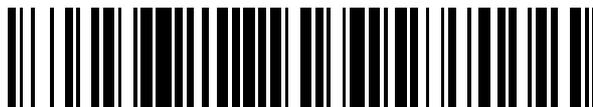


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 351 570**

21 Número de solicitud: 200901508

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **30.06.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **08.02.2011**

Fecha de la concesión: **18.11.2011**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **30.11.2011**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
30.11.2011

73 Titular/es:
**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
PLAZA DE SAN DIEGO SN
28801 ALCALA DE HENARES, MADRID**

72 Inventor/es:
**DOMINGO GALAN, ALBERTO;
GARCIA HERNANDEZ, VERONICA y
VAQUERO LOPEZ, JUAN JOSE**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **PROCEDIMIENTO MINIATURIZADO EN PLACAS MULTIPOCILLO PARA ANALIZAR LA UNIÓN DE LIGANDOS A ÁCIDOS NUCLEICOS MEDIANTE LA OBTENCIÓN DE CURVAS DE FUSIÓN TÉRMICA.**

57 Resumen:

Procedimiento miniaturizado en placas multipocillo para analizar la unión de ligandos a ácidos nucleicos mediante la obtención de curvas de fusión térmica. Se describe un procedimiento miniaturizado en placas multipocillo para analizar la unión de ligandos a ácidos nucleicos mediante curvas de fusión térmica. Para conseguir la miniaturización se utilizan estrategias de marcaje fluorescente que permitan la determinación de la proporción de complejos asociados y disociados en fase homogénea. Las mezclas de reacción a analizar se disponen en distintos pocillos de una placa multipocillo. A continuación se somete la placa a un incremento de temperatura gradual programado en el tiempo, tomando lecturas de intensidad de fluorescencia de cada pocillo tras cada paso de incremento de temperatura. Puede ejecutarse también un programa de disminución gradual de temperatura, igualmente tomando lecturas de intensidad de fluorescencia con cada cambio. El cambio programado de temperatura y lectura de intensidad de emisión de fluorescencia se puede realizar en un aparato de PCR de tiempo real u otros equipos que permitan realizar dichas operaciones sobre placas multipocillo.

ES 2 351 570 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento miniaturizado en placas multipocillo para analizar la unión de ligandos a ácidos nucleicos mediante la obtención de curvas de fusión térmica.

5

Sector de la técnica

El procedimiento descrito en esta patente tiene aplicaciones en el análisis y caracterización de la interacción con ADN de compuestos con capacidad de unión a ésta macromolécula. Igualmente es aplicable a otros ácidos nucleicos como ARN, híbridos ADN-ARN, derivados o análogos de cualquiera de estos. El procedimiento miniaturizado que se describe permite estudiar la unión de un determinado ligando a oligonucleótidos de diferentes secuencias o de una colección de ligandos, estructuralmente relacionados o no, con oligonucleótidos de igual o diferente secuencia. El estudio comparativo de la unión de un determinado ligando a diferentes secuencias puede aplicarse a la determinación de la especificidad o preferencia de secuencia de dicha unión. El mismo tipo de estudio permite igualmente determinar diferencias de estabilidad local de los complejos formados.

15

La rapidez, bajo coste relativo y facilidad de automatización o robotización de este ensayo, en comparación con otros métodos de determinación de interacciones entre ligandos y ácidos nucleicos, permite o facilita la aplicación de este procedimiento a casi cualquier estudio que implique la interacción covalente o no covalente de ligandos con oligonucleótidos, tanto si dicha interacción es un fin en sí misma como si se trata de un medio para estudiar otros parámetros. Un ejemplo de esto último podría ser un estudio de estabilidad o mantenimiento de la capacidad funcional de un determinado compuesto con aplicación farmacológica que actúa mediante unión al ADN.

20

El estudio de la unión de ligandos al ADN es un proceso de utilidad muy diversa en el campo de la química, la biología y la medicina, tanto para fines de investigación como diagnósticos, así como en otros campos afines a estos.

