

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 786**

51 Int. Cl.:

C07C 245/02 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C07D 241/46 (2006.01)

C07D 219/04 (2006.01)

C07H 19/073 (2006.01)

C09B 31/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2009 E 14152335 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2757091**

54 Título: **Sondas de fluoróforo atenuadoras oscuras de ácido nucleico estabilizado**

30 Prioridad:

01.04.2008 US 41515 P

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

25.09.2017

73 Titular/es:

**BIOSEARCH TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
81 Digital Drive
Novato, CA 94949, US**

72 Inventor/es:

**COOK, RONALD M. y
LYTTLE, MATT**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 633 786 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sondas de fluoróforo atenuadoras oscuras de ácido nucleico estabilizado

Campo técnico

5 La solicitud se refiere en general a materiales nuevos (por ejemplo, soportes sólidos y fosforamiditas) para la síntesis de ácido nucleico. Los ejemplos de materiales incluyen un soporte sólido y una fosforamidita con adición de una función con una fracción estabilizante. A diversos materiales se les añade una función tanto con una fracción estabilizante como con un agente atenuador. La solicitud también proporciona monómeros y oligómeros de ácido nucleico, incluyendo sondas marcadas en forma fluorescentes usando estos materiales. También se proporcionan métodos de análisis y diagnóstico basados en oligómeros que utilizan sondas de oligómeros de la invención que se unen a secuencias objetivo de ácido nucleico.

Antecedentes de la invención

15 Las sondas de oligonucleótidos fluorescentes son herramientas importantes para el análisis genético, tanto en investigación como en desarrollo genómico, y en medicina clínica. Una clase particularmente útil de sondas fluorescentes son las sondas auto atenuadoras, también conocidas como sondas de transferencia de energía de fluorescencia, o sondas FET. Aunque el diseño de diferentes sondas usando este motivo puede variar en los detalles, las sondas FET contienen tanto un fluoróforo como un atenuador unidos a un oligonucleótido. El fluoróforo y el atenuador están configurados para producir una señal sólo como resultado de la hibridación con un objetivo deseado. A pesar de la limitada disponibilidad de sondas FET, las técnicas que incorporan su uso están desplazando rápidamente a los métodos competitivos.

20 Se han desarrollado sondas que contienen un par atenuador de fluoróforo para ensayos de hibridación en los que la sonda forma una estructura en horquilla, es decir, donde la sonda se hibrida con ella misma para formar un bucle de tal manera que la molécula atenuadora se pone cerca a la molécula informadora en ausencia de una secuencia complementaria de ácido nucleico para evitar la formación de la estructura en horquilla (véase, por ejemplo, el documento WO 90/03446; solicitud de patente europea No. 0 601 889 A2). Cuando está presente una secuencia complementaria objetivo, la hibridación de la sonda con la secuencia complementaria objetivo interrumpe la estructura de horquilla y hace que la sonda adopte una conformación en la que la molécula atenuadora ya no está suficientemente cerca de la molécula informadora para inactivar la molécula informadora. Como resultado, las sondas proporcionan una señal fluorescente aumentada cuando se hibridan con una secuencia objetivo que cuando no se hibridan. Las sondas que incluyen una estructura de horquilla pueden ser difíciles de diseñar y pueden interferir con la hibridación de la sonda con la secuencia objetivo.

30 También se han desarrollado ensayos para identificar la presencia de una estructura de horquilla usando dos sondas separadas, una que contiene una molécula informadora y la otra una molécula atenuadora (véase, Meringue et al., *Nucleic Acids Research*, 22: 920-928 (1994)). En estos ensayos, la señal de fluorescencia de la molécula informadora disminuye cuando se hibrida con la secuencia objetivo debido a que la molécula atenuadora se pone en proximidad con la molécula informadora.

35 Una aplicación particularmente importante para sondas incluyendo un par de moléculas informadora-atenuadora es su uso en reacciones de amplificación de ácido nucleico, tales como reacciones en cadena de polimerasa (PCR), para detectar la presencia y amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo. En general, las técnicas de amplificación de ácido nucleico han abierto nuevos enfoques amplios para pruebas genéticas y análisis de ADN (véase, por ejemplo, Arnheim et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 61: 131-156 (1992)). La PCR, en particular, se ha convertido en una herramienta de investigación de gran importancia con aplicaciones, por ejemplo, en clonación, análisis de expresión genética, secuenciación de ADN, mapeo genético y descubrimiento de fármacos (véase, Arnheim et al. citado anteriormente, Gilliland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87: 2725-2729 (1990), Bevan et al., *PCR Methods and Applications*, 1: 222-228 (1992), Green et al., *PCR Methods and Applications*, 1: 77-90 (1991), Blackwell et al., *Science*, 250: 1104-1110 (1990)).

40 Los métodos comúnmente utilizados para detectar productos de amplificación de ácido nucleico requieren que el producto amplificado se separe de los cebadores no reaccionados. Esto se logra típicamente ya sea mediante el uso de electroforesis en gel, que separa el producto de amplificación de los cebadores sobre la base de un diferencial de tamaño, o mediante la inmovilización del producto, permitiendo que el cebador libre sea eliminado por lavado. Sin embargo, se han descrito tres métodos para supervisar el proceso de amplificación sin separación previa de cebador. Todos ellos están basados en FRET, y ninguno de ellos detecta el producto amplificado directamente. En su lugar, los tres métodos detectan algún evento relacionado con la amplificación. Por esa razón, están acompañados de problemas de alto nivel y no son cuantitativos, como se discute a continuación.

45 Un método, descrito en Wang et al. (patente estadounidense No. 5.348.853, Wang et al., *Anal. Chem.*, 67: 1197-1203 (1995)), utiliza un sistema de transferencia de energía en el que se produce transferencia de energía entre dos fluoróforos en la sonda. En este método, la detección de la molécula amplificada tiene lugar en el recipiente de reacción de amplificación, sin necesidad de una etapa de separación. Este método, sin embargo, no detecta el producto amplificado, sino que detecta la disociación del cebador del oligonucleótido "absorbente de energía". Por lo tanto, este

método depende de la detección de una disminución de las emisiones; se debe utilizar una parte significativa del cebador marcado con el fin de lograr una diferencia confiable entre las señales antes y después de la reacción. El documento WO0186001 describe atenuadores oscuros para la transferencia de energía donante-aceptor.

5 Un segundo método que detecta un producto de amplificación sin separación previa del cebador y del producto es el ensayo de PCR de 5'-nucleasa (también denominado ensayo TaqMan^{MR}) (Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7276-7280 (1991), Lee et al., Nucleic Acids Res., 21: 3761-3766 (1993)). Este ensayo detecta la acumulación de un producto de PCR específico por hibridación y escisión de una sonda fluorogénica doblemente marcada (la sonda "TaqMan") durante la reacción de amplificación. La sonda fluorogénica consiste en un oligonucleótido marcado tanto con un colorante indicador fluorescente como con un colorante de atenuación. Durante la PCR, esta sonda se escinde por la actividad 5'-exonucleasa de la ADN polimerasa si, y sólo si, hibrida con el segmento que se está amplificando. La escisión de la sonda genera un aumento en la intensidad de fluorescencia del colorante indicador.

10 En el ensayo TaqMan, el donante y el atenuador están preferiblemente situados en los extremos 3' y 5' de la sonda, debido a que el requisito de que la hidrólisis 5'-3' se lleva a cabo entre el fluoróforo y el atenuador puede cumplirse sólo cuando estas dos fracciones no están demasiado próximas entre sí (Lyamichev et al., Science, 260: 778-783 (1993)). Este requisito es un serio inconveniente del ensayo ya que la eficiencia de la transferencia de energía disminuye con la sexta potencia inversa de la distancia entre el informador y el atenuador. Por lo tanto, si el atenuador no está lo suficientemente cerca del informador para lograr la atenuación más eficiente, las emisiones de fondo de la sonda no hibrida pueden ser bastante altas.

15 Todavía otro método para detectar productos de amplificación que se basa en el uso de transferencia de energía es el método de "sonda baliza" descrito por Tyagi et al. (Nature Biotech., 14: 303-309 (1996)) que es también el tema de las patentes estadounidenses Nos. 5.119.801 y 5.312.728 de Lizardi et al. Este método emplea sondas de hibridación de oligonucleótidos que pueden formar estructuras de horquilla. En un extremo de la sonda de hibridación (ya sea el extremo 5' o 3') hay un fluoróforo donante, y en el otro extremo, una fracción aceptora. En este método, la fracción aceptora es un atenuador, que absorbe energía del donante. Por lo tanto, cuando la baliza está en conformación abierta, la fluorescencia del fluoróforo donante es detectable, mientras que cuando la baliza está en conformación de horquilla (cerrada), la fluorescencia del fluoróforo donante se atenúa. Cuando se emplea en PCR, la sonda de baliza molecular, que hibrida con una de las cadenas del producto de PCR, está en "conformación abierta" y se detecta fluorescencia, mientras que la que permanece sin hibridar no fluoresce. Como resultado, la cantidad de fluorescencia aumentará a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR y, por lo tanto, se puede usar como una medida del progreso de la PCR.

20 Debido a que este método se basa en la hibridación de la sonda con una región plantilla entre las secuencias de cebadores, tiene una serie de problemas asociados con ella. Por ejemplo, es improbable que las sondas de baliza hibriden cuantitativamente con una cadena del producto de PCR bicatenario, especialmente cuando el producto de amplificación es mucho más largo que la sonda de baliza.

25 Limitaciones adicionales han impedido también la aplicación y el uso de sondas FET. En primer lugar, los diseños de sonda actualmente disponibles tienen un fondo de ruido fluorescente superior al deseado. En algunos casos esto se debe a la dificultad de purificar la sonda que debe purgarse rigurosamente de cualquier subproducto fluorescente espurio. Como resultado, las sondas deben someterse a al menos 2 niveles de purificación antes de que sean aceptables. Este factor de trabajo trae como resultado un costo de sonda muy alto, aproximadamente \$ 300- \$ 600 por sonda. Una segunda limitación fundamental es el ruido inherente de la propia sonda, que es el resultado de la geometría física de la sonda, que impone restricciones a la interacción fluoróforo y atenuador.

30 Más recientemente, se ha mostrado que los oligonucleótidos se unen de una manera específica de la secuencia al ADN dúplex para formar tríplex. El ácido nucleico monocatenario, principalmente el ARN, es la molécula objetivo para los oligonucleótidos que se usan para inhibir la expresión génica mediante un mecanismo "antisentido" (Uhlmann, E., et al., Chem Reviews (1990) 90: 543-584; van Der Krol, AR, et al., Biotechniques (1988) 6: 958-976). Los oligonucleótidos antisentido se postulan para ejercer un efecto sobre la expresión génica objetivo mediante la hibridación con una secuencia de ARN complementaria. En este modelo, el dúplex híbrido de ARN-oligonucleótido interfiere con uno o más aspectos del metabolismo de ARN incluyendo procesamiento, traducción y rotación metabólica. Se han utilizado oligonucleótidos modificados químicamente para mejorar su estabilidad a una nucleasa.

35 El ADN dúplex puede ser reconocido específicamente por oligómeros basados en una secuencia nucleomonómera reconocible. Los ejemplos de reglas de reconocimiento son descritos por Maher III, L. J. et al., Science (1989) 245: 725-730; Moser, H. E., et al., Science (1987) 238: 645-650; Beal, P. A., et al., Science (1992) 251: 1360-1363; Cooney, M., et al., Science (1988) 241: 456-459; y Hogan, M. E., et al., publicación EP No. 375408.

40 El direccionamiento específico de secuencias de ambas secuencias objetivo monocatenarias y dúplex tiene aplicaciones en diagnóstico, análisis y terapia. Bajo algunas circunstancias en las que se ha de efectuar dicha unión, es ventajoso estabilizar el dúplex o tríplex resultante durante largos períodos de tiempo.

45 El uso de complejos de triple hélice (o tríplex) como un medio para la inhibición de la expresión de la expresión génica objetivo se presentó previamente (solicitud internacional No. PCT/LTS89/05769). Se ha demostrado que las estructuras

de triple hélice interfieren con la expresión génica objetivo (solicitud internacional No. PCT/US91/09321, Young, SL et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1991) 88: 10023-10026), demostrando la factibilidad de este enfoque.

La solicitud de patente europea No. 92103712.3, Rahim, SG, et al (Antiviral Chem. Chem. (1992) 3: 293-297) y la solicitud internacional No. PCT/SE91/00653 describen nucleomonómeros de pirimidina que tienen un grupo insaturado en la posición 5. Entre los derivados descritos están los grupos 5-propinilo y 5-etinilo.

Se ha descrito la síntesis de nucleomonómeros que tienen grupos alquilo insaturados en la posición 5 de uracilo (DeClercq, E., et al., J. Med. Chem. (1983) 26: 661-666; Goodchild, J., et al., J. Med. Chem. (1983) 26: 1252-1257). Se han descrito oligómeros que contienen pirimidinas modificadas con 5-propinilo (Froehler, B.C., et al., Tetrahedron Letters (1992) 33: 5307-5310).

Se ha descrito la conversión de 5-propinil-2'-desoxiuridina, 5-butilil-2'-desoxiuridina y compuestos relacionados al 5'-trifosfato seguida de la incorporación del monómero en oligómeros mediante la polimerasa de E. coli (Valko, K. et al., J. Liquid Chromatog (1989) 12: 2103-2116, Valko, K. et al., J. Chromatog. (1990) 506: 35-44). Estos estudios se llevaron a cabo como una estructura para el análisis de actividad de análogos de nucleótidos que tienen una serie de sustituciones en la posición 5 del uracilo. La actividad de los análogos de nucleótidos como sustratos para la polimerasa de E. coli se examinó y correlacionó con características tales como la hidrofobicidad del monómero. No se presentó información sobre las propiedades de los oligómeros que contienen los análogos.

Los oligómeros que tienen mayor afinidad por secuencias de ácido nucleico objetivo complementarias tendrían propiedades mejoradas para aplicaciones de diagnóstico, aplicaciones terapéuticas y reactivos de investigación. Además, existe en la técnica la necesidad de sondas mejoradas para detectar ácidos nucleicos (por ejemplo, productos de amplificación) en forma rápida, sensible, confiable y cuantitativa. Las sondas ideales darían lugar a una mínima señal de fondo y serían preparadas fácil y económicamente. De manera bastante sorprendente, la presente invención proporciona tales sondas. Las sondas FET y FRET oligoméricas de la presente invención tienen afinidad de unión mejorada para secuencias objetivo bicatenarias y/o monocatenarias.

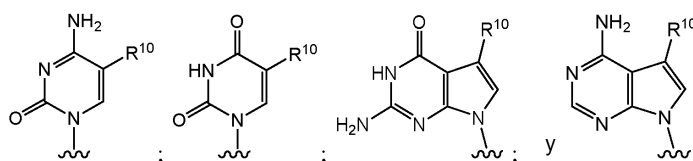
Breve descripción de las figuras

La FIGURA 1 es un esquema que muestra un ejemplo de preparación de un soporte sólido de la invención con la inclusión de una fracción estabilizante.

La FIGURA 2 es un esquema que muestra un ejemplo de preparación de un soporte sólido de la invención sometido a derivación con fracciones funcionales.

Sumario de la invención

De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona el uso de una sonda para la detección de un polimorfismo en secuencias objetivo de ácido nucleico, comprendiendo la sonda un oligómero de ácido nucleico que comprende una base que tiene una fórmula seleccionada entre:



en donde R¹⁰ es una fracción alquilo seleccionada del grupo que consiste en: etinilo, 1-propinilo, 1-butililo, 1-pentinilo, 1,3-pentadiinilo, fenil-etinilo, piridin-etinilo, pirimidin-etinilo, triazina-etinilo, tiofen-etinilo, tiazol-etinilo e imidazol-etinilo; y

un atenuador de energía de fluorescencia que comprende:

a) al menos tres residuos, cada uno seleccionado independientemente de arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido, en donde el primer residuo está unido covalentemente al segundo residuo a través de un primer enlace diazo exocíclico y en donde el primer o el segundo residuo está unido covalentemente al tercer residuo a través de un segundo enlace diazo; o

b) al menos dos fracciones, cada uno independientemente seleccionado de arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido, en donde el primer residuo está unido covalentemente al segundo residuo a través de un enlace diazo exocíclico y al menos uno de los residuos es un miembro seleccionado a partir de arilo policíclico sustituido o no sustituido y grupos heteroarilo policíclicos sustituidos o no sustituidos; en donde los grupos arilo y heteroarilo tienen de 1 a 3 anillos; y

en donde dicho atenuador está unido en el extremo 3' o en el extremo 5' de dicho oligómero de ácido nucleico;

en donde el oligómero contiene de 8 a 30 nucleomonómeros.

5 En la presente memoria se describe una nueva clase de fosforamiditas y soportes sólidos para la síntesis de oligómeros de ácido nucleico modificados y sondas de ácidos nucleicos (por ejemplo, oligómeros, por ejemplo, oligonucleótidos) de un formato convenientemente sintetizado usando las fosforamiditas o sobre los nuevos soportes. Ejemplos de soportes sólidos incluyen al menos un atenuador unido a través de un enlazador al soporte sólido. Aquí se describe un soporte sólido o una fracción con inclusión de fosforamidita que estabiliza un agregado dúplex, tríplex o de orden superior (por ejemplo, hibridación) del oligómero con un ácido nucleico objetivo. Los ejemplos de componentes del soporte sólido (y los oligómeros) incluyen fracciones que estabilizan la hibridación de ácidos nucleicos, por ejemplo, intercaladores, fracciones de unión al surco menor, bases modificadas con una fracción estabilizante (por ejemplo, fracciones alquínilo y fracciones fluoroalquilo), y fracciones estabilizantes conformacionales, tales como las descritas en la publicación de la solicitud de patente estadounidense No. 2007/0059752. Los ejemplos de oligómeros sintetizados sobre los soportes sólidos o usando las fosforamiditas incluyen un agente atenuador y una fracción estabilizante. Varios oligómeros también incluyen un fluoróforo y, opcionalmente, uno o más fracciones detectables adicionales, una fracción estabilizadora o atenuadora.

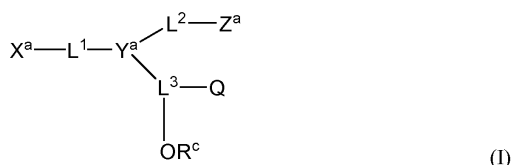
15 En la presente invención se describe un atenuador unido al soporte sólido, la fosforamidita o el oligómero es un miembro de una clase de atenuadores en los que un primer arilo sustituido o no sustituido o la primera fracción heteroarilo sustituida o no sustituida está unida a un segundo arilo sustituido o no sustituido o a una segunda fracción heteroarilo sustituida o no sustituida a través de un enlace diazo exocíclico. En un ejemplo de realización, los atenuadores son esencialmente no fluorescentes ("atenuadores oscuros") y son opcionalmente miembros de una clase de compuestos denominados "Black Hole Quenchers^{MR}" ("BHQ"), que se describen en la patente estadounidense No. 7.109.301, de propiedad común. Los soportes sólidos, fosforamiditas y oligómeros con inclusión de estos atenuadores también pueden unirse a uno o más componentes conjugados, generalmente conjugados covalentemente con la base o azúcar de la fosforamidita de ácido nucleico, soporte sólido u oligómero a través de un enlazador. Un ejemplo de componente conjugado es un ligante de surco menor, un intercalador, una fracción de estabilización de hibridación de fluorocarbono, una fracción estabilizadora de hibridación de alquínilo (colectivamente, "fracciones estabilizadoras"), un fluoróforo y un atenuador de energía fluorescente.

25 En la presente memoria se describen soportes sólidos y fosforamiditas apropiados para sintetizar sondas oligoméricas de ácido nucleico que incluyen una fracción estabilizante, un atenuador y/o un fluoróforo. También se proporcionan sondas de un formato fabricado convenientemente sobre tal soporte sólido o usando tal fosforamidita. Los ejemplos de sondas de ácido nucleico oligoméricas de la invención se caracterizan por la interacción entre un atenuador y un fluoróforo, conjugados cada uno con el oligómero con el fin de minimizar la fluorescencia de la sonda en ausencia de su interacción con un objetivo (por ejemplo, hibridación con un ácido nucleico al menos parcialmente complementario a la secuencia objetivo).

30 En muchas sondas de ácido nucleico marcadas doblemente, la interacción entre el fluoróforo y el atenuador se produce utilizando una secuencia de sonda de ácido nucleico que forma una estructura secundaria (por ejemplo, horquilla, bucle, etc.). Se requiere que una sonda adopte una estructura secundaria que complica significativamente el diseño de la sonda y restringe en gran medida las secuencias de ácido nucleico que pueden usarse como componentes de las sondas. Por el contrario, los ejemplos de sondas oligoméricas de ácido nucleico de la invención facilitan la interacción entre el atenuador y el fluoróforo sin requerir la formación concomitante de una estructura secundaria de ácido nucleico, permitiendo así que se use una mayor diversidad de secuencias de ácido nucleico como componentes de sondas fluorescentes. En diversas realizaciones, estas sondas incluyen uno o más atenuadores oscuros (por ejemplo, Black Hole Quencher) como se define aquí.

