



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 265**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/00** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05818326 .0**  
86 Fecha de presentación : **13.12.2005**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1831246**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2007**

54 Título: **Sonda para la detección de ácidos nucleicos.**

30 Prioridad: **23.12.2004 DE 10 2004 063 339**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

73 Titular/es: **Bayer Technology Services GmbH  
51368 Leverkusen, DE**

72 Inventor/es: **Burmeister, Jens;  
Seitz, Oliver;  
Köhler, Olaf y  
Röglin, Lars**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 306 265 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Sonda para la detección de ácidos nucleicos.

5 La invención se refiere a una sonda para la detección de ácidos nucleicos, procedimientos para la preparación de la sonda, métodos para llevar a cabo reacciones de detección y kits de ensayo que contienen los reactivos que se necesitan para llevar a cabo la reacción de detección basada en las sondas.

10 La detección de ácidos nucleicos tiene un gran campo de aplicación, p. ej. en el diagnóstico humano o veterinario, en el área alimentaria, en la analítica medioambiental, en la protección de plantas, en la investigación bioquímica o farmacológica y en la medicina forense.

15 Según el estado actual de la técnica, la detección de ácidos nucleicos se realiza mediante ensayos heterogéneos u homogéneos. Son ensayos heterogéneos aquellos métodos en los que se necesita como mínimo un paso de lavado para separar las sondas ligadas de las que no lo están. Los ensayos heterogéneos se llevan a cabo, por ejemplo, inmovilizando la sonda en una fase sólida mientras que los ácidos nucleicos que hay que detectar se encuentran en solución. Ejemplos de la detección de ácidos nucleicos mediante ensayos heterogéneos son las hibridaciones en filtros o en microarrays de ADN (chips de ADN) (véase p. ej. M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag, Nueva York, 1998 o D. Bowtell, J. Sambrook, *DNA Microarrays*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2003). La ventaja de los ensayos heterogéneos es la capacidad intrínseca para detectar de manera simultánea varios analitos (ensayos múltiplex), es desventajoso por ejemplo la necesidad de los pasos de lavado. Los ensayos homogéneos se caracterizan porque todos los componentes reaccionan entre sí en solución, desapareciendo por completo los pasos de lavado. Los ensayos homogéneos pueden seleccionarse por regla general mediante métodos que son comparativamente sencillos en cuanto al instrumental, sin embargo la capacidad de formar múltiplex es normalmente limitada. La renuncia a los pasos de lavado facilita la automatización, reduce el riesgo de contaminaciones y permite una realización económica de las reacciones de detección.

25 Las sondas para detectar ADN consisten por regla general en una unidad de hibridación y otra de emisión de la señal. La unidad de hibridación se une al ADN diana de manera específica para la secuencia y consta por ejemplo de ADN, ANP u otro análogo de ADN. La unidad emisora de la señal puede ser por ejemplo un marcaje radiactivo, una micro- o nanopartícula, una molécula redox activa, una molécula luminiscente o fluorescente. Por lo general, la unidad emisora de señal va unida covalentemente a la unidad de hibridación. El enlace de la unidad de hibridación a la unidad emisora de señal se produce habitualmente en los extremos 5' o 3' de la sonda para evitar una perturbación de la hibridación por parte de la unidad emisora de señal. Mientras que en los ensayos heterogéneos la separación de las sondas ligadas a los ácidos nucleicos que hay que detectar y que se encuentran libres en solución se produce mediante pasos de lavado, en los ensayos homogéneos debe garantizarse que la unidad emisora de señal en el estado hibridado de la sonda debe disponer de propiedades distintas a como en estado libre. Un cambio de las unidades emisoras de señal a consecuencia de la hibridación de la sonda puede conseguirse, por ejemplo, mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) o por medio de una molécula intercaladora de ADN. Ejemplos de sondas homogéneas fluorescentes que funcionan según el principio de la FRET son las sondas TaqMan® (P. M. Holland *et al.*, *Proc. Acad. EE.UU.*, 1991, 88, 7276-7280) o las denominados "balizas moleculares" ("Molecular Beacons") (documento 95/13399 A 1; S. Tyagi y F. Kramer, *Nature Biotechnol.* 1996, 14, 303-307). Las sondas que funcionan según el principio de FRET contienen en posición terminal un fluoróforo y un desactivador (quencher), con lo cual, por así decirlo, se puede conectar la fluorescencia dependiendo del estado de hibridación. En el caso de las balizas moleculares se usa como sonda una estructura de ADN en forma de horquilla que está unida en posición terminal a un fluoróforo y un desactivador. En el estado de no hibridado en la diana, la fluorescencia queda suprimida por un desactivador que se encuentra próximo en el espacio. En el caso de la unión a la diana, el fluoróforo y el desactivador están separados en el espacio, con lo cual se genera una señal de fluorescencia cuya intensidad aumenta al hacerlo la cantidad de diana. Las balizas moleculares pueden usarse como sondas en una reacción PCR para cuantificar la cantidad de producto que se genera en cada ciclo. La PCR cuantitativa (qPCR) es según el estado actual de la técnica uno de los métodos más habituales para detectar y cuantificar ácidos nucleicos en laboratorios de investigación y en el diagnóstico. Las desventajas de las balizas moleculares son la fluorescencia propia, que limita la sensibilidad, la especificidad limitada en la discriminación entre dianas complementarias y con emparejamiento erróneo de bases individuales y la estrechísima ventana de temperatura dentro de la que pueden usarse las sondas. Unir especificidad y sensibilidad es el principal reto en el desarrollo de sondas de hibridación, que tienen una importancia decisiva sobre todo en la detección de mutaciones de una única base (SNP).

50 Si se añaden a la mezcla de la PCR colorantes intercaladores, como por ejemplo SybrGreen, este colorante se intercala en la doble hélice de ADN formada y conduce al aumento de la fluorescencia al aumentar la cantidad del producto. Este método permite llevar a cabo una PCR cuantitativa sin sondas (un ejemplo se encuentra en A. K. Bhar *et al.* *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 2835-2845). Sin embargo, la desventaja de este método es la fluorescencia propia del colorante, que debe usarse a una concentración elevada, así como la tinción totalmente inespecífica. También una reacción múltiplex de la qPCR es alcanzable sólo de modo limitado con este procedimiento y se consigue, por ejemplo, registrando curvas de fusión a través de las cuales pueden discriminarse los distintos productos. Para el desarrollo de sondas homogéneas pueden aprovecharse igualmente moléculas emisoras de señal que fijan el ADN, garantizándose la especificidad mediante el enlace de la molécula emisora de señal con la sonda. Este principio lo llevaron a cabo por primera vez Barton *et al.*, que enlazaron complejos de rutenio(II) con sondas de ADN (documento US 5,157,032; Y. Jenkins *et al.*, *Biochemistry* 1992, 31, 10809-10816). Estas sondas muestran un aumento de la

fluorescencia en la hibridación. Sin embargo, al añadir ADN no-diana de doble hélice hay que reseñar igualmente un aumento de la fluorescencia. El complejo de rutenio catiónico favorece además las hibridaciones no específicas y limita de manera significativa la especificidad de las sondas. En el documento EP 0 710 668 B1 se describe la detección de ácidos nucleicos mediante sondas de ADN que van ligadas en posición terminal a un colorante de cianina asimétrico. Mediante la hibridación de estas sondas se consigue un débil aumento de la fluorescencia, aproximadamente en el factor 4, que no permite una detección sensible de ácidos nucleicos. En el documento US 6,329,144 B1 se describe una sonda de ANP que va ligada en posición terminal a un colorante de cianina asimétrico. Esta denominada sonda LightUp® muestra un claro aumento de la fluorescencia a causa de la hibridación de ácidos nucleicos. Estas sondas cumplen el criterio de sensibilidad y también se ha podido demostrar en el contexto de la qPCR (N. Svanvik *et al.*, Anal. Biochemistry 2000, 287, 179-182). Sin embargo, en lo que respecta a la especificidad las sondas LightUp® están limitadas a la capacidad de discriminación de la secuencia de ANP, motivo por el cual en la detección de mutaciones de una única base sólo es posible lograr una diferencia limitada de las intensidades de fluorescencia entre los pares de bases coincidentes y no coincidentes (un ejemplo es la difícil diferenciación de los pares de bases G:C y G:T).

