energía libre de un híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre (I), la estabilidad de un híbrido dominio diana de unión: secuencia diana (II), la diferencia de energía libre entre I y II (ΔG), y la diferencia en la activación de la energía libre (ΔG^*) para la conversión de I a II.

Las Figuras 2A-2G proporcionan ejemplos de diferentes estructuras de antorchas moleculares. “F” se refiere a un fluoróforo y “Q” a un inhibidor.

Las Figuras 3A-3C proporcionan ejemplos del desplazamiento de la cadena. “F” se refiere a un fluoróforo y “Q” a un inhibidor. La secuencia diana se muestra mediante una línea en negrita.

La Figura 4 ilustra el funcionamiento de una antorcha molecular que contiene una región de unión que es un enlace covalente. “F” se refiere a un fluoróforo y “Q” a un inhibidor.

La Figura 5 ilustra el funcionamiento de una antorcha molecular que contiene una región de unión constituida por dos grupos de polietilenglicol (PEG) y dos secuencias de ácido nucleico sustancialmente complementarias que presentan una T_m suficientemente elevada como para que no se derrita durante el calentamiento. “F” se refiere a un fluoróforo y “Q” a un inhibidor.

Las Figuras 6A y 6B ilustran cadenas que forman antorchas moleculares 1-7. “F” se refiere a un fluoróforo y “Q” a un inhibidor, “PEG” se refiere a polietilenglicol y “ccc” se refiere a un grupo propilo localizado en la posición 3’ del azúcar terminal. Las bases que se muestran en cursiva son ribonucleótidos sustituidos en 2’-metoxi.

La Figura 7 ilustra una antorcha molecular que se puede utilizar en una reacción de desplazamiento de la cadena. “F” se refiere a un fluoróforo y “Q” a un inhibidor.

La Figura 8 ilustra el funcionamiento de una antorcha molecular en una reacción de desplazamiento de la cadena. “F” se refiere a un fluoróforo y “Q” a un inhibidor. La secuencia diana se muestra mediante una línea en negrita.

Descripción detallada de la invención

Una antorcha molecular se designa preferentemente para proporcionar componentes cinética y termodinámica favorable en un ensayo para detectar la presencia de una secuencia diana. Los componentes cinéticos y termodinámicos de un ensayo que implican una antorcha molecular se pueden utilizar para aumentar la detección específica de una secuencia diana.

La termodinámica de una antorcha molecular preferida se ilustra en la Figura 1. Haciendo referencia a la Figura 1, “I” expresa el híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre mientras que “II” expresa el híbrido dominio diana de unión: secuencia diana. En la Figura 1, ΔG^* representa la energía libre de activación necesaria para fusionar

ES 2 330 812 T3

el dominio diana de unión: dominio diana de cierre, y ΔG representa la diferencia de energía libre entre el híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre y el híbrido dominio diana de unión: secuencia diana.

El componente termodinámico de la presente invención se basa en que el híbrido dominio diana de unión: secuencia diana es más estable que el híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre ($\Delta G < 0$). La región de unión facilita la conformación de una antorcha cerrada en ausencia de una secuencia diana.

Además, dependiendo del diseño de la antorcha, la región de unión se puede utilizar para proporcionar una o más de las ventajas siguientes: (1) reducir la probabilidad de marcadores presentes en los dominios diana de apertura y de cierre que se separan en ausencia de una diana; (2) facilitar la utilización de dominios diana de unión cortos que se pueden utilizar para aumentar su sensibilidad a dianas mal emparejadas; (3) facilitar la conformación de una antorcha cerrada cuando el dominio diana de cierre y el dominio diana de unión contienen, por ejemplo, “nucleótidos” desemparejados o no básicos; y (4) facilitar la detección de secuencias diana ricas en adenina o timina mediante la estabilización de la interacción de dominios diana de unión ricos en adenina y timina y de cierre.

Condiciones de desnaturalización

Las condiciones de desnaturalización se pueden utilizar para proporcionar la energía suficiente (ΔG^*) para fundir el híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre. La cantidad de energía necesaria variará dependiendo de la composición de la antorcha molecular y de las condiciones medioambientales. Las condiciones medioambientales incluyen la composición de la solución del ensayo y la temperatura. La energía necesaria para abrir una diana cerrada se puede proporcionar, por ejemplo, calentando la muestra.

Una medida útil de la estabilidad de un híbrido es la temperatura de fusión (T_m). A la temperatura de fusión, un 50% de los híbridos presentes se desnaturalizan.

Utilizando una particular composición del ensayo, un híbrido no es estable cuando la temperatura del ensayo es superior a la T_f . Dependiendo de la composición de un ensayo, la T_f de un híbrido puede variar. Factores como la concentración de sal y la presencia de agentes de desnaturalización pueden afectar la T_f de un híbrido. La T_f se determina utilizando una composición particular del ensayo y variando la temperatura.

Teniendo en cuenta los factores que afectan a la T_m , como los descritos en el presente memoria y los conocidos en la técnica, las antorchas moleculares se pueden diseñar fácilmente para que presenten una T_f dominio diana de unión: dominio diana de cierre deseable y una T_f deseable del dominio diana de unión: diana de modo que $\Delta G < 0$. La T_f se puede medir, por ejemplo, utilizando técnicas como las descritas por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning a Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1969, y por Hogan *et al.*, patente USA N°: 5.547.842 (ambas incorporadas en el presente documento como referencia).

Aunque la Figura 2 muestra varias configuraciones distintas de antorchas moleculares, los expertos en la materia pueden valorar fácilmente otras configuraciones de marcadores moleculares que se pueden utilizar en la realización de la presente invención. La Figura 2A ilustra una antorcha molecular de doble cadena formada a partir de una región diana de unión y una región de unión. La región diana de unión consiste en un dominio diana de unión que une la secuencia diana y un dominio diana de cierre que une el dominio diana de unión.

Las Figuras 2B-2D ilustra unas antorchas moleculares de una sola cadena compuestas de uniones diana y regiones de unión, mientras que la Figura 2E ilustra una antorcha molecular de triple cadena.

La Figura 2F ilustra una antorcha molecular que contiene una región de unión y dos regiones diana de unión. Las dos regiones diana de unión pueden unir la misma o diferentes secuencias diana y pueden presentar las mismas o diferentes marcadores de interacción. Por ejemplo, se pueden detectar la presencia de diferentes secuencias diana posicionando diferentes tipos de fluoróforos que presentan diferentes características de emisión que son detectables separadamente en cada región diana de adhesión utilizando una única antorcha molecular mediante la búsqueda de las características de la señal de los diferentes fluoróforos.

La Figura 2G ilustra una antorcha molecular de doble cadena formado a partir de una región diana de unión y una región de unión. La región diana contiene polinucleótidos complementarios unidos a la unión diana o a los dominios diana de cierre mediante un enlace hecho a partir, por ejemplo, de PEG o de un polinucleótido.

Condiciones de desplazamiento de la cadena

En las condiciones de desplazamiento de la cadena, el híbrido dominio diana de unión: secuencia diana es más estable que el híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre, y se favorece la producción del híbrido dominio diana de unión: secuencia diana si la secuencia diana está presente.

El desplazamiento de la cadena se realiza preferentemente utilizando antorchas que presentan grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos accesibles para la hibridación con la diana. Estas antorchas contienen preferentemente de uno a diez grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos complementarios a la secuencia diana que son accesibles.

Son posibles diferentes configuraciones, incluyendo aquellas en las que región de cadena única es una región terminal, o en las que la región de cadena única es una región interna como una región doblada. Alternativamente, se pueden utilizar las condiciones de desplazamiento de la cadena que hacen, por ejemplo, que la región terminal 5' ó 3' de la antorcha "respire". La respiración de una antorcha ocurre en condiciones en las que la estabilidad de una región permite que la antorcha sea de cadena única y se hibride con la secuencia diana de forma que se favorezca/propicie la formación del híbrido dominio diana de unión: secuencia diana.

Las Figuras 3A-3C proporcionan diferentes ejemplos de desplazamiento de la cadena. Las Figuras 3A y 3C ilustran antorchas moleculares que presentan tres nucleótidos terminales asequibles para la hibridación diana. La figura 3B representa la respiración de los dos nucleótidos terminales y la hibridación diana.

Sesgo de la secuencia diana

El dominio diana de unión se puede dirigir intencionadamente hacia la secuencia diana utilizando diferentes consideraciones de diseño que afectan la estabilidad del híbrido de ácido nucleico. Estas consideraciones incluyen el grado de complementariedad, el tipo de grupos complementarios de reconocimiento, y la parte central de la secuencia de reconocimiento de la base de nucleótidos. El efecto de las variaciones de estos distintos factores depende de las condiciones medioambientales.

El grado de complementariedad tiene en cuenta el número de grupos de reconocimiento presentes en el dominio diana de unión unidos por puente de hidrógeno con los grupos de reconocimiento presentes en el dominio diana de cierre y con la secuencia diana. El dominio diana de unión se puede diseñar para que presente un mayor grado de complementariedad a la secuencia diana que el dominio diana de cierre utilizando diferentes técnicas. Estas técnicas incluyen, por ejemplo, diseñar el dominio diana de unión para que presente uniones erróneas con el dominio diana de cierre pero no con la secuencia diana y la utilización de enlaces no nucleótidos en el dominio diana de cierre.

Los ejemplos de enlaces no nucleótidos presentes en una secuencia de reconocimiento de bases de nucleótidos los "nucleótidos" no básicos. A Los "nucleótidos no básicos" les falta un grupo de reconocimiento de base de nucleótidos.

Otros ejemplos de enlaces no nucleótidos incluyen los polisacáridos, los péptidos y los polipéptidos. La solicitud Internacional nº PCT/US88/03173, la publicación internacional WO 89/02439, y la patente US nº 5.585.481 de Arnold *et. al.* también proporcionan ejemplos de enlaces no nucleótidos.

Los tipos de grupos de reconocimiento presentes se pueden utilizar para dirigir el dominio diana de unión hacia la secuencia diana teniendo en cuenta factores como el grado de unión del puente de hidrógeno entre diferentes bases de nucleótidos de purina y pirimidina. Por ejemplo, el emparejamiento G-C o 2,6 diaminopurina-timina es más fuerte que el emparejamiento A-T y que el emparejamiento con bases universales como la inosina. El dominio diana de unión se puede diseñar para que presente un aumento del emparejamiento G o C con nucleótidos presentes en una secuencia diana en comparación con el dominio diana de cierre.

La composición de las partes centrales de la secuencia de reconocimiento de bases de nucleótidos se puede ajustar de diferentes formas para que se dirija el dominio diana de unión hacia una secuencia diana. Las partes centrales de las antorchas moleculares preferidas son enlaces de tipo azúcar-fosfodiéster, como los presentes en los ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico. Otro tipo de enlace es un enlace péptido, como el presente en los ácidos nucleicos péptidos.

Los ácidos nucleicos péptidos forman generalmente un dúplex más estable con ARN que con la correspondiente secuencia de ADN. Por consiguiente, el dominio diana de unión se puede dirigir hacia una secuencia diana de ARN, por ejemplo, mediante la utilización de una antorcha molecular en la que el dominio diana de unión contiene grupos de ácidos nucleicos péptidos y el dominio diana de cierre está formado por ADN.

En el caso de un enlace de tipo azúcar-fosfodiéster, tanto el grupo de azúcar como el enlace que junta los dos grupos de azúcar afectarán la estabilidad del híbrido. Un ejemplo del efecto que el azúcar puede presentar es el que se observa en ARN sustituido en 2'-metoxi. 2'-metoxi que contiene ácidos nucleicos forma generalmente dúplex más estables con ARN que con la secuencia de ADN correspondiente. Otro ejemplo es ARN sustituido en 2'-fluoro que presenta el mismo tipo de efecto que el ARN sustituido en 2'-metoxi.

Los ejemplos de formas en las que la estructura del grupo que enlaza puede afectar a la estabilidad del híbrido incluyen el efecto sobre la densidad de carga y la asociación física entre dos cadenas. Las interacciones estéricas de grupos voluminosos puede reducir la estabilidad del híbrido. Grupos como fosforotioatos pueden reducir la estabilidad del híbrido, mientras que grupos no cargados como los metilfosfonatos pueden aumentar la estabilidad del híbrido.

Híbrido dominio diana de unión: secuencia diana

La formación de un híbrido dominio diana de unión: secuencia diana da como resultado la producción de una antorcha abierta que es más estable que una antorcha cerrada. Las condiciones para abrir la antorcha, o desplazar la cadena, se pueden utilizar para facilitar la producción de una antorcha abierta en presencia de una secuencia diana.

La apertura y el cierre de la antorcha se puede conseguir cambiando las condiciones ambientales del procedimiento de detección utilizado. Los ejemplos de variaciones de las condiciones ambientales para abrir y cerrar la antorcha incluyen el calentamiento y el enfriamiento; el aumento y la disminución del pH; y la adición de un agente de desnaturalización, y después la disolución del agente.

