

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 088**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06806056 .5**
96 Fecha de presentación: **05.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1934374**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2008**

54 Título: **TRANSFERENCIA DE ENERGÍA NO FLUORESCENTE.**

30 Prioridad:
05.10.2005 US 724202 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.12.2011

73 Titular/es:
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:
WILL, Stephen, Gordon

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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).

ES 2 371 088 T3

DESCRIPCIÓN

Transferencia de energía no fluorescente.

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a los campos de la biología molecular y bioquímica molecular. En determinadas realizaciones, se proporcionan reactivos y ensayos que implica la transferencia de energía no fluorescente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Las técnicas de obtención de información sobre moléculas biológicas, tales como ácidos nucleicos y proteínas, se aplican en muchas disciplinas diferentes, entre ellas diversas ramas de la ciencia médica. Muchas de estas técnicas incluyen la utilización de marcajes fluorescentes para generar señales detectables. Por ejemplo, una clase de pigmentos fluorescentes que se ha desarrollado incluye pigmentos fluorescentes de transferencia de energía. En general, entre los procesos de transferencia energética que implican pigmentos se incluyen las interacciones de resonancia dipolo-dipolo entre las fracciones donadora y aceptora que se encuentran asociados a moléculas biológicas iguales o diferentes. En estos procesos, en el caso de que las fracciones donadora y aceptora se sitúen
- 15 suficientemente próximas entre sí y en las orientaciones mutuas correctas, la energía emitida por las fracciones donadoras resulta absorbida por las fraccionesceptoras. Se producen señales detectables cuando dicha energía absorbida provoca la fluorescencia de las fraccionesceptoras.

- 20 Entre los enfoques ejemplares de análisis de ácidos nucleicos que utilizan comúnmente pigmentos fluorescentes de transferencia energética se incluyen los ensayos basados en la hibridación, tales como los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR)), los procedimientos basados en matrices de alta densidad de ácidos nucleicos, los análisis de polimorfismos de nucleótido único (SNP) y las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos. A título de ilustración adicional, también se conocen algunos métodos de ensayo de otros tipos de moléculas biológicas que pueden utilizar la transferencia energética para realizar la detección. Por ejemplo, pueden detectarse y cuantificarse proteínas utilizando diversas técnicas, incluyendo la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, la electroforesis capilar, los ensayos enzimáticos, los ensayos basados en células y un amplio abanico de técnicas inmunológicas, tales como la transferencia western y el ELISA.

- 30 Además, se han desarrollado varios ensayos diagnósticos y analíticos que implican la detección de múltiples componentes en una muestra utilizando pigmentos fluorescentes, incluyendo, por ejemplo, la citometría de flujo (Lanier *et al.* "Human lymphocyte subpopulations identified by using three-color immunofluorescence and flow cytometry analysis: correlation of Leu-2, Leu-3, Leu-7, Leu-8 and Leu-11 cell surface antigen expression", J. Immunol. 132:151-156, 1984) y el análisis de cromosomas (Gray *et al.* "High resolution chromosome analysis: one and two parameter flow cytometry", Chromosoma 73:9-27, 1979), conjuntamente con muchos de los ensayos indicados anteriormente. Para estos ensayos, resulta deseable utilizar simultáneamente un conjunto de dos o más pigmentos fluorescentes espectralmente resolubles, de manera que pueda detectarse más de una sustancia diana en la muestra simultáneamente. La detección simultánea de múltiples componentes en una muestra utilizando múltiples pigmentos reduce el tiempo requerido para detectar en serie componentes individuales en una muestra. En el caso de los ensayos multi-loci de sonda de ADN, la utilización de múltiples pigmentos fluorescentes espectralmente resolubles reduce el número de probetas necesario, simplificando de esta manera los protocolos experimentales y facilitando la fabricación de kits específicos para la aplicación. En el caso de la secuenciación automática de ADN, por ejemplo, la utilización de múltiples pigmentos fluorescentes espectralmente resolubles permite el análisis de las cuatro bases en un único carril, incrementando de esta manera el rendimiento en comparación con los métodos monocromáticos y eliminando incertidumbres asociadas a variaciones de movilidad electroforética entre carriles.
- 45

- La detección de PCR multiplex utilizando sondas de nucleasa 5', balizas moleculares, sondas FRET o de hibridación, entre otros métodos de detección multiplex, típicamente incluye el agrupamiento de sondas fluorescentes desactivadas o no desactivadas, por ejemplo para mejorar el rendimiento del ensayo en comparación con los protocolos que utilizan sondas únicas en una reacción dada. A título ilustrativo, los ensayos multiplex se utilizan comúnmente para detectar múltiples marcadores genotípicos o patógenos en muestras obtenidas de pacientes como partes de procedimientos diagnósticos. En estos formatos, la línea base global o fluorescencia de fondo de las sondas agrupadas se incrementa aditivamente a medida que se incrementa el número de sondas en la mezcla de reacción. Dicha fluorescencia de línea base también se incrementa en esencialmente cualquier sistema de ensayo al incrementar la cantidad de cualquier sonda individual. La fluorescencia de línea base afecta
- 50
- 55 negativamente al rendimiento de un ensayo dado, por ejemplo al reducir la sensibilidad de detección y rango dinámico del ensayo. Por consiguiente, la fluorescencia de línea base limita efectivamente el número total de sondas fluorescentes y/o la cantidad de una sonda dada que puede utilizarse cada vez en un ensayo particular.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona moléculas biológicas y otros reactivos relacionados con la transferencia de energía no fluorescente. En particular, las moléculas biológicas que incluyen fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes indicadas en la presente memoria pueden utilizarse para llevar a cabo la detección de moléculas biológicas diana. Entre las ventajas de utilizar dichas fracciones donadoras para dicha detección se encuentra una menor fluorescencia de fondo en comparación con enfoques que utilizan fracciones donadoras fluorescentes. Además de mezclas de reacción y diversos métodos, también se proporcionan kits y sistemas relacionados.

La invención en particular proporciona una molécula biológica que comprende por lo menos una fracción donadora sustancialmente no fluorescente que comprende uno o más de entre: 4',5'-dimetoxi-6-carboxifluoresceína, 4',5'-dimetoxi-5-carboxifluoresceína, 6-carboxi-aminopentaclorofluoresceína ó 5-carboxi-aminopentaclorofluoresceína, siendo capaz dicha fracción donadora no fluorescente de transferir energía no fluorescente a por lo menos una fracción aceptora o informadora (por ejemplo un pigmento fluorescente) en el caso de que la fracción aceptora se encuentre suficientemente próxima a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente, de manera que la fracción aceptora emite luz en respuesta a la energía no fluorescente aceptada. La molécula biológica típicamente comprende por lo menos un nucleósido, por lo menos un aminoácido, por lo menos un azúcar y/o por lo menos un lípido. En determinadas realizaciones, la molécula biológica comprende la fracción aceptora y/o por lo menos una fracción desactivadora. En algunas realizaciones, la fracción donadora sustancialmente no fluorescente y/o la fracción aceptora se encuentran unidos a la molécula biológica mediante por lo menos una fracción conectora.

Las moléculas biológicas indicadas en la presente memoria incluyen muchas realizaciones diferentes. A título ilustrativo, la molécula biológica comprende un reactivo de síntesis de polímero biológico (por ejemplo una fosforamidita) en determinadas realizaciones. En algunas realizaciones, la molécula biológica comprende un polímero biológico. En dichas realizaciones, diferentes unidades monoméricas del polímero biológico comprenden opcionalmente la fracción donadora sustancialmente no fluorescente y la fracción aceptora. En algunas de dichas realizaciones, una unidad monomérica del polímero biológico comprende tanto la fracción donadora sustancialmente no fluorescente como la fracción aceptora. Opcionalmente, la fracción donadora sustancialmente no fluorescente y la fracción aceptora no se encuentran unidos entre sí mediante por lo menos una fracción conectora. A título de ilustración adicional, la molécula biológica comprende por lo menos un oligonucleótido o por lo menos un polinucleótido en determinadas realizaciones. El oligonucleótido generalmente comprende un primer ácido nucleico o un ácido nucleico sonda (por ejemplo una sonda de hibridación, una sonda 5'-nucleasa y una sonda en horquilla). En algunas realizaciones, la molécula biológica comprende por lo menos un péptido, por lo menos un polipéptido, por lo menos una proteína, por lo menos un enzima, por lo menos una hormona o por lo menos una inmunoglobulina.

En otro aspecto, la invención proporciona una mezcla de reacción que incluye por lo menos un nucleótido (por ejemplo un nucleótido extendible y/o un nucleótido terminador), por lo menos un ácido nucleico cebador y/o por lo menos un primer ácido nucleico sonda (por ejemplo una sonda de hibridación, una sonda 5'-nucleasa y una sonda en horquilla), en donde uno o más de entre el nucleótido, el ácido nucleico cebador o el primer ácido nucleico sonda comprende por lo menos una de dichas fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes que es capaz de transferir energía no fluorescente a por lo menos una fracción aceptora en el caso de que ésta se encuentre suficientemente próxima a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente, de manera que la fracción aceptora emite luz en respuesta a la energía no fluorescente absorbida. En algunas realizaciones, el nucleótido, el ácido nucleico cebador, o el primer ácido nucleico sonda comprende la fracción aceptora (por ejemplo un pigmento fluorescente). Opcionalmente, el nucleótido, el ácido nucleico cebador o el primer ácido nucleico sonda comprende por lo menos una fracción desactivadora. En determinadas realizaciones, dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente y/o la fracción aceptora se unen al nucleótido, al ácido nucleico cebador o al primer ácido nucleico sonda mediante por lo menos una fracción conectora. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción también incluye por lo menos un nucleótido que incorpora un catalizador biológico. Opcionalmente, dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente se une al nucleótido, al ácido nucleico cebador o al primer ácido nucleico sonda mediante por lo menos una fracción conectora. En determinadas realizaciones, la mezcla de reacción incluye por lo menos un segundo ácido nucleico sonda (por ejemplo que se utiliza opcionalmente como sonda de hibridación en algunas realizaciones) que comprende la fracción aceptora. En algunas de dichas realizaciones, el segundo ácido nucleico sonda comprende además por lo menos una fracción desactivadora. A título ilustrativo, esta mezcla de reacción puede utilizarse para llevar a cabo diversos protocolos de seguimiento de PCR en tiempo real o procedimiento de secuenciación de ácidos nucleicos, entre muchas otras posibles aplicaciones.

En otro aspecto, la invención proporciona una mezcla de reacción que comprende por lo menos un primer reactivo de síntesis de polímero biológico que comprende por lo menos uno de dichas fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes que es capaz de transferir energía no fluorescente a por lo menos una fracción aceptora en el caso de que ésta se encuentre suficientemente próxima a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente, de manera que la fracción aceptora emite luz en respuesta a la energía no fluorescente absorbida. En algunas realizaciones, dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente se une al primer reactivo de síntesis de polímero biológico mediante por lo menos una fracción conectora. En determinadas realizaciones, el primer reactivo de síntesis de polímero biológico comprende la fracción aceptora, en donde la fracción donadora sustancialmente no fluorescente y la fracción aceptora no se encuentran unidas entre sí mediante por lo menos una fracción conectora.

En otras realizaciones, el primer reactivo de síntesis de polímero biológico comprende la fracción aceptora, en donde la fracción donadora sustancialmente no fluorescente y la fracción aceptora se encuentran unidos entre sí mediante por lo menos una fracción conectora. Opcionalmente, un soporte sólido comprende el primer reactivo de síntesis de polímero biológico. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción incluye por lo menos un segundo reactivo de síntesis de polímero biológico que comprende la fracción aceptora y/o por lo menos una fracción desactivadora. A título ilustrativo adicional, el primer reactivo de síntesis de polímero biológico comprende un reactivo de síntesis de polipéptidos en determinadas realizaciones, mientras que en otras, el primer reactivo de síntesis de polímero biológico comprende un reactivo de síntesis de ácidos nucleicos (por ejemplo una fosforamidita). Esta mezcla de reacción se utiliza opcionalmente en, por ejemplo, la síntesis y/o marcaje de polímeros biológicos.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar una molécula biológica diana. El método incluye: (a) unir por lo menos una molécula biológica de sonda (por ejemplo una inmunoglobulina) a una molécula biológica diana en la que la molécula biológica de sonda comprende por lo menos uno de entre dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente y por lo menos una fracción aceptora (por ejemplo un pigmento fluorescente), absorbiendo dicha fracción aceptora energía no fluorescente transferida por la fracción donadora sustancialmente no fluorescente y emitiendo luz en respuesta a la energía no fluorescente absorbida. Además, el método también incluye: (b) detectar la luz emitida por la fracción aceptora, detectando de esta manera la molécula biológica diana. En algunas realizaciones, la molécula biológica diana comprende un ácido nucleico diana y el método comprende amplificar por lo menos una subsecuencia del ácido nucleico diana antes y/o durante (b). Típicamente, la molécula biológica de sonda comprende un polímero biológico. En determinadas realizaciones, diferentes unidades monoméricas del polímero biológico comprenden dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente y la fracción aceptora. Una unidad monomérica del polímero biológico opcionalmente comprende tanto dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente como la fracción aceptora, estando típicamente dichas fracciones donadora sustancialmente no fluorescente y aceptora unidas o no unidas entre sí mediante por lo menos una fracción conectora. A título ilustrativo adicional, la sonda (por ejemplo una sonda de hibridación, una sonda 5'-nucleasa o una sonda en horquilla) y/o molécula biológica diana comprende un ácido nucleico en determinadas realizaciones. En estas realizaciones, (a) generalmente comprende hibridar las moléculas biológicas de sonda y diana.

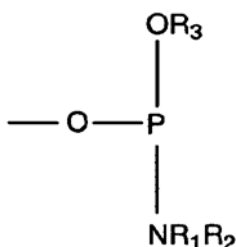
En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar una molécula biológica diana. El método incluye: (a1) proporcionar por lo menos una primera y una segunda moléculas biológicas de sonda en las que la primera molécula biológica de sonda comprende por lo menos uno de dichas fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes y en las que la segunda molécula biológica de sonda comprende por lo menos una fracción aceptora (por ejemplo un grupo fluorescente). El método también incluye: (a2) unir la primera y segunda moléculas biológicas de sonda a la molécula biológica diana, de manera que la fracción aceptora acepta la energía no fluorescente transferida a partir de dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente, y emite luz en respuesta a la energía no fluorescente absorbida. Además, el método también incluye: (b) detectar la luz emitida por la fracción aceptora, detectando de esta manera la molécula biológica diana. En algunas realizaciones, dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente en la primera molécula biológica de sonda es un isotiocianato diferente de 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC). En algunas realizaciones, la molécula biológica diana comprende un ácido nucleico diana y el método comprende amplificar por lo menos una subsecuencia del ácido nucleico diana antes y/o durante (b). En determinadas realizaciones, la primera y/o la segunda molécula biológica de sonda comprende una inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la primera molécula biológica de sonda, la segunda molécula biológica de sonda y/o la molécula biológica diana comprende un ácido nucleico. En dichas realizaciones, la primera y/o la segunda molécula biológica de sonda típicamente comprende una sonda de hibridación, una sonda 5'-nucleasa o una sonda en horquilla. En algunas de dichas realizaciones, (a2) comprende hibridar la primera molécula biológica de sonda, la segunda molécula biológica de sonda y la molécula biológica diana.

La invención también se refiere a un método de realización de un ensayo de proximidad (por ejemplo un ensayo de mezcla de lípidos). El método incluye: (a1) proporcionar por lo menos una primera y una segunda moléculas biológicas de sonda en las que la primera molécula biológica de sonda comprende por lo menos uno de dichas fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes y en las que la segunda molécula biológica de sonda comprende por lo menos una fracción aceptora. El método también incluye: (b) situar la primera y segunda moléculas biológicas de sonda en una primera posición mutua en la que la primera y segunda moléculas biológicas de sonda se encuentran suficientemente próximas entre sí en la primera posición para que la fracción aceptora acepte la energía no fluorescente transferida a partir de dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente y emita luz en respuesta a la energía no fluorescente absorbida. Además, el método también incluye: (c) mover la primera y segunda moléculas biológicas de sonda hasta por lo menos una segunda posición mutua, y (d) realizar un seguimiento de la luz emitida por la fracción aceptora antes, después y/o en el momento de mover la primera y segunda moléculas biológicas de sonda a la segunda posición, llevando a cabo de esta manera el ensayo de proximidad. Típicamente, la primera y/o segunda moléculas biológicas de sonda comprende un oligonucleótido, una inmunoglobulina o un lípido.

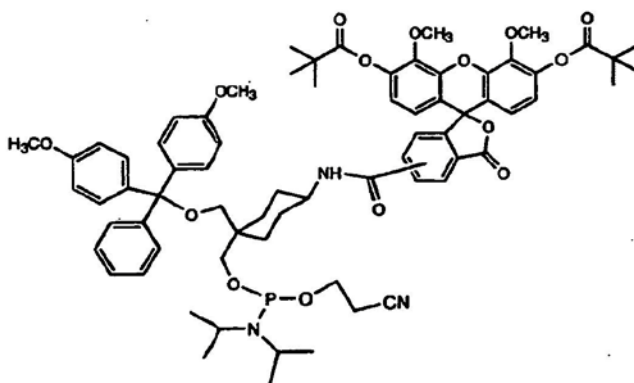
En otro aspecto, la invención proporciona un método para extender un ácido nucleico cebador utilizando por lo

menos una de dichas fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes. El método incluye incubar un ácido nucleico diana con: (a) por lo menos un nucleótido extensible y/o por lo menos un nucleótido terminador, (b) por lo menos un catalizador biológico incorporador de nucleótidos, y (c) por lo menos un ácido nucleico cebador que sea por lo menos parcialmente complementario a por lo menos una subsecuencia del ácido nucleico diana bajo condiciones en las que el catalizador biológico incorporador de nucleótidos extiende el ácido nucleico cebador, produciendo por lo menos un ácido nucleico cebador extendido mediante la incorporación del nucleótido extensible y/o el nucleótido terminador en un extremo terminal del ácido nucleico cebador extendido, en el que el ácido nucleico cebador, el nucleótido extensible y/o el nucleótido terminador comprende por lo menos una de dichas fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes capaz de transferir energía no fluorescente a por lo menos una fracción aceptora en el caso de que ésta se encuentre suficientemente próxima a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente, de manera que la fracción aceptora emite luz en respuesta a la energía no fluorescente absorbida, extendiendo de esta manera el ácido nucleico cebador. En determinadas realizaciones, se produce una pluralidad de ácidos nucleicos cebadores extendidos y el método comprende identificar nucleótidos terminadores en los ácidos nucleicos cebadores extendidos, de manera que por lo menos una parte de una secuencia de bases del ácido nucleico diana sea determinable a partir de los nucleótidos terminadores identificados. En algunas realizaciones, el ácido nucleico cebador, el nucleótido extensible y/o el nucleótido terminador comprenden la fracción aceptora. En determinadas realizaciones, dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente y la fracción aceptora no se unen entre sí mediante por lo menos una fracción conectora, mientras que en otras, dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente y la fracción aceptora se unen entre sí mediante por lo menos una fracción conectora.

La invención también se refiere a un método para producir una fosforamidita. El método incluye: (a) unir por lo menos una fracción donadora sustancialmente no fluorescente a un compuesto que comprende por lo menos un grupo protector. La fracción donadora sustancialmente no fluorescente es capaz de transferir energía no fluorescente a por lo menos una fracción aceptora en el caso de que ésta se encuentre suficientemente próxima a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente, de manera que la fracción aceptora emite luz en respuesta a la energía no fluorescente absorbida. El método también incluye: (b) unir una fracción que comprende la fórmula:



en la que R_1 y R_2 son grupos alquilo seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste de: metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo y decilo, y R_3 es $(\text{CH}_2)_2\text{CN}$ o CH_3 , produciendo de esta manera la fosforamidita. Los grupos protectores ejemplares se seleccionan de entre, por ejemplo, tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, levulinilo, fluorenilmetoxycarbonilo y benzhidroxycarbonilo. En algunas realizaciones, la fosforamidita comprende la fórmula:



Además, la invención se refiere a un método comercial que incluye: (a) recibir un pedido de un cliente de por lo menos una primera molécula biológica que comprende por lo menos una fracción donadora sustancialmente no fluorescente que es capaz de transferir energía no fluorescente a por lo menos una fracción aceptora en el caso de que ésta se encuentre suficientemente próxima a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente, de manera

que la fracción aceptora emite luz en respuesta a la energía no fluorescente absorbida. Además, el método comercial también incluye: (b) suministrar la primera molécula biológica al cliente en respuesta al pedido.

En otro aspecto, la invención proporciona un kit que incluye por lo menos una primera molécula biológica que comprende por lo menos uno de dichas fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes que es capaz de transferir energía no fluorescente a por lo menos una fracción aceptora en el caso de que ésta se encuentre suficientemente próxima a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente, de manera que la fracción aceptora emite luz en respuesta a la energía no fluorescente absorbida. En algunas realizaciones, un soporte sólido comprende la primera molécula biológica. En determinadas realizaciones, la primera molécula biológica comprende la fracción aceptora. En algunas de dichas realizaciones, dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente y la fracción aceptora no se unen entre sí mediante por lo menos una fracción conectora, mientras que en otras, dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente y la fracción aceptora se unen entre sí mediante por lo menos una fracción conectora. En determinadas realizaciones, el kit incluye una segunda molécula biológica que comprende la fracción aceptora. Opcionalmente, el kit incluye uno o más de entre, por ejemplo, un tampón, una sal, un ión metálico, un catalizador biológico que incorpora nucleótidos, una pirofosfatasa, glicerol, dimetilsulfóxido y/o poli-rA. Típicamente, el kit incluye por lo menos un recipiente para empaquetar por lo menos la primera molécula biológica.

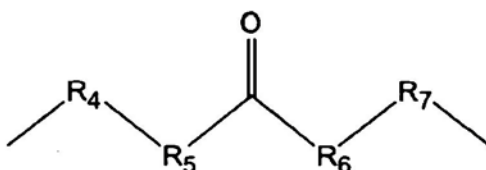
Los kits incluyen diversas realizaciones y pueden utilizarse para llevar a cabo muchas aplicaciones diferentes. En algunas realizaciones, por ejemplo, la primera molécula biológica comprende una inmunoglobulina y el kit comprende instrucciones para unir la inmunoglobulina a un epítipo diana y detectar la unión de la inmunoglobulina al epítipo diana. Opcionalmente, la primera molécula biológica comprende un lípido y el kit comprende instrucciones para llevar a cabo un ensayo de proximidad utilizando el lípido. En determinadas realizaciones, la primera molécula biológica comprende un ácido nucleico cebador y el kit comprende instrucciones para extender el ácido nucleico cebador. En algunas realizaciones, la primera molécula biológica comprende un nucleótido extensible y/o un nucleótido terminador. En determinadas realizaciones, la primera molécula biológica comprende un primer reactivo de síntesis de polímero biológico y el kit comprende instrucciones para sintetizar un polímero biológico utilizando el primer reactivo de síntesis de polímero biológico. En algunas de dichas realizaciones, el primer reactivo de síntesis de polímero biológico comprende un reactivo de síntesis de polipéptidos. Opcionalmente, el kit incluye por lo menos un segundo reactivo de síntesis de polímero biológico. En algunas realizaciones, el segundo reactivo de síntesis de polímero biológico comprende la fracción aceptora. En determinadas realizaciones, el primer reactivo de síntesis de polímero biológico comprende un reactivo de síntesis de ácidos nucleicos (por ejemplo una fosforamida). En algunas realizaciones, la primera molécula biológica comprende por lo menos un primer ácido nucleico de sonda. A título ilustrativo, el primer ácido nucleico de sonda opcionalmente comprende una sonda de hibridación, una sonda 5'-nucleasas o una sonda en horquilla. En algunas de dichas realizaciones, el kit incluye por lo menos un segundo ácido nucleico de sonda que comprende la fracción aceptora. En determinadas realizaciones, este segundo ácido nucleico de sonda se utiliza como sonda de hibridación conjuntamente con el primer ácido nucleico de sonda para llevar a cabo diversos ensayos de sondas de hibridación.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema que incluye: (a) por lo menos un recipiente y/o soporte sólido que comprende por lo menos una molécula biológica que comprende por lo menos una de dichas fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes que es capaz de transferir energía no fluorescente a por lo menos una fracción aceptora en el caso de que ésta se encuentre suficientemente próxima a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente, de manera que la fracción aceptora emite luz en respuesta a la energía no fluorescente absorbida. El sistema también incluye: (b) por lo menos una fuente de radiación que se encuentra configurado para dirigir la radiación electromagnética hacia la fracción donadora. Además, el sistema también incluye: (c) por lo menos un componente de detección que se encuentra configurado para detectar la luz emitida por la fracción aceptora en el caso de que ésta se encuentre suficientemente próxima a dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente. Típicamente, el sistema incluye por lo menos un dispositivo lógico operablemente conectado al componente de detección, comprendiendo dicho dispositivo lógico uno o más juegos de instrucciones que proporcionan una escala para las emisiones de luz detectadas por la fracción aceptora. En algunas realizaciones, el sistema incluye: (d) por lo menos un modulador térmico que comunica térmicamente con el recipiente y/o con el soporte sólido para modular la temperatura próxima al recipiente y/o al soporte sólido, y/o (e) por lo menos un componente de transferencia de fluidos que transfiere fluidos hacia y/o desde el recipiente y/o soporte sólido.

Las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes de las moléculas biológicas, mezclas de reacción, métodos, kits y sistemas indicados en la presente memoria incluyen diversas realizaciones. En particular, la fracción donadora sustancialmente no fluorescente comprende uno o más de entre: 4',5-dimetoxi-6-carboxifluoresceína, 4',5'-dimetoxi-5-carboxifluoresceína, 6-carboxi-aminopentaclorofluoresceína ó 5-carboxi-aminopentaclorofluoresceína, siendo capaz dicha fracción donadora no fluorescente de transferir energía no fluorescente a por lo menos una fracción aceptora o informadora (por ejemplo un pigmento fluorescente) en el caso de que la fracción aceptora se encuentre suficientemente próxima a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente, de manera que la fracción aceptora emite luz en respuesta a la energía no fluorescente absorbida. Las absorbancias de visible del pico de dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente y de la fracción aceptora difieren entre sí en aproximadamente 100 nm o más. Típicamente, la proporción entre la emisión fluorescente absoluta detectable de un

grupo de 6-carboxifluoresceína y la emisión fluorescente absoluta detectable de dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente a concentraciones sustancialmente idénticas del grupo de 6-carboxifluoresceína y de la fracción donadora sustancialmente no fluorescente es de aproximadamente 1.000:1 ó superior. En determinadas realizaciones, la fracción donadora sustancialmente no fluorescente es una carboxifluoresceína, un ácido estilben-2,2'-disulfónico o un isotiocianato. En otras realizaciones, la fracción donadora sustancialmente no fluorescente es un isotiocianato diferente de 4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC).

En algunas realizaciones, las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes y las fraccionesceptoras indicadas en la presente memoria no se unen entre sí mediante fracciones conectoras. En otras realizaciones, las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes y las fraccionesceptoras indicados en la presente memoria se unen entre sí mediante fracciones conectoras. En algunas de dichas realizaciones, los fracciones conectoras no presentan la estructura:



en la que R^4 es un alquilo C_{1-5} unido a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente; R_5 se selecciona de entre el grupo que consiste de: NH, S y O; R_6 se selecciona de entre el grupo que consiste de: un alqueno, un dieno, un alquino y un anillo de cinco o seis elementos que presenta por lo menos un enlace insaturado o una estructura de anillos fusionados que se encuentra unida al carbono del carbonilo; y R_7 comprende un grupo funcional que une la fracción conectora a la fracción aceptora.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figuras 1A-F muestran esquemáticamente determinadas realizaciones representativas de algunos reactivos de la invención.

La figura 2 ilustra esquemáticamente determinadas etapas llevadas a cabo en una reacción de 5'-nucleasa según una realización de la invención.

La figura 3 ilustra esquemáticamente algunas etapas llevadas a cabo en un ensayo que implica sondas en horquilla según una realización de la invención.

La figura 4 muestra esquemáticamente determinadas etapas llevadas a cabo en un ensayo que implica sondas de hibridación según una realización de la invención.

La figura 5 ilustra esquemáticamente determinadas etapas llevadas a cabo en un ensayo que implica cebadores marcados según una realización de la invención.

La figura 6 ilustra esquemáticamente algunas etapas llevadas a cabo en un ensayo que implica proteínas marcadas según determinadas realizaciones de la invención.

La figura 7 muestra esquemáticamente algunas etapas llevadas a cabo en un ensayo de mezcla de lípidos según una realización de la invención.

La figura 8 es un diagrama de bloques que muestra determinadas etapas llevadas a cabo en un método comercial según una realización de la invención.

La figura 9 es un diagrama de bloques que muestra un sistema representativo para llevar a cabo un ensayo de proximidad.

La figura 10 es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos a partir de oligonucleótidos marcados con 6-carboxifluoresceína (ó 6-FAM), 4',5'-dimetoxi-5-carboxifluoresceína (ó 5-DmF) ó 4',5'-dimetoxi-6-carboxifluoresceína (ó 6-DmF).

La figura 11 es un extracto detallado del gráfico ilustrado en la figura 10 que muestra los espectros superpuestos obtenidos de los escaneos de excitación y de emisión de oligonucleótidos marcados con 5-DmF ó 6-DmF.

La figura 12 ilustra esquemáticamente determinadas etapas en un esquema sintético de 5-DmF-DMT-CX-conector-fosforamidita y 6-DmF-DMT-CX-conector-fosforamidita según una realización de la invención.

La figura 13 es un registro de la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) que muestra la detección de 5-DmF y de 6-DmF.

La figura 14 es un registro de HPLC que muestra la detección de pivaloilil 5-DmF y de pivaloilil-6-DmF.

- La figura 15 es un registro de HPLC que muestra la detección de DmF+CX-conector pivalato.
- La figura 16 es un registro de HPLC que muestra la detección de DmF+CX-conector.
- La figura 17 es un registro de HPLC que muestra la detección de DmF+CX-conector-fosforamidita.
- La figura 18 es un registro de HPLC que muestra la detección de DmF+CX-conector-fosforamidita.
- 5 La figura 19 es un espectro de RMN de ^{31}P que muestra la detección de las DmF-CX-conector-fosforamiditas.
- La figura 20 ilustra esquemáticamente determinadas etapas en un esquema de purificación para la separación mutua de los isómeros 5-DmF y 6-DmF según una realización de la invención.
- La figura 21 es un cromatograma que muestra la detección de 5-DmF.
- La figura 22 es un cromatograma que muestra la detección de 6-DmF.
- 10 La figura 23 ilustra esquemáticamente determinadas etapas en un esquema sintético de la 6-DmF-DMT-CX-conector-fosforamidita según una realización de la invención.
- La figura 24 es un registro de HPLC que muestra la detección de pivalato de 6-DmF.
- La figura 25 es un registro de HPLC que muestra la detección de 6-DmF-CX-conector.
- La figura 26 es un registro de HPLC que muestra la detección de 6-DmF-CX-conector-fosforamidita.
- 15 La figura 27 ilustra esquemáticamente determinadas etapas en un esquema sintético de la 5-DmF-DMT-CX-conector-fosforamidita según una realización de la invención.
- La figura 28 es un registro de HPLC que muestra la detección de pivalato de 5-DmF.
- La figura 29 es un registro de HPLC que muestra la detección de 5-DmF-CX-conector.
- La figura 30 es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de escaneos de excitación de diversos ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas donadoras marcadas con 6-FAM, 5-DmF ó 6-DmF.
- 20 La figura 31 es un gráfico de los espectros superpuestos mostrados en la figura 30 en los que los escaneos de excitación de fluorescencia detectados han sido normalizados.
- La figura 32 es un gráfico de los espectros superpuestos obtenidos de escaneos de emisión de diversos ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas donadoras marcadas con 6-FAM, 5-DmF ó 6-DmF o que no incluían sondas donadoras.
- 25 La figura 33 es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos a partir de un análisis de la curva de fusión que incluía sondas donadoras marcadas con 6-FAM.
- La figura 34 es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos a partir de un análisis de la curva de fusión que incluía sondas donadoras marcadas con 5-DmF.
- 30 La figura 35 es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos a partir de un análisis cinético de PCR que incluía sondas donadoras marcadas con 6-FAM.
- La figura 36 es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos a partir de un análisis cinético de PCR que incluía sondas donadoras marcadas con 5-DmF.
- La figura 37A ilustra esquemáticamente una sonda 5'-nucleasa según una realización de la invención.
- 35 La figura 37B ilustra esquemáticamente una sonda 5'-nucleasa que no presenta una fracción donadora sustancialmente no fluorescente.
- La figura 38 es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de análisis de PCR en los que se utilizaron sondas de 5'-nucleasa para realizar un seguimiento de las reacciones.
- La figura 39 es un gráfico de los espectros superpuestos mostrados en la figura 38 en los que la fluorescencia detectada ha sido normalizada.
- 40 La figura 40 muestra esquemáticamente diversas fracciones donadoras y aceptoras en parejas representativas de sondas de hibridación.
- La figura 41A es un gráfico de un espectro obtenido a partir de un escaneo de emisión de una sonda de hibridación marcada con LC-Red 610.
- 45 La figura 41B es un gráfico de un espectro obtenido a partir de un escaneo de emisión de una sonda de hibridación marcada con JA-270.
- La figura 41C es un gráfico de un espectro obtenido a partir de un escaneo de emisión de una sonda de hibridación

marcada con CY5.

La figura 41D es un gráfico de un espectro obtenido a partir de un escaneo de emisión de una sonda de hibridación marcada con CY5.5.

5 La figura 42A es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos a partir de escaneos de emisión (fluorescencia absoluta) de sondas de hibridación marcadas con FAM o DmF.

La figura 42B es un gráfico de determinados espectros superpuestos obtenidos a partir de escaneos de emisión dibujados en la figura 42A en los que las emisiones fluorescentes han sido escalados.

10 La figura 43A es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de escaneos de excitación de ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas aceptoras marcadas con LC-Red 610 y sondas donadoras marcadas con FAM o DmF.

La figura 43B es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de escaneos de emisión (fluorescencia absoluta) de ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas aceptoras marcadas con LC-Red 610 y sondas donadoras marcadas con FAM o DmF.

15 La figura 43C es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos a partir de escaneos de emisión dibujados en la figura 43B en los que las emisiones fluorescentes han sido escalados.

La figura 44A es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de escaneos de excitación de ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas aceptoras marcadas con JA-270 y sondas donadoras marcadas con FAM o DmF.

20 La figura 44B es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de escaneos de emisión (fluorescencia absoluta) de ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas aceptoras marcadas con JA-270 y sondas donadoras marcadas con FAM o DmF.

La figura 44C es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos a partir de escaneos de emisión dibujados en la figura 44B en los que las emisiones fluorescentes han sido escalados.

La figura 45A es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de escaneos de excitación de ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas aceptoras marcadas con CY5 y sondas donadoras marcadas con FAM o DmF.

25 La figura 45B es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de escaneos de emisión (fluorescencia absoluta) de ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas aceptoras marcadas con CY5 y sondas donadoras marcadas con FAM o DmF.

La figura 45C es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos a partir de escaneos de emisión dibujados en la figura 45B en los que las emisiones fluorescentes han sido escaladas.

30 La figura 46A es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de escaneos de excitación de ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas aceptoras marcadas con CY5.5 y sondas donadoras marcadas con FAM o DmF.

La figura 46B es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de escaneos de emisión (fluorescencia absoluta) de ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas aceptoras marcadas con CY5.5 y sondas donadoras marcadas con FAM o DmF.

35 La figura 46C es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos a partir de escaneos de emisión dibujados en la figura 46B en los que las emisiones fluorescentes han sido escaladas.

La figura 47A es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de escaneos de excitación de ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas aceptoras marcadas con LC-Red 610 y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o Dam HEX.

40 La figura 47B es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de escaneos de emisión (fluorescencia absoluta) de ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas aceptoras marcadas con LC-Red 610 y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o Dam HEX.

45 La figura 48A es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de escaneos de excitación de ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas aceptoras marcadas con CY3.5 y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o Dam HEX.

La figura 48B es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos de escaneos de emisión (fluorescencia absoluta) de ensayos de sondas de hibridación que incluían sondas aceptoras marcadas con CY3.5 y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o Dam HEX.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

50 I. DEFINICIONES

Antes de describir la presente invención en detalle, debe interpretarse que la presente invención no se encuentra

limitada a moléculas biológicas, métodos, mezclas de reacción, composiciones, kits o sistemas particulares, que pueden variar. Tal como se utiliza en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" también incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la referencia a "una molécula biológica" incluye una combinación de dos o más moléculas biológicas. También debe interpretarse que la terminología utilizada en la presente memoria sirva para describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende ser limitativa. Además, a menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Durante la descripción y reivindicaciones de la presente invención, la terminología siguiente y variantes gramaticales de la misma se utilizan según las definiciones proporcionadas posteriormente. Una "sonda 5'-nucleasa" se refiere a un oligonucleótido marcado que es capaz de producir un cambio detectable de señal tras el corte del mismo. A título ilustrativo, en determinadas realizaciones, una sonda 5'-nucleasa comprende tres grupos de marcaje y emite radiación de intensidad incrementada tras el corte o separación del mismo de uno de los marcajes respecto del oligonucleótido. En algunas de estas realizaciones, por ejemplo, la sonda 5'-nucleasa se marca con una fracción desactivadora en el extremo 5'-terminal y una pareja de fracciones aceptora y donadora sustancialmente no fluorescente próximas al extremo 3' de la sonda. En determinadas realizaciones, las sondas 5'-nucleasa se marcan en una o más posiciones diferentes o adicionales a dichas posiciones terminales. En el caso de que la sonda se encuentre intacta, la transferencia de energía típicamente se produce entre los grupos de marcaje, de manera que la fracción desactivadora desactiva por lo menos parcialmente la emisión fluorescente de la fracción aceptora. Durante una etapa de extensión de una reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo, la actividad de nucleasa 5' a 3' de, por ejemplo, una polimerasa Taq u otra polimerasa que presente dicha actividad corta una sonda 5'-nucleasa unida a un ácido nucleico molde, de manera que la emisión fluorescente de la fracción aceptora ya no se encuentra desactivada. En otras realizaciones ejemplares, entre las sondas 5'-nucleasa se incluyen sólo las fracciones aceptora y donadora sustancialmente no fluorescente. Al separarse las fracciones respecto de estas sondas tras realizarse el corte, generalmente se produce una reducción de la emisión fluorescente de la fracción aceptora. A título ilustrativo adicional, en determinadas realizaciones, las sondas 5'-nucleasa incluyen regiones de autocomplementariedad, de manera que las sondas son capaces de formar estructuras de horquilla bajo condiciones seleccionadas. En dichas realizaciones, las sondas 5'-nucleasa también se denominan en la presente memoria "sondas en horquilla". Las sondas 5'-nucleasa ejemplares que pueden adaptarse para la utilización con las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes indicados en la presente memoria también se encuentran descritas en, por ejemplo, la patente US nº 5.210.015, titulada "HOMOGENEOUS ASSAY SYSTEM USING THE NUCLEASE ACTIVITY OF A NUCLEIC ACID POLYMERASE", expedida el 11 de mayo de 1993 a Gelfand *et al.*; patente US nº 5.994.056, titulada "HOMOGENEOUS METHODS FOR NUCLEIC ACID AMPLIFICATION AND DETECTION", expedida el 30 de noviembre de 1999 a Higuchi, y la patente US nº 6.171.785, titulada "METHODS AND DEVICES FOR HOMOGENEOUS NUCLEIC ACID AMPLIFICATION AND DETECTOR", expedida el 9 de enero de 2001 a Higuchi.

Una "fracción aceptora" o un "aceptor" se refiere a una fracción que es capaz de aceptar o absorber energía transferida a partir de una fuente energética. En algunas realizaciones, las fraccionesceptoras también son capaces de emitir energía (por ejemplo luz y/o calor) tras absorber cantidades suficientes de energía transferida. En dichas realizaciones, los aceptores también se conocen como "fracciones informadoras" o como "informadores". A título ilustrativo, determinadas fraccionesceptoras emiten fluorescencia en respuesta a la aceptación de cantidades suficientes de energía no fluorescente transferida a partir de fracciones donadoras no fluorescentes descritos en la presente memoria. Entre las fraccionesceptoras ejemplares se incluyen, aunque sin limitación, diversos fluoróforos, tales como LightCycler®-Red 610 (LC Red 610), LC-Red 640, LC-Red 670, LC-Red 705, JA-270, CY5, CY5.5, entre muchos otros.

Un "grupo alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo saturado lineal, ramificado o cíclico e incluye todos los isómeros posicionales, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, pentilo, hexilo, octilo, nonilo, heptilo, 1-metiletilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1-metilbutilo, 2-metilbutilo, 3-metilbutilo, 2,2-dimetilpropilo, 1-etilpropilo, 1,2-dimetilpropilo, 1-metilpentilo, 2-metilpentilo, 3-metilpentilo, 4-metilpentilo, 1,1-dimetilbutilo, 1,2-dimetilbutilo, 1,3-dimetilbutilo, 2,2-dimetilbutilo, 2,3-dimetilbutilo, 3,3-dimetilbutilo, 1-etilbutilo, 2-etilbutilo, 1,1,2-trimetilpropilo, 1,2,2-trimetilpropilo, 1-etil-1-metilpropilo, 1-etil-2-metilpropilo, n-hexilo, ciclohexilo, n-heptilo, n-octilo, 2-etilhexilo, n-nonilo y n-decilo. Un grupo alquilo típicamente comprende aproximadamente 1 a 20 átomos de carbono y más típicamente comprende aproximadamente 2 a 15 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden encontrarse sustituidos o no sustituidos.

Un "aminoácido" se refiere a cualquier unidad monomérica que puede incorporarse en un péptido, polipéptido o proteína. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "aminoácido" incluye los veinte alfa-aminoácidos naturales o genéticamente codificados siguientes: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. Las estructuras de dichos veinte aminoácidos naturales se muestran en, por ejemplo, Stryer *et al.*, Biochemistry, 5a edición, Freeman and Company, 2002. También pueden encontrarse genéticamente codificados aminoácidos adicionales, tales como selenocisteína y pirrolisina (Stadtman, "Selenocysteine", Annu. Rev. Biochem. 65:83-100, 1996, e Ibba *et al.* "Genetic code: introducing pyrrolysine", Curr. Biol. 12(13):R464-R466,

2002). El término "aminoácido" también incluye aminoácidos no naturales, aminoácidos modificados (por ejemplo que presentan cadenas laterales y/o esqueletos modificados), y análogos de aminoácidos. Ver, por ejemplo, Zhang e al. "Selective incorporation of 5-hydroxytryptophan into proteins in mammalian cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(24):8882-8887, 2004; Anderson *et al.* "An expanded genetic code with a functional quadruplet codon", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(20):7566-7571, 2004; Ikeda *et al.* "Synthesis of a novel histidine analogue and its efficient incorporation into a protein *in vivo*", *Protein Eng. Des. Sel.* 16(9):699-706, 2003; Chin *et al.* "An Expanded Eukaryotic Genetic Code", *Science* 301(5635):964-967, 2003; James *et al.* "Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues", *Protein Eng. Des. Sel.* 14(12):983-991, 2001; Kohrer *et al.* "Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells: A general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98(25):14310-14315, 2001; Bacher *et al.* "Selection and Characterization of *Escherichia coli* Variants Capable of Growth on an Otherwise Toxic Tryptophan Analogue", *J. Bacteriol.* 183(18): 5414-5425, 2001; Hamano-Takaku *et al.* "A Mutant *Escherichia coli* Tyrosyl-tRNA Synthetase Utilizes the Unnatural Amino Acid Azatyrosine More Efficiently than Tyrosine", *J. Biol. Chem.* 275(51):40324-40328, 2000; y Budisa *et al.* "Proteins with {beta}-(thienopyrrolyl)alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids", *Protein Sci.* 10(7):1281-1292, 2001.

A título ilustrativo adicional, un aminoácido típicamente es un ácido orgánico que incluye un grupo amino sustituido o no sustituido, un grupo carboxi sustituido o no sustituido, y una o más cadenas o grupos laterales, o análogos de cualquiera de dichos grupos. Entre las cadenas laterales ejemplares se incluyen, por ejemplo, tiol, seleno, sulfonilo, alquilo, arilo, acilo, ceto, azido, hidroxilo, hidrazina, ciano, halo, hidrazida, alquenilo, alquinilo, éter, borato, boronato, fosfo, fosfono, fosfina, heterocíclico, enona, imina, aldehído, éster, tioácido, hidroxilamina o cualquier combinación de dichos grupos. Entre otros aminoácidos representativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, aminoácidos que comprenden entrecruzantes fotoactivables, aminoácidos ligantes de metales, aminoácidos con marcaje de spín, aminoácidos fluorescentes, aminoácidos que contienen un metal, aminoácidos con grupos funcionales nuevos, aminoácidos que interactúan covalente o no covalentemente con otras moléculas, aminoácidos fotoenjaulados y/o fotoisomerizables, aminoácidos radioactivos, aminoácidos que comprenden biotina o un análogo de biotina, aminoácidos glucosilados, otros aminoácidos modificados con carbohidratos, aminoácidos que comprenden polietilenglicol o poliéter, aminoácidos con sustituciones de átomos pesados, aminoácidos cortables químicamente y/o fotocortables, aminoácidos que contienen azúcares unidos a carbonos, aminoácidos redox activos, aminoácidos que contienen aminotioácido y aminoácidos que comprenden uno o más grupos tóxicos.

El término "amplificar" en el contexto de las moléculas biológicas se refiere a cualquier proceso que resulte en un incremento del número de copia de una molécula biológica o de un conjunto de moléculas biológicas o subsecuencias de las mismas. Aplicado a los ácidos nucleicos, la amplificación se refiere a la producción de múltiples copias de un polinucleótido, o de una parte del polinucleótido, típicamente partiendo de una cantidad reducida del polinucleótido (por ejemplo una única molécula de polinucleótido), en la que los productos de amplificación o amplicones son generalmente detectables. La amplificación de polinucleótidos comprende una diversidad de procesos químicos y enzimáticos. La generación de múltiples copias de ADN a partir de una o unas cuantas copias de una molécula de ADN diana o molde durante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) o de una reacción en cadena de ligasa (LCR) son formas de amplificación. La amplificación no se encuentra limitada a la estricta duplicación de la molécula inicial. Por ejemplo, la generación de múltiples moléculas de ADNc a partir de una cantidad limitada de ARN en una muestra utilizando RT-PCR es una forma de amplificación. Además, la generación de múltiples moléculas de ARN a partir de una única molécula de ADN durante el procedimiento de transcripción también es una forma de amplificación.

El término "unir" o "unión" se refiere a un procedimiento en el que dos o más materiales se asocian covalente y/o no covalentemente entre sí, aunque sea sólo transitoriamente. En determinadas realizaciones, por ejemplo, se unen grupos donadores sustancialmente no fluorescentes a compuestos como parte de los métodos de producción de fosforamiditas. A título ilustrativo adicional, se unen moléculas biológicas de sonda a moléculas biológicas diana para realizar la detección de dichas dianas en algunos de los procedimientos descritos en la presente memoria.

Una "molécula biológica" se refiere a una molécula orgánica sintetizada y/o utilizada por un organismo, y/o que es utilizada para analizar el organismo o componentes del mismo. Entre las moléculas biológicas ejemplares se incluyen ácidos nucleicos, nucleótidos, aminoácidos, polipéptidos, péptidos, fragmentos de péptidos, azúcares, ácidos grasos, esteroides, lípidos y combinaciones de dichas moléculas biológicas (por ejemplo glucoproteínas, ribonucleoproteínas o lipoproteínas).

Un "polímero biológico" se refiere a una molécula biológica que incluye por lo menos dos unidades monoméricas unidas entre sí.

Un "reactivo de síntesis de polímero biológico" se refiere a un compuesto que puede utilizarse para sintetizar un polímero biológico o un componente del mismo. A título ilustrativo, en determinadas realizaciones, los reactivos de síntesis de polímero biológico son "reactivos de síntesis de ácidos nucleicos", tales como fosforamiditas u otros reactivos, que pueden utilizarse para sintetizar oligonucleótidos u otros ácidos nucleicos. Entre las técnicas ejemplares de síntesis de oligonucleótidos que se utilizan opcionalmente se incluyen el método del cloridato de fosforilo (Michelson *et al.* *J. Chem. Soc.* 2632, 1955), el método de acoplamiento de fosfodiéster (Khorana *et al.*

Chem. % Ind. London 1523, 1956), el método del fosfotriéster (Letsinger *et al.* J. Am. Chem. Soc. 91(12):3360-3365, 1969), el método del fosfitotriéster (Letsinger *et al.* J. Am. Chem. Soc. 97:3278-3279, 1975) y Letsinger *et al.* J. Am. Chem. Soc. 98:3655-3661, 1976) y el método de la fosforamidita (Beaucage *et al.* Tetrahedron Lett. 22:1859-1862, 1981, y McBride *et al.* Tetrahedron Lett. 24:245-248, 1983). A título ilustrativo adicional, entre los reactivos de síntesis de polímero biológico también se incluyen los "reactivos de síntesis de polipéptidos" (por ejemplo los reactivos t-Boc/Fmoc), que pueden utilizarse para sintetizar péptidos u otras proteínas. Ver, por ejemplo, Chan *et al.* (editores), Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press, 2000, y Jones, Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford University Press, 2002. Los polímeros biológicos también pueden sintetizarse utilizando muchos otros enfoques conocidos por el experto en la materia, tales como mediante ligación química (ver, por ejemplo, Hackeng *et al.* "Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology", PNAS 96(18): 10068-10073, 1999).

Un "complemento" en el contexto de los ácidos nucleicos se refiere a un ácido nucleico, o a un segmento del mismo, que puede combinarse en una asociación antiparalela o hibridarse con por lo menos una subsecuencia de un ácido nucleico. La asociación antiparalela puede ser intramolecular, por ejemplo en forma de un bucle de horquilla dentro de un ácido nucleico, o intermolecular, tal como en el caso de que dos o más ácidos nucleicos de una sola cadena se hibriden entre sí. Pueden incluirse en los ácidos nucleicos a los que se hace referencia en la presente memoria determinadas bases no presentes comúnmente en los ácidos nucleicos naturales, entre ellos, por ejemplo, hipoxantina, 7-deazaguanina, entre muchos otros. No resulta necesario que la complementariedad sea perfecta; los dúplex o tríplex estables, por ejemplo, pueden contener parejas de bases incorrectamente apareadas o bases no apareadas. Es decir, pueden producirse asociaciones antiparalelas, intramoleculares o intermoleculares, bajo determinadas condiciones en el caso de que los ácidos nucleicos sean únicamente "parcialmente complementarios". El experto en la materia de la química de los ácidos nucleicos podrá determinar, por ejemplo, la estabilidad de los dúplex o tríplex considerando empíricamente varias variables, tales como la longitud de una región de complementariedad, la composición de bases y la secuencia en una región de complementariedad, la fuerza iónica, la temperatura de fusión (T_m) y la incidencia de pares de bases incorrectamente apareados.

Un "epítipo" se refiere a un sitio en un antígeno que resulta reconocido y que se une a una inmunoglobulina o a un receptor de célula T.

Un "nucleótido extensible" se refiere a un nucleótido al que puede añadirse o unirse covalentemente por lo menos otro nucleótido, por ejemplo en una reacción catalizada por un catalizador biológico que incorpora nucleótidos tras incorporarse el nucleótido extensible en un polímero de nucleótidos. Entre los ejemplos de nucleótidos extensibles se incluyen desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. Un nucleótido extensible típicamente se extiende mediante la adición de otro nucleótido en una posición 3' del grupo azúcar del nucleótido extensible.

El término "extensión" en el contexto de los ácidos nucleicos se refiere a un procedimiento en el que se añaden uno o más nucleótidos, o de otro modo se incorporan, en un ácido nucleico dado.

Un "ácido nucleico cebador extendido" se refiere a un ácido nucleico cebador al que se han añadido, o de otra manera incorporado (por ejemplo unido covalentemente), uno o más nucleótidos adicionales.

Un "pigmento fluorescente" se refiere a un compuesto que es capaz de absorber energía de una fuente energética y emitir luz en respuesta a dicha energía absorbida. En algunas realizaciones, determinados pigmentos fluorescentes funcionan como grupos aceptores en las moléculas biológicas indicadas en la presente memoria.