Privat *et al.* describen sondas de ADN en las que un grupo fosfato internucleotídico central se enlazó con naranja de tiazol por medio de un espaciador (linker) (E. Privat *et al.*, Photochem. Photobiol. 2002, 75, 201-210). Estas sondas mostraban sólo un reducido aumento de la fluorescencia en un factor de cinco en el caso de la hibridación en dianas complementarias. Debido a la reducida sensibilidad de detección resultante, las sondas descritas no son adecuadas para aplicaciones prácticas en el diagnóstico de ácidos nucleicos.

Okamoto *et al.* han descrito una sonda de ADN para la detección homogénea de ácidos nucleicos basada en nucleósidos fluorescentes (A. Okamoto *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 9296-9297). Como nucleósidos fluorescentes se introdujeron en las sondas metoxibenzodeazaadenina (<sup>MD</sup>A) y metoxibenzodeazainosina (<sup>MD</sup>I), produciendo <sup>MD</sup>A en presencia de C en la cadena contraria una clara fluorescencia, mientras que <sup>MD</sup>I lo hace en presencia de T en la cadena contraria. Estas sondas son en principio apropiadas para la discriminación de mutaciones de una única base en ensayos homogéneos, aunque resulta desventajoso el hecho de que la fluorescencia de los nucleósidos fluorescentes resulta suprimida por los pares de bases G:C flanqueantes (desactivación [quenching] de la fluorescencia). Esta característica limita sensiblemente la aplicabilidad general de estas sondas. En el documento WO2004058793 A1 se da a conocer un principio similar: las nucleobases uracilo y citosina se enlazaron con pirenocarboxamida a través de un espaciador de propargilo y las bases fluorescentes así obtenidas (<sup>Py</sup>U y <sup>Py</sup>C) se integraron en las sondas de ADN. Aunque los pares de bases coincidentes <sup>Py</sup>U:A y <sup>Py</sup>C:G muestran una fluorescencia claramente mayor que las combinaciones emparejadas más débilmente, la hibridación de las sondas <sup>Py</sup>U y <sup>Py</sup>C conduce sólo a aumentos de fluorescencia reducidos (2-8 veces). Otra desventaja de este procedimiento es que sólo hay disponible un colorante fluorescente y por lo tanto no puede hacerse un múltiplex del ensayo.

Köhler y Seitz demostraron que el colorante fluorescente naranja de tiazol puede unirse como un subrogado universal de bases a una sonda de ANP con esqueleto de aminoetilglicina y de este modo se hace posible la construcción de una sonda de ANP con una especificidad mejorada (O. Köhler, O. Seitz, Chem. Commun. 2003, 23, 2938-2939). Si con estas sondas se detectan mutaciones de una única base, la base universal naranja de tiazol se introduce junto al lugar de la mutación. El colorante sensible al entorno da una señal de fluorescencia máxima sólo cuando se encuentra en las proximidades de emparejamientos de bases perfectos. Experimentos con estas sondas demostraron que el dúplex emparejado perfectamente entre la sonda y una diana complementaria mostraba entonces más fluorescencia que un dúplex que contiene un emparejamiento defectuoso cuando la hibridación se producía por debajo del punto de fusión del dúplex. Esta observación demuestra que mediante el naranja de tiazol puede conseguirse una especificidad de las sondas que va más allá de la especificidad del emparejamiento de bases complementarias. Aunque la especificidad de estas sondas basada en una secuencia de ANP con esqueleto de aminoetilglicina constituye una mejora frente al estado actual de la técnica, el factor de intensificación de la fluorescencia conseguido es equiparable al de otras sondas homogéneas.

La mejora de la especificidad y de la sensibilidad es el planteamiento central en el desarrollo de las sondas de hibridación, que tienen una importancia decisiva en particular en la detección de mutaciones de una única base (SNP). Además, las sondas deberán poder usarse en el intervalo de temperaturas más amplio posible y permitir la realización de ensayos múltiplex.

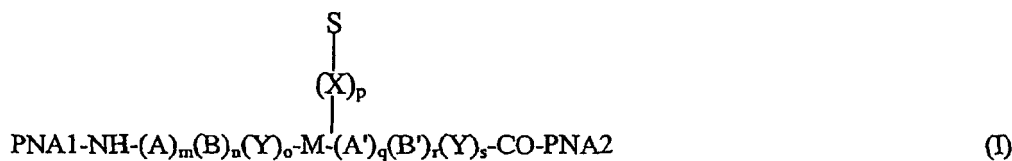
Por consiguiente, la presente invención tiene como objetivo facilitar una sonda para detectar ácidos nucleicos que se hibride con gran especificidad y selectividad, así como en el mayor intervalo de temperaturas posible, que pueda usarse en ensayos homogéneos y que permita una detección múltiplex.

Se encontró ahora sorprendentemente que hay una sonda de este tipo que cumple este objetivo.

Por consiguiente, es objeto de la invención una sonda para detectar ácidos nucleicos o una cadena de análogos de ADN en la que se ha sustituido una nucleobase en posición interna por un subrogado de base fluorescente. Se demostró sorprendentemente que por ejemplo naranja de tiazol que se unió a ornitina, en la hibridación en una secuencia diana sin emparejamiento erróneo, mostraba una intensificación de la fluorescencia claramente superior al naranja de tiazol que se había unido a un esqueleto de aminoetilglicina según el estado actual de la técnica. Otra observación sorprendente fue que los conjugados de L-ornitina y D-ornitina se diferencian con respecto a la relación entre la especificidad de la hibridación y la intensificación de la fluorescencia que puede conseguirse: el conjugado de L-ornitina mostraba una intensificación de la fluorescencia mayor que el conjugado de D-ornitina, mientras que el conjugado de D-ornitina mostraba una mayor especificidad de la intensificación de la fluorescencia.

## ES 2 306 265 T3

Es por consiguiente objeto de la invención una sonda de ANP que puede obtenerse por síntesis en fase sólida de la fórmula general:



en la que

PNA1 es una cadena de ácido nucleico peptídico de secuencia y longitud discretionales, preferentemente una secuencia de 2-100 bases, de manera especialmente preferente entre 2-10 bases.

PNA2 es una cadena de ácido nucleico peptídico de secuencia y longitud discretionales, preferentemente una secuencia de 2-100 bases, de manera especialmente preferente entre 2-10 bases.

A y A' representan independientemente entre sí un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2, representando R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo alquilo C1-C10 ramificado o sin ramificar y sustituido o sin sustituir -pudiéndose seleccionar los sustituyentes preferentemente del grupo de grupos amino sustituidos o sin sustituir, elementos de los grupos Va o VIa, preferentemente O o S-, un grupo fenilo sustituido o sin sustituir, representando preferentemente las correspondientes formas de realización sustituidas o sin sustituir y representando de manera especialmente preferente hidrógeno o un grupo metilo, A representa preferentemente un grupo metileno.