35 Además, al variar el número y la identidad de los miembros del sistema diazo-(hetero)arilo conjugado de los atenuadores usados en la presente invención, las propiedades espectrales (por ejemplo, la absorbancia) del atenuador pueden "ajustarse" para que coincidan las características espectrales (por ejemplo, la emisión) de uno o más fluoróforos. Esta característica proporciona sondas oligoméricas de la invención seleccionables para tener una amplia gama de máximos de absorbancia. Por consiguiente, las sondas oligoméricas de la invención son adecuadas para su uso en aplicaciones de multiplexación. Además, en la presente memoria se describen soportes sólidos y sondas útiles en aplicaciones de multiplexación que utilizan uno o más fluoróforos distintos en combinación con uno o más atenuadores, ampliando de este modo las opciones de pares donador-aceptor que pueden incorporarse en las sondas oligoméricas. Por consiguiente, al menos 2, al menos 3, al menos 4 sondas oligoméricas, cada una de las cuales está incluye un atenuador que tiene una propiedad espectral diferenciable de la misma propiedad del atenuador en las otras sondas (por ejemplo, longitud de onda de emisión).

40 En la presente invención se describe un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula I:



55 en donde X^a es una fracción estabilizante seleccionada de fluoroalquilo, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo

sustituido o no sustituido. En diversas realizaciones, X^a es un aglutinante del surco menor o un agente de intercalación.

Los símbolos L¹, L², L³ y L⁴ representan enlazadores. Los enlazadores se seleccionan independientemente entre un enlace covalente sencillo, alquilo sustituido o no sustituido y fracciones heteroalquilo sustituidas o no sustituidas. Y^a es un miembro seleccionado de CR^a, y N en el que R^a es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. R^a es opcionalmente un enlazador de un componente funcional.

El símbolo Z^a representa un soporte sólido, OR^b o NR^bR^{b'} en el que R^b y R^{b'} son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. El símbolo R^c representa un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y un enlazador que contiene fósforo unido covalentemente a un ácido nucleico. En un ejemplo de realización, R^c es un grupo protector de ácido nucleico, por ejemplo, dimetoxitritilo ("DMT"). En otra realización, R^c es un enlazador de fosfodiéster a otra fracción de ácido nucleico, que opcionalmente se somete a derivación con uno o más componentes funcionales.

Los compuestos descritos aquí incluyen un atenuador de energía de fluorescencia. El atenuador está representado por el símbolo Q y, en ejemplos de realizaciones, incluye una o más de las siguientes características estructurales:

(a) al menos tres residuos, cada uno seleccionado independientemente de arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido, en donde el primer residuo está unido covalentemente al segundo residuo a través de un primer enlace diazo exocíclico. El primer o el segundo residuo está unido covalentemente a un tercer residuo a través de un segundo enlace diazo; y

(b) al menos dos residuos, cada uno independientemente seleccionado de arilo sustituido o no sustituido, y heteroarilo sustituido o no sustituido. El primer residuo está unido covalentemente al segundo residuo a través de un enlace diazo exocíclico y al menos uno de los residuos es un miembro seleccionado entre arilo policíclico sustituido o no sustituido y grupos heteroarilo policíclicos sustituidos o no sustituidos.

Los atenuadores están unidos al resto del compuesto a través de un enlazador. El atenuador y el enlazador se acoplan por reacción de un grupo funcional reactivo sobre un atenuador precursor y un grupo funcional reactivo sobre el enlazador. Los dos grupos funcionales reactivos son de reactividad complementaria y después de la reacción forman un fragmento de enlace tal como se define en la presente memoria.

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

Descripción detallada de la invención

Abreviaturas

"BHQ", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a atenuadores oscuros que incluyen uno o más enlaces diazo y específicamente a "Black Hole Quenchers^{MR}". Los ejemplos de BHQ de uso en la presente invención se describen en la patente de Estados Unidos No. "FET", como se usa en la presente memoria, se refiere a "transferencia de energía de fluorescencia". "FRET", como se usa en la presente invención, se refiere a "transferencia de energía de resonancia de fluorescencia". Estos términos se usan aquí para referirse tanto a procesos de transferencia de energía radiactiva como no radiactiva. Por ejemplo, los procesos en los que se emite un fotón y los que implican transferencia de electrones de largo alcance están incluidos dentro de estos términos. A lo largo de esta memoria descriptiva, ambos fenómenos se resumen bajo el término general "transferencia de energía donador-aceptor". "SNP" se refiere a "polimorfismo de nucleótido único".

Definiciones

Las siguientes definiciones son ampliamente aplicables a cada una de las realizaciones de la presente invención expuestas a continuación. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria general tienen generalmente el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica al que pertenece esta invención. Generalmente, la nomenclatura utilizada aquí y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química de ácidos nucleicos e hibridación descritos a continuación son los bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Se usan técnicas estándar para síntesis de ácidos nucleicos y péptidos. Las técnicas y procedimientos biológicos moleculares se llevan a cabo generalmente de acuerdo con métodos convencionales en la técnica y varias referencias generales (véase generalmente Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, que se incorpora aquí como referencia). La nomenclatura utilizada en este documento y los procedimientos de laboratorio en química analítica y síntesis orgánica son bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica. Las técnicas estándar, o modificaciones de las mismas, se utilizan para síntesis químicas y análisis químicos.

El término "alquilo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical hidrocarbonado de cadena lineal o ramificada, o cíclico, o combinación de los mismos, que puede ser completamente saturado, mono o poliinsaturado y pueden incluir radicales mono, di, tri y tetravalentes, teniendo el

número de átomos de carbono designado (es decir, C₁-C₁₀ significa uno a diez carbonos). Ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, pero no se limitan a, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo y similares. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más dobles enlaces o triples enlaces. Ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero no se limitan a, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentenilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butenilo, y los homólogos e isómeros superiores. El término "alquilo", a menos que se indique lo contrario, también incluye opcionalmente los derivados de alquilo definidos más detalladamente a continuación, tales como "heteroalquilo". Los grupos alquilo que están limitados a grupos hidrocarbonados se denominan "homoalquilo". El término "alquilo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a fracciones alquilo, alquenilo y alquinilo, cada una de las cuales pueden ser especies mono, di o polivalentes según sea apropiado para satisfacer los requisitos de valencia. Los grupos alquilo están opcionalmente sustituidos, por ejemplo, con uno o más grupos denominados aquí como un "sustituyente del grupo alquilo".

El término "alquilenilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical divalente derivado de una fracción alquilo, como se ejemplifica, pero no se limita, por -CH₂CH₂CH₂CH₂-, e incluye además los grupos descritos a continuación como "heteroalquilenilo". Típicamente, un grupo alquilo (o alquilenilo) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, siendo preferidos en la presente invención aquellos grupos que tienen 10 o menos átomos de carbono. Para los grupos enlazantes alquilenilo y heteroalquilenilo, es opcional que no esté implicada ninguna orientación del grupo enlazador por la dirección en la que se escribe la fórmula del grupo enlazador. Por ejemplo, la fórmula -C(O)₂R' representa -C(O)₂R'- y, opcionalmente, -R'C(O)₂-. Un "alquilo inferior" o "alquilenilo inferior" es un grupo alquilo o alquilenilo de cadena más corta, que generalmente tiene ocho, siete, seis, cinco o menos átomos de carbono.

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

El término "heteroalquilo", por sí mismo o en combinación con otro término, significa, a menos que se indique lo contrario, un radical alquilo de cadena lineal o ramificada estable o cíclico que consiste en el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en B, O, N, Si y S, donde el heteroátomo puede estar opcionalmente oxidado y el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El o los heteroátomos pueden colocarse en cualquier posición interna del grupo heteroalquilo o en un extremo de la cadena, por ejemplo, la posición a través de la cual el grupo alquilo está unido al resto de la molécula. Ejemplos de grupos "heteroalquilo" incluyen, pero sin limitación, -CH₂-CH₂-O-CH₃, -CH₂-CH₂-NH-CH₃, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃, -CH₂-S-CH₂-CH₃, -CH₂-CH₂-, -S(O)-CH₃, -CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃, -CH=CH-O-CH₃, -Si(CH₃)₃, -CH₂-CH=N-OCH₃, y -CH=CH-N(CH₃)-CH₃. Dos o más heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo, -CH₂-NH-OCH₃ y -CH₂-O-Si(CH₃)₃. De forma similar, el término "heteroalquilenilo" por sí mismo o como parte de otro sustituyente se refiere a un radical heteroalquilo divalente sustituido o no sustituido, como se ejemplifica, pero no se limita a, -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- y -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. Para los grupos heteroalquilenilo, los heteroátomos también pueden ocupar uno o ambos de los extremos de la cadena (por ejemplo, alquilenoxi, alquilenidoxi, alquilenamino, alquilenidamino, y similares).

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

Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a menos que se indique lo contrario, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Adicionalmente, términos tales como "haloalquilo", significa que incluyen monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, el término "halo-alquilo (C₁-C₄)" pretende incluir, pero no se limita a, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo y similares.

El término "arilo" significa, a menos que se indique lo contrario, un sustituyente poliinsaturado, aromático, que puede ser un solo anillo o múltiples anillos (preferiblemente de 1 a 3 anillos, uno o más de los cuales es opcionalmente un cicloalquilo o heterocicloalquilo), que están fusionados entre sí o enlazados covalentemente. El término "heteroarilo" se refiere a grupos arilo (o anillos) que contienen de uno a cuatro heteroátomos seleccionados entre N, O y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados y el átomo o átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos arilo y heteroarilo anotados anteriormente se seleccionan del grupo de "sustituyentes del grupo arilo" que se describen a continuación.

Por brevedad, el término "arilo" cuando se usa en combinación con otros términos (por ejemplo, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye opcionalmente anillos homoarilo y heteroarilo como se ha definido anteriormente. Por lo tanto, el término arilalquilo incluye opcionalmente aquellos radicales en los que un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (por ejemplo, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similares) incluyendo aquellos grupos alquilo en los que un átomo de carbono (por ejemplo, un grupo metileno) ha sido sustituido, por ejemplo, por un átomo de oxígeno (por ejemplo, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo y similares).

Los sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (incluidos aquellos grupos a los que se hace referencia frecuentemente como alquilenilo, alquenilo, heteroalquilenilo, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo y heterocicloalquenilo) se denominan genéricamente como "sustituyentes del grupo alquilo" y pueden ser uno o más de una variedad de grupos seleccionados entre, pero sin limitarse a: $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-halógeno$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR''C(O)NR'R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$ en un número que va de cero a $(2m' + 1)$, donde m' es el número total de átomos de carbono en tal radical. R' , R'' , R''' y R'''' preferiblemente cada uno independientemente se refieren a hidrógeno, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, por ejemplo, arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo, alcoxi o alquilo sustituido o no sustituido, grupos tioalcoxi o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como grupos R' , R'' , R''' y R'''' cuando está presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, se pretende que $NR'R''$ incluya, pero no se limite a, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la discusión anterior de sustituyentes, el experto en la técnica comprenderá que el término "alquilo" incluye grupos con átomos de carbono unidos a grupos distintos de hidrógeno, tales como haloalquilo (por ejemplo, $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$) y acilo (por ejemplo, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$, y similares). Los ejemplos de sustituyentes del grupo alquilo incluyen aquellos grupos denominados aquí como "grupos funcionales reactivos" y "fragmentos de enlace". En diversas realizaciones, el sustituyente del grupo alquilo es una fracción que contiene fósforo, por ejemplo, un fosfodiéster o una modificación de fosfodiéster tal como las descritas en la presente memoria.

Similar a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, los sustituyentes para los grupos arilo y heteroarilo se denominan genéricamente como "sustituyentes del grupo arilo". Los ejemplos de sustituyentes se seleccionan de la lista de sustituyentes del grupo alquilo y otros, por ejemplo: halógeno, $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-SiR'R''R'''$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R''$, $-OC(O)NR'R''$, $-NR''C(O)R'$, $-NR''C(O)NR'R'''$, $-NR''C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-NR-C(NR'R''R''')=NR''''$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$, $-R'$, $-N_3$, $-CH(Ph)_2$, fluoro-alcoxi (C_1-C_4), y fluoroalquilo C_1-C_4 , en un número que va desde cero hasta el número total de valencias abiertas en el sistema de anillos aromáticos; y donde R' , R'' , R''' y R'''' se seleccionan preferiblemente independientemente entre hidrógeno, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente como son cada uno de R' , R'' , R''' y R'''' cuando más de uno de estos grupos está presente.

Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente con un sustituyente de la fórmula $-TC(O)-(CRR')_q-U-$, en donde T y U son independientemente $-NR-$, $-O-$, $-CRR'-$ o un enlace sencillo, y q es un número entero de 0 a 3. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden estar sustituidos opcionalmente con un sustituyente de la fórmula $-A-(CH_2)_r-B-$, donde A y B son independientemente $-CRR'-$, $-O-$, $-NR-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-S(O)_2NR'-$ o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado puede ser sustituido opcionalmente por un doble enlace. Alternativamente, dos de los sustituyentes en los átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden sustituirse opcionalmente con un sustituyente de la fórmula $-(CRR')_s-X-(CR'R''')_d-$, donde s y d son independientemente enteros de 0 a 3 y X es $-O-$, $-NR'-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, o $-S(O)_2NR'-$. Los sustituyentes R , R' , R'' y R''' se seleccionan preferiblemente independientemente entre hidrógeno o alquilo (C_1-C_{16}) sustituido o no sustituido. Ejemplos de sustituyentes de grupos arilo incluyen aquellos grupos denominados aquí como "grupos funcionales reactivos" y "fragmentos de enlace".

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

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

El término "sal(es)" incluye sales de los compuestos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en el presente documento. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funciones relativamente ácidas, se pueden obtener sales de adición de bases poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, bien sea pura o en un disolvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición de bases incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando los compuestos de la presente invención contienen funciones relativamente básicas, se pueden obtener sales de adición de ácido poniendo en

5 contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, ya sea puro o en un disolvente inerte adecuado. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen los derivados de ácidos inorgánicos tales como los ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, hidrídrico o fosforoso y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos tales como acético, propiónico, isobutírico, butírico, maleico, málico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares y sales de ácidos orgánicos tales como los ácidos glucurónico o galacturónico y similares (véase, por ejemplo, Berge et al., Journal of Pharmaceutical Science, 66: 1-19 (1977)). Ciertos compuestos específicos de la presente invención contienen tanto funciones básicas como ácidas que permiten que los compuestos sean convertidos tanto en sales de adición básica como ácida. También se incluyen los hidratos de las sales.

15 Tal como se usa en la presente memoria, "ácido nucleico" significa nucleósidos, nucleótidos y oligonucleótidos, por ejemplo, ADN, ARN, ya sea monocatenario, bicatenario, o en motivos de hibridación más altamente agregados, y cualquier modificación química de los mismos. Las modificaciones incluyen, pero no se limitan a, aquellas que proporcionan grupos químicos que incorporan carga adicional, capacidad de polarización, enlace de hidrógeno, interacción electrostática y fluxionalidad a las bases de ligando de ácido nucleico o al ligando de ácido nucleico en conjunto. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a, ácidos peptidonucleicos (PNA), modificaciones del grupo fosfodiéster (por ejemplo, fosforotioatos, metilfosfonatos), modificaciones de azúcar, modificaciones de pirimidina en posición 5, modificaciones de purina en posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo; modificaciones en la cadena principal, metilaciones (por ejemplo, 5' y/o 3'), combinaciones inusuales de apareamiento de bases tales como las isobases, isocitidina e isoguanidina y similares. Los ácidos nucleicos también pueden incluir bases no naturales. Un "nucleomonómero" se refiere a una unidad única de ácido nucleico, que puede ser un nucleósido, un nucleótido o una modificación de los mismos.

25 "Base", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye las fracciones que contienen no sólo los heterociclos de purina y pirimidina conocidos y las pirimidinas de la invención, sino también análogos de heterociclo y tautómeros de los mismos. Las purinas incluyen adenina, guanina y xantina y ejemplos de análogos de purina incluyen 8-oxo-N⁶-metiladenina y 7-deazaxantina. Las pirimidinas incluyen uracilo y citosina y sus análogos tales como 5-metilcitosina, 5-metiluracilo y 4,4-etanocitosina. Este término también abarca bases no naturales. Las bases no naturales representativas incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracil, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, nitroindol y 2,6-diaminopurina.

40 En diversas realizaciones, los compuestos de la invención incluyen pirimidinas que forman un derivado en la posición 5. Los derivados son modificaciones de 1-alquenil-, 1-alquinil-, y 1-alquinil-heteroaromático. "1-Alquenil" significa un grupo acíclico olefinicamente insaturado (que contiene doble enlace). "1-Alquinil" significa un grupo acíclico acetilénicamente insaturado (que contiene un triple enlace)

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

55 "Modificación de azúcar", tal como se utiliza en la presente memoria, significa cualquier fracción pentosa o hexosa diferente de 2'-desoxirribosa. Los azúcares modificados incluyen, por ejemplo, pentosas que incluyen las funciones D-ribosa, 2'-O-alquilo, 2'-amino, 2'-halo, hexosas y similares. Los ejemplos de modificaciones del azúcar incluyen aquellos azúcares en los que uno o más de los grupos hidroxilo se reemplaza con un halógeno, un heteroátomo, una fracción alquilo, o incluyen funciones tales como éteres, ésteres y similares. La fracción pentosa se puede reemplazar por una hexosa o una estructura alternativa tal como un anillo ciclopentano, un anillo morfolino de 6 miembros y similares. También se pretende que los nucleósidos como se definen en la presente invención incluyan una base unida a un

aminoácido y/o un análogo de aminoácido que tenga un grupo carboxilo libre y/o un grupo amino libre y/o formas protegidas de los mismos. También se incluyen los azúcares que tienen una estereoquímica distinta a la de una D-ribosa.

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

10 La modificación de ácido nucleico también incluye modificaciones 3' y 5', tales como una protección con un atenuador (por ejemplo, un BHQ), un fluoróforo, un intercalador, un aglutinante del surco menor, un fluorocarbono, un grupo estabilizante conformacionalmente asistido u otra fracción. En diversas realizaciones, el grupo protector se conjuga covalentemente con el oligómero a través de un grupo enlazador.

15 Los oligómeros se definen aquí como dos o más nucleomonómeros acoplados covalentemente entre sí mediante un fosfodiéster o una fracción fosfodiéster modificada. Por lo tanto, un oligómero puede tener tan sólo dos nucleomonómeros (un dímero), y no tiene esencialmente ningún límite superior de nucleomonómeros. Los oligómeros pueden ser de unión competente y, por lo tanto, pueden aparear bases con secuencias similares de ácido nucleico de monocatenarias o bicatenarias (o agregación de orden superior). Los oligómeros son también útiles como sintones para oligómeros más largos como se describe en la presente memoria. Los oligómeros también pueden contener sitios con una sola base y pseudonucleósidos. En diversas realizaciones, los oligómeros de la invención incluyen otras funciones. Las fracciones que añaden otras funciones a los oligómeros se discuten a continuación. En la descripción de ciertas realizaciones, el término "oligómero" se usa indistintamente para referirse a la secuencia de ácido nucleico del oligómero, proporcionando la secuencia de ácido nucleico modificada una sonda o proporcionando la secuencia de ácido nucleico modificada un soporte sólido de la invención.

20 "Péptido" se refiere a un oligómero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen entre sí a través de enlaces amida, denominados alternativamente polipéptido. Cuando los aminoácidos son α -aminoácidos, se puede usar tanto el isómero óptico L como el isómero óptico D. Adicionalmente, también se pueden incluir aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homoarginina. También se pueden usar aminoácidos comúnmente encontrados que no están codificados por genes en la presente invención. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser el isómero D o L. Se prefieren generalmente los isómeros L. Además, otros peptidomiméticos también son útiles en la presente invención. Para una revisión general, véase, Spatola, A. F., en CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINES, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983).

25 Un "soporte sólido" es un material sólido que tiene una superficie para la fijación de moléculas, compuestos, células u otras entidades, o a cuya superficie se unen tales especies. La superficie de un soporte sólido puede ser plana o bien configurada. Un soporte sólido puede ser poroso o no poroso. Un soporte sólido puede ser un chip o un arreglo que comprende una superficie, y que puede comprender vidrio, silicio, nailon, polímeros, plásticos, cerámicas o metales. Un soporte sólido puede ser también una membrana, tal como una membrana de nailon, nitrocelulosa o polimérica, o una placa o plato y puede estar constituida por vidrio, cerámica, metales o plásticos, tales como, por ejemplo, una placa de 96 pozos elaborada, por ejemplo, poliestireno, polipropileno, policarbonato o polialómero. Un soporte sólido también puede ser una perla o partícula de cualquier forma, y es preferiblemente esférico o casi esférico, y preferiblemente una perla o partícula tiene un diámetro o anchura máxima de 1 milímetro o menos, más preferiblemente entre 0,1 a 100 micras. Estas partículas o perlas pueden estar constituidas por cualquier material adecuado, por ejemplo, vidrio o cerámica, y/o uno o más polímeros, tales como, por ejemplo, nailon, politetrafluoroetileno, TEFLON®, poliestireno, poliacrilamida, sefarosa, agarosa, celulosa, derivados de celulosa o dextrano, y/o pueden comprender metales, particularmente metales paramagnéticos, tales como hierro.

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

35 Un "intercalador" se refiere a una fracción aromática o heteroaromática plana que es capaz de inserción y apilamiento parcial entre nucleobases adyacentes. Estas fracciones pueden ser moléculas pequeñas o parte de una entidad mayor, tal como una proteína. Ejemplos no limitativos de intercaladores incluyen acridinas, antracenos, antraciclina, antraciclina, azul de metileno, indol, antraquinona, quinolina, isoquinolina, dihidroquinonas, tetraciclina, psoralenos, cumarinas, haluros de etidio, homodímeros de etidio, amarillo de oxazol homodimérico (YOYO), naranja de tiazol

(TOTO), dinemicinas, 1,10-fenantrolina-cobre, calicheamicina, porfirinas, distamicinas, netropsinas y viológenos.