Una "sonda en horquilla" se refiere a un oligonucleótido que puede utilizarse para llevar a cabo la detección de ácidos nucleicos diana y que incluye por lo menos una región de autocomplementariedad, de manera que la sonda es capaz de formar una estructura de horquilla o bucle bajo condiciones seleccionadas. Típicamente, las sondas en horquilla incluyen uno o más grupos de marcaje. En una realización ejemplar, las fracciones aceptoras y grupos donadores sustancialmente no fluorescentes se posicionan unos respecto a otros en las sondas en horquilla de manera que la transferencia de energía entre estas fracciones pueda producirse sustancialmente sólo en el caso de que la sonda se encuentre en una conformación de horquilla. En otras realizaciones, entre las sondas en horquilla se incluyen fracciones desactivadoras además de fracciones aceptoras y fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes. En algunas de dichas realizaciones, estas fracciones se sitúan en las sondas de manera que las fracciones desactivadoras desactiven por lo menos parcialmente señales de otro modo detectables que resultan de la transferencia de energía entre las fracciones aceptora y donadora sustancialmente no fluorescente en el caso de que las sondas se encuentren en conformaciones de horquilla. En contraste, en el caso de que las sondas en estas realizaciones no se encuentren en conformaciones de horquilla, las señales que resultan de la transferencia de energía entre las fracciones aceptora y donadora sustancialmente no fluorescente generalmente son detectables. Por consiguiente, las sondas en horquilla funcionan de modo similar a las balizas moleculares en algunas de dichas realizaciones. Las sondas en horquilla también funcionan como sondas 5'-nucleasa o sondas de hibridación en determinadas realizaciones.

Una "hormona" se refiere a una molécula biológica producida por un organismo que genera un efecto específico sobre el organismo en un sitio diferente del punto de origen de la molécula biológica en el organismo. Las hormonas típicamente son producidas por los sistemas endocrinos de los organismos multicelulares y generalmente ejercen

efectos estimuladores o inhibidores de la actividad celular. Las hormonas también pueden sintetizarse *ex vivo*.

Una "sonda de hibridación" se refiere a un oligonucleótido que incluye por lo menos una fracción de marcaje que puede utilizarse para llevar a cabo la detección del ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, las sondas de hibridación funcionan por pares. En algunas de dichas realizaciones, por ejemplo, una primera sonda de hibridación de una pareja incluye por lo menos una fracción donadora sustancialmente no fluorescente en su extremo 3' o en una posición próxima al mismo, mientras que la segunda sonda de hibridación de la pareja incluye por lo menos una fracción aceptora (por ejemplo LC-Red 610, LC-Red 640, LC-Red 670, LC-Red 705, JA-270, CY5 ó CY5.5) en su extremo 5' o en una posición próxima al mismo. Las sondas típicamente se diseñan de manera que, al hibridarse ambas sondas con un ácido nucleico diana o molde (por ejemplo durante una PCR), la primera sonda de hibridación se une al lado del extremo 5' o cadena arriba de la segunda sonda de hibridación y a una proximidad suficiente para que se produzca la transferencia de energía entre las fracciones donadora sustancialmente no fluorescente y aceptora, produciendo de esta manera una señal detectable. Típicamente, la segunda sonda de hibridación también incluye un grupo fosfato u otro grupo en su extremo 3' para evitar la extensión de la sonda durante una PCR. En determinadas realizaciones, una pareja de sonda de hibridación incluye la fracción donadora sustancialmente no fluorescente en el extremo 5' de una sonda o en una posición próxima al mismo y la fracción aceptora en el extremo 3' de la otra sonda o en una posición próxima al mismo. En otra realización ejemplar, una sonda de hibridación de una pareja incluye por lo menos una fracción donadora sustancialmente no fluorescente y por lo menos una fracción aceptora, mientras que la otra sonda de la pareja comprende por lo menos una fracción desactivadora. En dicha realización, las fracciones se sitúan en las sondas de manera que la fracción desactivadora desactive la fluorescencia emitida por la fracción aceptora al hibridarse ambas sondas con un ácido nucleico diana.

Los ácidos nucleicos "se hibridan" o "aparean" en una interacción de apareamiento de bases de un polinucleótido con otro polinucleótido (típicamente un polinucleótido antiparalelo) resultando en la formación de un dúplex u otra estructura de orden superior, típicamente denominada complejo de hibridación. La interacción primaria entre los polinucleótidos antiparalelos típicamente es específica de bases, por ejemplo A/T y G/C, mediante interacciones de Watson/Crick y/o de tipo Hoogsteen. No resulta necesario que dos polinucleótidos presenten una complementariedad de 100% en toda su longitud para conseguir la hibridación. En algunos aspectos, un complejo de hibridación puede formarse a partir de interacciones intermoleculares, o alternatively, puede formarse a partir de interacciones intramoleculares. La hibridación se produce en virtud de una diversidad de fuerzas bien caracterizadas, incluyendo los enlaces de hidrógeno, la exclusión de solvente y el apilamiento de bases. Puede encontrarse una guía extensa sobre la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acids Probes*, parte I, capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, 1993.

Una "inmunoglobulina" o "anticuerpo" se refiere a un polipéptido codificado sustancialmente por como mínimo un gen de inmunoglobulina o fragmentos de por lo menos un gen de inmunoglobulina que pueden participar en la unión específica con un ligando. El término incluye formas naturales, así como fragmentos y derivados. Los fragmentos comprendidos dentro del alcance del término tal como se utiliza en la presente memoria incluyen aquellos producidos mediante digestión con diversas peptidasas, tales como fragmentos Fab, Fab' y F(ab)₂, aquellos producidos mediante disociación química, mediante corte químico y recombinantemente o desarrollados de otro modo artificial, con la condición de que el fragmento siga presentando la capacidad de unión específica a una molécula diana. Entre los fragmentos recombinantes típicos, tales como los producidos mediante, por ejemplo, expresión fágica, se incluyen los fragmentos Fab y scFv ("región variable de una cadena"). Entre los derivados comprendidos dentro del alcance del término se incluyen los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) que han sido modificados en su secuencia, pero que siguen presentando la capacidad de unión específica a una molécula diana, incluyendo los anticuerpos quiméricos entre especies y los humanizados. Tal como se utilizan en la presente memoria, pueden producirse anticuerpos o inmunoglobulinas mediante cualquier técnica conocida, incluyendo la recolección a partir de un cultivo celular de linfocitos B nativos, los hibridomas, los sistemas de expresión recombinante o la expresión fágica.

Una "fracción conectora" o "conector" se refiere a una fracción química que une covalente o no covalentemente (por ejemplo iónicamente) un compuesto, grupo sustituyente u otro grupo a, por ejemplo, un soporte sólido, otro compuesto, grupo o fracción. Por ejemplo, un conector opcionalmente une un marcaje (por ejemplo una fracción donadora sustancialmente no fluorescente, una fracción aceptora) a una molécula biológica. Los conectores típicamente son fracciones químicas bifuncionales y en determinadas realizaciones, comprenden uniones cortables que pueden cortarse mediante, por ejemplo, calor, un enzima, un agente químico y/o radiación electromagnética, liberando materiales o compuestos de, por ejemplo, un soporte sólido u otro compuesto. Una elección cuidadosa del conector permite realizar el corte bajo condiciones apropiadas compatibles con la estabilidad del compuesto y el método de ensayo. Generalmente, un conector no presenta ninguna actividad biológica específica aparte de, por ejemplo, la unión de fracciones químicas (por ejemplo las fracciones donadora sustancialmente no fluorescente y aceptora) entre sí o la conservación de cierta distancia mínima u otra relación espacial entre dichas fracciones. Sin embargo, los constituyentes de un conector pueden seleccionarse para que influyan sobre alguna propiedad de las fracciones químicas unidas, tal como la conformación tridimensional, la carga neta y/o la hidrofobicidad. Se proporciona una descripción de moléculas conectoras en, por ejemplo, Lyttle *et al.* *Nucleic Acids Res.* 24(14):2793,

1996; Shchepino *et al.* Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids 20:369, 2001; Doronina *et al.*, Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids 20:1007, 2001; Trawick *et al.* Bioconjugate Chem. 12:900, 2001; Olejnik *et al.* Methods in Enzymology 291:135, 1998; Pljevaljic *et al.* J. Am. Chem. Soc. 125(12):3486, 2003; Ward, *et al.*, patente US nº 4.711.955; Stavrianopoulos, patente US nº 4.707.352, y Stavrianopoulos, patente US nº 4.707.440.

5 Un "lípidio" se refiere a una molécula biológica insoluble en agua que comprende un ácido graso, un esteroide y/o un compuesto isoprenoide. Entre los grupos lípidos ejemplares se incluyen ácidos grasos (por ejemplo ácido oleico, ácido palmítico y ácido esteárico), grasas neutras (por ejemplo aceite de coco y sebo de vacuno), fosfolípidos (por ejemplo fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol), esfingolípidos (por ejemplo esfingomielina), glucolípidos (por ejemplo cerebrósidos y gangliosidos), esteroides (por ejemplo colesterol) y terpenos (por ejemplo aceites esenciales y carotenoides). Los lípidos también se describen en, por ejemplo, Vance

10 *et al.*, Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, 4a edición, Elsevier Science, 2002.

Un "ensayo de mezcla de lípidos" se refiere a un ensayo que implica la detección de una o más propiedades de los lípidos al combinarse o agruparse los lípidos. A título ilustrativo, algunos de dichos ensayos implica fusionar membranas que comprenden fracciones de marcaje, tales como las fracciones donadora sustancialmente no

15 fluorescente, aceptora y/o desactivadora indicados en la presente memoria. Los ensayos de mezcla de lípidos también se describen en, por ejemplo, Blumenthal *et al.* "Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion", Chem. Phys. Lipids 116:39-55, 2002; Hdekstra *et al.* "Lipid mixing assays to determine fusion in liposome systems", Methods Enzymol. 220:15-32, 1993; Hoekstra "Fluorescence assays to monitor membrane fusion: potential application in biliary lipid secretion and vesicle interactions", Hepatology 12:61S-66S, 1990; Stegmann *et al.*

20 "Protein-mediated membrane fusion", Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 18:187-211, 1989; Hoekstra *et al.* "Fluorescence method for measuring the kinetics of fusion between biological membranes", Biochemistry 23:5675-5681, 1984; Struck *et al.* "Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion," Biochemistry 20:4093-4099, 1981; y Stegmann *et al.* "Evaluation of viral membrane fusion assays. Comparison of the octadecylrhodamine dequenching assay with the pyrene excimer assay", Biochemistry 32:11330-11337, 1983.

25 Una "unidad monomérica" o "monómero" se refiere a un compuesto químico que puede someterse a polimerización. Entre las unidades monoméricas ejemplares se incluyen nucleótidos, que pueden polimerizarse para formar un ácido nucleico; aminoácidos, que pueden polimerizarse para formar proteínas; y monosacáridos, que pueden polimerizarse para formar polisacáridos.

Una "mezcla" se refiere a una combinación de dos o más componentes diferentes. Una "mezcla de reacción" se refiere a una mezcla que comprende moléculas que pueden participar y/o facilitar una reacción o ensayo dado. A título ilustrativo, una mezcla de reacción de amplificación generalmente incluye una solución que contiene reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación, y típicamente contiene cebadores, un catalizador biológico que incorpora nucleótidos, dNTPs y un catión metálico divalente en un tampón adecuado. Se indica que una mezcla de reacción es completa en el caso de que contenga todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la

30 reacción, e incompleta en el caso de que contiene únicamente un subconjunto de los reactivos necesarios. El experto en la materia entenderá que los componentes de reacción se almacenan rutinariamente en forma de soluciones separadas, conteniendo cada una un subconjunto de los componentes totales, por motivos de comodidad, estabilidad de almacenamiento, o para permitir el ajuste dependiente de la aplicación de las concentraciones de componentes, y que los componentes de reacción se combinan antes de la reacción para crear una mezcla de reacción completa. Además, el experto en la materia entenderá que los componentes de reacción se empaquetan separadamente para su comercialización y que los kits comerciales útiles pueden contener cualquier subconjunto de los componentes de reacción o de ensayo, incluyendo las moléculas biológicas de la invención.

Una "fracción" o "grupo" se refiere a una de las partes en las que se divide algo, tal como una molécula (por ejemplo un grupo funcional o un grupo sustituyente). Por ejemplo, una molécula biológica de la invención incluye por lo

45 menos una fracción donadora sustancialmente no fluorescente.

El término "seguimiento" en el contexto de un procedimiento, reacción o ensayo dado se refiere a la observación, detección, ensayo y/o cuantificación periódica o continua de uno o más aspectos o propiedades del procedimiento, reacción o ensayo o componente de los mismos. A título ilustrativo, en determinados ensayos basados en PCR, la intensidad de la luz emitida por los grupos aceptores se detecta periódica o continuamente durante los ciclos de

50 reacción. Un procedimiento de seguimiento típicamente se encuentra automatizado por lo menos parcialmente. Una "fracción donadora no fluorescente" se refiere a una fracción que es capaz de transferir, emitir o donar una o más formas de energía de excitación a una o más fracciones aceptoras, aunque no energía, en forma de fluorescencia detectable. Una "fracción donadora sustancialmente no fluorescente" se refiere a una fracción que es capaz de transferir, emitir o donar una o más formas de energía de excitación a una o más fracciones aceptoras, aproximada o

55 esencialmente sin emitir fluorescencia detectable del donante. Por ejemplo, una proporción entre una emisión fluorescente absoluta detectable procedente de una fracción fluorescente y una emisión fluorescente absoluta detectable procedente de una fracción donadora sustancialmente no fluorescente a aproximadamente las mismas concentraciones de la fracción fluorescente y de la fracción donadora sustancialmente no fluorescente típicamente es de aproximadamente 500:1 ó superior, más típicamente de aproximadamente 1.000:1 ó superior, y todavía más

60 típicamente de aproximadamente 1.500:1 ó superior (por ejemplo de aproximadamente 2.000:1, de

aproximadamente 2.500:1, de aproximadamente 3.000:1, de aproximadamente 3.500:1, de aproximadamente 4.000:1, de aproximadamente 4.500:1 ó de aproximadamente 5.000:1). Entre las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes ejemplares se incluyen 4',5'-dimetoxi-6-carboxifluoresceína, 4',5'-dimetoxi-5-carboxifluoresceína, 6-carboxi-aminopentaclorofluoresceína y 5-carboxi-aminopentaclorofluoresceína. Las fracciones donadoras no fluorescentes y las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes emiten energía de excitación no fluorescente en respuesta a la absorción de una cantidad suficiente de energía procedente de otra fuente de energía (por ejemplo una fuente de luz y/o una fuente de calor). Además, las fraccionesceptoras generalmente son capaces de absorber la energía de excitación emitada por dichas fracciones donadoras y emitir fluorescencia en respuesta.

La expresión "energía no fluorescente" se refiere a energía que no se encuentra en forma de fluorescencia emitida.

La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a un polímero que corresponde a un polímero de ácido ribonucleico (ARN) o de ácido desoxirribonucleico (ADN), o a un análogo del mismo. Lo anterior incluye polímeros de nucleótidos tales como ARN y ADN, así como formas modificadas de los mismos, ácidos péptidonucleicos (APNs) y ácidos nucleicos bloqueados (LNATMs). En determinadas realizaciones, un ácido nucleico puede ser un polímero que incluye múltiples tipos de monómero, por ejemplo subunidades tanto de ARN como de ADN. Un ácido nucleico puede ser o puede incluir, por ejemplo, un cromosoma o segmento cromosómico, un vector (por ejemplo un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero desnudo de ADN o ARN, el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un oligonucleótido, una sonda y un cebador. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, de una cadena, de doble cadena o de triple cadena y no se encuentra limitada a ninguna longitud en particular. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácidos nucleicos opcionalmente comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia indicada explícitamente.

Los ácidos nucleicos no se encuentran limitados a moléculas que presentan secuencias o estructuras polinucleótidas naturales, esqueletos naturales y/o enlaces internucleótidos naturales. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se encuentran incluidos dentro de esta definición (Jenkins *et al.* Chem. Soc. Rev., páginas 169 a 176, 1995). A título ilustrativo adicional, aunque un ácido nucleico generalmente contiene enlaces fosfodiéster, en algunos casos se encuentran incluidos análogos de ácidos nucleicos que presentan esqueletos alternativos. Entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, fosforamida (Beaucage *et al.* Tetrahedron 49(10):1925, 1993, y las referencias en la misma; Letsinger, J. Org. Chem. 35:3800, 1970; Sprinzl *et al.* Eur. J. Biochem. 81:579, 1977; Letsinger *et al.* Nucl. Acids Res. 14: 3487, 1986; Carty *et al.* Chem. Lett. 805, 1984; Letsinger *et al.* J. Am. Chem. Soc. 110:4470, 1988; Pauwels *et al.* Chemica Scripta 26:1419, 1986); fosforotioato (Mag *et al.* Nucleic Acids Res. 19:1437, 1991, y la patente US nº 5.644.048), fosforoditioato (Briu *et al.* J. Am. Chem. Soc. 111:2321, 1989), enlaces O-metilfosforoamidita (Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press, 1991), y esqueletos y enlaces de ácidos péptidonucleicos (Egholm, J. Am. Chem. Soc. 114:1895, 1992; Meier *et al.* Chem. Int. Ed. Engl. 31:1008, 1992; Nielsen, Nature 365:566, 1993; y Carlsson *et al.* Nature 380:207, 1996). Entre otros análogos de ácidos nucleicos se incluyen aquellos con esqueletos con carga positiva (Denpcy *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6097, 1995), esqueletos no iónicos (patentes US nº 5.386.023, nº 5.637.684, nº 5.602.240, nº 5.216.141 y nº 4.469.863; Angew. Chem. Intl. Ed. English 30: 423, 1991; Letsinger *et al.* J. Am. Chem. Soc. 110:4470, 1988; Letsinger *et al.* Nucleoside & Nucleotide 13:1597, 1994; capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", editores Y.S. Sanghvi y P. Dan Cook; Mesmaeker *et al.* Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4: 395, 1994; Jeffs *et al.* J. Biomolecular NMR 34:17, 1994; Tetrahedron Lett. 37:743, 1996) y esqueletos no de ribosa, incluyendo los indicados en las patentes US nº 5.235.033 y 5.034.506, y los capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, editores Y.S. Sanghvi y P. Dan Cook. También se describen varios análogos de ácidos nucleicos en, por ejemplo, Rawls C. & E. News, 2 de junio de 1997, página 35. Pueden realizarse modificaciones del esqueleto de ribosa-fosfato para facilitar la adición de fracciones adicionales, tales como fracciones de marcaje, o para alterar la estabilidad y vida media de dichas moléculas en ambientes fisiológicos.

Además de las bases heterocíclicas naturales que se encuentran típicamente en los ácidos nucleicos (por ejemplo adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), los análogos de ácidos nucleicos también incluyen aquellos que presentan bases heterocíclicas no naturales u otras bases modificadas. A título ilustrativo, determinadas bases utilizadas en los nucleótidos que actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_m) se encuentran opcionalmente incluidas. Por ejemplo, entre algunas de ellas se incluyen las 7-deazapurinas (por ejemplo 7-deazaguanina ó 7-deazaadenina), las pirazolo[3,4-d]pirimidinas y propinil-dN (por ejemplo propinil-dU o propinil-dC). Ver, por ejemplo la patente US nº 5.990.303, titulada "SYNTHESIS OF 7-DEAZA-2'-DEOXYGUANOSINE NUCLEOTIDES", expedida el 23 de noviembre de 1999 a Seela. Entre otras bases heterocíclicas representativas se incluyen, por ejemplo, hipoxantina, xantina, derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina y xantina; derivados 7-deaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina; 6-azacitosina, 5-fluorocitosina, 5-clorocitosina, 5-yodocitosina, 5-bromocitosina, 5-metilcitosina, 5-propinilcitosina, 5-bromoviniluracilo, 5-fluorouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, 5-bromouracilo, 5-trifluorometiluracilo, 5-metoximetiluracilo, 5-etiniluracilo y 5-propiniluracilo. Muchas bases no naturales también se describen en, por ejemplo, Seela *et al.* Helv. Chim. Acta 74:1790, 1991; Grein *et al.* Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:971-976, 1994; y Seela *et al.* Helv. Chim. Acta 82:1640, 1999.

También se describen ejemplos adicionales de bases y nucleótidos modificados en, por ejemplo, la patente US nº 5.484.908, titulada "OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING 5-PROPYNYL PYRIMIDINES", expedida el 16 de enero de 1996 a Froehler *et al.*; en la patente US nº 5.645.985, titulada "ENHANCED TRIPLE-HELIX AND DOUBLE-HELIX FORMATION WITH OLIGOMERS CONTAINING MODIFIED PYRIMIDINES", expedida el 8 de julio de 1997 a Froehler *et al.*; en la patente US nº 5.830.653, titulada "METHODS OF USING OLIGOMERS CONTAINING MODIFIED PYRIMIDINES", expedida el 3 de noviembre de 1998 a Froehler *et al.*; en la patente US nº 6.639.059, titulada "SYNTHESIS OF [2.2.1]BICYCLONUCLEOSIDES", expedida el 28 de octubre de 2003 a Kochkine *et al.*; en la patente US nº 6.303.315, titulada "ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES", expedida el 16 de octubre de 2001 a Skouv, y en la solicitud expedida de patente US nº 2003/0092905, titulada "SYNTHESIS OF [2.2.1]BICYCLO NUCLEOSIDES" a Kochkine *et al.*, expedida el 15 de mayo de 2003.

Un "nucleósido" se refiere a un componente ácido nucleico que comprende una base o grupo básico (por ejemplo que comprende por lo menos un anillo homocíclico, por lo menos un anillo heterocíclico y/o por lo menos un grupo arilo) unido covalentemente a una fracción azúcar (por ejemplo un azúcar ribosa), un derivado de una fracción azúcar, o un equivalente funcional de una fracción azúcar (por ejemplo un análogo, tal como un anillo carbocíclico). Por ejemplo, en el caso de que un nucleósido incluya una fracción azúcar, la base típicamente se encuentra unida en posición 1' de dicha fracción azúcar. Tal como se ha indicado anteriormente, una base puede ser natural (por ejemplo una base purina, tal como adenina (A) o guanina (G); una base pirimidina, tal como timina (T), citosina (C) o uracilo (U)), o no natural (por ejemplo una base 7-deazapurina, una base pirazolo[3,4-d]pirimidina o una base propinil-dN). Entre los nucleósidos ejemplares se incluyen ribonucleósidos, desoxirribonucleósidos, dideoxirribonucleósidos y nucleósidos carbocíclicos.

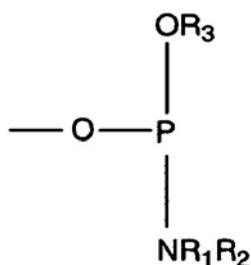
Un "nucleótido" se refiere a un éster de un nucleósido, por ejemplo un éster fosfato de un nucleósido. A título ilustrativo, un nucleótido puede incluir 1, 2, 3 ó más grupos fosfato unidos covalentemente en una posición 5' de una fracción azúcar del nucleósido.

Un "catalizador biológico que incorpora nucleótidos" se refiere a un catalizador que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Los catalizadores biológicos que incorporan nucleótidos son típicamente enzimas. Un "enzima" es un catalizador basado en proteínas y/o ácidos nucleicos que actúa reduciendo la energía de activación de una reacción química en la que participan otros compuestos o "sustratos". Un "enzima que incorpora nucleótidos" se refiere a un enzima que cataliza la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico, por ejemplo durante la amplificación de ácidos nucleicos. Entre los enzimas ejemplares que incorporan nucleótidos se incluyen, por ejemplo, polimerasas, transferasas terminales, transcriptasas inversas, telomerasas, polinucleótido fosforilasas y ligasas. Un "enzima termoestable" se refiere a un enzima que es estable frente al calor, es resistente al calor y conserva suficiente actividad catalítica al someterlo a temperaturas elevadas durante periodos seleccionados de tiempo. Por ejemplo, una polimerasa termoestable conserva suficiente actividad para llevar a cabo las reacciones posteriores de extensión de cebadores al someterla a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para llevar a cabo la desnaturalización de los ácidos nucleicos de doble cadena y a temperaturas que permiten la hibridación de los cebadores. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de los ácidos nucleicos son bien conocidas por el experto en la materia y se ejemplifican en la patente US nº 4.683.202, titulada "PROCESS FOR AMPLIFYING NUCLEIC ACID SEQUENCES", expedida el 28 de julio de 1987 a Mullis; y la patente US nº 4.683.195, titulada "PROCESS FOR AMPLIFYING, DETECTING AND/OR CLONING NUCLEIC ACID SEQUENCES", expedida el 28 de julio de 1987 a Mullis *et al.* A título ilustrativo adicional, una "polimerasa termoestable" se refiere a un enzima que resulta adecuado para la utilización en una reacción de ciclado térmico, tal como una reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). Para una polimerasa termoestable, la actividad enzimática se refiere a la catálisis de la combinación de los nucleótidos de manera apropiada para formar productos de extensión de cebadores que son complementarios al ácido nucleico molde.

Un "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye por lo menos dos unidades monoméricas de ácidos nucleicos (por ejemplo nucleótidos), típicamente más de tres unidades monoméricas, y más típicamente más de diez unidades monoméricas. El tamaño exacto de un oligonucleótido generalmente depende de diversos factores, incluyendo la función última o utilización del oligonucleótido. Típicamente, los monómeros nucleósidos se unen mediante enlaces fosfodiéster o análogos de los mismos, incluyendo fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotoato, fosforanilidato, fosforamidato y fosfonato de metilo, incluyendo contraiones asociados, por ejemplo H^+ , NH_4^+ y Na^+ , en el caso de que dichos contraiones se encuentren presentes. Los oligonucleótidos opcionalmente se preparan mediante cualquier método adecuado, incluyendo, aunque sin limitación, el aislamiento de una secuencia existente o natural, la replicación o amplificación del ADN, la transcripción inversa, la clonación y digestión de restricción de secuencias apropiadas, o la síntesis química directa mediante un método tal como el método del fosfotriéster de Narang *et al.* Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979; el método del fosfodiéster de Brown *et al.* Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979; el método de la dietilfosforamida de Beaucage *et al.* Tetrahedron Lett. 22:1859-1862, 1981; el método del triéster de Matteucci *et al.* J. Am. Chem. Soc. 103:3185-3191, 1981; los métodos sintéticos automatizados, o el método en soporte sólido de la patente US nº 4.458.066, titulada "PROCESS FOR PREPARING POLYNUCLEOTIDES", expedida el 3 de julio de 1984 a Caruthers *et al.*, u otros métodos conocidos por el experto en la materia.

La expresión "absorbancia visible pico" se refiere a una longitud de onda a la que una molécula absorbe energía en la región visible u óptica del espectro electromagnético más eficientemente. La región visible u óptica del espectro electromagnético típicamente incluye longitudes de onda que se encuentran comprendidas entre aproximadamente 700 nanómetros (nm) y aproximadamente 400 nm. En algunas realizaciones, por ejemplo, la transferencia de energía no fluorescente desde una fracción donadora sustancialmente no fluorescente hasta una fracción aceptora es más eficiente en el caso de que las absorbancias visibles pico de la fracción donadora sustancialmente no fluorescente y de la fracción aceptora difieran entre sí en aproximadamente 100 nm o más. Dependiendo de la molécula particular considerada, la absorbancia visible pico puede corresponder a un máximo de absorbancia global para la molécula o a un máximo de absorbancia local para la molécula en la región visible del espectro electromagnético.

Una "fosforamidita" se refiere a un compuesto que incluye un grupo que comprende la fórmula:



en la que R^1 y R^2 son grupos alquilo seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste de: metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo y heptilo, y R_3 es $(\text{CH}_2)_2\text{CN}$ o CH_3 . En determinadas realizaciones, por ejemplo, una fosforamidita es un monómero nucleósido-3'-fosforamidita, comúnmente utilizada en procedimientos de síntesis de oligonucleótidos. En algunas de dichas realizaciones, estos monómeros fosforamidita se encuentran protegidos en la posición 5'-hidroxilo con un grupo protector. Típicamente también se unen diferentes grupos protectores a las aminas exocíclicas de la bases. Además, el átomo de fósforo del monómero se protege opcionalmente con grupos beta-cianoetilo (R_3) y diisopropilamina (NR_1R_2) u otros grupos que son consistentes con la fórmula mostrada anteriormente. Las fosforamiditas y la síntesis de oligonucleótidos también se describen en, por ejemplo, Beaucage *et al.* "Advances in the synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach", Tetrahedron 48:2223-2311, 1992.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan intercambiabilmente en la presente memoria refiriéndose a un polímero de aminoácidos. Los términos resultan de aplicación a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos aminoácidos son análogos, derivados o miméticos de aminoácidos naturales correspondientes, así como polímeros de aminoácidos naturales. Por ejemplo, los polipéptidos pueden modificarse o derivatizarse, por ejemplo mediante la adición de residuos carbohidrato para formar glucoproteínas mediante la adición de fracciones lípidos para formar lipoproteínas. Por consiguiente, los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" incluyen glucoproteínas y lipoproteínas, así como no glucoproteínas y no lipoproteínas.

Un "ácido nucleico cebador" o "cebador" es un ácido nucleico que puede hibridarse con un ácido nucleico diana o molde y permitir la extensión o alargamiento de la cadena utilizando, por ejemplo, un catalizador biológico que incorpora nucleótidos, tal como una polimerasa bajo condiciones de reacción apropiadas. Un ácido nucleico cebador típicamente es un oligonucleótido natural o sintético (por ejemplo un oligodesoxirribonucleótido de una sola cadena). Aunque opcionalmente se utilizan otras longitudes de ácido nucleico cebador, típicamente comprende regiones hibridantes de longitud comprendida entre aproximadamente 8 y aproximadamente 100 nucleótidos. Los ácidos nucleicos cebadores cortos generalmente requieren temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con ácidos nucleicos molde. Un ácido nucleico cebador que es complementario por lo menos parcialmente respecto a una subsecuencia de un ácido nucleico molde típicamente resulta suficiente para la hibridación con el molde para que se produzca la extensión. Puede marcarse un ácido nucleico cebador, si se desea, mediante la incorporación de un marcaje detectable mediante, por ejemplo, técnicas espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunoquímicas, químicas u otras. A título ilustrativo, entre los marcajes útiles se incluyen fracciones donadores sustancialmente no fluorescentes, fracciones aceptoras, fracciones desactivadoras, isótopos radioactivos, reactivos electrodenso, enzimas (utilizados comúnmente en la realización de los ELISAs), biotina o haptenos y proteínas para las que encuentran disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales. Muchos de ellos y otros marcajes se describen adicionalmente en la presente memoria y/o de otro modo son conocidos de la técnica. El experto en la materia reconocerá que, en determinadas realizaciones, también pueden utilizarse ácidos nucleicos cebadores como ácidos nucleicos de sonda.

Una "molécula biológica sonda" se refiere a una molécula biológica marcada o no marcada que es capaz de unirse selectivamente a una molécula biológica diana.

Un "grupo protector" se refiere a un grupo química que se une covalente o no covalentemente a un compuesto dado y que evita que se produzcan reacciones químicas no deseadas en uno o más sitios del compuesto. Entre los grupos protectores ejemplares se incluyen tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, levulinilo, fluorenilmetoxicarbonilo y benzhidriloxicarbonilo.

- 5 La expresión "ácido nucleico sonda" o "sonda" se refiere a un oligonucleótido marcado o no marcado capaz de hibridarse selectivamente con un ácido nucleico diana o molde bajo condiciones adecuadas. Típicamente, una sonda es suficientemente complementaria respecto a una secuencia diana específica contenida en una muestra de ácidos nucleicos, formando un dúplex de hibridación estable con la secuencia diana bajo condiciones de hibridación seleccionadas, tales como, aunque sin limitación, condiciones restrictivas de hibridación. Un ensayo de hibridación
- 10 llevado a cabo utilizando una sonda bajo condiciones de hibridación suficientemente restrictivas permite la detección selectiva de una secuencia diana específica. La expresión "región hibridante" se refiere a aquella región de un ácido nucleico que es exacta o sustancialmente complementaria a la secuencia diana, y por lo tanto capaz de hibridarse con la misma. Para la utilización en un ensayo de hibridación para la discriminación de diferencias de nucleótidos individuales en la secuencia, la región hibridante típicamente presenta una longitud de entre aproximadamente 8 y
- 15 aproximadamente 100 nucleótidos. Aunque la región hibridante generalmente se refiere al oligonucleótido entero, la sonda puede incluir secuencias de nucleótidos adicionales que funcionan, por ejemplo, como sitios de unión a conectores, proporcionando un sitio para la unión de la secuencia sonda a un soporte sólido. Generalmente se incluye una sonda de la invención en un ácido nucleico que comprende uno o más marcajes (por ejemplo fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes, fracciones aceptoras y/o fracciones desactivadoras), tales como una
- 20 sonda 5'-nucleasa, una sonda de hibridación, una sonda de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), una sonda en horquilla o una baliza molecular, que también puede utilizarse para detectar la hibridación entre los ácidos nucleicos sonda y diana en una muestra. En algunas realizaciones, la región hibridante de la sonda es completamente complementaria a la secuencia diana. Sin embargo, en general no resulta necesaria la complementariedad completa (es decir, los ácidos nucleicos pueden ser parcialmente complementarios entre sí); los complejos de hibridación estables pueden contener bases incorrectamente apareadas o desapareadas. Puede resultar necesaria la modificación de las condiciones restrictivas para permitir la formación de un complejo de hibridación estable con uno o más apareamientos incorrectos de pares de bases o con bases desapareadas. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), proporciona guías para realizar las modificaciones adecuadas. La estabilidad del
- 30 complejo de hibridación de diana/sonda depende de varias variables, entre ellas la longitud del oligonucleótido, la composición de bases y la secuencia del oligonucleótido, temperatura y condiciones iónicas. El experto en la materia reconocerá que, en general, el complemento exacto de una sonda dada, de manera similar, resulta útil como sonda. El experto en la materia también reconocerá que, en determinadas realizaciones, también pueden utilizarse ácidos nucleicos sonda como ácidos nucleicos cebadores.
- 35 La expresión "ensayo de proximidad" se refiere a un ensayo en el que la producción de una señal detectable depende por lo menos en parte de que las fracciones aceptora y donadora se encuentran suficientemente próximas entre sí. En determinadas realizaciones, por ejemplo, moléculas biológicas separadas comprenden fracciones aceptora y donadora de manera que la producción de emisiones energéticas detectables de las fracciones aceptoras depende por lo menos en parte de la distancia intermolecular entre las moléculas biológicas. En otras realizaciones ejemplares, las moléculas biológicas comprenden fracciones aceptora y donadora (por ejemplo unidas a las mismas o a diferentes unidades monoméricas de un polímero biológico) y la generación de emisiones energéticas detectables de las fracciones aceptoras depende por lo menos en parte del espaciado intramolecular entre dichas fracciones. En algunas de dichas realizaciones, las emisiones energéticas detectables de las fracciones aceptoras varían, por ejemplo, al experimentar las moléculas biológicas cambios conformacionales, o a medida que se
- 40 incrementa la distancia entre las fracciones aceptora y donadora en las moléculas biológicas por procesos enzimáticos u otros procesos de corte.

- Una "fracción desactivadora" o "desactivador" se refiere a una fracción que es capaz de reducir la emisión detectable de radiación, por ejemplo radiación fluorescente o luminiscente, de una fuente respecto a la que habría emitido en su ausencia. Un desactivador típicamente reduce la radiación detectable emitida por la fuente en por lo menos 50%,
- 50 típicamente en por lo menos 80%, y más típicamente en por lo menos 90%. Determinados desactivadores pueden reemitir la energía absorbida de, por ejemplo, un pigmento fluorescente dando lugar a una señal característica para dicho desactivador y, por lo tanto, un desactivador también puede ser una fracción aceptora. Este fenómeno se conoce generalmente como transferencia de energía por resonancia fluorescente o FRET. Alternativamente, un desactivador puede disipar la energía absorbida de un pigmento fluorescente en una forma diferente de la luz, tal como en forma de calor. Entre las moléculas utilizadas comúnmente en las aplicaciones de FRET se incluyen, por ejemplo, fluoresceína, FAM, JOE, rodamina, R6G, TAMRA, ROX, dabculo y EDANS. Se determina si un pigmento fluorescente es un aceptor o un desactivador a partir de sus espectros de excitación y de emisión, y el pigmento fluorescente con el que se encuentra emparejado. Por ejemplo, FAM es excitado más eficientemente por luz de una longitud de onda de 494 nm, y emite luz con un espectro de 500 a 650 nm, y un máximo de emisión de 525 nm. FAM es una fracción donadora adecuada para la utilización con, por ejemplo, TAMRA como desactivador, que presenta como su máximo de excitación, 560 nm. Entre los desactivadores no fluorescentes o oscuros ejemplares que disipan energía absorbida de un pigmento fluorescente se incluyen los Black Hole QuenchersTM, comercializados por
- 60

Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA, USA). Los Black Hole Quenchers™ son estructuras que comprenden por lo menos tres radicales seleccionados de entre compuestos arilo o heteroarilo sustituidos o no sustituidos, o combinaciones de los mismos, en los que por lo menos dos de los residuos se unen mediante un enlace diazo exocíclico (ver, por ejemplo, la publicación internacional nº WO 01/86001, titulada "DARK QUENCHERS FOR DONOR-ACCEPTOR ENERGY TRANSFER", expedida el 15 de noviembre de 2001 a Cook *et al.*). También se proporcionan desactivadores ejemplares en, por ejemplo, la patente US nº 6.465.175, titulada "OLIGONUCLEOTIDE PROBES BEARING QUENCHABLE FLUORESCENT LABELS, AND METHODS OF USE THEREOF", expedida el 15 de octubre de 2002 a Horn *et al.*

Una "secuencia" de un polímero biológico se refiere al orden e identidad de las unidades monoméricas (por ejemplo nucleótidos, aminoácidos y monosacáridos) en el polímero biológico. La secuencia de un ácido nucleico típicamente se lee en la dirección 5' a 3', mientras que la secuencia de un polipéptido generalmente se lee en una dirección de extremo amino-terminal o N-terminal a extremo carboxilo-terminal o C-terminal de la molécula.

Un "soporte sólido" se refiere a un material sólido que puede derivatizarse, o de otro modo unirse a una fracción química, tal como una sonda. Entre los soportes sólidos ejemplares se incluyen placas, perlas, microperlas, vidrio de poro controlado (CPG), poliestireno, tubos, fibras, triquitos, peines, chips de hibridación (incluyendo sustratos micromatrices, tales como los utilizados en matrices de sondas GeneChip® (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA)), membranas, cristales individuales, capas cerámicas, monocapas autoensamblantes y superficies metálicas.

Las expresiones "restrictivo" o "condiciones restrictivas", tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a condiciones de hibridación de baja fuerza iónica y alta temperatura, tal como es bien conocido de la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001; Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, editor, J. Wiley & Sons Inc., New York, 1997); Tijssen, 1993, *supra*. Generalmente, las condiciones restrictivas se selecciona que sean aproximadamente 5°C a 30°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) de la secuencia especificada a una fuerza iónica y pH definidos. Alternativamente, las condiciones restrictivas se selecciona que sean aproximadamente 5°C a 15°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) de la secuencia especificada a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácidos nucleicos definidos) a la que 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en el equilibrio (debido a que las secuencias diana se encuentran presentes en exceso, a la T_m , el 50% de las sondas se hibridan en el equilibrio).

Una "subsecuencia", "segmento" o "fragmento" se refiere a cualquier parte de una secuencia entera de polímero biológico.

La expresión "suficientemente próximo" en el contexto de la transferencia energética entre fracciones donadora y aceptora se refiere a un espaciado y/o situación adecuados de dichas fracciones una respecto a la otra para que las fracciones aceptoras sean capaces de aceptar o absorber la energía transferida por las fracciones donadoras. A título ilustrativo, determinadas fracciones aceptoras en respuesta a la absorción de cantidades suficientes de energía no fluorescente transferida por fracciones donadoras convenientemente espaciadas y/o sustancialmente no fluorescentes.

Un "azúcar" o "carbohidrato" se refiere a un polihidroxi-aldehído (aldosa) o polihidroxiketona (cetosa) o compuestos o análogos derivados de los mismos. Los polímeros de carbohidratos (por ejemplo oligosacáridos y polisacáridos) incluyen unidades monoméricas de monosacáridos. Entre los carbohidratos ejemplares se incluyen gliceraldehído, eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, dihidroxiacetona, xilulosa y fructosa. Los análogos de azúcares, tales como los azúcares carbocíclicos, también se encuentran incluidos en la definición de azúcar (ver, por ejemplo, Jenkins *et al.* Chem. Soc. Rev., páginas 169 a 176, 1995).

Un "sistema" se refiere a un grupo de objetos y/o dispositivos que forman una red para llevar a cabo el objetivo deseado. En algunas realizaciones, por ejemplo, un sistema de la invención incluye un recipiente y/o soporte sólido que incluye una o más moléculas biológicas que comprende fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes y componentes de detección que se configuran para detectar la luz emitida por fracciones aceptoras en el caso de que las fracciones aceptoras se encuentran suficientemente próximas a las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes, por ejemplo como parte de ensayos de sondas de hibridación.

Una "diana" se refiere a una molécula biológica, o parte de la misma, que debe amplificarse, detectarse y/o analizarse de otro modo.

Un "nucleótido terminador" se refiere a un nucleótido, que tras la incorporación en un ácido nucleico evita la extensión adicional del ácido nucleico, por ejemplo por parte de un catalizador biológico que incorpora nucleótidos.

Los objetos "se comunican térmicamente" entre sí en el caso de que la energía térmica se transfiera o presente la capacidad de transferirse entre los objetos. En determinadas realizaciones de los sistemas descritos en la presente memoria, por ejemplo los moduladores térmicos se comunican térmicamente con recipientes y/o soportes sólidos, modulando la temperatura en los recipientes y/o en los soportes sólidos.

II. INTRODUCCIÓN

La presente invención se refiere de manera general a la transferencia de energía no fluorescente entre fracciones donadoras y fraccionesceptoras. Más concretamente, las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes indicadas en la presente memoria pueden utilizarse esencialmente en cualquier aplicación que implique la transferencia de energía entre fracciones donadora y aceptora, incluyendo muchos formatos diferentes de ensayo de proximidad. Las parejas convencionales de pigmentos de transferencia energética, por ejemplo, típicamente se preparan con una fracción donadora fluorescente de longitud de onda corta que transmite la energía absorbida a una fracción aceptora de longitud de onda más larga. Además, se cree generalmente que el espectro de emisión fluorescente de la fracción donadora y el espectro de absorbancia fluorescente de la fracción aceptora deben ser solapantes. En contra de dicha enseñanza convencional, un resultado inesperado de la presente invención es que las fracciones donadoras indicadas en la presente memoria no presentan espectros apreciables de emisión fluorescente. Sin embargo, en el caso de que las fraccionesceptoras se sitúen suficientemente próximas a dichas fracciones donadoras, las fraccionesceptoras emiten luz en respuesta a la absorción de energía no fluorescente transferida por las fracciones donadoras.

Un problema común asociado a la utilización de fracciones donadoras fluorescentes convencionales, tales como la fluoresceína, es la fluorescencia de fondo emitida por las fracciones donadoras mismas (por ejemplo la patente EP nº 1.067.134, de Heller, y la patente US nº 2005/0164316, de Bray). Esta fluorescencia de fondo puede dificultar la identificación de la transferencia de energía a las fraccionesceptoras de longitud de onda más larga, particularmente en aplicaciones multiplex que incluyen la utilización de múltiples sondas donadoras fluorescentes. En particular, las emisiones de luz de fondo o de línea base, tales como las anteriores, típicamente impactan negativamente sobre el rendimiento de los ensayos que implican dichas sondas por ejemplo al limitar la sensibilidad (es decir, la capacidad del ensayo de discriminar entre pequeñas diferencias de concentración del analito) y el rango dinámico (es decir, el rango útil del ensayo, que se extiende entre la concentración más baja a la que pueden realizarse mediciones cuantitativas (límite de cuantificación, o LOQ) y la concentración a la que la curva de calibración se aparta de la linealidad (límite de linealidad, LOL) de detección. En particular Heller (patente EP nº 1.067.134) describe pigmentos donadores no fluorescentes que muestran una relación señal a ruido reducida o un nivel reducido de emisión de fondo de fluorescencia en ensayos fluorescentes FRET. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, entre las ventajas de utilizar las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes indicadas en la presente memoria se encuentra la reducción o eliminación de dicho tipo de fluorescencia de fondo, mejorando de esta manera el rendimiento de los ensayos que incluyen estos tipos de fracciones donadoras. Las relaciones mejoradas de señal a ruido proporcionadas por las fracciones donadoras indicadas en la presente memoria se ilustran adicionalmente, conjuntamente con muchas otras características de la invención, en los ejemplos proporcionados posteriormente.

Tal como se describe en mayor detalle posteriormente, la invención proporciona moléculas biológicas (por ejemplo reactivos de síntesis de polímeros biológicos, oligonucleótidos, polipéptidos, carbohidratos y lípidos) que incluyen las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes indicadas en la presente memoria asociadas covalentemente o de otro modo con las mismas. La invención también proporciona diversas mezclas de reacción que incluyen dichas moléculas biológicas conjuntamente con otros reactivos para llevar a cabo un procedimiento dado, tal como la síntesis de polímeros biológicos, el marcaje de polímeros biológicos, la detección de ácidos nucleicos, entre muchas otras descritas en la presente memoria o de otro modo conocidas por el experto en la materia. Tal como también se describe en la presente memoria, también se proporcionan diversos métodos. En determinadas realizaciones, por ejemplo, la invención proporciona métodos para llevar a cabo ensayos de proximidad y métodos de detección de moléculas biológicas diana. A título ilustrativo, las moléculas biológicas indicadas en la presente memoria se utilizan opcionalmente en métodos para detectar ácidos nucleicos en diversas aplicaciones, incluyendo el genotipado, el diagnóstico, medicina forense, entre muchas otras conocidas por el experto en la materia. A título ilustrativo adicional, también se proporcionan métodos de secuenciación y/o marcaje de polímeros biológicos, así como métodos para sintetizar las moléculas biológicas indicadas en la presente memoria. La invención proporciona además determinados métodos comerciales. Además, la invención también proporciona diversos kits y sistemas. Este aspecto y una diversidad de otros aspectos y características de la presente invención resultarán evidentes tras una revisión completa de la presente exposición.

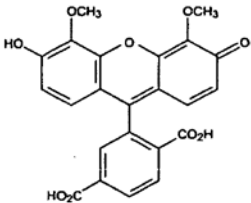
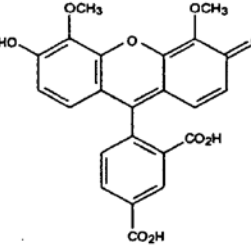
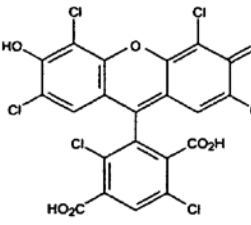
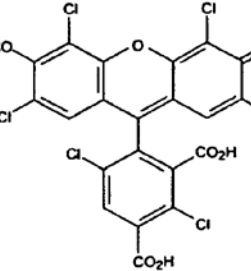
III. FRACCIONES DONADORAS SUSTANCIALMENTE NO FLUORESCENTES

Puede utilizarse como fracción donadora sustancialmente no fluorescente esencialmente cualquier compuesto que sea capaz de transferir energía no fluorescente a una fracción aceptora sin emitir fluorescencia apreciable durante el proceso. Por consiguiente, en la presente memoria no se realiza ningún intento de listar todos los posibles compuestos que se utilizan opcionalmente con este propósito. La presente invención en particular proporciona fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes específicas que comprenden uno o más de entre: 4',5'-dimetoxi-6-carboxifluoresceína, 4',5'-dimetoxi-5-carboxifluoresceína, 6-carboxi-aminopentaclorofluoresceína ó 5-carboxi-aminopentaclorofluoresceína, siendo capaz dicho grupo donador no fluorescente de transferir energía no fluorescente a por lo menos un grupo aceptor en el caso de que la fracción aceptora se encuentre suficientemente próxima a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente para que la fracción aceptora emita luz en respuesta a la energía no fluorescente absorbida. En particular entre las fracciones donadoras sustancialmente no

fluorescentes representativas, o los precursores de las mismas, se incluyen los compuestos anteriormente mencionados y 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína, así como 5-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína. Las estructuras químicas de algunos de dichas fracciones ejemplares se ilustran esquemáticamente en la Tabla I.

5

TABLA I

4',5'-dimetoxi-6-carboxifluoresceína	
4',5'-dimetoxi-5-carboxifluoresceína	
6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína	
5-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína	

Se observa que, bajo determinadas condiciones (por ejemplo en el caso de que se calienten en amonio a 55°C oligonucleótidos marcados con HEX durante aproximadamente 24 horas), la unión de 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-

hexaclorofluoresceína y 5-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína a moléculas biológicas se ve acompañada de la pérdida de por lo menos un ión cloro y la adición de por lo menos un grupo amino y, de acuerdo con ello, dichas fracciones se denominan en la presente memoria "6-carboxi-aminopentaclorofluoresceína" y "5-carboxi-aminopentaclorofluoresceína", respectivamente, o como "HEX dañado" o "Dam Hex" (por ejemplo 5-Dam HEX ó 6-Dam HEX) unido a moléculas biológicas en dichas realizaciones. Además, con respecto a todas las estructuras moleculares proporcionadas en la presente memoria, se pretende que dichas estructuras moleculares comprendan no sólo las estructuras electrónicas exactas presentadas, sino que también incluyan todas las estructuras resonantes y estados de protonación de las mismas. Muchas fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes pueden sintetizarse fácilmente utilizando química que es conocida por el experto en la materia. Diversas técnicas sintéticas que opcionalmente se adaptan para la utilización en dichos protocolos sintéticos son conocidas de manera general por el experto en la materia y también se describen en, por ejemplo, March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5a edición, John Wiley & Sons, Inc. (2000), Carey and Sundberg, *Advanced Organic Chemistry, Parte A: Structure and Mechanism*, 4a edición, Plenum Publishing Corporation (2000), y Carey and Sundberg, *Advanced Organic Chemistry, Parte B: Reaction and Synthesis*, 4a edición, Plenum Publishing Corporation (2001). Los materiales iniciales químicos y otros componentes de reacción que resultan útiles en la síntesis de fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes se encuentran fácilmente disponibles de diversos proveedores comerciales, entre ellos, por ejemplo, Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, USA). Además, determinadas fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes se encuentran disponibles en forma presintetizada de diversos proveedores comerciales, tales como Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA). Además, la 4',5'-dimetoxi-6-carboxifluoresceína y su utilización como pigmento aceptor FRET es sugerida por Khanna *et al.* (Academic Press, New York N.Y., U.S. vol. 108, páginas 156-161, 1980). Sin embargo, no se sugiere en la técnica anterior que dicho pigmento pueda utilizarse como pigmento donador.

IV. REACTIVOS QUE INCLUYEN FRACCIONES DONADORAS SUSTANCIALMENTE NO FLUORESCENTES

La presente invención también se refiere a reactivos que incluyen las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes indicadas en la presente memoria. Entre estos reactivos pueden incluirse cualquier molécula o material al que dichas fracciones donadoras pueda unirse covalente o no covalentemente. Entre los ejemplos de dichas moléculas y materiales se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, soportes sólidos (por ejemplo membranas o vidrio de poro controlado), partículas víricas, tejidos, células (por ejemplo células de mamífero y bacterias u otros microorganismos), orgánulos y monómeros o polímeros orgánicos e inorgánicos. En determinadas realizaciones, por ejemplo, entre los reactivos de la invención se incluyen moléculas biológicas, tales como lípidos, nucleótidos, nucleósidos, aminoácidos y azúcares. En algunas realizaciones, entre dichas moléculas biológicas se incluyen polímeros biológicos, tales como péptidos, proteínas, polipéptidos, enzimas, determinadas hormonas, inmunoglobulinas, polisacáridos, oligosacáridos, polinucleótidos u oligonucleótidos.