B y B' representan independientemente entre sí un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2, representando R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo alquilo C1-C10 ramificado o sin ramificar y sustituido o sin sustituir -pudiéndose seleccionar los sustituyentes preferentemente del grupo de grupos amino sustituidos o sin sustituir, elementos de los grupos Va o VIa, preferentemente O o S-, un grupo fenilo sustituido o sin sustituir, representando preferentemente las correspondientes formas de realización sustituidas o sin sustituir y representando de manera especialmente preferente hidrógeno o un grupo metilo, A representa preferentemente un grupo metileno.

m significa un número natural de 1-5, preferentemente 1,

n significa un número natural de 1-5, preferentemente 1,

o significa un número natural de 1-5, preferentemente 1,

X representa un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2, representando R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo alquilo C1-C10 ramificado o sin ramificar y sustituido o sin sustituir -pudiéndose seleccionar los sustituyentes preferentemente del grupo de grupos amino sustituidos o sin sustituir, elementos de los grupos Va o VIa, preferentemente O o S-, o un grupo fenilo sustituido o sin sustituir, o

X representa un grupo amino sustituido o sin sustituir del tipo NH o NR, representando R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo alquilo C1-C10 ramificado o sin ramificar y sustituido o sin sustituir -pudiéndose seleccionar los sustituyentes preferentemente del grupo de grupos amino sustituidos o sin sustituir, elementos de los grupos Va o VIa, preferentemente O o S-, un grupo fenilo sustituido o sin sustituir,

o X representa un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre, de manera especialmente preferente X representa un grupo NH.

p es un número natural de 0 a 10, preferentemente un número de 1-6,

S es un subrogado de bases universal y fluorescente, caracterizado porque es fluorescente y capaz de intercalarse en ADN, preferentemente un colorante de cianina, además preferentemente etidio, además preferentemente un antraceno sustituido, además preferentemente un colorante de acridina, además preferentemente un colorante seleccionado de los colorantes comercializados por la empresa Molecular Probes PO-PRO-1, BO-PRO-1, YO-PRO-1, TO-PRO-1, JO-PRO-1, PO-PRO-1, PO-PRO-3, LO-PRO-1, BO-PRO-3, YO-PRO-3, TO-PRO-3, TO-PRO-5 (así como los fluoróforos con estructura del espaciador modificada que derivan de estos compuestos), de manera especialmente preferente naranja de tiazol,

M representa una unidad de carbono sustituida del tipo CH o CR, representando R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo alquilo C1-C10 ramificado o sin ramificar y sustituido o sin sustituir -pudiéndose seleccionar los sustituyentes preferentemente del grupo de grupos amino sustituidos o sin sustituir, elementos de los grupos Va o VIa, preferentemente O o S-, o un grupo fenilo sustituido o sin sustituir, o

## ES 2 306 265 T3

M representa un grupo amino sustituido o sin sustituir del tipo NH o NR, representando R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo alquilo C1-C10 ramificado o sin ramificar y sustituido o sin sustituir -pudiéndose seleccionar los sustituyentes preferentemente del grupo de elementos de los grupos Va o VIa, preferentemente O o S-, un grupo fenilo sustituido o sin sustituir,

o M representa un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre, de manera especialmente preferente M representa un grupo CH.

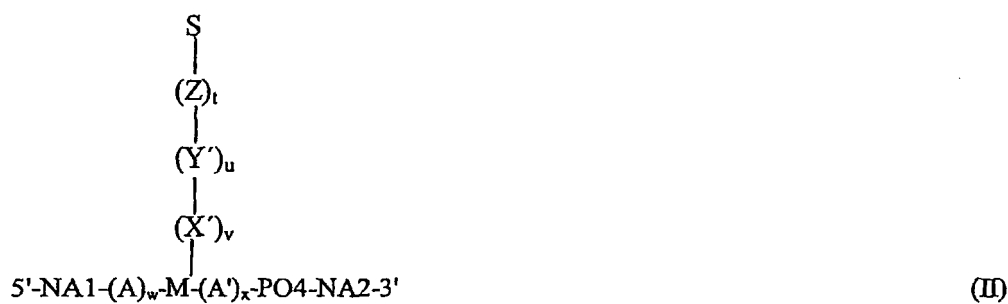
Y está definido como A.

q es un número natural de 0-5, preferentemente 0,

r es un número natural de 0-5, preferentemente 0,

s es un número natural de 0-5, preferentemente 0.

El oligómero del tipo de ácido nucleico que hibrida puede ser, alternativamente a ANP, ADN o un análogo de ADN como por ejemplo ANL, ADN-morfolino o ADN-arabino. De manera correspondiente, también son objeto de la invención sondas de fórmula general (II) que pueden obtenerse por síntesis en fase sólida:



en la que

5'-NA1 es un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico de secuencia y longitud discrecionales que finaliza con un grupo fosfato 3' terminal, preferentemente una secuencia de ácido nucleico de 3-100 bases de longitud, de manera especialmente preferente una secuencia de ácido nucleico de 3-20 bases de longitud, de manera muy especialmente preferente una secuencia de ácido nucleico de 3-15 bases de longitud.

A y A' está definido como anteriormente.

w y x es un número natural de 0-5,

X' y Z representan independientemente entre sí un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2, representando R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo alquilo C1-C10 ramificado o sin ramificar y sustituido o sin sustituir -pudiéndose seleccionar los sustituyentes preferentemente del grupo de grupos amino sustituidos o sin sustituir, elementos de los grupos Va o VIa, preferentemente O o S-, o un grupo fenilo sustituido o sin sustituir, o

X' y Z representan independientemente entre sí un grupo amino sustituido o no sustituido del tipo NH o NR, representando R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo alquilo C1-C10 ramificado o sin ramificar y sustituido o sin sustituir -pudiéndose seleccionar los sustituyentes preferentemente del grupo de grupos amino sustituidos o sin sustituir, elementos de los grupos Va o VIa, preferentemente O o S-, un grupo fenilo sustituido o sin sustituir, o

X' y Z representan independientemente entre sí un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre,

X' y Z representan de manera especialmente preferente e independientemente entre sí un grupo metileno.

Y' representa un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2, representando R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo alquilo C1-C10 sustituido o no sustituido ramificado o sin ramificar -pudiéndose seleccionar los sustituyentes preferentemente del grupo de grupos amino sustituidos o no sustituidos, elementos de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente O o S- o un grupo fenilo sustituido o no sustituido, o

## ES 2 306 265 T3

Y' representa un grupo amino sustituido o no sustituido del tipo NH o NR, representando R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo alquilo C1-C10 sustituido o no sustituido ramificado o sin ramificar -pudiéndose seleccionar los sustituyentes preferentemente del grupo de elementos de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente O o S- un grupo fenilo sustituido o no sustituido,

o Y' representa un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre, de manera especialmente preferente Y' representa un grupo NH.

u es un número natural de 0 a 10, preferentemente un número de 1-6, de manera especialmente preferente 1,

v es un número natural de 0 a 10, preferentemente un número de 1-6, de manera especialmente preferente 1,

t es un número natural de 0 a 10, preferentemente un número de 1-6,

S y M son tal como se ha definido con anterioridad.

Formas de realización preferentes, de manera especialmente preferentes o de manera muy especialmente preferentes son aquellas que hacen uso de parámetros, compuestos, definiciones y explicaciones mencionadas más delante de manera preferente, especialmente preferente o muy especialmente preferente.

Sin embargo, las definiciones, parámetros, compuestos y explicaciones generales presentadas en la descripción o presentadas en las secciones preferentes pueden combinarse también entre sí de modo discrecional, o sea entre las correspondientes secciones y secciones preferentes.