25

Este método tiene una aplicabilidad a una gran variedad de compuestos y modos de interacción con ácidos nucleicos, por lo que puede emplearse para la búsqueda de nuevos compuestos con capacidad de unión a ADN u otros ácidos nucleicos. Esto es de especial interés en la búsqueda de fármacos que tengan a estas moléculas como diana, o bien de ligandos para mareaje y localización de ácidos nucleicos.

30

Estado de la técnica

Hasta la actualidad se han descrito numerosos procedimientos y aparatos que permiten realizar diversas formas de caracterización de la unión de ligandos al ADN.

35

La mayor parte de los métodos descritos no son susceptibles de miniaturización ni procesamiento paralelo que permita su aplicación para un gran número de muestras. En dichos métodos el consumo de reactivos y tiempo de realización o manipulación es elevado, por lo que no pueden aplicarse para el estudio de diversos compuestos y/o secuencias nucleotídicas. Cabe citar, entre este tipo de métodos, las técnicas calorimétricas, las electroforéticas (electroforesis en gel, capilar), el *footprinting*, las técnicas espectrofotométricas (como la espectrofotometría ultravioleta-visible, el dicroísmo circular o la fluorimetría), la cristalografía (o difracción de rayos X) y la resonancia magnética nuclear (o RMN). Todos estos métodos tienen su campo de aplicación específico, así como sus ventajas y capacidades en el estudio de la interacción de ligandos con ácidos nucleicos, pero requieren cantidades relativamente elevadas de reactivos, equipamientos poco frecuentes y costosos o procesamiento secuencial de las muestras. Pueden llegar a proporcionar mucha información y muy precisa sobre el proceso en estudio, pero no comparten el campo de aplicación práctica con el método descrito en esta patente puesto que no pueden aplicarse de forma realista a un número elevado de ensayos, por ejemplo a colecciones de muchos compuestos o sobre muchas secuencias de ácido nucleico, o en situaciones donde no hay gran disponibilidad de los compuestos a analizar o el tiempo dedicable a cada ensayo es limitado.

40

El procedimiento descrito en esta patente tiene como único antecedente relacionado la utilización de un aparato de PCR en tiempo real (termociclador) para la lectura de la disociación del ADN marcado con fluorescencia (referencias 1 a 4). En estos trabajos describen el uso de un termociclador para PCR en tiempo real que trabaja con mezclas de reacción contenidas en tubos capilares individuales que se introducen en una pieza en forma de carrusel rotativo que aloja hasta 32 tubos (LightCycler[®], Roche).

45

No se ha encontrado ninguna descripción de un ensayo de unión de ligandos a ácidos nucleicos mediante análisis de curvas de fusión térmica en placa multipocillo. Esta es la novedad y utilidad fundamental, sencilla pero no obvia, que aporta el procedimiento descrito y reivindicado en esta patente. Todas las demás reivindicaciones son derivadas de ésta.

50

Referencias citadas

1. Darby, R.A.J., M. Sollogoub, C. McKeen, L. Brown, A. Risitano, N. Brown, C. Barton, T. Brown, and K. Fox, *High throughput measurement of duplex, triplex and quadruplex melting curves using molecular beacons and the LightCycler. Nucleic Acids Research*, 2002. **30**: e39.

65

2. James, P.L., L. Le Strat, U. Ellervik, C. Bratwall, B. Nordén, T. Brown, and K.R. Fox, *Effects of hairpin polyamide on DNA melting: comparison with distamycin and Hoechst 33258*. *Biophysical chemistry*, 2004, **111**: 205-212.
3. James, P.L., E.E. Merkina, A.I. Khalaf, C.J. Suckling, R.W. Waigh, T. Brown, and K.R. Fox, *DNA sequence recognition by an isopropyl substituted thiazole polyamide*. *Nucleic Acids Research*, 2004, **32**(11): 3410-3417.
4. Rachwal, P.A. and K.R. Fox, *Quadruplex melting*. *Methods*, 2007, **43**(4): 291 -301.