Un "aglutinante del surco menor" se refiere a una fracción que típicamente tiene un peso molecular de aproximadamente 150 a aproximadamente 2000 Daltons. La fracción se une de una manera no intercalada a la surco menor del ADN, ARN o sus híbridos bicatenarios (o agregación de orden superior), preferiblemente, con una constante de asociación mayor a aproximadamente 10^3 M^{-1} . Los compuestos de unión a la surco menor tienen estructuras químicas muy diversas, sin embargo, los ejemplos de ligandos de la surco menor tienen una estructura tridimensional de forma de media luna. Los ejemplos incluyen ciertos compuestos naturales tales como netropsina, distamicina y lexitropsina, mitramicina, cromomicina A₃, olivomicina, antramicina, sibirromicina, así como otros antibióticos y derivados sintéticos relacionados. Ciertos compuestos heterocíclicos de amonio bisquaternario, diarilamidinas tales como pentamidina, estilbamidina y berenilo, CC-1065 y polipéptidos de pirroloindol e indol relacionados, Hoechst 33258, 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) así como una serie de oligopéptidos que consisten en aminoácidos naturales o sintéticos son compuestos del aglutinante del surco menor. Los ejemplos de aglutinante del surco menor se describen en la patente estadounidense No. 6.084.102. Este tipo de unión se puede detectar por métodos espectrofotométricos bien establecidos, tales como espectroscopia ultravioleta (UV) y resonancia magnética nuclear (RMN) y también por electroforesis en gel. Los cambios en los espectros UV tras la unión de una molécula aglutinante del surco menor, y espectroscopia RMN que utilizan el efecto "Overhauser nuclear" (NOSEY) son técnicas particularmente bien conocidas y útiles para este propósito. La electroforesis en gel detecta la unión de un aglutinante del surco menor al ADN bicatenario o fragmento del mismo, debido a que después de dicha unión, cambia la movilidad del ADN bicatenario.

El aglutinante del surco menor se une típicamente al oligómero o soporte sólido a través de un enlazador que comprende una cadena de aproximadamente 20, aproximadamente 15 átomos, aproximadamente 10 o aproximadamente 5 átomos.

Las fracciones o agentes de intercalación se distinguen fácilmente de los ligandos de surco menor sobre la base de que los agentes de intercalación son moléculas aromáticas planas (preferiblemente policíclicas) frente a la "forma de media luna" o geometría análoga de los ligandos de surco menor. Una distinción experimental también puede hacerse por espectroscopia de RMN utilizando el efecto de Overhauser Nuclear.

El término "enlazador" o "L", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un enlace covalente sencillo ("orden cero") o a una serie de enlaces covalentes estables que incorporan 1-30 átomos distintos de hidrógeno seleccionados del grupo que consiste en C, N, O, S, Si y P que se unen covalentemente a los componentes de los compuestos de la invención, por ejemplo, enlazando un soporte sólido con un agente estabilizante, un atenuador, un nucleomonómero u oligómero de la invención; o enlazando un agente atenuador o fracción estabilizante con una base en un amidita de la invención. Los ejemplos de enlazadores incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 átomos distintos de hidrógeno. A menos que se especifique lo contrario, los términos "enlazamiento", "enlazado", "ligado", "conjugación" "conjugado" y términos análogos relacionados con la unión se refieren a técnicas que utilizan las especies que incorporan enlazadores. Los ejemplos de enlazadores incluyen un fragmento de enlace tal como se define aquí. Además, un enlazador se usa para unir un oligómero u oligómero naciente (durante la síntesis de oligómeros) al soporte sólido de la invención. De este modo, la invención proporciona también un oligómero de la invención unido covalentemente a un soporte sólido (por ejemplo, un soporte sólido de la invención) a través de un enlazador. Los soportes sólidos y oligómeros de la invención incluyen opcionalmente un enlazador escindible entre dos componentes del soporte sólido y el oligómero (por ejemplo, entre el oligómero y el soporte sólido, entre el fluoróforo y el oligómero, entre el atenuador y el oligómero, entre el fluoróforo y el atenuador, etc.). En varias realizaciones, el enlazador que une el soporte sólido al oligómero es un enlazador escindible.

Un "enlazador escindible" es un enlazador que tiene uno o más grupos escindibles que pueden romperse como resultado de una reacción o condición. Un ejemplo de enlazador escindible está situado dentro de L² de la Fórmula I, que sirve para permitir la separación conveniente de un oligómero sintetizado de la invención del soporte sólido sobre el cual se sintetizó. El término "grupo escindible" se refiere a una fracción que permite la liberación de un componente del soporte sólido u oligómero de la invención mediante la escisión de un enlazador de unión de la fracción liberada al resto del conjugado. Los ejemplos de mecanismos de escisión de uso tanto en la preparación como en el uso de los oligómeros y soportes sólidos de la invención están mediados enzimáticamente o bien químicamente.

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

Un ejemplo de un grupo escindible es uno escindible por un reactivo, por ejemplo, hidróxido de sodio, amoníaco u otra amina. En varias realizaciones, el enlazador escindible se escinde fácilmente a temperatura ambiente o bajo condiciones de microondas. En una realización, el enlazador escindible es L² y se escinde por tratamiento con una

amina, por ejemplo, amoniaco o una amina esencialmente anhidra en un disolvente orgánico.

- Un "fragmento de enlace", es una fracción que se enlaza a dos o más componentes (por ejemplo, un componente funcional, un soporte sólido o un enlazador). Este término se refiere a un enlace covalente que se forma por reacción de compañeros de reacción complementarios, cada uno de los cuales tiene un grupo funcional reactivo de reactividad complementario a la reactividad de su compañero. Los fragmentos de enlace en el soporte sólido y los oligómeros de la invención se seleccionan independientemente. Los ejemplos de fragmentos de enlace incluyen, pero no se limitan a, S, SC(O)NH, HNC(O)S, SC(O)O, O, NH, NHC(O), (O)CNH y NHC(O)O, y OC(O)NH, CH₂S, (CH₂)O, CH₂CH₂O, CH₂CH₂S, (CH₂)_oO, (CH₂)_oS o (CH₂)_oY^x-PEG en donde, Y^x es S, NH, NHC(O), C(O)NH, NHC(O)O, OC(O)NH, u O y o es un número entero de 1 a 50. En cada uno de estos ejemplos de fragmentos de enlace, NH puede ser NR^t en donde R^t es alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido. Un fragmento de unión puede ser también un fosfodiéster o una modificación de fosfodiéster. En diversas realizaciones, el fragmento de enlace está entre un enlazador y un fluoróforo, un enlazador y un atenuador, un enlazador y una fracción estabilizante o un enlazador y un soporte sólido. En un ejemplo de realización ejemplar del soporte sólido y oligómeros de la invención, cada fragmento de enlace es un fragmento de enlace diferente.
- El término "fluoróforo", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una fracción que es inherentemente fluorescente o que demuestra un cambio en fluorescencia tras la unión a un compuesto biológico o un ion metálico o metabolismo mediante una enzima, es decir, fluorogénico. Los fluoróforos pueden estar sustituidos para alterar la solubilidad, las propiedades espectrales o las propiedades físicas del fluoróforo. Numerosos fluoróforos son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a cumarinas, acridinas, furanos, dansilos, cianinas, pirenos, naftalenos, benzofuranos, quinolinas, quinazolinonas, indoles, benzazoles, borapoliiazaindacenos, oxazinas y xantenos. Incluyendo estas últimas fluoresceínas, rodaminas, rosaminas y rodoles. Estos y otros fluoróforos de uso en la invención se describen en Haugland, MOLECULAR PROBES HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS. Otros fluoróforos útiles se describen en la publicación de las solicitudes de patente estadounidenses Nos. 2005/0214833 y 2005/0170363 de propiedad común y aquí a continuación.
- Tal como se usa en la presente memoria, "atenuador" se refiere a cualquier fracción modificadora de la fluorescencia de la invención que puede atenuar al menos parcialmente la luz emitida por un fluoróforo. Esta atenuación se denomina aquí "atenuación". Por lo tanto, en diversas realizaciones, la excitación del fluoróforo en presencia del grupo de atenuación conduce a una señal de emisión que es menos intensa de lo esperado, o incluso está completamente ausente. La atenuación se produce típicamente a través de transferencia de energía entre el fluoróforo excitado y el grupo de atenuación.
- El fluoróforo o atenuador puede incluir sustituyentes que mejoran una propiedad deseable, por ejemplo, solubilidad en agua, permeabilidad celular y absorción y emisión espectral, con relación al compuesto "original" en ausencia de tal sustituyente. Como tal, el fluoróforo o atenuador de uso en la invención incluye sustituyentes que mejoran una propiedad deseable con relación a un compuesto original idéntico en ausencia del sustituyente mejorador.
- Un "componente funcional" es un término genérico para una fracción en un compuesto de la invención que tiene una estructura seleccionada entre un atenuador, un fluoróforo y una fracción estabilizante (incluyendo, pero sin limitarse a, intercaladores, fracciones de unión a la surco menor, bases modificadas con una fracción estabilizante (por ejemplo, fracciones alquilo y fracciones fluoroalquilo), y fracciones estabilizantes conformacionales, tales como las descritas en la publicación de solicitud de patente estadounidense No. 2007/0059752 de propiedad común).
- La expresión "amplificación de polinucleótidos" incluye, pero no se limita a, métodos tales como reacción en cadena de polimerasa (PCR), amplificación de ligación (o reacción en cadena de ligasa, LCR) y métodos de amplificación basados en el uso de replicasa Q-beta. Estos métodos son bien conocidos y ampliamente practicados en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos 4.683.195 y 4.683.202 e Innis et al., 1990 (para PCR); y Wu et al., 1989a (para LCR). Los reactivos y el hardware para llevar a cabo la PCR están disponibles comercialmente. Los cebadores útiles para amplificar secuencias de una región génica particular son preferiblemente complementarios e hibridan específicamente con secuencias en la región objetivo o en sus regiones flanqueantes. Las secuencias de ácidos nucleicos generadas por amplificación pueden secuenciarse directamente. Alternativamente, la secuencia o secuencias amplificadas pueden clonarse antes del análisis de secuencia. Un método para la clonación directa y análisis de secuencias de segmentos genómicos amplificados enzimáticamente ha sido descrito por Scharf (1986). La presente invención proporciona cebadores oligoméricos de uso en procesos de amplificación. Además, se proporciona un soporte sólido de uso en la síntesis de tales cebadores. Además de cebadores, la invención proporciona sondas, y métodos de uso de tales sondas, para detectar, caracterizar y/o cuantificar los productos de amplificación: también se proporcionan soportes sólidos de uso para sintetizar estas sondas oligoméricas.
- El término "perturbaciones de apilamiento de bases" se refiere a cualquier evento que provoque una perturbación en el apilamiento de bases tal como, por ejemplo, un desajuste de pares de bases, una proteína que se une a su sitio de reconocimiento, o cualquier otra entidad que forme aductos oligonucleótidos. Varias sondas de la invención son capaces de detectar, caracterizar y/o cuantificar tales perturbaciones de apilamiento de bases. Además, la invención proporciona soportes sólidos de uso para sintetizar sondas capaces de detectar, caracterizar y/o cuantificar tales perturbaciones de apilamiento de bases.

El término "hibridado" se refiere a dos cadenas de ácido nucleico asociadas entre sí que pueden estar o no totalmente emparejadas en la base: generalmente, este término se refiere a una asociación que incluye un oligómero de la invención, ya sea unido a un soporte sólido o en solución.

5 El término "desnaturalización" se refiere al proceso mediante el cual las cadenas de dúplex de ácido nucleico (o agregación superior) ya no son más bases apareadas por enlaces de hidrógeno y se separan en moléculas de cadena sencilla. Los métodos de desnaturalización son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen desnaturalización térmica y desnaturalización alcalina. Este término se refiere generalmente a la disociación de una sonda de la invención de su ácido nucleico objetivo.

10 El término "desajustes" se refiere a bases de ácido nucleico dentro de dúplex de ácido nucleico hibridado (o agregación superior) que no son complementarias al 100%. Un desajuste incluye cualquier emparejamiento incorrecto entre las bases de dos bases situadas en cadenas complementarias de ácido nucleico que no son las parejas de bases de Watson-Crick, por ejemplo, A:T o G:C. La falta de homología total puede deberse a supresiones, inserciones, inversiones, sustituciones o mutaciones de cambio de marco. En diversas realizaciones, el oligómero de la invención incluye una falta de coincidencia con respecto a su ácido nucleico objetivo, preferiblemente permitiendo la detección y/o
15 caracterización y/o cuantificación de la desadaptación correspondiente en su objetivo. En ciertas realizaciones, el desajuste es un desajuste de un solo nucleótido.

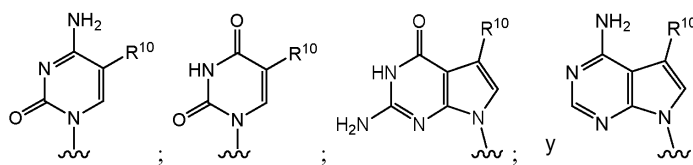
20 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polimorfismo" se refiere a una variación de secuencia en un gen, y "mutación" se refiere a una variación de secuencia en un gen que está asociado o se cree que está asociado con un fenotipo. El término "gen" se refiere a un segmento del genoma que codifica para una región de control de la proteína del producto funcional. Los marcadores polimórficos usados de acuerdo con la presente invención para la identificación del sujeto pueden estar localizados en regiones codificantes o no codificantes del genoma y diversas sondas de la invención están diseñadas para hibridar con regiones de ácido nucleico que incluyen estos marcadores. El término "sujeto", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un sujeto que proporciona una muestra de ensayo a partir de la cual se obtienen ácidos nucleicos objetivo con el propósito de realizar pruebas genéticas. Los oligómeros de la invención son útiles para detectar y/o caracterizar y/o cuantificar polimorfismos y mutaciones. Además, los soportes
25 sólidos de la invención son útiles para sintetizar oligómeros de uso para detectar y/o caracterizar y/o cuantificar polimorfismos y mutaciones.

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

35 El término "respuesta detectable" tal como se usa en la presente memoria se refiere a un cambio o una ocurrencia de una señal que es directa o indirectamente detectable ya sea por observación o por instrumentación y la presencia de, o preferiblemente, la magnitud de la cual es una función de la presencia de un compañero de unión objetivo para una sonda en la muestra de ensayo. Típicamente, la respuesta detectable es una respuesta óptica de un fluoróforo que da como resultado un cambio en los patrones de distribución de longitud de onda o intensidad de absorbancia o fluorescencia o un cambio en la dispersión de luz, rendimiento cuántico de fluorescencia, vida de la fluorescencia, polarización de fluorescencia, un cambio en la longitud de onda de excitación o emisión o una combinación de los parámetros anteriores. El cambio detectable en una propiedad espectral dada es generalmente un aumento o una
40 disminución. Sin embargo, también son útiles los cambios espectrales que resultan en un aumento de la intensidad de fluorescencia y/o un cambio en la longitud de onda de emisión o excitación de fluorescencia. El cambio en la fluorescencia en la unión a iones suele ser debido a cambios conformacionales o electrónicos en el indicador que pueden ocurrir en el estado excitado o en el estado basal del fluoróforo, debido a cambios en la densidad de electrones en el sitio de unión a iones debido a la atenuación de la fluorescencia por el ión metálico objetivo unido, o debido a cualquier combinación de estos u otros efectos. Alternativamente, la respuesta detectable es una ocurrencia de una señal en la que el fluoróforo es inherentemente fluorescente y no produce un cambio en la señal al unirse a un ion metálico o compuesto biológico. La presente invención proporciona sondas que proporcionan una respuesta detectable y soportes sólidos de uso para sintetizar dichas sondas.
45
50

Introducción

55 La presente invención proporciona el uso de una sonda para la detección de un polimorfismo en secuencias objetivo de ácido nucleico, comprendiendo la sonda un oligómero de ácido nucleico que comprende una base que tiene una fórmula seleccionada entre:



en donde R^{10} es una fracción alquínilo seleccionado del grupo que consiste en: etínilo, 1-propínilo, 1-butínilo, 1-pentínilo, 1,3-pentadiínilo, fenil-etínilo, piridin-etínilo, pirimidin-etínilo, triazin-etínilo, tiofen-etínilo, tiazol-etínilo e imidazol-etínilo; y un atenuador de energía de fluorescencia que comprende ya sea:

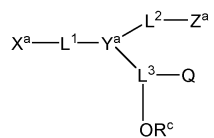
- 5 a) al menos tres residuos, cada uno seleccionado independientemente de arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido, en el que el primer residuo está unido covalentemente al segundo residuo a través de un primer enlace diazo exocíclico y en el que el primer o el segundo residuo está unido covalentemente al tercer residuo a través de un segundo enlace diazo; o
- 10 b) al menos dos residuos, cada uno independientemente seleccionado de arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido, en el que el primer residuo está unido covalentemente al segundo residuo a través de un enlace diazo exocíclico y al menos uno de los residuos es un miembro seleccionado a partir de arilo policíclico sustituido o no sustituido y grupos heteroarilo policíclicos sustituidos o no sustituidos; en donde los grupos arilo y heteroarilo tienen de 1 a 3 anillos; y
- en donde dicho atenuador está unido en el extremo 3' o en el extremo 5' de dicho oligómero de ácido nucleico;
- 15 en donde el oligómero contiene de 8 a 30 nucleomonómeros. En la presente memoria se describen fosforamiditas, soportes sólidos y oligómeros de un formato fácilmente preparado sobre estos soportes sólidos. Se estabilizan ejemplos de oligómeros con respecto a su capacidad para hibridarse con secuencias de ácido nucleico objetivo, formando dúplex o triplex. Varios oligómeros de la invención son adecuados para unirse a secuencias objetivo dúplex de ADN a través de un motivo de unión de triple hélice CT o GT.
- 20 En diversas realizaciones, los oligómeros aquí descritos son resistentes a la degradación por nucleasa en relación con un oligodesoxinucleótido que no tiene modificaciones. Los oligómeros resistentes a la nucleasa se utilizan ventajosamente bajo condiciones en las que están presentes nucleasas. Para ciertas aplicaciones, tales como la modulación de la expresión génica mediante un mecanismo antisentido, la estabilidad de la nucleasa por oligómeros es un aspecto funcional importante del oligómero.
- 25 En la presente memoria se describen métodos para detectar la presencia, ausencia o cantidad de un ADN o ARN monocatenario particular o un dúplex objetivo particular en una muestra biológica (u otra) utilizando los oligómeros para detectar secuencias seleccionadas de ácido nucleico. Tales secuencias pueden estar asociadas con la presencia de crecimiento neoplásico, virus o condiciones de enfermedad.
- 30 Ejemplos de oligómeros tienen propiedades de unión mejoradas con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos monocatenarias y bicatenarias complementarias en comparación con los oligómeros no modificados que no tienen el componente de la fracción estabilizante de los oligómeros de la invención. En diversas realizaciones, pueden formarse estructuras de triple hélice a niveles de pH fisiológico de 7,0 y superiores. También se proporciona una formación dúplex mejorada, en ejemplos de realizaciones.

35 En este documento se describen oligómeros útiles para, en ejemplos de realizaciones, (1) modular la expresión génica en células *in vitro*, incluyendo células cultivadas en cultivo de tejido (por ejemplo, para tratar una condición, por ejemplo, cáncer, infección, etc.) y (2) detectar y/o cuantificar secuencias de ácido nucleico objetivo.

En la presente memoria se describen reactivos y kits que comprenden las fosforamiditas, soportes sólidos y/o oligómeros de la invención.

Las formas de realización

40 En el presente documento se describe un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula I:



en la que X^a es una fracción estabilizante seleccionada de fluoroalquilo, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. En diversas realizaciones, X^a es un aglutinante del surco menor o un agente de intercalación.

45 Los símbolos L^1 , L^2 , L^3 y L^4 representan enlazadores. Los enlazadores se seleccionan independientemente entre un solo enlace covalente, alquilo sustituido o no sustituido y fracciones heteroalquilo sustituidas o no sustituidas. Y^a es un

miembro seleccionado de CR^a, y N en el que R^a es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. R^a es opcionalmente un enlazador para un componente funcional.

5 El símbolo Z^a representa un soporte sólido, OR^b o NR^bR^{b'} en el que R^b y R^{b'} son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido. El símbolo R^c representa un miembro seleccionado entre H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y un enlazador que contiene fósforo unido covalentemente a un ácido nucleico. En un ejemplo de realización, R^c es un grupo protector de ácido nucleico, por ejemplo, dimetoxitritilo ("DMT"). En otra realización, R^c es un enlace de fosfodiéster a otra fracción de ácido nucleico, que opcionalmente forma derivado con uno o más componentes funcionales.

10 Los compuestos descritos en la presente invención incluyen un atenuador de energía de fluorescencia. El atenuador está representado por el símbolo Q y, en ejemplos de realizaciones, incluye una o más de las siguientes características estructurales:

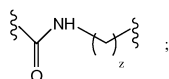
15 (a) al menos tres residuos, cada uno seleccionado independientemente de arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido, en el que el primer residuo está unido covalentemente al segundo residuo a través de un primer enlace diazo exocíclico. El primero o el segundo residuo está unido covalentemente a un tercer residuo a través de un segundo enlace diazo; y

20 (b) al menos dos residuos, cada uno independientemente seleccionado de arilo sustituido o no sustituido, y heteroarilo sustituido o no sustituido. El primer residuo está unido covalentemente al segundo residuo a través de un enlace diazo exocíclico y al menos uno de los residuos es un miembro seleccionado de arilo policíclico sustituido o no sustituido y grupos heteroarilo policíclico sustituidos o no sustituidos.