El subrogado de bases universal fluorescente S según la invención, tal como se menciona en las sondas según la fórmula (I) y (II), se caracteriza porque es capaz de intercalarse en el ADN y da la misma o similar temperatura de fusión para el dúplex sondas-ADN, independientemente de la base situada enfrente del subrogado en la diana de ácido nucleico. El subrogado de bases puede designarse hasta aquí como universal. Ejemplos de subrogados de bases según la invención son colorantes de cianina como por ejemplo naranja de tiazol, amarillo de oxazol (documento EP 0 714 986 A1), etidio, Dapoxyl<sup>®</sup>, antraceno sustituido con 2,6-donante-aceptor (H. Ihmels *et al.*, Org. Lett. 2000, 2, 2865-2867), acridina (véase por ejemplo K. Fukui *et al.*, Bioconjugate Chem. 1996, 7, 349-355), colorantes comercializados por la empresa Molecular Probes (véase el manual de la empresa Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Products) como por ejemplo PO-PRO-1, BO-PRO-1, YO-PRO-1, TO-PRO-1, JO-PRO-1, PO-PRO-1, PO-PRO-3, LO-PRO-1, BO-PRO-3, YO-PRO-3, TO-PRO-3, TO-PRO-5 (así como compuestos derivados de estos fluoróforos con la estructura del espaciador ausente o modificada) y el cromóforo BTCS (el cromóforo BTCS se describe por ejemplo en R. B. Thompson *et al.*, J. Biomed. Opt. 2000, 5, 1, 17-22). Las sondas que se diferencian en su secuencia pueden marcarse más o menos de color usando subrogados de bases que se diferencian con respecto a sus longitudes de onda de excitación de fluorescencia y de emisión de fluorescencia, y de esta manera facilitan la detección simultánea de varios analitos (análisis múltiple).

El subrogado de bases fluorescente está unido a un esqueleto que establece una distancia entre las nucleobases que flanquean al subrogado de bases mayor que un esqueleto que imita la separación entre nucleobases vecinas en el ADN. Ejemplo de un esqueleto que imita la geometría estándar del ADN es el esqueleto de la aminoetilglicina en el ANP. Cuanto más se diferencia la separación entre el subrogado de bases fluorescente y las nucleobases flanqueantes de la geometría estándar del esqueleto de ADN, con tanta menor eficacia pueden aumentar las interacciones de los apilamientos de bases la emisión del subrogado de bases fluorescente en la cadena sencilla. Como resultado, la fluorescencia de la cadena simple de la sonda es pequeña. No obstante, la separación no puede seleccionarse tan grande que se impidiera un apilamiento de bases en la doble cadena formada después de la hibridación. Una separación adecuada entre el subrogado de bases fluorescente y las nucleobases flanqueantes dentro de una sonda de ANP con esqueleto de aminoetilglicina puede establecerse, por ejemplo, mediante la introducción de 3-10 grupos metileno en la posición del esqueleto que lleva el subrogado de bases. La estructura de esqueleto que lleva el subrogado de bases puede contener, además de unidades de carbono, también heteroátomos tales como oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo o silicio. Un ejemplo de un esqueleto según la invención en el sitio del subrogado de bases fluorescente es ornitina dentro de una sonda de ANP con esqueleto de aminoetilglicina.

Si se unen entre sí covalentemente varias unidades de la estructura general (I) o (II), puede obtenerse una sonda con marcajes múltiples. Un modo de proceder de este tipo aumenta la sensibilidad de detección al usar las sondas según la invención. A diferencia de los marcajes de fluorescencia en posición terminal, mediante los cuales son posibles como máximo dos marcajes por cada sonda, incorporando los subrogados de bases fluorescentes es posible un marcaje múltiple.

La sonda según la invención es apropiada para llevar a cabo ensayos de hibridación, en especial ensayos de hibridación homogéneos. En los ensayos de hibridación homogéneos puede usarse la sonda, por ejemplo, para determinar el tipo y la cantidad de un ácido nucleico diana presente en una muestra acuosa. Para ello, se añade la sonda al ácido nucleico diana disuelto y se incuba durante un tiempo comprendido entre pocos segundos y varias horas. A continuación se mide la fluorescencia de la solución comparándola con un control (la misma solución sin ácido nucleico diana). La comparación del valor de fluorescencia con una curva estándar en la que se determinó la correlación entre

la fluorescencia de la sonda y la cantidad de diana usada, hace posible cuantificar el ácido nucleico que hay que detectar. Si la detección cuantitativa de ácidos nucleicos ha de llevarse a cabo con una sensibilidad particularmente alta, la sonda marcada una o varias veces puede combinarse de manera especialmente ventajosa con el procedimiento de la PCR. Durante la PCR cuantitativa se determina el aumento de fluorescencia a consecuencia de la amplificación de la diana. El número de ciclos PCR que se necesitan para superar un valor umbral fijado de la fluorescencia se define como el denominado valor Ct (Cycle threshold). El valor Ct puede relacionarse con la concentración de diana por medio de una curva de calibración y constituye de este modo una medida de la concentración de diana. Para ello, la sonda debe seleccionarse de tal manera que sea complementaria a una sección de la secuencia de la diana situada entre las secuencias del cebador y que muestre la menor hibridación cruzada posible con otras secuencias del genoma.

La sonda es apropiada para la detección de una única base (SNP), pudiéndose realizar esta detección por ejemplo mediante hibridación o mediante PCR. Con la sonda pueden analizarse también muestras de metilación. Si el ADN que hay que analizar se trata con bisulfito sódico, todas las citosinas no metiladas se transforman en uracilo mientras que las citosinas metiladas salen de la reacción sin cambios. La diana resultante, parcialmente modificada, puede analizarse mediante análisis tales como p. ej. PCR, PCR cuantitativo o hibridación. Un procedimiento de este tipo usando PCR o PCR cuantitativo se describe por ejemplo en J. G. Herman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 9821-9826 *et al. et al.* o en T.-S. Wong *et al.*, European Journal of Cancer 2003, 39, 1881-1887. Para el análisis de ADN tratado con bisulfito sódico, las sondas pueden usarse en ensayos, preferentemente en el PCR o en el PCR cuantitativo.

La preparación de la sonda se realiza mediante síntesis química, preferentemente por síntesis en fase sólida, de manera especialmente preferente por síntesis en fase sólida automatizada. Los métodos para la preparación de ácidos nucleicos, análogos de ácidos nucleicos y ácidos nucleicos peptídicos son conocidos para el experto y se describen por ejemplo en L. M. Smith, Anal. Chem. 1988, 60, 381-390 así como en B. E. Hyrup y P. E. Nielsen, Bioorg. Med. Chem. 1996, 4, 5-23. Las sondas o bien pueden unirse covalentemente al subrogado de bases fluorescente después de la síntesis en fase sólida, o bien la incorporación del subrogado de bases tiene lugar ya durante la síntesis convergente. La ornitina puede protegerse por ejemplo en el extremo N terminal mediante un grupo fluorenilmetoxycarbonilo (grupo Fmoc), mientras que el subrogado de bases se une covalentemente al grupo amino primario de la ornitina. Por ejemplo, el naranja de tiazol puede unirse a través de un grupo carboxilo al grupo amino primario de la ornitina. Un bloque funcional de este tipo es adecuado para usarlo en síntesis en fase sólida automatizadas de las sondas según el procedimiento Fmoc.