Los reactivos de la invención pueden utilizarse en muchos procedimientos diferentes. Entre los usos representativos de los reactivos nucleótidos y nucleósidos, por ejemplo, se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, oligonucleótidos de marcaje formados mediante síntesis química, por ejemplo nucleósidos trifosfato utilizados en el contexto de la amplificación por PCR, reacciones de marcaje por desplazamiento de mella y secuenciación de oligonucleótidos de tipo Sanger. En determinadas realizaciones, por ejemplo, dichos reactivos son nucleósidos marcados (NTP), tales como citosina, adenosina, guanosina y timidina, marcados con una fracción donadora sustancialmente no fluorescente de la presente invención. Estos reactivos pueden utilizarse en diversos métodos que implican la síntesis de oligonucleótidos. Dichos reactivos también son nucleótidos marcados, por ejemplo ésteres de mononucleósidos fosfato, dinucleósidos fosfato y trinucleósidos fosfato en algunas realizaciones. Más concretamente, entre dichos reactivos se incluyen, por ejemplo, los desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs), tales como desoxiadenosina trifosfato, desoxicitosina trifosfato, desoxitimidina trifosfato y desoxiguanosina trifosfato, marcados con una fracción donadora tal como se describe en la presente memoria. Estos reactivos pueden utilizarse, por ejemplo, como sustratos de polimerasa en la preparación de oligonucleótidos marcados con pigmento. Entre dichos reactivos también se incluyen dideoxinucleósidos trifosfato marcados (ddNTP) (por ejemplo dideoxiadenosina trifosfato, dideoxicitosina trifosfato, dideoxitimidina trifosfato y dideoxiguanosina trifosfato) u otros nucleótidos terminadores marcados con una fracción donadora sustancialmente no fluorescente de la presente invención. Estos reactivos pueden utilizarse, por ejemplo, en la secuenciación con pigmentos terminales. Entre los ejemplos de utilización de reactivos oligonucleotidos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cebadores de secuenciación de ácidos nucleicos, cebadores de PCR, sondas de hibridación, sondas en horquilla y sondas 5'-nucleasa. Entre las utilidades representativas de los polipéptidos marcados con las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes indicadas en la presente memoria se incluyen los estudios de estructura y conformación de proteínas, los ensayos de unión de receptor/ligando y los inmunoensayos. Entre los ejemplos de utilidades de los reactivos lípidos marcados con las fracciones donadoras indicadas en la presente memoria se incluyen los ensayos de distribución y transporte de lípidos, los ensayos de fusión de membrana y los análisis de medición de potenciales de membrana. Además, entre las utilidades ejemplares de los reactivos carbohidrato marcados con las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes indicadas en la presente memoria se incluyen los ensayos de unión de receptor/ligando y los análisis de estructuras. Los métodos de utilización de los reactivos de la presente invención se describen en mayor detalle posteriormente.

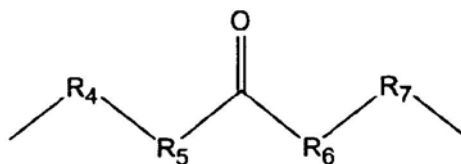
En determinadas realizaciones, un reactivo de la invención incluye una o más fracciones aceptoras y/o desactivadoras además de una o más fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes. En otras realizaciones, un reactivo dado no presenta las fracciones aceptora y/o desactivadora. A título ilustrativo adicional, las figuras 1A-F muestran esquemáticamente realizaciones representativas de los reactivos de la invención. Más concretamente, en cada una de las figuras 1A-F, el polímero biológico 100 se ilustra esquemáticamente con unidades monoméricas 102. Tal como se muestra en la realización ilustrada esquemáticamente en la figura 1A, el polímero biológico 100 incluye la fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 104 unida a la unidad monomérica 102. En la figura 1B, la fracción aceptora (A) 106 se encuentra unida a la unidad monomérica 102 del polímero biológico 100 mediante una fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 104, mientras que en la figura 1C, la fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 104 se encuentra unida a la unidad monomérica 102 del polímero biológico 100 mediante la fracción aceptora (A) 106. La figura 1D muestra otra unión de la fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 104 y la fracción aceptora (A) 106 al polímero biológico 100. La figura 1E muestra esquemáticamente la fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 104 y la fracción aceptora (A) 106 unidas separadamente a la misma unidad monomérica 102. Además, la figura 1F muestra esquemáticamente la fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 104, la fracción aceptora (A) 106 y la fracción desactivadora (Q) 108 unidas separadamente a diferentes unidades monoméricas 102 del polímero biológico 100. Se apreciará que las fracciones donadora, aceptora y desactivadora se encuentran opcionalmente unidas covalente o no covalentemente a reactivos y/o entre sí. En determinadas realizaciones, por ejemplo, dichas fracciones se encuentran unidas entre sí y/o a otros componentes de reactivos mediante fracciones conectoras, mientras que en otras realizaciones, se encuentran unidas entre sí o a otros componentes reactivos mediante fracciones conectoras. También se apreciará que las fracciones donadora, aceptora y desactivadora pueden unirse a polímeros mediante esqueletos o cualquier otro componente estructural de las moléculas.

FACCIONES ACEPTORA Y DESACTIVADORA

Las fracciones aceptoras de los reactivos de la invención son generalmente capaces de absorber la energía de excitación transferida por fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes y emitir fluorescencia en respuesta. En algunas realizaciones, las absorbancias pico de visible de dichas fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes y de las fracciones aceptoras difieren entre sí en aproximadamente 100 nm o más. Entre las clases generales representativas de fracciones aceptoras que pueden utilizarse se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, pigmentos xanteno, pigmentos cianina, pigmentos ftalocianina y pigmentos escuarina. También se describen ejemplos de fracciones aceptoras que se encuentran incluidas en dichas clases de pigmentos en, por ejemplo, la patente US nº 5.800.996, titulada "ENERGY TRANSFER DYES WITH ENHANCED FLUORESCENCE", expedida el 1 de septiembre de 1998 a Lee *et al.*

A título ilustrativo adicional, entre los ejemplos más específicos de fracciones aceptoras que pueden utilizarse en determinadas realizaciones de los reactivos de la invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, isómeros de la carboxifluoresceína (por ejemplo 5-carboxi y 6-carboxi), las 4,7-diclorofluoresceínas, las 4,7-diclororodaminas (patente US nº 5.847.162, titulada "4,7-DICHLORORHODAMINE DYES", expedida el 8 de diciembre de 1998 a Lee *et al.*), las fluoresceínas, los pigmentos benzoxanteno asimétricos, los isómeros de carboxi-HEX (por ejemplo 5-carboxi y 6-carboxi), NAN, CI-FLAN, TET, JOE, VIC, ZOE, rodamina, los isómeros de carboxirrodamina (por ejemplo 5-carboxi y 6-carboxi), los isómeros de carboxi R110 (por ejemplo 5-carboxi y 6-carboxi), los isómeros de carboxi R6G (por ejemplo 5-carboxi y 6-carboxi), los isómeros de N,N,N',N'-tetrametilcarboxirrodamina (TAMRA) (por ejemplo 5-carboxi y 6-carboxi), los isómeros de carboxi-X-rodamina (ROX) (por ejemplo 5-carboxi y 6-carboxi), los pigmentos LC-Red 610, LC-Red 640, LC-Red 670, LC-Red 705, JA-270, CY3, CY3.5, CY5, CY5.5, BODIPY[®] (por ejemplo FL, 530/550, TR y TMR), los pigmentos ALEXA FLUOR[®] (por ejemplo 488, 532, 546, 568, 594, 555, 653, 647, 660 y 680), otros pigmentos de transferencia energética (por ejemplo los pigmentos BIGDYE[™] v 1, los pigmentos BIGDYE[™] v 2 y los pigmentos BIGDYE[™] v 3), los pigmentos Lucifer (por ejemplo el amarillo Lucifer) y CASCADE BLUE[®] y verde Oregon. Se proporcionan ejemplos adicionales de fracciones aceptoras adecuadas en, por ejemplo, Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9a edición, 2003, y nuevas versiones del mismo. Las fracciones aceptoras generalmente se encuentran fácilmente disponibles de diversos proveedores comerciales, incluyendo, por ejemplo, Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA), Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ, USA) y Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes y las fracciones aceptoras no se encuentran unidas entre sí mediante fracciones conectoras según la invención en determinadas realizaciones. En otras realizaciones, dichas fracciones se unen entre sí mediante fracciones conectoras. En algunas de dichas realizaciones, por ejemplo, las fracciones conectoras no presentan la estructura:



en la que R^4 es un alquilo C_{1-5} unido a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente, R^5 se selecciona de entre el grupo que consiste de: NH, S y O; R_6 se selecciona de entre el grupo que consiste de: un alqueno, un dieno, un alquino y un anillo de cinco o seis elementos que presenta por lo menos un enlace insaturado o una estructura de anillos fusionados que se encuentra unida al carbono del carbonilo; y R_7 comprende un grupo funcional que une la fracción conectora a la fracción aceptora. Se describen las fracciones conectoras en mayor detalle posteriormente.

En algunas realizaciones, los reactivos de la invención también incluyen una o más fracciones desactivadoras. La cuestión de si un pigmento fluorescente dado es un informador o un desactivador generalmente se define a partir de sus espectros de excitación y de emisión, y del pigmento fluorescente con el que se encuentra emparejado. Entre las moléculas fluorescentes utilizadas comúnmente como fracciones desactivadoras se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, por ejemplo, fluoresceína, FAM, JOE, rodamina, R6G, TAMRA, ROX, dabcylo y EDANS. Muchos de dichos compuestos se encuentran disponibles de los proveedores comerciales indicados anteriormente. Entre los desactivadores no fluorescentes u oscuros ejemplares que disipan energía absorbida de un pigmento fluorescente se incluyen los Black Hole QuenchersTM o BHQTM, que comercializan Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA, USA).

En determinadas realizaciones, los reactivos de la invención también pueden incluir otras fracciones de marcaje. Entre los ejemplos de otros marcajes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, por ejemplo, biotina, marcajes débilmente fluorescentes (Yin *et al.* Appl. Environ. Microbiol. 69(7):3938, 2003; Babendure *et al.* Anal. Biochem. 317(1):1, 2003; y Jankowiak *et al.* Chem. Res. Toxicol. 16(3): 304, 2003), marcajes radioactivos, marcajes no fluorescentes, marcajes colorimétricos, marcajes quimioluminiscentes (Wilson *et al.* Analyst. 128(5):480, 2003, y Roda *et al.* Luminescence 18(2):72, 2003), marcajes Raman, marcajes electroquímicos, marcajes bioluminiscentes (Kitayama *et al.* Photochem. Photobiol. 77(3):333, 2003; Arakawa *et al.* Anal. Biochem. 314(2):206, 2003, y Maeda, J. Pharm. Biomed. Anal. 30(6):1725, 2003), y un reactivo de marcaje alfa-metil-PEG tal como el descrito en, por ejemplo, la solicitud provisional de patente US nº 60/428,484, titulada "DETECTABLE LABELED NUCLEOSIDE ANALOGS AND METHODS OF USE THEREOF", presentada el 22 de noviembre de 2002, de Bodepudi *et al.*

FRACCIONES CONECTORAS

Se encuentra disponible una gran diversidad de fracciones conectoras para unir otras fracciones (por ejemplo fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes, fracciones aceptoras y fracciones desactivadoras) a las moléculas biológicas y otros reactivos de la invención y resultarán evidentes para el experto en la materia. Una fracción desactivadora es de manera general una estructura que resulta estérica y electrónicamente adecuada para la unión a una molécula biológica dada. A título ilustrativo, entre las fracciones conectoras opcionalmente se incluyen, por ejemplo, éter, tioéter, carboxamida, sulfonamida, urea, uretano, hidrazina y otras fracciones. A título ilustrativo adicional, entre las fracciones conectoras se incluyen generalmente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 25 átomos no de hidrógeno seleccionados de entre, por ejemplo, C, N, O, P, Si y S, y comprenden esencialmente cualquier combinación de, por ejemplo, enlaces éter, tioéter, amina, éster, carboxamida, sulfonamida, hidrazida y enlaces aromáticos o heteroaromáticos. En algunas realizaciones, por ejemplo, una fracción conectora comprende una combinación de enlaces individuales carbono-carbono y enlaces carboxamida o tioéter. Aunque opcionalmente se utilizan segmentos lineales más largos de conectores, los segmentos lineales típicamente contienen entre aproximadamente tres y aproximadamente 15 átomos no de hidrógeno. Algunos de dichos tipos ejemplares de conectores se describen en mayor detalle posteriormente.

A título ilustrativo adicional, entre los ejemplos no limitativos de fracciones conectoras se incluyen grupos sustituidos (por ejemplo funcionalizados) o no sustituidos. Más concretamente, entre las fracciones ejemplares se incluyen conectores imidazol/biotina, grupos polimetileno, grupos arileno, grupos alquilarileno, grupos arilalquilo, grupos ariltio, grupos amidoalquilo, grupos alquilalquilo, grupos alquenalquilo, grupos alquilo, grupos alcóxilo, grupos tio, grupos aminoalquilo, fosfatos derivatizados con morfolina, ácidos péptido nucleicos (por ejemplo N-(2-aminoetil)glicina) y grupos disulfuro. En algunas realizaciones, una fracción conectora es isotiocianato, cloruro de sulfonilo, 4,6-diclorotriazinilamina, éster succinimidilo u otro carboxilato activo en el caso de que la funcionalidad complementaria o sitio de unión a la molécula biológica sea una amina. Opcionalmente, la fracción conectora es maleimida, haloacetilo o yodoacetamida en el caso de que la funcionalidad complementaria sea sulfhidrilo. En determinadas realizaciones, la fracción conectora es un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) activada formada de un grupo carboxilo en la fracción donadora, aceptora o desactivadora que puede hacerse reaccionar con un aminohexilo de la molécula biológica particular. Algunas de estos conectores y otros se describen adicionalmente en, por ejemplo, la patente US nº 6.339.392, de Haugland *et al.*; en la patente US nº 5.047.519, de Hobbs, Jr. *et al.*;

en la patente US nº 4.711.958, de Iizuka *et al.*; patente US nº 5.175.269, de Stavrianopoulos; en la patente US nº 4.711.955, de Ward *et al.*; en la patente US nº 5.241.060, de Engelhardt *et al.*, patente US nº 5.328.824, de Ward *et al.*; y en la publicación de patente US nº 2002/0151711, de Khan *et al.* Se proporcionan detalles adicionales referentes a las fracciones de marcaje y conectoras de moléculas biológicas en, por ejemplo, Hermanson, Bioconjugate Techniques, Elsevier Science, 1996, y en Haugland, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 9a edición, 2003, y nuevas versiones del mismo.

En determinadas realizaciones, los conectores adecuados comprenden grupos fotocortables, tales como los grupos 2-nitrobencilo, los grupos 2-nitrobencilo alfa-sustituídos (por ejemplo los grupos 1-(2-nitrofenil)etil), los grupos 3,5-dimetoxibencilo, el ácido tiohidroxámico, los grupos 7-nitroindol, los grupos 9-fenilxantilo, los grupos benzoína, los grupos hidroxifenacilo y los grupos NHS-ASA. Los conectores fotocortables se describen en mayor detalle en, por ejemplo, la publicación de patente US nº 2003/0099972, de Olejnik *et al.* En algunas realizaciones, entre los conectores se incluyen metales, tales como los átomos de platino. Estos se describen adicionalmente en, por ejemplo, la patente US nº 5.714.327, de Houthoff *et al.* Varios conectores de longitud variable se encuentran comercialmente disponibles de diversos proveedores, entre ellos, por ejemplo, Operon Biotechnologies, Inc. (Huntsville, AL, USA), BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA) y Molecular BioSciences (Boulder, CO, USA).

En el contexto de los nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos, las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes, fracciones aceptoras y fracciones desactivadoras se unen opcionalmente, por ejemplo, a un anillo homocíclico, a un anillo heterocíclico, o a un grupo arilo de un nucleósido o nucleótido (por ejemplo mediante C⁵ de una pirimidina, N⁴ de citidina, N⁷ de una purina, N⁶ de adenosina, C⁸ de una purina u otro sitio de unión conocido de la técnica), por ejemplo mediante una amida, éster, tioéster, éter, tioéter, carbono-carbono u otro tipo de enlace covalente. Adicionalmente, o alternativamente, la fracción particular se une a una fracción azúcar (por ejemplo un azúcar ribosa) o a un análogo de la misma (por ejemplo un anillo carbocíclico) de un nucleósido o nucleótido, y/o a un grupo fosfato de un nucleótido, tal como mediante un enlace covalente que es un enlace amida, éster, tioéster, éter, tioéter, carbono-carbono u otro enlace. Los enlaces covalentes típicamente se forman en reacciones entre grupos electrofílicos y nucleofílicos de las fracciones y nucleósidos o nucleótidos. En determinadas realizaciones, las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes, las fracciones aceptoras y las fracciones desactivadoras y los nucleótidos se conjugan directamente entre sí (por ejemplo mediante enlaces sencillos, dobles, triples o carbono-carbono aromáticos, o mediante enlaces carbono-nitrógeno, enlaces nitrógeno-nitrógeno, enlaces carbono-oxígeno, enlaces carbono-azufre, enlaces fósforo-oxígeno y enlaces fósforo-nitrógeno).

En algunas realizaciones, las fracciones conectoras son enlaces amido acetilénico o amido alquénico, el enlace entre la fracción donadora sustancialmente no fluorescente, la fracción aceptoras o la fracción desactivadora y la base nucleotídica se forma mediante la reacción de un éster de NHS activado de la fracción particular con una base derivatizada con alquililamino, alquililetoxiamino o alquenilamino de un nucleótido. Entre los enlaces resultantes pueden incluirse, por ejemplo, propargil-1-etoxiamido (3-(amino)etoxi-1-propinilo), 3-(carboxi)amino-1-propinilo ó 3-amino-1-propin-1-ilo.

A título ilustrativo adicional, la síntesis de nucleósidos derivatizados con alquililamino también se describe en, por ejemplo, Hobbs, "Palladium-catalyzed synthesis of alkynylamino nucleosides A universal linker for nucleic acids", J. Org. Chem. 54:3420-3422, 1989. Brevemente, los nucleótidos derivatizados con alquililamino se forman introduciendo el halodideoxinucleósido apropiado (habitualmente los dideoxinucleósidos 5-yodopirimidina y 7-yodo-7-deazapurina) y Cu(I) en un matraz, burbujeando con argón para eliminar el aire, añadiendo DMF seco, seguido de la adición de una alquililamina, trietilamina y Pd(0). La mezcla de reacción puede agitarse durante varias horas, o hasta que la cromatografía de capa fina indique que se ha consumido el halodideoxinucleósido. En el caso de que se utilice una alquililamina no protegida, el alquililaminonucleósido puede aislarse concentrando la mezcla de reacción y realizando una cromatografía en gel de sílice utilizando un solvente de elución que contenga hidróxido amónico con el fin de neutralizar el hidroháluro generado durante la reacción de acoplamiento. En el caso de que se utilice una alquililamina protegida, puede añadirse metanol/cloruro de metileno a la mezcla de reacción, seguido de la forma bicarbonato de una resina de intercambio aniónico fuertemente básica. A continuación, la suspensión puede agitarse durante aproximadamente 45 minutos, filtrarse y enjuagarse la resina con metanol/cloruro de metileno adicional. Los filtrados agrupados pueden concentrarse y purificarse mediante cromatografía flash en gel de sílice utilizando un gradiente de metanol-cloruro de metileno. Los trifosfatos pueden obtenerse mediante la utilización de técnicas estándares conocidas por el experto en la materia.

PREPARACIÓN DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS

Las moléculas biológicas u otros reactivos de la invención pueden prepararse utilizando cualquier método adecuado, incluyendo la producción sintética o la obtención a partir de fuentes naturales (por ejemplo antes del marcaje). Por ejemplo, la síntesis de oligonucleótidos marcados con fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes, fracciones aceptoras y/o fracciones desactivadoras puede llevarse a cabo utilizando cualquiera de entre un gran número de técnicas conocidas de marcaje de oligonucleótidos. A título ilustrativo, pueden sintetizarse enzimáticamente oligonucleótidos marcados, por ejemplo utilizando una ADN polimerasa o ligasa, o mediante síntesis química, por ejemplo utilizando un método de fosforamidita o un método de fosfito-triéster (Herdewijn, Oligonucleotide Syntheses: Methods and Applications, Humana Press, 2005, Gait (editor), Oligonucleotide

Synthesis, Oxford University Press, 1984; Vorbruggen *et al.*, Handbook of Nucleoside Synthesis, John Wiley & Sons, Inc., 2001, y Hermanson, Bioconjugate Techniques, Elsevier Science, 1996). Pueden introducirse marcajes durante la síntesis enzimática utilizando, por ejemplo, monómeros de nucleósido trifosfato marcados, o introducirse durante la síntesis química utilizando fosforamiditas marcadas no nucleotídicas o nucleotídicas, o pueden introducirse posteriormente a la síntesis. Los enfoques de la síntesis de fosforamiditas que incluyen fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes también se ilustran en los ejemplos proporcionados posteriormente.

Un procedimiento ejemplar para sintetizar enzimáticamente oligonucleótidos marcados incluye la desnaturalización de un ácido nucleico molde o diana y la hibridación de un cebador con el molde. Típicamente se añade una mezcla de desoxinucleósidos trifosfato (por ejemplo dGTP, dATP, dCTP y dTTP) a la mezcla de reacción en la que por lo menos una fracción de uno de los desoxinucleótidos se marca con una fracción donadora sustancialmente no fluorescente, una fracción aceptora y/o una fracción desactivadora tal como se describe en la presente memoria. A continuación, se añade generalmente un catalizador que incorpora nucleótidos, tal como un enzima polimerasa, a la mezcla de reacción bajo condiciones en las que el enzima se encuentra activo. Se forma un oligonucleótido marcado mediante la incorporación de los desoxinucleótidos marcados durante la síntesis de cadena con la polimerasa. En un método alternativo de síntesis enzimática, se utilizan dos cebadores en lugar de uno, un cebador complementario a una parte de una cadena y el otro complementario a una parte de la otra cadena de un ácido nucleico diana de doble cadena. La polimerasa utilizada en este método generalmente es termoestable, y la temperatura de reacción típicamente se cicla entre las temperaturas de desnaturalización y de extensión para llevar a cabo la síntesis de cadenas complementarias marcadas del ácido nucleico diana mediante PCR (Edwards *et al.* (editores), Real-Time PCR: An Essential Guide, Horizon Scientific Press, 2004; Innis *et al.* (editores), PCR Strategies, Elsevier Science & Technology Books, 1995; e Innis *et al.* (editores), PCR Protocols, Academic Press, 1990).

Los oligonucleótidos marcados que se sintetizan químicamente se producen generalmente utilizando un método de fosforamidita, aunque también se utilizan opcionalmente otros enfoques. La síntesis basada en fosforamidita comúnmente se lleva a cabo con cadenas oligonucleótidas en crecimiento unidas a soportes sólidos, de manera que el exceso de reactivos, que se encuentran en la fase líquida, pueda eliminarse fácilmente mediante filtración. Lo anterior elimina la necesidad de otras etapas de purificación entre ciclos.

Para describir brevemente un ciclo ejemplar de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida que utiliza un método de fosforamidita, un soporte sólido que incluye un monómero nucleotídico protegido se trata inicialmente con ácido (por ejemplo ácido tricloroacético) para eliminar un grupo protector 5'-hidroxilo, liberando el hidroxilo para una posterior reacción de acoplamiento. A continuación, se forma generalmente un intermediario activado mediante la adición simultánea de un monómero nucleósido fosforamidita protegido y un ácido débil (por ejemplo tetrazol) a la reacción. El ácido débil protona el nitrógeno de la fosforamidita, formando un intermediario reactivo. La adición de nucleósidos a la cadena de ácidos nucleicos en crecimiento se completa generalmente en menos de 30 segundos. A continuación, típicamente se lleva a cabo una etapa de adición de caperuza para terminar cualquier cadena oligonucleótida en la que no se han añadido nucleósidos. La adición de caperuza puede llevarse a cabo con, por ejemplo, anhídrido acético y 1-metilimidazol. A continuación, se convierten los enlaces entre nucleótidos de fosfito al más estable fosfotriéster mediante oxidación, utilizando por ejemplo yodo como agente oxidante y agua como donador de oxígeno. Tras la oxidación, el grupo protector de hidroxilos típicamente se elimina con un ácido prótico (por ejemplo ácido tricloroacético o ácido dicloroacético) y se repite el ciclo hasta completar la elongación de la cadena. Tras la síntesis, el oligonucleótido sintetizado generalmente se corta del soporte sólido utilizando una base, tal como hidróxido amónico o *t*-butilamina. La reacción de corte también elimina cualquier grupo protector de fosfato (por ejemplo cianoetilo). Finalmente, los grupos protectores en aminas exocíclicas de las bases y los grupos protectores de hidroxilos en la fracción o fracciones de marcaje se eliminan mediante tratamiento de la solución de oligonucleótidos bajo condiciones básicas a una temperatura elevada (por ejemplo de hasta aproximadamente 55°C).

También se proporcionan descripciones de la química utilizada para formar oligonucleótidos mediante métodos de fosforamidita en, por ejemplo, la patente US nº 4.458.066, titulada "PROCESS FOR PREPARING POLYNUCLEOTIDES", expedida el 3 de julio de 1984 a Caruthers *et al.*, y en la patente US nº 4.415.732, titulada "PHOSPHORAMIDITE COMPOUNDS AND PROCESSES", expedida el 15 de noviembre de 1983 a Caruthers *et al.*

Cualquiera de los monómeros nucleósidos fosforamidita puede marcarse con las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes, fracciones aceptoras y/o fracciones desactivadoras indicadas en la presente memoria. En determinadas realizaciones, en el caso de que el extremo 5'-terminal del oligonucleótido deba marcarse, puede utilizarse una fosforamidita no nucleotídica marcada durante la etapa final de condensación. En el caso de que deba marcarse una posición interna del oligonucleótido, puede utilizarse una fosforamidita nucleotídica marcada durante cualquiera de las etapas de condensación. Además, tras la síntesis, también pueden marcarse los oligonucleótidos en esencialmente varias posiciones (Eckstein *et al.* editores, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University press, 1992; Chu *et al.* "Derivatization of unprotected polynucleotides", Nucleic Acids Res. 11(18): 6513-6529, 1983, y patente US nº 5.118.800, titulada "Oligonucleotides possessing a primary amino group in the terminal nucleotide", expedida el 2 de junio de 1992 a Smith *et al.* A título ilustrativo adicional, los oligonucleótidos también pueden marcarse en su esqueleto fosfodiéster (Eckstein *et al. supra*, 1992) o en el extremo 3'-terminal (Nelson *et al.* "Oligonucleotide labeling methods. 3. Direct labeling of oligonucleotides employing a novel,

non-nucleosidic, 2-aminobutyl-1,3-propanediol backbone", Nucleic Acids Res. 20(23):6253-6259, 1992, patente US nº 5.401.837, titulada "Method for labeling the 3' terminus of a synthetic oligonucleotide using a unique multifunctional controlled pore glass (MF-CPG) reagent in solid phase oligonucleotide synthesis", expedida el 28 de marzo de 1995 a Nelson, y patente US nº 5.141.813, titulada "Multifunctional controlled pore glass reagent for solid phase oligonucleotide synthesis", expedida el 25 de agosto de 1992 a Nelson.

En determinadas realizaciones, se incluyen nucleótidos modificados en los oligonucleótidos marcados indicados en la presente memoria (por ejemplo sondas o cebadores). A título ilustrativo, la introducción de sustituciones de nucleótidos modificados en secuencias oligonucleótidas puede incrementar, por ejemplo, la temperatura de fusión de los oligonucleótidos. En algunas realizaciones, lo anterior puede proporcionar una mayor sensibilidad respecto a los oligonucleótidos no modificados correspondientes, incluso en presencia de uno o más apareamientos incorrectos en la secuencia entre el ácido nucleico diana y el oligonucleótido particular. Entre los nucleótidos modificados ejemplares que pueden sustituirse o añadirse en los oligonucleótidos se incluyen, por ejemplo, C5-etil-dC, C5-metil-dC, C5-etil-dU, 2,6-diaminopurinas, C5-propinil-dC, C7-propinil-dA, C7-propinil-dG, C5-propargilamino-dC, C5-propargilamino-dU, C7-propargilamino-dA, C7-propargilamino-dG, 7-deaza-2-desoxixantósina, análogos pirazolopirimidina, pseudo-dU, nitropirrol, nitroindol, 2'-O-metil-ribo-U, 2'-O-metil-ribo-C, una 8-aza-dA, una 8-aza-dG, una 7-deaza-dA, una 7-deaza-dG, N4-etil-dC y N6-metil-dA. A título ilustrativo adicional, entre otros ejemplos de oligonucleótidos modificados se incluyen aquellos que presentan uno o más monómeros LNATM. También se describen análogos de nucleótidos tales como los indicados, en, por ejemplo, la patente US nº 6.639.059, titulada "SYNTHESIS OF [2.2.1]BICYCLO NUCLEOSIDES", expedida el 28 de octubre de 2003 a Kochkine *et al.*; patente US nº 6.303.315, titulada "ONE STEP SAMPLE PREPARATION AND DETECTION OF NUCLEIC ACIDS IN COMPLEX BIOLOGICAL SAMPLES", expedida el 16 de octubre de 2001 a Skouv, y la solicitud publicada de patente US nº 2003/0092905, titulada "SYNTHESIS OF [2.2.1]BICYCLO NUCLEOSIDES", de Kochkine *et al.*, expedida el 15 de mayo de 2003. Los oligonucleótidos que comprenden monómeros LNATM se encuentran disponibles comercialmente de, por ejemplo, Exiqon A/S (Vedbæk, Dinamarca). Se hace referencia en la presente memoria a modificaciones adicionales de oligonucleótidos, incluyendo en las definiciones proporcionadas anteriormente. A título ilustrativo adicional, esencialmente cualquier ácido nucleico (y prácticamente cualquier ácido nucleico marcado, sea estándar o no estándar) puede adaptarse o ser estándar, obtenido de cualquiera de entre una diversidad de fuentes comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company, Inc. (Midland, TX, USA), Operon Biotechnologies, Inc. (Huntsville, AL, USA), Proligo LLC (Boulder, CO, USA) y muchos otros. Los reactivos de la invención también pueden incluir proteínas y péptidos que se marcan con fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes, fraccionesceptoras y/o fracciones desactivadoras tal como se describe en la presente memoria. Los péptidos opcionalmente se sintetizan y/o marcan utilizando cualquier técnica conocida. Por ejemplo, los métodos de preparación de péptidos con alcoholes C-terminales típicamente implican la síntesis en fase solución o la síntesis peptídica en fase sólida. Los procedimientos en fase sólida generalmente utilizan una unión covalente del material inicial a un soporte sólido (por ejemplo poliestireno o polietilenglicol) mediante fracciones conectoras adcaudas, que son generalmente conocidas por el experto en la materia. La estrategia de anclaje C-terminal para la síntesis de péptidos basada en conectores bencilo y benzhidrilamina para las reacciones de Boc/Bzl (terc-butoxicarbonilo/bencilo), así como las versiones más lábiles alcóxibencilo ó 2,4-dimetoxibenzhidrilamina utilizadas en los protocolos de Fmoc/tBu (fluorenilmetoxycarbonilo/terc-butilo), se aplican opcionalmente a la síntesis de péptidos con extremos carboxilo o carboxilamida libres. También se describen diversos aspectos de la síntesis de péptidos en, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149, 1963; Larsen *et al.* J. Am. Chem. Soc. 115:6247, 1993; Smith *et al.* J. Peptide Protein Res. 44:183, 1994; O'Donnell *et al.* J. Am. Chem. Soc. 118:6070, 1996; Mitchell *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 98:7357-7362, 1976; Matsueda *et al.*, Peptides 2:45-50, 1981; Wang, J. Am. Chem. Soc. 95:1328-1333, 1972; Rink, Tet. Let. 28:3787-3790, 1987; Lloyd-Williams *et al.*, Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, CRC Press, 1997; Jones, Amino Acid and Peptide Synthesis, 2a edición, Oxford University Press, 2002, y Howl, Peptide Synthesis and Applications, Humana Press, 2005. Además, también pueden obtenerse péptidos y proteínas a medida, de diversos proveedores comerciales, entre ellos, por ejemplo, Sigma-Genesis Co. (The Woodlands, TX, USA), Biopeptide Co., LLC (San Diego, CA, USA) e Invitrogen Corp (Carlsbad, CA, USA).

La invención también se refiere a inmunoglobulinas o anticuerpos que incluyen fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes, fraccionesceptoras y/o fracciones desactivadoras tal como se describe en la presente memoria. Los anticuerpos adecuados para la utilización en dichas realizaciones de la invención pueden prepararse y marcarse mediante métodos convencionales y/o mediante ingeniería genética. Pueden manipularse genéticamente fragmentos de anticuerpos, por ejemplo de las regiones variables de las cadenas ligera y/o pesada (V_H y V_L), incluyendo las regiones hipervariables, o de tanto la región V_H como la V_L. Por ejemplo, el término "inmunoglobulina" o "anticuerpos" tal como se utiliza en la presente memoria incluye los anticuerpos policlonales y monoclonales y los fragmentos biológicamente activos de los mismos, incluyendo, entre otras posibilidades, anticuerpos "univalentes" (Glennie *et al.* Nature 295:712, 1982); proteínas Fab, incluyendo los fragmentos Fab' y F(ab')₂, agregados covalente o no covalentemente; cadenas ligeras o pesadas solas, típicamente regiones variables de cadenas pesadas y ligeras (regiones V_H y V_L), y más típicamente incluyendo las regiones hipervariables (también conocidas como regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de las regiones V_H y V_L); proteínas Fc; anticuerpos "híbridos" capaces de unión a más de un antígeno; quimeras de región constante-variable;

inmunoglobulinas "compuestas" con cadenas pesadas y ligeras de diferentes orígenes; anticuerpos "alterados" con especificidad mejorada y otras características preparadas mediante técnicas de recombinación estándares; técnicas mutagénicas, u otras técnicas evolutivas dirigidas conocidas de la técnica. Pueden utilizarse inmunoglobulinas marcadas en una diversidad de ensayos bien conocidos, incluyendo, por ejemplo, inmunoensayos fluorescentes.

La invención se refiere además a lípidos y carbohidratos que incluyen fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes, fracciones aceptoras y/o fracciones desactivadoras tal como se describe en la presente memoria. También se describen aspectos de la química y síntesis de lípidos y/o carbohidratos en, por ejemplo, Tyman (editor), *Surfactants in Lipid Chemistry: Recent Synthetic, Physical, and Biodegradative Studies*, The Royal Society of Chemistry, 1992; Gurr *et al.*, *Lipid Biochemistry*, 5a edición, Iowa State Press, 2001; Min Kuo *et al.*, editores, *Lipid Biotechnology*, Marcel Dekker, 2002; Ogura *et al.*, editores, *Carbohydrates-Synthetic Methods and Applications in Medicinal Chemistry*, VCH Publishers, Inc., 1993; Derek Horton *et al.*, editores, *Trends in Synthetic Carbohydrate Chemistry*, American Chemical Society, 1989; Gunstone *et al.*, *Lipid Handbook*, 2a edición, CRC Press, 1994; Scherz *et al.*, *Analytical Chemistry of carbohydrates*, John Wiley & Sons, Inc., 2002; Boons, editor, *Carbohydrate Chemistry*, Chapman & Hall, 1997; Davis *et al.*, *Carbohydrate Chemistry*, Oxford University Press, 2002.

V. MEZCLAS DE REACCIÓN

La invención también proporciona muchas mezclas de reacción diferentes que pueden utilizarse en una amplia diversidad de aplicaciones. En algunas realizaciones, por ejemplo, se utilizan mezclas de reacción para llevar a cabo ensayos de amplificación/detección homogéneos (por ejemplo el seguimiento mediante PCR en tiempo real), procedimientos de secuenciación de ácidos nucleicos, protocolos de síntesis de polímeros biológicos (por ejemplo la síntesis de péptidos o la síntesis de oligonucleótidos) o reacciones de marcaje de polímeros biológicos. Muchas de dichas aplicaciones se describen en mayor detalle posteriormente o, de otro modo, se hace referencia a las mismas en la presente memoria.

En particular, entre las mezclas de reacción de la invención se incluyen cantidades seleccionadas de nucleótidos, cebadores y/o sondas. Típicamente, se marca uno o más de dichos nucleótidos, cebadores y/o sondas con por lo menos uno de dichos fracción donadora sustancialmente no fluorescente, fracción aceptora y/o fracción desactivadora. Los nucleótidos de dichas mezclas de reacción típicamente son nucleótidos extendibles y/o nucleótidos terminadores, por ejemplo la patente US nº 5.273.638, titulada "NUCLEOTIDE SEQUENCE DETERMINATION EMPLOYING MATCHED DIDEOXYNUCLEOTIDE TERMINATOR CONCENTRATIONS", expedida el 28 de diciembre de 1993 a Konrad *et al.*, solicitud de patente US nº 10/879.493, titulada "2'-TERMINATOR NUCLEOTIDE-RELATED METHODS AND SYSTEMS", presentada el 28 de junio de 2004 a Gelfand *et al.*, y la solicitud de patente US nº 10/879.494, titulada "SYNTHESIS AND COMPOSITIONS OF 2'-TERMINATOR NUCLEOTIDES", expedida el 28 de junio de 2004 a Bodepudi *et al.* Entre las sondas que se incluyen en dichas mezclas de reacción se incluyen generalmente, por ejemplo, sondas de hibridación, sondas 5'-nucleasa y/o sondas en horquilla.

Además, entre las mezclas de reacción también se incluyen generalmente diversos reactivos que resultan útiles para llevar a cabo reacciones de amplificación o detección de ácidos nucleicos (por ejemplo el seguimiento mediante PCR en tiempo real o los ensayos de 5'-nucleasa) o las reacciones de secuenciación de ácidos nucleicos. Entre los tipos ejemplares de estos otros reactivos se incluyen, por ejemplo, ácidos nucleicos molde o diana, catalizadores biológicos que incorporan nucleótidos (por ejemplo ADN polimerasas), tampones, sales, amplicones, glicerol, iones metálicos, dimetilsulfóxido (DMSO) y poli-rA. La amplificación y detección de ácidos nucleicos, así como otros métodos, también se describen en mayor detalle posteriormente.

Se producen mezclas de reacción generalmente mediante combinación de nucleótidos, cebadores y/o sondas seleccionados, tal como se ha indicado anteriormente, con cantidades de otros reactivos que resultan suficientes para llevar a cabo la aplicación particular que se selecciona. La cantidades de los reactivos que deben incluirse en una mezcla de reacción dada resultarán evidentes para el experto en la materia en vista del método seleccionado que debe llevarse a cabo. A título ilustrativo, sin embargo, cada uno de los ácidos nucleicos cebadores y los nucleótidos extendibles (por ejemplo cuatro dNTPs (dGTP, dCTP, dATP, dTTP)) se encuentra típicamente presente en un amplio exceso molar en dichas mezclas de reacción. Las sondas y cebadores que pueden utilizarse en las mezclas de reacción de la invención se indican en la presente memoria. Los nucleótidos extendibles y/o terminadores adecuados se encuentran fácilmente disponibles de muchos proveedores comerciales diferentes, incluyendo, por ejemplo, Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN, USA), Amersham Biosciences Corp. (Piscataway, NJ, USA) y Applied Biosystems (Foster City, CA, USA).

Los catalizadores biológicos que incorporan nucleótidos, utilizados en las mezclas de reacción, y otros aspectos de la invención, típicamente comprenden enzimas, tales como polimerasas, transferasas terminales, transcriptasas inversas, telomerasas y polinucleótido fosforilasas. En determinadas realizaciones, por ejemplo, el enzima incluye una actividad de nucleasa 5'-3', una actividad de exonucleasa 3'-5' y/o es un enzima termoestable. El enzima se deriva opcionalmente de un organismo, tal como *Thermus antranikianii*, *Thermus aquaticus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus filiformis*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus sco-toductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species* Z05, *Thermus species* sps 17, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*,

Anaerocellum thermophilum, *Bacillus caldovenax* y *Bacillus stearothermophilus*.

En determinadas realizaciones, también se añaden reactivos adicionales a las mezclas de reacción de la invención. A título ilustrativo, las mezclas de reacción también incluyen opcionalmente pirofosfatasa (por ejemplo una pirofosfatasa termoestable), por ejemplo para la utilización en la minimización de la pirofosforólisis, la uracilo-N-glucosilasa (UNG) (por ejemplo una UNG termoestable), por ejemplo para la protección frente a la contaminación cruzada.

Entre las mezclas de reacción ejemplares adicionales de la presente invención se incluyen los reactivos de síntesis de polímeros biológicos tales como los indicados en la presente memoria (por ejemplo reactivos de síntesis de ácidos nucleicos, tales como fosforamidas o reactivos de síntesis de polipéptidos). Dichas mezclas de reacción se utilizan típicamente en procedimientos de síntesis de polímeros biológicos tal como indica en la presente memoria o que, de otro modo, son conocidos para el experto en la materia.

Muchas mezclas de reacción que pueden adaptarse para la utilización con las moléculas biológicas y otros reactivos de la invención también se describen en, por ejemplo, Ausubel *et al.*, editores, Current Protocols in Molecular Biology, volúmenes I, II y III, 1997 (Ausubel 1), Ausubel *et al.*, editores, Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 5a edición, John Wiley & Sons, Inc., 2002 (Ausubel 2); Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000 (Sambrook); Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques: Methods in Enzymology, volumen 152, Academic Press, Inc. (Berger); Vorbruggen *et al.*, Handbook of Nucleoside Synthesis, Organic Reactions Series, nº 60, John Wiley & Sons, Inc., 2001; Gait (editor), Oligonucleotide Synthesis, Oxford University Press, 1984; Hames and Higgins, Nucleic Acid Hybridization, Practical Approach Series, Oxford University Press, 1997; y Hames and Higgins, editores, Transcription and Translation, Practical Approach Series, Oxford University Press, 1984.

VI. MÉTODOS DE UTILIZACIÓN DE MOLÉCULAS BIOLÓGICAS QUE COMPRENDEN FRACCIONES DONADORAS SUSTANCIALMENTE NO FLUORESCENTES

La invención también proporciona métodos de utilización de las moléculas biológicas marcadas descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, por ejemplo, dichas moléculas biológicas se utilizan para llevar a cabo ensayos que implican la detección de ácidos nucleicos diana u otras moléculas biológicas, por ejemplo para proporcionar información diagnóstica, genética u otra información sobre los sujetos a partir de los que se derivaron dichas dianas. La utilización de fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes en estos métodos generalmente conduce a una fluorescencia de fondo reducida respecto a los procedimientos que utilizan fracciones donadoras convencionales. Por consiguiente, lo anterior típicamente mejora las características de rendimiento, tales como la sensibilidad y el rango dinámico del ensayo particular en el que se utilizan dichas fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes. Estos aspectos también se ilustran en los ejemplos proporcionados posteriormente. Las moléculas biológicas indicadas en la presente memoria opcionalmente se utilizan o se adaptan para la utilización en esencialmente cualquier aplicación que implique la transferencia de energía para llevar a cabo la detección de analitos. Entre los ejemplos de tipos de aplicación relacionada con ácidos nucleicos se incluyen el análisis de la estructura y conformación de los ácidos nucleicos, los ensayos de PCR en tiempo real y la detección de SNP (Myakishev *et al.* "High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers", Genome Res. 11:163-169, 2001; Lee *et al.*, "Seven-color, homogeneous detection of six PCR products", Biotechniques 27:342-349, 1999; Thelwell *et al.*, "Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection", Nucleic Acids Res. 28:3752-3761, 2000; Whitcombe *et al.*, "Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence", Nat. Biotechnol. 17:804-807, 1999; Heid *et al.*, "Real time quantitative PCR", Genome Res. 6:986-994, 1996; Nazarenko *et al.*, "A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer", Nucleic Acids Res. 25:2516-2521, 1997); la detección de la hibridación de ácidos nucleicos (Parkhurst *et al.*, "Kinetic studies by fluorescence resonance energy transfer employing a double-labeled oligonucleotide: hybridization to the oligonucleotide complement and to single-stranded DNA", Biochemistry 34:285-292, 1995; Tyagi *et al.*, "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization", Nat. Biotechnol. 14:303-308, 1996; Tyagi *et al.* "Multicolor molecular beacons for allele discrimination", Nat. Biotechnol. 16:49-53, 1998; Sixou *et al.* "Intracellular oligonucleotide hybridization detected by fluorescence resonance energy transfer (FRET)", Nucleic Acids Res. 22:662-668, 1994; y Cardullo *et al.* "Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8790-8794, 1988); ensayos de extensión de cebadores para la detección de mutaciones (Chen *et al.*, "Fluorescence energy transfer detection as a homogeneous DNA diagnostic method", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10756-10761, 1997); y la secuenciación automática de ADN (Woolley *et al.*, "Ultra-high-speed DNA sequencing using capillary electrophoresis chips", Anal. Chem. 67:3676-3680, 1995; Hung *et al.*, "Comparison of fluorescence energy transfer primers with different donor-acceptor dye combinations", Anal. Biochem. 255:32-38, 1998; y Ju *et al.*, "Fluorescence energy transfer dye-labeled primers for DNA sequencing and analysis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:4347-4351, 1995).

Entre los ejemplos de tipos de aplicación relacionada con proteínas se incluyen el análisis de la estructura y conformación de las proteínas (Xing *et al.*, "Internal movement in myosin subfragment 1 detected by fluorescence resonance energy transfer", Biochemistry 34:6475-6487, 1995; Luo *et al.*, "Localization of Gys133 of rabbit skeletal

troponin-I with respect to troponin-C by resonance energy transfer", *Biophys. J.* 74:3111-3119, 1998; Erickson *et al.*, "Use of resonance energy transfer to determine the proximity of the guanine nucleotide binding site of transducin relative to a conformationally sensitive site on the gamma subunit of the cyclic GMP phosphodiesterase", *Biochemistry* 34:8693-8700, 1995; y Taniguchi *et al.*, "Reversible changes in the fluorescence energy transfer accompanying formation of reaction intermediates in probe-labeled (Na⁺,K⁺)-ATPase", *J. Biol. Chem.* 268:15588-15594, 1993); el análisis de la distribución espacial y ensamblaje de los complejos de proteínas (Moens *et al.*, "Determination of the radial coordinate of Cys-374 in F-actin using fluorescence resonance energy transfer spectroscopy: effect of phalloidin on polymer assembly", *Biochemistry* 33:13102-13108, 1994; Watson *et al.*, "Macromolecular arrangement in the aminoacyl-tRNA elongation factor Tu.GTP ternary complex. A fluorescence energy transfer study", *Biochemistry* 34: 7904-7912, 1995; Adair *et al.*, "Glycophorin A helical transmembrane domains dimerize in phospholipid bilayers: a resonance energy transfer study", *Biochemistry* 33:5539-5544, 1994; y Matyus, "Fluorescence resonance energy transfer measurements on cell surfaces. A spectroscopic tool for determining protein interactions", *I. Photochem. Photobiol.* 12:323-337, 1992); el análisis de las interacciones de receptor/ligando (Berger *et al.*, "Complex molecular mechanism for dihydropyridine binding to L-type Ca(2⁺)-channels as revealed by fluorescence resonance energy transfer", *Biochemistry* 33:11875-11883, 1994; Gagne *et al.*, "Use of fluorescence polarization detection for the measurement of fluopeptide™ binding to G protein-coupled receptors", *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* 22:333-343, 2002; y Poo *et al.*, "Ligation of CD3 triggers transmembrane proximity between LFA-1 and cortical microfilaments in a cytotoxic T cell clone derived from tumor infiltrating lymphocytes: a quantitative resonance energy transfer microscopy study", *J. Cell. Physiol.* 159:176-180, 1994); y los inmunoensayos (Morrison, "Time-resolved detection of energy transfer: theory and application to immunoassays", *Anal. Biochem.* 174:101-120, 1988; y Khanna *et al.*, "4',5'-Dimethoxy-6-carboxyfluorescein: a novel dipole-dipole coupled fluorescence energy transfer acceptor useful for fluorescence immunoassays", *Anal. Biochem.* 108:156-161, 1980).

Entre los ejemplos de aplicaciones relacionadas con lípidos y otros tipos de aplicación se incluyen los análisis de la distribución y transporte de los lípidos (Gutiérrez-Merino *et al.*, "Preferential distribution of the fluorescent phospholipid probes NBDphosphatidylcholine and rhodamine-phosphatidylethanolamine in the exofacial leaflet of acetylcholine receptor-rich membranes from Torpedo marmorata", *Biochemistry* 34:4846-4855, 1995; y Wolf *et al.*, "Determination of the transbilayer distribution of fluorescent lipid analogues by nonradiative fluorescence resonance energy transfer", *Biochemistry* 31:2865-2873, 1992); ensayos de fusión de membranas (Pecher *et al.*, "Membrane fusion induced by 11-mer anionic and cationic peptides: a structure-function study", *Biochemistry* 37:2361-2371, 1998; y Partearroyo *et al.*, "Real-time measurements of chemically-induced membrane fusion in cell monolayers, using a resonance energy transfer method", *Biophys. J.* 118:175-180, 1994); ensayos de detección de potencial de membrana (González *et al.*, "Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells", *Biophys. J.* 69:1272-1280, 1995); el análisis de sustratos de proteasa fluorogénica (Kurth *et al.*, "Engineering the S1' subsite of trypsin: design of a protease which cleaves between dibasic residues", *Biochemistry* 37:11434-11440, 1998; y Gulnik *et al.*, "Design of sensitive fluorogenic substrates for human cathepsin D", *FEBS Lett.* 413:379-384, 1997); el análisis de indicadores de AMP cíclico (Adams *et al.*, "Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells", *Nature* 349:694-697, 1991) y el cinc (Godwin *et al.*, "A Fluorescent Zinc Probe Based on Metal-Induced Peptide Folding", *J. Am. Chem. Soc.* 118:6514, 1996); y el análisis de interacciones de sondeo de moléculas individuales (Ha *et al.*, "Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6264-6268, 1996).

A título ilustrativo adicional, entre los ejemplos de tipos generales de técnica de análisis de ácidos nucleicos que pueden utilizarse o adaptarse para la utilización en el análisis de ácidos nucleicos diana en, por ejemplo, mezclas de reacción de la invención, o procedentes de las mismas, se incluyen diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos. Una característica común de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos es que típicamente se diseñan para amplificar secuencias de ácidos nucleicos que son específicas para el organismo que se detecta. Los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos generalmente presentan una mayor sensibilidad que otros enfoques de análisis de ácidos nucleicos. Esta sensibilidad, que mejora adicionalmente con la utilización de las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes descritas en la presente memoria, típicamente es atribuible a su capacidad de producir una señal positiva a partir de tan sólo una única copia del ácido nucleico diana. Entre los métodos de amplificación que se utilizan opcionalmente o que se adaptan para detectar ácidos nucleicos diana se incluyen, por ejemplo, diversos métodos de amplificación mediados por polimerasa, ligasa o transacriptasa inversa, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y/o la PCR de transcripción inversa (RT-PCR). Puede recabarse información adicional sobre la utilización de dichos métodos y otros métodos de amplificación y diversos enfoques de preparación de las muestras para estos ensayos en cualquiera de entre una diversidad de textos estándares, entre ellos, por ejemplo, Berger, Sambrook, Ausubel 1 y 2, e Innis, a los que se ha hecho referencia anteriormente.

Diversos ensayos comerciales de amplificación de ácidos nucleicos que se adaptan opcionalmente para la utilización con los reactivos y métodos de la invención generalmente difieren en sus métodos de amplificación y en sus secuencias diana de ácidos nucleicos. Entre los ejemplos de dichos ensayos comerciales se incluyen los ensayos de sondas de hibridación (por ejemplo utilizando el sistema LightCycler®) y los ensayos AMPLICOR® y COBAS AMPLICOR® (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA), que utilizan reacciones en cadena de la polimerasa (PCR); el ensayo LCx® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA), que utiliza reacciones en cadena de

la ligasa (LCR); el ensayo BDProbeTec™ ET (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, N.J., USA), que utiliza la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA); y el ensayo APTIMA™ (Gen-Probe, Inc., San Diego, CA, USA), que utiliza la amplificación mediada por la transcripción (TMA). Se describe en mayor detalle la amplificación y detección de ácidos nucleicos posteriormente.