Explicación de la invención

La invención consiste en un procedimiento miniaturizado para la determinación de la unión de compuestos a ácidos nucleicos en placas multipocillo, basado en el análisis de curvas de fusión térmica de los complejos. La realización del ensayo en placas multipocillo permite la ejecución en paralelo para un gran número de mezclas de reacción, al tiempo que facilita la manipulación y automatización de todo el proceso, desde el manejo de líquidos hasta el procesamiento de los datos. La clave para conseguir la miniaturización del ensayo es utilizar métodos muy sensibles y rápidos para la determinación de la proporción de complejos asociados y disociados. Esto se consigue gracias a diversas estrategias de mareaje con grupos o moléculas fluorescentes.

El procedimiento puede realizarse igualmente utilizando distintas formas o combinaciones de mareaje fluorescente y para la unión de ligandos o reactivos a distintos tipos de ácidos nucleicos o derivados. Para una mayor claridad, la siguiente explicación está referida a la unión de un ligando a ADN de doble hebra y utilizando una de las combinaciones de mareaje fluorescente más habituales y versátiles.

Para un estudio de unión de un determinado ligando "L" a un oligonucleótido de ADN de doble hebra con una secuencia específica predeterminada se comienza disponiendo de los oligonucleótidos correspondientes a las dos hebras complementarias, obtenidos por síntesis química con la secuencia de nucleótidos específica para el estudio que se quiera realizar. Uno de estos oligonucleótidos se sintetiza con un grupo fluorescente unido covalentemente en uno de los extremos, por ejemplo un derivado de la fluoresceína en el extremo 5-prima, y el complementario se sintetiza con un grupo amortiguador ("quencher") de la emisión de fluorescencia del anterior, unido covalentemente en el extremo contrario, por ejemplo un derivado de rodamina en el extremo 3-prima. Cuando ambos oligonucleótidos se asocian por complementariedad de bases se forma una estructura duplexa donde el extremo 5-prima de una hebra se encuentra muy próximo en el espacio al extremo 5-prima de la otra hebra. Los grupos fluorescente y amortiguador, por tanto, se encuentran muy próximos de forma que el segundo elimina muy eficientemente la emisión de fluorescencia del primero. El resultado práctico es que el estado duplexo de esta construcción emite muy poca intensidad de fluorescencia. La separación de las hebras por cualquier causa origina un aumento de la distancia entre los grupos fluorescente y amortiguador, de modo que disminuye la efectividad del último para eliminar la emisión del primero. El resultado práctico es que en el estado disociado de estos oligonucleótidos derivatizados se produce una importante emisión de fluorescencia. Con los controles adecuados, la simple determinación de la intensidad de emisión de fluorescencia de la mezcla de reacción que contiene estos oligonucleótidos permite conocer la proporción de los mismos que se encuentran en estado asociado y disociado.

Aprovechando esta propiedad podemos obtener una curva de disociación, también llamada de desnaturalización o de fusión, producida por cualquier condición o agente físico o químico en la mezcla de reacción. En nuestro caso se aplica un cambio gradual y programado de la temperatura y se van obteniendo simultáneamente lecturas de emisión de fluorescencia. Con las correcciones oportunas de blancos, cada lectura de dicha intensidad de emisión de una determinada mezcla de reacción a una determinada temperatura es directamente proporcional a la concentración de hebras disociadas o inversamente proporcional a la concentración de hebras asociadas en forma de duplex a dicha temperatura.