Frente a las sondas conocidas para la detección de ácidos nucleicos, la sonda según la invención posee las ventajas siguientes:

- a) gran especificidad de reconocimiento entre la sonda y el ácido nucleico que hay que detectar, lo cual resulta ventajoso en especial en la detección de mutaciones de una única base (SNP) o de citosinas metiladas.
- b) poca fluorescencia en la cadena sencilla debido al ensanchamiento del esqueleto y a consecuencia de ello un mayor aumento de la fluorescencia en la formación del complejo sondas-analito.
- c) posibilidad de generar mediante la elección del esqueleto sondas con una alta intensificación de la fluorescencia (= sensibilidad de detección) o especificidad.
- d) al incorporar varios subrogados de bases se puede marcar varias veces la sonda.
- e) aplicación en ensayos múltiple mediante el uso de subrogados de bases cuyos máximos de fluorescencia se encuentran en distintas longitudes de onda.
- f) hibridación y discriminación específica de bases individuales en un amplio intervalo de temperaturas en condiciones de hibridación no estrictas. Esto facilita considerablemente el diseño de la sonda y la optimización del ensayo.
- g) la preparación de las sondas se realiza mediante síntesis en fase sólida convencional.

Se explicará a continuación con más detalles la invención basándose en ejemplos de realización e ilustraciones.

Se muestra

Figura 1

La relación entre la intensidad de la fluorescencia de la sonda ANP Ac-GCCGTA-R(TO)-TAGCCG antes y después de la adición de la diana de ADN 5'-CGGCTAZTACGGC-3' dependiendo del esqueleto R al que se unió el naranja de tiazol (TO) y dependiendo del subrogado de bases con Z = 1 = timidina (T), 2 = guanósina (G), 3 = adenosina (A) y 4 = citidina (C) en nucleótidos situados opuestos en el dúplex. Corresponde aquí 5 = R = aminoetilglicina (Aeg), 6 = R = L-ornitina (L-Orn) y 7 = R = D-ornitina (D-Orn).

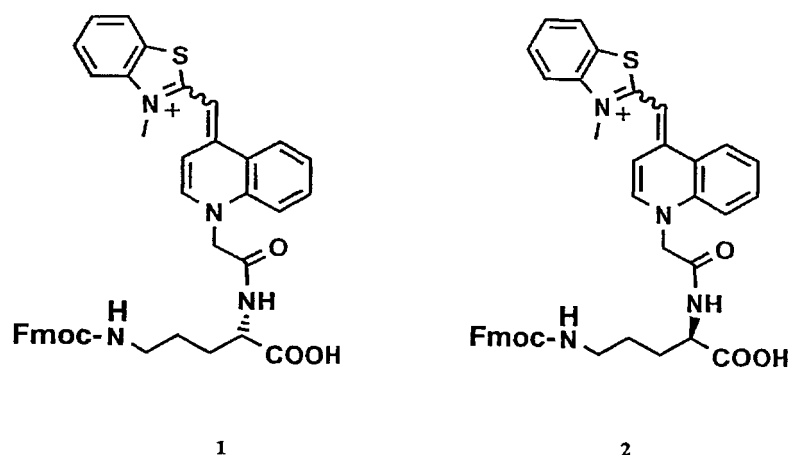
Figura 2

La relación entre la intensidad de la fluorescencia de la sonda ANP Ac-GCCGTA-R(TO)-TAGCCG antes y después de la adición de la diana de ADN 5'-CGGCTYTTACGGC-3' dependiendo del esqueleto R al que se unió el naranja de tiazol (TO) y dependiendo de la mutación de una única base presente en la diana con Y = 8 = adenina (A), 9 = guanosina (G), 10 = citidina (C) y 11 = timidina (T). Corresponde aquí 5 = R = aminoetilglicina (Aeg), 6 = R = L-ornitina (L-Orn) y 7 = R = D-ornitina (D-Orn).

#### 10 Ejemplos sobre síntesis de sondas

Los monómeros de ANP se obtuvieron de la empresa PerSeptive Biosystems y antes de la síntesis se secaron al vacío fino. La fase sólida NovaSyn® TGR, PyBOP y clorhidrato de D-ornitina se adquirieron en Novabiochem, el clorhidrato de L-ornitina en Avocado Research Chemicals. Los oligonucleótidos de ADN se obtuvieron de la empresa MWG-Biotech. Todos los restantes productos químicos se obtuvieron de las empresas Acros, Aldrich, Avocado, Fluka y Riedel de Haen. Eventualmente, antes de su uso los disolventes usados se destilaron o se secaron por un procedimiento estándar. Todas las soluciones acuosas se prepararon con agua que se purificó mediante una instalación Milli-Q-Pore (empresa Millipore).

La síntesis de las sondas puede realizarse por medio de una estrategia divergente o convergente (lineal). Se describirá a continuación la síntesis de las sondas aplicando una estrategia de síntesis lineal ya que esta última puede llevarse a cabo de manera totalmente automatizada. Como ejemplo de una forma de realización de la invención se sintetizaron las ornitinas-naranja de tiazol 1 y 2 de protegidas con Fmoc.



#### 45 Ejemplo 1

Preparación del éster alílico de Nδ-[9-(fluorenilmetoxycarbonil)-L-ornitina]-Nα-[bromuro de 2-(1-carboximetil-1H-quinolin-4-ilidenmetil)-3-metil-benzotiazol-3-io] (Fmoc-L-Orn(TO)-OAll)

Se preparó ácido carboxílico-naranja de tiazol según un protocolo de Zhou *et al.* (X.-F- Zhou *et al.*, Journal of Imaging Science and Technology, 1995, 39, 244-252). A una solución de ácido carboxílico-naranja de tiazol (100 mg, 0,23 mmol) en DMF (2,3 ml) seco se le añadió PyBOP (145 mg, 0,279 mmol), piridinio-p-tolueno-sulfonato (58 mg, 0,232 mmol) y N-metilmorfolina (23 mg, 0,23 mmol). Se agitó la suspensión en atmósfera de argón hasta obtener una solución A transparente. La L-ornitina se protegió según un procedimiento estándar con Fmoc en el extremo N-terminal y con un grupo alquilo en el extremo C-terminal (= Fmoc-L-Orn-OAll). La solución A transparente se incorporó a una solución de Fmoc-L-Orn-OAll (100 mg, 0,23 mmol) y N-metilmorfolina (23 mg, 0,23 mmol) en DMF (2,3 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 12 h en atmósfera de argón. El disolvente se retiró al vacío, el residuo se recogió en metanol (2 ml). Se agitó durante 1 h, se filtró la materia sólida y se relavó con metanol (5 ml). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (cloroformo : metanol 97:3, 1% ácido fórmico). Se obtuvieron 118 mg de Fmoc-L-Orn(TO)-OAll en forma de una sustancia sólida de color naranja, correspondiente a un rendimiento del 63%. Rf (cloroformo : metanol 80:20, 1% ácido fórmico) = 0,56.

## ES 2 306 265 T3

### Ejemplo 2

*Preparación de Nδ-[9-(fluorenilmetoxicarbonil)-L-ornitina]-Nα-[bromuro de 2-(1-carboximetil-1H-quinolin-4-ilidenmetil)-3-metil-benzotiazol-3-io] OH (Fmoc-L-Orn(TO)-OH) 1*

5 A una solución de Fmoc-L-Orn(TO)-OAll (81 mg, 0,1 mmol) en THF (5 ml) se añadió N-metilanilina (11,3 mg, 0,1 mmol) y se desgasificó varias veces la solución. Tras la adición de [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] (12 mg, 0,01 mmol) se agitó la solución durante 14 h con exclusión de luz. El disolvente se eliminó al vacío. El residuo se disolvió en metanol (4 ml) y se filtró el precipitado. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (cloroformo : metanol 97:3, 1% ácido fórmico). Se obtuvieron 53 mg del producto Fmoc-L-Orn(TO)-OH (1) en forma de una sustancia sólida de color naranja, correspondiente a un rendimiento del 68%.