En determinadas realizaciones, por ejemplo, las sondas 5'-nucleasa de la invención se utilizan en diversas reacciones de 5'-nucleasa. Muchos ensayos de 5'-nucleasa son bien conocidos por el experto en la materia. También se describen ejemplos de dichas reacciones en, por ejemplo, la patente US nº 6.214.979, titulada "HOMOGENEOUS ASSAY SYSTEM", expedida el 10 de abril de 2001 a Gelfand *et al.*; en la patente US nº 5.804.375, titulada "REACTION MIXTURES FOR DETECTION OF TARGET NUCLEIC ACIDS", expedida el 8 de septiembre de 1998 a Gelfand *et al.*; en la patente US nº 5.487.972, titulada "NUCLEIC ACID DETECTION BY THE 5'-3' EXONUCLEASE ACTIVITY OF POLYMERASES ACTING ON ADJACENTLY HYBRIDIZED OLIGONUCLEOTIDES", expedida el 30 de enero de 1996 a Gelfand *et al.*; y en la patente US nº 5.210.015, titulada "HOMOGENEOUS ASSAY SYSTEM USING THE NUCLEASE ACTIVITY OF A NUCLEIC ACID POLYMERASE", expedida el 11 de mayo de 1993 a Gelfand *et al.*

A título ilustrativo breve, en una reacción de 5'-nucleasa, se pone en contacto un ácido nucleico diana con un cebador y una sonda (por ejemplo una sonda 5'-nucleasa de la invención) bajo condiciones en las que el cebador y la sonda se hibridan con una cadena del ácido nucleico diana. El ácido nucleico diana, el cebador y la sonda también se ponen en contacto con una ácido nucleico polimerasa que presenta actividad de nucleasa 5' a 3'. Las polimerasas de ácidos nucleicos que presentan una actividad de nucleasa 5' a 3' pueden cortar la sonda hibridada con el ácido nucleico diana cadena abajo del cebador. El extremo 3' del cebador proporciona el sitio de unión inicial para la polimerasa. La polimerasa unida corta fragmentos de la sonda al encontrarse con el extremo 5' de la sonda. Este procedimiento también se ilustra esquemáticamente en la figura 2. Tal como se muestra, durante la extensión del cebador 200, la polimerasa 202 corta la sonda 5'-nucleasa 204, que se hibrida con la diana o el molde 206, liberando la fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 208 y la fracción aceptora (A) 210 de la parte restante de la sonda 5'-nucleasa 204, que incluye la fracción desactivadora (Q) 212. Antes del corte, la fracción desactivadora (Q) 212 desactiva las emisiones fluorescentes de la fracción aceptora (A) 210, mientras que, tal como se muestra, tras este procedimiento de corte, la fracción desactivadora (Q) 212 ya no desactiva las emisiones fluorescentes de la fracción aceptora (A) 210. En otra realización ejemplar, entre las sondas 5'-nucleasa se incluyen sólo las fracciones donadora sustancialmente no fluorescente y aceptora. En dichas realizaciones, la intensidad de las emisiones fluorescentes de las fraccionesceptoras generalmente se reduce tras el corte a medida que las fracciones donadora y aceptora se separan una de otra.

Pueden diseñarse el cebador y la sonda para que se hibriden al encontrarse muy próximas en el ácido nucleico diana, de manera que la unión de la ácido nucleico polimerasa al extremo 3' del cebador la ponga en contacto con el extremo 5' de la sonda en ausencia de extensión del cebador. La expresión "corte independiente de la polimerización" se refiere a este proceso. Alternativamente, en el caso de que el cebador y la sonda se hibriden con regiones más espaciadas del ácido nucleico diana, la polimerización típicamente se produce antes de que la ácido nucleico polimerasa entre en contacto con el extremo 5' de la sonda. A medida que progresa la polimerización, la polimerasa corta progresivamente fragmentos del extremo 5' de la sonda. Este corte continúa hasta que se ha desestabilizado el resto de la sonda en el grado suficiente para disociarla de la molécula molde. La expresión "corte independiente de la polimerización" se refiere a este proceso.

Una ventaja del corte independiente de la polimerización reside en la eliminación de la necesidad de amplificar el ácido nucleico. Con la condición de que el cebador y la sonda se encuentren unidos en posiciones contiguas al ácido nucleico, pueden realizarse rondas secuenciales de hibridación de la sonda y corte de los fragmentos. De esta manera, puede generarse una cantidad suficiente de fragmentos, permitiendo la detección en ausencia de polimerización.

En cualquiera de los procedimientos se proporciona una muestra que se cree que contiene el ácido nucleico diana. El ácido nucleico diana contenido en la muestra puede transcribirse inversamente formando ADNc, en caso necesario, y después desnaturalizarse, utilizando cualquier método adecuado de desnaturalización, incluyendo métodos físicos, químicos o enzimáticos, que son conocidos por el experto en la materia. Un enfoque físico ejemplar para llevar a cabo la separación de cadenas implica el calentamiento del ácido nucleico hasta su completa desnaturalización (>99%). La desnaturalización por calor típica implica temperaturas comprendidas entre aproximadamente 85°C y aproximadamente 105°C, durante periodos de tiempo comprendidos entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 minutos. A modo de alternativa a la desnaturalización, el ácido nucleico puede existir en una forma monocatenaria en la muestra, tal como en el caso de que la muestra comprenda virus de ARN o ADN monocatenario.

La cadena de ácido nucleico diana desnaturalizado típicamente se incuba con un cebador y una sonda bajo condiciones de hibridación que permitan la unión del cebador y la sonda a la cadena de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, pueden utilizarse dos cebadores para amplificar el ácido nucleico diana. Los dos cebadores típicamente se seleccionan de manera que sus posiciones relativas a lo largo del ácido nucleico diana de modo que un producto de extensión sintetizado a partir de un cebador, al separarse el producto de extensión de su molde

(complemento), sirva de molde para la extensión del otro cebador, rindiendo una cadena réplica de longitud definida.

Debido a que las cadenas complementarias típicamente son más largas que la sonda o que el cebador, las cadenas presentan más puntos de contacto y de esta manera, una mayor probabilidad de unirse entre sí dentro de un periodo de tiempo dado. Por consiguiente, típicamente se aplica un exceso molar elevado de sonda y cebador para favorecer la hibridación de ambos durante la rehibridación de la cadena molde. En los formatos multiplex, típicamente se utilizan múltiples sondas en un único recipiente de reacción con el fin de detectar simultáneamente múltiples ácidos nucleicos diana.

Los cebadores generalmente son de suficiente longitud y complementariedad para unirse selectivamente a ácidos nucleicos diana bajo condiciones seleccionadas que permitan que se produzca el corte independiente de la polimerización o el corte dependiente de la polimerización. La longitud y composición exactas del cebador depende de muchos factores, entre ellos la temperatura de la reacción de hibridación, la fuente y composición del cebador, la proximidad del sitio de hibridación de la sonda al sitio de hibridación del cebador, y la proporción de concentraciones de cebador:sonda. Por ejemplo, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador típicamente incluye aproximadamente 15 a 30 nucleótidos, aunque puede contener un número mayor o menos de nucleótidos.

La sonda generalmente se hibrida con su ácido nucleico diana complementario antes de que la ácido nucleico polimerasa se ponga en contacto con la región del ácido nucleico diana, permitiendo de esta manera que la actividad 5' a 3' nucleasa del enzima corte fragmentos de la sonda. Para incrementar la probabilidad de que la sonda se hibride con el ácido nucleico antes de que la polimerasa alcance su región de hibridación, puede utilizarse una diversidad de técnicas. Por ejemplo, los cebadores cortos generalmente requieren una temperatura más fría para formar complejos híbridos suficientemente estables con el ácido nucleico. Por lo tanto, la sonda puede diseñarse para que sea más larga que el cebador, de manera que la sonda preferentemente se hibride con el ácido nucleico diana a temperaturas más altas que la hibridación del cebador. A título ilustrativo adicional, la composición de nucleótidos de la sonda puede seleccionarse para que presente un contenido de G/C más alto y, en consecuencia, una mayor estabilidad térmica que el cebador. Opcionalmente, pueden incorporarse nucleótidos modificados en cebadores o sondas para proporcionar una estabilidad térmica mayor o menor comparado con los cebadores o sondas que presentan únicamente nucleótidos no modificados. Se han descrito en mayor detalle anteriormente nucleótidos modificados ejemplares. Los parámetros de termociclado también pueden modificarse para aprovechar la diferente estabilidad térmica de sonda y cebador. Por ejemplo, tras una etapa de desnaturalización en el termociclado, puede aplicarse una temperatura intermedia que permita la unión de la sonda, pero no la unión del cebador. A continuación, la temperatura puede reducirse adicionalmente para permitir la hibridación del cebador. Con el fin de favorecer la unión de la sonda con preferencia a la del cebador, también puede utilizarse un exceso molar elevado de concentración de sonda respecto a cebador. Dichas concentraciones de sonda típicamente son entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 veces superiores a la concentración de cebador respectiva, que generalmente es de entre aproximadamente $0,5 \times 10^{-7}$ M y 5×10^{-7} M.

La extensión dependiente del molde de los cebadores generalmente se encuentra catalizada por un catalizador biológico incorporador de nucleótidos (por ejemplo una polimerasa) en presencia de cantidades adecuadas de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) o análogos en una mezcla de reacción que también incluye sales apropiadas, cationes metálicos y tampones. Se han descrito en mayor detalle mezclas de reacción anteriormente. Los catalizadores biológicos adecuados que incorporan nucleótidos son enzimas que es conocido que catalizan la síntesis de cebador y ADN dependiente del molde y que presentan la actividad nucleasa 5' a 3'. Entre las ADN polimerasas ejemplares de este tipo se incluyen la ADN polimerasa I de *E. coli*, la ADN polimerasa de Tht, la ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus*, la ADN polimerasa Taq, la ADN polimerasa ZO5, la ADN polimerasa de *Thermatoga maritima*, la ADN polimerasa de *Thermatoga neopolitana* y la ADN polimerasa de *Thermosipho africanus*. Las condiciones de reacción para catalizar la síntesis de ADN con dichas ADN polimerasas son bien conocidas de la técnica. Típicamente, el catalizador biológico incorporador de nucleótidos corta eficientemente la sonda y libera fragmentos marcados de manera que se genere directa o indirectamente una señal detectable.

Los productos de la síntesis generalmente son moléculas dúplex que incluyen las cadenas de molde y las cadenas de extensión de cebador. Los productos secundarios de esta síntesis son fragmentos de sonda, que pueden incluir una mezcla de fragmentos mononucleótidos, dinucleótidos y de mayor número de nucleótidos. Los ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación de sonda y cebador, y extensión de cebador y corte de sonda resultan en la acumulación exponencial de la región definida por los cebadores y la generación exponencial de fragmentos marcados. Se llevan a cabo suficientes ciclos para conseguir una cantidad detectable de fragmentos de sonda, que generalmente es varios ordenes de magnitud mayor que la señal de fondo. La utilización de las fracciones donadoras tal como se describe en la presente memoria puede reducir efectivamente el número de ciclos realizados antes de que se produzca una señal detectable respecto a los ensayos que no reducen dichas señales de fondo.

En determinadas realizaciones, las reacciones de PCR se llevan a cabo en forma de procedimiento automatizado, que utiliza un enzima termoestable. En este procedimiento, se cicla la mezcla de reacción a través de una etapa de desnaturalización, una etapa de hibridación de sonda y cebador, y una etapa de síntesis en la que se producen el corte y desplazamiento simultáneamente a la extensión del molde dependiente de cebador. En algunas

realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se llevan a cabo utilizando un sistema. Dichos sistemas se describen en mayor detalle posteriormente. Opcionalmente pueden utilizarse cicladores térmicos, tales como los disponibles comercialmente de, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), que están diseñados para la utilización con enzimas termoestables.

Las polimerasas termoestables típicamente se utilizan en procedimientos automatizados que llevan a cabo la desnaturalización de productos de extensión de doble cadena mediante la exposición de los mismos a temperaturas elevadas (por ejemplo aproximadamente 95°C) durante el ciclo de PCR. Por ejemplo, la patente US nº 4.889.818, titulada "PURIFIED THERMOSTABLE ENZYME", expedida el 26 de diciembre de 1989 a Gelfand *et al.*, da a conocer un enzima termoestable representativo aislado de *Thermus aquaticus*. Entre las polimerasas termoestables representativas adicionales se incluyen, por ejemplo, polimerasas extraídas de las bacterias termoestables *Thermus flavus*, *Thermus ruber*, *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* (que presenta una temperatura óptima algo más baja que las otras bacterias listadas), *Thermus lacteus*, *Thermus rubens*, *Thermotoga maritima*; *Thermatoga neopolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Thermococcus littoralis* y *Methanothermobacter fervidus*.

La hibridación de sondas a ácidos nucleicos diana puede llevarse a cabo seleccionando las condiciones de hibridación apropiadas. La estabilidad del híbrido de sonda:ácido nucleico diana típicamente se selecciona para que resulte compatible con las condiciones de ensayo y de lavado, de manera que se formen híbridos detectables estables únicamente entre las sondas y los ácidos nucleicos diana. La manipulación de uno o más de los diferentes parámetros de ensayo determina la sensibilidad y especificidad exactas de un ensayo de hibridación particular.

Más concretamente, la hibridación entre las bases complementarias de los ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN, APN o combinaciones de los mismos) se produce bajo una amplia diversidad de condiciones que varían de temperatura, concentración salina, fuerza electrostática y composición del tampón. Se describen ejemplos de dichas condiciones y métodos de aplicación de las mismas en, por ejemplo, Tijssen, *Hybridization with Nucleic Acid Probes*, vol. 24, Elsevier Science, 1993, y en Hames and Higgins, *supra*. La hibridación generalmente tiene lugar entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 70°C, durante periodos de entre aproximadamente un minuto y aproximadamente una hora, dependiendo de la naturaleza de la secuencia que debe hibridarse y su longitud. Sin embargo, se reconoce que las hibridaciones pueden producirse en segundos u horas, dependiendo de las condiciones de la reacción. A título ilustrativo, las condiciones de hibridación típicas para una mezcla de dos 20-meros es calentar la mezcla a 68°C, y después enfriarla hasta la temperatura ambiente (22°C) durante cinco minutos o a temperaturas muy bajas, tales como 2°C. La hibridación entre ácidos nucleicos puede facilitarse mediante la utilización de tampones, tales como Tris-EDTA (TE), Tris-HCl y HEPES, soluciones salinas (por ejemplo NaCl, KCl y MgCl₂) u otras soluciones acuosas, reactivos y compuestos químicos. Entre los ejemplos de dichos reactivos se incluyen proteínas de unión de una cadena, tales como la proteína Rec A, la proteína del gen 32 de T4, la proteína de unión de una cadena de *E. coli* y las proteínas de unión del surco mayor o menor de ácidos nucleicos.

Entre otros ejemplos de dichos reactivos y compuestos químicos se incluyen iones divalentes, iones polivalentes y sustancias intercalantes tales como bromuro de etidio, actinomicina D, psoralén y angelicina.

Puede utilizarse en la presente invención esencialmente cualquier método disponible para detectar ácidos nucleicos diana. Entre los enfoques comunes se incluyen la detección mediante amplificación en tiempo real con sondas 5'-nucleasa, sondas de hibridación o sondas en horquilla (por ejemplo balizas moleculares), la detección de marcajes incorporados en los cebadores de amplificación o los ácidos nucleicos amplificados mismos, por ejemplo tras la separación electroforética de los productos de amplificación de marcajes no incorporados, tras los ensayos basados en la hibridación (por ejemplo ensayos basados en matrices) y/o tras la detección de reactivos secundarios que se unen a los ácidos nucleicos. Estos enfoques generales también se describen en, por ejemplo, Sambrook y en Ausubel 1 y 2, *supra*.

Las sondas en horquilla, tales como las balizas moleculares, son oligonucleótidos diseñados para la detección y cuantificación en tiempo real de ácidos nucleicos diana. Los extremos 5' y 3' de las sondas en horquilla generalmente comprenden los grupos de marcaje, que proporcionan las propiedades detectables de la sonda. En una realización ejemplar, uno de los extremos se une a una fracción donadora sustancialmente no fluorescente y a una fracción aceptora (por ejemplo un pigmento fluorescente) y el otro extremo se une a una fracción desactivadora capaz de inactivar las emisiones fluorescentes de la fracción aceptora. En el caso de que la sonda en horquilla se encuentre presente libre en solución, es decir, no hibridada con un segundo ácido nucleico, se estabiliza el tallo de la sonda mediante apareamiento de bases complementarias. El apareamiento autocomplementario resulta en una estructura de "bucle de horquilla" de la sonda en la que las fracciones aceptora y desactivadora se encuentran próximas entre sí. En esta confirmación, la fracción desactivadora desactiva la fracción aceptora. El bucle de una sonda en horquilla típicamente comprende una secuencia que es complementaria de la secuencia que debe detectarse en el ácido nucleico diana, de manera que la hibridación del bucle con su secuencia complementaria en la diana fuerza la disociación del tallo, de esta manera distanciando la fracción aceptora de la fracción desactivadora. Lo anterior anula la desactivación de la fracción aceptora, provocando un incremento de fluorescencia de la sonda en horquilla.

A título ilustrativo adicional, la figura 3 muestra esquemáticamente la sonda en horquilla 30, que incluye la fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 302, la fracción aceptora (A) 304 y la fracción desactivadora (Q) 306.

Tal como se muestra, la fracción desactivadora (Q) 306 desactiva las emisiones fluorescentes de la fracción aceptora (A) 304 en el caso de que la sonda en horquilla 300 se encuentre libre en solución, aunque no en el caso de que la sonda en horquilla 300 se hibride con el ácido nucleico diana 308. En otra realización representativa, las sondas en horquilla incluyen únicamente fracciones donadora sustancialmente no fluorescente y aceptora. En estas realizaciones, la intensidad de fluorescencia de las fracciones aceptoras típicamente se reduce al hibridarse la sonda con los ácidos nucleicos diana debido a cambios conformacionales de las sondas.

Los detalles de los métodos estándares de preparación y utilización de sondas en horquilla son generalmente conocidos para el experto en la materia y también se describen en, por ejemplo, Leone *et al.* "Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogenous real-time detection of RNA", *Nucleic Acids Res.* 26:2150-2155, 1995; Kostrikis *et al.*, "Molecular beacons: spectral genotyping of human alleles", *Science* 279:1228-1229, 1998; Fang *et al.*, "Designing a novel molecular beacon for surface-immobilized DNA hybridization studies", *J. Am. Chem. Soc.* 121:2921-2922, 1999; y Marras *et al.*, "Multiplex detection of single-nucleotide variation using molecular beacons", *Genet. Anal. Biomol. Eng.* 14:151-156, 1999. Una diversidad de proveedores comerciales produce sondas en horquilla estándares y a medida que pueden adaptarse para la utilización en los métodos descritos en la presente memoria, entre ellos Oswel Research Products Ltd. (Reino Unido), Research Genetics (una división de Invitrogen, Huntsville, AL, USA), y The Midland Certified Reagent Company (Midland, TX, USA). También se encuentra disponible comercialmente una diversidad de kits que utilizan sondas en horquilla, tales como los kits de balizas moleculares de discriminación alélica Sentinel™ de Stratagene (La Jolla, CA, USA) y diversos kits de Eurogentec SA (Bélgica) e Isogen Bioscience BV (Países Bajos). Estos kits también se adaptan opcionalmente para la utilización en los métodos descritos en la presente memoria.

Las sondas de hibridación generalmente funcionan en parejas y pueden utilizarse para llevar a cabo diversos tipos de detección en tiempo real de ácidos nucleicos diana, incluyendo la cuantificación, la detección de mutaciones, el multiplexado de la temperatura de fusión (T_m) y el multiplexado del color. También se describen aspectos de determinados ensayos de sondas de hibridación en, por ejemplo, Brega *et al.* "Real-time PCR for dihydrofolate reductase gene single-nucleotide polymorphisms in *Plasmodium vivax* isolates," *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(7):2581, 2004; Perelle *et al.*, "A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic *Campylobacter*," *Mol. Cell Probes.* 18(5):321-327, 2004; y Whiley *et al.*, "Detection of *Neisseria Meningitidis* in clinical samples by a duplex real-time PCR targeting the *porA* and *ctrA* genes," *Mol. Diagn.* 7(3-4):141-145, 2003.

Entre los ensayos de sondas de hibridación típicamente se incluyen la hibridación de una pareja de sondas marcadas con un ácido nucleico diana o molde suficientemente próximas entre sí para que se produzca la transferencia de energía entre las fracciones de marcaje. Más concretamente, una sonda de hibridación (una "sonda donadora") de la pareja generalmente incluye por lo menos una fracción donadora sustancialmente no fluorescente (por ejemplo 5 ó 6 carboxi-DmF), mientras que la otra sonda de hibridación (una "sonda aceptora") de la pareja incluye por lo menos una fracción aceptora (por ejemplo LC-Red 610, LC-Red 640, LC-Red 670, LC-Red 705, JA-270, CY5 ó CY5.5). A título ilustrativo adicional, la figura 4 muestra esquemáticamente que, en el caso de que la sonda donadora 400 con una fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 402 y la sonda aceptora 404 con la fracción aceptora (A) 406 se encuentran libres en solución, la energía de excitación no fluorescente no se transfiere desde la fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 402 a la fracción aceptora (A) 406. Por el contrario, en el caso de que la sonda donadora 400 y la sonda aceptora 404 se hibriden ambas con los ácidos nucleicos diana o molde 408, la fracción aceptora (A) 406 emite energía fluorescente en respuesta a la recepción de energía de excitación no fluorescente transferida de la fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 402, que se encuentra suficientemente próxima a la fracción aceptora (A) 406 en el ácido nucleico diana o molde 408. En otra realización ejemplar, una sonda de hibridación de una pareja incluye fracciones tanto donadora sustancialmente no fluorescente como aceptora, mientras que la otra sonda de la pareja incluye una fracción desactivadora. En la presente realización, la emisión fluorescente detectable de la fracción aceptora se reduce en el caso de que la pareja de sondas se hibride con un ácido nucleico diana, debido a que la fracción desactivadora desactiva la fluorescencia. La fluorescencia emitida por las fracciones aceptoras de las sondas de hibridación pueden detectarse utilizando diversos métodos, incluyendo aquellos que utilizan un sistema LightCycler® (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN, USA).

En otras realizaciones ilustrativas de utilización de las moléculas biológicas indicadas en la presente memoria, se utilizan cebadores marcados para llevar a cabo una detección en tiempo real de los ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, la figura 5 muestra esquemáticamente el cebador 500, que incluye una fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 502, una fracción aceptora (A) 504 y una fracción desactivadora (Q) 506. Previamente a la extensión del cebador, el cebador 500 forma una estructura de bucle de horquilla, de manera que la fracción desactivadora (Q) 506 desactiva la fluorescencia emitida por la fracción aceptora (A) 504. Tras la extensión del cebador 500 (unido al ácido nucleico molde 508), la estructura de bucle de horquilla se disocia y se hibrida a la recién formada secuencia complementaria, separando la fracción aceptora (A) 504 de la fracción desactivadora (Q) 506, de manera que las emisiones fluorescentes de la fracción aceptora (A) 504 pueden detectarse. En otras realizaciones, los cebadores comprenden únicamente fracciones donadora sustancialmente no fluorescente y aceptora. Los enfoques basados en cebadores de la detección en tiempo real de ácidos nucleicos diana que pueden

adaptarse para la utilización con las moléculas biológicas de la invención también se describen en, por ejemplo, Huang *et al.* "Real-time quantitative assay of telomerase activity using the duplex scorpion primer", *Biotechnol. Lett.* 26(11):891, 2004; Asselbergs *et al.*, "Rapid detection of apoptosis through real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction measurement of the small cytoplasmic RNA Y1," *Anal. Biochem.* 318(2):221-229, 2003; y Nuovo *et al.*, "*In situ* amplification using universal energy transfer-labeled primers", *J. Histochem. Cytochem.* 47(3):273-280, 1999.

Otra aplicación ejemplar de determinadas realizaciones de las moléculas biológicas indicadas en la presente memoria es en la secuenciación de ácidos nucleicos. En general, los protocolos de secuenciación de ácidos nucleicos implican una reacción de extensión/terminación de un ácido nucleico cebador. Incluida en la mezcla de reacción típicamente se encuentran desoxinucleósidos trifosfato (dNTPs) y enzimas polimerasa, que se utilizan para extender el cebador. Además, también incluido en la mezcla de reacción se encuentra por lo menos un dideoxinucleósido trifosfato (ddNTP) u otro nucleótido terminador, que, al incorporarse en el cebador extendido, evita la extensión adicional del cebador. Tras terminar la reacción de extensión, los diferentes productos de terminación que se forman se separan y se analizan con el fin de determinar la secuencia de bases del ácido nucleico diana.

La secuenciación de ácidos nucleicos generalmente se divide en dos clases, "la secuenciación de pigmento-cebador" y "la secuenciación de pigmento-terminador". En la secuenciación de pigmento-cebador, se incorpora un pigmento fluorescente (por ejemplo una pareja de fracciones aceptora y donadora sustancialmente no fluorescente tal como se describe en la presente memoria) en el cebador que se está extendiendo. A continuación, se llevan a cabo cuatro reacciones separadas de extensión/terminación en paralelo, conteniendo cada reacción de extensión un nucleótido terminador diferente para terminar la reacción de extensión. Tras la terminación, los productos de reacción típicamente se separan mediante electroforesis en gel y se analizan (Ansorge *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 15:4593-4602, 1987).

En una variación de la secuenciación de pigmento-cebador, se utilizan diferentes cebadores en las cuatro reacciones separadas de extensión/terminación, conteniendo cada cebador un pigmento espectralmente resoluble diferente. Tras la terminación, los productos de reacción de las cuatro reacciones de extensión/terminación típicamente se agrupan, se separan electroforéticamente y se detectan en un único carril (Smith *et al.* *Nature* 321:674-679, 1986). De esta manera, en esta variación de la secuenciación de pigmento-cebador, mediante la utilización de cebadores que contienen un conjunto de pigmentos espectralmente resolubles, pueden detectarse simultáneamente productos de más de una reacción de extensión/terminación.

En la secuenciación de pigmento-terminador, se une un pigmento fluorescente (por ejemplo una pareja de fracciones aceptora y donadora sustancialmente no fluorescente tal como se describe en la presente memoria) a cada uno de los nucleótidos terminadores (por ejemplo terminadores 2' ó dideoxinucleósidos trifosfato). A continuación, se lleva a cabo una reacción de extensión/terminación en la que se extiende un cebador utilizando desoxinucleósidos trifosfato hasta incorporar el nucleótido terminador marcado en el cebador extendido, con el fin de evitar la extensión adicional del cebador. Tras la terminación, se separan y detectan los productos de reacción para cada nucleótido terminador. En una realización, se llevan a cabo reacciones separadas de extensión/terminación para cada uno de los cuatro nucleótidos terminadores. En otra realización, se lleva a cabo una única reacción de extensión/terminación que contiene los cuatro nucleótidos terminadores, cada uno marcado con un pigmento fluorescente espectralmente resoluble diferente tal como se describe en la presente memoria.

De esta manera, según un aspecto de la invención, se proporcionan métodos para llevar a cabo la secuenciación de pigmento-cebador utilizando uno o más reactivos oligonucleótidos de la presente invención. Según dicho método, se forma una mezcla de cebadores marcados extendidos mediante hibridación de un ácido nucleico diana con un cebador marcado en presencia de desoxinucleósidos trifosfato, por lo menos un nucleótido terminador y una polimerasa. El cebador marcado incluye una secuencia oligonucleótida complementaria a una parte de la secuencia diana de ácidos nucleicos que se está secuenciando, y un pigmento fluorescente de transferencia energética (por ejemplo una pareja de fracciones aceptora y donadora sustancialmente no fluorescente, tal como se describe en la presente memoria) unido al oligonucleótido.

Según dicho método ejemplar, la polimerasa extiende el cebador con los desoxinucleósidos trifosfato hasta incorporar un nucleótido terminador, que termina la extensión del cebador. Tras la terminación, los cebadores extendidos en la mezcla se separan típicamente (por ejemplo electroforéticamente y/o cromatográficamente). La secuencia del ácido nucleico diana seguidamente se determina a partir de la detección de los cebadores extendidos.

En otra realización ejemplar de dicho método, se llevaron a cabo cuatro reacciones de secuenciación de pigmento-cebador, incluyendo cada reacción de secuenciación de cebador un cebador marcado diferentemente y un nucleótido terminador diferente (por ejemplo ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP). Tras llevar a cabo las cuatro reacciones de secuenciación de pigmento-cebador, las mezclas resultantes de cebadores extendidos pueden agruparse. Los cebadores extendidos en la mezcla seguidamente pueden separarse y la señal fluorescente de cada uno de los cuatro cebadores marcados diferentemente detectados con el fin de determinar la secuencia del ácido nucleico diana.

La invención se refiere además a un método para llevar a cabo la secuenciación de pigmento-terminador utilizando

uno o más nucleótidos terminadores (por ejemplo nucleótidos 2'-terminadores o dideoxinucleósidos trifosfato) marcados con un pigmento de transferencia energética de la presente invención (por ejemplo una pareja de fracciones aceptora y donadora sustancialmente no fluorescente tal como se describe en la presente memoria). Según dicho método, se forma una mezcla de cebadores marcados extendidos mediante hibridación de un ácido nucleico diana con un cebador marcado en presencia de desoxinucleósidos trifosfato, por lo menos un nucleótido terminador marcado y una polimerasa. En algunas realizaciones de dicho método, la etapa de formación de una mezcla de cebadores extendidos incluye hibridar el ácido nucleico diana con cuatro nucleótidos terminadores marcados diferentemente. La polimerasa extiende el cebador con los desoxinucleósidos trifosfato hasta incorporar un nucleótido terminador marcado en el cebador extendido. Tras la terminación, los cebadores extendidos en la mezcla típicamente se separan. A continuación, se determina la secuencia de los ácidos nucleicos diana a partir de la detección del nucleótido terminador marcado incorporado en el cebador extendido.

Entre otras utilizaciones ejemplares de las moléculas biológicas de la invención se incluyen el análisis de proteínas. Por ejemplo, la figura 6 ilustra esquemáticamente un ensayo que puede utilizarse para evaluar respuestas al corte de proteínas. Tal como se muestra, determinados aminoácidos 602 de la proteína 600 incluyen una fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 604, una fracción aceptora (A) 606 ó una fracción desactivadora (Q) 608. Previamente al corte (por ejemplo mediante corte con proteasa y/o corte químico), la fracción desactivadora (Q) 608 desactiva las emisiones fluorescentes de la fracción aceptora (A) 606, que acepta la energía de excitación transferida de la fracción donadora sustancialmente no fluorescente (D) 604. Tras el corte, la fracción desactivadora (Q) 608 ya no desactiva esta fluorescencia, que puede detectarse mediante diversos métodos conocidos por el experto en la materia. En una variación ejemplar de este procedimiento, las proteínas se marcan únicamente con las fracciones donadora sustancialmente no fluorescente y aceptora de manera que tras el corte, se reduce la intensidad de la fluorescencia emitida por la fracción aceptora. También se describen aspectos de los ensayos de corte con proteasa, que puede adaptarse para la utilización con las moléculas biológicas de la presente invención, en, por ejemplo, Jenny *et al.*, "A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa," *Protein Expr. Purif.* 31 1 (1): 1 -11, 2003, y Funovics *et al.* "Protease sensors for bioimaging", *Anal. Bioanal. Chem.* 377(6):956-963, 2003.

Entre otros ensayos de proximidad representativos que pueden llevarse a cabo utilizando determinadas moléculas biológicas de la invención se incluyen ensayos de mezcla de lípidos basados en la transferencia de energía. A título ilustrativo, la figura 7 muestra esquemáticamente determinadas etapas llevadas a cabo en un ensayo de mezcla de lípidos según una realización de la invención. Tal como se muestra, la membrana marcada 700 incluye lípidos donadores 702 que incluyen fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes (D) 704 y lípidos aceptores 706 que incluyen fraccionesceptoras (A) 708. Previamente a la fusión de la membrana marcada 700 con membrana no marcada 710, las fraccionesceptoras (A) 708 emiten fluorescencia en respuesta a la absorción de energía de excitación transferida de fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes (D) 704, que se encuentran suficientemente próximas a las fraccionesceptoras (A) 708 en la membrana marcada 700. Esta fluorescencia se reduce tras fusionarse las membranas a medida que se incrementa la distancia entre los lípidos donadores 702 y los lípidos aceptores 706.

Los enfoques a la detección de la fluorescencia de las fraccionesceptoras en dichos ensayos y otros ensayos de proximidad son generalmente conocidos por el experto en la materia. Algunos de dichos métodos de detección y sistemas relacionados, que incluyen la utilización de tubos fotomultiplicadores o dispositivos de carga acoplada se describen en mayor detalle posteriormente.

La invención se refiere además a métodos comerciales que implican las moléculas biológicas indicadas en la presente memoria. Por ejemplo, la figura 8 es un diagrama de bloques que muestra determinadas etapas llevadas a cabo en un método comercial según una realización de la invención. Tal como se muestra en la etapa 800, el método incluye recibir un pedido de un cliente para por lo menos una molécula biológica indicada en la presente memoria. Además, el método también incluye suministrar la molécula biológica al cliente en respuesta al pedido (etapa 802). En algunas realizaciones, por ejemplo, una entidad comercial recibe el pedido realizado presencialmente por el cliente o mediante un agente del mismo, a través del servicio postal u otro servicio de envíos (por ejemplo un servicio general de transporte), mediante una comunicación telefónica, mediante una comunicación por email u otro medio electrónico o cualquier otro método adecuado. En algunas realizaciones, las moléculas biológicas que se piden y/o se suministran se encuentran incluidas en los kits indicados en la presente memoria. Además, las moléculas biológicas se suministran o se proporcionan a los clientes (por ejemplo en intercambio por una forma de pago) mediante cualquier método adecuado, incluyendo mediante la presencia personal del cliente o un agente del mismo, mediante el servicio postal u otro servicio de envíos, tal como un servicio general de transporte.

II. SISTEMAS

La invención también proporciona sistemas para detectar emisiones energéticas de fraccionesceptoras en respuesta a energía no fluorescente transferida por fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes. Los sistemas pueden utilizarse para llevar a cabo muchos ensayos diferentes, entre ellos los ensayos de proximidad indicados en la presente memoria. Los sistemas incluyen una o más moléculas biológicas marcadas con por lo

menos una o más fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes definidas en la reivindicación 1. En determinadas realizaciones, las moléculas biológicas se disponen ordenadamente sobre soporte sólidos, mientras que en otras, se proporcionan en uno o más recipientes, por ejemplo para ensayos realizados en solución. Los sistemas también incluyen fuentes de radiación y por lo menos un detector o componente de detección (por ejemplo un espectrómetro) que por lo menos detecta la energía emitida por fracciones aceptoras en el caso de que las fracciones aceptoras se encuentren suficientemente próximas a las fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes. Además, los sistemas opcionalmente incluyen por lo menos un modulador térmico (por ejemplo un dispositivo de ciclado térmico) operablemente conectado a los recipientes o soportes sólidos para modular la temperatura en los recipientes o sobre los soporte sólidos, y/o por lo menos un componente de transferencia de líquidos (por ejemplo un pipeteador automático) que transfiere líquidos hacia y/o desde los recipientes o soportes sólidos, por ejemplo para llevar a cabo uno o más ensayos de proximidad en los recipientes o sobre los soportes sólidos.

Los detectores típicamente se estructuran para detectar las señales detectables producidas, por ejemplo, en otro componente o en una posición próxima al mismo del sistema de ensayo dado (por ejemplo en un recipiente y/o sobre un soporte sólido). Los detectores de señal adecuados que se utilizan opcionalmente, o que se han adaptado para la utilización, en la presente invención detectan, por ejemplo, fluorescencia, fosforescencia, radioactividad, absorbancia, índice refractivo, luminiscencia o masa. Los detectores opcionalmente realizan un seguimiento de una o una pluralidad de señales anteriores y/o posteriores a la realización de, por ejemplo, una etapa de ensayo dada. Por ejemplo, los detectores opcionalmente siguen una pluralidad de señales ópticas, que corresponden en posición a los resultados "en tiempo real". Entre los ejemplos de detectores o sensores se incluyen tubos fotomultiplicadores, matrices CCD, sensores ópticos, sensores de temperatura, sensores de presión, sensores de pH, sensores de conductividad o detectores de escaneo. Entre los detectores ejemplares más específicos que se utilizan opcionalmente para llevar a cabo los métodos de la invención se incluyen, por ejemplo, los detectores de dispersión lumínica por resonancia, los espectroscopios de emisión, los espectroscopios de fluorescencia, los espectroscopios de fosforescencia, los espectroscopios de luminiscencia, los espectrofotómetros y los fotómetros.

También se describen detectores en, por ejemplo, Skoog *et al.*, Principles of Instrumental Analysis, 5a edición, Harcourt Brace College Publishers, 1998; Currell, Analytical Instrumentation: Performance Characteristics and Quality, John Wiley & Sons, Inc., 2000; Sharma *et al.*, Introduction to Fluorescence Spectroscopy, John Wiley & Sons, Inc., 1999; Valeur, Molecular Fluorescence: Principles and Applications, John Wiley & Sons, Inc., 2002, y Gore, Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach, 2a edición, Oxford University Press, 2000.

Entre los sistemas de la invención también se incluyen típicamente controladores que se encuentran operablemente conectados a uno o más componentes (por ejemplo detectores, moduladores térmicos y/o componentes de transferencia de líquidos) del sistema para controlar el funcionamiento de los componentes. Más concretamente, los controladores generalmente se incluyen como componentes separados o integrales del sistema que se utilizan, por ejemplo, para recibir datos de los detectores, para llevar a cabo y/o regular la temperatura en los recipientes, para producir y/o regular el flujo de líquido hacia o desde recipientes seleccionados. Los controladores y/o otros componentes del sistema opcionalmente se acoplan a un procesador programado apropiadamente, a un ordenador, dispositivo digital, aparato de tratamiento de la información u otro dispositivo lógico (por ejemplo incluyendo un conversor de analógico a digital o de digital a analógico, según resulte necesario), que funciona ordenando el funcionamiento de dichos instrumentos de acuerdo con instrucciones preprogramadas o introducidas por el usuario, recibiendo datos e información de dichos instrumentos, e interpretando, manipulando y comunicando esta información al usuario. Los controladores adecuados son generalmente conocidos de la técnica y se encuentran disponibles de diversas fuentes comerciales.

Cualquier controlador u ordenador incluye opcionalmente una pantalla, que con frecuencia es una pantalla de tubo de rayos catódicos ("CRT"), una pantalla plana (por ejemplo una pantalla de cristal líquido con matriz activa o pantalla de cristal líquido) u otros. Los circuitos del ordenador con frecuencia se introducen en una caja, que incluye numerosos chips de circuito integrado, tales como un microprocesador, memoria, circuitos de interfaz y otros. La caja también incluye opcionalmente un disco duro, una disquetera, un disco extraíble de alta capacidad tal como un CD-ROM grabable y otros elementos periféricos comunes. Los dispositivos de introducción, tales como un teclado o un ratón opcionalmente permiten la introducción de información por parte de un usuario. Dichos componentes se ilustran en mayor detalle posteriormente.

El ordenador típicamente incluye software apropiado para recibir instrucciones del usuario, en forma de introducción por parte del usuario en un conjunto de campos paramétricos, por ejemplo en un GUI, o en forma de instrucciones preprogramadas, por ejemplo preprogramadas para una diversidad de diferentes operaciones específicas. A continuación, el software convierte estas instrucciones en lenguaje apropiado para ordenar la activación de uno o más controladores para que se lleve a cabo la operación deseada. Seguidamente el ordenador recibe los datos de, por ejemplo, sensores/detectores incluidos en el sistema, e interpreta los datos, los proporciona en un formato comprensible para el usuario, o utiliza los datos para iniciar instrucciones adicionales del controlador, de acuerdo con la programación, por ejemplo el control de reguladores del flujo de líquido en respuesta a datos de peso de líquido recibidos de básculas.

La figura 9 es un esquema que muestra un sistema representativo que incluye un dispositivo lógico en el que pueden encontrarse realizados diversos aspectos de la presente invención. Tal como entenderá el experto en la materia a partir de las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, la invención se implementa opcionalmente en hardware y/o software. En algunas realizaciones, se implementan diferentes aspectos de la invención en lógica del lado del cliente o en lógica del lado del servidor. Tal como se entenderá en la técnica, la invención o componentes de la misma pueden encontrarse realizados en un componente programa multimedia (por ejemplo un componente multimedia fijo) que contiene instrucciones lógicas y/o datos que, al ser cargados en un dispositivo de informática configurado apropiadamente, causan que el dispositivo funcione tal como se desea. Tal como también se entenderá en la técnica, un medio fijo que contenga instrucciones lógicas puede proporcionarse a un usuario en un medio fijo para la carga física en el ordenador de un usuario o un medio fijo que contenga instrucciones lógicas puede residir en un servidor remoto al que accede un usuario a través de un medio de comunicación con el fin de descargar un componente del programa.

Más concretamente, la figura 9 ilustra esquemáticamente un ordenador 900 al que se conectan operablemente un detector 902 (por ejemplo un espectrómetro, tal como un espectrofluorómetro), un componente de transferencia de líquidos 904 y un modulador térmico 908. Opcionalmente, uno o más de dichos componentes se conecta operablemente a un ordenador 900 mediante un servidor (no mostrado en la figura 9). Durante el funcionamiento, el componente de transferencia de líquidos 904 típicamente transfiere mezclas de reacción o componentes de las mismas a un recipiente multipocillo 906. La modulación térmica (por ejemplo el ciclado térmico) típicamente se lleva a cabo con un modulador térmico 908, que comunica térmicamente con un recipiente multipocillo 906. El detector 902 típicamente detecta señales detectables (por ejemplo emisiones fluorescentes) producidas antes, durante y/o después de llevarse a cabo un ensayo de proximidad dado en el sistema. Resultará evidente para el experto en la materia que uno o más componentes del sistema ilustrados esquemáticamente en la figura 9 se fabrican opcionalmente de manera que se encuentran integrados (por ejemplo en la misma carcasa).

VIII. KITS

Las mezclas de reacción o componentes de las mismas (por ejemplo moléculas biológicas) utilizadas en los métodos de la presente invención opcionalmente se empaquetan en kits. En determinadas realizaciones, se marcan diferentes moléculas biológicas incluidas en los kits con fracciones aceptoras espectralmente resolubles, por ejemplo para llevar a cabo determinadas aplicaciones multiplex utilizando estos kits. En algunas realizaciones de dichos kits, únicamente se incluye un tipo de fracción donadora sustancialmente no fluorescente adecuada, de manera que únicamente resulta necesaria una única fuente energética para excitar cada una de las diferentes fracciones aceptoras.

Además, los kits también pueden incluir reactivos convenientemente empaquetados y materiales utilizados para llevar a cabo la síntesis de polímeros biológicos, reacciones de secuenciación de ácidos nucleicos, el seguimiento en tiempo real de la amplificación de ácidos nucleicos u otros ensayos de proximidad, tales como tampones, enzimas, estándares o controles, sales, iones metálicos, cebadores, sondas, nucleótidos extensibles, nucleótidos terminadores, glicerol, dimetilsulfóxido y/o poli-rA, así como instrucciones para llevar a cabo un procedimiento o ensayo particular. En algunas de dichas realizaciones, los kits incluyen además por lo menos una pirofosfatasa (por ejemplo una pirofosfatasa termoestable), por ejemplo utilizados para minimizar la pirofosforólisis y/o la uracilo N-glucosilasa (UNG) y opcionalmente dUTP, por ejemplo para la utilización en aplicaciones en las que la protección frente a la contaminación cruzada resulta deseable. Los componentes de kit, tales como moléculas biológicas, típicamente se proporcionan en uno o más recipientes.

A título ilustrativo adicional, los kits de la invención incluyen muchas realizaciones diferentes para llevar a cabo una amplia diversidad de ensayos y/o reacciones de síntesis. Algunas de dichas aplicaciones también se han descrito anteriormente. En algunas realizaciones, por ejemplo, los kits incluyen inmunoglobulinas marcadas tal como se describe en la presente memoria e instrucciones para detectar la unión de las inmunoglobulinas a epítomos diana como parte de un inmunoensayo dado. Opcionalmente, los kits incluyen lípidos marcados e instrucciones para llevar a cabo un ensayo de proximidad particular utilizando los lípidos, tales como un ensayo de fusión membranar. En determinadas realizaciones, los kits incluyen cebadores e instrucciones para extender los cebadores, por ejemplo en reacciones de secuenciación de ácidos nucleicos o reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. En dichas realizaciones, los cebadores y/o nucleótidos extensibles incluidos opcionalmente, nucleótidos terminadores (por ejemplo dideoxicitosina trifosfato, dideoxiadenosina trifosfato, dideoxiguanosina trifosfato y dideoxitimidina trifosfato) y/o sondas (por ejemplo sondas de hibridación, sondas 5'-nucleasa y sondas en horquilla) se marcan típicamente tal como se describe en la presente memoria. En algunas otras realizaciones ejemplares, los kits incluyen reactivos de síntesis de polímeros biológicos (por ejemplo reactivos de síntesis polipeptídica o reactivos de síntesis de ácidos nucleicos) e instrucciones para sintetizar polímeros biológicos utilizando dichos reactivos.

IX. Ejemplos

Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en la presente memoria se proporcionan únicamente a título ilustrativo y no pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada. También se entiende que el experto en la materia podrá concebir diversas modificaciones o cambios a la luz de los ejemplos y realizaciones descritos en la presente memoria y que deben incluirse dentro del espíritu y alcance de la presente solicitud y alcance según las

reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo I: COMPARACIONES DE FLUORESCENCIA DETECTADA

El presente ejemplo muestra emisiones fluorescentes que se detectaron separadamente de oligonucleótidos marcados con fracciones fluorescentes y oligonucleótidos marcados con fracciones sustancialmente no fluorescentes en diferentes muestras. En particular, la figura 10 es un gráfico de espectros superpuestos obtenidos a partir de escaneos de excitación y emisión de oligonucleótidos marcados con 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 4',5'-dimetoxi-5-carboxifluoresceína (5-DmF) ó 4',5'-dimetoxi-6-carboxifluoresceína (6-DmF). La ordenada del gráfico mostrado en la figura 10 representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm). Tal como se muestra, el gráfico de un escaneo de excitación de oligonucleótidos marcados con 6-FAM obtenido a 515 nm se etiqueta como "6-FAM ex", mientras que el gráfico de un escaneo de emisión de oligonucleótidos marcados con 6-FAM obtenido a 493 nm se etiqueta como "6-FAM em". El gráfico de un escaneo de excitación de oligonucleótidos marcados con 5-DmF obtenido a 545 nm se etiqueta como "5-DmF-ex", mientras que el gráfico de un escaneo de emisión de oligonucleótidos marcados con 5-DmF obtenido a 520 nm se etiqueta como "5-DmF em". El gráfico de un escaneo de excitación de oligonucleótidos marcados con 6-DmF obtenido a 545 nm se etiqueta como "6-DmF ex", mientras que el gráfico de un escaneo de emisión de oligonucleótidos marcados con 6-DmF obtenido a 520 nm se etiqueta como "6-DmF em". A título ilustrativo adicional, la figura 11 es un extracto detallado del gráfico ilustrado en la figura 10 que muestra los espectros superpuestos obtenidos de los escaneos de excitación y de emisión de oligonucleótidos marcados con 5-DmF y 6-DmF, respectivamente. La concentración de los nucleótidos marcados en cada una de las muestras escaneadas respectivas era de 0,15 mM.

Ejemplo II: SÍNTESIS DE REACTIVOS DE SÍNTESIS DE POLÍMEROS BIOLÓGICOS

El presente ejemplo describe una ruta de síntesis representativa para los reactivos de síntesis de polímeros biológicos que comprende fracciones donadoras sustancialmente no fluorescentes. En particular, se describen esquemas sintéticos para 5-dimetoxifluoresceína-DMT-CX-conector-fosforamiditas y 6-dimetoxifluoresceína-DMT-CX-conector-fosforamiditas en el presente ejemplo según una realización de la invención. A modo de visión general, la figura 12 ilustra esquemáticamente determinadas etapas en dicho esquema sintético.

Síntesis de isómeros de 5 y 6-dimetoxifluoresceína (DmF)

Se llevó a cabo la síntesis de DmF según el procedimiento de la patente US nº 4.318.846, titulada "NOVEL ETHER SUBSTITUTED FLUORESCCEIN POLYAMINO ACID COMPOUNDS AS FLUORESCERS AND QUENCHERS", expedida el 9 de marzo de 1982 a Khanna *et al.* Tras el tratamiento final, el producto se purificó mediante cromatografía de columna. Tal como se muestra en la figura 13 (la ordenada representa unidades de absorbancia; la abscisa representa el tiempo de retención (minutos)), el análisis de HPLC de DmF purificado mostraba dos picos debidos a isómeros posicionales, tal como se esperaba. Estos isómeros posicionales se identificaron como 5-DmF y 6-DmF. Además, se determinó la identidad de estos compuestos a partir de los datos de espectroscopía de masas.

Pivalación de isómeros 5-DmF y 6-DmF

A la solución de DmF (200 mg, 0,46 mmoles) en piridina (5 ml) se añadió N,N-diisopropiletilamina (3,0 ml). A continuación, se enfrió la mezcla de reacción en un baño de agua helada durante 20 minutos. A esta mezcla de reacción se añadió cloruro de pivaloil (500 mg, 4,15 mmoles) gota a gota. Tras la adición, la mezcla de reacción se agitó bajo condiciones de enfriamiento durante 5 minutos adicionales. A continuación, se retiró el baño de enfriamiento y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó el solvente bajo presión reducida y después se purificó mediante cromatografía de columna. Ver la figura 14, que es un registro de HPLC que muestra la detección de pivaloil-5-DmF y pivaloil-6-DmF (la ordenada representa unidades de absorbancia; la abscisa representa el tiempo de retención (minutos)). Se confirmó la identidad de estos compuestos mediante análisis espectral de masas.

Pivaloil-5-DmF-DMT-Cx-Conector y pivaloil-6-DmF-DMT-Cx-Conector

A la solución de pivaloil-DmF (220 mg) y DMT-CX-conector (195 mg, preparado en Roche, Penzberg) en DMSO (2 ml) y dimetilformamida (3 ml) se añadió HBTU (3 ml) bajo condiciones de enfriamiento. Aproximadamente 5 minutos después, se añadió diisopropiletilamina (0,4 ml) y se continuó la agitación durante 3 horas bajo condiciones de enfriamiento (temperatura del baño: 0°C a 5°C). Tal como se muestra en la figura 15 (la ordenada representa unidades de absorbancia; la abscisa representa el tiempo de retención (minutos)), no se observó material inicial tras 3 horas. Se eliminaron los solventes en la mezcla de reacción (DMF y DMSO) bajo alto vacío. Se purificó el producto mediante cromatografía de columna (ver el cromatograma de HPLC de la figura 16 (la ordenada representa unidades de absorbancia; la abscisa representa el tiempo de retención (minutos)) y se confirmó mediante análisis espectral de masas. El rendimiento aislado fue de 84% (320 mg).

5-DmF-DMT-Cx-Conector-fosforamidita y 6-DmF-DMT-Cx-Conector-fosforamidita

A la solución de pivaloil-DmF-DMT-CX-Conector (100 mg, 0,095 mmoles) en diclorometano (6 ml) a temperatura ambiente se añadió diisopropiletilamina (300 mg, 0,84 mmoles) y la mezcla de reacción se enfrió a 5°C (temperatura de baño) en agua helada. A la mezcla de reacción se añadió reactivo cianoetil-diisopropilclorofosforamidita (28 mg,

0,12 mmoles) y se continuó la agitación a 5°C. Tras una hora, se añadió un reactivo cianoetil-diisopropilclorofosforamidita adicional (28 mg, 0,12 mmoles) y la mezcla de reacción se dejó a 0°C durante 16 horas adicionales. La figura 17 es un registro de HPLC que muestra la detección del producto tras este periodo de 16 horas. Tal como se muestra en la figura 18 (la ordenada representa unidades de absorbancia; la abscisa representa el tiempo de retención (minutos)), el análisis de HPLC de la mezcla de reacción, tras 18 horas, no mostró material inicial y la aparición de un nuevo pico a los 28 minutos. Se purificó el producto mediante cromatografía de columna flash (rendimiento aislado: 100 mg, 80%) y se confirmó mediante análisis espectral de masas y análisis de RMN ³¹P (ver la figura 19).

Separación de isómeros de dimetoxifluoresceína mediante cromatografía

La figura 20 ilustra esquemáticamente determinadas etapas en un esquema de purificación que se utilizó para separar uno de otro los isómeros 5-dimetoxifluoresceína y 6-dimetoxifluoresceína. Más concretamente, se consiguió la separación de los isómeros de DmF mediante cromatografía de columna flash utilizando una columna C-18 Biotage y TEAA 0,1 M-acetonitrilo como tampón de elución. Las figuras 21 y 22 son cromatogramas que muestran la detección de 5-DmF y 6-DmF, respectivamente (la ordenada representan unidades de absorbancia; la abscisa representa el tiempo de retención (minutos)). Las fracciones correspondientes a 5-DmF y las fracciones correspondientes a 6-DmF se agruparon separadamente y después se liofilizaron. Estos isómeros se confirmaron adicionalmente mediante datos de RMN ¹H [Datos de RMN de 5-DmF: δ8,34 (1H, s, Ar), 8,25 (1H, d, Ar), 7,24 (1H, d, Ar), 6,63 (2H, d, Ar), 6,30 (2H, d, Ar), 3,95 (6H, s, OMe)] y datos de RMN de 6-DmF: δ8,13 (1H, d, Ar), 7,89 (1H, d, Ar), 7,56 (1H, s, Ar), 6,63 (2H, d, Ar), 6,29 (2H, d, Ar), 3,95 (6H, s, OMe)].