El híbrido dominio diana de unión: secuencia diana es más estable que el híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre. Preferentemente, bajo las condiciones utilizadas en el procedimiento de detección, la T_f del dominio diana de unión: diana es de por lo menos 2°C, más preferentemente por lo menos 5°C, incluso más preferentemente de por lo menos 10°C, superior a la T_f del dominio diana de unión: dominio diana de cierre.

Una antorcha cerrada en ausencia de una secuencia diana reduce el ruido de fondo de una antorcha molecular no hibridada con la secuencia diana sin la necesidad de una etapa de separación. Preferentemente, en los ensayos en los que la antorcha se abre primero, las condiciones de hibridación que cierran el marcador en ausencia de una secuencia diana utilizan una temperatura de por lo menos 2°C menos, más preferentemente de por lo menos 5°C menos, y más preferentemente 10°C menos, que la T_f del híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre.

Si se desea, se puede utilizar una etapa de separación para separar físicamente antorchas moleculares hibridadas con secuencias diana de antorchas moleculares no hibridadas a secuencias diana. Se puede realizar una etapa de separación utilizando, por ejemplo, la información de la secuencia proporcionada por el dominio diana de unión. Por ejemplo, se puede utilizar una sonda de captura que presenta una secuencia de ácido nucleico complementaria al dominio diana de cierre para capturar una antorcha molecular hibridada con una secuencia diana. La sonda de captura misma se puede proporcionar tanto directa como indirectamente a una bola o columna.

Si se utilizan sondas de captura, u otros tipos de sondas de ácido nucleico complementarias al dominio diana de cierre, es importante que esas sondas se diseñen y se utilicen en condiciones en las que un híbrido dominio diana de unión: sonda no se forma en ausencia de un híbrido dominio diana de unión: secuencia diana. Preferentemente, un híbrido dominio diana de unión: sonda presenta una T_f que es por lo menos 5°C, y más preferentemente por lo menos 10°C menos que el híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre.

Detección de la secuencia diana

Las antorchas moleculares se pueden utilizar para detectar la presencia de una secuencia diana mediante la determinación de si una antorcha está abierta en unas condiciones en las que un híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre es estable. Las antorchas abiertas se pueden detectar utilizando diferentes técnicas como (1) las que implican la utilización de marcadores de interacción para producir diferentes señales dependiendo de si la antorcha está abierta o cerrada; (2) las que implican la utilización de un dominio diana de cierre que comprende un marcador que produce una señal cuando en híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre que es distinta a la señal producida cuando el dominio diana de cierre no está hibridado al dominio de unión diana; y (3) los que implican la detección de información de la secuencia proporcionada por un dominio diana de unión abierto.

Se pueden utilizar diferentes tipos de marcadores de interacción para determinar si una antorcha está abierta. Preferentemente, los marcadores de interacción pueden ser un par luminiscencia/inhibidor, un par luminiscente/aducto, un par de transferencia de energía Forrester o un dímero de tinción. Pueden estar presentes más de un marcador y más de un tipo de marcador en una molécula en particular.

Un par luminiscencia/inhibidor está formado por uno o más marcadores de luminiscencia, como marcadores químico luminiscentes o fluorescentes y uno o más inhibidores. Preferentemente, se utiliza un par luminiscente/inhibidor para detectar una antorcha abierta. Un marcador fluorescente absorbe la luz de una longitud de onda en particular, o un intervalo de longitud de onda, y emite luz con una emisión de una longitud de onda en particular, o tasa de longitud de onda. Un inhibidor apaga parcial o completamente, la señal emitida de un marcador fluorescente excitado. Los inhibidores pueden reducir la producción de la señal de diferentes fluoróforos. Por ejemplo, el ácido 4-(4'-dimetilamino-fenilaxo) benzoico (DABCYL) puede sofocar aproximadamente un 95% de la señal producida por el ácido 5-(2'-aminoetilo)aminoftalina-1-sulfónico (EDANS), por la rodamina y la fluoresceína.

Se pueden utilizar diferentes cantidades y tipos de fluorescente y de marcadores de sofocación. Por ejemplo, se pueden utilizar varios marcadores fluorescentes para aumentar la producción de la señal de una antorcha abierta, y se pueden utilizar varios inhibidores para asegurarse de que en la ausencia de una secuencia diana una molécula fluorescente produce poca o ninguna señal. Los ejemplos de fluoróforos incluyen acridina, fluoresceína, sulforodamina 101, rodamina, EDANS, Texas Red, Eosina, Biodipy y lucifer yellow. (Por ejemplo, ver Tyagi et. al., Nature Biotechnology 16:49-53, 1998. ejemplos de inhibidores incluyen DABCYL, talio, cesio y bromuro de p-xileno bis piridinio.

Un par luminiscente/aducto está formado por uno o más marcadores de interacción y una o más moléculas capaces de formar un aducto con la/las molécula/s y, de este modo, disminuir la producción de señal de la/las molécula/s luminiscentes. La utilización de la formación del aducto para alterar señales de una molécula luminiscente utilizado ligandos libres en una solución se describe en la patente US n° 5.731.148 de Becker y Nelson. Los aductos también se pueden formar agregando un aducto formado a la antorcha molecular, o a una sonda de ácido nucleico que se hibrida con la información de la secuencia proporcionada en una antorcha abierta.

Los pares de transferencia de energía Förrester están hechos a partir de dos marcadores en los que el espectro de emisión de un primer marcador se solapa con el espectro de excitación de una segunda marca. El primer marcador se puede excitar y se pueden medir las características de la emisión del segundo marcador para determinar si los marcadores están interactuando. Los ejemplos de pares de transferencia de energía Förrester incluyen pares que implican fluoresceína y rodamina; nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol y rodamina; fluoresceína tetrametilrodamina; fluoresceína y fluoresceína; IAEDANS y fluoresceína; y BODIPYFL y BODIPYFL.

Un dímero de tinción está formado a partir de dos tintes que interactúan sobre la formación de un dímero para producir una señal diferente cuando los tintes no están en conformación de dímero. Las interacciones de dímeros de tinción se describen, por ejemplo, por Packard *et. al.*, Proc. Natl. Sci. US 93:11640-11645, 1996.

La señal observada que se produce durante la etapa de detección que es característica de la presencia de una secuencia diana se puede comparar con una reacción de control que no presenta una secuencia diana o cantidades conocidas de secuencias diana. Las cantidades conocidas de secuencias diana se pueden utilizar para obtener una curva de calibración. Cuando se realiza una reacción controlada preferentemente al mismo tiempo que una reacción experimental, no es necesario que las reacciones de control tengan lugar al mismo tiempo que la reacción experimental y se pueden basar en los datos obtenidos en un experimento previo.

En las Figuras 4 y 5 se proporcionan ejemplos de la utilización de antorchas moleculares que presentan marcadores de interacción para detectar una secuencia diana. Ambas figuras ilustran la presencia de una secuencia diana. En ausencia de una secuencia diana, el dominio diana de unión de la antorcha molecular se cierra dando como resultado la sofocación de la señal.

La Figura 4 ilustra la utilización de una antorcha molecular de una sola cadena que contiene una pequeña región de unión. Para fundir el híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre se utiliza la aplicación de calor. La antorcha es dirigida hacia la secuencia diana de ARN mediante, por ejemplo, la presencia de ribonucleótidos sustituidos en 2'-metoxi presente en el dominio diana de unión. En presencia de una secuencia diana, el inhibidor (Q) ya no permanece próximo al fluoróforo (F) disminuyendo, de este modo, la capacidad del inhibidor de afectar al fluoróforo fluorescente.

La Figura 5 ilustra la utilización de una molécula de doble cadena con una región de unión hecha a partir de dos partes, un enlace PEG no nucleótido y de una secuencia cuya elevada T_f impide su fusión durante el ensayo.

Otra forma de realización de la presente invención implica la detección de antorchas abiertas utilizando un marcador que produce una señal cuando en un híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre que es diferente de la señal producida cuando el dominio diana de cierre no se hibrida con el dominio diana de unión. Dichos marcadores incluyen moléculas y marcadores luminiscentes que presentan una estabilidad diferente cuando se presentan en ambientes distintos.

La señal producida por moléculas luminiscentes presentes en una secuencia de reconocimiento de bases de nucleótidos se puede alterar mediante otra secuencia de reconocimiento de bases de nucleótidos. Por ejemplo, los nucleótidos en una secuencia de reconocimiento de bases de nucleótidos se pueden utilizar para inhibir, o alterar el movimiento rotacional de un fluoróforo presente en otra secuencia de reconocimiento de bases de nucleótidos.

Los ambientes que pueden afectar la estabilidad de algunos marcadores incluyen un dúplex de ácido nucleico formada con un emparejamiento de bases Watson-Crick. Los ejemplos de estos marcadores y de su utilización se describen en la patente US nº 5.731.148 de Becker y Nelson, y en la patente US nº 5.283.174 de Arnold *et. al.*

El éster de acridinio y sus derivados son los ejemplos preferidos de marcadores para la detección de antorchas abiertas basadas en el ambiente del marcador. Un éster de acridinio se puede detectar utilizando diferentes técnicas como inactivar selectivamente el marcador no presente en un dúplex de ácido nucleico. Un ejemplo de la utilización de uno o más marcadores de éster de acridinio implica adjuntar dichos marcadores al dominio diana de cierre y utilizando una reducción de la señal debido a la inactivación selectiva de los marcador/es de éster de acridinio presentes en un dominio diana de cierre de una cadena como una indicación de la presencia de la secuencia diana.

La detección de antorchas abiertas que utiliza la información de la secuencia proporcionada por un dominio diana de unión abierto se puede realizar utilizando unas sondas que se hibridan con el dominio diana de cierre. Las sondas de detección preferidas contienen un marcador detectable. El marcador detectable puede ser, por ejemplo, un marcador que interactúa con un marcador presente en el dominio diana de cierre, o puede ser un marcador que produce una señal en ausencia de un marcador de interacción en el dominio diana de cierre. Una sonda de marcaje preferida es el éster de acridinio.

Aumento del número de secuencias diana

En casos en los que una secuencia diana está presente en una muestra en pequeñas cantidades, se puede realizar una amplificación para aumentar el número de secuencias diana. Existen numerosas técnicas de amplificación bien conocidas en la técnica, incluyendo las que implican un amplificación asociada a la transcripción, una reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) y una reacción en cadena de la ligasa (LCR). La presente invención se refiere a procedimientos de amplificación a una temperatura constante.

Preferentemente, la antorcha molecular se utiliza conjuntamente con una amplificación asociada a la transcripción. La amplificación asociada a la transcripción implica la generación de transcripciones de ARN utilizando ARN polimerasa que reconoce una región de promotor de ADN de doble cadena.

Los ejemplos de referencias que describen la amplificación asociada a la transcripción incluyen Burg *et al.*, patente US nº 5.437.990; Kacian *et al.*, patente US nº 5.399.491; Kacian *et al.*, patente US nº 5.554.516; Kacian *et al.*, solicitud internacional nº PCT/US93/04015, publicación internacional WO 93/22461, Gingeras *et al.*, solicitud internacional nº PCT/US87/01966, publicación internacional WO 88/01302; Gingeras *et al.*, solicitud internacional nº PCT/US88/02108, publicación internacional WO 88/10315; Davey y Malek, solicitud EPO nº 88113948.9, publicación europea nº 0 329 822 A2; Malek *et al.*, patente US nº 5.130.238; Urdea, solicitud internacional nº PCT/US91/00213, publicación internacional WO 91/10746; McDonough *et al.*, solicitud internacional nº PCT/US93/007138, publicación internacional WO 94/03472; Ryder *et al.*, solicitud internacional Nº PCT/US94/08307, publicación internacional WO 95/03430.

Resulta preferida la utilización de un procedimiento de amplificación asociado a la transcripción que implica la actividad de la RNasa H. Más preferentemente, el procedimiento utiliza la actividad de la RNasa H presente en transcriptasa reversa para facilitar la separación. La patente US nº 5.399.491 de Kacian *et al* describe una amplificación que tiene lugar bajo condiciones esencialmente constantes sin la adición de una actividad de la RNasa H exógena. El procedimiento utiliza la actividad de la RNasa H presente en transcriptasa reversa para facilitar la separación de la cadena.

Una de las ventajas de la utilización de la presente invención conjuntamente con una amplificación basada en la transcripción es que la antorcha molecular se puede añadir antes de la amplificación, y la detección se puede realizar sin la adición de reactivos adicionales. La antorcha molecular es apropiada para su utilización en una amplificación asociada a la transcripción porque la Tf del híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre se puede ajustar fácilmente para que sea más elevada que la temperatura utilizada durante la amplificación. El dominio diana de unión cerrado impide que la antorcha molecular se una prematuramente a las secuencia diana generadas mediante la amplificación.