Representando todos estos valores expresados como porcentaje de cadena sencilla frente a la temperatura se obtiene lo que se denomina una curva de disociación o de fusión. La llamada curva de fusión realmente es una forma de representación del cambio con la temperatura de la constante de equilibrio aparente de la reacción de asociación-disociación global, según la ecuación de Van't Hoff.

$$\ln K_{eq} = -\frac{\Delta G^{\circ}}{RT} = -\frac{\Delta H^{\circ} - T\Delta S^{\circ}}{RT} = -\frac{\Delta H^{\circ}}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^{\circ}}{R}$$

Estas curvas tienen forma sigmoidea y están caracterizadas por un parámetro que es la temperatura de fusión (melting, T_m), que corresponde a la temperatura a la cual la mitad de las moléculas de ADN se encuentran en forma de cadena sencilla (y consecuentemente, la otra mitad se encuentra en forma de cadena doble).

La aplicación práctica deriva de que la unión de un ligando al ADN produce un aumento o disminución en la T_m así como otras alteraciones diversas en la curva de disociación, de modo que los datos obtenidos en presencia de distintas

concentraciones de ligando aportan información útil sobre la capacidad de unión de dicho ligando al ácido nucleico y sobre el complejo o producto formado en su caso.

La reacción de equilibrio de asociación-disociación de dos oligonucleótidos complementarios, S_1 , y S_2 , se puede expresar como $S_1 + S_2 \leftrightarrow D$, donde D representa el ADN de doble cadena. Si en la reacción participa además un ligando L que se une preferentemente al ADN de cadena doble, la reacción se puede expresar como $S_1 + S_2 + nL \leftrightarrow D: L_n$, donde $D: L_n$ (DL en lo sucesivo) representa el complejo formado por el ADN de cadena doble y n moléculas de ligando L . La constante de equilibrio para esta reacción viene dada por la expresión:

$$K = \frac{[DL]}{[S_1][S_2][L]^n}$$

Si el ligando se une preferentemente a ADN de cadena doble, cada aumento en la concentración de ligando causará un incremento en la temperatura de fusión. Esto se debe a que, para una temperatura T fija, la constante de equilibrio K ha de ser la misma, independientemente de la concentración de ligando L . Por tanto, para que el valor de K se mantenga constante, al aumentar L es necesario que S_1 y S_2 disminuyan y, consecuentemente, DL aumente. Si imaginamos la curva de fusión como una representación de porcentaje de cadena sencilla en ordenadas (eje Y, vertical) frente a la temperatura en abscisas (eje X, horizontal), el aumento de concentración de ligando motiva un desplazamiento no lineal “hacia abajo” de todos los puntos que componen la curva de fusión, que se manifiesta como un aparente desplazamiento “hacia la derecha” de la curva sigmoidea, es decir, hacia una mayor temperatura de fusión T_m al aumentar la concentración de ligando.

Sin embargo, si L se une en mayor número a la forma en cadena sencilla se observará el efecto opuesto, esto es, una disminución de T_m . Por supuesto, si el ligando se une por igual a cadena doble y sencilla, o si no se une en absoluto, no se apreciará cambio en la T_m .

Esto constituye el fundamento principal de la mayoría de los estudios de interacción de ligandos con el ADN basados en el análisis de curvas de asociación-disociación térmica.

Modo de realización

Para llevar a cabo un ensayo realista, siguiendo el ejemplo anterior, se debe disponer de los oligonucleótidos de ADN con secuencia complementaria uno del otro y marcados como antes se indicaba, de modo que uno de ellos contenga un grupo fluorescente unido covalentemente en uno de los extremos, por ejemplo un derivado de la fluoresceína en el extremo 5-prima, y el oligonucleótido complementario contenga un grupo amortiguador o “quencher” de la emisión de fluorescencia del anterior, unido covalentemente en el extremo contrario, por ejemplo un derivado de rodamina en el extremo 3-prima. La estructura de doble cadena se obtiene mezclando ambos oligonucleótidos en proporciones equimoleculares. Para asegurar una correcta asociación la mezcla se lleva a 95°C y luego se deja enfriar lentamente hasta temperatura ambiente.