Rf (cloroformo : metanol 80:20, 1% ácido fórmico) = 0,22.

### 15 Ejemplo 3

*Preparación del éster alílico de Nδ-[9-(fluorenilmetoxicarbonil)-D-ornitina]-Nα-[bromuro de 2-(1-carboximetil-1H-quinolin-4-ilidenmetil)-3-metil-benzotiazol-3-io] (Fmoc-D-Orn(TO)-OAll)*

20 Se preparó ácido carboxílico-naranja de tiazol según un protocolo de Zhou *et al.* (X.-F. Zhou *et al.*, Journal of Imaging Science and Technology, 1995, 39, 244-252). A una solución de ácido carboxílico-naranja de tiazol (100 mg, 0,23 mmol) en DMF (2,3 ml) seco se le añadió PyBOP (145 mg, 0,279 mmol), piridinio-p-tolueno-sulfonato (58 mg, 0,232 mmol) y N-metilmorfolina (23 mg, 0,23 mmol). Se agitó la suspensión en atmósfera de argón hasta obtener una solución A transparente. La D-ornitina se protegió según un procedimiento estándar con Fmoc en el extremo N-terminal y con un grupo alquilo en el extremo C-terminal (= Fmoc-D-Orn-OAll). La solución A transparente se incorporó a una solución de Fmoc-D-Orn-OAll (100 mg, 0,23 mmol) y N-metilmorfolina (23 mg, 0,23 mmol) en DMF (2,3 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 12 h en atmósfera de argón. El disolvente se retiró al vacío, el residuo se recogió en metanol (2 ml). Se agitó durante 1 h, se filtró la materia sólida y se relavó con metanol (5 ml). El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (cloroformo : metanol 97:3, 1% ácido fórmico). Se obtuvieron 103 mg de Fmoc-D-Orn(TO)-OAll en forma de una sustancia sólida de color naranja, correspondiente a un rendimiento del 55%.

Rf (cloroformo : metanol 80:20, 1% ácido fórmico) = 0,56.

### Ejemplo 4

*Preparación de Nδ-[9-(fluorenilmetoxicarbonil)-D-ornitina]-Nα-[bromuro de 2-(1-carboximetil-1H-quinolin-4-ilidenmetil)-3-metil-benzotiazol-3-io] OH (Fmoc-D-Orn(TO)-OH) 1*

45 A una solución de Fmoc-D-Orn(TO)-OAll (81 mg, 0,1 mmol) en THF (5 ml) se añadió N-metilanilina (11,3 mg, 0,1 mmol) y se desgasificó varias veces la solución. Tras la adición de [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] (12 mg, 0,01 mmol) se agitó la solución durante 14 h con exclusión de luz. El disolvente se eliminó al vacío. El residuo se disolvió en metanol (4 ml) y se filtró el precipitado. El producto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (cloroformo : metanol 97:3, 1% ácido fórmico). Se obtuvieron 52 mg del producto Fmoc-D-Orn(TO)-OH (1) en forma de una sustancia sólida de color naranja, correspondiente a un rendimiento del 65%.

Rf (cloroformo : metanol 80:20, 1% ácido fórmico) = 0,22.

### Ejemplo 5

*Síntesis en fase sólida de sondas*

*Carga de la fase sólida NovaSyn® TGR*

55 Se lavó (3x diclorometano, 3x dimetilformamida, 3x diclorometano, 3x dimetilformamida) la fase sólida. Se dejó hinchar la fase sólida durante 30 min en dimetilformamida (10 ml). Para la preactivación se añadieron hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio (PyBOP® 301,2 mg, 0,58 mmol) y N-metilmorfolina (87,7 mg, 0,87 mmol) a una solución de glicina protegida con Fmoc (172,3 mg, 0,58 mmol) en dimetilformamida (5,8 ml). Después de 3 min de incubación se mezcló la solución obtenida con la fase sólida. Después de otras 4 h de incubación se lavó la fase sólida (3x dimetilformamida, 3x diclorometano, 3x dimetilformamida) y se bloquearon los grupos que no habían reaccionado con una solución de anhídrido acético en piridina (1:4, 5 ml). Después de 5 min se repitió el paso de 65 bloqueo. Se lavó la fase sólida (3x dimetilformamida, 3x diclorometano, 3x dimetilformamida y 5x diclorometano) y a continuación se secó al vacío.

## ES 2 306 265 T3

### *Síntesis usando un sintetizador automatizado*

La síntesis de las sondas en el sintetizador automatizado (Intavis RespPep de la empresa Intavis AG) se llevó a cabo según el siguiente protocolo general de trabajo:

Se dejó hinchar en dimetilformamida (2 ml) la fase sólida cargada. Después de 30 min se transfirió la fase sólida hinchada al sintetizador. Se lavó 2x con dimetilformamida (180  $\mu$ l).

*Disociación de Fmoc:* se mezcló la fase sólida con dimetilformamida/piperidina (4:1, 100  $\mu$ l). Al cabo de 2 min se repitió el procedimiento, a continuación se lavó la fase sólida con DMF (1x 180  $\mu$ l, 3x 100  $\mu$ l y 1x 180  $\mu$ l).

*Acoplamiento:* se suspendió la fase sólida en una solución de 4 equivalentes del bloque funcional protegido con Fmoc que hay que acoplar y 8 equivalentes de N-metilmorfolina en dimetilformamida (concentración 0,3M del bloque funcional en NMP, que se preactivó durante 8 min mediante incubación con 3,6 equivalentes de 1H-benzotriazolío-1-[bis(dimetilamino)metileno]-5-cloro-hexafluorofosfato (HCTU)). Al cabo de 30 min se lavó la fase sólida (2x 180  $\mu$ l dimetilformamida).

*Remate:* el remate (capping) se realizó mediante un tratamiento de 3 min con anhídrido acético/2,6-lutidina/piridina (5:6:89, 100  $\mu$ l). A continuación se lavó la fase sólida (2x 180  $\mu$ l dimetilformamida, 1x 100  $\mu$ l dimetilformamida).

En el acoplamiento de los compuestos 1 y 2 se procedió según el protocolo anteriormente indicado, añadiéndose PPTS (2 mg, 8  $\mu$ mol) para mejorar la solubilidad. El acoplamiento se llevó a cabo dos veces.

*Separación de la fase sólida:* una solución de hidrocloreuro del éster metílico de cistina (5 mg, 29  $\mu$ mol) en ácido trifluoroacético/m-cresol/agua (37:2:1, 1 ml) se hizo pasar durante 40 min a través de la fase sólida previamente secada. Se lavó la fase sólida con ácido trifluoroacético (500  $\mu$ l). Los filtrados reunidos se concentraron al vacío.

*Purificación:* se añadió éter dietílico frío a la solución de separación concentrada. Se centrifugó el precipitado y se desechó el residuo. Se recogió el residuo en agua y se llevó a cabo una purificación previa con una columna SepPak<sup>®</sup>C 18, que se equilibró con agua. Los eluidos de color obtenidos después de una elución en gradiente (1x 20:80 acetonitrilo:H<sub>2</sub>O: 0,1% ácido trifluoroacético; 1x 40:60 acetonitrilo:H<sub>2</sub>O: 0,1% ácido trifluoroacético; 1x 80:20 acetonitrilo:H<sub>2</sub>O: 0,1% ácido trifluoroacético; 2 ml en cada caso) se analizaron mediante HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF y se purificaron mediante HPLC semipreparativa.