Después de la amplificación, la solución se puede calentar para abrir el dominio diana de unión permitiendo que la antorcha molecular se hibride a la secuencia diana. Después, la solución se puede enfriar para cerrar los dominios diana de cierre de antorcha no hibridadas a secuencias diana. La presencia de antorchas abiertas que presentan, por ejemplo, un par fluoróforo/inhibidor se puede después medir mediante la irradiación de la muestra con la luz de excitación adecuada y después medir la emisión de luz.

Los ejemplos de referencias que nombran otros procedimientos de amplificación incluyen los que describen la amplificación de PCR como las patentes US nº 4.683.195, nº 4.683.202 y 4.800.159 de Mullis *et al.*, y en Methods in Enzymology, Volumen 155, 1987, págs. 335-350; y en los que describen la reacción en cadena de la ligasa, como la solicitud de patente europea nº 88311741.8 de Backman, la publicación europea nº 0 320 308.

Construcción de la antorcha molecular

Una antorcha molecular comprende un dominio diana de unión, un dominio diana de cierre y una región de unión. Los dominios diana de unión y de cierre son cada uno grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos.

Las secuencias de reconocimiento de las bases de nucleótidos contienen grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos capaces de enlazar con el hidrógeno con bases de nucleótidos nitrogenadas presentes en el ácido nucleico. Los grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos están unidos por una parte central que proporciona una conformación y espaciado adecuados para permitir que los grupos creen puentes de hidrógeno con los nucleótidos presentes en el ácido nucleico.

Un grupo de reconocimiento de bases de nucleótidos dado puede ser complementario de un nucleótido particular (por ejemplo, adenina, guanina, citosina, timina y uracilo) y, de este modo, poder crear un puente de hidrógeno con ese nucleótido presente en un ácido nucleico. Un grupo de reconocimiento de bases de nucleótidos también debe poder crear un puente de hidrógeno con diferentes nucleótidos. Por ejemplo, cuando la inosina es un grupo de reconocimiento de bases de nucleótidos se puede unir al hidrógeno con diferentes bases de nucleótidos.

Los grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos son bases de purina o pirimidina nitrogenadas, o sus derivados, capaces de enlazar con el hidrógeno tanto con la adenina, la guanina, la citosina, la timina o el uracilo. Los ejemplos de estos grupos de reconocimiento incluyen adenina, guanina, citosina, timina, uracilo y sus derivados. Ejemplos de derivados incluyen bases de purina o pirimidina modificadas como deoxiguanosina N4-metilo, purinas desaza o aza y pirimidinas utilizadas en lugar de purina natural y bases de pirimidina, bases de pirimidina que presentan grupos sustituidos en la posición 5 ó 6, y bases de purina que presentan una sustitución alterada o reemplazada en la posición 2, 6 u 8. Ver, por ejemplo, la solicitud internacional Cook nº PCT/US92/11339, la publicación internacional WO 93/13121. Otros ejemplos incluyen, 2-amino-6-metilaminopurina O6-metilguanina, 4-tio-pirimidinas, 4-amino-

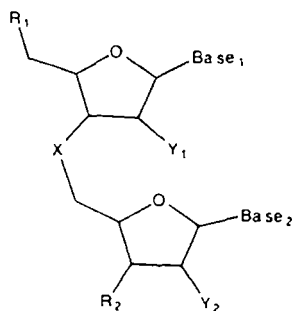
ES 2 330 812 T3

pirimidinas, 4-dimetilhidracina-pirimidinas y O4-alquilo-pirimidinas (ver, por ejemplo, The Glen Report, volumen 1, 1993).

La parte central de la secuencia de reconocimiento de bases de nucleótidos puede estar formada a partir de diferentes grupos. Los ejemplos de diferentes partes centrales incluyen partes centrales del tipo azúcar-fosfodiéster y una parte central de ácido nucleico peptídico.

La Estructura I ilustra una parte central del tipo azúcar-fosfodiéster en la que el grupo de azúcar es un grupo pentafuranosilo. Los grupos de azúcar se unen mediante un enlace como un enlace fosfodiéster u otro enlace adecuado.

Estructura I



X representa el grupo que une dos azúcares. Los ejemplos de X incluyen $-\text{OP}(\text{O})_2\text{O}-$, $-\text{NHP}(\text{O})_2\text{O}-$, $-\text{OC}(\text{O})_2\text{O}-$, $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})_2\text{NH}-$, $-\text{OCH}_2\text{C}(\text{O})_2\text{O}-$, $-\text{OP}(\text{CH}_3)(\text{O})\text{O}-$, $-\text{OP}(\text{S})(\text{O})\text{O}-$ y $-\text{OC}(\text{O})_2\text{NH}$. También se pueden utilizar, junto con los otros ejemplos proporcionados en el presente documento, otros equivalentes que son bien conocidos en la técnica o que sean asequibles.

Y_1 y Y_2 son grupos seleccionados independientemente. Ejemplos de Y_1 y Y_2 incluyen H, OH, C_1 - C_4 alcoxi, halógeno, y C_1 - C_6 alquilo. Preferentemente, Y_1 y Y_2 son independientemente o bien H, OH, F o OCH_3 , C_1 - C_6 alquilo y C_1 - C_4 alcoxi, pueden ser o pueden incluir grupos que son de cadena recta, ramificada o cíclica.

Base_1 y Base_2 se seleccionan independientemente de entre el grupo constituido por: adenina, guanina, citosina, timina, uracilo, o un grupo que no inhibe el emparejamiento de bases complementarias de una base adyacente a un ácido nucleico complementario. Los ejemplos de grupos que inhiben el emparejamiento de bases complementarias incluyen grupos de pequeño tamaño como hidrógeno, OH, C_1 - C_6 alquilo, y C_1 - C_4 alcoxi. Preferentemente, la secuencia de reconocimiento de bases de nucleótidos contiene aproximadamente 7 a aproximadamente 40, más preferentemente, aproximadamente 10 a aproximadamente 30, bases seleccionadas independientemente de entre el grupo constituido por: adenina, guanina, citosina, timina y uracilo.

R_1 y R_2 representan grupos seleccionados independientemente. Los ejemplos de R_1 y R_2 incluyen grupos adicionales del tipo azúcar-fosfodiéster, hidrógeno, hidroxilo, ácido nucleico peptídico, y moléculas que no proporcionan información sobre la secuencia como "nucleótidos" no básicos, polisacáridos, polipeptidos, péptidos y otros enlace no nucleótidos.

Los derivados de la Estructura I pueden ser un componente de una secuencia de reconocimiento de bases de nucleótidos son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, moléculas que presentan un tipo diferente de azúcar. Por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de bases de nucleótidos puede tener mitades de ciclobutilo conectadas mediante mitades de enlace, en las que las mitades de ciclobutilo presentan bases heterocíclicas unidas a ellas. Ver, por ejemplo, la solicitud internacional n° PCT/US93/01579, publicación internacional WO 94/19023 de Cook *et. al.*

En una forma de realización de la presente invención, una molécula de reconocimiento de bases de nucleótidos es un polinucleótido o sus derivados. Un "polinucleótido o su derivado" es una molécula de reconocimiento de bases de nucleótidos que está hecha a partir de la estructura I repitiendo las unidades en las que X es $-\text{OP}(\text{O})_2\text{O}-$; Y_1 e Y_2 son grupos seleccionados independientemente de entre los grupos consistentes en H, OH, OCH_3 y F; Base_1 y Base_2 se seleccionan independientemente de entre el grupo constituido por: adenina, guanina, citosina, timina, uracilo, o un grupo que no inhibe el emparejamiento de bases complementarias de una base adyacente a un ácido nucleico complementario; y siempre y cuando la molécula contenga aproximadamente 5 a aproximadamente 35 bases seleccionadas independientemente de entre el grupo constituido por: adenina, guanina, citosina, timina y uracilo. La porción terminal de molécula contiene R_1 y R_2 seleccionados independientemente de entre el grupo constituido por OH, alquilo C_1 - C_6 , y fosfato.

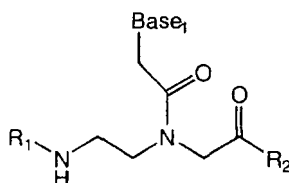
El ácido nucleico peptídico en un análogo de ADN en el que la parte central del fosfato desoxirribosa se reemplaza por una parte central pseudopéptida. El ácido nucleico peptídico se describe por Hyrup y Nielsen, Bioorganic &

ES 2 330 812 T3

Medicinal Chemistry 4:5-23, 1996, y Hydig-Hielsen y Godskesen, la publicación internacional N°: PCT/DK95/00195, la publicación internacional WO 95/32305.

Preferentemente, el ácido nucleico peptídico está hecho de unidades de N-(2-aminoetil)glicina como se ilustra en la Estructura II.

Estructura II



en la que R₁, R₂ y Base₁ son moléculas del mismo tipo como se describe en la Estructura I.

Las secuencias de reconocimiento de bases de nucleótidos se pueden preparar utilizando las técnicas habituales. Las publicaciones que describen síntesis orgánicas de oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados incluyen Eckstein, F., *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, capítulos 1-5, 1991, que repasa la síntesis orgánica de oligonucleótidos; Caruthers *et al.*, *Methods In Enzymology* vol. 154 p. 287 (1987), que describe un procedimiento para la síntesis orgánica de oligonucleótidos utilizando química estándar de fosforamidita en fase sólida; Bhatt, patente US n° 5.252.723, que describe un procedimiento para la síntesis orgánica de oligonucleótidos modificados que contienen enlaces de fosforotioato; y Klem *et al.*, WO 92/07864, que describe la síntesis orgánica de oligonucleótidos modificados que presentan diferentes enlaces incluyendo enlaces de metilfosfato.

Las referencias adicionales que describen las técnicas que se pueden utilizar para producir diferentes tipos de secuencias de reconocimiento de bases de nucleótidos incluyen la solicitud internacional n° PCT/US92/11339 y la publicación internacional WO 93/13121 de Cook; la solicitud internacional n° PCT/US94/00157 y la publicación internacional WO 94/15619 de Miller *et al.*; la solicitud internacional n° PCT/US93/06807 y la publicación internacional WO 94/02051 de McGee *et al.*; la solicitud internacional n° PCT/US93/01579 y la publicación internacional n° WO 94/19023 de Cook *et al.*; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4:5-23, 1996 de Hyrup y Nielsen; y la solicitud internacional n° PCT/DK95/00195 y la publicación internacional WO 95/32305 de Hydig-Hielsen y Godskesen.

Los marcadores se pueden unir a una antorcha molecular mediante varios procedimientos incluyendo enlaces covalentes, quelación e interacciones iónicas. Preferentemente, un marcador se une covalentemente.

Las antorchas moleculares presentes durante el protocolo de amplificación no contienen preferentemente un OH 3' terminal disponible para la extensión del cebador. Los grupos de bloqueo que pueden inhibir la extensión del cebador mediante una polimerasa de ácido nucleico pueden localizarse en o estar cerca del extremo 3' de una antorcha molecular de ácido nucleico. "En o cerca de" del extremo 3' se refiere a un grupo de bloqueo presente en las cinco bases del extremo 3'. Si un grupo de bloqueo no está localizado en el extremo 3' terminal de una antorcha molecular de ácido nucleico, debería ser lo suficientemente grande para afectar la unión de la ADN polimerasa a la antorcha.

Preferentemente, una antorcha molecular de ácido nucleico contiene un grupo de bloqueo localizado en su terminal 3'. Adjuntando un grupo de bloqueo al 3' terminal OH, el grupo 3' OH ya no es asequible para aceptar un trifosfato nucleósido en una reacción de polimerización.

Se pueden utilizar varios grupos químicos diferentes para bloquear el extremo 3' de una secuencia de ácido nucleico. Los ejemplos de estos grupos incluyen grupos alquilo, enlaces no nucleótidos, residuos alcano-diol dideoxi-nucleótido y cordicepina.

La región diana de unión debería ser suficientemente larga para unirse específicamente a una diana deseada. Una región diana de unión bacteriana presenta preferentemente por lo menos 10 grupos de reconocimiento, más preferentemente por lo menos 12 grupos de reconocimiento. Una región diana de unión compleja para un organismo multicelular como el humano, presenta preferentemente por lo menos 16 grupos de reconocimiento, más preferentemente por lo menos 18 grupos de reconocimiento.