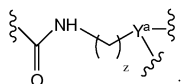
Los atenuadores están unidos al resto del compuesto a través de un enlazador. El atenuador y el enlazador se acoplan por reacción de un grupo funcional reactivo sobre un atenuador precursor y un grupo funcional reactivo sobre el enlazador. Los dos grupos funcionales reactivos son de reactividad complementaria y después de la reacción forman un fragmento de enlace tal como se define en la presente memoria.

25 Ejemplos de enlazadores en la Fórmula I incluyen:

Para L¹,

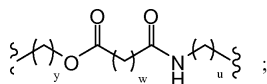


por ejemplo

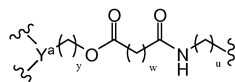


30 en la que z es un número entero de 1 a 20, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20.

Para L²,

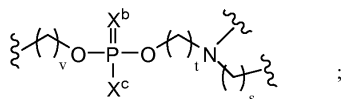


por ejemplo

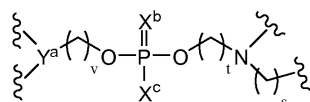


35 en la que y, w y u son números enteros independientemente seleccionados de 1 y 20, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20.

Para L³,

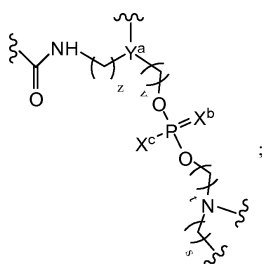


por ejemplo

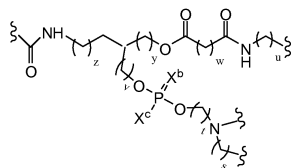


5 en la que v, t y s son números enteros seleccionados independientemente de 1 a 20, tales como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20. El símbolo X^b representa un miembro seleccionado de O y S. X^c es un miembro seleccionado entre OR^8 , SR^8 y NR^8R^{8a} , en la que R^8 y R^{8a} son miembros seleccionados independientemente de H y alquilo sustituido o no sustituido, o el compuesto es una sal y OR^8 y SR^8 se seleccionan de O^-M^+ y S^-M^+ . M^+ es cualquier catión capaz de formar una sal con el ion cargado negativamente, incluyendo un ion metálico o un ion amonio. R^9 es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido y un ácido nucleico opcionalmente conectado a través de un enlazador que contiene fósforo.

10 Para $L^1-Y^a-L^3$,

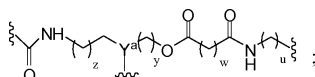


por ejemplo

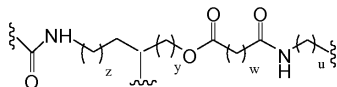


en las que los índices y los radicales variables son como se ha indicado anteriormente.

15 Para $L^1-Y^a-L^2$,

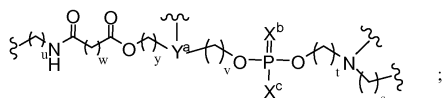


por ejemplo

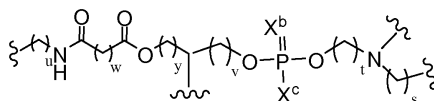


en las que los índices y radicales variables son como se ha indicado anteriormente.

20 Para $L^1-Y^a-L^3$,

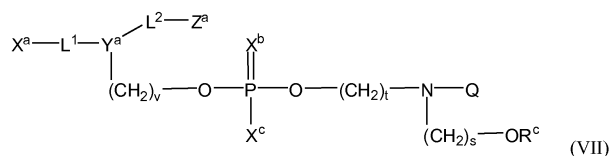


por ejemplo



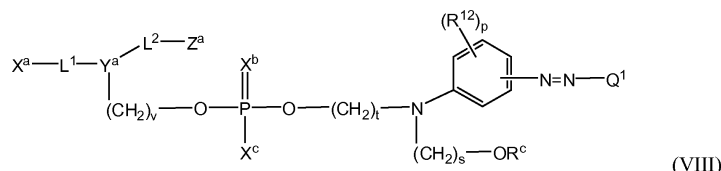
en las que los índices y radicales variables son como se ha indicado anteriormente.

25 En el presente documento se describe un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula VII:



en la que los índices y los radicales variables son como se ha indicado anteriormente.

En la presente memoria se describe un compuesto que tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula VIII:



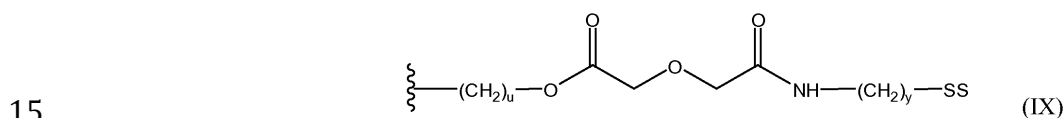
5 en la que Q¹ es un fragmento del atenuador. El fragmento comprende un miembro seleccionado de:

(a) dos fracciones seleccionadas de arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido, estando conectadas dichas dos fracciones a través de un enlace diazo exocíclico; y

(b) una fracción seleccionada de arilo policíclico sustituido o no sustituido y grupos heteroarilo policíclicos sustituidos o no sustituidos.

10 Cada R¹² es un miembro independientemente seleccionado del grupo de sustituyentes arilo como se define en la presente memoria; y el número entero p es 0, 1, 2, 3 o 4. Los restantes índices y radicales son como se han indicado anteriormente.

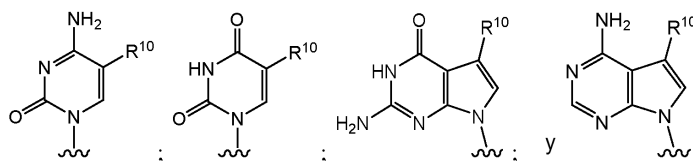
Con respecto a los enlazadores de uso en los compuestos, se proporciona un ejemplo de realización en la que Z^a es un soporte sólido y L²-Z^a comprende una estructura de acuerdo con la Fórmula IX:



15 en la cual los índices son como se ha indicado anteriormente; y SS es el soporte sólido.

En ciertas realizaciones se incluye en el soporte sólido o en una fosforamidita o en un oligómero sintetizado en el soporte sólido una fracción estabilizante. Un ejemplo de compuesto de acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente es aquel en el que X^a se selecciona entre agentes de intercalación y ligandos de surco menor.

20 En diversas realizaciones, el soporte sólido o fosforamidita u oligómero de la invención incluye una base que tiene una fórmula seleccionada de



en la que R¹⁰ es un miembro seleccionado entre una fracción alquínilo y una fracción fluoroalquilo.

25 Por "alquínilo" se entiende un grupo acilo acetilénicamente insaturado, tal como etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo, 1-pentinilo, 1,3-pentadiinilo, fenil-etinilo, piridin-etinilo, pirimidin-etinilo, triazina-etinilo, tiofen-etinilo, tiazol-etinilo e imidazol-etinilo. Ejemplos de grupos sustituidos incluyen grupos alquínilo C₁-C₁₀ sustituidos o no sustituidos, por ejemplo, alquínilo C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉ o C₁₀, sustituido con 2-, 3- y 4-piridinilo (por ejemplo, 2-, 3- y 4-pirimidin-etinilo), triazina (por ejemplo, triazinil-etinilo), 2-, 4- y 5-pirimidinilo, 2-, 4- y 5-tiazolilo, 1-metil-2-imidazolilo, 2- y 4-imidazolilo, 2-, 4- y 5-oxazolilo, 3-piridinilo, 4-piridinilo, 2-piridinilo, 2- y 3-furani-etinilo, 2- y 3-tienil-etinilo, 2- y 4-imidazolil-etinilo, 2-, 4- y 5-tiazolil-etinilo, 2-, 4- y 5-oxazolil-etinilo, 2- y 3-pirrolil-etinilo, 2- y 3-tienilo, 2- y 3-furanilo, 2- y 3-pirrolilo, propenilo (-CH≡CH-CH₃), vinilo y -C≡C-Z' donde Z' es hidrógeno (H) o alquilo C₁-C₁₀, haloalquilo (C₁-C₁₀ con 1 a 6 átomos de halógeno o heteroalquilo (C₁-C₁₀ con 1 a 3 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S). La fracción alquínilo también puede ser el componente de un enlazador o un fragmento de enlace.

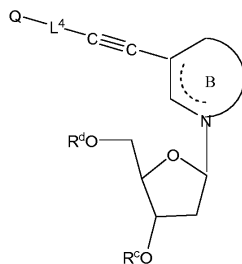
35 Ejemplos de grupos fluoroalquilo incluyen fracciones lineales (por ejemplo, C₁-C₂₀, C₂-C₁₆, C₃-C₁₀, C₄-C₈) y cicloalquilo (por ejemplo, C₃-C₈) sustituidos con una o más fracciones flúor. Ejemplos de grupos fluoroalquilo incluyen 1, 2, 3, 4, 5,

6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 átomos de carbono. Los compuestos perfluorados son útiles en los compuestos.

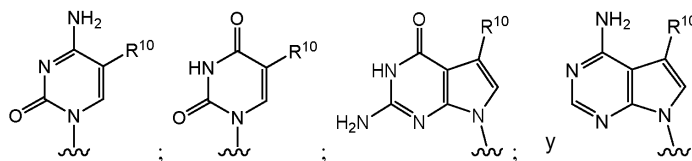
Monómeros

5 En la presente memoria se describen ácidos nucleicos monoméricos de uso en la síntesis de oligómeros. En una realización representativa, el ácido nucleico monomérico es una fosoramidita que porta una fracción estabilizante. Un ejemplo de ácido nucleico monomérico de acuerdo con esta realización tiene la fórmula:

En diversas realizaciones, la fracción estabilizante es un residuo alquino, que proporciona un ácido nucleico monomérico que tiene la fórmula:

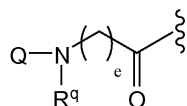


10 en la que Q es un atenuador, y L⁴ es un enlazador. Los ejemplos de enlazadores incluyen alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido de orden cero. R^d es H, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido. En un ejemplo de realización, R^d es un grupo protector de ácido nucleico, por ejemplo, DMT. R^c es H o es un componente de una fosoramidita, por ejemplo, -OPN(i-Pr)₂(OCNE). El anillo marcado B representa una base como se define aquí. Los ejemplos de bases incluyen:



15 en las que R¹⁰ representa L⁴-Q.

En diversas realizaciones, Q-L⁴ tiene la fórmula:



20 en la que R^q es H, alquilo sustituido o no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido y el índice e representa un número entero de 1 a 20, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20.

También se proporciona un oligómero de ácido nucleico, por ejemplo, una sonda, preparada usando un monómero e incluyendo los componentes del monómero a partir del cual es sintetizado.

Oligómeros

25 Ejemplos de oligómeros incluyen oligonucleótidos, oligonucleósidos, oligodesoxirribonucleótidos (que contienen 2'-desoxi-D-ribosa o sus formas modificadas), es decir, ADN, oligorribonucleótidos (que contienen D-ribosa o sus formas modificadas), es decir, ARN, y cualquier otro tipo de polinucleótido que es un N-glicósido o C-glicósido de una base purina o pirimidina, o una base purina o pirimidina modificada. Oligómero, tal como se usa en el presente documento, también incluye compuestos en los que los nucleomonómeros adyacentes están unidos mediante enlaces amida como se ha descrito anteriormente (Nielsen et al., Science (1991) 254: 1497-1500). Se cree que la competencia reforzada de unión por oligómeros que contienen las bases es principalmente una función de la base sola. Debido a esto, los elementos habitualmente encontrados en oligómeros, tales como el anillo de furanosa y/o el enlace fosfodiéster pueden reemplazarse por cualquier elemento funcionalmente equivalente adecuado. Por lo tanto, se pretende que "oligómero" incluya cualquier estructura que sirva como estructura o soporte para las bases en las que la estructura permite la unión con ácidos nucleicos objetivo de una manera dependiente de la secuencia.

35 Ejemplos de grupos que unen nucleomonómeros en un oligómero incluyen (i) un fosfodiéster y modificaciones de fosfodiéster (fosforotioato, fosfonato de metilo, etc.), (ii) enlaces sustitutos que contienen un isótopo diferente de fósforo (formacetal, riboacetal, carbamato, etc.) (iii) residuos de morfolino, residuos carbocíclicos u otros azúcares de furanosa tales como arabinosa o hexosa en lugar de ribosa o desoxirribosa y (iv) nucleomonómeros enlazados por enlaces amida o nucleomonómeros acíclicos enlazados por cualquier enlace sustitutivo adecuado.

Los oligómeros se pueden formar usando nucleomonómeros modificados y convencionales y sintetizados usando técnicas de síntesis de oligómeros estándar en fase sólida (o en fase de disolución), las cuales están ahora disponibles comercialmente. En general, los oligómeros se pueden sintetizar por un método que comprende las etapas de: sintetizar un nucleomonómero u sintón oligómero que tiene un grupo protector y una base y un grupo de acoplamiento capaz de acoplarse a un nucleomonómero u oligómero; acoplar el nucleomonómero o sintón de oligómero a un nucleomonómero aceptor o un oligómero aceptor; eliminación del grupo protector; y repetir el ciclo según sea necesario hasta que se sintetice el oligómero deseado.

Los oligómeros pueden ser de cualquier longitud incluyendo aquellos de más de 40, 50 o 100 nucleomonómeros. En diversas realizaciones, los oligómeros contienen 2-30 nucleomonómeros. Las longitudes mayores o iguales a aproximadamente 8 a 20 nucleomonómeros son útiles para aplicaciones terapéuticas o diagnósticas. Se incluyen específicamente oligómeros cortos que contienen 2, 3, 4 o 5 nucleomonómeros y son útiles, por ejemplo, como sintones.

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

Los oligómeros pueden contener enlaces fosfodiéster convencionales o pueden contener modificación de fosfodiéster tales como enlaces fosforamidato. Estos enlaces sustituidos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que una fracción de la fórmula $-OP(O)(S)-O-$ ("fosfortioato"), $-O-P(S)(S)-O-$ ("fosforoditioato"), $-O-P(O)-(NR^o)_2-X-$, $-O-P(O)(R^o)-O-O-P(S)(R^o)-O-$ ("tioalquilfosfonato"), $-P(O)(OR^p)-X-$, $-OC(O)-X-$, o $-OC(O)(NR^p)_2-X-$, donde R^o es H (o una sal) o alquilo (1-12C) y R^p es alquilo (1-9C) y el enlace se une a nucleomonómeros adyacentes a través de un $-O-$ o $-S-$ unido al carbono del nucleomonómero. En diversas realizaciones, los enlaces sustituidos para uso en los oligómeros de la presente invención incluyen enlaces fosfodiéster, fosfortioato, metilfosfonato y tionometilfosfonato. Los enlaces fosfortioato y metilfosfonato confieren estabilidad adicional al oligómero en entornos fisiológicos. Aunque no todos estos enlaces en el mismo oligómero necesitan ser idénticos, los oligómeros particularmente preferidos de la invención contienen enlaces uniformemente fosfortioato o enlaces uniformemente metilfosfonato.

Los oligómeros o sus segmentos se sintetizan convencionalmente, y se pueden preparar usando un soporte sólido y/o fosforamidita. Los métodos sintéticos conocidos en la técnica y descritos aquí pueden usarse para sintetizar oligómeros que contienen bases, así como otras bases conocidas en la técnica, usando nucleomonómeros adecuadamente protegidos. Los métodos para la síntesis de oligómeros se encuentran, por ejemplo, en Froehler, B., et al., *Nucleic Acids Res.* (1986) 14: 5399-5467; *Nucleic Acids Res.* (1988) 16: 4831-4839; *Nucleosides and Nucleotides* (1987) 6: 287-291; Froehler, B., *Tetrahedron Lett.* (1986) 27: 5575-5578; Caruthers, M.H. en *Oligodeoxynucleotides-Antisense Inhibitions of Gene Expression* (1989), J. S. Cohen, editor, CRC Press, Boca Raton, p7-24; Reese, C. B. et al., *Tetrahedron Lett.* (1985) 26: 2245-2248. También se ha descrito la síntesis de los oligómeros unidos a metilfosfonato por medio de la química de la metilfosfonamidita (Agrawal, S. et al., *Tetrahedron Lett.*, (1987) 28: 3539-3542, Klem, RE et al., publicación internacional No. WO 92/07864).

Tal como se describe en la presente memoria, son "conjugados" de oligómeros. Por ejemplo, los oligómeros pueden estar unidos covalentemente a diversos componentes funcionales tales como fracciones estabilizantes (X^a), fluoróforos, agentes de atenuación, intercaladores y sustancias que interactúan específicamente con el surco menor de la doble hélice de ADN (ligandos de surco menor, "MGB"). Otras fracciones conjugadas elegidas, pueden ser etiquetas tales como radioactivas, fluorescentes, enzimas o fracciones que facilitan la asociación de células usando enlazadores de escisión y similares. Las etiquetas radioactivas adecuadas incluyen ^{32}P , ^{35}S , 3H y ^{14}C ; y las etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen fluoresceína, resorufina, rodamina, BODIPY (Molecular Probes) y rojo Texas; las enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante. Los fluoróforos adicionales se exponen aquí y se reconocen generalmente en la técnica. Otras fracciones unidas covalentemente incluyen biotina, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, y proteínas, por ejemplo, transferrina y la proteína Tat del VIH.

Como se discute aquí y se reconoce en la técnica, los oligómeros pueden formar derivados a través de cualquier enlace conveniente. Por ejemplo, pueden ligarse a los oligómeros aglutinantes del surco menor, fluoróforos, atenuadores e intercaladores, tales como acridina o psoraleno, a través de cualquier $-OH$ o $-SH$ disponible, por ejemplo, en la posición 5' terminal del oligómero, en las posiciones 2' de ARN, o un OH , NH_2 , $COOH$ o SH incorporados en la posición 5 de pirimidinas. Una forma derivada que contiene, por ejemplo, $-CH_2CH_2NH_2$, $-CH_2CH_2CH_2OH$ o $-CH_2CH_2CH_2SH$ en la posición 5 es de uso como se describe en la presente memoria. Los conjugados que incluyen polilisina o lisina se pueden sintetizar como se ha descrito y pueden mejorar adicionalmente la afinidad de unión de un oligómero a su secuencia de ácido nucleico objetivo (Lemaitre, M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1987) 84: 648-652; Lemaitre, M. et al., *Nucleosides and Nucleotides* (1987) 6: 311-315).

Se puede unir una amplia variedad de sustituyentes, incluyendo aquellos enlazados a través de enlaces o enlaces sustituidos. Los fracciones $-OH$ en los enlaces fosfodiéster de los oligómeros pueden sustituirse por grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar, o grupos de acoplamiento para preparar enlaces adicionales a otros nucleomonómeros o pueden unirse al sustituyente conjugado. El OH del terminal 5' puede ser fosforilado; los sustituyentes 2'- OH u OH en el terminal 3' también pueden ser fosforilados. Los hidroxilos también pueden formar

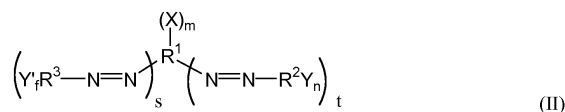
derivados con grupos protectores estándar.

Los oligómeros pueden formar derivados covalentemente con fracciones que facilitan la asociación con células usando enlazadores escindibles. Los enlazadores usados para tales conjugados pueden incluir enlaces disulfuro que se reducen después de que el conjugado de oligómero-agente de transporte haya entrado en una célula. Los enlazadores que contienen disulfuro de este tipo tienen una semivida controlable. Dichos enlazadores son estables en condiciones extracelulares con respecto a las condiciones intracelulares debido al potencial redox del enlace disulfuro.

Fracciones donantes yceptoras

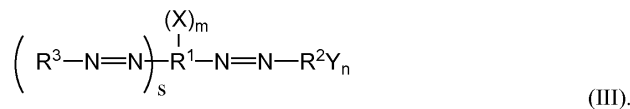
Atenuadores

Ejemplos de soportes sólidos y oligómeros incluyen un atenuador unido covalentemente a los mismos, opcionalmente a través de un enlazador. En diversas realizaciones, el atenuador es una fracción que tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula (II)

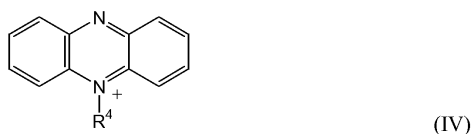


en la que R¹, R² y R³ son miembros seleccionados independientemente entre arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido. Los símbolos X, Y y Y' son miembros seleccionados independientemente de grupos funcionales reactivos y fragmentos de enlace que unen covalentemente dicho agente atenuador a L³. El índice f es un número seleccionado de 0 a 4 (es decir, 0, 1, 2, 3, o 4), inclusive, de manera que cuando (f x s) es mayor que 1, los grupos Y' son iguales o diferentes. El índice m es un número seleccionado de 0 a 5 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4, o 5), inclusive, de manera que cuando m es mayor que 1, los grupos X son iguales o diferentes. El índice n es un número de 0 a 6 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6), inclusive, de manera que cuando (n x t) es mayor que 1, los grupos Y son iguales o diferentes. El índice s es un número de 0 a 6 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6), inclusive, de manera que cuando s es mayor que 1 los grupos R³ son iguales o diferentes. El índice t es un número de 1 a 6 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5 o 6), inclusive, de manera que cuando t es mayor que 1 los grupos R² son iguales o diferentes, y cuando t es 1 y s es 0, un miembro seleccionado de R¹, R² y sus combinaciones son un miembro seleccionado de arilo policíclico sustituido o no sustituido y grupos heteroarilo policíclicos sustituidos o no sustituidos.