A continuación se preparan distintas mezclas de reacción conteniendo un medio tamponado adecuado, una concentración fija (por ejemplo 10^{-7} M) de oligonucleótido marcados, previamente asociados, y distintas concentraciones del ligando en estudio (por ejemplo entre 10^{-2} y 10^{-9} M). Estas mezclas de reacción se disponen en distintos pocillos de una placa multipocillo adecuada. El volumen total habitual de mezcla de reacción por pocillo es de 20 μ l en el caso de placas de 96 pocillos. Las mezclas de reacción pueden someterse opcionalmente a una incubación de duración y temperatura controladas para asegurar la formación y estabilización de los complejos entre el ligando y el ADN. A continuación se somete toda la placa a un programa de incremento de temperatura gradual (por ejemplo entre 20°C y 95°C, aumentando un grado cada 45 segundos) tomando lecturas de intensidad de fluorescencia de cada uno de los pocillos tras cada incremento de 1°C. Opcionalmente, dependiendo de los objetivos del estudio, puede ejecutarse a continuación un programa de disminución gradual de temperatura, igualmente tomando lecturas de intensidad de fluorescencia con cada cambio. Para este proceso de cambio de temperaturas y lectura de intensidad de emisión de fluorescencia se puede emplear un aparato de PCR cuantitativa o de tiempo real adecuado para el uso de placas multipocillo. Este aparato se emplea aquí como un espectrofluorímetro termostatzado programable y multicanal.

El aparato está conectado a un computador que almacena las lecturas de intensidad de fluorescencia en función de la temperatura para cada una de las mezclas de reacción en la placa multipocillo. Los datos se recuperan finalmente en formato de documento de texto separado por comas y se procesan y analizan con ayuda programas informáticos adecuados. Un experimento típico sobre placa de 96 pocillos, con 75 pasos de temperatura y lectura de cuatro canales de longitud de onda genera 28.800 valores numéricos. Con la opción de doble programa de aumento de temperatura (disociación) seguido de disminución de temperatura (asociación) representa 57.600 valores numéricos. Evidentemente, el análisis manual de esta cantidad de datos es imposible, de modo que se debe realizar con la ayuda de herramientas de software desarrolladas específicamente para este propósito.

El ejemplo descrito utiliza dos oligonucleótidos marcados diferencialmente con un grupo fluorescente y un grupo que extingue la emisión del anterior. La idea básica de la forma de realización se puede aplicar a otros esquemas de

mareaje o a la utilización de moléculas fluorescentes independientes, no unidas covalentemente a los oligonucleótidos, como por ejemplo el compuesto comercial denominado SYBR[®] Green, cuya emisión permita cuantificar la proporción de cadena doble y cadena sencilla.

5 La característica diferencial del procedimiento descrito en esta patente reside en el empleo de placas multipocillo en conjunción con el uso de diversas estrategias de mareaje con grupos o moléculas fluorescentes. Esta conjunción posibilita la miniaturización suficiente para permitir la aplicación del método a un gran número de muestras en un formato de placa multipocillo que facilita el procesamiento en paralelo, la automatización del cálculo y la robotización del proceso, incluyendo la dispensación de líquidos o la carga en aparatos.

10

Aplicación industrial

El procedimiento descrito y reivindicado en esta patente tiene distintas aplicaciones industriales. La primera aplicación consiste en su empleo como método rápido de determinación de unión de compuestos al ADN. Este método puede aplicarse, en primer lugar, para identificar entre un gran número de compuestos aquellos que se unen al ADN, por lo que puede emplearse para la búsqueda de nuevos compuestos con unión a ADN. Esto es de especial interés en la búsqueda de fármacos que tengan el ADN como diana, o bien de ligandos para mareaje y localización de ADN.

15 Por otro lado, puede aplicarse al estudio de identificación de la secuencia preferente de unión de un determinado ligando por el ADN.

Puede emplearse como método de ensayo de unión al ADN rápido, sensible y con mínimos requerimientos para cualquier aplicación que pueda requerir o aprovechar la información suministrada. Esto puede incluir estudios de estabilidad de compuestos, estudios de relación estructura-actividad (SAR) en familias de compuestos o estudios encaminados a seleccionar una secuencia adecuada para aplicar luego otras técnicas de determinación de la estructura del complejo más costosas, como RMN o cristalografía de difracción de rayos X.