En una forma de realización de la presente invención, el dominio diana de unión está formado por 7 a aproximadamente 40 grupos de reconocimiento, y 0 a aproximadamente 4 grupos monoméricos no nucleótidos cada uno opuesto al grupo de reconocimiento en el dominio diana de cierre. En unas formas de realización preferidas, están presentes por lo menos aproximadamente 8, más preferentemente por lo menos aproximadamente 10 grupos de reconocimiento; están presentes no más de aproximadamente 30, no más de aproximadamente 25, y no más de aproximadamente 15 grupos de reconocimiento; y están presentes no más de 2, preferentemente no más de 1, y más preferentemente 0 grupos monoméricos no nucleótidos. Preferentemente, cada grupo monomérico no nucleótido es un "nucleótido" no básico.

Un grupo monomérico no nucleótido proporciona una distancia entre grupos adjuntos que contienen bases de nucleótidos que presentan aproximadamente la misma longitud que en un ácido nucleico. Por consiguiente, un grupo monomérico no nucleótido que une dos nucleótidos posiciona los nucleótidos de forma que pueden crear un puente de hidrógeno con nucleótidos complementarios en un ácido nucleico.

En una forma de realización de la presente invención, el dominio diana de cierre está formado por aproximadamente 7 a aproximadamente 40 grupos de reconocimiento, y 0 a aproximadamente 6 grupos monoméricos no nucleótidos o desapareados con el dominio diana de unión. En otras formas de realización, están presentes por lo menos aproximadamente 8, o por lo menos aproximadamente 10 grupos de reconocimiento; están presentes no más de aproximadamente 30, no más de aproximadamente 25, y no más de aproximadamente 15 grupos de reconocimiento; y están presentes 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 grupos monoméricos no nucleótidos o desapareados con el dominio diana de unión. Preferentemente, cada grupo monomérico no nucleótido es un "nucleótido" no básico. Más preferentemente, están presentes desapareamientos más que nucleótidos no básicos.

Preferentemente, el dominio diana de unión está sustancialmente constituido por ribonucleótidos sustituidos en 2'-metoxi o 2'-fluoro seleccionados independientemente, y el dominio diana de cierre se comprende sustancialmente de desoxirribonucleótidos seleccionados independientemente. "Consta sustancialmente" o "constando sustancialmente de" indican que el/los componente/s referenciados comprenden por lo menos el 70%, por lo menos el 80%, por lo menos el 90%, o el 100% del dominio diana de apertura o dominio diana de cierre.

La región de unión se puede preparar utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica teniendo en cuenta la composición de la región de unión. Preferentemente, la región de unión contiene diferentes miembros de un grupo de unión que pueden unir, en el lugar en el que el dominio diana de unión se junta a un miembro del grupo de unión y el dominio diana de cierre se junta a otro miembro del grupo de unión. Un miembro de un grupo de unión que se puede unir a otro miembro del mismo grupo de unión. Los ejemplos de grupos de unión incluyen secuencias de reconocimiento de bases de nucleótidos sustancialmente complementarios, anticuerpo/antígeno, enzima/sustrato, biotina/avidina.

Los miembros de grupos de unión posicionados adyacentes o cercanos a los dominios diana de apertura y de cierre pueden afectar la estabilidad de un híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre. Un efecto demasiado largo puede crear dificultades para producir una antorcha abierta ya que el híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre puede permanecer intacto bajo un amplio registro de condiciones. El efecto de un grupo de unión en la estabilidad de un híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre se puede determinar, por ejemplo, midiendo la T_f del híbrido.

Los miembros de grupos de unión pueden estar enlazados covalentemente utilizando uno o más enlaces. Los ejemplos de enlaces incluyen opcionalmente grupos alquilo sustituidos, enlaces polinucleótidos y no nucleótidos. Los enlaces no nucleótidos incluyen polisacáridos, polipéptidos y "nucleótidos" no básicos.

Los polinucleótidos utilizados como grupos de enlace entre los dominios diana de apertura y de cierre se diseñan preferentemente para no hibridarse con la secuencia diana, o a otros ácidos nucleicos que pueden estar presentes en la muestra. Aunque algún enlace a la diana puede resultar ventajoso, por ejemplo, cuando se utilizan condiciones de desplazamiento de la cadena. Los grupos de enlace polinucleótidos preferidos son poli T, poli A y la mezcla poli A-T. Los grupos de enlace polinucleótidos presentan preferentemente de 5 a 25 nucleótidos.

Las antorchas abiertas pueden incluir regiones de una sola cadena complementarias a la secuencia diana que, por ejemplo, se pueden posicionar al lado del dominio diana de unión y puede ser parte de la región de unión. Preferentemente, estas regiones de una sola cadena contienen no más de aproximadamente diez grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos complementarios de la secuencia diana. Más preferentemente, estas regiones de una sola cadena, si están presentes, no son más de diez, cinco, tres, dos o un grupo de reconocimiento de bases de nucleótidos complementarios de la secuencia diana.

Los grupos de enlace se pueden posicionar entre los miembros de los grupos de unión y los dominios diana de unión y de cierre para disminuir el efecto de los miembros de los grupos de unión en el híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre. La colocación de grupos de enlace entre, por ejemplo, un miembro de un grupo de unión y un dominio diana de unión separa físicamente el miembro del grupo de unión del dominio diana de unión disminuyendo de este modo el efecto del miembro del grupo de unión en el híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre.

A continuación se proporcionan unos otros ejemplos que ilustran diferentes aspectos y formas de realización de la presente invención. Estos ejemplos no pretenden limitar la invención dada a conocer.

Ejemplo 1

Ajuste de la T_f del dominio diana de unión: dominio diana de cierre

Este ejemplo ilustra la utilización de diferentes factores del diseño de antorchas moleculares para obtener una T_f deseada de un híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre. En este ejemplo se ajustó la T_f de cuatro

antorchas moleculares diferentes utilizando enlaces no nucleótidos de polietilenglicol (PEG), una combinación de bases desapareados, “nucleótidos” no básicos (es decir, salientes), y ribonucleótidos sustituidos en 2'-metoxi.

Las diferentes antorcha moleculares utilizadas en este ejemplo se construyeron a partir de cuatro cadenas diferentes, como se muestra en las Figura 6A y 6B. En estas figuras, “F” se refiere al fluoróforo EDANS, “Q” se refiere a un inhibidor DABCYL, y el grupo “ccc” al extremo 3' de una cadena de cada antorcha se refiere a un grupo de tres carbonos que funciona como una extensión del cebador del grupo de bloqueo. Los nucleótidos de estas antorchas moleculares son o bien desoxirribonucleótidos o bien ribonucleótidos sustituidos en 2'-metoxi (indicados en *negrita/cursiva*). Todos las antorchas moleculares utilizados en este ejemplo contienen una región de unión compuesta de un grupo 20 Å PEG no nucleótido y un dúplex de ribonucleótido sustituido en 2'-metoxi de doble cadena muestra una T_m muy elevada ($>90^\circ\text{C}$).

Como se muestra en la Figura 6B, la antorcha 1 está constituida por las cadenas 2 y 3; la antorcha 2 está constituida por las Cadenas 2 y 4; la antorcha 3 está constituida por las Cadenas 1 y 3; y la antorcha 4 está constituida por las Cadenas 1 y 4. Cada una de las cadenas 1-4 (que se muestran en la Figura 6A) incluyen dos secuencias de reconocimiento de bases de nucleótidos separadas por un grupo PEG, en la que la Cadena 1 incluye las secuencias de reconocimiento de bases de nucleótidos de SEC ID N°: 1 (5'-cagugcagnggaaag-3') y SEC ID N°: 2 (5'-gguggacugc gugcg-3'); la Cadena 2 incluye las secuencias de reconocimiento de bases de nucleótidos SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3 (5'-cagugcaggg gaaag-3'); la Cadena 3 incluye las secuencias de reconocimiento de bases de nucleótidos SEC ID N°: 4 (5'-ctttccttg ctctg-3') y SEC ID N°: 5 (5'-cgcacgcagu ccagcc-3'); y la Cadena 4 incluye las secuencias de reconocimiento de bases de nucleótidos de SEC ID N°: 5 y SEC ID N°: 6 (5'-tttnccccc tgcnnactg-3').

En las cuatro antorchas moleculares, el dominio diana de unión se hizo con ribonucleótidos sustituidos en 2'-metoxi y el dominio diana de cierre se hizo de desoxirribonucleótidos. Los grupos subrayados indican desapareamientos mientras que “n” indica salientes no básicos.

La estabilidad de diferentes híbridos se determinó utilizando una mezcla que contenía 500 pmol de cada cadena añadida a 350 μl de tampón KEMPS. (el KEMPS está formado de KCl 100 mM, EDTA 0,1 mM, MgCl_2 10 mM, PIPES 50 mM (pH 6,85), y espermina 1 mM). La mezcla se calentó a 80°C durante 15 minutos y después se sometió a un análisis de la T_f . La T_f se midió óptimamente a 260 nm dentro de un intervalo de $45\text{--}95^\circ\text{C}$ a $0,5^\circ\text{C min}^{-1}$ utilizando un aparato de fusión Beckman DU-640.

La Tabla 1 resume la estabilidad del híbrido dominio diana de unión: dominio diana de cierre en los cuatro antorchas moleculares probadas. La Tabla 1 también destaca algunos de los factores de diseño que afectan la estabilidad del híbrido.

TABLA 1

Antorcha	Temperatura de fusión ($^\circ\text{C}$)	Factores que afectan a la estabilidad del híbrido
1	76,9	Tres pares de bases desapareados
2	89,4	Dos conjuntos de 2 salientes no básicos (“n”) en una cadena desoxi
3	64,5	1 saliente no básico (“n”) en una cadena metoxi, más 3 pares de bases desapareados
4	72,9	1 saliente no básico (“n”) en metoxi, dos conjuntos de 2 salientes no básicos (“n”) en una cadena desoxi

Nota: “desoxi” se refiere a desoxirribonucleótidos y “metoxi” se refiere a ribonucleótidos sustituidos en 2'-metoxi.

Como se ilustra en la Tabla 1, la T_f de una antorcha molecular se puede modular utilizando diferentes factores que afectan a la estabilidad del híbrido. Otros factores que afectan a la estabilidad del híbrido, como los descritos en el presente documento y los conocidos en la técnica, también se pueden utilizar para obtener la T_f deseada de un híbrido en diferentes soluciones.

Ejemplo 2

Unión de la antorcha molecular a una secuencia diana

La antorcha 5, como se muestra en la Figura 6B, es la misma que la antorcha 1 excepto que el enlace PEG de las Cadenas 2 y 3 se reemplazó con las secuencias de desoxirribonucleótido de 5'-tttctttcttt-3' y 5'-ttttctttcttc-3' respectivamente de forma que las secuencias de reconocimiento de bases de nucleótidos de la antorcha 5 fueron SEC

ES 2 330 812 T3

ID N°: 7 (5'-cagucaggg gaaagttct ttcttggc ugccacugcg gcg-3') y SEC ID N°: 8 (5'-cgcacgcagu ccagcctttt cttcttctt tttcttgc ctg-3'). La antorcha 5 también contenía fluoróforo EDANS ("F") y un inhibidor DABCYL ("Q"), que se utilizó para detectar la presencia de una secuencia diana de ARN sintético. La antorcha 5 presentaba un dominio diana de unión (SEC ID N°: 3) formado por ribonucleótidos sustituidos en 2'-metoxi (indicado en **negrito/cursiva**), y un dominio diana de cierre (SEC ID N°: 4) formado por desoxirribonucleótidos. El dominio diana de unión fue perfectamente complementario a la secuencia diana pero presentaba tres desapareamientos al dominio diana de cierre.

La antorcha 5 se generó mediante primero la producción de una mezcla en un tampón KEMPS que contenía las cadenas de EDANS y DABCYL (como se describe en el Ejemplo 1 *supra*) con un pH de 6,85. La mezcla se calentó a 60°C durante 10 minutos y después se enfrió a temperatura ambiente.

Se incubaron aproximadamente 80 pmoles de la antorcha con cantidades crecientes de la molécula diana de ARN. La muestra se calentó a 60°C durante 20 minutos para abrir las antorchas y permitir la hibridación entre el dominio de unión diana y la secuencia diana, y se enfrió a continuación a temperatura ambiente para cerrar las antorchas que no han hibridado a la secuencia diana.

Se midió la fluorescencia utilizando un espectrofotómetro Spex Fluorolog-2 (ISA Jobin Yvon-Spex; Edison, NJ). La emisión de la longitud de onda fue de 495 nm, y la excitación de la longitud de onda fue de 360 nm. En la Tabla 2 se resumen los resultados del experimento.

TABLA 2

Temperatura de Incubación (°C)	Nivel del ARN diana (pmol)	Datos de la fluorescencia @ 495 nm (cps)
60	0	11.800
60	30	54.000
60	60	89.000
60	90	94.000
Ambiente	90	17.300

Los resultados muestran que esta antorcha molecular se une aproximadamente estequiométricamente a la secuencia diana. Y, con las condiciones utilizadas, el dominio diana de unión no es asequible para la unión a la secuencia diana en ausencia de calor, produciendo, por consiguiente, poca señal incluso en presencia de la secuencia diana.