En diversas realizaciones, el atenuador tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula (III):

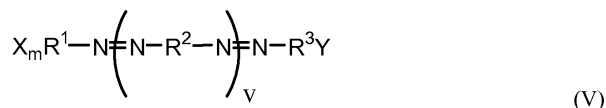


El soporte sólido y los oligómeros también pueden incluir un atenuador de acuerdo con la Fórmula III en la que un miembro seleccionado entre R¹, R² y R³ incluye una estructura de acuerdo con la Fórmula IV:



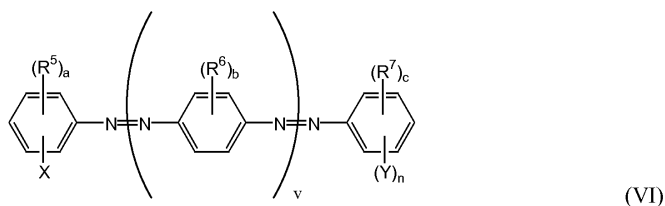
en la que R⁴ es un miembro seleccionado entre alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido.

Los atenuadores de uso en diversas realizaciones tienen una estructura de acuerdo con la Fórmula V:



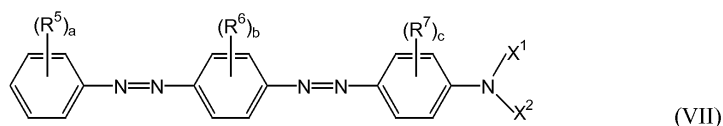
en la que v es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10).

En los ejemplos de realizaciones, el atenuador tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula VI:



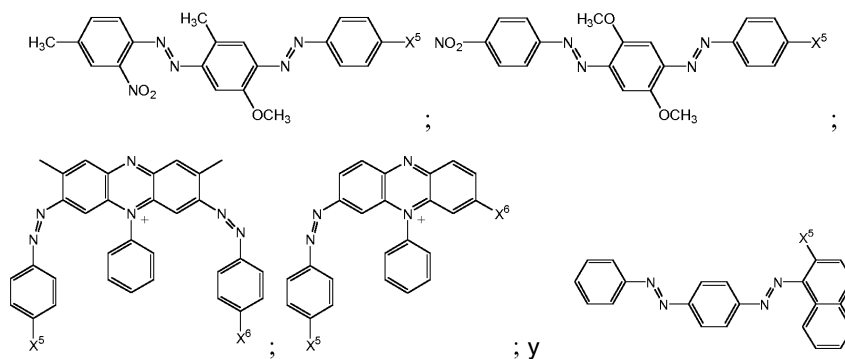
5 en la que los símbolos R^5 , R^6 y R^7 son miembros seleccionados independientemente entre -NR'R", arilo sustituido o no sustituido, nitro, alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido y alcoxi C₁-C₆ sustituido o no sustituido R' y R" se seleccionan independientemente entre H y alquilo (C₁-C₆) sustituido o no sustituido. El índice n es un número entero de 0 a 1. El índice a es un número entero de 0 a 4 (es decir, 0, 1, 2, 3 o 4), de manera que cuando a es mayor que 1, los grupos R^5 son iguales o diferentes. El índice b es un número entero de 0 a 4 (es decir, 0, 1, 2, 3, o 4), de manera que cuando (v x b) es mayor que 1, los grupos R^6 son iguales o diferentes. El índice c es un número entero de 0 a 5 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4 o 5), de manera que cuando c es mayor que 1, los grupos R^7 son iguales o diferentes; y v es un número entero de 1 a 10 (es decir, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10), de manera que cuando v es mayor que 1, el valor de b en cada uno de los anillos fenilos b es igual o diferente.

Varias realizaciones utilizan un atenuador que tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula VII:



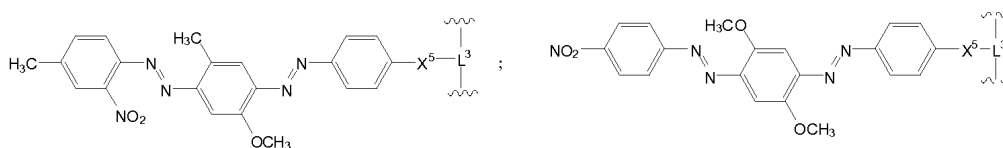
15 en la que R^5 , R^6 y R^7 son miembros seleccionados independientemente de amina, alquilamina, arilo sustituido o no sustituido, nitro, alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido, alcoxi C₁-C₆ sustituido o no sustituido. Los símbolos X^1 y X^2 representan miembros seleccionados independientemente de alquilo C₁-C₆ o alquilo sustituido C₁-C₆, -OH, -COOH, -NR'R", -SH, -OP(OX³)(NR'R") y un fragmento de enlace que une covalentemente dicho agente atenuador a L³. R' y R" son miembros seleccionados independientemente del grupo que consiste en H, y alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

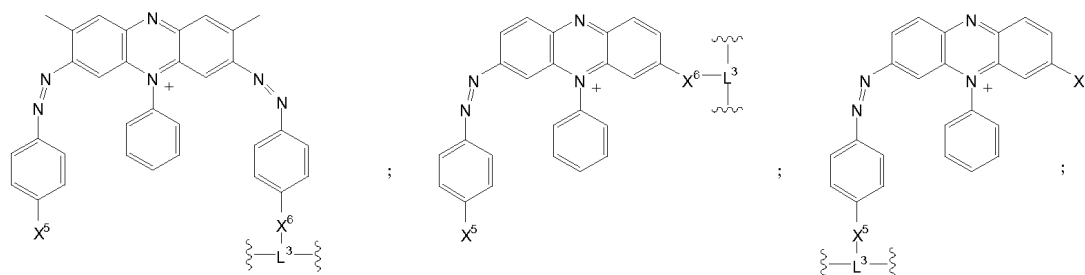
20 En ciertas realizaciones, los compuestos utilizan un atenuador que tiene una estructura que es un miembro seleccionado entre:



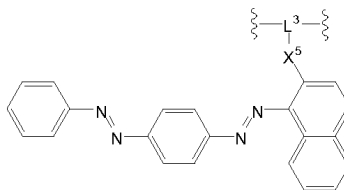
25 en las que X^5 y X^6 son miembros seleccionados independientemente de H, un grupo funcional reactivo y un fragmento de enlace que une covalentemente dicho agente atenuador (Q) a L³, con la condición de que al menos uno de X^5 y X^6 sea un fragmento de enlace de este tipo.

En la presente memoria se describen compuestos de acuerdo con la Fórmula I, incluyendo el componente seleccionado entre:





y



5 Como apreciará un experto en la técnica, L^3 en las estructuras anteriores se puede reemplazar por L^4 y su unión a una base modificada propino.

10 Una de las ventajas de los compuestos es que se puede usar una amplia gama de moléculas dadoras de energía junto con los soportes sólidos y oligómeros que incluyen la función atenuadora. Una amplia gama de fluoróforos es conocida por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Cardullo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8790-8794 (1988); Dexter, D.L., J. of Chemical Physics 21: 836-850 (1953); Hochstrasser et al., Biophysical Chemistry 45: 133-141 (1992); Selvin, P., Methods in Enzymology 246: 300-334 (1995); Steinberg, I. Ann. Rev. Biochem., 40: 83-114 (1971); Stryer, L. Ann. Rev. Biochem., 47: 819-846 (1978); Wang et al., Tetrahedron Letters 31: 6493-6449 (1990); Wang et al., Anal. Chem. 67: 1197-1203 (1995).

En la Tabla 1 se proporciona una lista no limitativa de ejemplos de donantes que pueden usarse conjuntamente con los atenuadores.

15 TABLA 1

Fracciones adecuadas que pueden ser seleccionadas como donantes o receptoras en pares de transferencia de energía donante-aceptor	
	Ácido 4-acetamido- 4'-isotiocianatoestilbenceno-2,2'-disulfónico
	acridina y derivados:
	acridina
	isotiocianato de acridina
20	Ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS)
	4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5-disulfonato
	N-(4-anilino-1-naftil)maleimida
	antranilamida
	BODIPY
25	Amarillo Brillante
	cumarina y derivados:
	cumarina
	7-amino-4-metilcumarina (AMC, Cumarina 120)
	7-amino-4-trifluorometilcumarina (Cumarina 151)
30	colorantes de cianina

- cianosina
- 4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI)
- 5',5"-dibromopirogalol-sulfonaftaleína (Rojo de bromopirogalol)
- 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina
- 5 penta-acetato de dietilentriamina
- ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbena-2,2'-disulfónico
- ácido 4,4'-diisotiocianatostilbena-2,2'-disulfónico
- cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo)
- ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL)
- 10 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC)
- eosina y derivados:
- eosina
 - isotiocianato de eosina
- eritrosina y derivados:
- 15 eritrosina B
- isotiocianato de eritrosina
- etidio
- fluoresceína y derivados:
- 5-carboxifluoresceína (FAM)
- 20 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF)
- 2',7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE)
 - fluoresceína
 - isotiocianato de fluoresceína
 - QFITC (XRITC)
- 25 fluorescamina
- IR144
 - IR1446
 - Isotiocianato verde de malaquita
 - 4-metilumbeliferona
- 30 orto cresolftaleína
- nitrotirosina
 - pararosanilina
 - Rojo Fenol
 - B-ficoeritrina
- 35 o-ftaldialdehído
- pireno y derivados:

pireno

butirato de pireno

succinimidil butirato de 1-pireno

puntos cuánticos

5 Rojo Reactivo 4 (Cibacron^{MR} Rojo Brillante 3B-A)

rodamina y derivados:

6-carboxi-X-rodamina (ROX)

6-carboxirodamina (R6G)

cloruro sulfonilo de lissamina rodamina B rodamina (Rhod)

10 rodamina B

rodamina 123

isotiocianato de rodamina X

sulforrodamina B

sulforrodamina 101

15 derivado de cloruro de sulforrodamina 101 (Rojo Texas)

N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA)

tetrametil rodamina

isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC)

riboflavina

20 ácido rosólico

quelatos de metal, por ejemplo, quelatos de lantánidos (por ejemplo, quelatos de europio y terbio), quelatos de rutenio

25 Existe una gran cantidad de orientación práctica disponible en la literatura para seleccionar pares apropiados donador-aceptor para sondas particulares, como se ejemplifica mediante las siguientes referencias: Pesce et al., Eds., SPECTROSCOPY FLUORESCENCE (Marcel Dekker, New York, 1971); White et al., FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH (Marcel Dekker, New York, 1970); y similares. La literatura también incluye referencias que proporcionan listas exhaustivas de moléculas fluorescentes y cromogénicas y sus propiedades ópticas relevantes para la elección de pares de informador-atenuador (véase, por ejemplo, Berlman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2ª Edición (Academic Press, New York, 1971). Griffiths, COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES (Academic Press, New York, 1976); Bishop, Ed., INDICATORS (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS (Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE (Interscience Publishers, New York, 1949); y similares. Además, existe una guía extensa en la literatura para formar derivados de moléculas de informador y atenuador para una unión covalente a través de grupos reactivos comunes que se pueden añadir a un ácido nucleico, tal como se ejemplifica mediante las siguientes referencias: Haugland (citado anteriormente), Ullman et al., patente de Estados Unidos No. 3.996.345, Khanna et al., patente de Estados Unidos 4.351.760. Por lo tanto, está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica elegir un par de intercambio de energía para una aplicación particular y conjugar los miembros de este par con una molécula de sonda, tal como, por ejemplo, un ácido nucleico, péptido u otro polímero.

40 En general, se prefiere que una banda de absorbancia de la BHQ se solape sustancialmente la banda de emisión de fluorescencia del donante. Cuando el donador (fluoróforo) es un componente de una sonda que utiliza la transferencia de energía donador-aceptor, la fracción fluorescente donante y el atenuador (aceptor) de la invención se seleccionan preferiblemente de modo que los fragmentos donador y aceptor exhiban transferencia de energía donador-aceptor cuando se excita la fracción donadora. Un factor a tener en cuenta al elegir que el par fluoróforo-atenuador sea la eficiencia de la transferencia de energía donador-aceptor entre ellos. Preferiblemente, la eficiencia de FRET entre las fracciones donador y aceptor es al menos del 10%, más preferiblemente al menos del 50% e incluso más preferiblemente al menos del 80%. La eficacia de FRET se puede probar empíricamente fácilmente utilizando los métodos descritos en la presente memoria y conocidos en la técnica.

La eficiencia de transferencia de energía entre el par donador-aceptor también puede ajustarse cambiando la capacidad de los grupos donador y aceptor para dimerizar o asociarse estrechamente. Si las fracciones donante y aceptora son conocidas o se determina que se asocian estrechamente, se puede promover un aumento o disminución en la asociación ajustando la longitud de una fracción enlazadora, o de la propia sonda, entre el donante y el aceptor. La capacidad del par donador-aceptor para asociarse puede aumentarse o disminuirse ajustando las interacciones hidrófobas o iónicas, o las repulsiones estéricas en el constructo de la sonda. De este modo, las interacciones intramoleculares responsables de la asociación del par donador-aceptor pueden ser mejoradas o atenuadas. De este modo, por ejemplo, la asociación entre el par donador-aceptor puede aumentarse, por ejemplo, utilizando un donante que porta una carga negativa total y un aceptor con una carga positiva total.

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

Los donantes actualmente preferidos de uso junto con BHQ, incluyen, por ejemplo, colorantes de xanteno, incluyendo fluoresceínas, colorantes de cianina y colorantes de rodamina. Muchas formas adecuadas de estos compuestos están ampliamente disponibles comercialmente con sustituyentes en sus fracciones fenilo, que pueden usarse como el sitio para la unión o como la función de unión para unir un ácido nucleico. Otro grupo de compuestos fluorescentes preferidos son las naftilaminas, que tienen un grupo amino en la posición alfa o beta. Incluidos entre estos compuestos naftilamino se encuentran 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, 1-anilino-8-naftalensulfonato y 2-p-touidil-6-naftaleno sulfonato. Otros donantes incluyen 3-fenil-7-isocianatocumarina, acridinas, tales como 9-isotiocianatoacridina y naranja de acridina; N-(p-(2-benzoxazolil)fenil)maleimida; benzoxadiazoles, estilbenos, pirenos, y similares.

Para mayor claridad de la ilustración, la discusión se centra a continuación en la unión de BHQ y fluoróforos a ácidos nucleicos. El enfoque en las sondas de ácido nucleico no pretende limitar el alcance de las moléculas sonda a las que se pueden unir los BHQ. Los expertos en la técnica apreciarán que los BHQ también pueden estar unidos a moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, polímeros sintéticos, soportes sólidos y similares usando química sintética estándar.

En una realización actualmente preferida, en la que la sonda es una sonda de ácido nucleico, la molécula informadora es un colorante de fluoresceína (FAM). La fracción de fluoresceína está unida preferiblemente al extremo 3' o 5' del ácido nucleico, aunque los sitios internos también son accesibles y tienen utilidad para propósitos seleccionados. Sea cual sea el terminal al que esté unido el derivado de FAM, el BHQ se unirá generalmente a su antípoda, o en una posición interna a la cadena de ácido nucleico. El donador de FAM se introduce preferiblemente usando una amidita 6-FAM. También se introducen preferiblemente diferentes grupos donantes utilizando un derivado de amidita del donante. Alternativamente, los grupos donantes que comprenden grupos funcionales reactivos (por ejemplo, isotiocianatos, ésteres activos, etc.) pueden introducirse por reacción con un grupo funcional reactivo sobre un brazo de unión o enlazador unido al ácido nucleico (por ejemplo, hexilamina).

En otra realización preferida, la fracción donante puede unirse en el extremo 3' de un ácido nucleico mediante el uso de un soporte de síntesis sometido a derivación. Por ejemplo, TAMRA (ácido tetrametilrodamina carboxílico) está unido a un extremo 3' de ácido nucleico usando un soporte sólido que forma un derivado con un análogo de este fluoróforo (Biosearch Technologies, Inc.).

En vista del cuerpo bien desarrollado de la literatura referente a la conjugación de moléculas pequeñas a ácidos nucleicos, muchos otros métodos de fijación de pares donador/aceptor a ácidos nucleicos serán evidentes para los expertos en la técnica. Por ejemplo, los colorantes de rodamina y fluoresceína se unen convenientemente al 5'-hidroxilo de un ácido nucleico al concluir la síntesis en fase sólida por medio de colorantes que forman derivados con una fracción de fosforamidita (véase, por ejemplo, Woo et al., patente estadounidense No. 5.231.191 y Hobbs, Jr., patente estadounidense No. 4.997.928).

Más específicamente, hay muchas fracciones enlazadoras y metodologías para unir grupos a los terminales 5' o 3' de ácidos nucleicos, como se ejemplifica mediante las siguientes referencias: Eckstein, editor, *Nucleic acids and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckerman et al., *Nucleic Acids Research*, 15: 5305-5321 (1987) (grupo 3'-tiol sobre ácido nucleico); Sharma et al., *Nucleic Acids Research*, 19: 3019 (1991) (3'-sulfhidrilo); Giusti et al., *PCR Methods and Applications*, 2: 223-227 (1993) y Fung et al., patente estadounidense No. 4.757.141 (grupo 5'-fosfoamino a través de Aminolink TM II disponible a través de P.E. Biosystems, CA); Stabinsky, patente estadounidense No. 4.739.044 (grupo 3-aminoalquilfosforilo); Agrawal et al., *Tetrahedron Letters*, 31: 1543-1546 (1990) (unión mediante enlaces fosforamidato); Sproat et al., *Nucleic Acids Research*, 15: 4837 (1987) (grupo 5-mercapto); Nelson et al., *Nucleic Acids Research*, 17: 7187-7194 (1989) (grupo 3'-amino), y similares.

5 Los medios para detectar marcadores fluorescentes son bien conocidos por los expertos en la técnica. Así, por ejemplo, se pueden detectar marcadores fluorescentes por excitación del fluoróforo con la longitud de onda apropiada de luz y detección de la fluorescencia resultante. La fluorescencia puede detectarse visualmente, por medio de una película fotográfica, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de acoplamiento de carga (CCD) o fotomultiplicadores y similares. De forma similar, los marcadores enzimáticos pueden detectarse proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante.

Grupos funcionales reactivos

10 Los componentes de los soportes sólidos y oligómeros de la invención (por ejemplo, enlazadores, fluoróforo, atenuadores, fracción estabilizante están unidos a través de fragmentos de enlace formados por reacción de un primer y un segundo grupo funcional reactivo. Los grupos funcionales reactivos son de reactividad complementaria y reaccionan para formar un enlace covalente entre dos componentes de los oligómeros a los que se hace referencia en la presente memoria como un fragmento de enlace. Con referencia al soporte sólido de Fórmula I, el grupo funcional reactivo se encuentra en precursores de L¹, L² y L³, así como en precursores de Q, Z^a y X^a. En varios ejemplos, X^a y L¹ están unidos covalentemente a través de un fragmento de enlace; L² y Z^a están unidos por un fragmento de enlace; L³ y Q están unidos por un fragmento de enlace, cada fragmento de enlace formado por reacción de grupos funcionales reactivos sobre los precursores de los componentes nombrados de los oligómeros. Los fragmentos de enlace están presentes en grupos similares de los oligómeros de Fórmulas VII y VIII.

20 Con respecto a los precursores de los componentes de soportes sólidos, fosforamiditas y oligómeros, los grupos funcionales reactivos pueden situarse en cualquier posición sobre estos precursores, por ejemplo, un alquilo o heteroalquilo, un núcleo arilo o heteroarilo o un sustituyente en un núcleo arilo o heteroarilo. De manera similar, un grupo funcional reactivo está situado en cualquier posición de una cadena de alquilo o heteroalquilo. En varias realizaciones, cuando el grupo reactivo está unido a una cadena de alquilo (o heteroalquilo) o cadena de alquilo sustituida (o heteroalquilo), el grupo reactivo se sitúa preferiblemente en una posición terminal de la cadena.

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

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

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

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

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

(c) grupos haloalquilo, en donde el haluro puede desplazarse posteriormente con un grupo nucleofílico tal como, por ejemplo, una amina, un anión carboxilato, un anión tiol, un carbanión o un ion alcóxido, resultando de este modo en la unión covalente de un nuevo grupo en el sitio del átomo de halógeno;

55 (d) grupos dienófilos, que son capaces de participar en reacciones de Diels-Alder tales como, por ejemplo, grupos maleimido;

(e) grupos aldehído o cetona, de tal manera que es posible la posterior formación de derivados mediante la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o a través de

mecanismos tales como adición de Grignard o adición de alquil-litio;

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

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

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

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

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

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

10 Los grupos funcionales reactivos pueden elegirse de tal manera que no participan ni interfieren en las reacciones necesarias para ensamblar el oligómero. Alternativamente, un grupo funcional reactivo puede estar protegido de participar en la reacción por la presencia de un grupo protector. Los expertos en la técnica entienden cómo proteger un grupo funcional particular de tal manera que no interfiera con un conjunto elegido de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores útiles, véase, por ejemplo, Greene et al., PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, New York, 1991.

Fracción de unión covalente

15 Includido en algunos de los oligómeros está una fracción de grupo funcional reactivo que es capaz de efectuar al menos un enlace covalente entre el oligómero y una secuencia objetivo. Pueden formarse también múltiples enlaces covalentes proporcionando una multiplicidad de tales fracciones. El enlace covalente es preferiblemente un residuo de base en la cadena objetivo, pero también puede hacerse con otras porciones del objetivo, incluyendo el azúcar o fosfodiéster. La naturaleza de la reacción de la fracción que efectúa el entrelazador determina la naturaleza del objetivo en el dúplex.
20 Las fracciones entrelazadoras preferidas incluyen agentes acilantes y alquilantes, y en particular, aquellos situados en relación con la porción que confiere especificidad de secuencia, de manera que permitan la reacción con la posición objetivo en la cadena.