Síntesis de 6-dimetoxifluoresceína-DMT-Cx-Conector-fosforamidita

Los métodos para la síntesis de 6-DmF-DMT-CS-conector-fosforamidita son idénticos a los métodos, indicados anteriormente, para 5-DmF-DMT-CX-conector-fosforamidita y 6-DmF-DMT-CX-conector-fosforamidita. En particular, la figura 23 ilustra esquemáticamente determinadas etapas en dicho esquema sintético. Además, las figuras 24 a 26 son registros de HPLC que muestran la detección de pivalato de 6-DmF, 6-DmF-CX-conector y 6-DmF-CX-conector-fosforamidita, respectivamente (la ordenada representa unidades de absorbancia; la abscisa representa el tiempo de retención (minutos)).

Síntesis de 5-dimetoxifluoresceína-DMT-Cx-Conector-fosforamidita

Los métodos para la síntesis de 5-DmF-DMT-CX-conector-fosforamidita son idénticos a los métodos, indicados anteriormente, para 5-DmF-DMT-CX-conector-fosforamidita y 6-DmF-DMT-CX-conector-fosforamidita. En particular, la figura 27 ilustra esquemáticamente determinadas etapas en dicho esquema sintético. Además, las figuras 28 a 29 son registros de HPLC que muestran la detección de 5-DmF y 5-DmF-CX-conector, respectivamente (la ordenada representa unidades de absorbancia; la abscisa representa el tiempo de retención (minutos)).

Ejemplo III: ENSAYOS DE SONDAS DE HIBRIDACIÓN

Se sintetizó una fosforamidita del pigmento dimetoxifluoresceína (DmF) tal como se describe en el Ejemplo II y se incorporó en un oligonucleótido en el extremo 3'. La sonda oligonucleótida o sonda se hibridó con un oligonucleótido diana conjuntamente con una sonda aceptora marcada con LightCycler[®] Red 640 (LC-Red 640). Se realizaron las mediciones de fluorescencia conjuntamente con experimentos de control en los que se examinó la sonda donadora 6-carboxifluoresceína (6-FAM). Los resultados muestran que la sonda donadora con DmF no presentaba fluorescencia detectable. En particular, a llevar a cabo un escaneo de excitación, observando la emisión de fluorescencia del pigmento LC-Red 640 de la sonda aceptora (a 640 nm) durante el escaneo a una longitud de onda de excitación de entre 400 y 630 nm, se observó un pico de excitación aproximadamente a 520 nm, que coincidía con el máximo de absorbancia del pigmento DmF. Lo anterior sugería que el pigmento sustancialmente no fluorescente DmF transfería luz absorbida en forma de energía no fluorescente a LC-Red 640. La intensidad del nuevo pico de excitación era aproximadamente la mitad de la de 6-FAM para uno de los isómeros del pigmento DmF (es decir, 5-DmF). Los gráficos de los espectros superpuestos obtenidos de dichos escaneos de excitación se muestran en la figura 30, en la que la ordenada del gráfico representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm). Tal como se muestra, el registro del escaneo que implicaba la sonda donadora 6-FAM se etiqueta como "6-FAM", mientras que los registros de los escaneos que implicaban las sondas donadoras DmF se etiquetan como "5-DmF" y "6-DmF". A título ilustrativo adicional, la figura 31 es un gráfico de los espectros superpuestos mostrados en la figura 30, en la que los escaneos de excitación de fluorescencia han sido normalizados (es decir, la ordenada del gráfico representa la fluorescencia normalizada, mientras que la abscisa representa la longitud de onda de excitación (nm)).

Al llevar a cabo escaneos de emisión, no se obtuvo ningún a señal de las sondas donadoras marcadas con DmF. En contrate, se detectó una emisión enorme del marcaje de 6-FAM en el experimento de control. Se presenta un gráfico de los espectros superpuestos obtenidos de dichos escaneos en la figura 32, en la que la ordenada del gráfico representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm). En particular, el registro del escaneo de emisión obtenido a una longitud de onda de excitación de 493 nm del ensayo de sonda de hibridación que incluía sondas donadoras marcadas con 6-FAM se etiqueta como "6-FAM". Los

registros para los escaneos obtenidos a las longitudes de onda de excitación de 514 nm de los ensayos que incluían las sondas donadoras marcadas con DmF se etiquetan como "5-DmF" y "6-DmF". A modo de controles negativos también se llevaron a cabo ensayos sin sondas donadoras en las mezclas de reacción. El registro del escaneo de emisión obtenido a una longitud de onda de excitación de 514 nm de uno de dichos ensayos de control se etiqueta como "Control 1", mientras que el registro del escaneo de emisión obtenido a una longitud de onda de excitación de 493 nm de otro de dichos ensayos de control se etiqueta como "Control 2".

Ejemplo IV: ANÁLISIS DE CURVA DE FUSIÓN

Se llevaron a cabo análisis de curva de fusión utilizando parejas de sondas de hibridación que incluían sondas donadoras marcadas con una fracción fluorescente o con una fracción sustancialmente no fluorescente. Más concretamente, un conjunto de ensayos de curva de fusión incluía una pareja de sondas de hibridación en la que la sonda donadora se marcó en el extremo 3' con 6-FAM y la sonda aceptora se marcó en el extremo 5' con CY5.5. Otro conjunto de ensayos incluía una pareja de sondas de hibridación en la que la sonda donadora se marcó en el extremo 3' con 5-DmF y la sonda aceptora, en el extremo 5' con CY5.5. Se utilizó el mismo ácido nucleico diana en cada ensayo con el mismo número de copia, es decir, 100.000 copias. Las curvas de fusión obtenidas en estos análisis se muestran en las figuras 33 y 34, en las que las ordenadas de los gráficos representan la fluorescencia cruda, mientras que la abscisa representa la temperatura (°C). Los registros obtenidos en ensayos que incluían sondas donadoras 6-FAM se etiquetan como "6-FAM", mientras que los registros obtenidos en ensayos que incluían sondas donadoras 5-DmF se etiquetan como "5-DmF". También se llevaron a cabo controles negativos sin sondas donadoras en las mezclas de reacción. Tal como se muestra en las figuras 33 y 34, cada ensayo de curva de fusión se llevó a cabo por duplicado.

Ejemplo V: SEGUIMIENTO POR PCR EN TIEMPO REAL BASADO EN SONDAS DE HIBRIDACIÓN

Las parejas de sondas de hibridación indicadas en el Ejemplo IV también se utilizaron para realizar un seguimiento de reacciones en cadena de la polimerasa. En particular, las curvas de crecimiento obtenidas en estos análisis se muestran en las figuras 35 y 36, en las que las ordenadas de los gráficos representan la fluorescencia cruda, mientras que la abscisa representa el número de ciclo. Los registros obtenidos en ensayos que incluían sondas donadoras 6-FAM se etiquetan como "6-FAM", mientras que los registros obtenidos en ensayos que incluían sondas donadoras 5-DmF se etiquetan como "5-DmF". También se llevaron a cabo controles negativos sin sondas donadoras en las mezclas de reacción. Se utilizó el mismo ácido nucleico diana en cada ensayo con el mismo número de copia, es decir 100.000 copias. Tal como se muestra en las figuras 35 y 36, cada PCR se llevó a cabo por duplicado.

Ejemplo VI: SEGUIMIENTO POR PCR EN TIEMPO REAL BASADO EN SONDAS 5'-NUCLEASA

También se realizó un seguimiento de los ensayos de PCR utilizando sondas 5'-nucleasa que incluían fracciones sustancialmente no fluorescentes o que no presentaban dichas fracciones en las parejas de transferencia energética. Las sondas 5'-nucleasa utilizadas en dichos ensayos se ilustran esquemáticamente en las figuras 37A y 37B. Tal como se muestra en la figura 37A, la sonda 600 (sonda DmF) incluía una fracción desactivadora (Q), es decir, un Black Hole Quencher™ o BHQ™ (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA, USA) en el extremo 5' del ácido nucleico. Además, la sonda 600 también incluía una pareja de transferencia energética (pareja de TE) que incluía DmF (fracción donadora) y CY5.5 (fracción aceptora). La sonda 602 (sonda no DmF), mostrada en la figura 37B, era la misma sonda que la sonda 600, excepto en que la fluoresceína (FL) se había sustituido por DmF en la pareja de TE como la fracción donadora.

Las curvas de crecimiento para diversos ensayos de PCR que incluían la utilización de las sonda 5'-nucleasa, que se ilustran esquemáticamente en las figuras 37A y 37B, se proporcionan en la figura 38. La ordenada del gráfico mostrado en la figura 38 representa la fluorescencia cruda, mientras que la abscisa representa el número de ciclo. La figura 39 es un gráfico de las curvas de crecimiento mostrado en la figura 38, en la que la fluorescencia detectada ha sido normalizada. Tal como se muestra, los registros correspondientes a las reacciones que incluían sondas DmF y 100.000 copias iniciales del ácido nucleico molde se etiquetan como "DmF sonda 100K"; los registros que corresponden a reacciones que incluían sondas DmF y 1.000 copias iniciales del ácido nucleico molde se etiquetan como "DmF sonda 1 K", y los registros correspondientes a reacciones que incluían sondas DmF y 100 copias iniciales del ácido nucleico molde se etiquetan como "DmF sonda 100". Los registros correspondientes a las reacciones que incluían sondas no DmF y 100.000 copias iniciales del ácido nucleico molde se etiquetan como "sonda no DmF 100K"; los registros que corresponden a reacciones que incluían sondas no DmF y 1.000 copias iniciales del ácido nucleico molde se etiquetan como "sonda no DmF 1K", y los registros correspondientes a reacciones que incluían sondas no DmF y 100 copias iniciales del ácido nucleico molde se etiquetan como "sonda no DmF 100". También se llevaron a cabo controles negativos en los que las mezclas de reacción no presentaban ácidos nucleicos molde para ambas sondas 5'-nucleasa. Los registros correspondientes a dichas reacciones de control se etiquetan como "sonda DmF y controles de sonda no DmF". Tal como se muestra en las figuras 38 y 39, cada PCR se llevó a cabo por duplicado.

Ejemplo VII: ENSAYOS ADICIONALES DE Sonda DE HIBRIDACIÓN

El presente ejemplo muestra determinadas características de rendimiento de diversas combinaciones de fracciones donadora y aceptora en parejas representativas de sondas de hibridación. A título ilustrativo, la figura 40 ilustra esquemáticamente las fracciones donadora y aceptora de dichas parejas de sondas de hibridación. Tal como se muestra, la sonda donadora 4000 y la sonda aceptora 4002 se hibridan con el complemento monocatenario 4004. Las sondas donadoras utilizadas en el presente ejemplo incluían FAM, DmF o Dam HEX como fracciones donadoras, mientras que las sondasceptoras utilizadas en el presente ejemplo incluían LC-Red 610, JA-270, CY3.5, CY5 ó CY5.5 como fraccionesceptoras.

Las figuras 41A-D son gráficos de escaneos de emisión (las ordenadas de los gráficos representan la fluorescencia absoluta, mientras que las abscisas representan la longitud de onda (nm)) obtenidos utilizando las sondasceptoras indicadas anteriormente. En particular, la figura 41A es un gráfico de un escaneo de emisión obtenido de una sonda de hibridación marcada con LC-Red 610 y la figura 41B es un gráfico de un escaneo de emisión obtenido de una sonda de hibridación marcada con JA-270. Además, la figura 41C es un gráfico de un escaneo de emisión obtenido de una sonda de hibridación marcada con CY5, mientras que la figura 41D es un gráfico de un escaneo de emisión obtenido de una sonda de hibridación marcada con CY5.5.

La figura 42A es un gráfico de superposición de escaneos de emisión (la ordenada representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm)) obtenido de sondas de hibridación marcadas con FAM, una molécula de DmF (isómero 6-carboxi) (DmF) o dos moléculas de DmF (isómero 6-carboxi) (DmFx2). La longitud de onda de excitación (nm) de cada registro se indica como (ex). La figura 42B es un gráfico de superposición de determinados escaneos de emisión dibujados en la figura 42A, en la que se proporcionan las emisiones fluorescentes relativas.

La figura 43A es un gráfico de superposición de escaneos de excitación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm)) de ensayos de sondas de hibridación que implicaban sondasceptoras marcadas con LC610 (máximo de emisión=604 nm) y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o DmFx2. También se muestran los picos de excitación de FAM, DmF y LC-Red 610. La longitud de onda de emisión (nm) de cada registro se indica como (em). Tal como también se muestra, también se obtuvo un escaneo para un control negativo que incluía únicamente la sonda aceptora (LC-Red 610 únicamente, em=604) en la mezcla de reacción. La figura 43B es un gráfico de superposición de escaneos de emisión (la ordenada representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm)) de dichos ensayos de sondas de hibridación que implicaban sondasceptoras marcadas con LC-Red 610 y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o DmF2. La longitud de onda de excitación (nm) correspondiente a cada registro se indica como (ex). Tal como también se muestra, también se obtuvieron escaneos para controles negativos que incluían únicamente la sonda aceptora en la mezcla de reacción, a una longitud de onda de excitación de 495 nm (LC-Red 610 únicamente, ex=495) y a una longitud de onda de excitación de 515 nm (LC-Red 610 únicamente, ex=515). La figura 43C es un gráfico de superposición de los escaneos de emisión dibujados en la figura 43B, en la que se proporcionan las emisiones fluorescentes relativas.

La figura 44A es un gráfico de superposición de escaneos de excitación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm)) de ensayos de sondas de hibridación que implicaban sondasceptoras marcadas con JA-270 (máximo de emisión=640 nm) y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o DmFx2. También se muestran los picos de excitación de FAM, DmF y JA-270. La longitud de onda de emisión (nm) de cada registro se indica como (em). Tal como también se muestra, se obtuvo un escaneo para un control negativo que incluía únicamente la sonda aceptora (JA-270 únicamente, em=640) en la mezcla de reacción. La figura 44B es un gráfico de superposición de escaneos de emisión (la ordenada representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm)) de dichos ensayos de sondas de hibridación que implicaban sondasceptoras marcadas con JA-270 y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o DmFx2. La longitud de onda de excitación (nm) correspondiente a cada registro se indica como (ex). Tal como también se muestra, también se obtuvieron escaneos para controles negativos que incluían únicamente la sonda aceptora en la mezcla de reacción, a una longitud de onda de excitación de 495 nm (JA-270 únicamente, ex=495) y a una longitud de onda de excitación de 515 nm (JA-270 únicamente, ex=515). La figura 44C es un gráfico de superposición de los escaneos de emisión dibujados en la figura 44B, en la que se proporcionan las emisiones fluorescentes relativas.

La figura 45A es un gráfico de superposición de escaneos de excitación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm)) de ensayos de sondas de hibridación que implicaban sondasceptoras marcadas con CY5 (máximo de emisión=663 nm) y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o DmFx2. También se muestran los picos de excitación de FAM, DmF y CY5. La longitud de onda de emisión (nm) de cada registro se indica como (em). Tal como también se muestra, se obtuvo un escaneo para un control negativo que incluía únicamente la sonda aceptora (CY5 únicamente, em=663) en la mezcla de reacción. La figura 45B es un gráfico de superposición de escaneos de emisión (la ordenada representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm)) de dichos ensayos de sondas de hibridación que implicaban sondasceptoras marcadas con CY5 y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o DmFx2. La longitud de onda de excitación (nm) correspondiente a cada registro se indica como (ex). Tal como también se

muestra, también se obtuvieron escaneos para controles negativos que incluían únicamente la sonda aceptora en la mezcla de reacción, a una longitud de onda de excitación de 495 nm (CY5 únicamente, ex=495) y a una longitud de onda de excitación de 515 nm (CY5 únicamente, ex=515). La figura 45C es un gráfico de superposición de los escaneos de emisión dibujados en la figura 45B, en la que se proporcionan las emisiones fluorescentes relativas.

5 La figura 46A es un gráfico de superposición de escaneos de excitación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm)) de ensayos de sondas de hibridación que implicaban sondas aceptoras marcadas con CY5.5 (máximo de emisión=702 nm) y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o DmFx2. También se muestran los picos de excitación de FAM, DmF y CY5.5. La longitud de onda de emisión (nm) de cada registro se indica como (em). Tal como también se muestra, se obtuvo un escaneo para un control negativo que incluía únicamente la sonda aceptora (CY5.5 únicamente, em=702) en la mezcla de reacción. La figura 46B es un gráfico de superposición de escaneos de emisión (la ordenada representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm)) de dichos ensayos de sondas de hibridación que implicaban sondas aceptoras marcadas con CY5.5 y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o DmFx2. La longitud de onda de excitación (nm) correspondiente a cada registro se indica como (ex). Tal como también se muestra, también se obtuvieron escaneos para controles negativos que incluían únicamente la sonda aceptora en la mezcla de reacción, a una longitud de onda de excitación de 495 nm (CY5.5 únicamente, ex=495) y a una longitud de onda de excitación de 515 nm (CY5.5 únicamente, ex=515). La figura 46C es un gráfico de superposición de los escaneos de emisión dibujados en la figura 46B, en la que se proporcionan las emisiones fluorescentes relativas.

20 La figura 47A es un gráfico de superposición de escaneos de excitación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm)) de ensayos de sondas de hibridación que implicaban sondas aceptoras marcadas con LLC610 (máximo de emisión=604 nm) y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o Dam HEX (es decir, 6-carboxi-aminopentaclorofluoresceína). La longitud de onda de emisión (nm) de cada registro se indica como (em). Tal como también se muestra, se obtuvo adicionalmente un escaneo para un control negativo que incluía únicamente la sonda aceptora (LC-Red 610 únicamente, em=604) en la mezcla de reacción. La figura 47B es un gráfico de superposición de escaneos de emisión (la ordenada representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm)) de dichos ensayos de sondas de hibridación que implicaban sondas aceptoras marcadas con LC-Red 610 y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o Dam HEX. La longitud de onda de excitación (nm) correspondiente a cada registro se indica como (ex). Tal como también se muestra, también se obtuvieron escaneos para controles negativos que incluían únicamente sondas donadoras en las mezclas de reacción (FAM únicamente, ex=495 nm; DMF únicamente, ex=515 nm, y DAM HEX únicamente ex=485 nm).

La figura 48A es un gráfico de superposición de escaneos de excitación (la ordenada representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm)) de dichos ensayos de sondas de hibridación que implicaban sondas aceptoras marcadas con CY3.5 y sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o Dam HEX. La longitud de onda de emisión (nm) de cada registro se indica como (em). Tal como también se muestra, se obtuvo un escaneo para un control negativo que incluía únicamente la sonda aceptora (CY3.5 únicamente, em=605) en la mezcla de reacción. La figura 48B es un gráfico de superposición de escaneos de emisión (la ordenada representa la fluorescencia absoluta, mientras que la abscisa representa la longitud de onda (nm)) de dichos ensayos de sondas de hibridación que implicaban sondas donadoras marcadas con FAM, DmF o Dam HEX. La longitud de onda de excitación (nm) correspondiente a cada registro se indica como (ex). Tal como también se muestra, también se obtuvieron escaneos para controles negativos que incluían únicamente sondas donadoras en las mezclas de reacción (FAM únicamente, ex=495 nm; DMF únicamente, ex=515 nm, y DAM HEX únicamente ex=485 nm).

Aunque la invención ha sido descrita en cierto detalle con fines de claridad y comprensión, resultará evidente para el experto en la materia a partir de una lectura de la presente exposición que pueden llevarse a cabo diversos cambios de forma y detalle sin apartarse del alcance real de la invención. Por ejemplo, todas las técnicas y aparatos indicados anteriormente pueden utilizarse en diversas combinaciones.

REIVINDICACIONES

1. Molécula biológica que comprende por lo menos un oligonucleótido o por lo menos un polinucleótido y por lo menos una fracción donadora sustancialmente no fluorescente, que comprende uno o más de entre: 4',5'-dimetoxi-6-carboxifluoresceína, 4',5'-dimetoxi-5-carboxifluoresceína, 6-carboxi-aminopentaclorofluoresceína ó 5-carboxi-aminopentaclorofluoresceína, siendo capaz dicha fracción donadora no fluorescente de transferir energía no fluorescente a por lo menos una fracción aceptora en el caso de que la fracción aceptora se encuentre suficientemente próxima a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente, de manera que la fracción aceptora emita luz en respuesta a la energía no fluorescente aceptada, en el que los picos de absorbancia de luz visible de la fracción donadora sustancialmente no fluorescente y la fracción aceptora difieren entre sí en aproximadamente 100 nm o más.

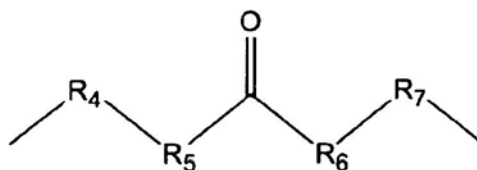
2. Molécula biológica según la reivindicación 1, en la que una proporción entre la emisión fluorescente absoluta detectable de un grupo de 6-carboxifluoresceína y una emisión fluorescente absoluta detectable de dicho grupo donador sustancialmente no fluorescente a concentraciones sustancialmente idénticas de la fracción 6-carboxifluoresceína y de la fracción donadora sustancialmente no fluorescente es de aproximadamente 1.000:1 ó superior.

3. Molécula biológica según la reivindicación 1, en la que la molécula biológica comprende la fracción aceptora.

4. Molécula biológica según la reivindicación 3, en la que la fracción donadora sustancialmente no fluorescente y la fracción aceptora no se encuentran unidos entre sí mediante por lo menos una fracción conectora.

5. Molécula biológica según la reivindicación 3, en la que la fracción donadora sustancialmente no fluorescente y la fracción aceptora se encuentran unidos a la molécula biológica mediante por lo menos una fracción conectora.

6. Molécula biológica según la reivindicación 5, en la que la fracción conectora no presenta la estructura:



en la que R^4 es un alquilo C_{1-5} unido a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente, R^5 se selecciona de entre el grupo que consiste de: NH, S y O, R^6 se selecciona de entre el grupo que consiste de: un alqueno, un dieno, un alquino y un anillo de cinco o seis elementos que presenta por lo menos un enlace insaturado o una estructura de anillos fusionados que se encuentra unida al carbono del carbonilo; y R^7 comprende un grupo funcional que une la fracción conectora a la fracción aceptora.

7. Molécula biológica según la reivindicación 1, en la que el oligonucleótido comprende un ácido nucleico cebador o un ácido nucleico sonda.

8. Molécula biológica según la reivindicación 7, en la que el ácido nucleico sonda comprende una sonda de hibridación, una sonda 5'-nucleasa o una sonda en horquilla.

9. Mezcla de reacción, que comprende por lo menos un nucleótido, por lo menos un ácido nucleico cebador y/o por lo menos un primer ácido nucleico sonda, en la que uno o más de entre el nucleótido, el ácido nucleico cebador o el primer ácido nucleico sonda comprende por lo menos una fracción donadora sustancialmente no fluorescente, según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Mezcla de reacción según la reivindicación 9, en la que el nucleótido, el ácido nucleico cebador o el primer ácido nucleico sonda comprende la fracción aceptora.

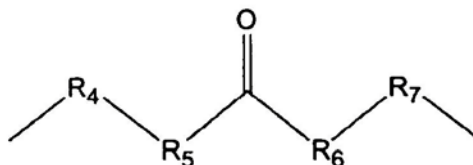
11. Método para detectar una molécula biológica diana que comprende un ácido nucleico diana, comprendiendo el método:

(a) unir por lo menos una molécula biológica sonda a una molécula biológica diana, en la que la molécula biológica sonda comprende por lo menos una fracción donadora sustancialmente no fluorescente, que comprende uno o más de entre: 4',5'-dimetoxi-6-carboxifluoresceína, 4',5'-dimetoxi-5-carboxifluoresceína, 6-carboxi-aminopentaclorofluoresceína ó 5-carboxi-aminopentaclorofluoresceína, y por lo menos una fracción aceptora, aceptando la fracción aceptora energía no fluorescente transferida de la fracción donadora sustancialmente no fluorescente y emitiendo luz en respuesta a la energía no fluorescente aceptada, y

(b) detectar la luz emitida por la fracción aceptora, detectando de esta manera las moléculas biológicas diana que comprenden un ácido nucleico diana.

12. Método según la reivindicación 11, en el que la fracción donadora sustancialmente no fluorescente y la fracción aceptora se encuentran unidos entre sí mediante por lo menos una fracción conectora.

13. Método según la reivindicación 12, en el que la fracción conectora no presenta la estructura:



en la que R₄ es un alquilo C₁₋₅ unido a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente,

R₅ se selecciona de entre el grupo que consiste de NH, S y O, R₆ se selecciona de entre el grupo que consiste de: un alqueno, un dieno, un alquino y un anillo de cinco o seis elementos que presenta por lo menos un enlace insaturado o una estructura de anillos fusionados que se encuentra unida al carbono del carbonilo; y R₇ comprende un grupo funcional que une la fracción conectora a la fracción aceptora.

14. Método según la reivindicación 11, en el que la molécula biológica de sonda comprende un ácido nucleico y una sonda de hibridación, una sonda 5'-nucleasa o una sonda en horquilla.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, que comprende:

(a₁) proporcionar por lo menos una primera y una segunda moléculas biológicas, en las que la primera molécula biológica de sonda comprende por lo menos una fracción donadora sustancialmente no fluorescente, que comprende uno o más de entre: 4',5'-dimetoxi-6-carboxifluoresceína, 4',5'-dimetoxi-5-carboxifluoresceína, 6-carboxi-aminopentaclorofluoresceína ó 5-carboxi-aminopentaclorofluoresceína, y en el que la segunda molécula biológica de sonda comprende por lo menos una fracción aceptora, y

(a₂) unir la primera y segunda moléculas biológicas de sonda a la molécula biológica diana, de manera que la fracción aceptora acepta energía no fluorescente transferida por la fracción donadora sustancialmente no fluorescente y emite luz en respuesta a la energía no fluorescente aceptada.

16. Método según la reivindicación 11 ó 15, en el que la molécula biológica diana comprende un ácido nucleico diana y el método comprende amplificar por lo menos una subsecuencia del ácido nucleico diana antes y/o durante la detección de la luz emitida por la fracción aceptora, detectando de esta manera la molécula biológica diana que comprende un ácido nucleico diana.

17. Método según la reivindicación 15, en el que la primera y/o la segunda moléculas biológicas de sonda comprenden un ácido nucleico y una sonda de hibridación, una sonda 5'-nucleasa o una sonda en horquilla.

18. Método de extensión de un ácido nucleico cebador, comprendiendo el método incubar un ácido nucleico diana con:

(a) por lo menos un nucleótido extensible y/o por lo menos un nucleótido terminador,

(b) por lo menos un catalizador biológico que incorpora nucleótidos, y

(c) por lo menos un ácido nucleico cebador que es por lo menos parcialmente complementario a por lo menos una subsecuencia del ácido nucleico diana, bajo condiciones en las que el catalizador biológico que incorpora nucleótidos extiende el ácido nucleico cebador, produciendo por lo menos un ácido nucleico cebador extendido mediante la incorporación del nucleótido extensible y/o el nucleótido terminador en un extremo terminal del ácido nucleico cebador extendido, en el que el ácido nucleico cebador, el nucleótido extensible y/o el nucleótido terminador comprenden por lo menos una fracción donadora sustancialmente no fluorescente, comprendiendo uno o más de entre: 4',5'-dimetoxi-6-carboxifluoresceína, 4',5'-dimetoxi-5-carboxifluoresceína, 6-carboxi-aminopentaclorofluoresceína ó 5-carboxi-aminopentaclorofluoresceína, siendo capaz dicho grupo donador no fluorescente de transferir energía no fluorescente a por lo menos una fracción aceptora en el caso de que la fracción aceptora se encuentre suficientemente próxima a la fracción donadora sustancialmente no fluorescente para que la fracción aceptora emita luz en respuesta a la energía no fluorescente absorbida, extendiendo de esta manera el ácido nucleico cebador.

19. Método según la reivindicación 18, en el que el ácido nucleico cebador, el nucleótido extensible y/o el nucleótido terminador comprenden la fracción aceptora.

20. Kit, que comprende por lo menos una primera molécula biológica según cualquiera de las reivindicaciones 1

a 8.

21. Sistema, que comprende:

(a) por lo menos un recipiente y/o soporte sólido que comprende por lo menos una molécula biológica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8,

5 (b) por lo menos una fuente de radiación que se encuentra configurada para dirigir radiación electromagnética a la fracción donadora, y

(c) por lo menos un componente de detección que se encuentra configurado para detectar la luz emitida por la fracción aceptora en el caso de que ésta se encuentre suficientemente próxima a dicha fracción donadora sustancialmente no fluorescente.