Ejemplo 3

Efecto de diferentes ambientes

Este ejemplo ilustra la utilización y el efecto de diferentes ambientes de soluciones y diferentes montajes de antorchas. Las soluciones diferentes utilizadas en este ejemplo contienen diferentes componentes para las reacciones de amplificación asociadas a la transcripción.

En este ejemplo se utilizaron las antorchas 1, 6 y 7 (las antorchas 1 y 6 están representadas en la Figura 6, mientras que la antorcha 7 no está representada). La antorcha 1 se describe en el Ejemplo 1 *supra*, mientras que la antorcha 6 contenía una región de unión 20 Å PEG que se unió a un dominio diana de unión ribonucleótido sustituido en 2'-metoxi (SEC ID N°: 3) (indicado en **negrita/cursiva**) y un dominio diana de cierre desoxirribonucleico (SEC ID N°: 4). La antorcha 6 también incluía un fluoróforo fluorescente ("F") y un inhibidor DABCYL ("Q"). La antorcha 7 era un análogo de la antorcha 6, en el que el dominio diana de cierre (SEC ID N°: 4) estaba formado por nucleótidos modificados que presentaban enlaces fosfodiéster reemplazados con enlaces fosforotioatos.

Se mezclaron una cantidad específica de secuencia diana de ARN sintético, de haberlo, y 25 pmol de antorcha molecular en 100 µl de la solución que se utilizó para preparar las Condiciones A, B, C y D descritas a continuación. Después de crear las Condiciones A, B, C y D, se calentó cada solución a 65°C durante 20 minutos, y después se enfriaron a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Las Condiciones A, B, C y D incluyen reactivos seleccionados de entre los siguientes grupos de reactivos:

Reactivo 1: trealosa 40 mM, HEPES 4mM, NaCl 25 mM, EDTA 0,02 mM, 0,04% de Triton® X-102, y acetato de zinc 0,02 mM, a un pH de 7,0;

Reactivo 2: MgCl₂ 12,5 mM, KCl 7,5 mM, acetato de zinc 0,15 mM, 5% de glicerol, 6,25 mM de ATP, 2,5 mM de CTP, 6,25 mM de GTP, 2,5 mM de UTP, 0,2 mM de dATP, 0,2 mM de dCTP, 0,2 mM de dGTP, 0,2 mM de dTTP, 50 mM de base de Trizma, 53 mM de trealosa, 100 µM de desferoxamina, y 2 mM de espermidina a un pH de 8,0;

ES 2 330 812 T3

Reactivo 3: KCl 18 mM, 4% de glicerol, HEPES 4 mM, EDTA 0,1 mM, y 0,0002% de fenol o/o a un pH de 7,0; y

Reactivo 4: trealosa 40 mM, 4 mM de HEPES, 25 mM de Nalc, 0,02 mM de EDTA, 0,04% de Triton® X-102, 0,02 mM de acetato de zinc, 18 mM de KCl, 4% de glicerol, 4 mM de HEPES, 0,1 mM de EDTA, y 0,0002% de fenol rojo a un pH de 7,0.

La Condición A se creó con 25 µl del Reactivo 2, 20 µl del Reactivo 4, 50 µl de la muestra, transcriptasa inversa (~ 33,4 µg), ARN polimerasa T7 (~ 540 ng) y cebadores. La Condición B se creó con 20 µl de Reactivo 3, 25 µl del Reactivo 2, 50 µl de la muestra, y cebadores, la Condición C fue la misma que la Condición A, pero sin la presencia de los cebadores. La Condición D fue la misma que la Condición B pero sin la presencia de los cebadores.

Se midió la fluorescencia utilizando un lector de placas de microtitulación Spex MicroMax y un espectrofotómetro Fluorolog-2 que utiliza un filtro de paso de banda (485 nm) en el monocromador de excitación. La fluorescencia se midió utilizando una longitud de onda de excitación de 491 nm y una longitud de onda de emisión de 522 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Condición	Nivel de ARN diana (pmol)	Datos de fluorescencia @ 522 nm (cps)		
		Antorcha 1	Antorcha 7	Antorcha 6
A	0 (sin antorcha)	14.000	17.000	13.000
	0	13.000	18.000	12.100
	5	35.000	25.400	30.000
	40	68.000	35.100	56.500
B	0 (sin antorcha)	27.000	74.000	27.000
	0	30.000	70.000	29.300
	5	50.500	78.100	46.700
	40	65.000	94.500	67.500
C	0 (sin antorcha)	16.000	18.000	14.000
	0	10.000	18.000	13.600
	5	39.000	24.100	28.000
	40	69.000	39.000	54.000
D	0 (sin antorcha)	30.000	82.000	31.000
	0	31.000	62.000	35.300
	5	54.000	87.100	48.700
	40	76.000	106.500	70.500

Para cada una de las diferentes antorchas moleculares examinadas en los diferentes ambientes, se observó un aumento en la señal a medida que la cantidad de secuencia diana aumentaba. La cantidad de señal de fondo varió dependiendo de la composición de la antorcha y del ambiente.

Ejemplo 4

Detección de transcritos amplificados de ARN

Este ejemplo ilustra la utilización de antorchas moleculares presentes durante un procedimiento de amplificación asociada a la transcripción (discutido anteriormente) para detectar la producción de transcritos de ARN diana. La amplificación asociada a la transcripción se realizó en presencia de antorchas moleculares y, después de la amplificación, la presencia de transcritos de ARN se determinó o con la antorcha 6 o con una sonda de una sola cadena de acridinio polinucleótido marcada con éster.

Para este ejemplo, se generaron ocho replicados separados de transcripción en presencia de 20 pmol de la antorcha 6 y utilizando las condiciones especificadas en la Condición A en el Ejemplo 3 *supra* (excepto que se utilizó 1 mM de cada dNTP en lugar de los 0,2 mM indicados para el Reactivo 2) a cada uno de los cinco niveles de secuencia diana de ARN diferentes (es decir, 0, 100, 500, 1.000 y 5.000 copias de la secuencia diana de ARN), y para cada nivel de secuencia diana, las ocho replicados se dispusieron en dos grupos separados de cuatro replicaciones cada uno. La amplificación se realizó a 42°C. Después de la amplificación, se calentaron 350 µl de cada solución de reacción formada a 60°C durante 20 minutos para abrir la antorcha molecular, permitiendo, de este modo, la hibridación del dominio diana de unión (SEC ID N°: 3) con la transcripción diana. Después, la muestra se enfrió a temperatura ambiente para que las antorcha que no se hibridaron con la diana se cerraran.

ES 2 330 812 T3

Se midió la antorcha 6 unida a la secuencia diana utilizando un lector de placas de microtitulación Spex MicroMax y un espectrofotómetro Spex Fluorolog-2. Se midió la fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 491 nm y una longitud de onda de emisión de 522 nm.

Se utilizaron sondas de acridinio marcadas con éster perfectamente complementarias a la secuencia diana como control para determinar el alcance de la amplificación. Se utilizaron las sondas de acridinio marcadas con éster utilizando un formato de ensayo de protección homogéneo ("HPA"). El HPA se prepara en 50 μ l de cada solución de reacción formada utilizando una mezcla de sonda que contenía aproximadamente 3.000.000 RLU totales de sonda de acridinio marcada con éster y 400 pmol de sonda fría.

Los formatos de HPA que utilizan sondas de acridinio marcadas con éster se describen en diferentes referencias como la patente US nº 5.283.174 de Arnold *et. al.*, "Detection of Acridinium Esters By Chemiluminescence" de Nelson *et. al.* en: Nonisotopic DNA Probe Techniques, (Kricka ed., Academic Press, 1992) pp. 275-311, y Clin. Chem. Acta, 194: 73-90, 1990 de Nelson *et. al.*

Las Tablas 4 y 5 proporcionan los resultados de dos experimentos diferentes.

TABLA 4

Experimento 1		
Número de copias diana (Partida)	Resultados HPA (RLUs)	Resultados de fluorescencia @ 522 nm (cps)
0	7.096	869.000
100	8.711 9.109	872.000 870.000
500	29.092 20.910	1.377.000 1.043.000
1000	22.262 7.612	1.143.000 860.000
5000	89.389 73.971	1.623.000 1.670.000

TABLA 5

Experimento 2		
Número de copias diana (Partida)	Resultados HPA (RLUs)	Resultados de fluorescencia @ 522 nm (cps)
0	2.879 4.515	919.000 1.080.000
100	11.789 9.404	1.222.000 1.159.000
500	14.221 14.641	1.379.000 1.351.000
1000	19.931 24.052	1.697.000 1.607.000
5000	134.126 3.378	3.465.000 1.045.000

En ambos experimentos se mostró una relación lineal total entre la cantidad de transcripto de ARN diana detectado mediante HPA utilizando una sonda de acridinio marcada con éster y la cantidad de transcriptos de ARN diana detectadas por la antorcha molecular. En el Experimento 1, la sensibilidad del ensayo fue de 500 copias de la secuencia diana. En el Experimento 2, se detectaron transcriptos de ARN superiores al fondo de las reacciones de amplificación partiendo de 100 copias de la secuencia diana.

Ejemplo 5

Desplazamiento de cadena de la antorcha molecular por la secuencia diana

Este ejemplo demuestra que las antorchas moleculares se pueden diseñar para unirse y detectar las secuencias diana bajo unas condiciones ambientales esencialmente medioambientales. Para este experimento, se diseñó la antorcha 8 (ver Figura 7) y se ensayó su capacidad de detectar una secuencia diana de ARN en una solución. La antorcha 8 se prepara a partir de la base de reconocimiento de nucleótido de la SEC ID N°: 9 (5'-cggcugcagg ggaagaaua gtttttccc ctgcagccg-3'), en la que la porción 5'-ugcaggggaagaauag-3' representa el dominio diana de unión, la porción 5'-ttccctgcagccg-3' representa el dominio diana de cierre, la porción 5'-cggc-3' representa una región "anillo" para la unión de una porción de la secuencia del dominio diana de cierre, y la porción 5'-tttt-3' es una región de unión de desoxirribonucleótido. Una porción del dominio de unión diana (5'-aagaauag-3') permanece no unida para facilitar el desplazamiento de la cadena del dominio diana de cierre por la diana. El dominio diana de unión fue completamente complementario de la secuencia diana y tanto el dominio diana de unión y la región del anillo se prepararon a partir de ribonucleótidos sustituidos en 2'-metoxi (indicados en negrita/cursiva). El dominio diana de cierre se prepara a partir de desoxirribonucleótidos. La antorcha 8 incluye también un fluoróforo fluoresceína ("F") y un inhibidor DABCYL ("Q").

En este experimento, se añadieron 100 μ l de tampón Krammer (Tris HCl 20 mM a pH 8,0, MgCl 0,5 mM y Tween® -20 al 0,2%) en cada pocillo de microtitulación 10 de una Cliniplate blanca (Labsystems, Inc.; Franklin, MA). Las concentraciones en aumento de la secuencia diana se añaden a unos pocillos que contienen tampón 10 a unas cantidades crecientes como se indica en la Tabla 6 a continuación, seguido de la adición de 30 pmol de antorcha 8 en cada uno de los 10 pocillos. La placa se agita manualmente después durante 10-15 segundos antes de cubrir la superficie fluida de cada pocillo con 50 μ l de aceite, que se utiliza para limitar la evaporación y la contaminación. La placa se mantiene a temperatura ambiente durante un periodo de 10 minutos para dar a la secuencia diana suficiente tiempo para desplazar el dominio diana de cierre y unir el dominio diana de unión. Las señales de fluorescencia de cada pocillo se miden después utilizando un lector de placas Spex MicroMax y un espectrofotómetro Spex Fluorolog-2, con una longitud de onda de emisión de 495 nm y una longitud de onda de excitación de 525 nm. La Tabla 6 proporciona los resultados de este experimento.

TABLA 6

Nivel de ARN diana (pmol)	Resultados de fluorescencia @ 525 nm (cps)
0 (sin antorcha)	4.728
0	58.460
2,5	99.220
5	149.200
10	290.786

TABLA 6 (continuación)

Nivel de ARN diana (pmol)	Datos de fluorescencia 525 nm (cps)
20	576.624
40	875.120
50	938.640
100	1.117.912
250	1.190.892

Los resultados de este experimento muestran que la secuencia diana es capaz que la cadena pase a la antorcha 8 y se una con el dominio diana de unión a temperatura ambiente. Además, los resultados muestran que la cantidad de la secuencia diana que se une a la antorcha en los pocillos aumenta con la cantidad de la secuencia diana presente en un pocillo, lo que indica que las antorchas de la presente invención también pueden ser útiles para cuantificar la cantidad de diana que puede estar presente en una muestra.