25 La fracción entrelazadora puede colocarse convenientemente como un residuo de pirimidina o purina análogo en la secuencia del oligómero. La colocación puede estar en los extremos 5' y/o 3', las porciones internas de la secuencia, o combinaciones de las anteriores. Se prefiere la colocación en los terminales para permitir una mayor flexibilidad. También se pueden unir fracciones análogas a las cadenas principales del péptido.

Ejemplos de fracciones alquilantes que son útiles incluyen N⁴,N⁴-etanocitosina y N⁶,N⁶-etanoadenina.

30 Es evidente que la base no necesita ser una purina o pirimidina; en realidad la fracción a la cual está unida la función reactiva no necesita ser una base en absoluto y puede ser un azúcar, un enlazador, un atenuador, una fracción estabilizante, un fluoróforo o alguna combinación de estos componentes de los oligómeros de la invención. Cualquier medio de fijación del grupo reactivo es satisfactorio siempre y cuando el posicionamiento sea correcto.

Síntesis

35 Los soportes sólidos, monómeros (por ejemplo, fosforamiditas) y oligómeros o sus segmentos son generalmente sintetizados convencionalmente. Los métodos sintéticos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria pueden usarse para sintetizar oligómeros que contienen bases de la invención, así como otras bases conocidas en la técnica, usando nucleomonómeros adecuadamente protegidos. Los métodos para la síntesis de oligómeros se encuentran, por ejemplo, en Froehler, B., et al., Nucleic Acids Res. (1986) 14: 5399-5467; Nucleic Acids Res. (1988) 16: 4831-4839; Nucleosides and Nucleotides (1987) 6: 287-291; Froehler, B., Tetrahedron Letters (1986) 27: 5575-5578; Caruthers, M.H. en Oligodeoxynucleotides-Antisense Inhibitions of Gene Expression (1989), J. S. Cohen, editor, CRC Press, Boca Raton, páginas 7-24; Reese, C. B. et al., Tetrahedron Letters (1985) 28: 2245-2248. También se ha descrito la síntesis de los oligómeros unidos a metilfosfonatos a través de la química del metilfosfonamidita (Agrawal, S. et al., Tetrahedron Letters (1987) 28: 3539-3542, Klem, RE, et al., publicación internacional Número WO 92/07864).

Un ejemplo de síntesis de un soporte sólido se expone en la Figura 1, la Figura 2 y los ejemplos adjuntos.

45 En un ejemplo de realización, los nucleomonómeros son incorporados directamente en oligómeros o un fragmento conveniente de los mismos usando condiciones y reactivos de síntesis estándar. Los ejemplos de enlaces realizados por este método incluyen fosfodiéster, fosforotioato, fosforoamidato, metilfosfonato, fosforoditioato, carbonato, morfolino carbamato y sulfonato.

50 En varias realizaciones, la síntesis implica la síntesis de sintones cortos (dímeros, trímeros, etc.) partiendo de un precursor apropiado. Este enfoque es adecuado para la síntesis de enlaces incluyendo N-metilhidroxilamina, dimetilhidrazo, sulfamato, carbamato, sulfonato, sulfonamida, formacetal, tioformacetal y carbonato.

Los oligómeros se pueden sintetizar por cualquier química adecuada que incluya métodos y condiciones de

5 acoplamiento de amidita, triéster o fosfonato de hidrógeno. Los oligómeros se sintetizan preferiblemente a partir de
 10 sintones de partida apropiados que están preferiblemente protegidos en la posición 5' con DMT, MMT, Fmoc (9-
 fluorenilmetoxicarbonilo), PACO (fenoxiacetilo), un silil éter tal como TBDMS (t-butildifenilsililo) o TMS (trimetilsililo) y
 activado en la posición 3' es un éster, H-fosfonato, una amidita tal como β -cianoetilfosforamidita, un silil éter tal como
 TBDMS o TMS o t-butildifenilo. Alternativamente, los precursores apropiados de uridina o citidina tales como 5-yodo-2'-
 desoxiuridina, 5-yodo-2'-O-alquiluridina, 5-bromo-2'-desoxiuridina, 5-trifluorometanosulfonato-2'-desoxiuridina, 5-
 bromo-2'-O-alquiluridina bloqueadas o 5-yodo-2'-desoxicitidina, 5-bromo-2'-desoxicitidina, 5-trifluorometanosulfonato-2'-
 desoxicitidina, 5-yodo-2'-O-alquilitidina, 5-bromo-2'-O-alquilitidina bloqueadas y protegidas pueden incorporarse
 convenientemente en oligómeros cortos tales como sintones dímeros, trímeros, tetrameros, pentámeros o sintones más
 largos que posteriormente forman derivados para producir sintones adecuados y oligómeros más largos.

15 Los ejemplos de síntesis de oligómeros que contienen aproximadamente 4 o más residuos de nucleomonomero se
 llevan a cabo usando sintones tales como monómeros, dímeros o trímeros que portan un grupo de acoplamiento
 adecuado para su uso con químicas de amidita, H-fosfonato o triglicéridos. El sintón puede usarse para unir los
 componentes del oligómero a través de un fosfodiéster o un enlace que contiene fósforo distinto del fosfodiéster (por
 ejemplo, fosforotioato, metilfosfonato, tionometilfosfonato, fosforamidato y similares).

La síntesis de otros enlaces sustituidos que no contienen fósforo puede llevarse a cabo usando precursores apropiados
 como se conoce en la técnica.

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

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

Ensayos y sondas oligoméricas de la invención

30 En este documento se describe un oligómero de uso en uno o más formatos de ensayo. En realizaciones
 seleccionadas, el oligómero participa en la generación de una señal detectable al asociarse o disociarse de su objetivo.
 Las sondas oligoméricas de la invención no están limitadas en su uso a ningún formato de ensayo particular. Por
 consiguiente, la siguiente descripción pretende ilustrar ejemplos de formatos de ensayo en los que los oligómeros de la
 invención encuentran uso, y no pretenden ser limitativos de los formatos de ensayo en los que los oligómeros son útiles.

Ensayos

35 La discusión siguiente es generalmente relevante para los ensayos descritos en la presente memoria. Esta exposición
 pretende ilustrar la invención haciendo referencia a ciertas realizaciones preferidas y no debe ser interpretada como
 limitante del alcance de las sondas y tipos de ensayo en los que los compuestos encuentran uso. Otros formatos de
 ensayo que utilizan los compuestos serán evidentes para los expertos en la técnica.

40 En general, para determinar la concentración de una molécula objetivo, tal como, por ejemplo, un ácido nucleico, es
 preferible obtener primero datos de referencia en los que se ponen en contacto cantidades constantes de sonda y
 ligando de ácido nucleico con cantidades variables del objetivo. La emisión de fluorescencia de cada una de las mezclas
 de referencia se utiliza para derivar un gráfico o tabla en el que la concentración objetivo se compara con la emisión de
 fluorescencia. Por ejemplo, una sonda que: a) se hibrida con un ligando de ácido nucleico exento de objetivo; y b) tiene
 45 una arquitectura de tallo-bucle siendo los terminales 5' y 3' los sitios del grupo fluorescente y el etiquetado de BHQ,
 puede usarse para obtener tales datos de referencia. Dicha sonda proporciona un perfil de emisión característico en el
 que la emisión de fluorescencia disminuye a medida que la concentración objetivo aumenta en presencia de una
 cantidad constante de sonda y ligando de ácido nucleico. A continuación, se pone en contacto una mezcla de ensayo
 con una cantidad desconocida del objetivo con la misma cantidad del primer ligando de ácido nucleico y la segunda
 50 sonda, y se determina la emisión de fluorescencia. El valor de la emisión de fluorescencia se compara entonces con los
 datos de referencia para obtener la concentración del objetivo en la mezcla de ensayo.

Análisis de multiplex

En otra realización, los soportes sólidos y oligómeros se utilizan como una sonda o un componente de una o más
 sondas utilizadas en un ensayo de multiplex para detectar una o más especies en una mezcla.

55 Las sondas basadas en los soportes sólidos u oligómeros son particularmente útiles en la realización de análisis y
 ensayos de tipo multiplex. En un análisis típico de multiplex, se detectan dos o más especies distintas (o regiones de
 una o más especies) usando dos o más sondas, en donde cada una de las sondas está marcada con un fluoróforo

diferente. Las especies preferidas utilizadas en los análisis de multiplex que dependen de la transferencia de energía donador-aceptor cumplen al menos dos criterios: la especie fluorescente es brillante y espectralmente bien resuelta; y la transferencia de energía entre las especies fluorescentes y el atenuador es eficiente.

Los soportes sólidos y oligómeros permiten el diseño de ensayos de multiplex en los que se utiliza más de una estructura de atenuación en el ensayo. Un número de diferentes ensayos de multiplex utilizando los soportes sólidos u oligómeros será evidente para un experto en la técnica. En un ejemplo de ensayo, cada uno de al menos dos atenuadores distintos se utiliza para atenuar la energía derivada de uno o más fluoróforos idénticos. Alternativamente, se puede practicar un ensayo en el que cada atenuador distinto atenúa la energía derivada de un fluoróforo distinto al cual se "ajusta" el atenuador. Los fluoróforos pueden unirse a la misma molécula que el atenuador o a una molécula diferente. Además, de forma similar al agente atenuador y los fluoróforos, las moléculas portadoras de uso en un sistema de ensayo particular pueden ser iguales o diferentes.

Además de las mezclas descritas anteriormente, en la presente invención se describe un método para detectar o cuantificar una especie molecular particular. El método incluye: (a) poner en contacto la especie con una mezcla que contiene un soporte sólido u oligómero; y (b) detectar un cambio en una propiedad fluorescente de uno o más componentes de la mezcla resultante, detectando o cuantificando así las especies moleculares.

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

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

Sondas de ácido nucleico

Los soportes sólidos y oligómeros son sondas útiles de ácidos nucleicos y se pueden usar como componentes de agentes de detección en una variedad de estrategias de amplificación/cuantificación de ADN que incluyen, por ejemplo, el ensayo de 5'-nucleasa, la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación de círculos rodantes (RCA), así como para la detección directa de objetivos en ensayos en fase de disolución o fase sólida (por ejemplo, una matriz). Además, los soportes sólidos y oligómeros pueden utilizarse en sondas de prácticamente cualquier formato, incluyendo, por ejemplo, un formato seleccionado de balizas moleculares, sondas Scorpion^{MR}, sondas Sunrise^{MR}, sondas conformacionalmente asistidas, sondas LightUp, sondas de detección de invasores y sondas TaqMan^{MR}. Véase, por ejemplo, Cardullo, R., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8790-8794 (1988); Dexter, D.L., *J. Chem. Physics*, 21: 836-850 (1953); Hochstrasser, R.A., et al., *Biophysical Chemistry*, 45: 133-141 (1992); Selvin, P., *Methods in Enzymology*, 246: 300-334 (1995); Steinberg, I., *Ann. Rev. Biochem.*, 40: 83-114 (1971); Stryer, L., *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 819-846 (1978); Wang, G., et al., *Tetrahedron Letters*, 31: 6493-6494 (1990); Wang, Y., et al., *Anal. Chem.*, 67: 1197-1203 (1995); Debouck, C., et al., en *Supplement to Nature Genetics*, 21: 48-50 (1999); Rehman, F.N., et al., *Nucleic Acids Research*, 27: 649-655 (1999); Cooper, J.P., et al., *Biochemistry*, 29: 9261-9286 (1990); Gibson, E.M., et al., *Genome Methods*, 6: 995-1101 (1996); Hochstrasser, R.A., et al., *Biophysical Chemistry*, 45: 133-141 (1992); Holland, P.M., et al., *Proc Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7276-7289 (1991); Lee, L.G., et al., *Nucleic Acids Resch.*, 21: 3761-3766 (1993); Livak, K.J., et al., *PCR Methods and Applications*, Cold Spring Harbor Press (1995); Vamosi, G., et al., *Biophysical Journal*, 71: 972-994 (1996); Wittwer, C.T., et al., *Biotechniques*, 22: 176-181 (1997); Wittwer, C.T., et al., *Biotechniques*, 22: 130-38 (1997); Giesendorf, B.A.J., et al., *Clinical Chemistry*, 44: 482-486 (1998); Kostrikis, L.G., et al., *Science*, 279: 1228-1229 (1998); Matsuo, T., *Biochemica y Biophysica Acta*, 1379: 178-184 (1998); Piatek, A.S., et al., *Nature Biotechnology*, 16: 359-363 (1998); Schofield, P., et al., *Appl. Environ. Microbiology*, 63: 1143-1147 (1997); Tyagi S., et al., *Nature Biotechnology*, 16: 49-53 (1998); Tyagi, S., et al., *Nature Biotechnology*, 14: 303-308 (1996); Nazarenko, I.A., et al., *Nucleic Acids Research*, 25: 2516-2521 (1997); Uehara, H., et al., *Biotechniques*, 26: 552-558 (1999); D. Whitcombe, et al., *Nature Biotechnology*, 17: 804-807 (1999); Lyamichev, V., et al., *Nature Biotechnology*, 17: 292 (1999); Daubendiek, et al., *Nature Biotechnology*, 15: 273-277 (1997); Lizardi, P.M., et al., *Nature Genetics*, 19: 225-232 (1998); Walker, G., et al., *Nucleic Acids Res.*, 20: 1691-1696 (1992); Walker, G.T., et al., *Clinical Chemistry*, 42: 9-13 (1996); y Compton, J., *Nature*, 350: 91-92 (1991).

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

En los métodos descritos en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario, un ácido nucleico detector preferido incluye una secuencia de unión al objetivo monocatenario. La secuencia de unión se ha unido a los mismos: i) un fluoróforo; y ii) un atenuador; y iii) una fracción estabilizante. Además, antes de su hibridación con una secuencia complementaria, el ácido nucleico detector está preferiblemente en una conformación que permite la transferencia de energía donador-aceptor entre el fluoróforo y el atenuador cuando se excita el fluoróforo. Además, en cada uno de los métodos descritos en esta sección, se detecta un cambio en la fluorescencia como una indicación de la presencia de la secuencia objetivo. El cambio en la fluorescencia se detecta preferiblemente en tiempo real.

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

En otro aspecto, se describe aquí un método para detectar la amplificación de una secuencia objetivo. El método incluye el uso de una reacción de amplificación que incluye las siguientes etapas: (a) hibridación de la secuencia objetivo y un ácido nucleico detector. El ácido nucleico detector incluye una secuencia de unión objetivo monocatenaria y una estructura secundaria 5' asociada en forma intramolecular a la secuencia de unión objetivo. Al menos una porción de la secuencia detectora forma una cola de cadena sencilla que está disponible para hibridación con la secuencia objetivo; (b) extender el ácido nucleico detector hibridado sobre la secuencia objetivo con una polimerasa para producir un producto de extensión de ácido nucleico detector y separar el producto de extensión de ácido nucleico detector de la secuencia objetivo; (c) hibridar un cebador con el producto de extensión de ácido nucleico detector y extender el cebador con la polimerasa, linealizando de este modo la estructura secundaria asociada en forma intramolecular y produciendo un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (d) detectar el cambio en el parámetro de fluorescencia, detectando de este modo la secuencia objetivo.

En aún otro aspecto, se describe aquí un método para determinar si un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico se hibridan. En este método, el primer ácido nucleico es un oligómero (en solución o unido a un soporte sólido). El método incluye: (a) poner en contacto el primer ácido nucleico con el segundo ácido nucleico; (b) detectar una alteración en una propiedad fluorescente de un miembro seleccionado entre el primer ácido nucleico, el segundo ácido nucleico y una combinación de los mismos, comprobando así si tiene lugar la hibridación.

En diversas realizaciones, la presente invención proporciona sondas y métodos de uso para detectar un polimorfismo en secuencias objetivo de ácido nucleico. Polimorfismo se refiere a la aparición de dos o más secuencias alternativas o alelos genéticamente determinados en una población. Un marcador o sitio polimórfico es el lugar en el que se produce la divergencia. Los marcadores preferidos tienen al menos dos alelos, cada uno de los cuales se presenta con una frecuencia mayor al 1%, y más preferiblemente mayor al 10% o 20% de una población seleccionada. Un locus polimórfico puede ser tan pequeño como un par de bases. Los marcadores polimórficos incluyen polimorfismos de longitud del fragmento de restricción, un número variable de repeticiones en tándem (VNTR), regiones hipervariables, minisatélites, repeticiones de dinucleótidos, repeticiones de trinucleótidos, repeticiones de tetranucleótidos, repeticiones de secuencia simple y elementos de inserción tales como Alu. La primera forma alélica identificada se designa arbitrariamente como la forma de referencia y las otras formas alélicas se designan como alelos alternativos o variantes. La forma alélica que se presenta con más frecuencia en una población seleccionada se conoce a veces como la forma de tipo silvestre. Los organismos diploides pueden ser homocigóticos o heterocigotos para las formas alélicas. Un polimorfismo dialélico tiene dos formas. Un polimorfismo trialélico tiene tres formas.

En un ejemplo de realización, se utiliza una sonda de la invención para detectar un polimorfismo de un solo nucleótido. Un polimorfismo de un solo nucleótido se produce en un sitio polimórfico ocupado por un solo nucleótido, que es el sitio de variación entre las secuencias alélicas. El sitio está usualmente precedido por y seguido por secuencias altamente conservadas del alelo (por ejemplo, secuencias que varían en menos de 1/100 o 1/1000 miembros de las poblaciones). Normalmente, un polimorfismo de un solo nucleótido surge debido a la sustitución de un nucleótido por otro en el sitio polimórfico. Una transición es la sustitución de una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina. Una transversión es la sustitución de una purina por una pirimidina o viceversa. Los polimorfismos de un solo nucleótido también pueden surgir de una supresión de un nucleótido o de una inserción de un nucleótido con respecto a un alelo de referencia.

Se puede usar un oligómero que porta tanto un atenuador como un fluoróforo o, alternativamente, uno o más de los ácidos nucleicos pueden marcarse individualmente con un único miembro de un par de transferencia de energía (por ejemplo, un atenuador o fluoróforo). Cuando un ácido nucleico marcado individualmente con un atenuador es la sonda,

la interacción entre el primer y el segundo ácidos nucleicos puede detectarse observando la interacción entre el atenuador y el ácido nucleico o, más preferiblemente, la atenuación por el atenuador de la fluorescencia de un fluoróforo unido al segundo ácido nucleico.

Además de su utilidad general en sondas diseñadas para investigar la amplificación, polimorfismo y detección y cuantificación de ácido nucleico, los presentes soportes sólidos y oligómeros pueden usarse en prácticamente cualquier formato de sonda de ácido nucleico actualmente conocido o descubierto posteriormente. Por ejemplo, los soportes sólidos y oligómeros de la invención se pueden incorporar en motivos de sonda, tales como sondas TaqMan^{MR} (Held et al., *Genome Res.* 6: 986-994 (1996), Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7276-7280 (1991), Lee et al., *Nucleic Acids Res.* 21: 3761-3766 (1993)), balizas moleculares (Tyagi et al., *Nature Biotechnology* 14: 303-308 (1996), Jayasena et al., patente estadounidense No. 5.989.823, publicada el 23 de noviembre de 1999), sondas Scorpion (Whitcomb et al., *Nature Biotechnology* 17: 804-807 (1999)), sondas Sunrise (Nazarenko et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 2516-2521 (1997)), sondas asistidas por conformación (Cook, R., solicitud de patente estadounidense en trámite y asignada en forma común US 2007/0059752, presentada el 9 de junio de 1999), sondas LightUp basadas en ácido peptidonucleico (Kubista et al., WO 97/45539, diciembre de 1997), colorantes de ADN específicos bicatenarios (Higuchi et al., *Bio/Technology* 10: 413-417 (1992), Wittwer et al., *BioTechniques* 22: 130-138 (1997)) y similares. Estos y otros motivos de sonda con los cuales se pueden usar los presentes atenuadores se revisan en NONISOTOPIC DNA PROBE TECHNIQUES, Academic Press, Inc. 1992.

Los oligómeros para uso en las sondas de la invención pueden tener cualquier tamaño adecuado y están preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 nucleótidos y más preferiblemente todavía, de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos. En las sondas etiquetadas doblemente (fluoróforo-atenuador), la fracción donante se separa preferiblemente del atenuador por al menos aproximadamente 6, preferiblemente por lo menos aproximadamente 8, preferiblemente por lo menos aproximadamente 10 nucleótidos, y más preferiblemente por al menos aproximadamente 15 nucleótidos. En diversas realizaciones, la fracción donante está unida preferiblemente a los nucleótidos terminales 3' o 5' de la sonda. La fracción atenuadora también está unida preferiblemente a los nucleótidos terminales 3' o 5' de la sonda. Más preferiblemente, las fracciones donante y aceptora se unen a los nucleótidos de los terminales 3' y 5' o 5' y 3' de la sonda, respectivamente, aunque también es útil la colocación interna.

La secuencia y longitud precisas de una sonda de ácido nucleico de la invención depende en parte de la naturaleza del polinucleótido objetivo al que se une. La posición y la longitud de unión pueden variarse para conseguir las propiedades adecuadas de hibridación y de fusión para una realización particular. En muchas de las referencias reconocidas en la técnica se pueden encontrar guías para tomar tales decisiones de diseño.