20 Otra aplicación del método consiste en su aprovechamiento para el diseño de aparatos destinados a su realización, accesorios para otros aparatos con el mismo propósito, o comercialización de programas, por separado o asociados a aparatos, destinados al tratamiento de datos y cálculos relativos al procedimiento.

Otras aplicaciones consisten en la utilización de este procedimiento como parte de procesos que se comercialicen como servicios.

25 Todas las aplicaciones anteriores se extienden igualmente a cualquier tipo de ácidos nucleicos, híbridos, derivados o análogos.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento analítico miniaturizado y realizado en placas multipocillo para detectar el efecto de ligandos no covalentes, reactivos covalentes o condiciones físico-químicas de una mezcla de reacción sobre las propiedades de las interacciones no covalentes que mantienen una asociación entre cadenas o partes de una cadena de ácidos desoxirribonucleico, ribonucleico, moléculas o complejos híbridos o derivados de cualquiera de estos, basado en la modificación de la medición experimental del cambio con la temperatura de la constante de equilibrio aparente de la reacción global, simple o múltiple, de asociación-disociación entre las mencionadas cadenas de ácido nucleico.
- 10 2. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** por aplicarse a la determinación de la capacidad de unión de un determinado ligando o reactivo a un ácido nucleico o derivado.
- 15 3. Método, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por aplicarse a la determinación de la capacidad de unión de dicho ligando o reactivo a la forma simplexa o de hebra sencilla de dicho ácido nucleico o derivado.
- 20 4. Método, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por aplicarse a la determinación de la capacidad de unión de dicho ligando o reactivo a la forma duplexa o de doble hebra de dicho ácido nucleico o derivado.
- 25 5. Método, según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** por aplicarse a determinar la preferencia de unión del ligando o reactivo a la forma simplexa o duplexa de un ácido nucleico o derivado con una secuencia de bases determinada.
- 30 6. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** por aplicarse a determinar el grado de estabilización de la forma duplexa de un ácido nucleico o derivado inducido por la unión de un determinado ligando o reactivo.
- 35 7. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la cuantificación de la fracción de moléculas de ácido nucleico o derivado en forma duplexa presentes en la mezcla de reacción a cada temperatura se realiza mediante la inclusión en dicha mezcla de un ligando fluorescente auxiliar cuyas propiedades de fluorescencia cambian al estar unido al ácido nucleico respecto del estado libre.
- 40 8. Método, según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el ligando fluorescente auxiliar es SYBR Green.
- 45 9. Método, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la cuantificación de la fracción de moléculas de ácido nucleico o derivado en forma duplexa presentes en la mezcla de reacción a cada temperatura se realiza gracias a un mareaje covalente con uno o más grupos cromóforos, fluorescentes o no fluorescentes, en una o ambas hebras de dicho ácido nucleico.
- 50 10. Método, según la reivindicación 9, **caracterizado** porque el grupo o grupos marcadores se encuentran unidos covalentemente a uno o ambos extremos (5-prima y/o 3-prima o equivalentes) de una o ambas cadenas de ácido nucleico o derivado.
- 55 11. Método, según la reivindicación 9, **caracterizado** porque se emplean dos grupos fluorescentes distintos con propiedades espectroscópicas tales que la emisión de fluorescencia del primero es absorbida o extinguida por el segundo, estando cada uno de ellos unido a una de las hebras del ácido nucleico o derivado, de modo que en el estado duplexo se encuentran ambos grupos en proximidad y la intensidad de emisión de fluorescencia del primero resulta disminuida como consecuencia de la extinción por el segundo.
- 60 12. Método, según la reivindicación 11, **caracterizado** porque dichos dos grupos fluorescentes distintos se encuentran unidos a los extremos de cada cadena complementaria de ácido nucleico.
- 65 13. Método, según la reivindicación 11, **caracterizado** porque dichos dos grupos fluorescentes distintos se encuentran unidos a los extremos opuestos, 5-prima y 3-prima, de cada cadena complementaria de ácido nucleico, de modo que en la estructura duplexa del ácido nucleico se sitúan ambos grupos muy próximos en el espacio.
- 70 14. Método, según las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13, **caracterizado** porque se emplea un oligonucleótido con secuencia total o parcialmente autocomplementaria que forme dímeros o estructuras en horquilla.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200901508