Otras formas de realización se encuentran en las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una antorcha molecular para detectar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra en un procedimiento de amplificación a una temperatura constante, comprendiendo la antorcha molecular:

un dominio de unión diana unido a un dominio de cierre diana mediante un vínculo no nucleótido, comprendiendo tanto el dominio de unión diana como el dominio de cierre diana unos grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos,

en la que el dominio de cierre diana es totalmente complementario a una región del dominio de unión diana,

en la que el dominio de unión diana se hibrida con el dominio de cierre diana en ausencia del ácido nucleico diana,

en la que la utilización comprende el desplazamiento del dominio de unión diana del dominio de cierre diana mediante el ácido nucleico diana, de manera que el dominio de unión diana forma un híbrido más estable con el ácido nucleico diana que con el dominio de cierre diana en la muestra,

en la que la antorcha molecular no presenta un grupo OH 3' terminal disponible para la extensión del cebador, y

en la que la antorcha molecular comprende unos marcadores de interacción que producen señales diferentes dependiendo de si el dominio de unión diana se hibrida con el dominio de cierre diana o con el ácido nucleico diana.

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el dominio de unión diana y el dominio de cierre diana comprende un esqueleto de tipo azúcar fosfodiéster.

3. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que el dominio de unión diana está predispuesto para unirse más establemente al ARN diana, y en la que el dominio de unión diana está formado a partir de ADN.

4. Utilización según la reivindicación 3, en la que el dominio de unión diana comprende unos ribonucleótidos sustituidos 2'-metoxi.

5. Utilización según la reivindicación 3 ó 4, en la que el ácido nucleico diana es ARN.

6. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la región de unión está constituida por un polisacárido o un polipéptido.

7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la región de unión contiene unos polinucleótidos complementarios unidos al dominio de unión diana o de cierre diana mediante un enlazador formado por polietilenglicol.

8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el primer marcador se asocia con el dominio de unión diana y un segundo marcador se asocia con el dominio de cierre diana.

9. Utilización según la reivindicación 8, en la que los marcadores comprenden un par luminiscente/inhibidor.

10. Utilización según la reivindicación 8, en la que los marcadores comprenden un par fluoroforo/inhibidor.

11. Utilización según la reivindicación 8, en la que los marcadores comprenden un par luminiscente/aducto.

12. Utilización según la reivindicación 8, en la que los marcadores comprenden un par de transferencia de energía Förrester.

13. Utilización según la reivindicación 8, en la que los marcadores comprende un par dímero de tinción.

14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que el ácido nucleico diana se genera mediante un procedimiento de amplificación.

15. Utilización según la reivindicación 14, en la que el procedimiento de amplificación es una amplificación asociada con una transcripción.

16. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que la antorcha molecular comprende además un grupo de bloqueo que puede inhibir la extensión del cebador mediante una polimerasa de ácido nucleico.

17. Utilización según la reivindicación 16, en la que el grupo de bloqueo se sitúa en o próximo al extremo 3' de la antorcha molecular.

ES 2 330 812 T3

18. Utilización según la reivindicación 17, en la que el grupo de bloqueo se selecciona de entre el grupo constituido por un grupo alquilo, un enlazador no nucleótido, un residuo alcano-diol didesoxinucleótido y cordicepina.

5 19. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que el dominio de unión diana y el dominio de cierre diana comprenden cada uno de 7 a 40 de los grupos de reconocimiento de las bases de nucleótidos.

10 20. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la que por lo menos 70% de los grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos del dominio de unión diana se une a los grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos del dominio de cierre diana en unas condiciones de hibridación.

21. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la que por lo menos 80% de los grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos del dominio de unión diana se une a los grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos del dominio de cierre diana en condiciones de hibridación.

15 22. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la que por lo menos 90% de los grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos del dominio de unión diana se une a los grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos del dominio de cierre diana en condiciones de hibridación.

20 23. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en la que el extremo 5' o el extremo 3' del dominio de unión diana incluye desde 1 a 10 grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos disponibles para la hibridación con la secuencia diana.

24. Utilización según la reivindicación 23, en la que el dominio de unión diana incluye hasta 5 grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos disponibles para la hibridación con la secuencia diana.

25 25. Utilización según la reivindicación 23, en la que el dominio de unión diana incluye hasta 3 grupos de reconocimiento de bases de nucleótidos disponibles para la hibridación con la secuencia diana.