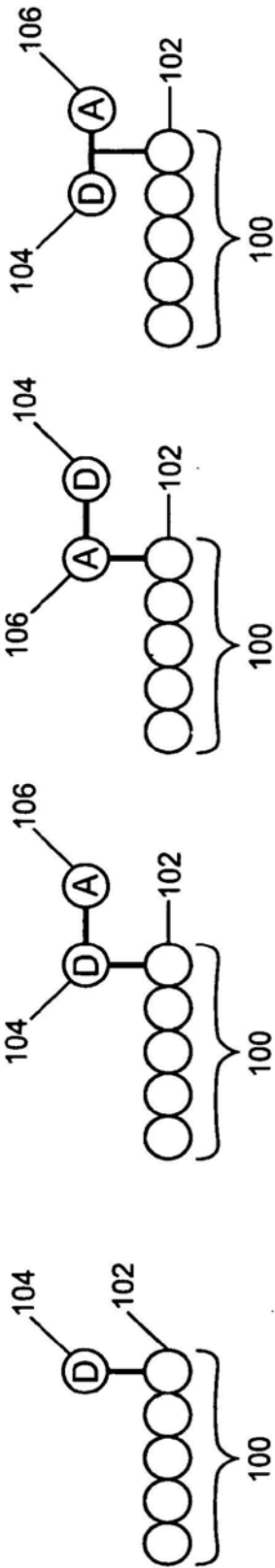


Fig. 1A

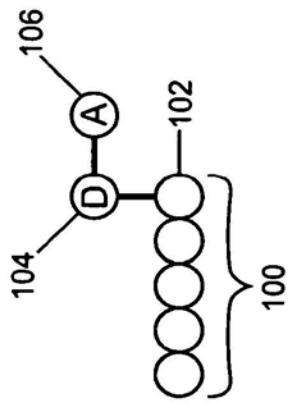


Fig. 1B

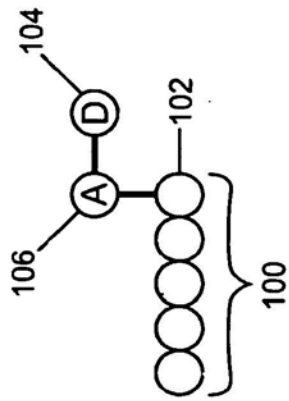


Fig. 1C

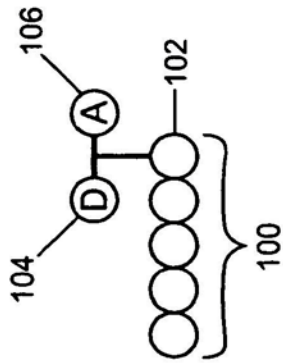


Fig. 1D

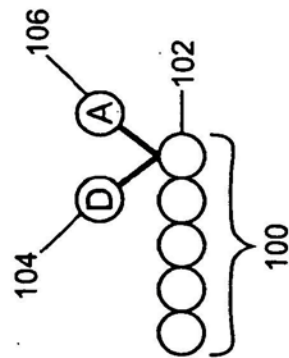


Fig. 1E

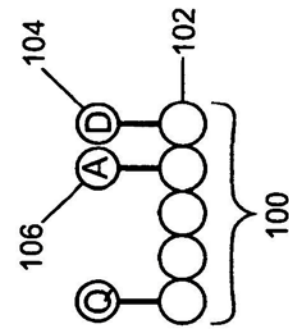


Fig. 1F

Fig. 1

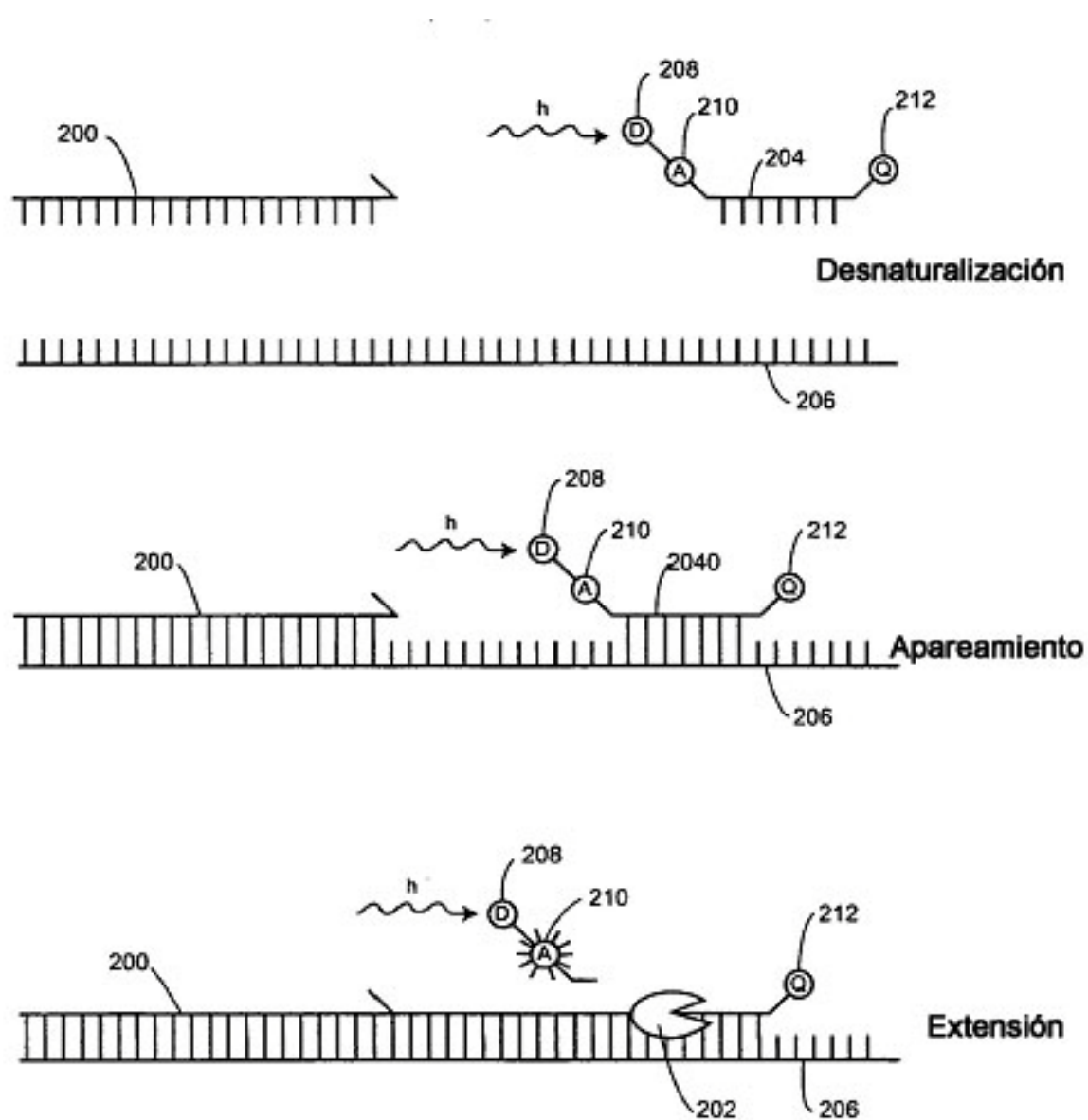


Fig. 2

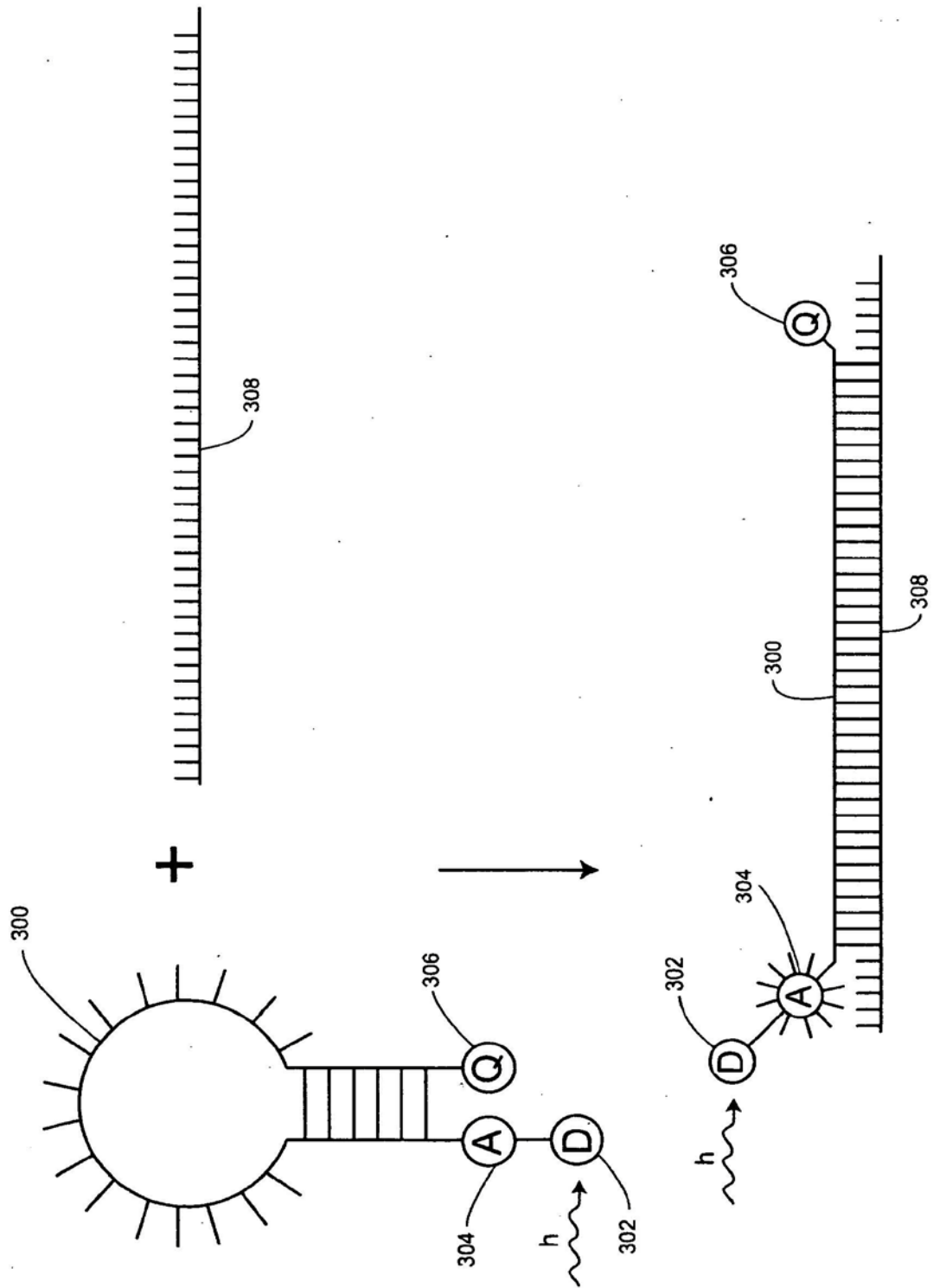


Fig. 3

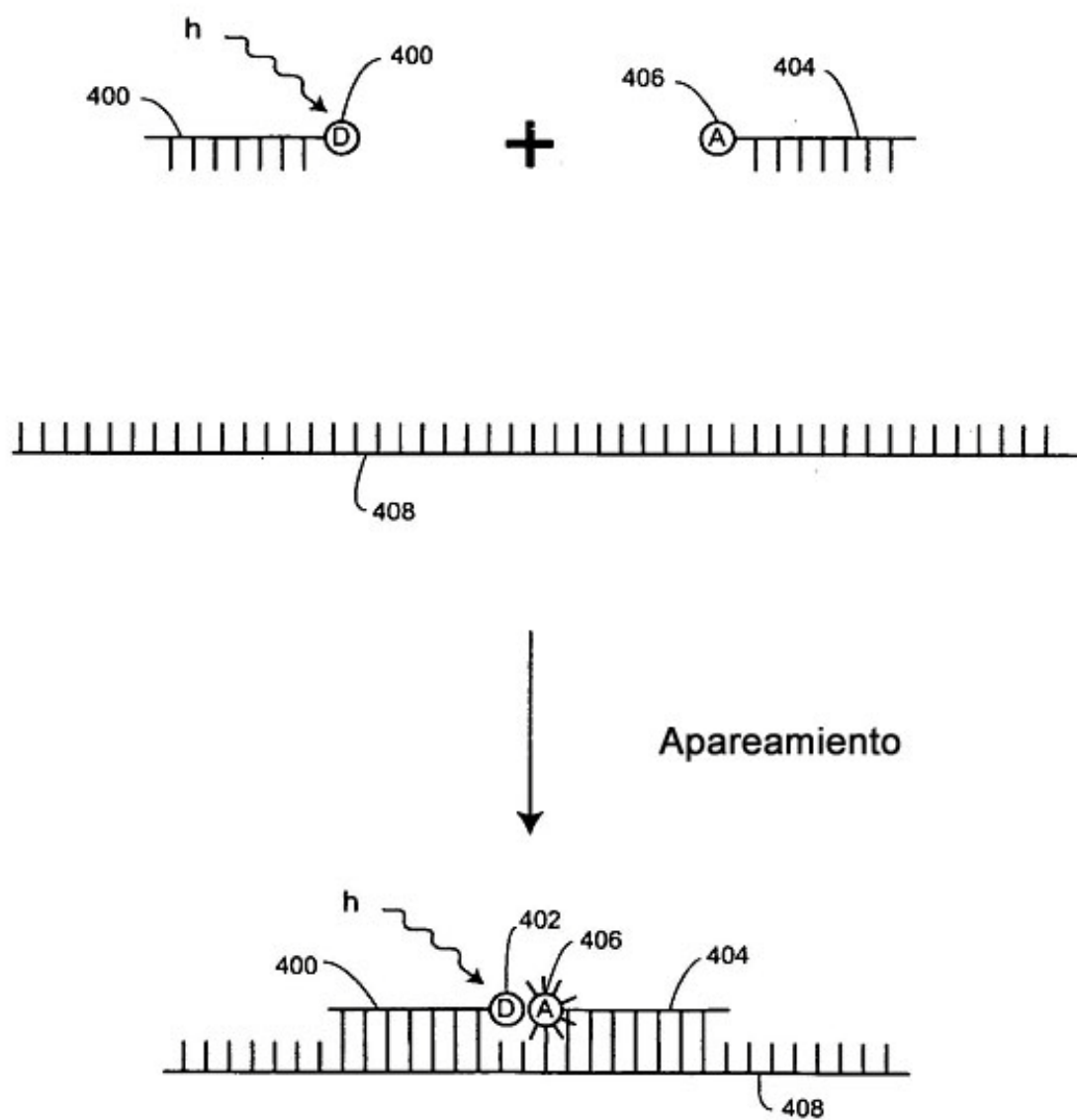


Fig. 4

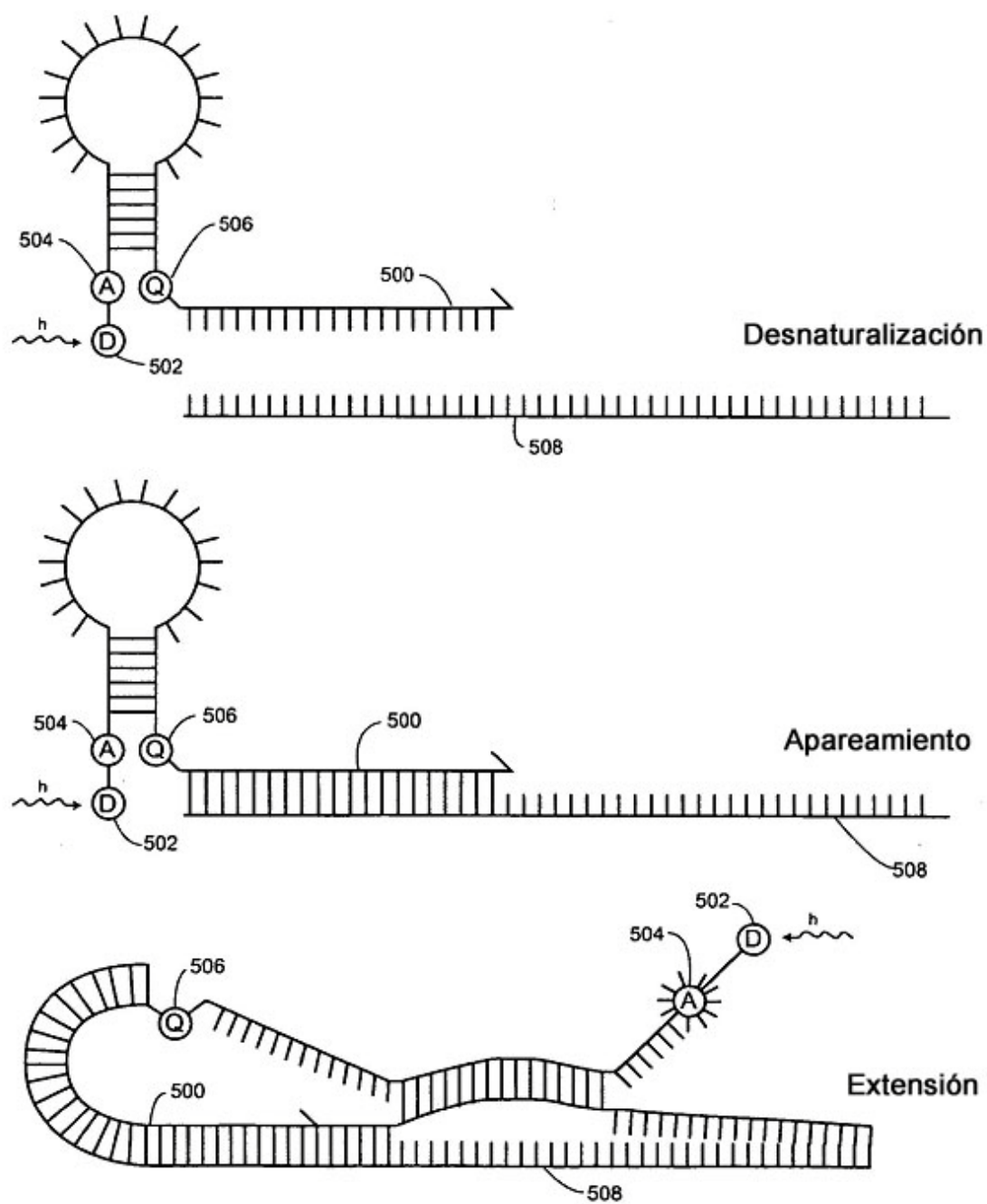


Fig. 5

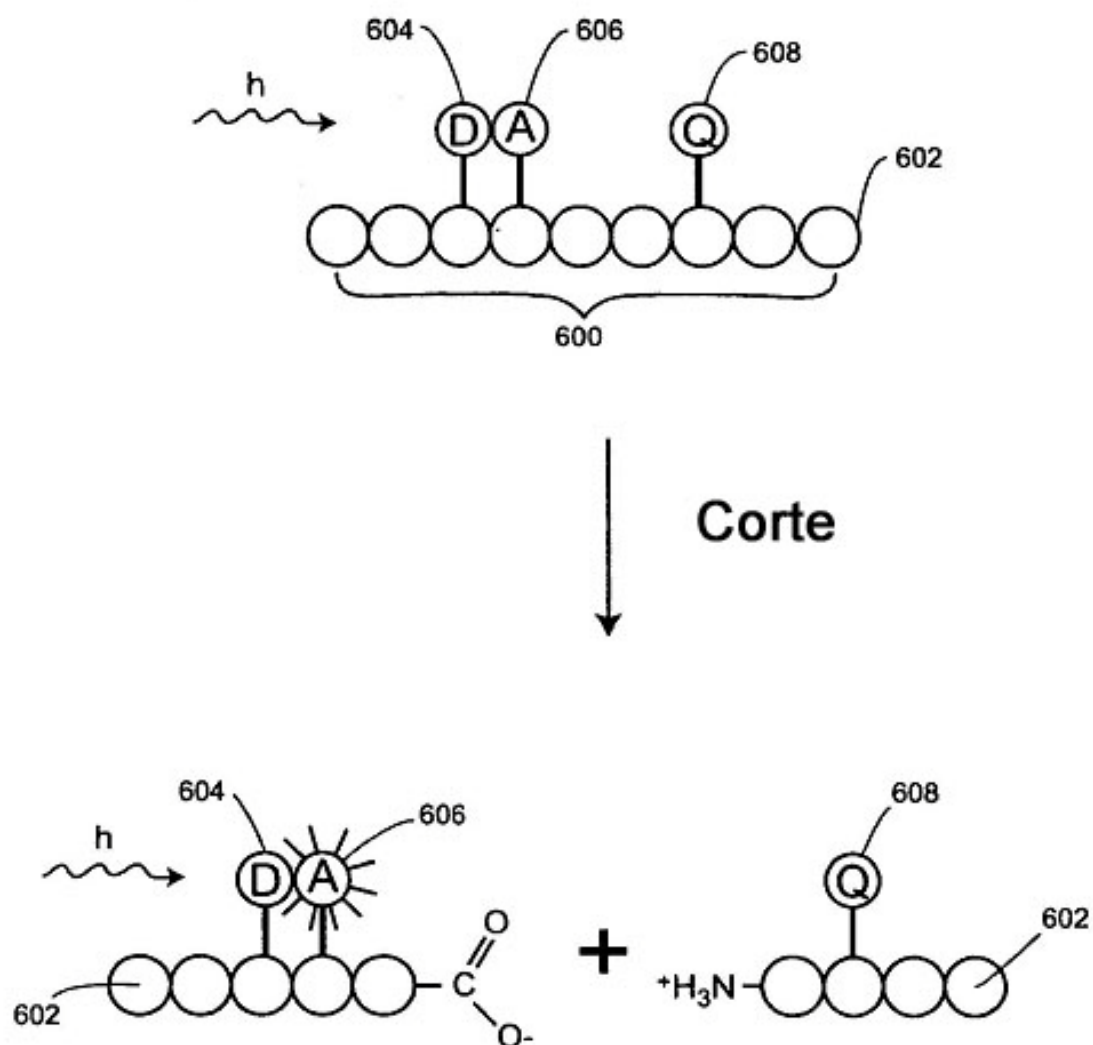


Fig. 6

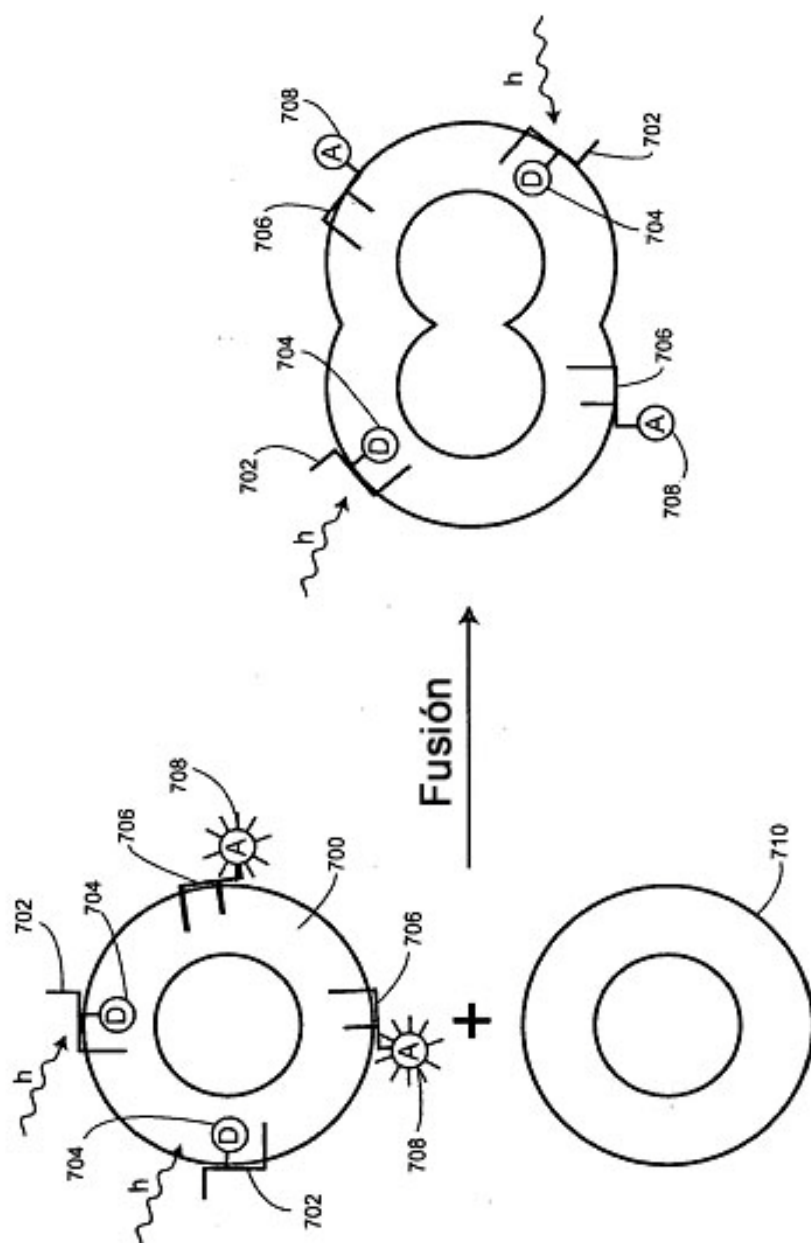


Fig. 7

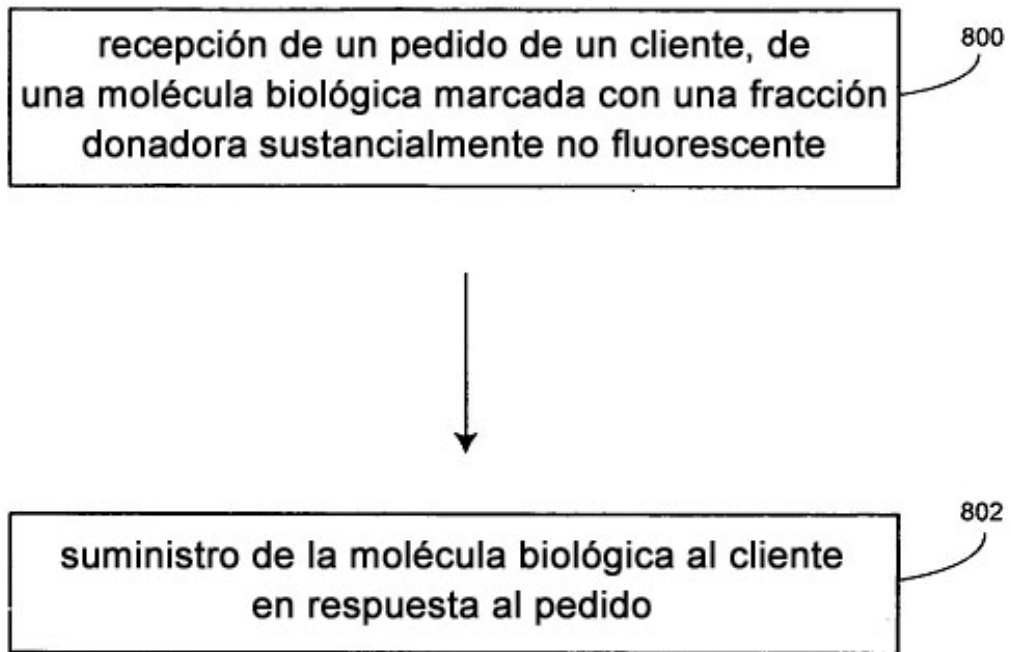


Fig. 8

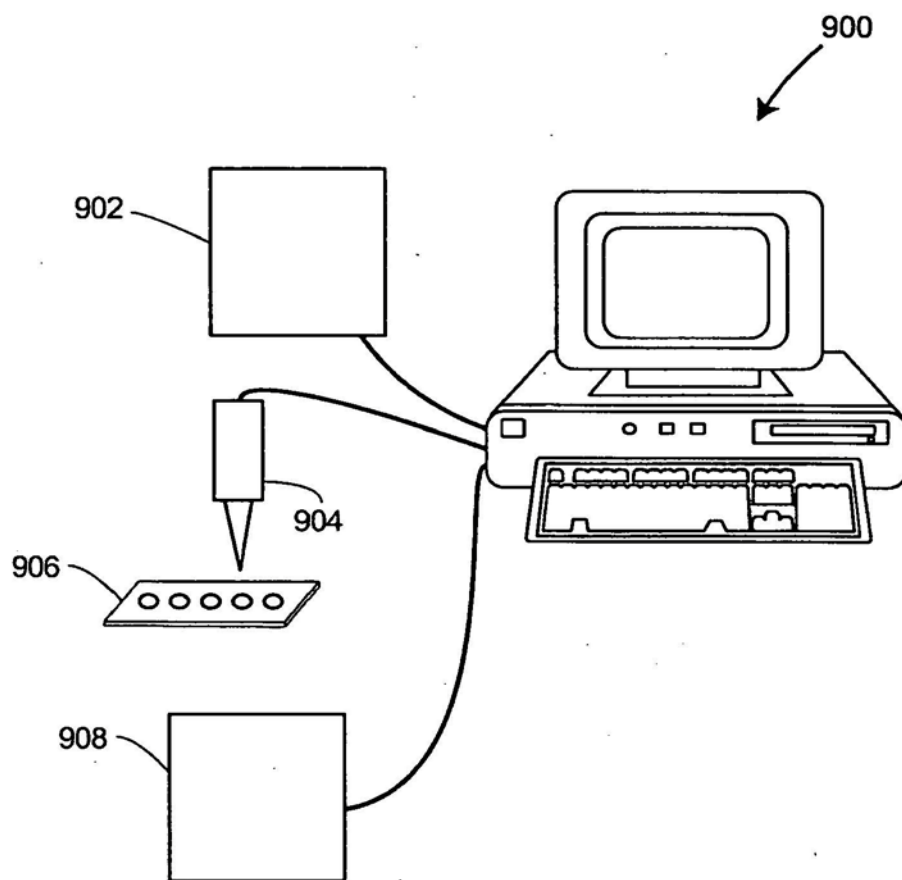


Fig. 9

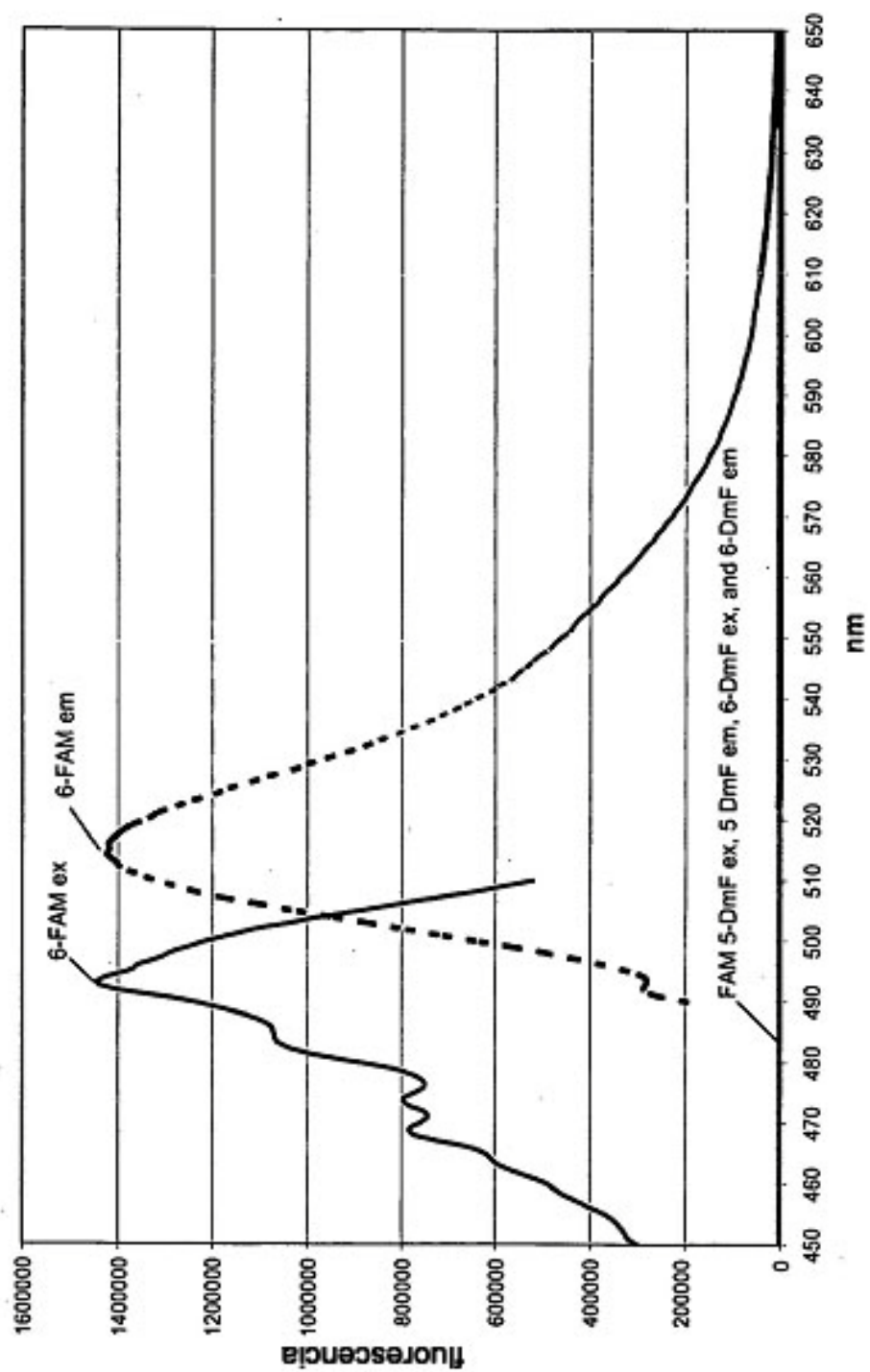


Fig. 10

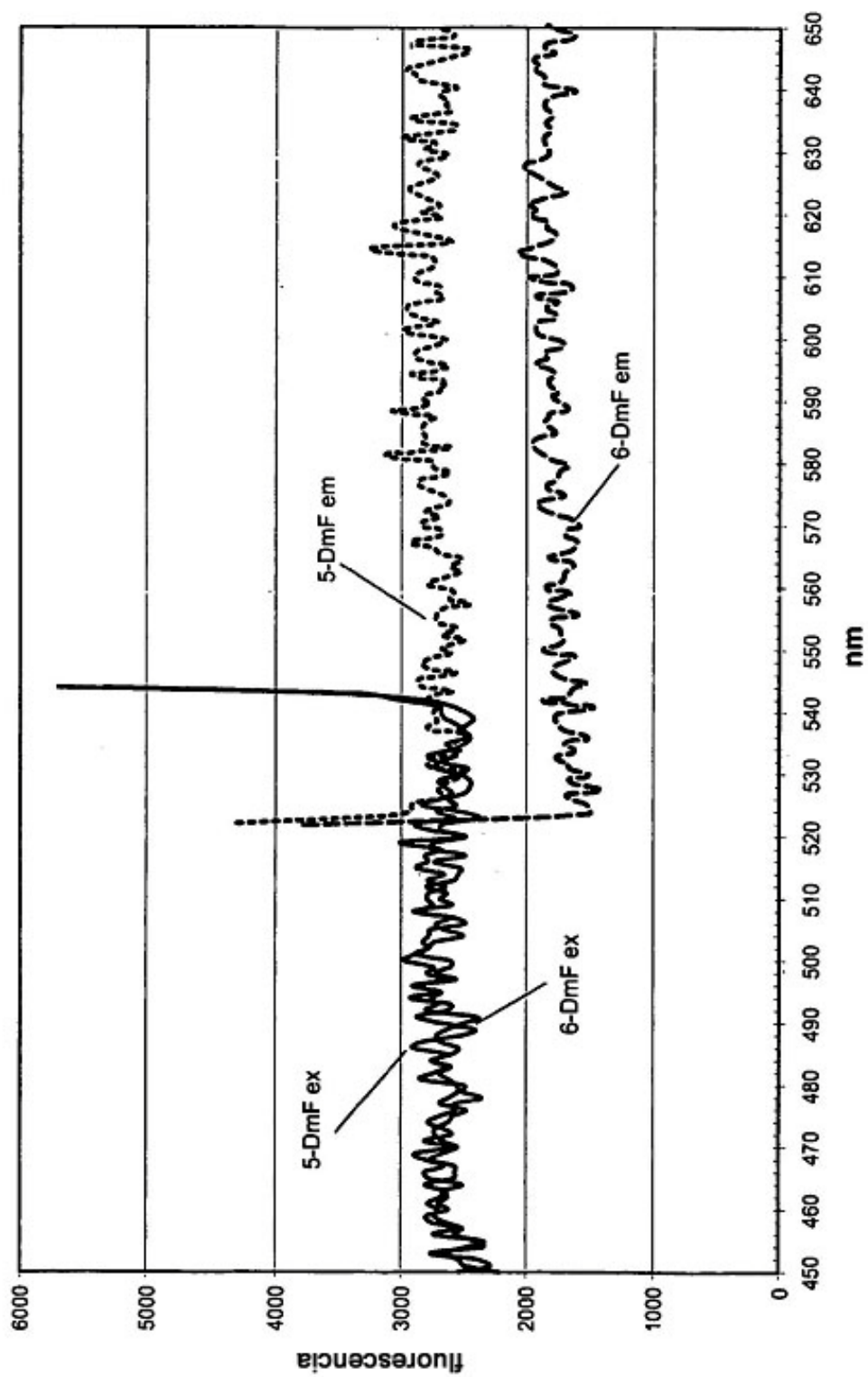


Fig. 11

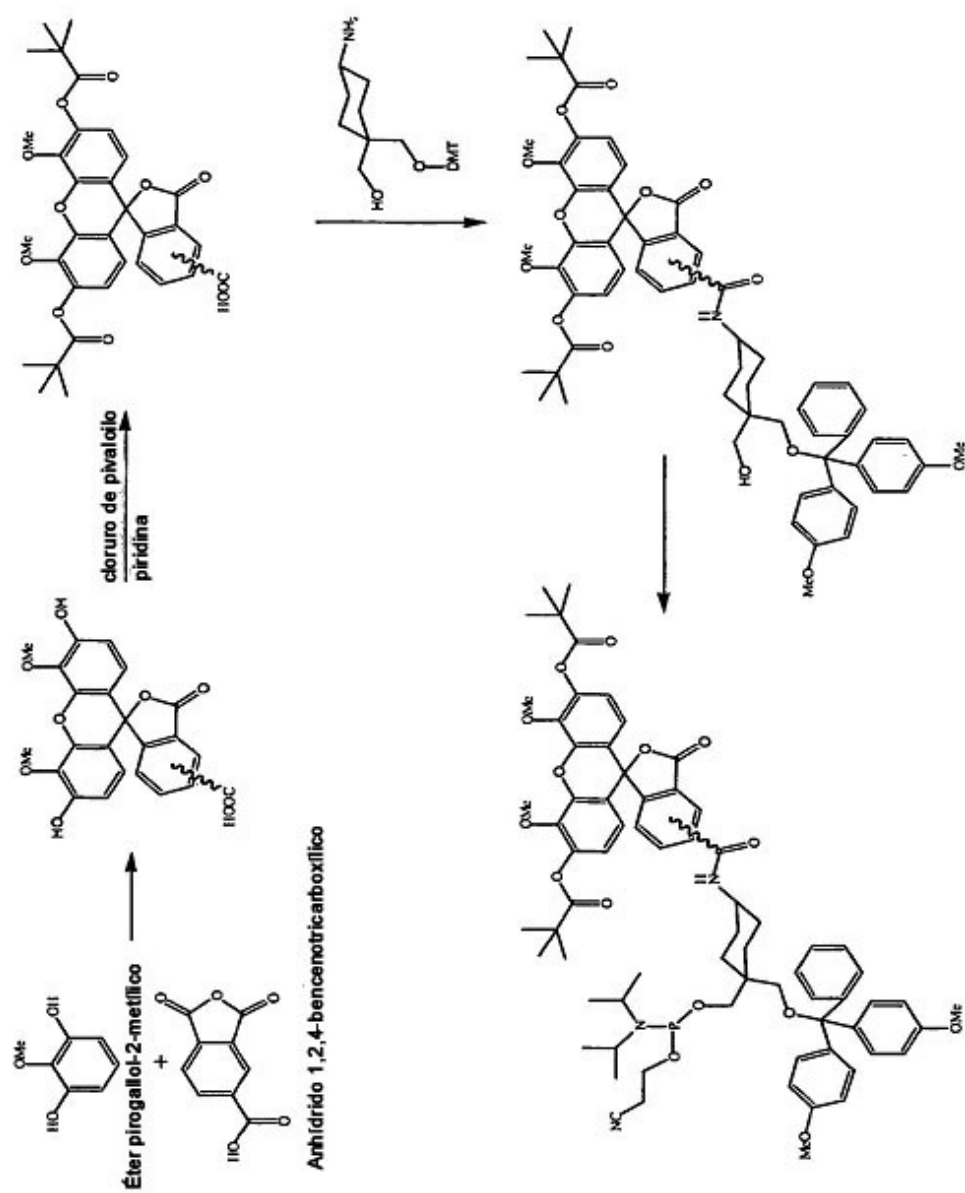


Fig. 12

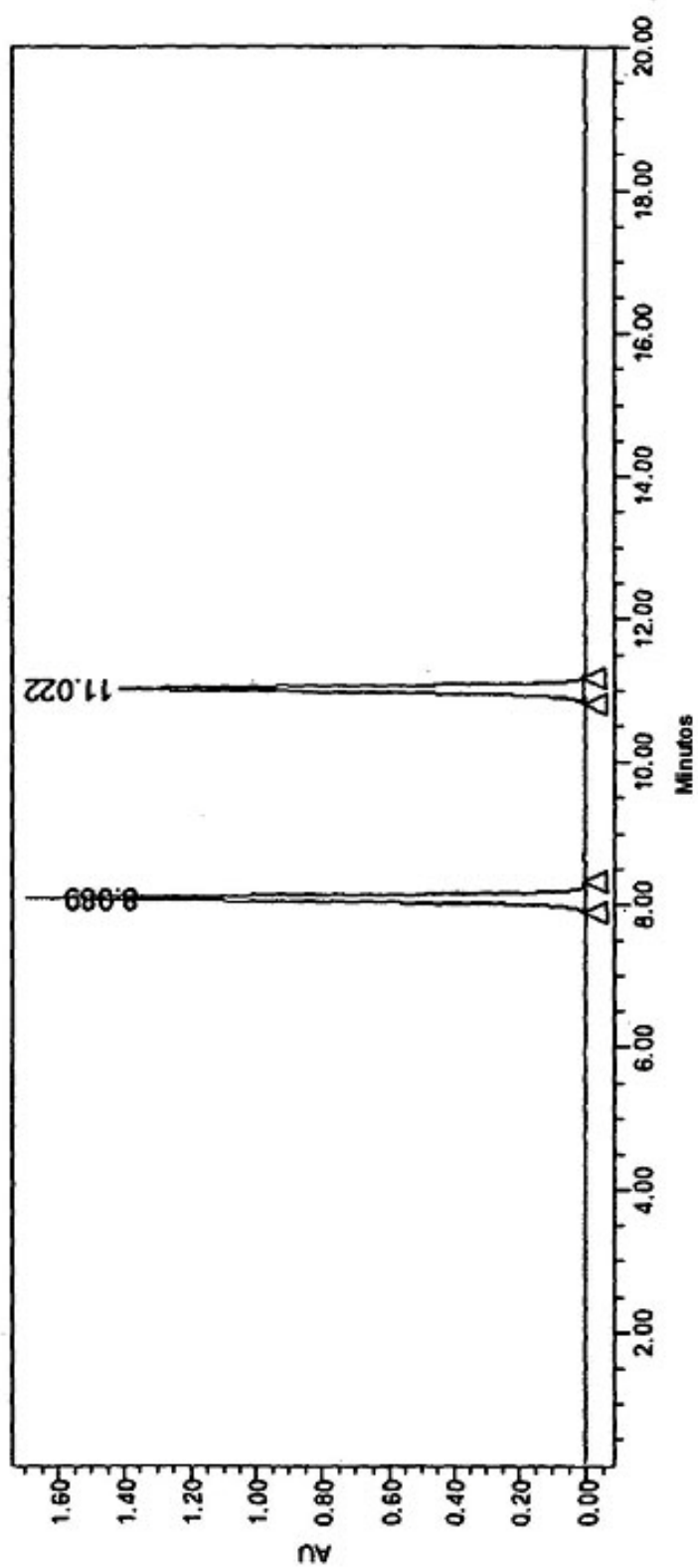


Fig. 13

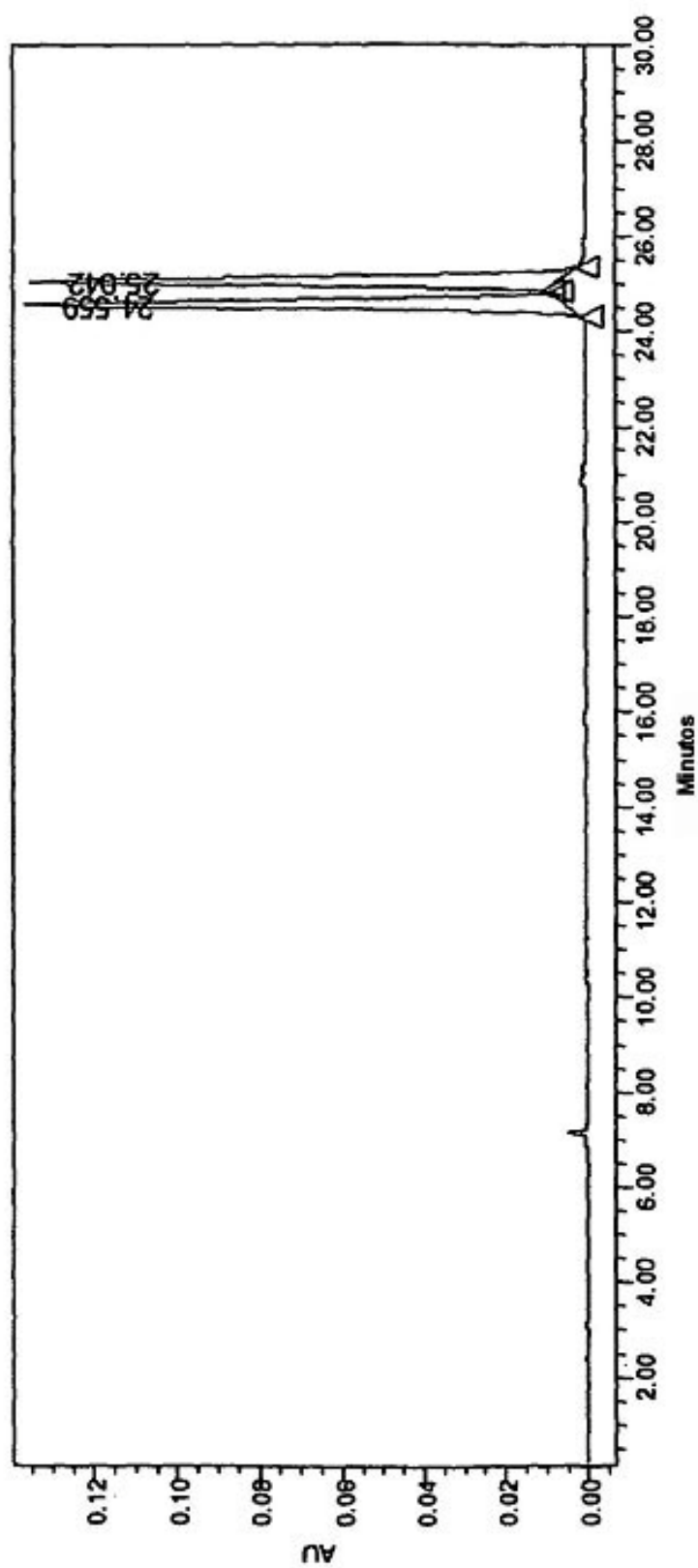


Fig. 14

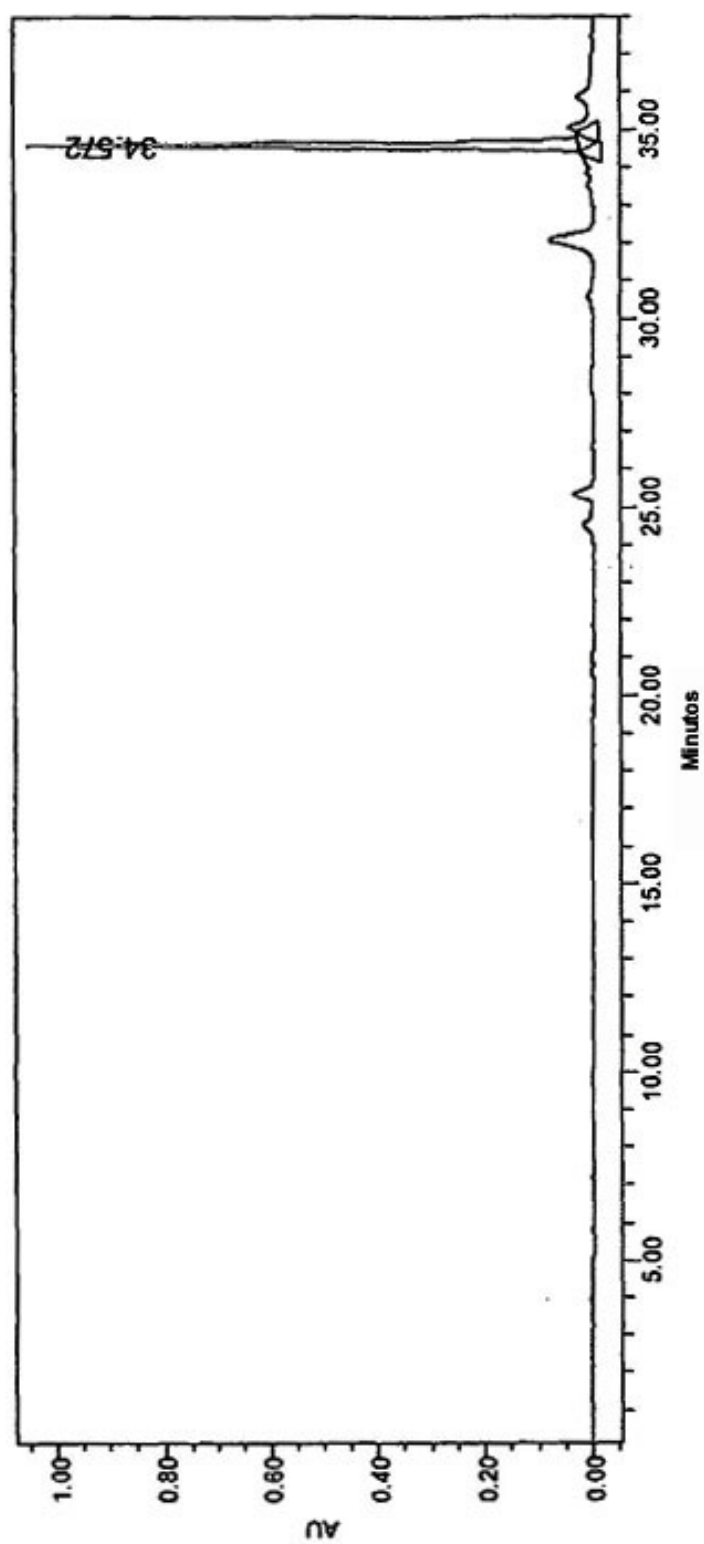


Fig. 15