En algunas realizaciones, el nucleótido del terminal 3' de la sonda de ácido nucleico se bloquea o se hace incapaz de extensión por una polimerasa de ácido nucleico. Dicho bloqueo se lleva a cabo convenientemente mediante la unión de una fracción donadora o aceptora a la posición del terminal 3' de la sonda de ácido nucleico, ya sea directamente o mediante una fracción enlazadora.

El ácido nucleico puede comprender ADN, ARN o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos. Tanto la sonda como el ácido nucleico objetivo pueden estar presentes como una cadena simple, dúplex, tríplex, etc. Además, el ácido nucleico puede modificarse en la fracción de la base, la fracción de azúcar o la cadena principal de fosfato con otros grupos tales como etiquetas radioactivas, aglutinantes del surco menor, agentes de intercalación, hidrocarburos acetilénicamente insaturados, grupos fluoroalquilo, fracciones donantes y/o aceptoras y similares.

Los oligómeros son útiles como cebadores que son secuencias discretas o como cebadores con una secuencia aleatoria. Los cebadores de secuencia aleatoria tienen generalmente aproximadamente 6 o 7 nucleomonómeros de longitud. Dichos cebadores pueden usarse en diversos protocolos de amplificación de ácidos nucleicos (PCR, reacción en cadena de ligasa, etc.) o en protocolos de clonación. Las sustituciones en posición 5 de la invención generalmente no interfieren con la capacidad del oligómero para funcionar como cebador. Los oligómeros de la invención que tienen modificaciones 2' en sitios distintos del residuo terminal 3', otras modificaciones que hacen que el oligómero RNasa H sea incompetente o bien estable a la nucleasa puede usarse ventajosamente como sondas o cebadores para secuencias de ARN o ADN en extractos celulares u otras soluciones que contienen nucleasas. De este modo, se pueden usar los oligómeros en protocolos para amplificar el ácido nucleico en una muestra mezclando el oligómero con una muestra que contiene ácido nucleico objetivo, seguido por hibridación del oligómero con el ácido nucleico objetivo y amplificación del ácido nucleico objetivo por PCR, LCR u otros métodos adecuados.

Los oligómeros sometidos a derivación con agentes quelantes tales como EDTA, DTPA o análogos de ácido 1,2-diaminociclohexano-acético pueden utilizarse en diversos ensayos de diagnóstico in vitro como se describe (patentes estadounidenses Nos. 4.772.548, 4.707.440 y 4.707.352). Alternativamente, los oligómeros pueden someterse a derivación con agentes entrelazadores tales como 5-(3-yodoacetamidoprop-1-il)-2'-desoxiuridina o 5-(3-(4-bromobutiramido)prop-1-il)-2'-desoxiuridina y utilizado en diversos métodos o kits de ensayo como se describe (publicación internacional No. WO 90/14353).

Además de los usos anteriores, la capacidad de los oligómeros para inhibir la expresión génica puede verificarse en

sistemas *in vitro* midiendo los niveles de expresión en células objetivo o en sistemas recombinantes, mediante cualquier método adecuado (Graessmann, M. et al., *Nucleic Acids Res.* (1991) 19: 53-59).

Las condiciones que favorecen la hibridación entre el oligómero y moléculas de ácido nucleico objetivo pueden determinarse empíricamente por los expertos en la técnica y pueden incluir temperaturas óptimas de incubación, concentraciones de sales, composiciones de duración y base de sondas de análogos de oligonucleótidos y concentraciones de moléculas de oligómeros y ácidos nucleótidos de la muestra. Preferiblemente, la hibridación se realiza en presencia de al menos magnesio 1 milimolar y a un pH que está por encima de 6,0. En algunas realizaciones, puede ser necesario o deseable tratar una muestra para hacer que las moléculas de ácido nucleico en la muestra sean monocatenarias antes de la hibridación. Ejemplos de tales tratamientos incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con base (preferiblemente seguido de neutralización), incubación a alta temperatura o tratamiento con nucleasas.

Además, debido a que la dependencia de la sal de la hibridación con los ácidos nucleicos está determinada en gran medida por la densidad de carga de la cadena principal de un análogo de oligonucleótido de hibridación, aumentando la relación de los monómeros de pPNA en un oligómero de HypNA-pPNA o un oligómero de SerNA-pPNA puede aumentar la dependencia de sal de la hibridación. Esto puede usarse ventajosamente en los métodos aquí descritos en los que puede ser deseable en algunos aspectos poder aumentar la rigurosidad de la hibridación cambiando las condiciones de salinidad, por ejemplo, o liberar un ácido nucleico hibridado reduciendo la concentración de sal. En aún otros aspectos de la presente invención, puede ser deseable tener una unión de alta afinidad de un análogo de oligonucleótido de la presente invención con un ácido nucleico en condiciones de baja salinidad. En este caso, es ventajoso mantener una proporción cercana a 1:1 de monómeros de HypNA con respecto a pPNA en un análogo de oligonucleótido de la presente invención.

El alto grado de especificidad de oligómeros en la unión a moléculas de ácido nucleico objetivo le permite al especialista seleccionar condiciones de hibridación que pueden favorecer la discriminación entre secuencias de ácido nucleico que comprenden un tramo de secuencia que es completamente complementaria a al menos una porción de uno o más oligómeros y moléculas de ácido nucleico objetivo que comprenden un tramo de secuencia que comprende un número pequeño de bases no complementarias dentro de una secuencia sustancialmente complementaria. Por ejemplo, se pueden seleccionar temperaturas de hibridación o de lavado que permitan híbridos estables entre moléculas de oligómero y ácido nucleico objetivo que son completamente complementarias a lo largo de un tramo de secuencia, pero promueven la disociación de híbridos entre moléculas de oligómero y de ácido nucleico objetivo que no son completamente complementarias, incluyendo aquellas que comprenden uno o dos faltas de correspondencia de las bases a lo largo de un tramo de secuencia complementaria. La selección de una temperatura para la hibridación y los lavados puede depender, al menos en parte, de otras condiciones, tales como la concentración de sal, la concentración de moléculas de oligómero y de ácido nucleico objetivo, las proporciones relativas de moléculas de oligómero con respecto a las de ácido nucleico, la longitud de los oligómeros a hibridar, la composición base de las moléculas de oligómero y de ácido nucleico objetivo, la composición monomérica de las moléculas análogas de oligonucleótidos, etc. Además, al seleccionar condiciones que favorezcan híbridos estables de moléculas completamente complementarias y desfavorecen híbridos estables entre moléculas de oligómero y de ácido nucleico objetivo que no están emparejadas por una o más bases, pueden tenerse en cuenta condiciones adicionales y, cuando se desee, alteradas, incluyendo pero sin limitarse a, la longitud del análogo de oligonucleótido a hibridar, la longitud del tramo de secuencia de complementariedad entre moléculas de oligómero y de ácido nucleico objetivo, el número de las bases no complementarias dentro de un tramo de secuencia de complementariedad, la identidad de bases no coincidentes, la identidad de bases en la proximidad de las bases no emparejadas, y la posición relativa de cualesquiera bases no coincidentes a lo largo de un tramo de complementariedad. (Véanse, por ejemplo, los Ejemplos 20, 27, 28 y 29). Los expertos en la técnica de la hibridación de ácidos nucleicos podrían determinar condiciones de hibridación y de lavado favorables en el uso de un oligómero para la hibridación con moléculas de ácido nucleico objetivo, dependiendo de la aplicación particular. "Condiciones favorables" pueden ser aquellas que favorecen los híbridos estables entre moléculas de oligómero y de ácido nucleico objetivo que son, al menos en parte, sustancialmente complementarias, incluyendo aquellas que comprenden una o más faltas de correspondencia.

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

Usando métodos tales como los descritos aquí, se puede determinar la temperatura de fusión del oligómero hibridado con moléculas de ácido nucleico objetivo de diferentes secuencias y se puede usar para determinar condiciones favorables para una aplicación dada. También es posible determinar empíricamente condiciones de hibridación favorables, por ejemplo, hibridando moléculas de ácido nucleico objetivo con oligómero que están unidas a un soporte sólido y detectar los complejos hibridados.

Las moléculas de ácido nucleico objetivo que están unidas a soportes sólidos o sondas oligoméricas de la presente invención pueden separarse conveniente y eficientemente de moléculas de ácido nucleico no unidas de la población en estudio mediante la unión directa o indirecta de sondas de oligómeros a un soporte sólido. Un soporte sólido puede lavarse con alta rigurosidad para eliminar moléculas de ácido nucleico que no están unidas a sondas de oligómeros. Sin embargo, la unión de sondas de oligómeros a un soporte sólido no es un requisito de la presente invención. Por ejemplo, en algunas aplicaciones se pueden separar las moléculas de ácido nucleico unidas o no unidas por

centrifugación a través de una matriz o por separación de fases o algunas por otras formas de separación (por ejemplo, por precipitación diferencial) que pueden opcionalmente ser ayudadas por grupos químicos incorporados en el oligómero (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 6.060.242 concedida el 9 de mayo de 2000 a Nie et al.).

Sondas de captura de ácidos nucleicos

5 En una realización, se usa un ácido nucleico inmovilizado que comprende un atenuador y una fracción estabilizante como sonda de captura. La sonda de ácido nucleico puede unirse directamente a un soporte sólido, por ejemplo, por unión del nucleótido del terminal 3' o 5' de la sonda al soporte sólido. Más preferiblemente, sin embargo, la sonda está unida al soporte sólido por un enlazador (ver más arriba). El enlazador sirve para distanciar la sonda del soporte sólido. El enlazador es lo más preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 átomos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 átomos de longitud.

10 En diversas realizaciones, el soporte sólido se usa también como soporte de síntesis en la preparación del oligómero (sonda). La longitud y la estabilidad química del enlazador entre el soporte sólido y la primera unidad 3' de ácido nucleico desempeñan un papel importante en la síntesis eficiente y la hibridación de ácidos nucleicos unidos a un soporte. El brazo enlazador es preferiblemente suficientemente largo para que se pueda conseguir un alto rendimiento (> 97%) durante la síntesis automatizada. La longitud requerida del enlazador dependerá del soporte sólido particular utilizado. Por ejemplo, un enlazador de seis átomos es generalmente suficiente para conseguir un rendimiento > 97% durante la síntesis automatizada de ácidos nucleicos cuando se usa poliestireno altamente entrelazado como soporte sólido. El brazo enlazador tiene preferiblemente al menos 20 átomos de longitud para alcanzar un alto rendimiento (> 97%) durante la síntesis automatizada cuando se usa CPG como soporte sólido.

20 La hibridación de una sonda inmovilizada sobre un soporte sólido requiere generalmente que la sonda se separe del soporte sólido por al menos 30 átomos, más preferiblemente por lo menos 50 átomos. Con el fin de conseguir esta separación, el enlazador incluye generalmente un espaciador situado entre el enlazador y el extremo 3'. Para la síntesis de ácidos nucleicos, el brazo enlazador se une habitualmente al 3'-OH del extremo terminal 3' mediante un enlace éster que puede escindirse con reactivos básicos para liberar el ácido nucleico del soporte sólido.

25 Se conocen en la técnica una amplia variedad de enlazadores, que se pueden utilizar para unir la sonda de ácido nucleico al soporte sólido. El enlazador puede estar formado de cualquier compuesto, que no interfiera significativamente con la hibridación de la secuencia objetivo con la sonda unida al soporte sólido. El enlazador puede estar formado, por ejemplo, por un ácido nucleico homopolimérico, que puede añadirse fácilmente al enlazador mediante síntesis automatizada. Alternativamente, se pueden usar polímeros tales como polietilenglicol con adición de grupos funcionales como el enlazador. Estos polímeros se prefieren actualmente sobre los ácidos nucleicos homopoliméricos porque no interfieren significativamente con la hibridación de la sonda con el ácido nucleico objetivo. El polietilenglicol se prefiere particularmente porque está disponible comercialmente, es soluble en medios tanto orgánicos como acuosos, se pueden añadir funciones fácilmente y es completamente estable en condiciones de síntesis de ácido nucleico y posteriores a la síntesis.

35 Los fragmentos de enlace entre el soporte sólido, el enlazador y la sonda preferiblemente no se escinden durante la síntesis o eliminación de los grupos protectores de la base en condiciones básicas a alta temperatura. Estos enlaces pueden, sin embargo, ser seleccionados de grupos que son escindibles bajo una variedad de condiciones. Ejemplos de enlaces actualmente preferidos incluyen enlaces carbamato, éster y amida.

Detección de ácidos nucleicos en muestras

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

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

50 Una muestra puede ser del medio ambiente, tal como de un cuerpo de agua o del suelo, o de una fuente de alimento, bebida o agua, una fuente industrial, área de trabajo, área pública o área de estar. Una muestra puede ser un extracto, por ejemplo, un extracto líquido de una muestra de suelo o de alimento. Una muestra puede ser una solución elaborada a partir de un lavado o remojo, o suspensión de un hisopo de artículos tales como herramientas, prendas de vestir, artefactos u otros materiales.

Una muestra puede ser una muestra no procesada o procesada; el procesamiento puede implicar etapas que aumentan

la pureza, concentración o accesibilidad de los componentes de la muestra para facilitar el análisis de la misma. Como ejemplos no limitativos, el procesamiento puede incluir etapas que reducen el volumen de una muestra, remueven o separan componentes de una muestra, solubilizan una muestra o uno o más componentes de la muestra, o alteran, modifican, exponen, liberan o aíslan componentes de una muestra. Ejemplos no limitativos de tales procedimientos son centrifugación, precipitación, filtración, homogeneización, lisis celular, unión de anticuerpos, separación celular, etc. Por ejemplo, en algunas realizaciones preferidas, la muestra es una muestra de sangre que se procesa al menos parcialmente, por ejemplo, mediante la eliminación de los glóbulos rojos, por concentración, por selección de uno o más tipos de células o virus (por ejemplo, glóbulos blancos o células patógenas), o por lisis de células, etc.

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

Un oligómero o soporte sólido puede ser cualquier formato de oligómero descrito en la presente memoria, o cualquier oligómero que comprende un componente monómero, dímero o que no es ácido nucleico (por ejemplo, un enlazador, fluoróforo, atenuador, fracción estabilizante) descrito en la presente memoria. Un análogo de oligonucleótido usado en los métodos aquí descritos puede ser de cualquier longitud y de cualquier composición de base, y puede comprender uno o más fracciones de ácido nucleico, péptidos, proteínas, lípidos, carbohidratos, esteroides y otras fracciones bioquímicas y químicas. Puede proporcionarse un análogo de oligonucleótido en solución o unido a un soporte sólido. En algunas realizaciones preferidas, el oligómero comprende residuos de HypNA y pPNA, y puede comprender residuos de HypNA y pPNA en proporciones de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:3. Más preferiblemente, el oligómero usado en los métodos descritos en la presente invención comprende proporciones de residuos de HypNA a pPNA de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:2.

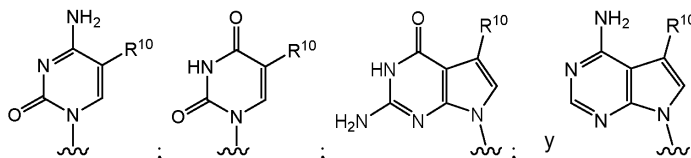
Los métodos de detección para ácidos nucleicos unidos son bien conocidos en la técnica y pueden incluir el uso de un marcador detectable que está unido o incorporado en moléculas de ácido nucleico de la población en estudio o que se une o se incorpora a una molécula de ácido nucleico objetivo hibridada o complejo de molécula de ácido nucleico objetivo hibridada. Los marcadores detectables para las moléculas de ácido nucleico son bien conocidos en la técnica, y comprenden moléculas fluorescentes tales como fluoróforos (incluidos los expuestos aquí), radioisótopos, grupos químicos alterados en masa, miembros de unión específica tales como biotina que pueden ser detectados por moléculas de generación de señales, y similares. Las etiquetas detectables también se pueden incorporar o unirse a un oligómero, por ejemplo, en los casos en que se utiliza la hibridación en sándwich usando un oligómero señal para la detección, o la detección se lleva a cabo usando un miembro de unión específico, tal como un anticuerpo que reconoce los complejos de moléculas de ácido nucleico objetivo/oligómero. Los soportes sólidos pueden ser escaneados, expuestos a una película, inspeccionados visualmente, etc. para determinar la presencia de un marcador detectable y, de este modo, determinar la unión de una molécula de ácido nucleico objetivo a un oligómero inmovilizado en un soporte sólido tal como los de la invención.

Kits

Un aspecto aquí descrito es la formulación de kits que facilitan la práctica de síntesis usando soportes sólidos y ensayos usando oligómeros, como se ha descrito anteriormente. Los kits típicamente comprenden un soporte sólido u oligómero, ya sea presente como una especie químicamente reactiva útil para preparar conjugados, o presente como un oligómero terminado en el que el oligómero es un miembro de par de unión específica. El kit opcionalmente comprende además uno o más agentes reguladores, típicamente presentes como una solución acuosa. Los kits opcionalmente comprenden además reactivos de detección adicionales, un medio de purificación para purificar la sustancia marcada resultante, patrones de luminiscencia, enzimas, inhibidores enzimáticos, disolvente orgánico, o instrucciones para llevar a cabo un ensayo de la invención. Otros formatos para kits serán evidentes para los expertos en la técnica.

A modo de resumen, en las realizaciones ejemplares, la presente invención proporciona:

un uso de una sonda para la detección de un polimorfismo en secuencias objetivo de ácido nucleico, comprendiendo la sonda un oligómero de ácido nucleico que comprende una base que tiene una fórmula seleccionada entre:



en las que R¹⁰ es una fracción alquínilo seleccionada del grupo que consiste en: etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo, 1-pentinilo, 1,3-pentadiinilo, fenil-etinilo, piridin-etinilo, pirimidin-etinilo, triazin-etinilo, tiofen-etinilo, tiazol-etinilo e imidazol-etinilo; y

un atenuador de energía de fluorescencia que comprende:

a) al menos tres residuos, cada uno seleccionado independientemente de arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido, en donde el primer residuo está unido covalentemente al segundo residuo a través de un primer enlace diazo exocíclico y en donde el primer o el segundo residuo está unido covalentemente al tercer residuo a través de un segundo enlace diazo; o

b) al menos dos residuos, cada uno independientemente seleccionado de arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido, en donde el primer residuo está unido covalentemente al segundo residuo a través de un enlace diazo exocíclico y al menos uno de los residuos es un miembro seleccionado a partir de arilo policíclico sustituido o no sustituido y grupos heteroarilo policíclicos sustituidos o no sustituidos; en donde los grupos arilo y heteroarilo tienen de 1 a 3 anillos; y

en donde dicho atenuador está unido en el extremo 3' o en el extremo 5' de dicho oligómero de ácido nucleico; en donde el oligómero contiene de 8 a 30 nucleomonómeros.

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

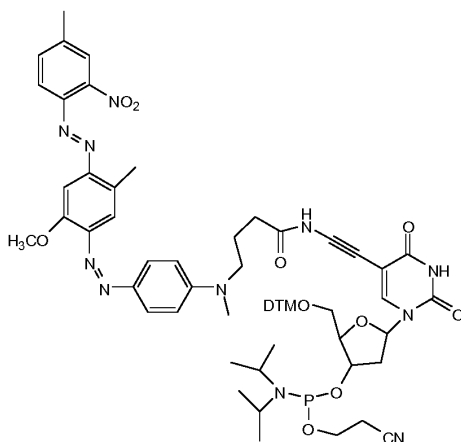
Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de CPH BHQ1-Plus

Se preparó 1-O-DMT-2-(N-Fmoc-4-aminobutiril-1,3-propanodiol 1 (Figura 1) de acuerdo con Nelson, et al., patente de Estados Unidos No. 5.942.910 (1999), excepto porque se utilizó una mezcla de THF, agua y Na₂CO₃ (en lugar de DMF) durante la etapa de adición de Fmoc que conduce a 1. Después de la purificación por cromatografía en columna, se eliminó el grupo Fmoc de 1 con metilamina en etanol y después de una eliminación rigurosa de la metilamina por evaporación conjunta con piridina, se añadió ácido 9-acridinacarboxílico activado con BOP en DMF. Se aisló el 1-O-DMT-2-(N-carboxi-acridina-4-aminobutiril)-1,3-propanodiol, 2, resultante mediante eliminación de los disolventes y cromatografía en columna. Después de un secado adicional por evaporación conjunta de piridina seca, se añadió anhídrido de ácido diglicólico para producir 1-O-DMT-2-(N-carboxiacridina-4-aminobutiril)-3-O-diglicolato-1,3-propanodiol, 3, aislado como su sal de trietilamina después de la cromatografía en columna. Se añadió 3 a aminopropil CPG, después de la activación con BOP y NMM, para producir DMT acridina CPG 4. Los grupos amina que no reaccionaron en la CPG se protegieron (acetilaron) con una mezcla de anhídrido acético y n-metilimidazol en acetonitrilo. Se determinó que la carga de DMT de CPG 4 era de 45 a 80 micromoles por gramo, encontrada por destilación (3% de DCA/DCM) de una cantidad del soporte seco y análisis colorimétrico.

De acuerdo con la Fig. 2, CPG 4 se destriló (3% de DCA/DCM), se lavó y se secó por evaporación conjunta con piridina (Esquema 2). Se añadió amidita de BHQ1 DMT (Cook, et al., patente de Estados Unidos No. 7.109.312 (2006)) a la CPG destrilada y se activó con etiltiotetrazol 0,5 M. Después de 2 minutos, se lavó el CPG con MeCN y se oxidó con una solución de yodo, piridina y agua en THF. El soporte 5 se lavó, se acetilo como anteriormente, después se lavó bien y se secó. La carga final de DMT fue de 30 - 50 micromoles/g.