30

35

40

45

50

55

60

65

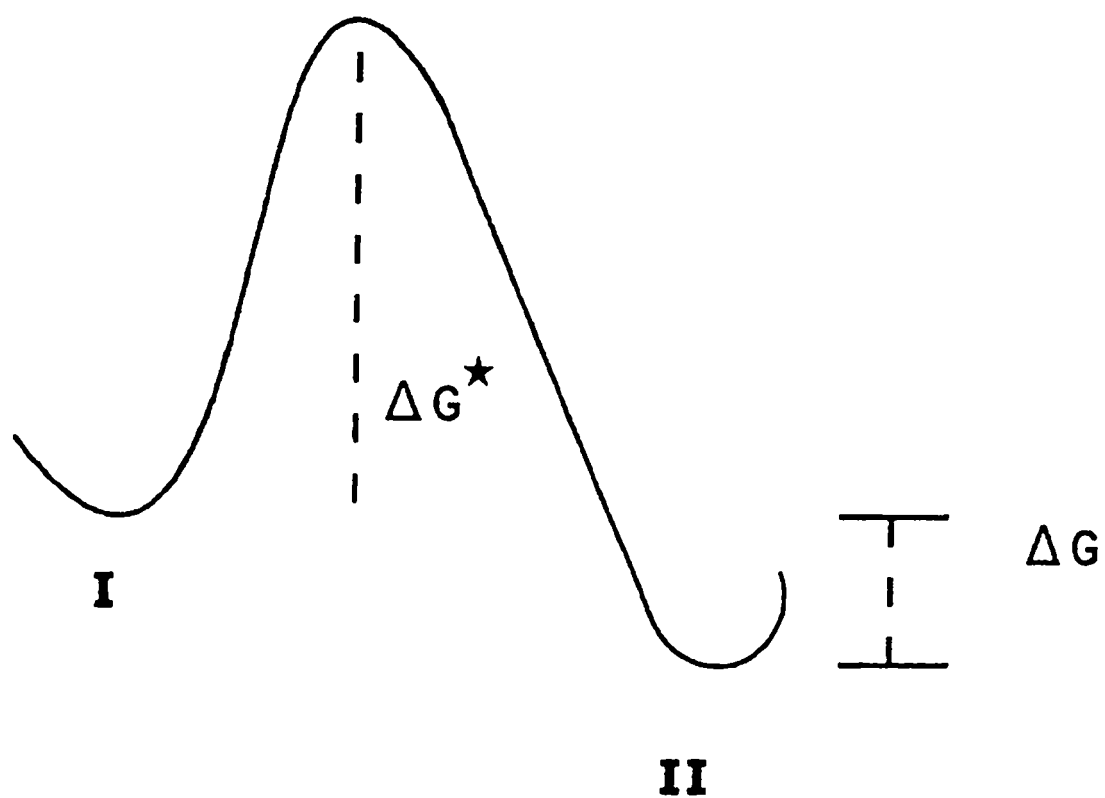


FIG. 1

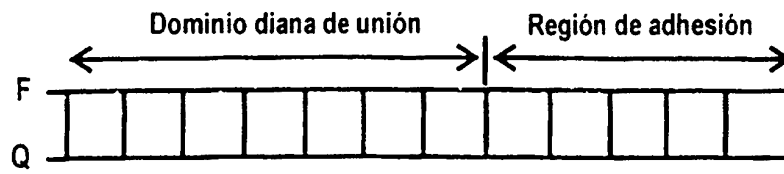


FIG. 2A

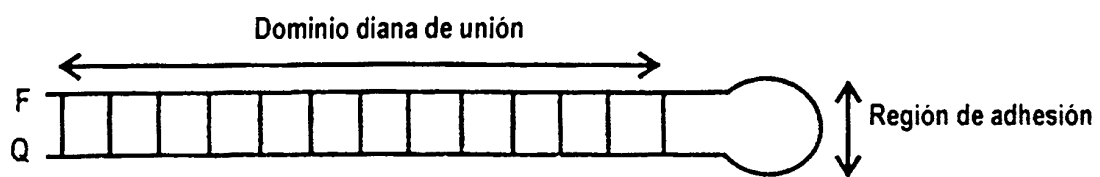


FIG. 2B

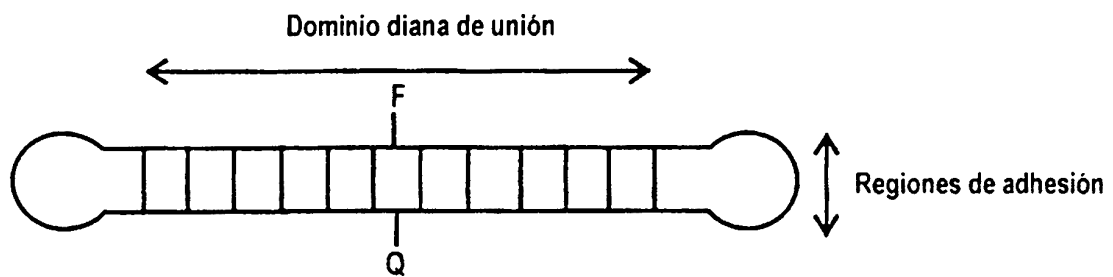


FIG. 2C

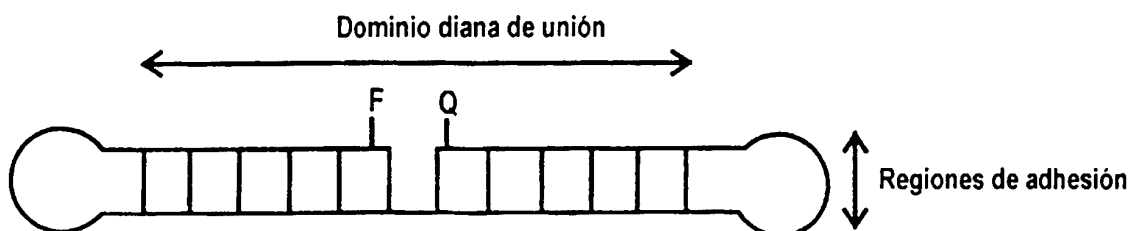


FIG. 2D

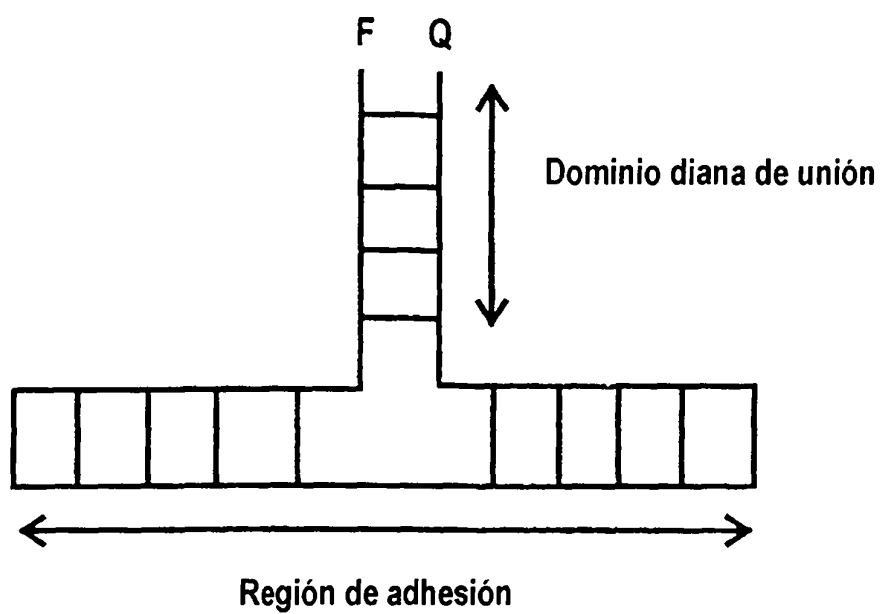


FIG. 2E

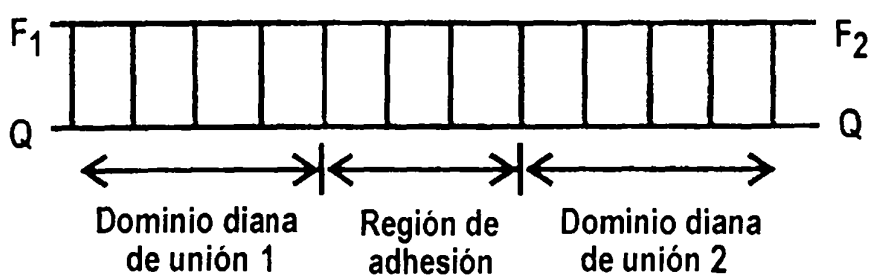


FIG. 2F

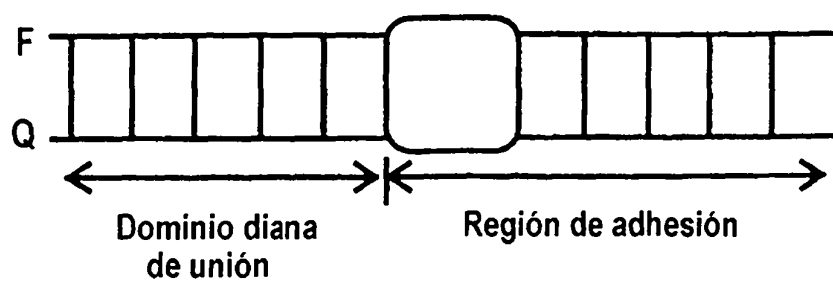


FIG. 2G

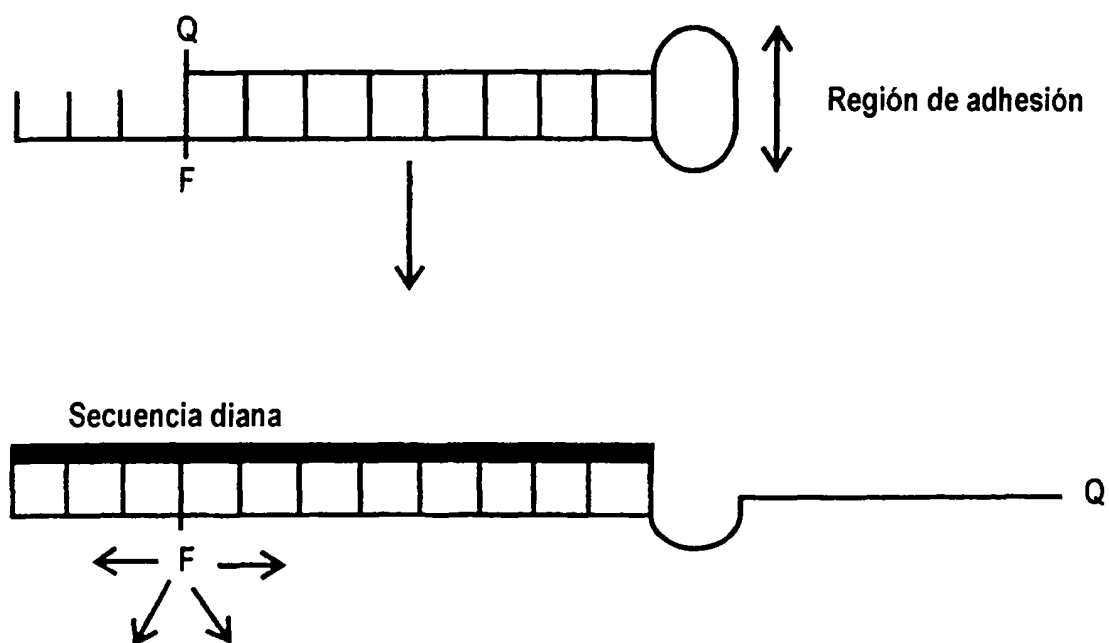


FIG. 3A

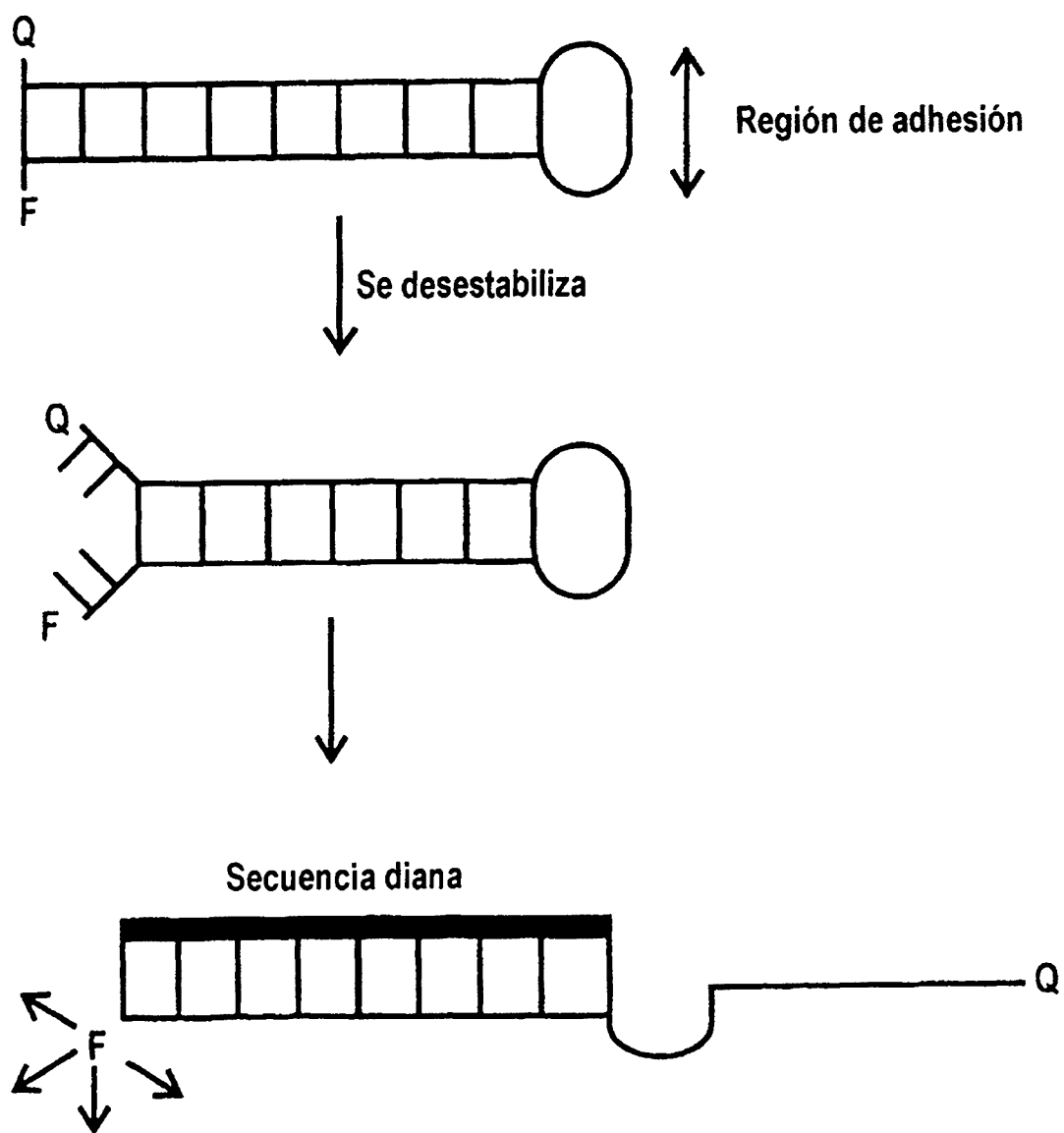


FIG. 3B

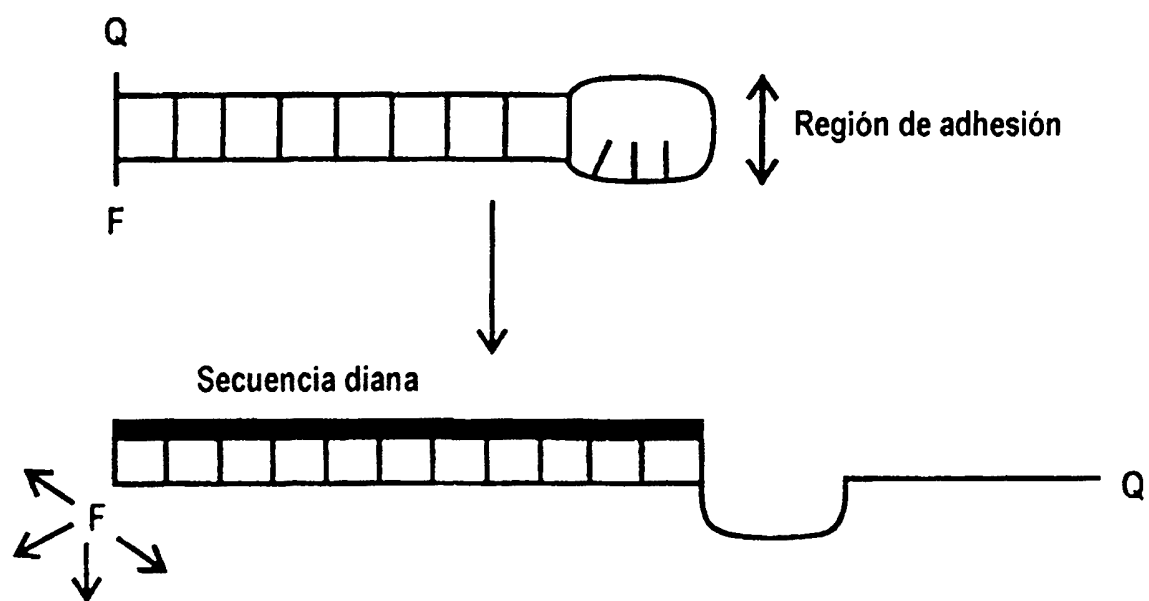


FIG. 3C

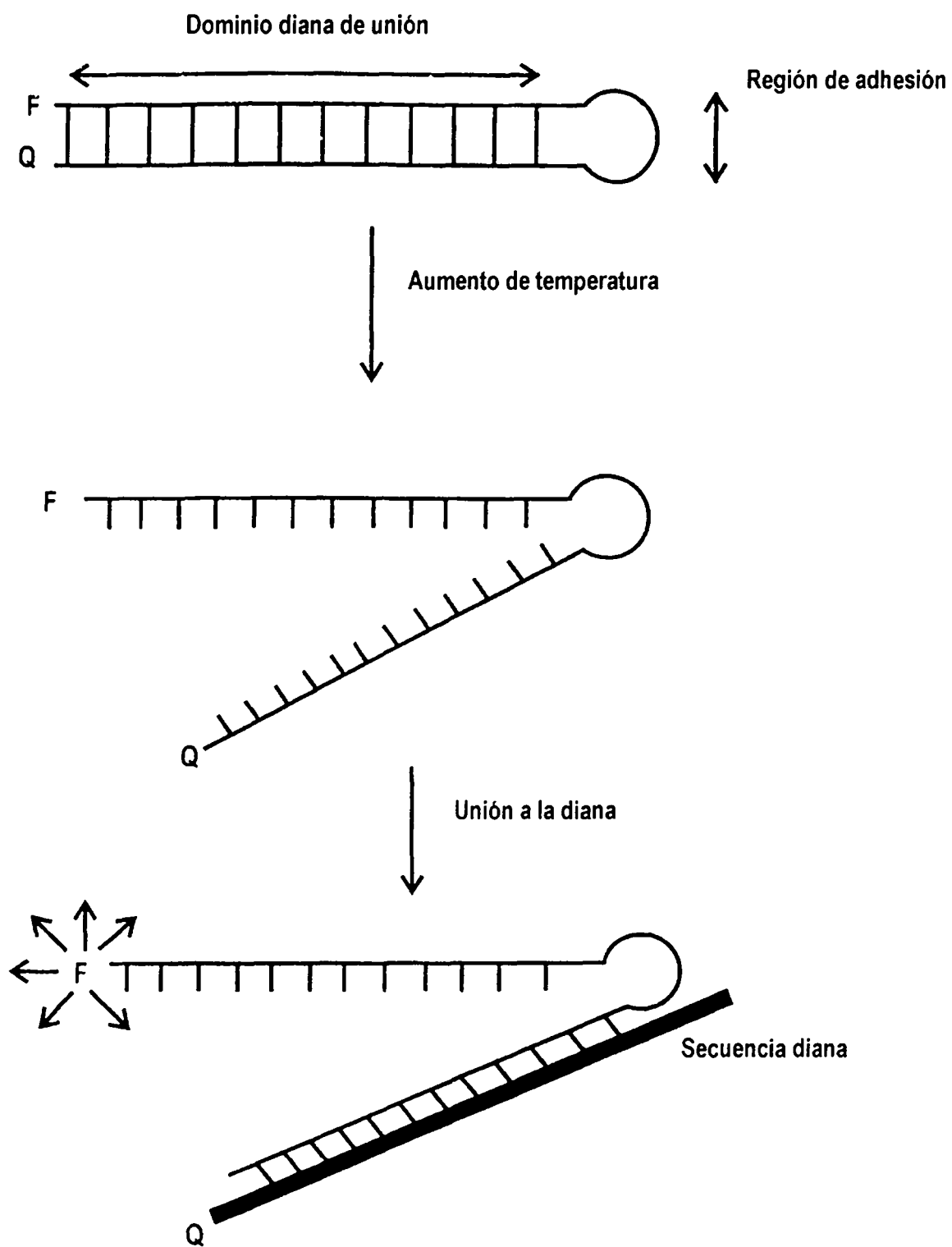


FIG. 4

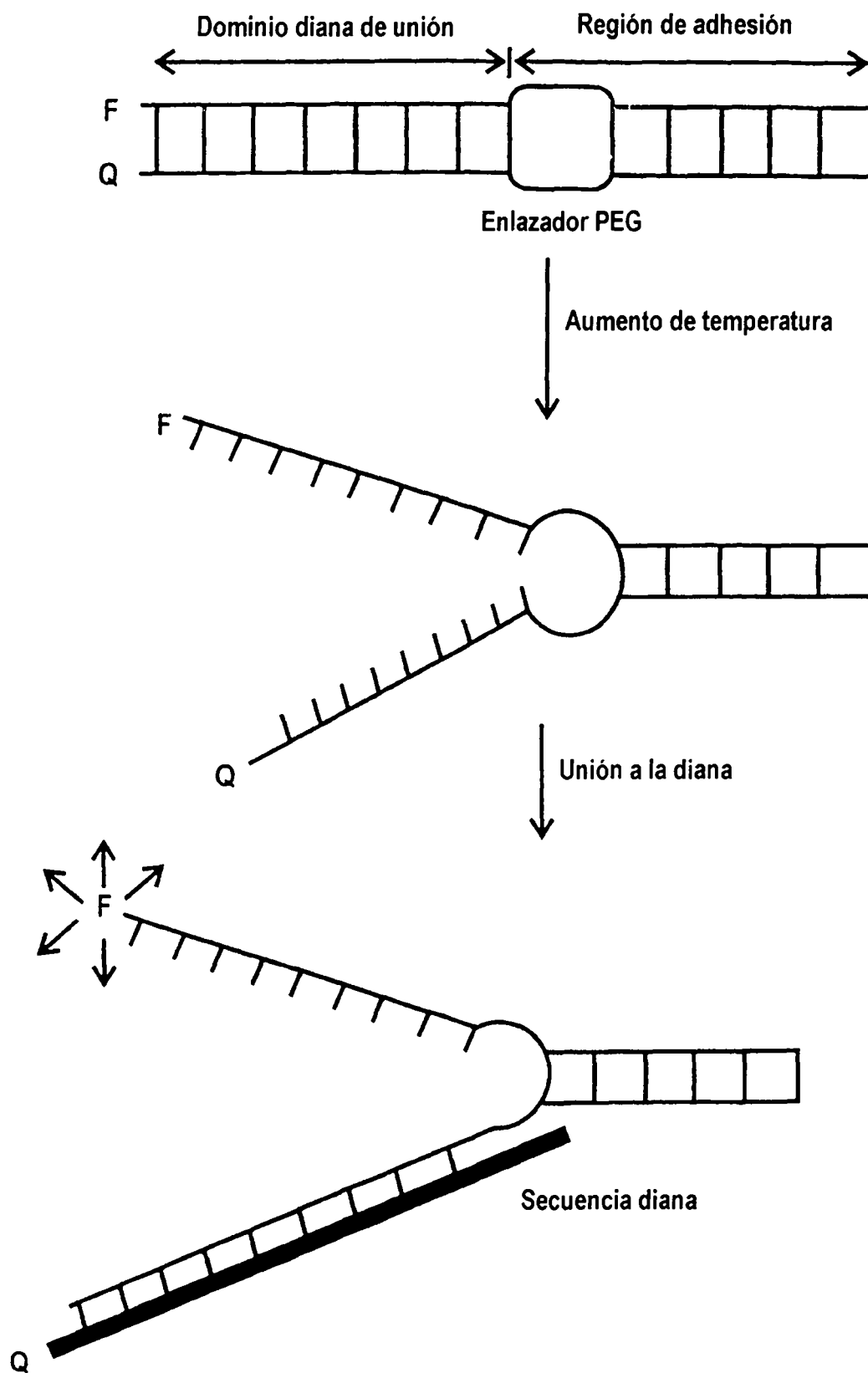


FIG. 5

CADENA 1

5'-F-**cagugcaggnnggaaag**-PEG-**ggcuggacugcgugcg**-3'-ccc
(SEC ID. NO. 1) (SEC ID. NO. 2)

CADENA 2

5'-F-**cagugcaggggaaag**-PEG-**ggcuggacugcgugcg**-3'-ccc
(SEC ID NO: 3) (SEC ID NO: 2)

CADENA 3

3'-Q-gtctcgtccttttc-PEG-**ccgaccugacgcacgc**-5'
(SEC ID NO: 4) (SEC ID NO: 5)

CADENA 4

3'Q-gtcanncg~~t~~ccccnntttc-PEG-**ccgaccugacgcacgc**-5'
(SEC ID NO: 6) (SEC ID NO: 5)

FIG. 6A

MARCADOR 1

5' -F-**cagugcaggggaaag**-PEG-**ggcuggacugcgugcg**-3' -ccc
 3' -Q-gtctcggtcccttttc-PEG-**ccgaccugacgcacgc**-5'

MARCADOR 2

5' -F-**cagu--gcagggg--aaag**-PEG-**ggcuggacugcgugcg**-3' -ccc
 3' -Q-gtcanncggtcccnnttttc-PEG-**ccgaccugacgcacgc**-5'

MARCADOR 3

5' -F-**cagugcaggnngaaag**-PEG-**ggcuggacugcgugcg**-3' -ccc
 3' -Q-gtctcggttc-cttttc-PEG-**ccgaccugacgcacgc**-5'

MARCADOR 4

5' -F-**cagu--gcaggnng--aaag**-PEG-**ggcuggacugcgugcg**-3' -ccc
 3' -Q-gtcanncggtcc-cnnnttttc-PEG-**ccgaccugacgcacgc**-5'