### *Ejemplos del uso de sondas*

Los dos ejemplos siguientes demuestran de modo ejemplar cómo pueden usarse las sondas para la detección de ADN homogénea y muestran una comparación con el estado actual de la técnica.

#### Ejemplo 6

#### *Detección de ADN homogénea con sondas de L-ornitina-naranja de tiazol y D-ornitina-naranja de tiazol en comparación con sondas aminoetilglicina-naranja de tiazol*

Los espectros de fluorescencia se registraron a 25°C con un espectrómetro LS 50B de la empresa Perkin Elmer. Las mediciones se realizaron en tampón fosfato, pH 7 (100 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 mM EDTA). Para la hibridación se usó en cada caso 1 nmol de la diana de ADN y de la correspondiente sonda de ANP en 1 ml de solución tampón. La sonda de ANP usada poseía la secuencia general Ac-gccgta-O-tagcgg-Gly-NH<sub>2</sub>, en la que O representa el colorante naranja de tiazol que estaba unido a un esqueleto de aminoetilglicina, de D-ornitina o de L-ornitina. La diana de ADN poseía la secuencia general 5'-CGGCTAXTACGGC, en la que X era la nucleobase situada en el dúplex opuesta al subrogado de bases, o sea C, T, A o G. La Figura 1 muestra la relación entre las intensidades de fluorescencia medidas de las sondas antes y después de la adición de la diana de ADN dependiendo de la estructura del esqueleto al que iba ligado el naranja de tiazol así como dependiendo de la base situada opuesta al subrogado de bases. Los resultados muestran a modo de ejemplo que el esqueleto de L-ornitina da en todos los casos una señal de fluorescencia más alta que el esqueleto de aminoetilglicina. El esqueleto de D-ornitina da en los cuatro casos señales de fluorescencia más débiles que el esqueleto de L-ornitina. En comparación con el esqueleto de aminoetilglicina, el esqueleto de D-ornitina da en tres casos una intensidad de fluorescencia mayor que el esqueleto de aminoetilglicina, en un caso las intensidades son las mismas. El ejemplo muestra también que seleccionando de manera apropiada las secuencias de las sondas puede maximizarse el aumento de fluorescencia en la hibridación.

## ES 2 306 265 T3

### Ejemplo 7

*Detección de mutaciones de una base particular con sondas de L-ornitina-naranja de tiazol y de D-ornitina-naranja de tiazol en comparación con sondas de aminoetilglicina-naranja de tiazol*

5 Los espectros de fluorescencia se registraron a 25°C con un espectrómetro LS 50B de la empresa Perkin-Elmer. Las mediciones se realizaron en tampón fosfato, pH 7 (100 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,1 mM EDTA). Para la hibridación se usó en cada caso 1 nmol de la diana de ADN y de la correspondiente sonda de ANP en 1 ml de solución tampón. La sonda de ANP usada poseía la secuencia general Ac-gccgta-O-tagccg-Gly-NH<sub>2</sub>, en la que O representa el colorante naranja de tiazol que estaba unido a un esqueleto de aminoetilglicina, de D-ornitina o de L-ornitina. La diana de ADN poseía la secuencia general 5'-CGGCTXTTACGGC, en la que X era la mutación de una única base en la diana de ADN, o sea, C, T, A o G. En el caso de X=A se trata de un dúplex perfectamente emparejado. La Figura 2 muestra la relación entre las intensidades de fluorescencia medidas de las sondas antes y después de la adición de la diana de ADN dependiendo de la estructura del esqueleto al que iba ligado el naranja de tiazol así como dependiendo de la mutación de una base particular presente en la diana. Los resultados muestran que las sondas de ornitina poseen en general una especificidad en el reconocimiento de las mutaciones de una base particular mayor que las sondas de aminoetilglicina. Las sondas de D-ornitina muestran por lo general señales de fluorescencia más débiles que las sondas de L-ornitina. Mientras que la relación de señal entre el dúplex perfectamente emparejado y los distintos dúplex que contienen una despareja vale 6-12 en el caso de la L-ornitina, en el caso de la D-ornitina se observa una relación de 8-12. El ejemplo demuestra la especificidad generalmente mayor de las sondas de D-ornitina.

### Ejemplo 8

25 *Determinación de las temperaturas de fusión de distintos dúplex con sondas de aminoetilglicina-naranja de tiazol, L-ornitina-naranja de tiazol y D-ornitina-naranja de tiazol*

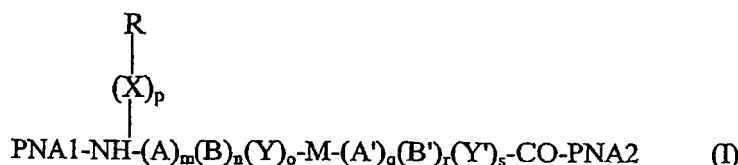
Las curvas de fusión de los complejos sondas-ADN se registraron en agua con un espectrómetro UV-VIS de la empresa Varian (Cary 100). La medición se llevó a cabo con un gradiente de 0,3°C por minuto, midiéndose dos veces de 85°C-15°C y otras dos veces de 15°C-85°C. El punto de inversión de la curva de fusión se determinó como la temperatura de fusión del correspondiente dúplex. Se usaron dos dianas de ADN con la secuencia 5'-AGTGAAATGT-TATACGAAACT-3' (diana emparejada) y 5'-GAAATGCTATACGAA-3' (diana desparejada). Como sondas se usaron compuestos de secuencia general N-ttcgtat-O-acatttc-Lys-C, en donde O representa el colorante naranja de tiazol que estaba unido a un esqueleto de aminoetilglicina, de D-ornitina o de L-ornitina. Se determinaron las siguientes temperaturas de fusión para los diferentes dúplex:

	aminoetilglicina	L-ornitina	D-ornitina
T <sub>m</sub> (emparejado)	59 °C	59 °C	55 °C
T <sub>m</sub> (desemparejado)	37 °C	38 °C	35 °C
ΔT <sub>m</sub>	22 °C	20 °C	21 °C

El ejemplo muestra que con las estructuras modificadas (ensanchadas) del esqueleto, en el caso de las sondas de ornitina no se produce ninguna desestabilización significativa de los dúplex. Además, las diferencias de las temperaturas de fusión de los dúplex emparejados y desemparejados son las mismas dentro del marco de los límites de error experimentales. Este ejemplo muestra que la diferencia entre dúplex emparejados y no emparejados mejorada mediante el esqueleto de ornitina, no se debe a los puntos de fusión modificados sino a la modificación del entorno del subrogado de bases. Con ello se facilita la aplicabilidad de las sondas para diferenciar bases individuales en un amplio intervalo de temperaturas.

## REIVINDICACIONES

1. Sonda de ANP de fórmula general:



en la que

PNA1 es una cadena de ácido nucleico peptídico de secuencia y longitud discrecionales, preferentemente una secuencia de 2-100 bases, de manera especialmente preferente entre 2-10 bases,

PNA2 es una cadena de ácido nucleico peptídico de secuencia y longitud discrecionales, preferentemente una secuencia de 2-100 bases, de manera especialmente preferente entre 2-10 bases,

A es un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2 (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), preferentemente un grupo metileno.