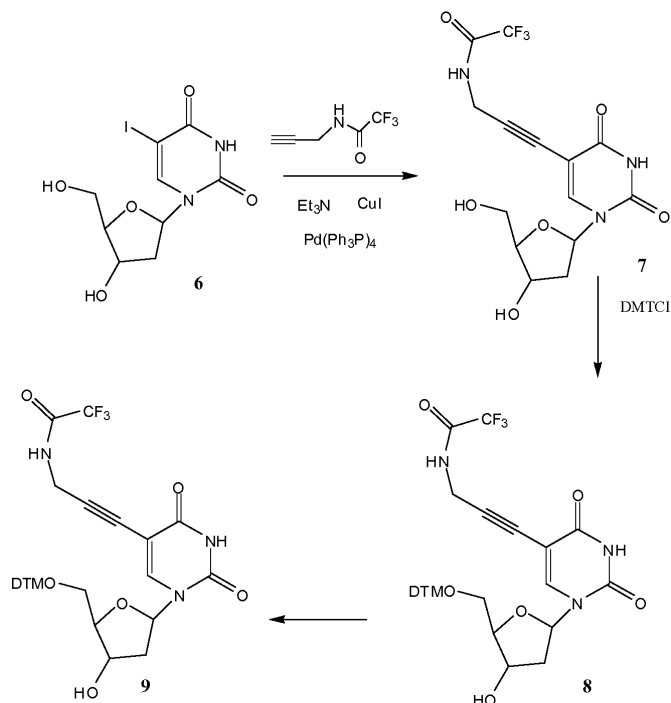
Ejemplo 2: Síntesis de 5'-DMTdU-5-alkinil(BHQ1)3'-diisopropil cianoetil fosforamidita



12

Comenzando con 5-yodouridina 6, se elaboró el compuesto 9 en una síntesis en 5 etapas. En primer lugar, el acoplamiento de Sonogashira (JACS 2005, 127, 15071) con propargilamina trifluoroacetamida, yoduro de cobre y tetrakis(trifenil)fosfina paladio (0) en DMF con trietilamina produjo el nucleótido 7, 5-propargil(trifluoroacetamida), con un rendimiento del 37% después de cromatografía de sílice. El nucleósido se secó bien y se añadió el grupo 5'DMT

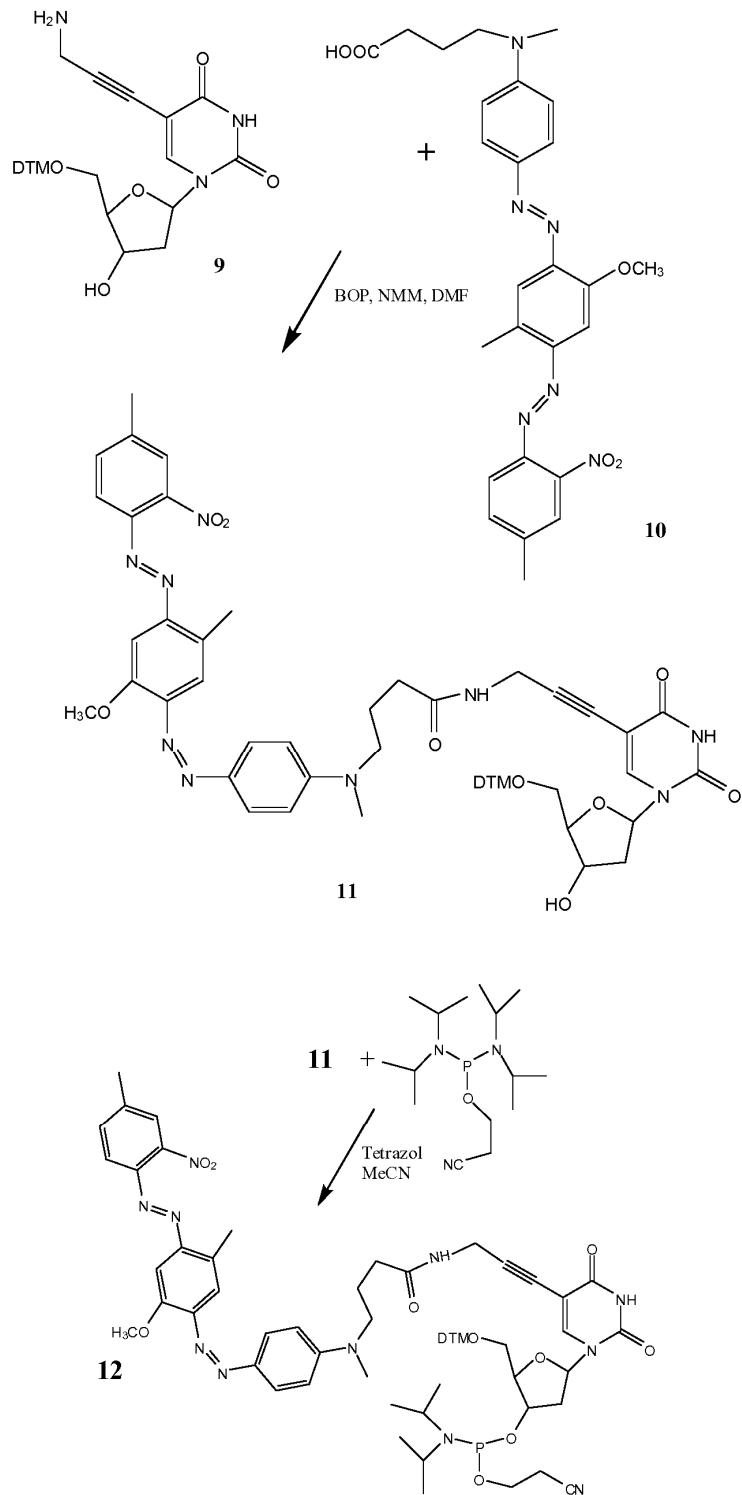
utilizando cloruro de DMT en piridina seca para producir 8 μ L con un rendimiento del 87% después de cromatografía. El grupo protector de amina de TFA se eliminó con metilamina en etanol, para producir el nucleósido de 5-propargilamina. A continuación, se añadió ácido carboxílico BHQ C3 al nucleósido de amina con BOP y N-metilmorfolina para producir el nucleósido 11, 5'-DMTdU-5-alquinil(BHQ1).



5

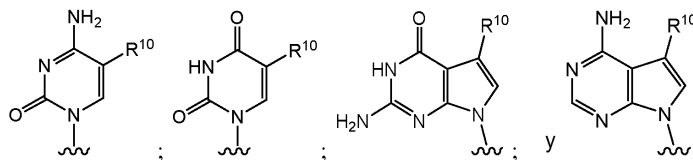
Después de secar por evaporación a partir de piridina, el nucleósido 11 se convirtió en 5'-DMTdU-5-alquinil(BHQ1)3'-diisopropil cianoetil fosforamidita 12 con tetraisopropil cianoetil fosforamidita y tetrazol en una mezcla de acetonitrilo seco y diclorometano. Después de la purificación en una columna de sílice con un gradiente de metanol en diclorometano con piridina al 2%, se obtuvieron 700 mg de 12. La fosforamidita se acopló a 5'-TTTTTTTTTT-3' inmovilizado sobre CPG con la química estándar de fosforamidita. El análisis del producto por ESMS mostró una masa de 3.809,5 AMU (calculada 3.808,5).

10



REIVINDICACIONES

1. Uso de una sonda para la detección de un polimorfismo en secuencias objetivo de ácido nucleico, comprendiendo la sonda un oligómero de ácido nucleico que comprende una base que tiene una fórmula seleccionada de:



5 en las que R¹⁰ es una fracción alquililo seleccionada del grupo que consiste en: etinilo, 1-propinilo, 1-butinilo, 1-pentinilo, 1,3-pentadiinilo, fenil-etinilo, piridin-etinilo, pirimidin-etinilo, triazin-etinilo, tiofen-etinilo, tiazol-etinilo e imidazol-etinilo; y

un atenuador de energía de fluorescencia que comprende:

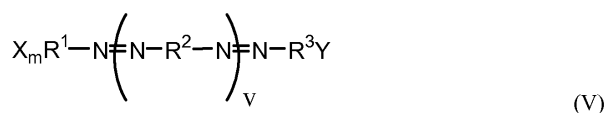
10 a) al menos tres residuos, cada uno seleccionado independientemente de arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido, en donde el primer residuo está unido covalentemente al segundo residuo a través de un primer enlace diazo exocíclico y en donde el primer o el segundo residuo está unido covalentemente al tercer residuo a través de un segundo enlace diazo; o

15 b) al menos dos residuos, cada uno independientemente seleccionado de arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido, en donde el primer residuo está unido covalentemente al segundo residuo a través de un enlace diazo exocíclico y al menos uno de los residuos es un miembro seleccionado a partir de arilo policíclico sustituido o no sustituido y grupos heteroarilo policíclicos sustituidos o no sustituidos; en donde los grupos arilo y heteroarilo tienen de 1 a 3 anillos; y

en donde dicho atenuador está unido en el extremo 3' o en el extremo 5' de dicho oligómero de ácido nucleico;

en donde el oligómero contiene de 8 a 30 nucleomonómeros.

20 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho atenuador es de una estructura de acuerdo con la Fórmula V:



en la que

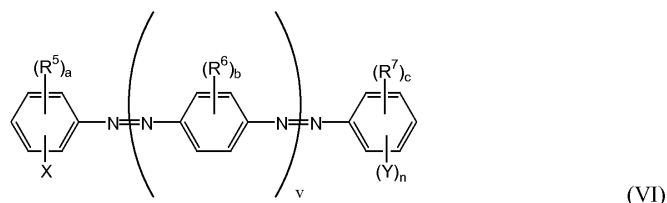
25 R¹, R² y R³ son miembros seleccionados independientemente entre arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido;

X y Y son miembros seleccionados independientemente entre un grupo funcional reactivo y un fragmento de enlace que une covalentemente a dicho atenuador al oligómero de ácido nucleico, con la condición de que al menos uno de X y Y sea dicho fragmento de enlace;

m es un número entero de 0 a 5, de manera que cuando m es mayor que 1, los grupos X son iguales o diferentes; y

30 v es un número entero de 1 a 10.

3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho atenuador es de una estructura de acuerdo con la Fórmula VI:



en la que

35 R⁵, R⁶ y R⁷ son miembros seleccionados independientemente entre -NR'R'', arilo sustituido o no sustituido, nitro, alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido y alcoxi C₁-C₆ sustituido o no sustituido,

en donde R' y R" se seleccionan independientemente entre H y alquilo C₁-C₆ sustituido o no sustituido;

X y Y son miembros seleccionados independientemente entre un grupo funcional reactivo y un fragmento de enlace que une covalentemente a dicho atenuador con el oligómero de ácido nucleico, con la condición de que al menos uno de X y Y sea dicho fragmento de enlace;

5 n es un número entero de 0 a 1;

a es un número entero de 0 a 4, de manera que cuando a es mayor que 1, los grupos R⁵ son iguales o diferentes;

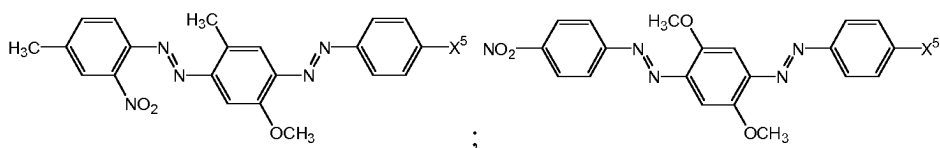
b es un número entero de 0 a 4, de manera que cuando (v x b) es mayor que 1, los grupos R⁶ son iguales o diferentes;

c es un número entero de 0 a 5, de manera que cuando c es mayor que 1, los grupos R⁷ son iguales o diferentes; y

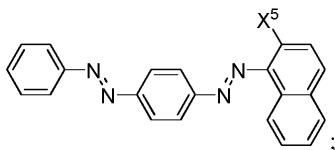
10 v es un número entero de 1 a 10, de manera que cuando v es mayor que 1, el valor de b en cada uno de los anillos fenilo b es igual o diferente.

4. El uso de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde v es 1.

5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho atenuador tiene una estructura seleccionada de:



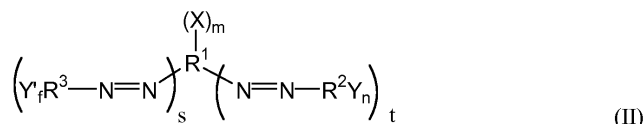
15 y



en las que X⁵ es un fragmento de enlace que une covalentemente a dicho atenuador con el oligómero de ácido nucleico.

6. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho atenuador es de una estructura de acuerdo con la Fórmula (II)

20

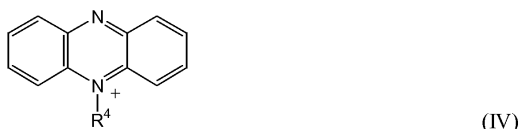


en la que

R¹, R² y R³ son miembros seleccionados independientemente entre arilo sustituido o no sustituido y heteroarilo sustituido o no sustituido;

en donde un miembro seleccionado entre R¹, R² y R³ incluye una estructura de acuerdo con la Fórmula IV:

25



en la que R⁴ es un miembro seleccionado entre alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

30 X, Y y Y' son miembros seleccionados independientemente entre un grupo funcional reactivo y un fragmento de enlace que une covalentemente a dicho atenuador al oligonucleómero de ácido nucleico, con la condición de que al menos uno de X, Y y Y' sea dicho fragmento de enlace;

f es un número entero de 0 a 4, de manera que cuando (f x s) es mayor que 1, los grupos Y' son iguales o diferentes;

m es un número entero de 0 a 5, de manera que cuando m es mayor que 1, los grupos X son iguales o diferentes;

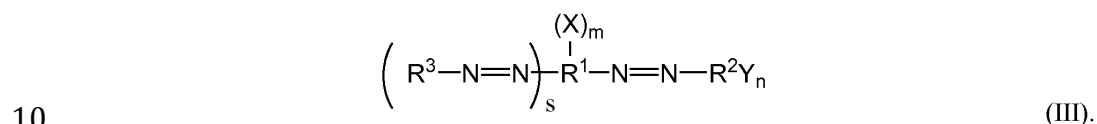
n es un número entero de 0 a 6, de manera que cuando (n x t) es mayor que 1, los grupos Y son iguales o diferentes;

s es un número entero de 0 a 6, de manera que cuando s es mayor que 1, los grupos R³ son iguales o diferentes; y

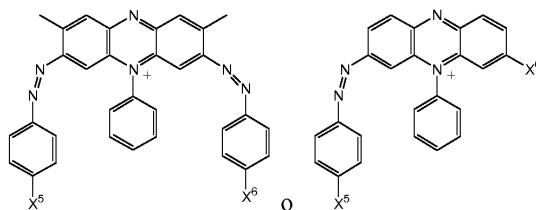
t es un número entero de 1 a 6, de manera que cuando t es mayor que 1, los grupos R² son iguales o diferentes, y cuando

5 t es 1 y s es 0, un miembro seleccionado entre R¹, R² y combinaciones de los mismos es un miembro seleccionado de grupos arilo policíclico sustituido o no sustituido y heteroarilo policíclico sustituido o no sustituido; en donde los grupos arilo y heteroarilo tienen de 1 a 3 anillos.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho atenuador es de una estructura de acuerdo con la Fórmula (III):



8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho atenuador tiene la estructura:



en las que

15 X⁵ y X⁶ son miembros seleccionados independientemente entre H, un grupo funcional reactivo y un fragmento de enlace que une covalentemente dicho agente atenuador al oligómero de ácido nucleico, con la condición de que al menos uno de X⁵ y X⁶ sea un fragmento de enlace de este tipo.

9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en el que dicho fragmento de enlace es NH o NR^t, en donde R^t se selecciona de alquilo sustituido o no sustituido y heteroalquilo sustituido o no sustituido.

20 10. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicho oligómero de ácido nucleico es la sonda, preferiblemente en donde dicha sonda se selecciona de balizas moleculares, sondas Scorpion, sondas Sunrise, sondas conformacionalmente asistidas, sondas LightUp, sondas de detección de invasores y sondas TaqMan.

11. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicha fracción alquinilo es 1-propinilo.

25 12. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el oligómero de ácido nucleico comprende además un fluoróforo.

13. El uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el polimorfismo en secuencias objetivo de ácido nucleico es un polimorfismo de nucleótido único.

30 14. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el polimorfismo en las secuencias objetivo de ácido nucleico se produce a partir de una supresión de un nucleótido o una inserción de un nucleótido con respecto a un alelo de referencia.

FIGURA 1

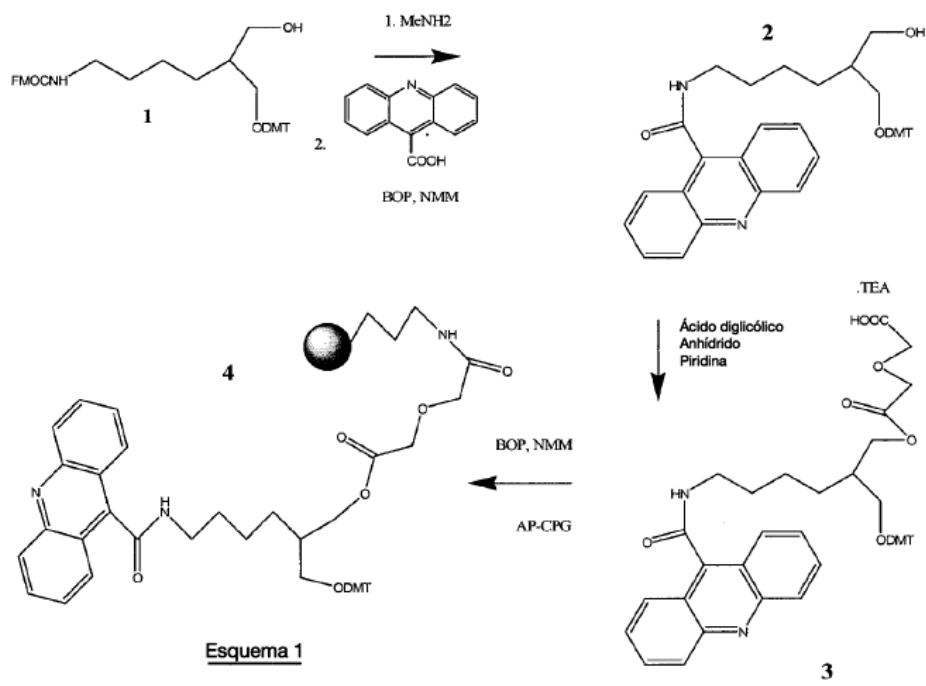
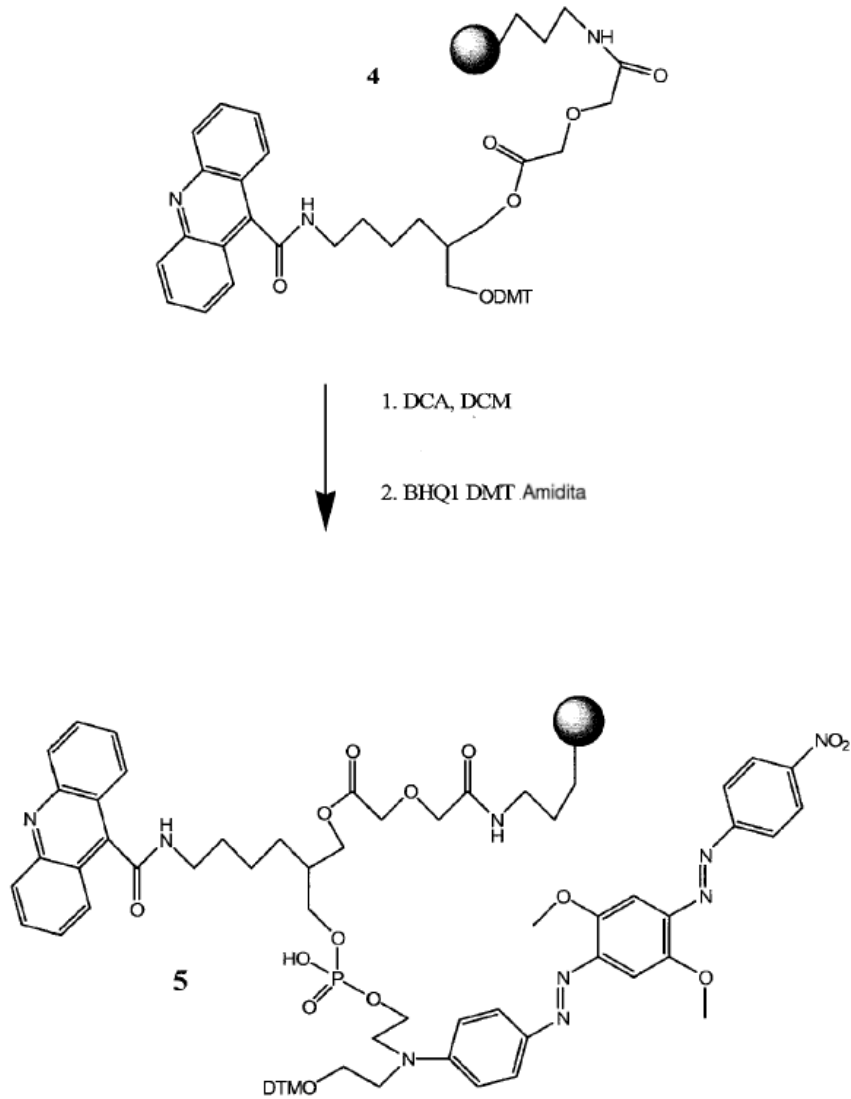


FIGURA 2



Esquema 2