MARCADOR 5

5' -F-**cagugcaggggaaag**-tttcttttctttt-**ggcuggacugcgugcg**-3' -ccc
 3' -Q-gtctcggtcccttttc-ctttctttctttt-**ccgaccugacgcacgc**-5'

MARCADOR 6

5' -F-**cagugcaggggaaag**
 3' -Q-gtctcggtcccttttc

┌
 PEG
 └

FIG. 6B

MARCADOR 8

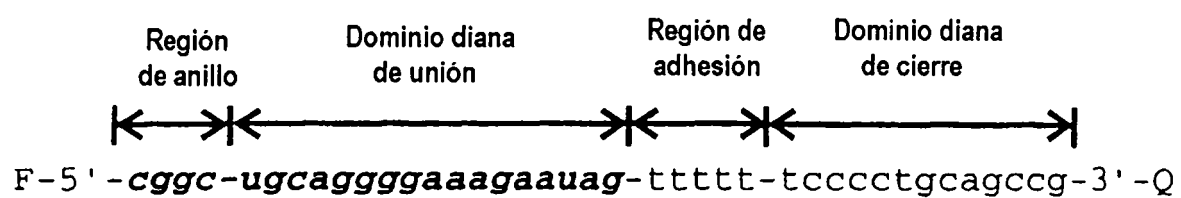


FIG. 7

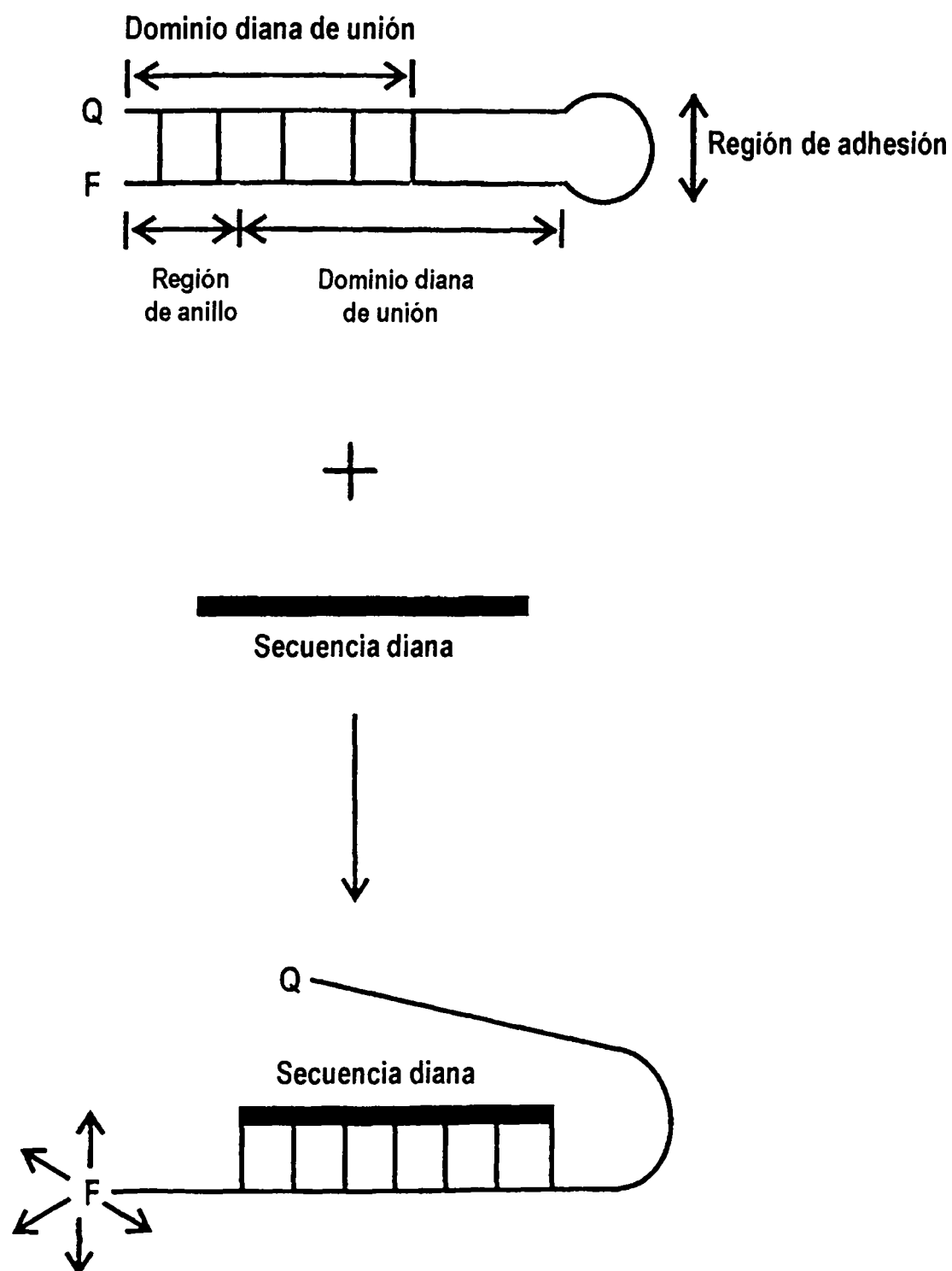


FIG. 8

ES 2 330 812 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> GEN-PROBE INCORPORATED	
5	<120> ANTORCHAS MOLECULARES	
	<130> sec-list-pct	
10	<140> tba	
	<141> 1999-07-01	
15	<150> 60/091.616	
	<151> 1998-07-02	
	<160> 9	
20	<170> PatentIn Ver. 2.0	
	<210> 1	
25	<211> 16	
	<212> ARN	
	<213> constructo sintético	
30	<400> 1	
	cagugcaggn ggaaag	16
35	<210> 2	
	<211> 15	
	<212> ARN	
	<213> constructo sintético	
40	<400> 2	
	gguggacugc gugcg	15
45	<210> 3	
	<211> 15	
	<212> ARN	
50	<213> constructo sintético	
	<400> 3	
55	cagugcaggg gaaag	15
	<210> 4	
	<211> 15	
60	<212> ADN	
	<213> constructo sintético	
65	<400> 4	
	cttttccttg ctctg	15

ES 2 330 812 T3

	<210> 5	
	<211> 16	
	<212> ARN	
5	<213> constructo sintético	
	<400> 5	
10	cgcacgcagu ccagcc	16
	<210> 6	
	<211> 19	
15	<212> ADN	
	<213> constructo sintético	
	<211> 43	
20	<212> ADN	
	<213> constructo sintético	
	<400> 7	
25	cagugcaggg gaaagttct tttcttggc uggacugcgu gcg	43
	<210> 8	
30	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> constructo sintético	
35	<400> 8	
	cgcacgcagu ccagcctttt ctctttcct tttccttgct ctg	43
40	<210> 9	
	<211> 39	
	<212> ADN	
45	<213> constructo sintético	
	<400> 9	
50	cggcugcagg ggaaagaaua gtttttccc ctgcagccg	39
55		
60		
65		