B es un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2 (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), un grupo amino sustituido o sin sustituir o un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre, de manera especialmente preferente un grupo metileno,

C es un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2 (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), un grupo amino sustituido o sin sustituir o un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre, de manera especialmente preferente un grupo metileno,

m es un número natural de 1-5, preferentemente 1,

n es un número natural de 1-5, preferentemente 1,

o es un número natural de 1-5, preferentemente 1,

X es un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2 (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), un grupo amino sustituido o sin sustituir del tipo NH o NR (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir) o un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre, de manera especialmente preferente un grupo NH,

p es un número natural de 0 a 10, preferentemente un número de 1-6,

R es un sustituto de bases universal fluorescente, **caracterizada** porque es fluorescente y es capaz de intercalarse en el ADN, preferentemente un colorante de cianina, además preferentemente etidio, además preferentemente un antraceno sustituido, además preferentemente un colorante de acridina, además preferentemente un colorante seleccionado de los colorantes comercializados por la empresa Molecular Probes PO-PRO-1, BO-PRO-1, YO-PRO-1, TO-PRO-1, JO-PRO-1, PO-PRO-1, PO-PRO-3, LO-PRO-1, BO-PRO-3, YO-PRO-3, TO-PRO-3, TO-PRO-5 (así como los fluoróforos con estructura del espaciador modificada que derivan de estos compuestos), de manera especialmente preferente naranja de tiazol,

M es una unidad de carbono sustituida del tipo CH o CR (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), un grupo amino sustituido del tipo NH o NR (representando R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir) o un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre, de manera especialmente preferente un grupo CH,

## ES 2 306 265 T3

A' es un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2 (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), un grupo amino sustituido o sin sustituir o un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre, de manera especialmente preferente un grupo metileno,

B' es un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2 (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), un grupo amino sustituido o sin sustituir o un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre, de manera especialmente preferente un grupo metileno,

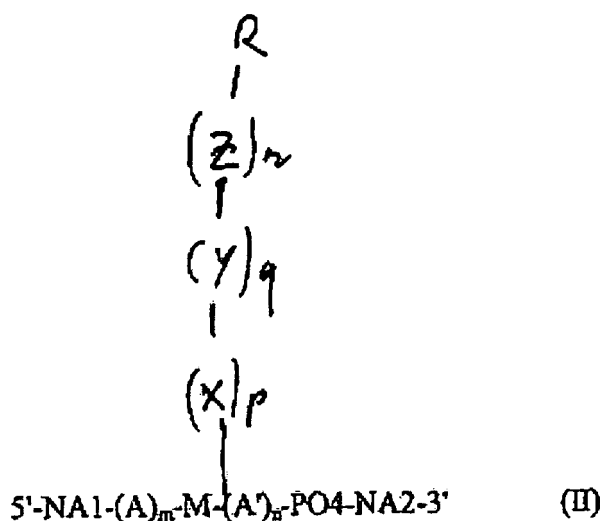
Y es un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2 (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), de manera especialmente preferente un grupo metileno,

q es un número natural de 0-5, preferentemente 0,

r es un número natural de 0-5, preferentemente 0,

s es un número natural de 0-5, preferentemente 0.

### 2. Sonda de fórmula general



en la que

5'-NA1 es un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico de secuencia y longitud discrecionales que finaliza con un grupo fosfato 3'-terminal, preferentemente una secuencia de ácidos nucleicos de 3-100 bases de longitud, de manera especialmente preferente una secuencia de ácido nucleico de 3-20 bases de longitud, de manera muy especialmente preferente una secuencia de ácido nucleico de 3-15 bases de longitud,

NA2-3' es un ácido nucleico o un análogo de ácido nucleico de secuencia y longitud discrecionales, preferentemente una secuencia de ácido nucleico de 3-100 bases de longitud, de manera especialmente preferente una secuencia de ácido nucleico de 3-20 bases de longitud, de manera muy especialmente preferente una secuencia de ácido nucleico de 3-15 bases de longitud,

A es un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2 (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), preferentemente un grupo metileno,

m es un número natural de 0-5,

X es un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2 (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), un grupo amino sustituido o sin sustituir del tipo NH o NR (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sus-

## ES 2 306 265 T3

tituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir) o un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre, de manera especialmente preferente un grupo metileno,

5 Y es un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2 (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), un grupo amino sustituido o sin sustituir del tipo NH o NR (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir) o un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre, de manera especialmente preferente un grupo NH,

15 Z es un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2 (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), un grupo amino sustituido o sin sustituir del tipo NH o NR (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir) o un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre, de manera especialmente preferente un grupo metileno,

20 p es un número natural de 0 a 10, preferentemente un número de 1-6, de manera especialmente preferente 1,

q es un número natural de 0 a 10, preferentemente un número de 1-6, de manera especialmente preferente 1,

25 r es un número natural de 0 a 10, preferentemente un número de 1-6,

R es un sustituto de bases universal fluorescente, **caracterizada** porque es fluorescente y es capaz de intercalarse en el ADN, preferentemente un colorante de cianina, además preferentemente etidio, además preferentemente un antraceno sustituido, además preferentemente un colorante de acridina, además preferentemente un colorante seleccionado de los colorantes comercializados por la empresa Molecular Probes PO-PRO-1, BO-PRO-1, YO-PRO-1, TO-PRO-1, JO-PRO-1, PO-PRO-1, PO-PRO-3, LO-PRO-1, BO-PRO-3, YO-PRO-3, TO-PRO-3, TO-PRO-5 (así como los fluoróforos con estructura del espaciador modificada que derivan de estos compuestos), de manera especialmente preferente naranja de tiazol,

35 M es una unidad de carbono sustituida del tipo CH o CR (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), un grupo amino sustituido del tipo NH o NR (representando R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir) o un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente oxígeno o azufre, de manera especialmente preferente un grupo CH,

45 A' es un grupo metileno o una unidad de carbono sustituida del tipo CHR o CR2 (siendo R hidrógeno o un resto orgánico, preferentemente un grupo metilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo alquilo sustituido o sin sustituir, además preferentemente un grupo fenilo sustituido o sin sustituir), un grupo amino sustituido o sin sustituir o un átomo de los grupos Va o VIa del sistema periódico, preferentemente azufre, preferente un grupo metileno,

n es un número natural de 0-5.

50 3. Sonda según una de las reivindicaciones 1 y/o 2, **caracterizada** porque se unen covalentemente varias unidades de la estructura general (I) o (II) y se obtiene una sonda con marcajes múltiples.

4. Procedimiento para la preparación de la sonda según una de las reivindicaciones 1-2 mediante síntesis en fase sólida, preferentemente mediante síntesis en fase sólida automatizada.

55 5. Uso de la sonda según una de las reivindicaciones 1-3 para la realización de ensayos de ácidos nucleicos, preferentemente para la realización de ensayos de ácidos nucleicos homogéneos.

60 6. Uso de la sonda según una de las reivindicaciones 1-3 para la realización de una reacción PCR, preferentemente para la realización de una reacción PCR cuantitativa.

7. Uso de la sonda según una de las reivindicaciones 1-3 para la realización de ensayos múltiplex, **caracterizado** porque distintas sondas se marcan con distintos sustitutos de bases fluorescentes.

65 8. Sonda según la reivindicación 1 o 3, conteniendo la sonda L-ornitina a la que está ligado un sustituto de bases fluorescente, preferentemente naranja de tiazol.

## ES 2 306 265 T3

9. Sonda según la reivindicación 1 o 3, conteniendo la sonda D-ornitina a la que está ligado un sustituto de bases fluorescente, preferentemente naranja de tiazol.

5 10. Kit de ensayo que contiene aquellos reactivos que se necesitan para la realización del ensayo según una de las reivindicaciones 5-7.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65