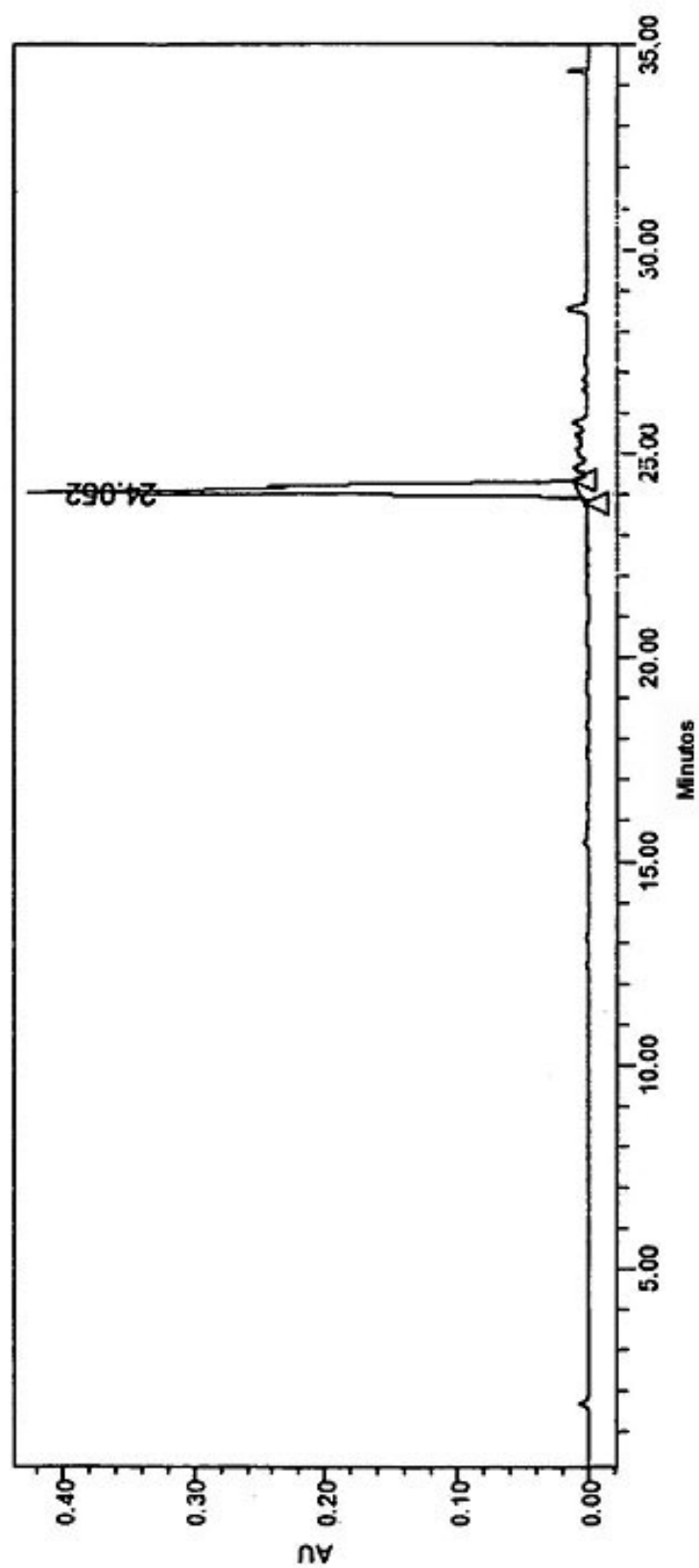


Fig. 16

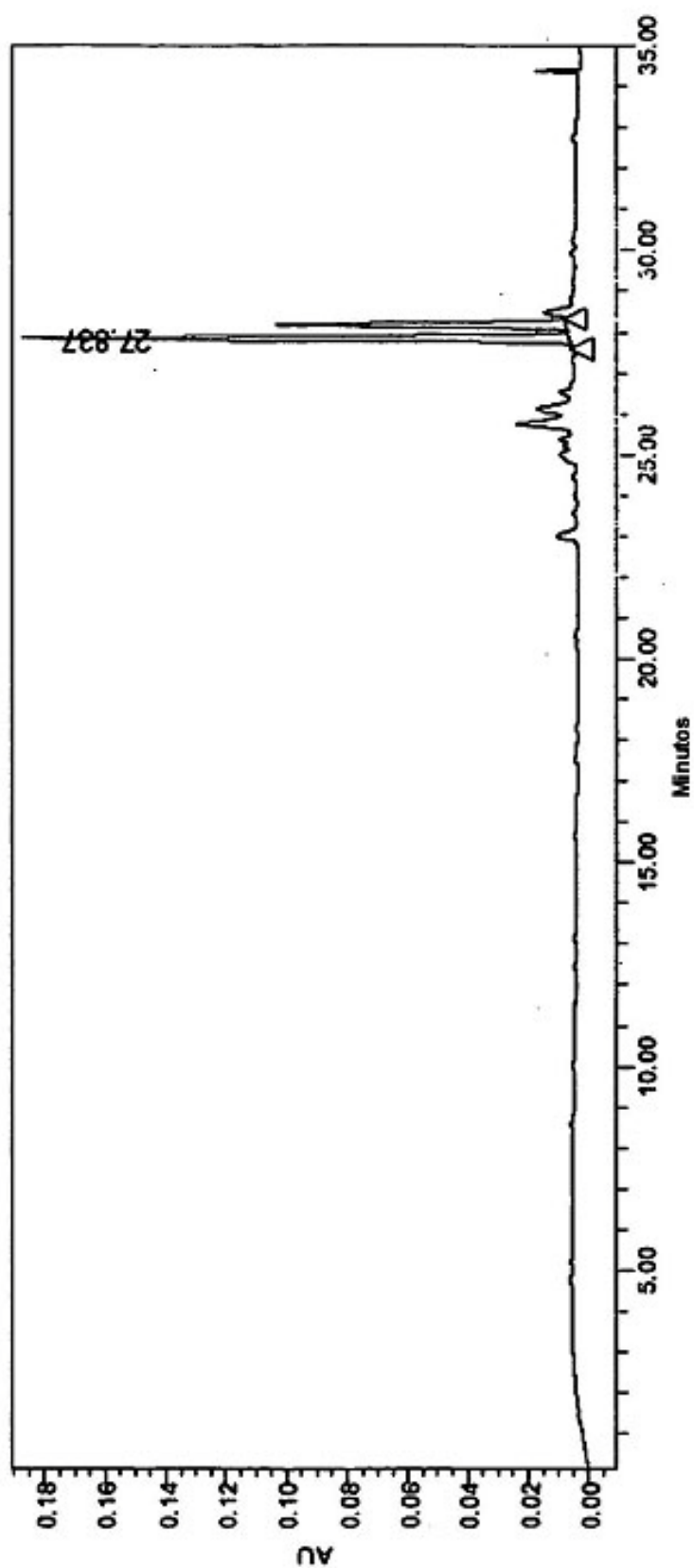


Fig. 17

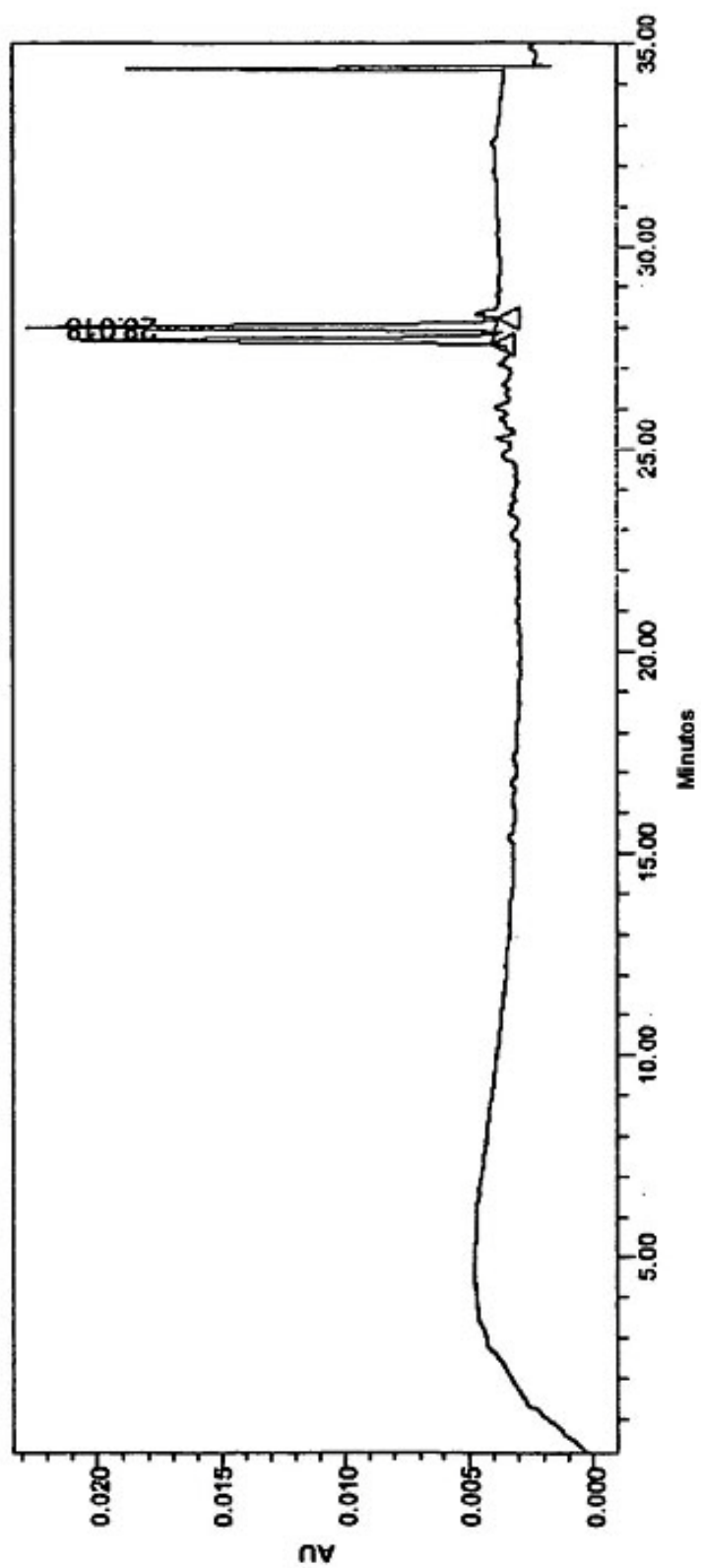


Fig. 18

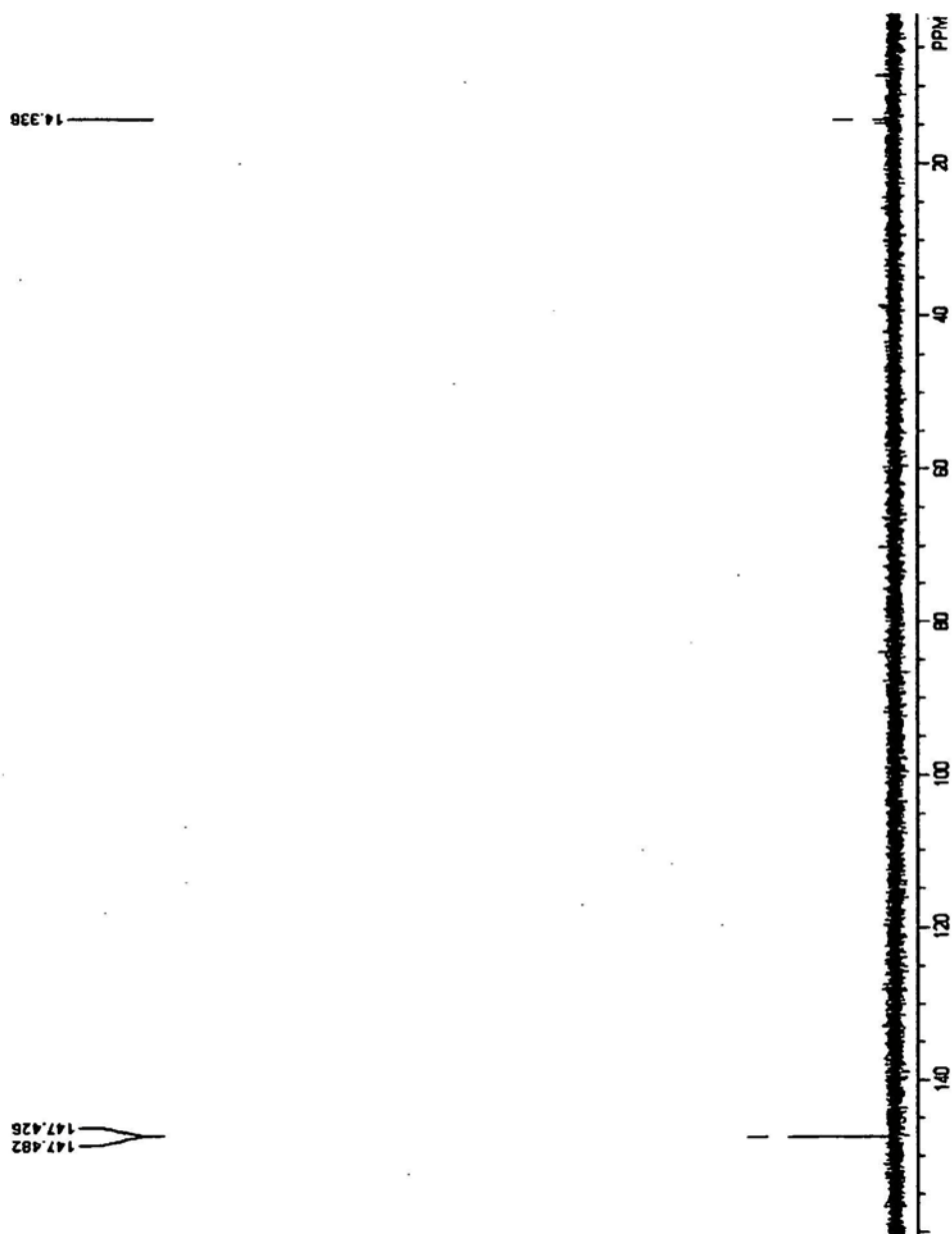


Fig. 19

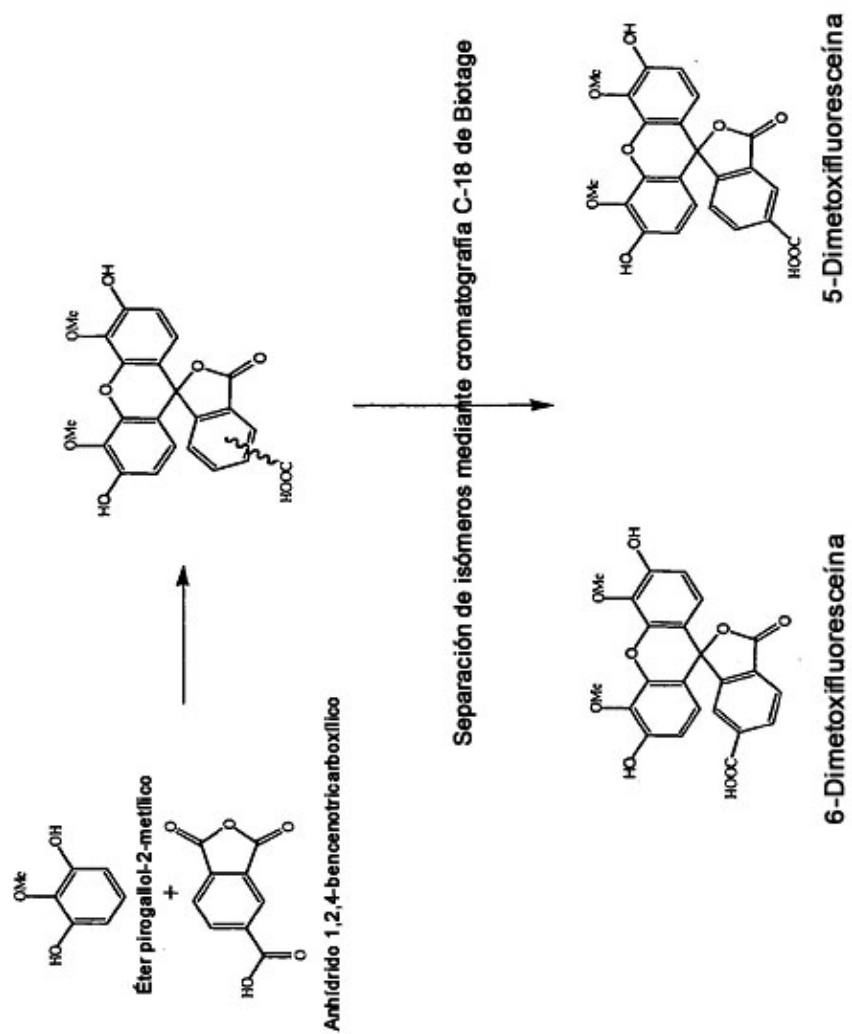


Fig. 20

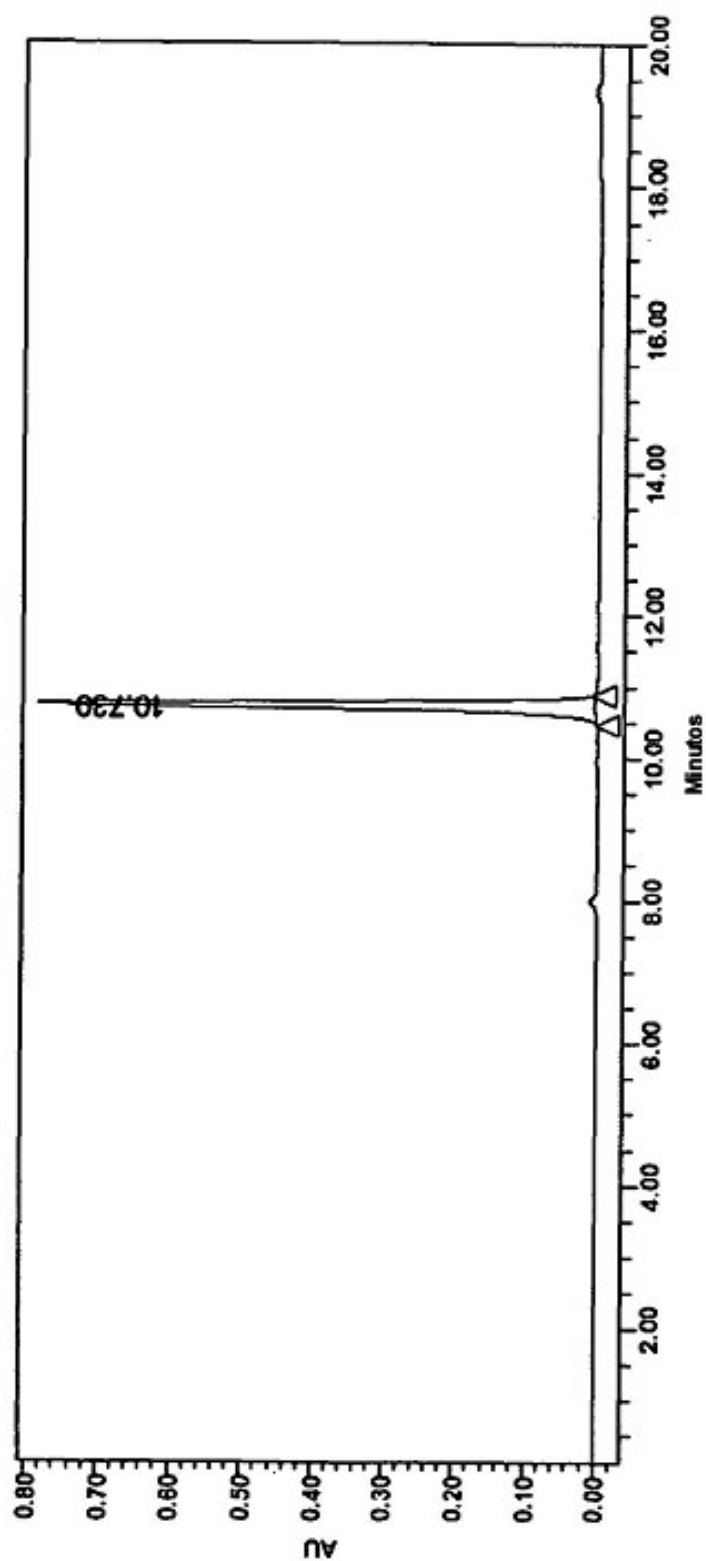


Fig. 21

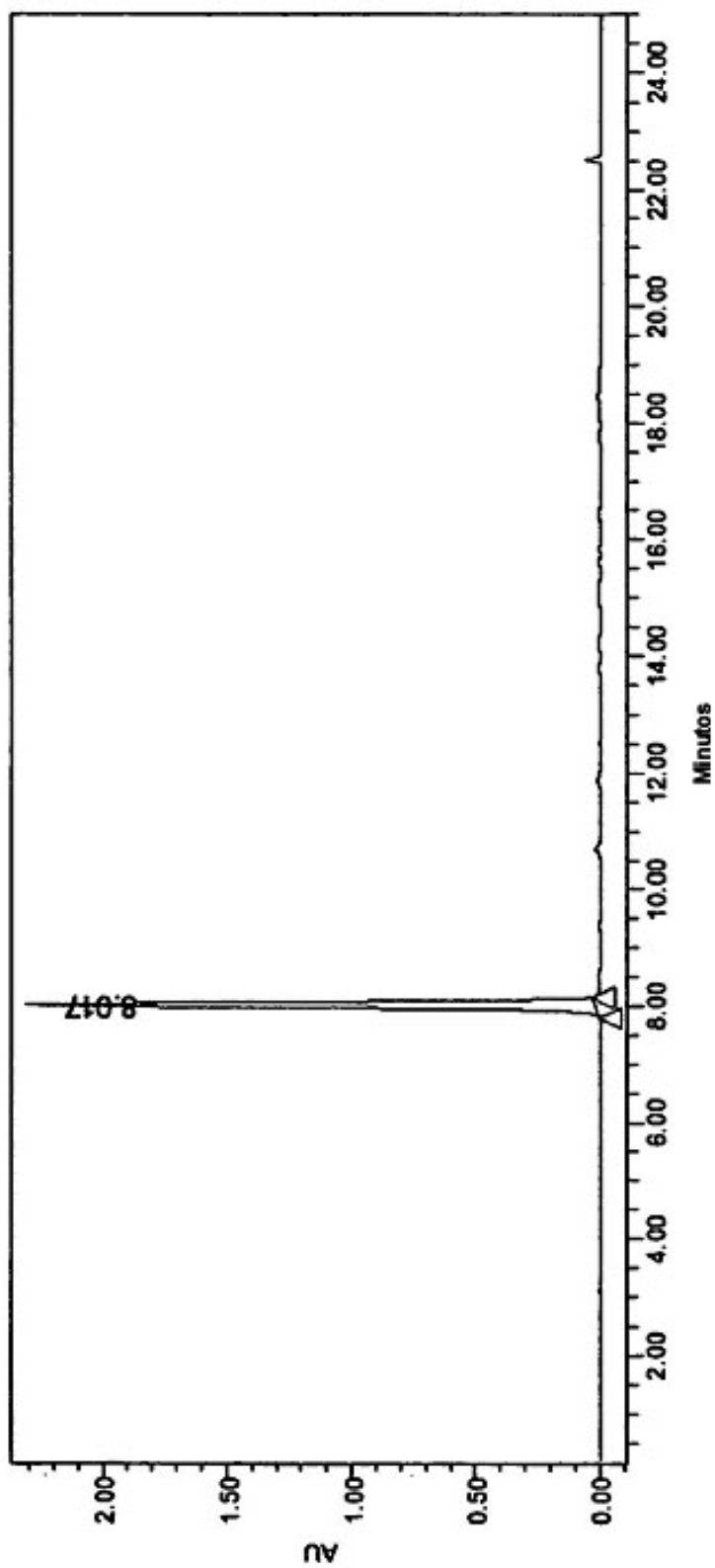


Fig. 22

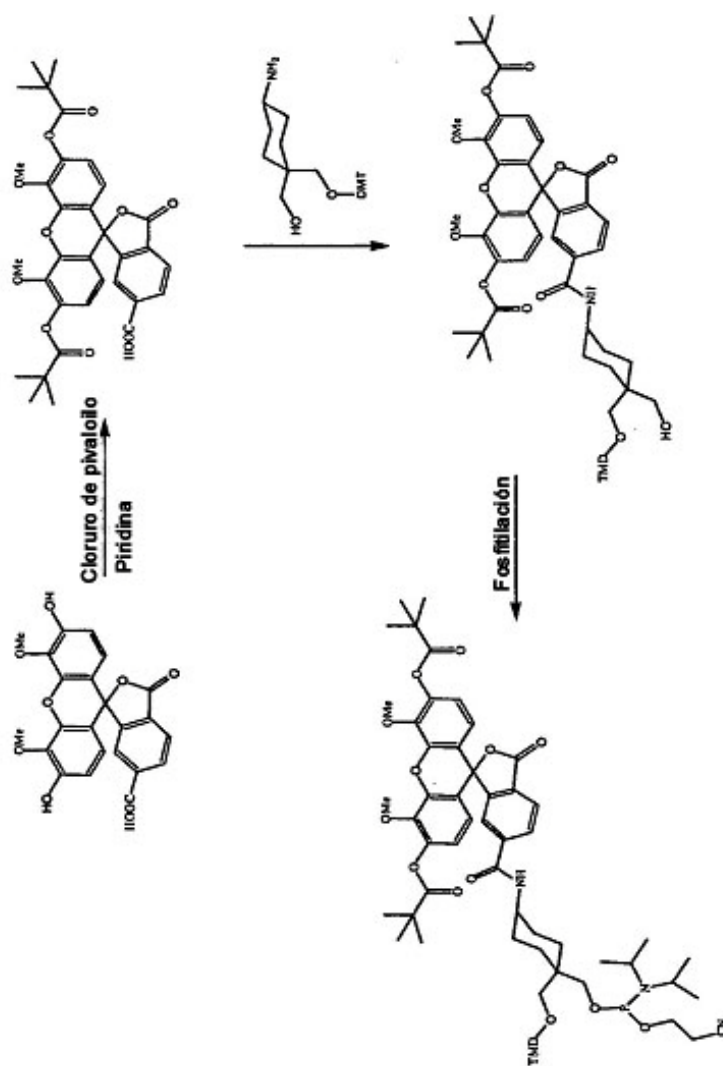


Fig. 23

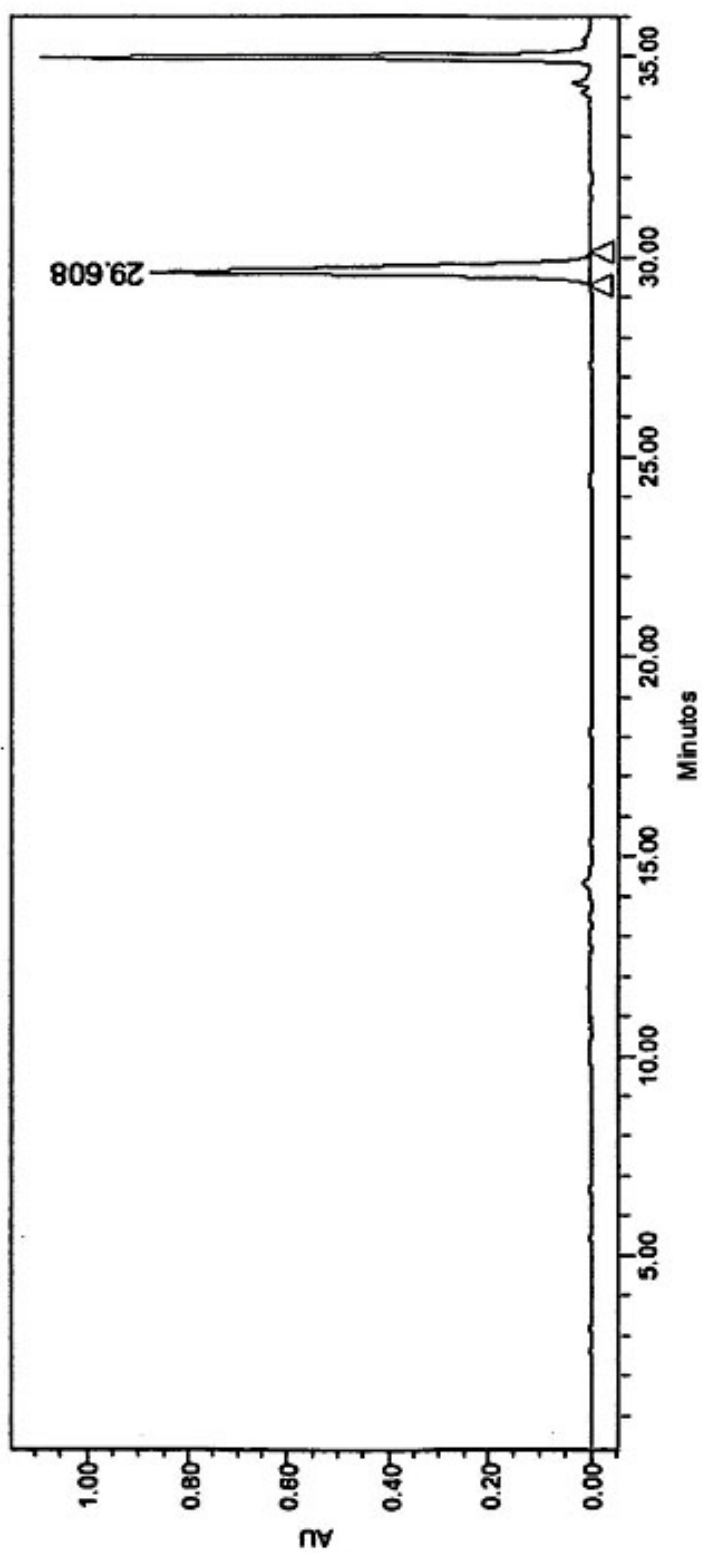


Fig. 24

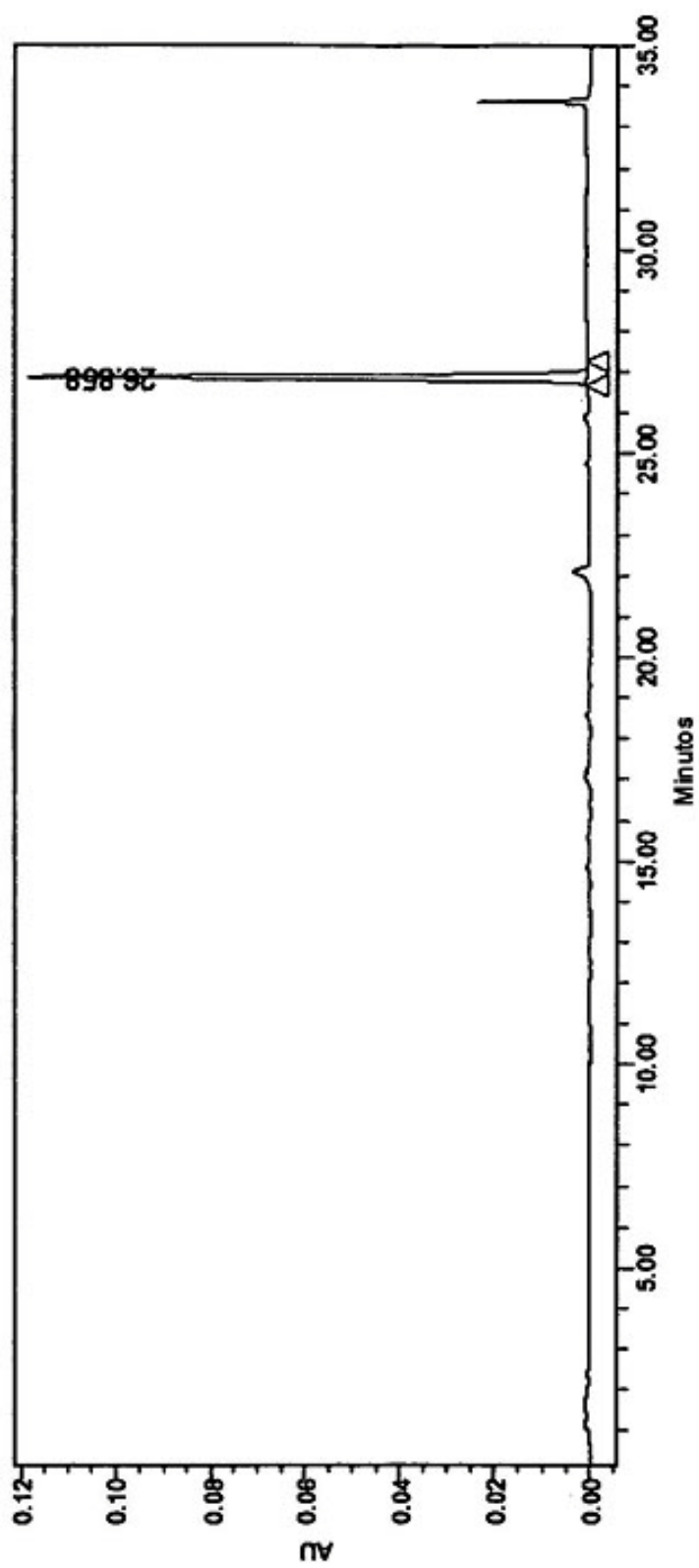


Fig. 25

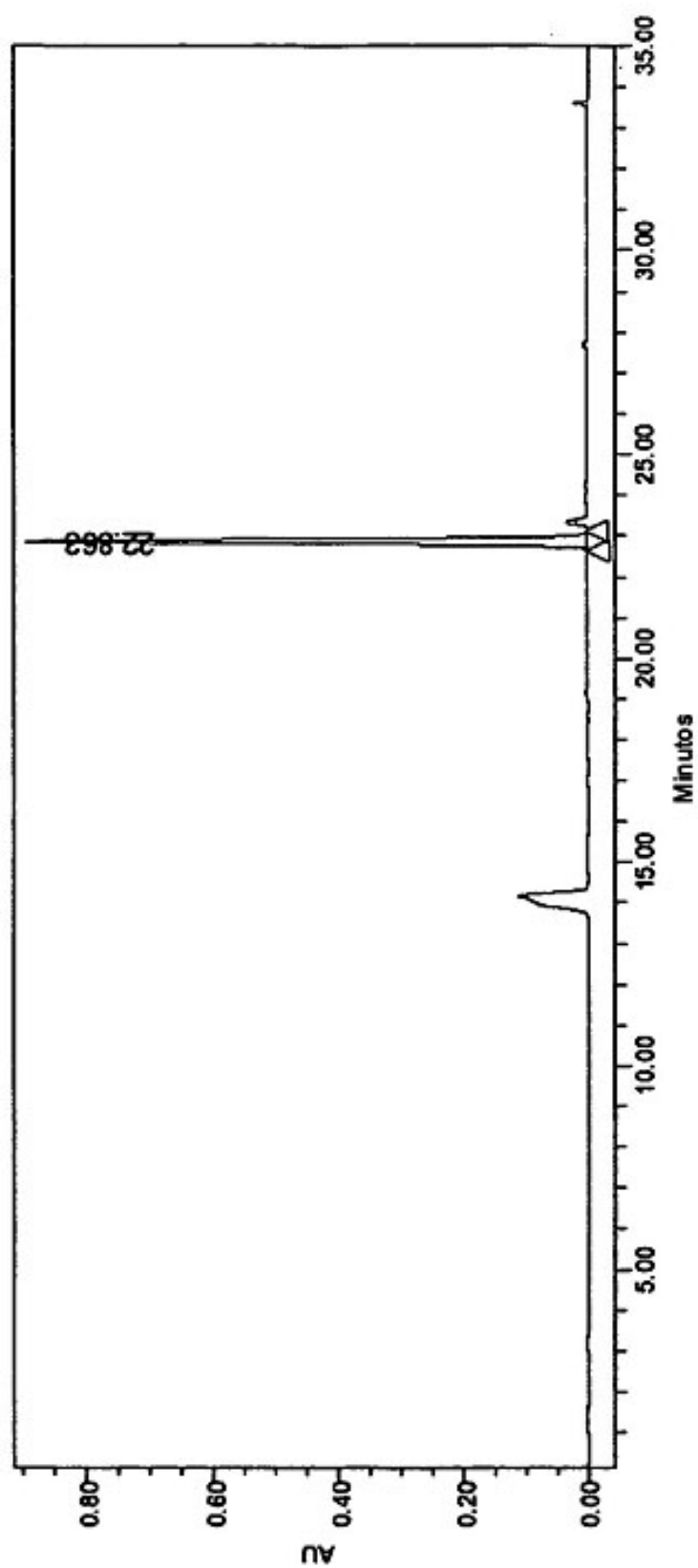


Fig. 26

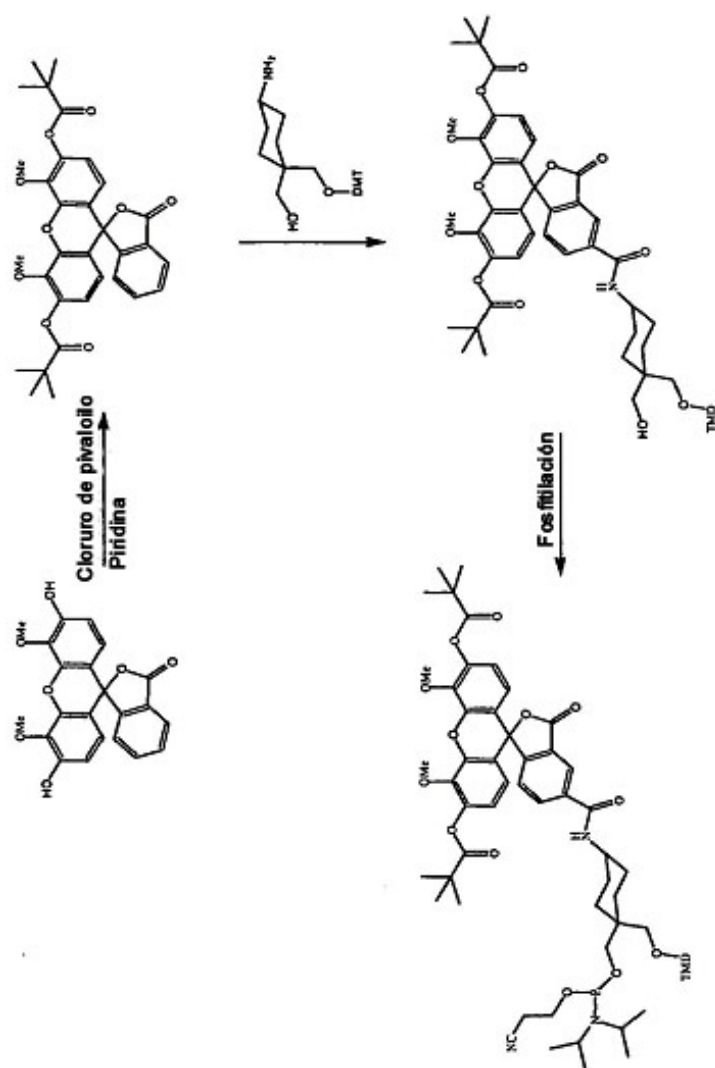


Fig. 27

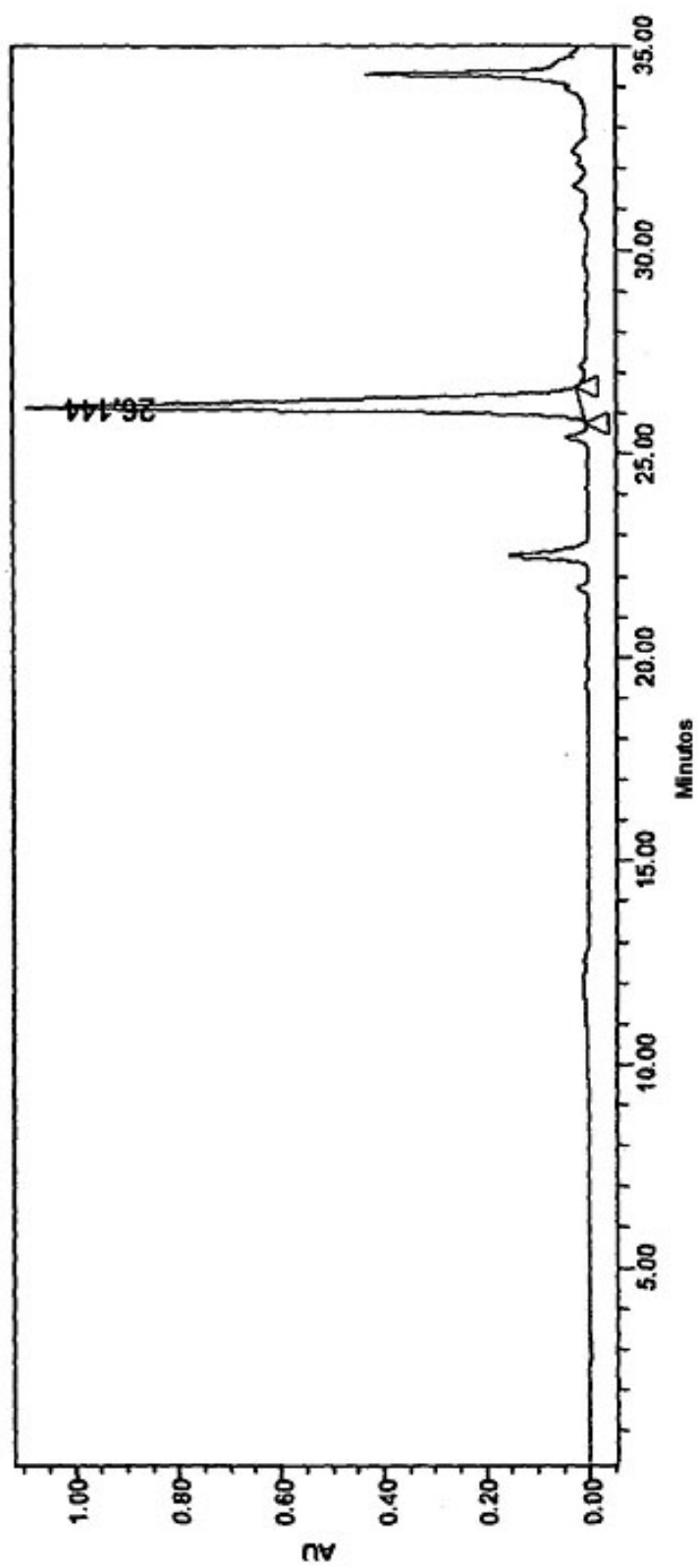


Fig. 28

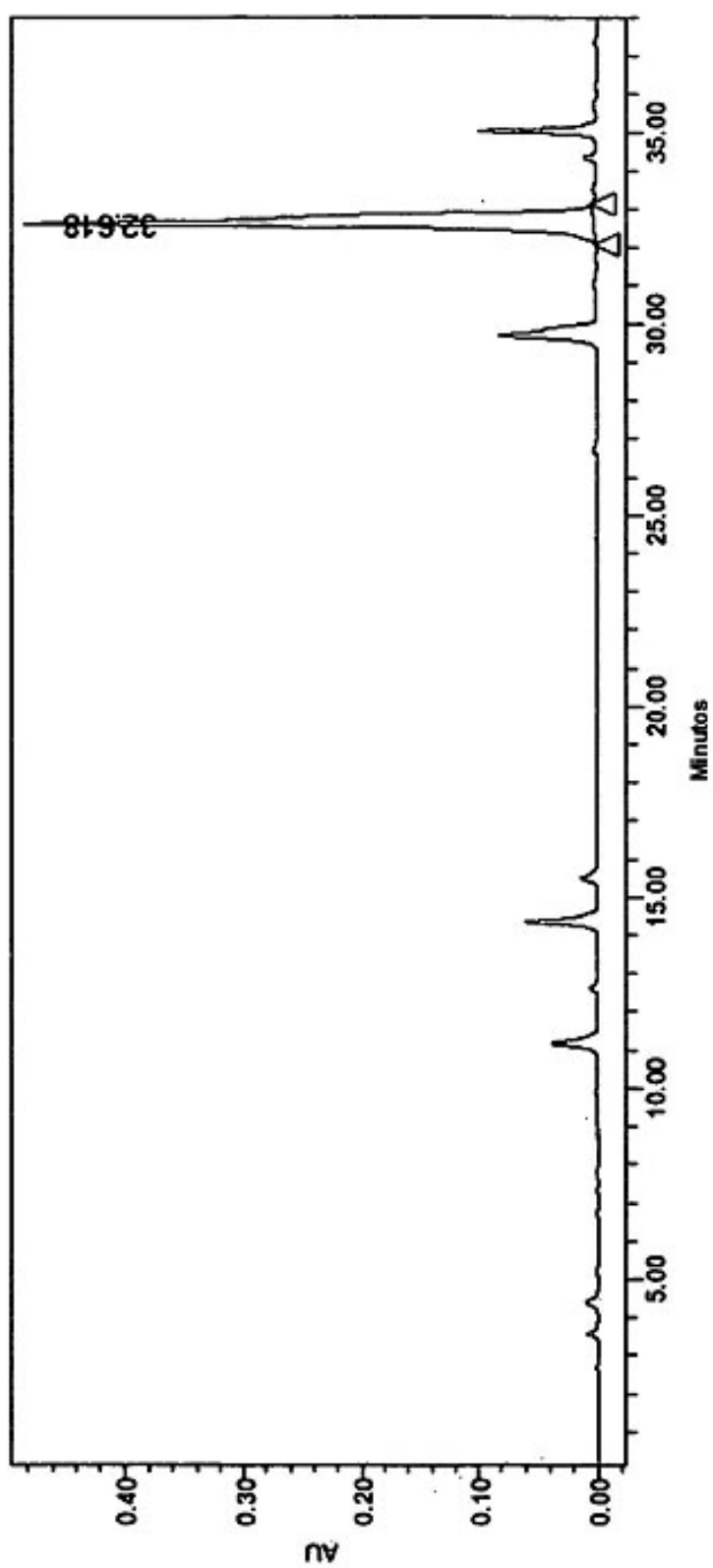


Fig. 29

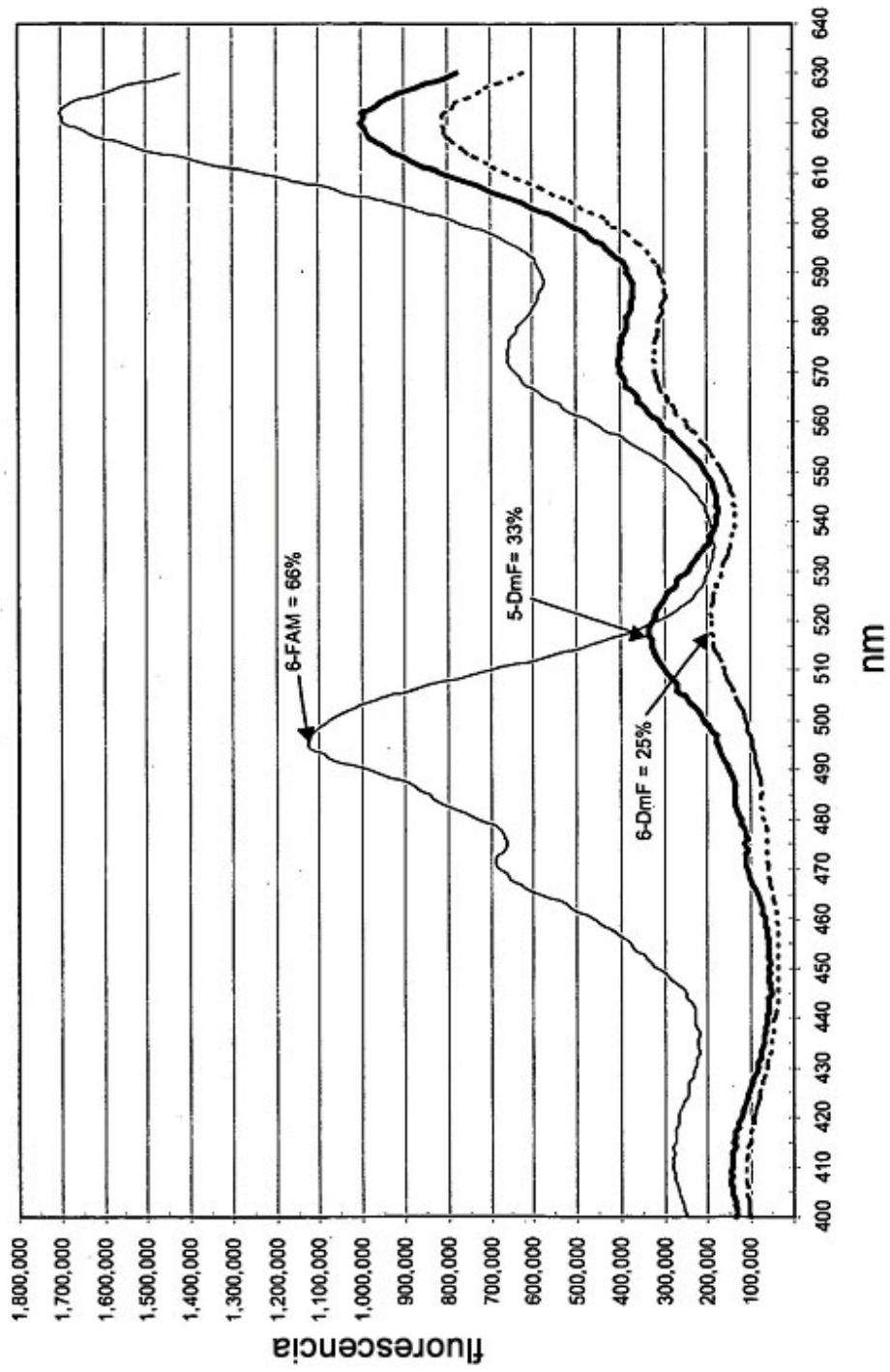


Fig. 30

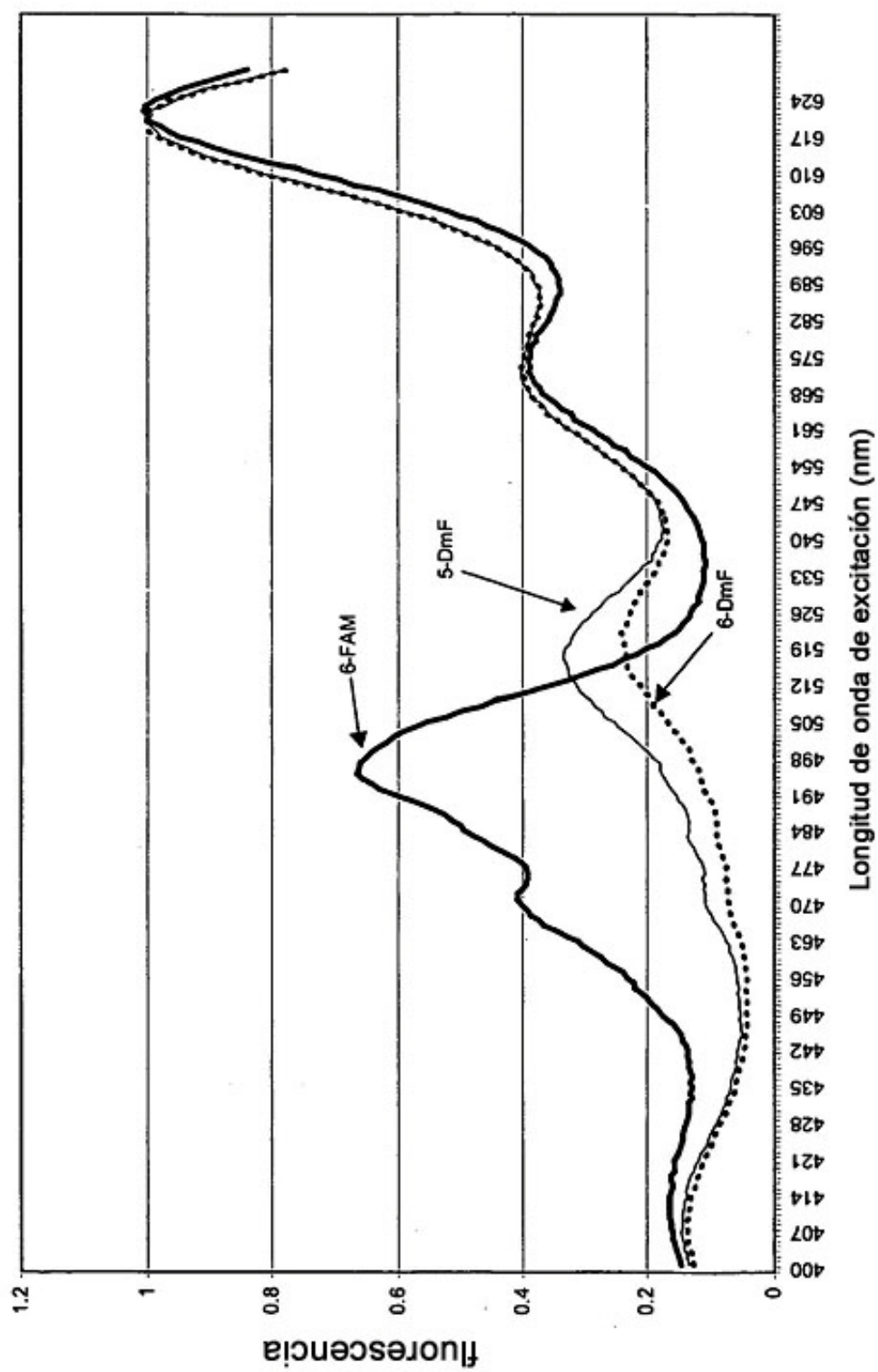


Fig. 31

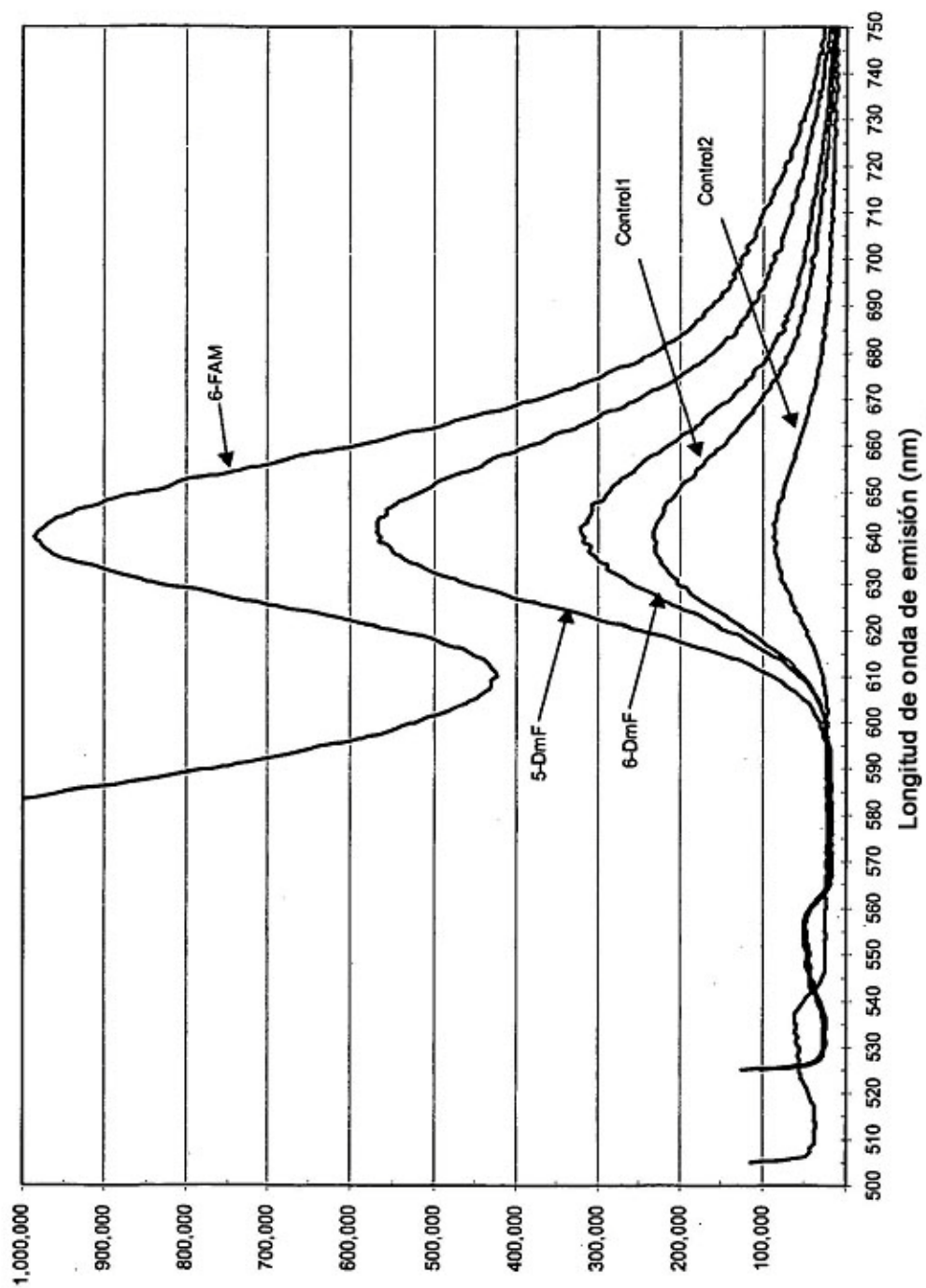


Fig. 32

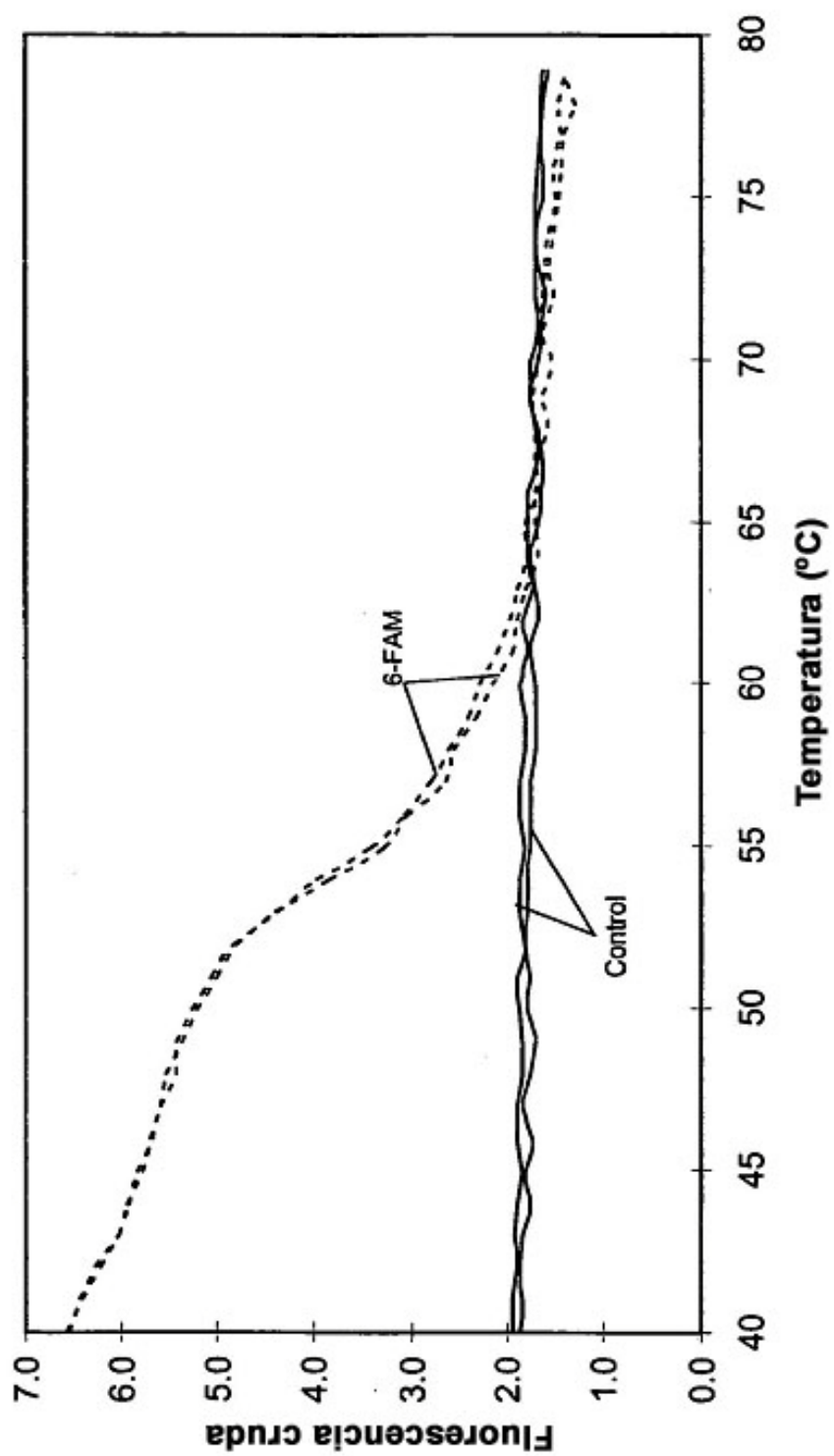


Fig. 33

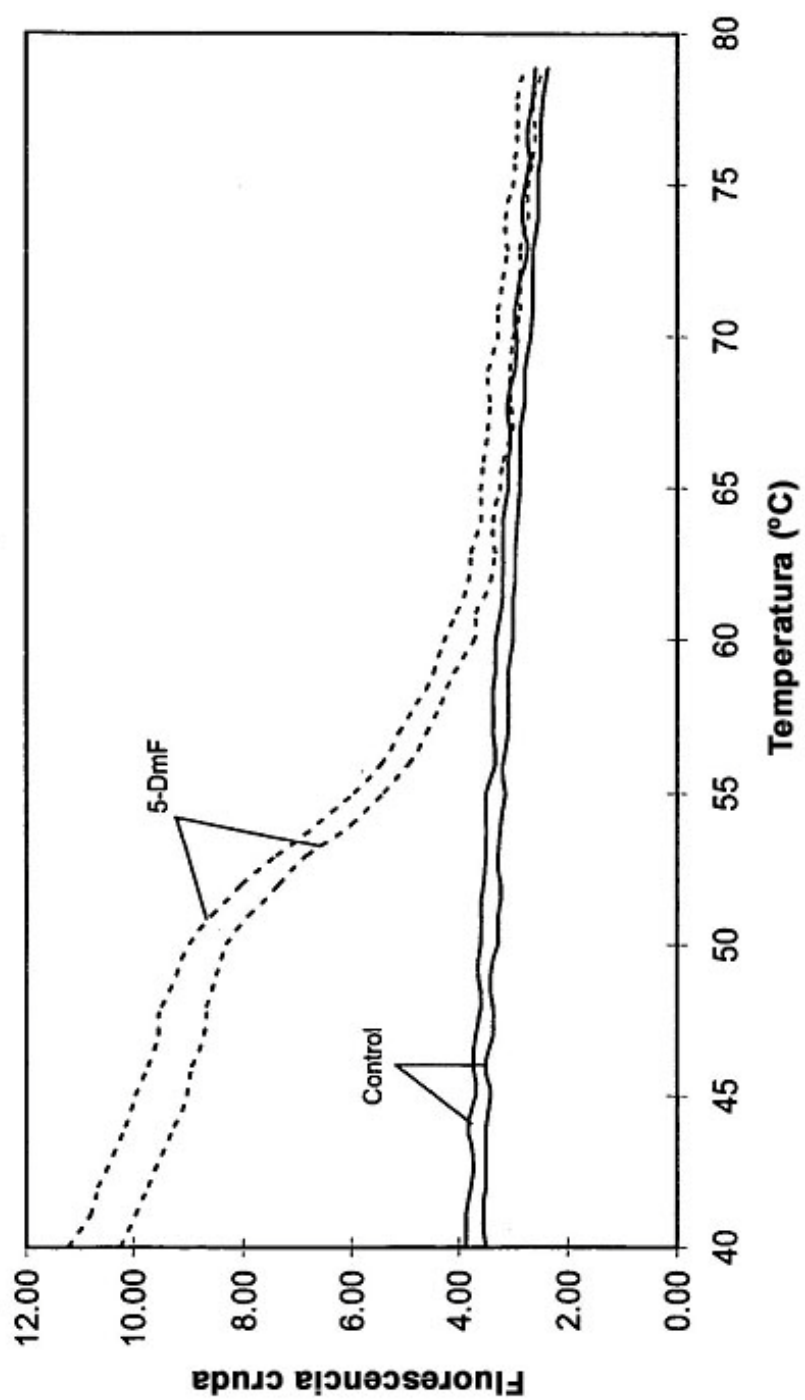


Fig. 34

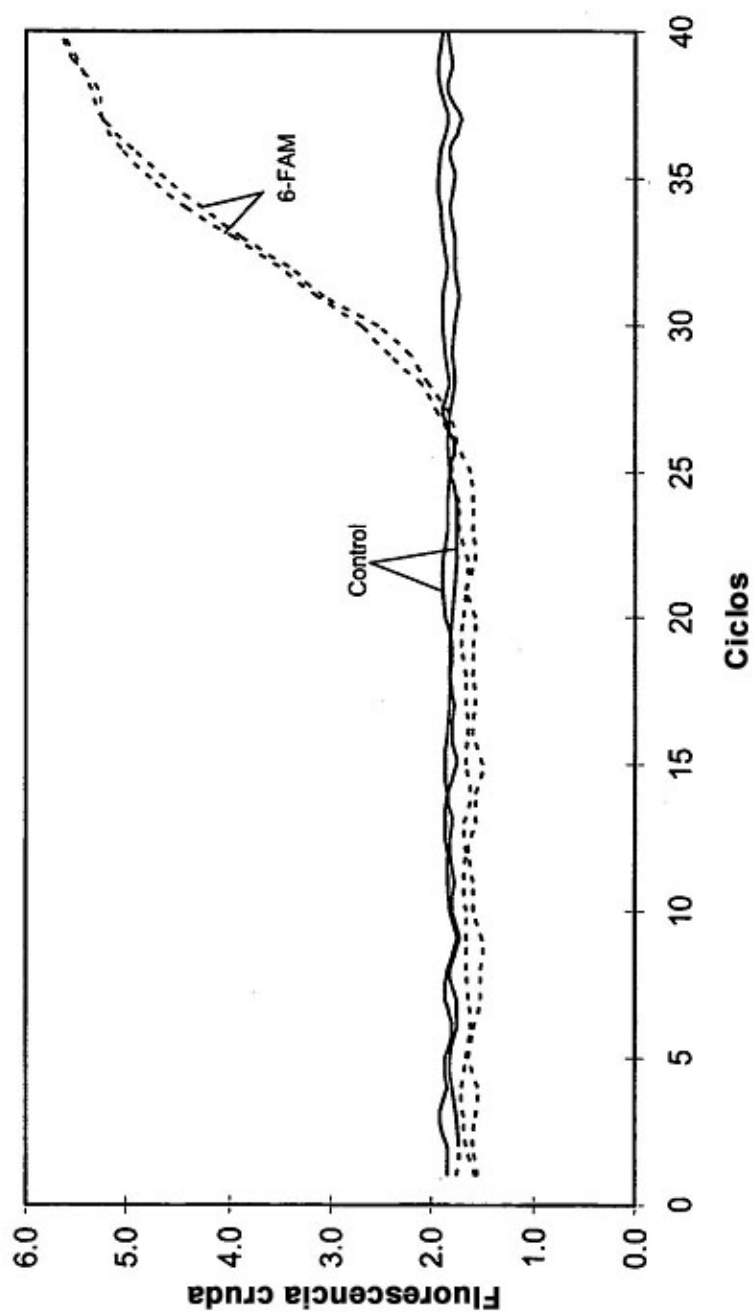


Fig. 35

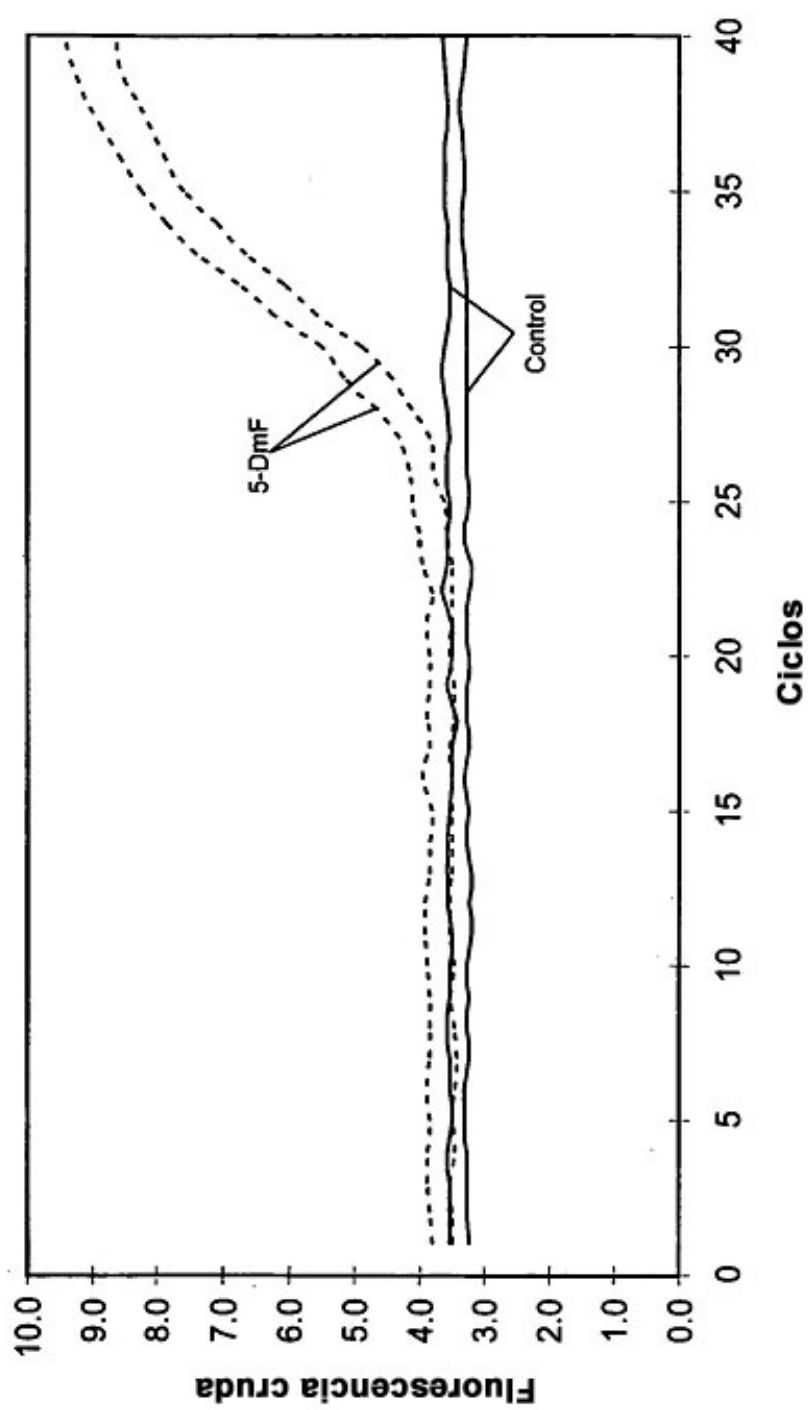