②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.06.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q 1/68** (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RU 2182708 C2 (AS RUSSIA MOLECULAR BIOLOGY INST.) 20.05.2002, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 04.10.2010]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW200263, N° DE ACCESO 2002-588369.	1-14
A	DARBY, R.A.J. et al.: "High Throughput Measurement of Duplex, Triplex and Quadruplex Melting Curves Using Molecular Beacons and a LightCycler", Nucleic Acids Res. (2002), vol. 30 (9) e39, todo el documento.	1-14
A	WO 2007018734 A2 (BIO-RAD LAB INC) 15.02.2007, todo el documento.	1-13
A	DROBYSHEV, A.L. et al.: "Massive Parallel Analysis of DNA-Hoechst 33258 Binding Specificity with a Generic Oligodeoxyribonucleotide Microchip", Nucleic Acids Res. (1999), vol. 27 (20), pp.: 4100-4105.	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

11.01.2011

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.01.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RU 2182708 C2 (AS RUSSIA MOLECULAR BIOLOGY INST.) 20.05.2002, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 04.10.2010]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW200263, Nº DE ACCESO 2002-588369.	
D02	DARBY, R.A.J. et al.: "High Throughput Measurement of Duplex, Triplex and Quadruplex Melting Curves Using Molecular Beacons and a LightCycler", Nucleic Acids Res. (2002), vol. 30 (9) e39, todo el documento.	
D03	WO 2007018734 A2 (BIO-RAD LAB INC) 15.02.2007, todo el documento.	
D04	DROBYSHEV, A.L. et al.: "Massive Parallel Analysis of DNA-Hoechst 33258 Binding Specificity with a Generic Oligodeoxyribonucleotide Microchip", Nucleic Acids Res. (1999), vol. 27 (20), pp.: 4100-4105.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud reivindica un procedimiento analítico miniaturizado para detectar el efecto de ligandos sobre las interacciones no covalentes que mantienen una asociación entre cadenas o partes de una cadena de ADN, ARN o moléculas o complejos derivados de dichos ácidos. Este procedimiento se basa en la modificación de las curvas de fusión de las mencionadas cadenas. Se lleva a cabo en placas multipocillo y se aplica tanto a formas de hebra sencilla, como de doble hebra. Para completar el procedimiento se utiliza, al menos, un ligando fluorescente. Para perfeccionar la técnica descrita en el procedimiento, se reivindica la utilización de dos ligandos fluorescentes, unidos cada uno a una hebra (en el caso de formas duplexas), con la característica particular de que la emisión de fluorescencia del primer ligando es absorbida o extinguida ("*quenched*") por el segundo. De esta manera puede conocerse en qué grado están unidas o separadas dichas hebras.

El estado de la técnica anterior queda reflejado en D01-D04. Todos estos documentos reflejan la existencia de procedimientos en los que se relaciona la interacción de distintos ligandos con ácidos nucleicos o con pequeñas cadenas de nucleótidos con las curvas de fusión y la utilización de fluoróforos que faciliten la medida de los cambios provocados. Sin embargo, tal y como se dice en la descripción de la solicitud, "no se ha encontrado ninguna descripción de un ensayo de unión de ligandos a ácidos nucleicos mediante análisis de curvas de fusión térmica en placa multipocillo". Esta técnica miniaturizada facilita la economía de medios y la obtención de mayor información sobre las reacciones.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1-14 de la solicitud cumplen los requisitos de novedad y de actividad inventiva.