Fig. 36

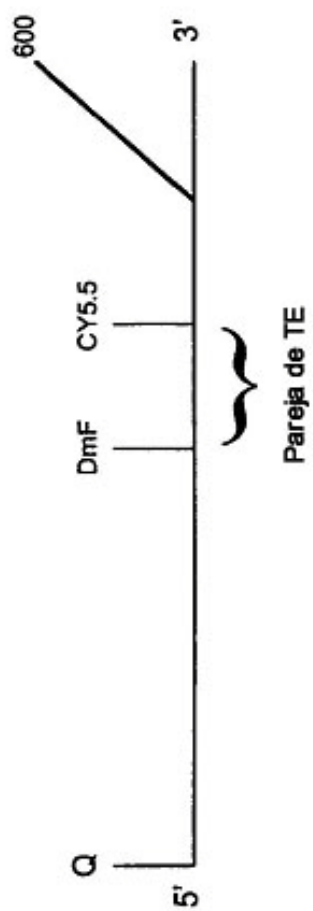


Fig. 37A

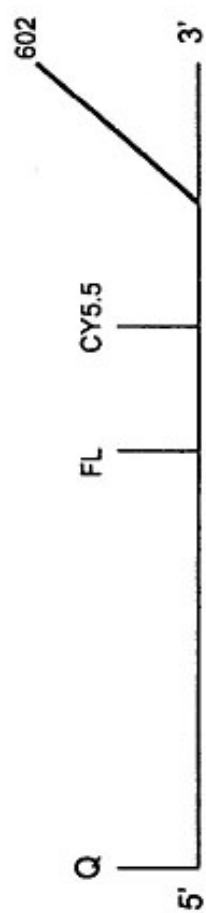


Fig. 37B

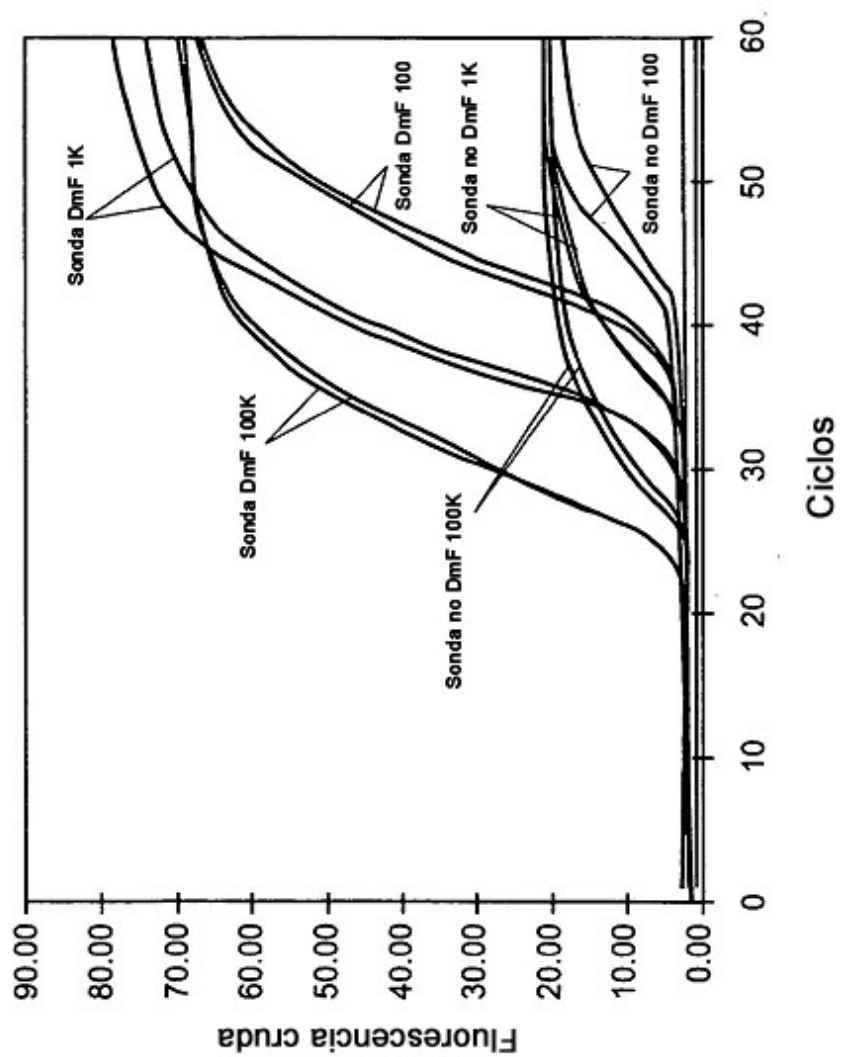


Fig. 38

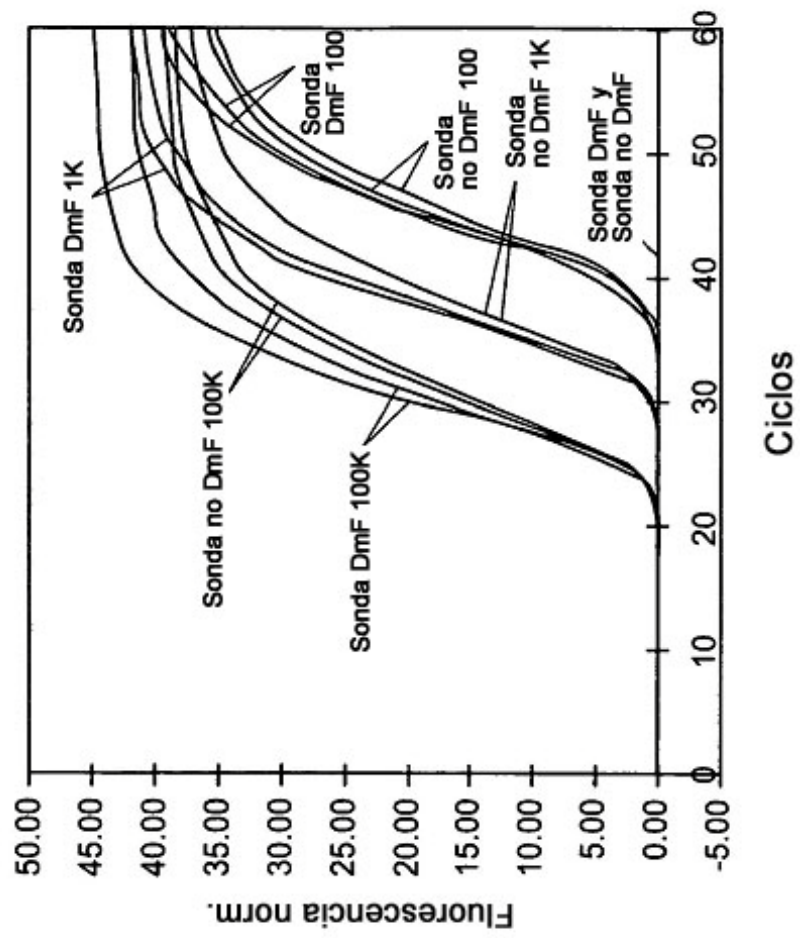


Fig. 39

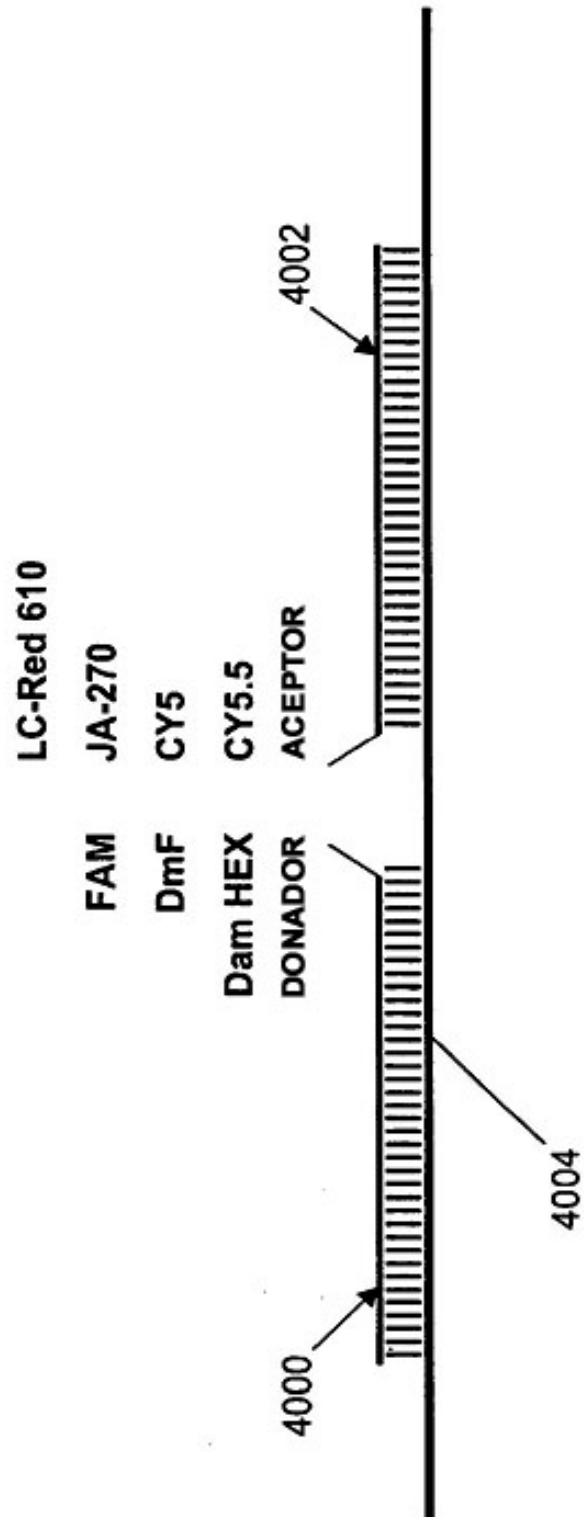


Fig. 40

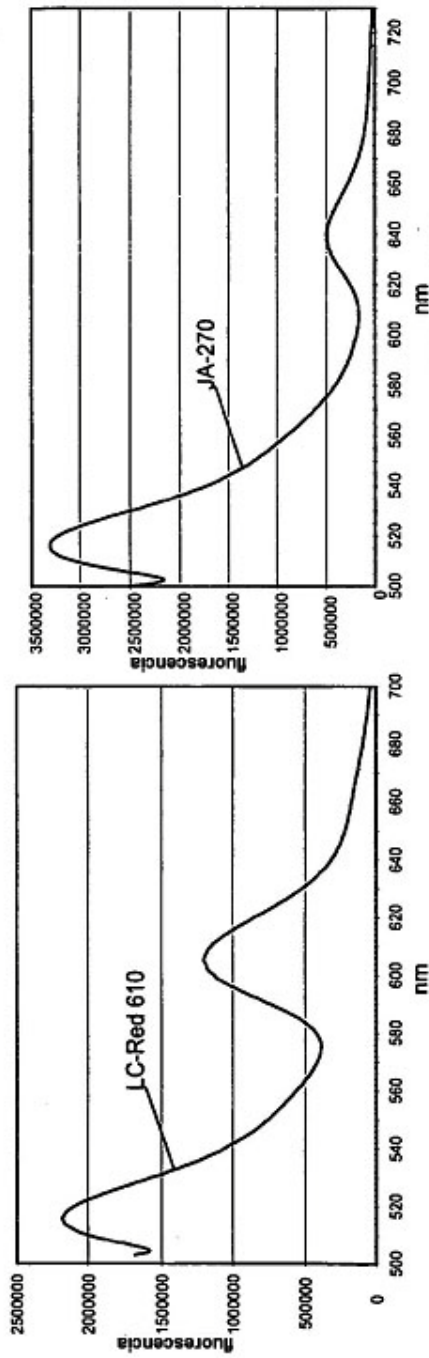


Fig. 41B

Fig. 41A

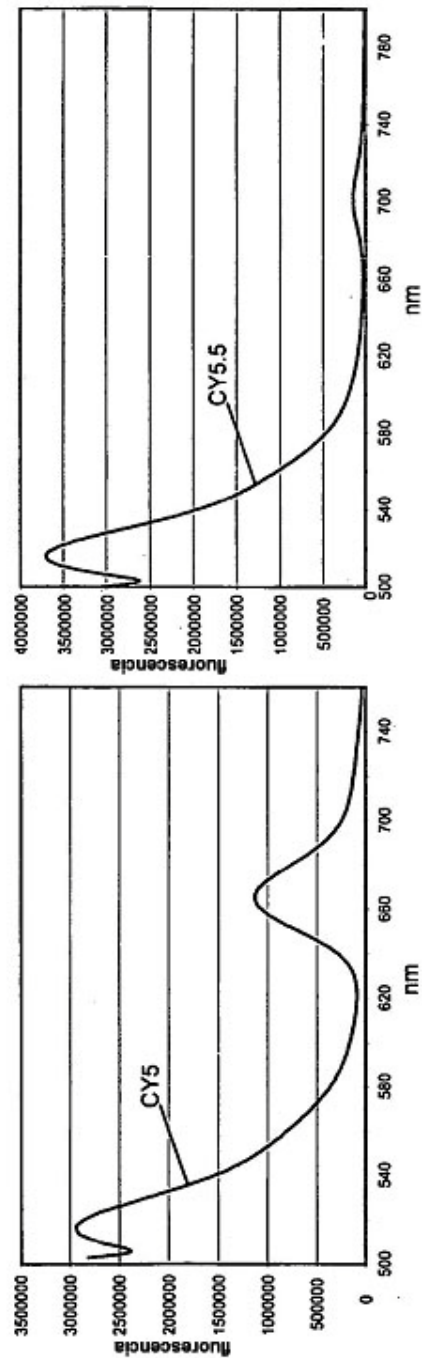


Fig. 41D

Fig. 41C

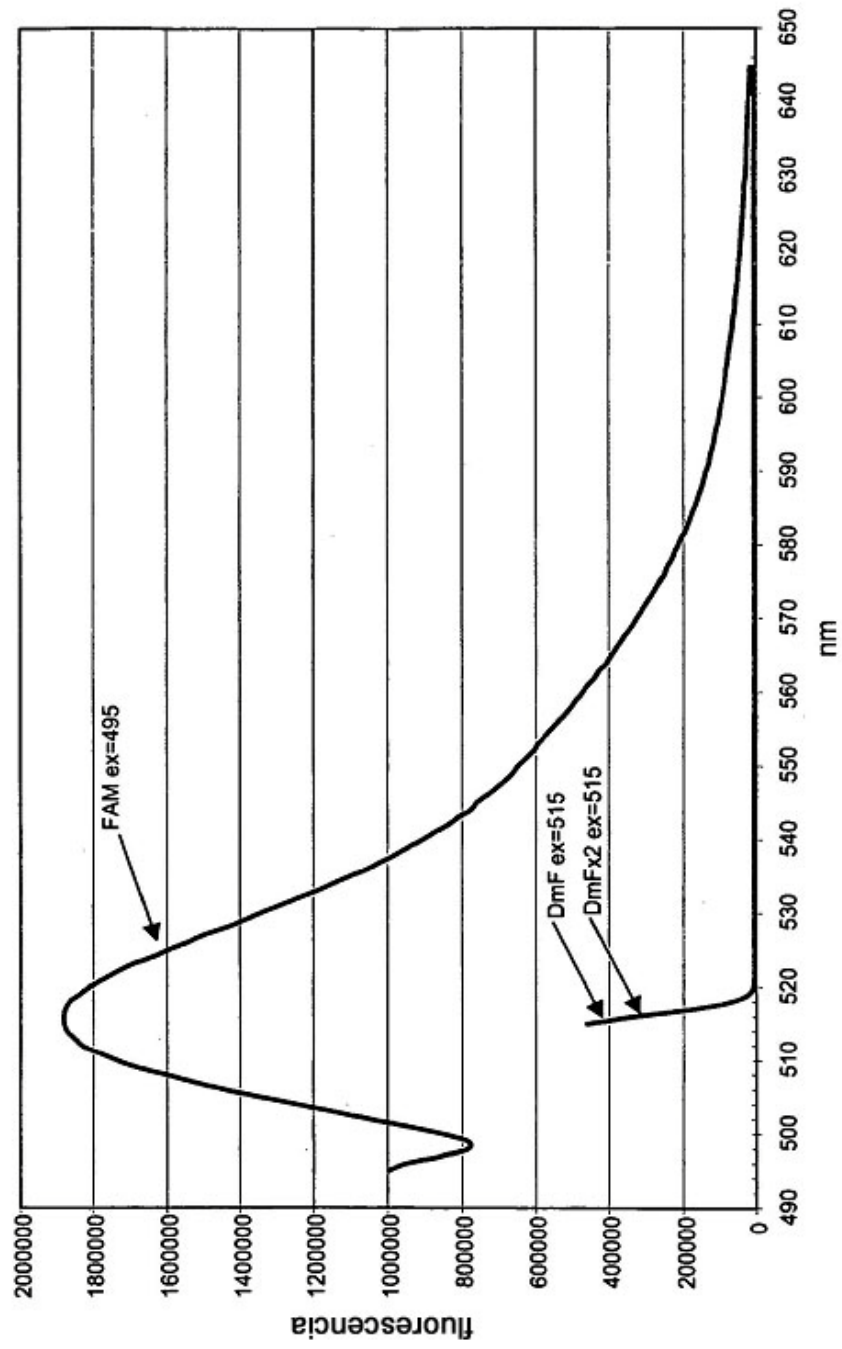


Fig. 42A

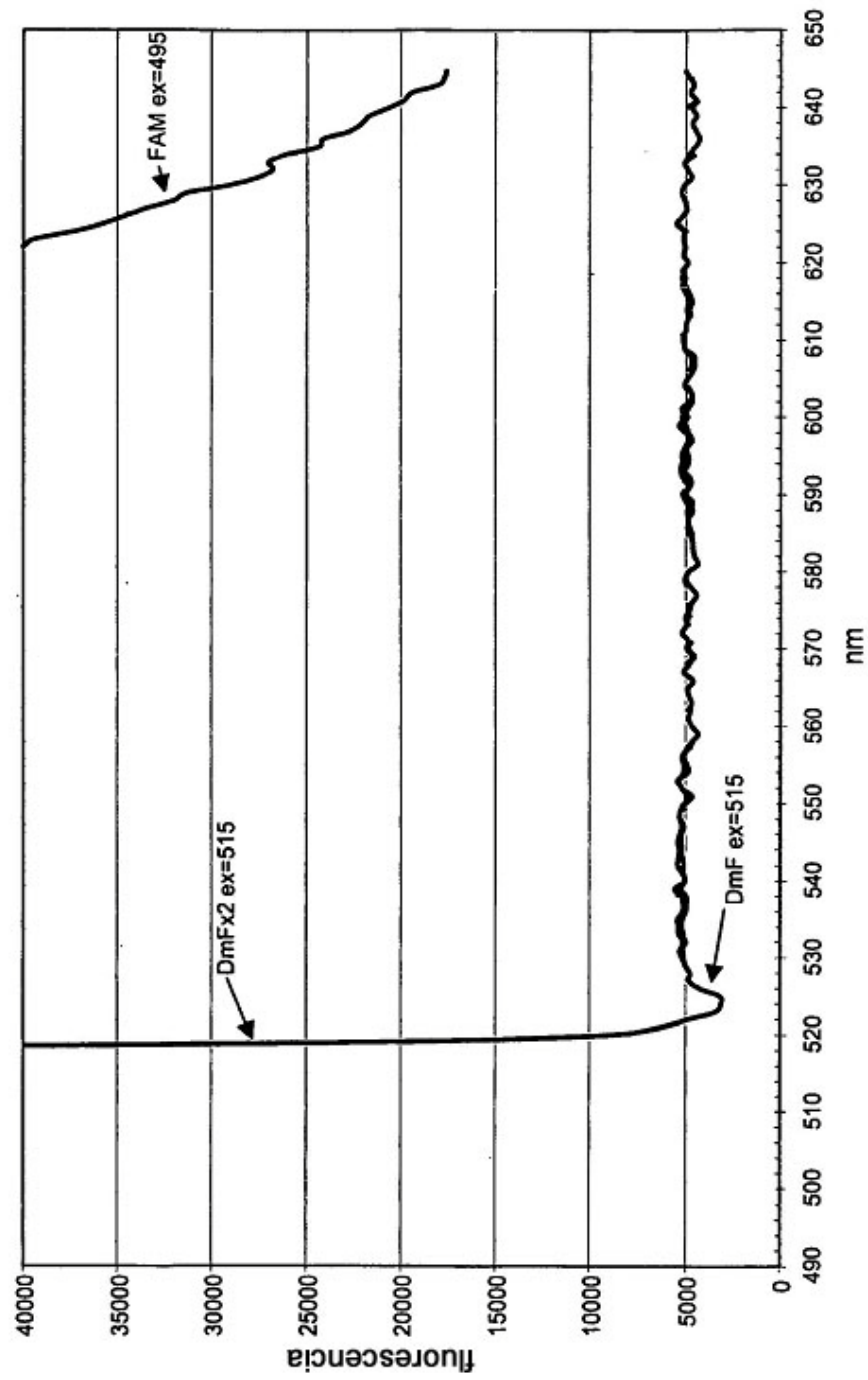


Fig. 42B

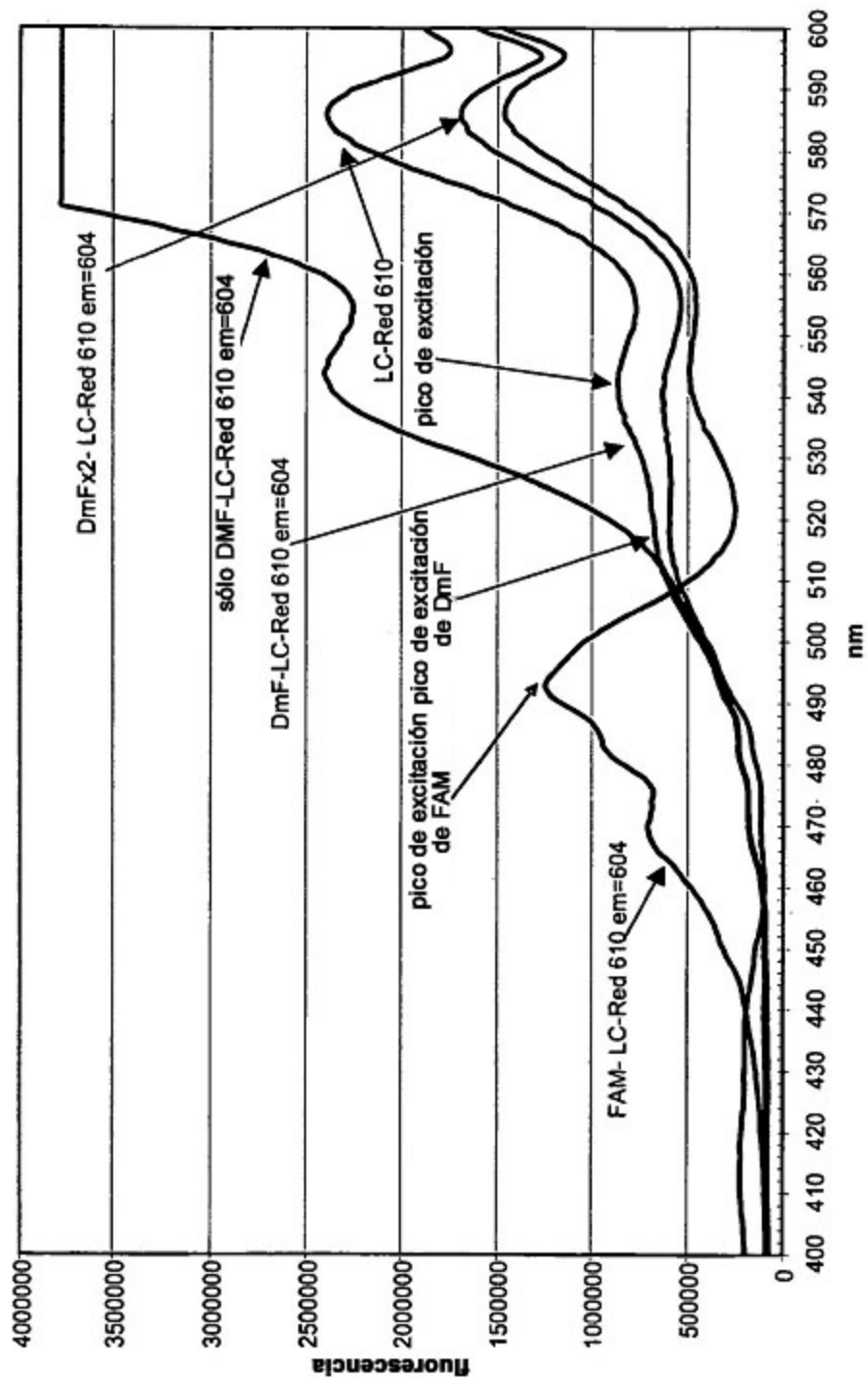


Fig. 43A

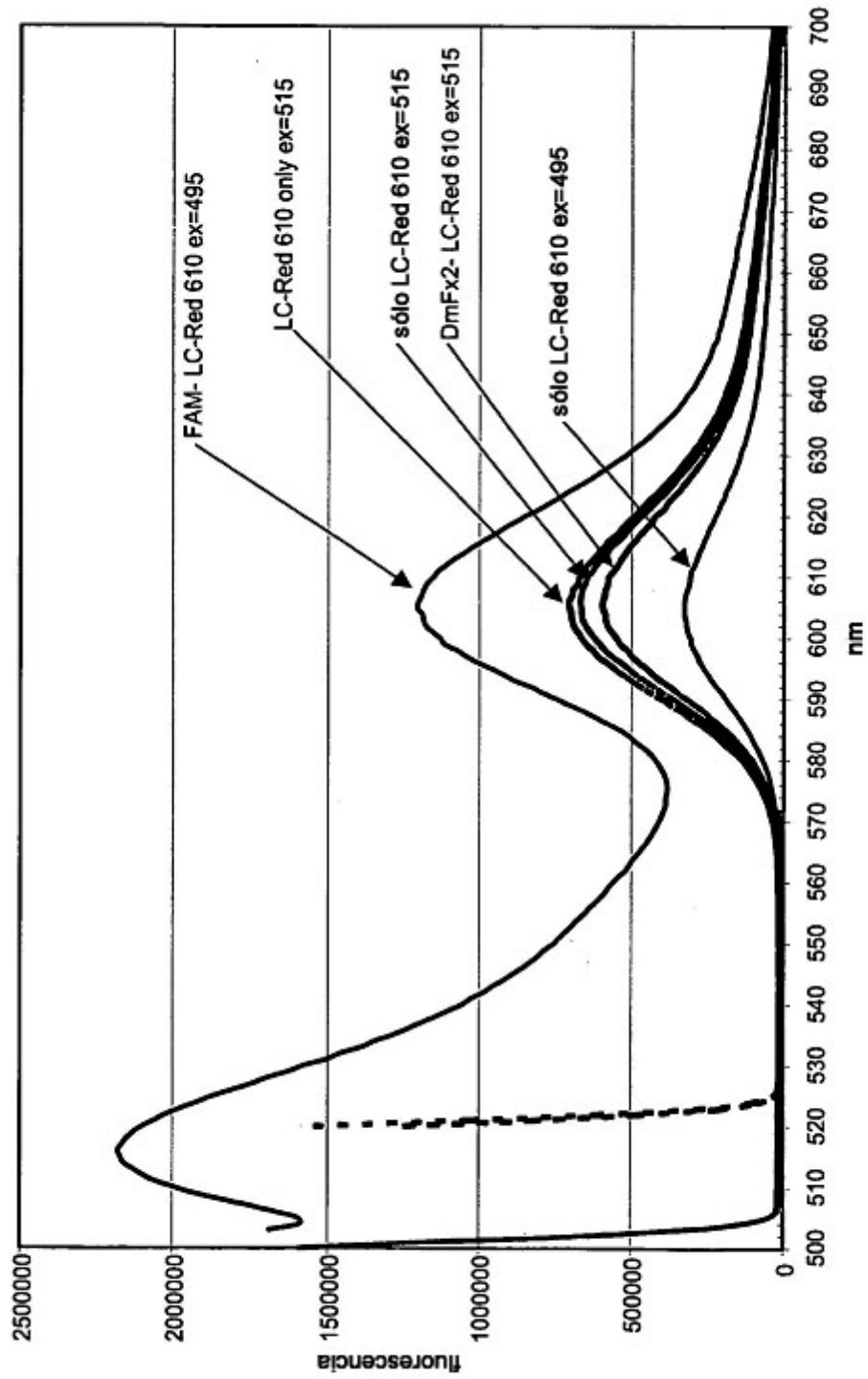


Fig. 43B

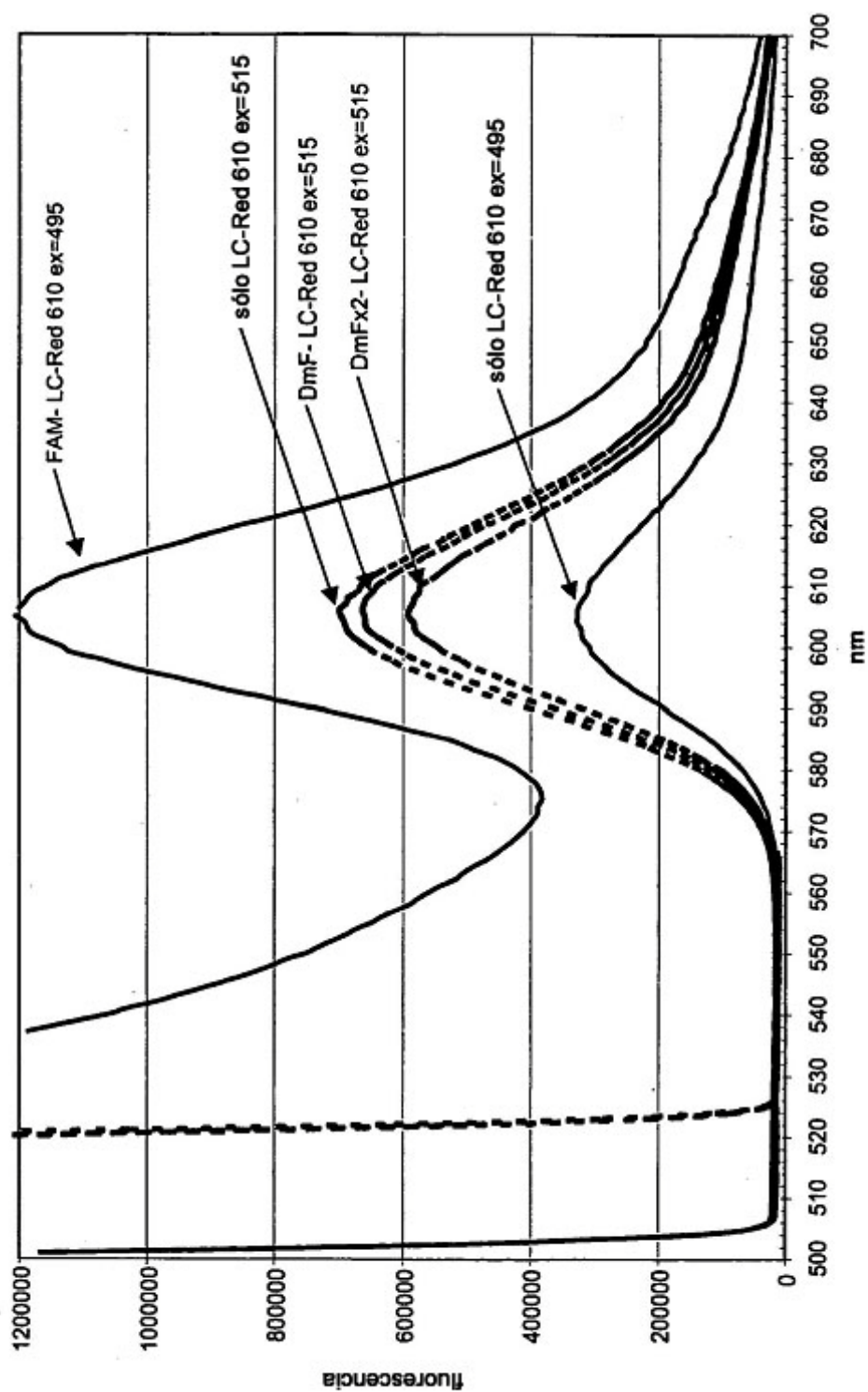


Fig. 43C

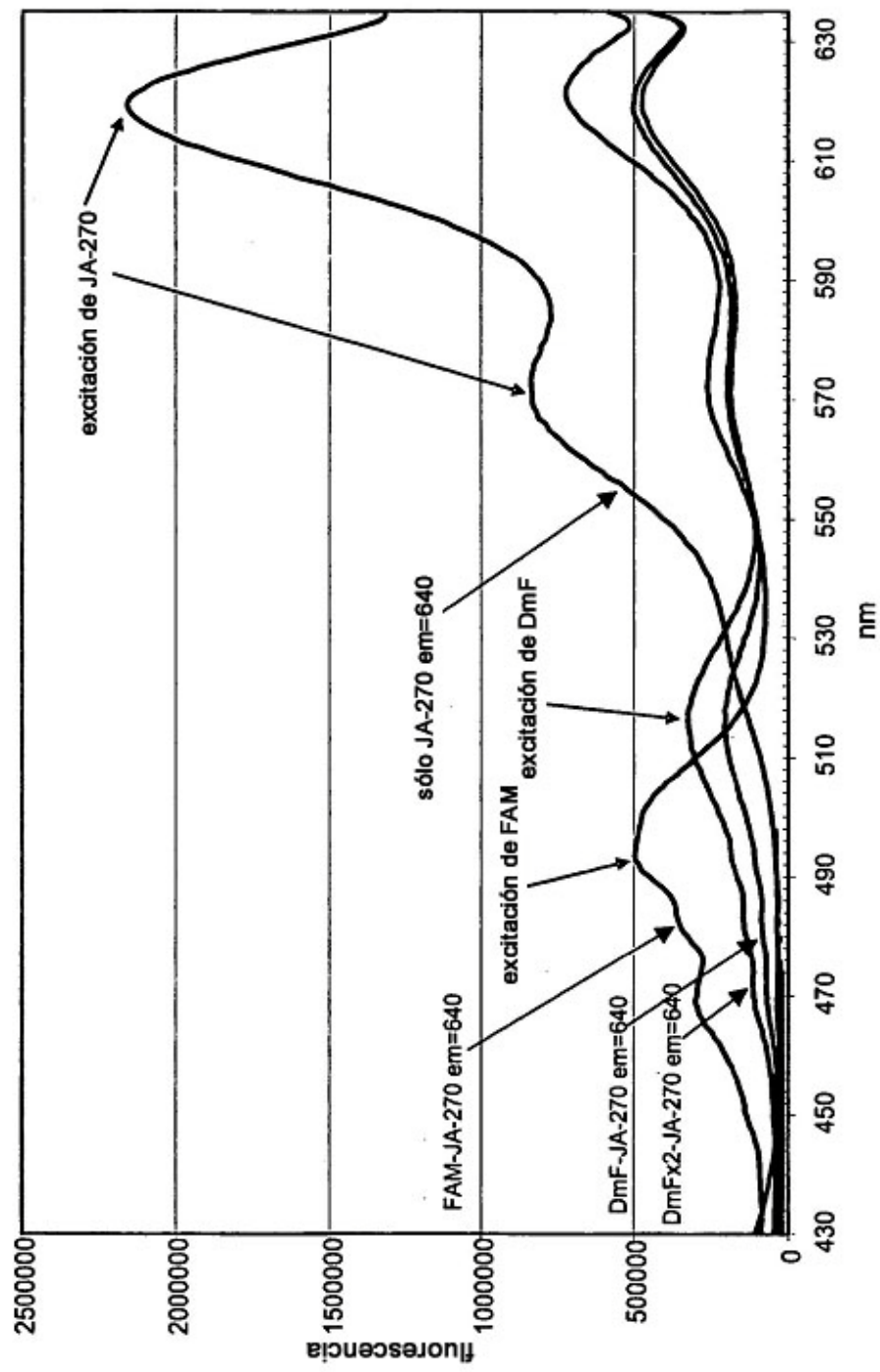


Fig. 44A

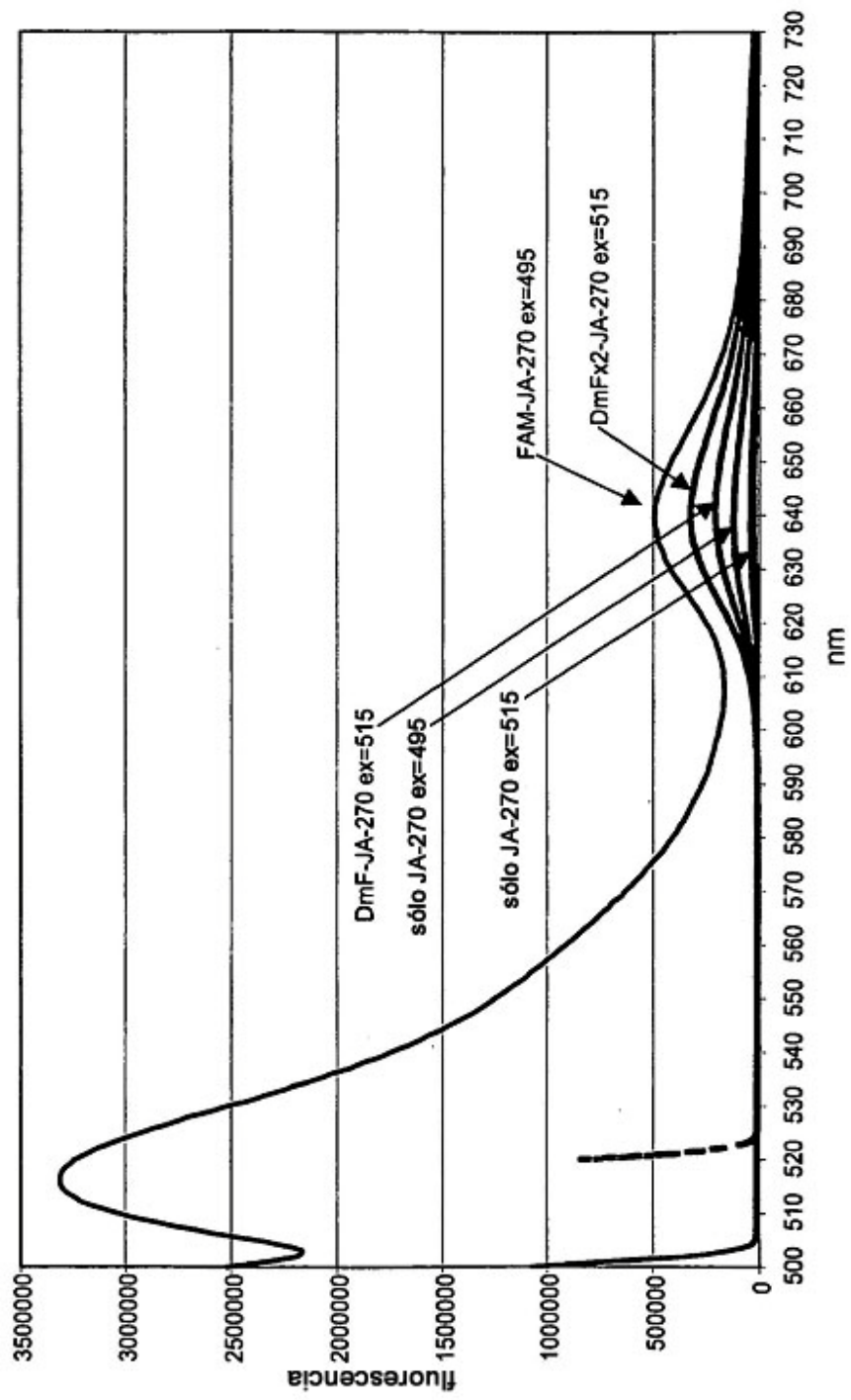


Fig. 44B

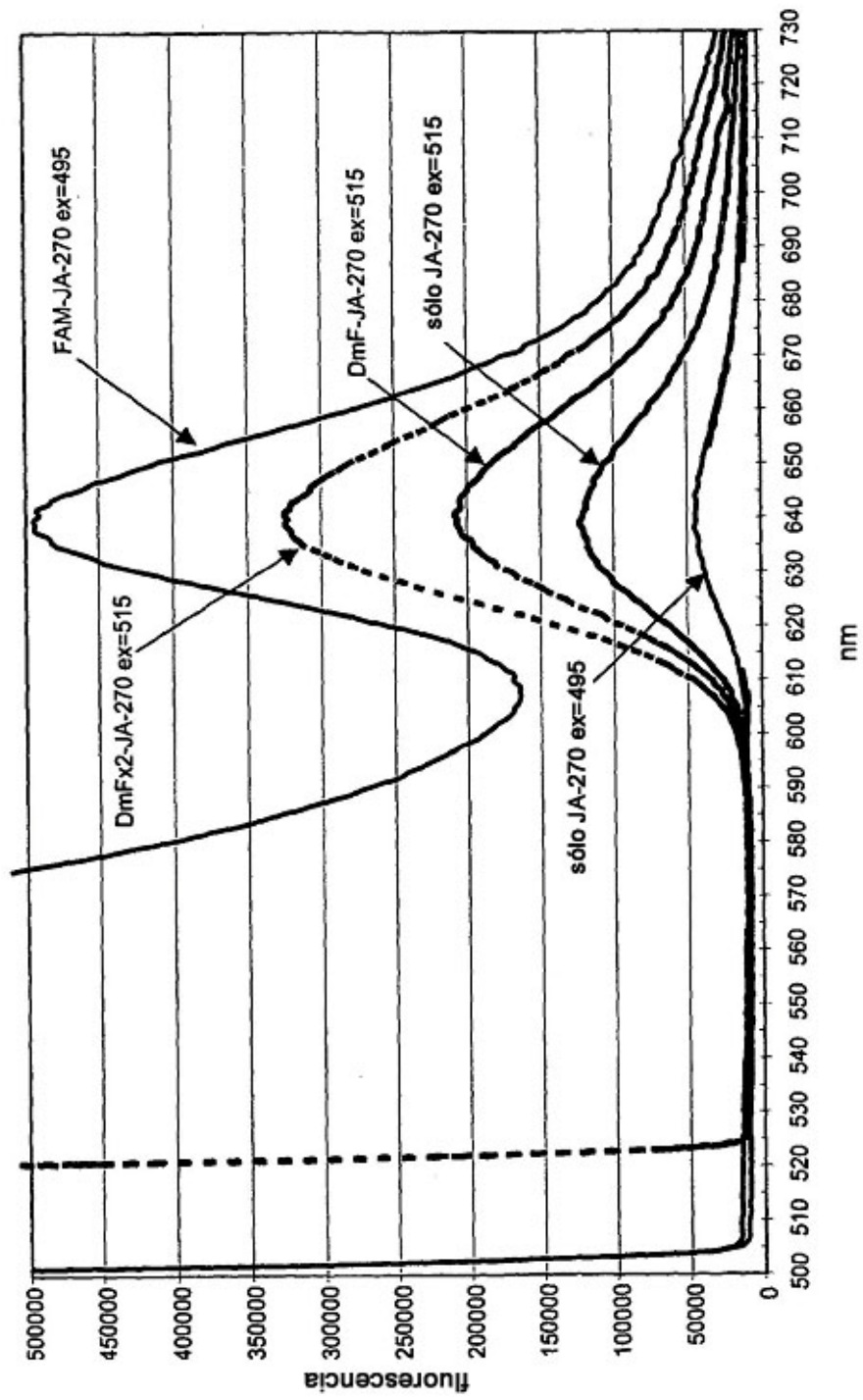


Fig. 44C

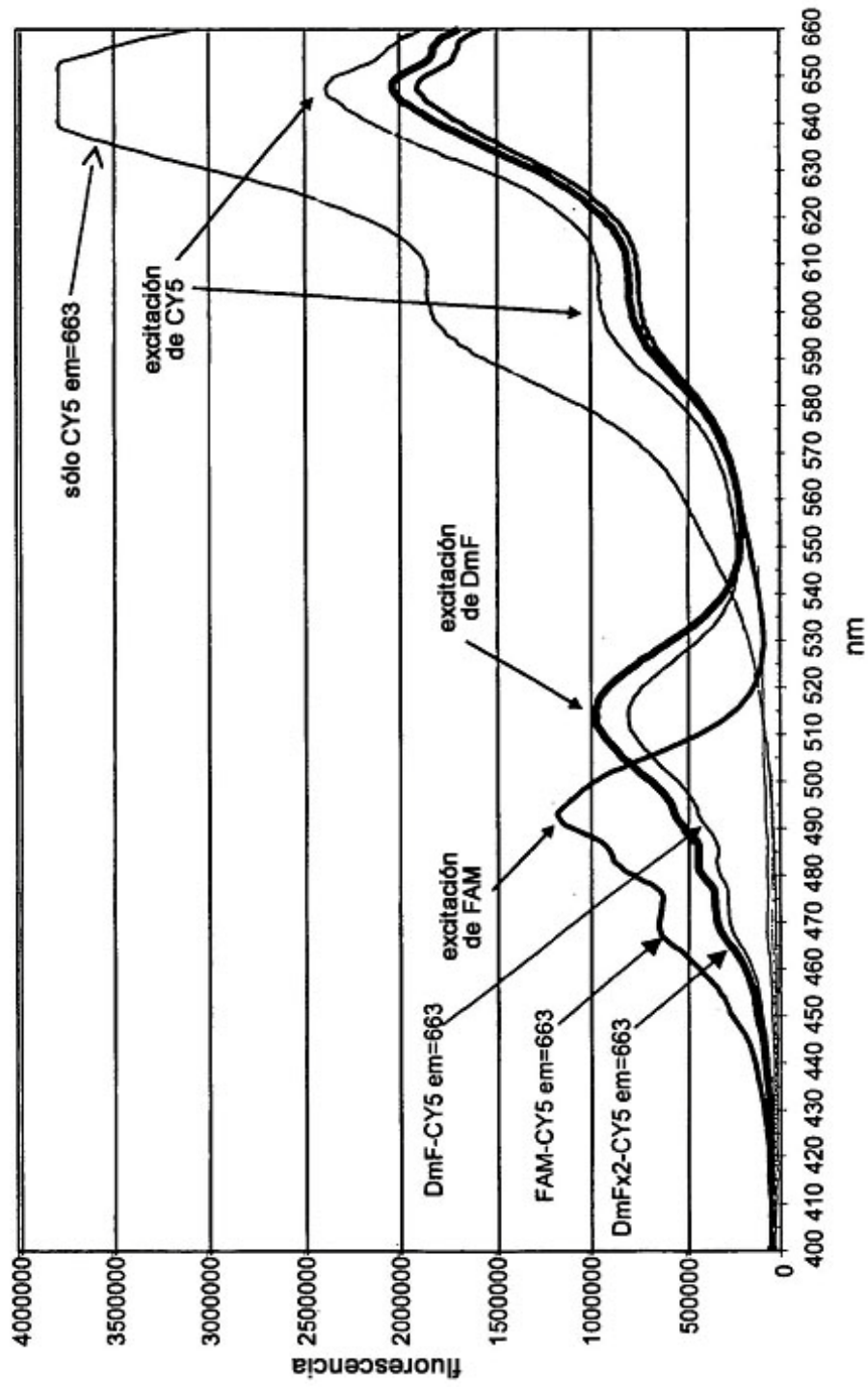


Fig. 45A

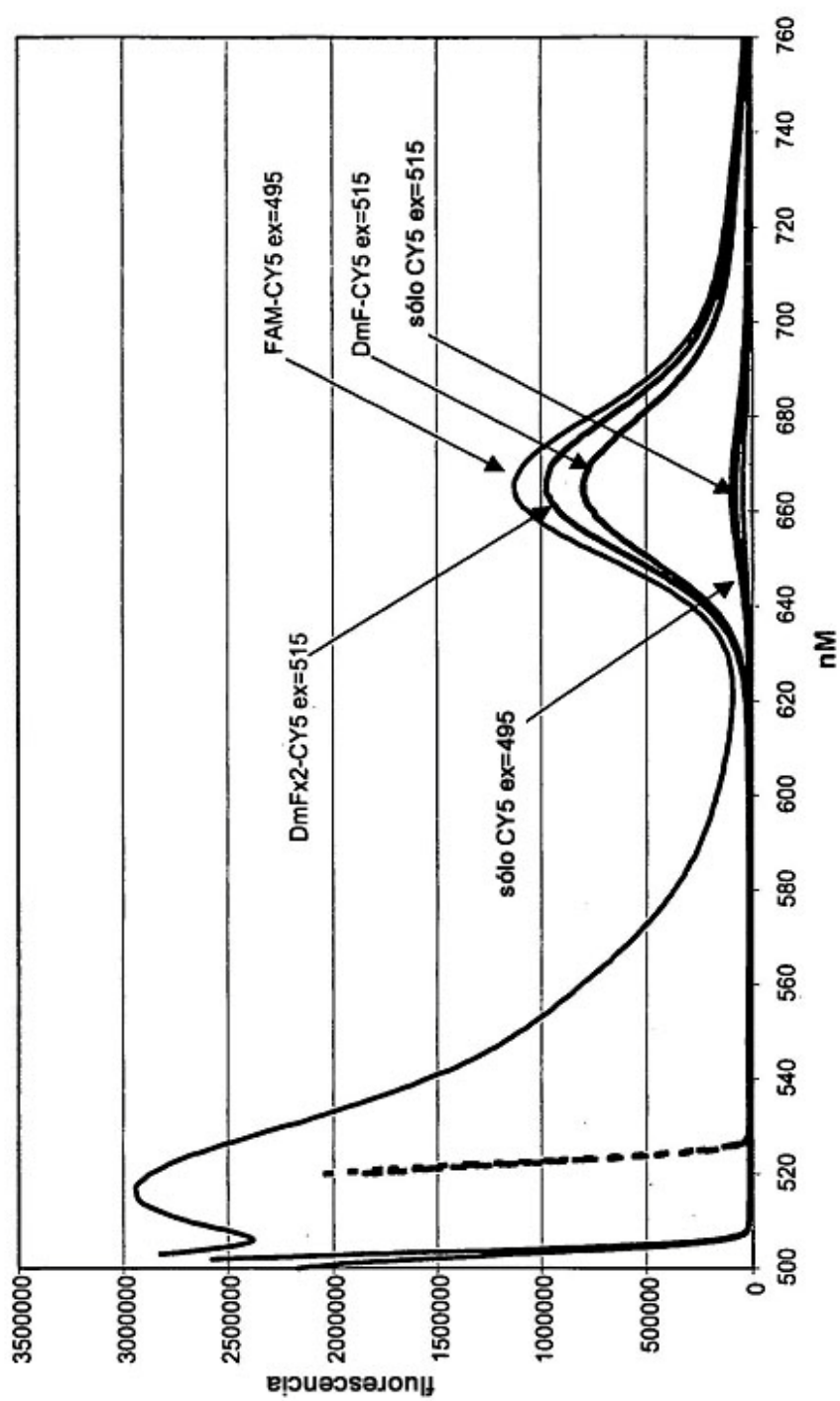


Fig. 45B

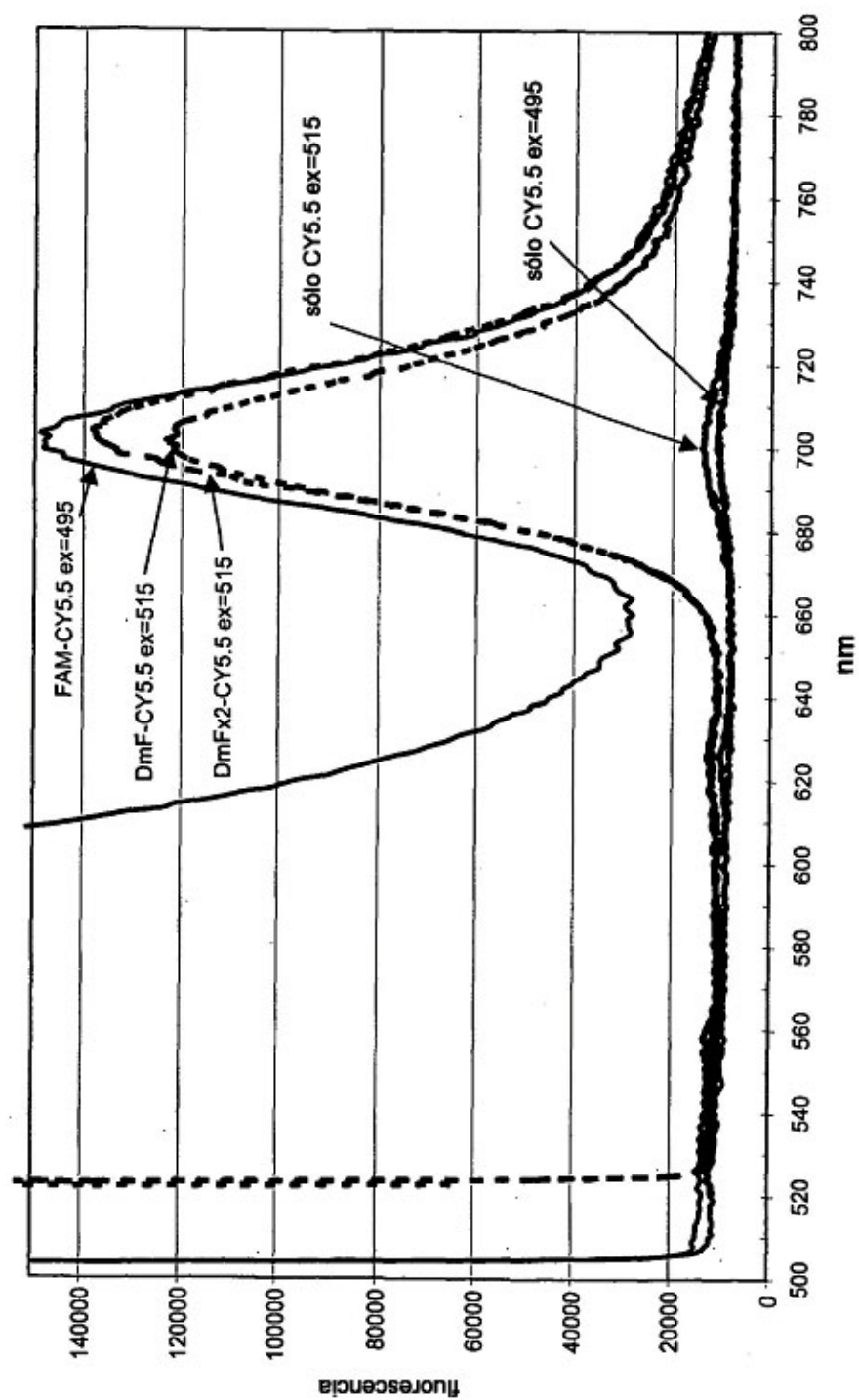


Fig. 45C

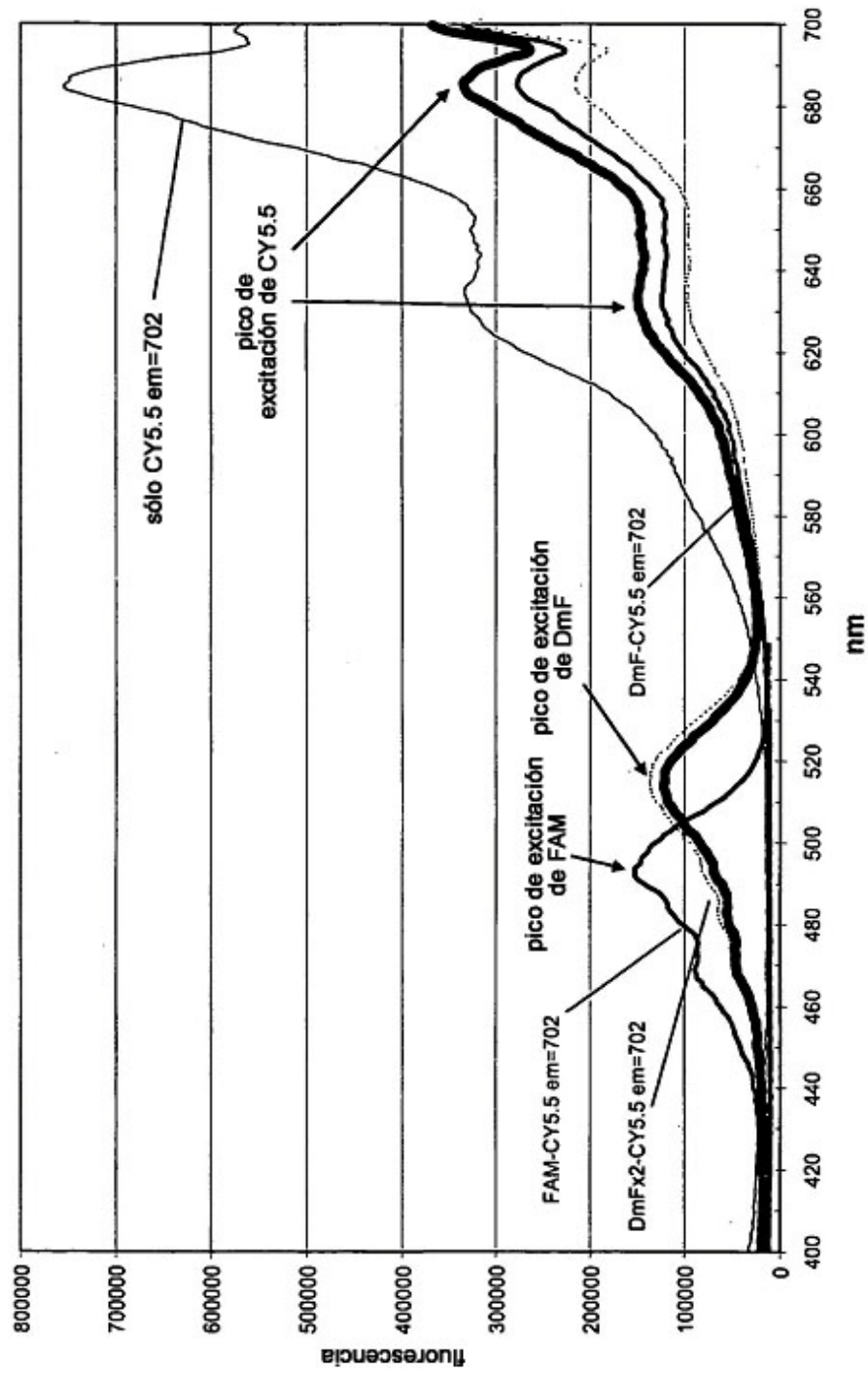


Fig. 46A

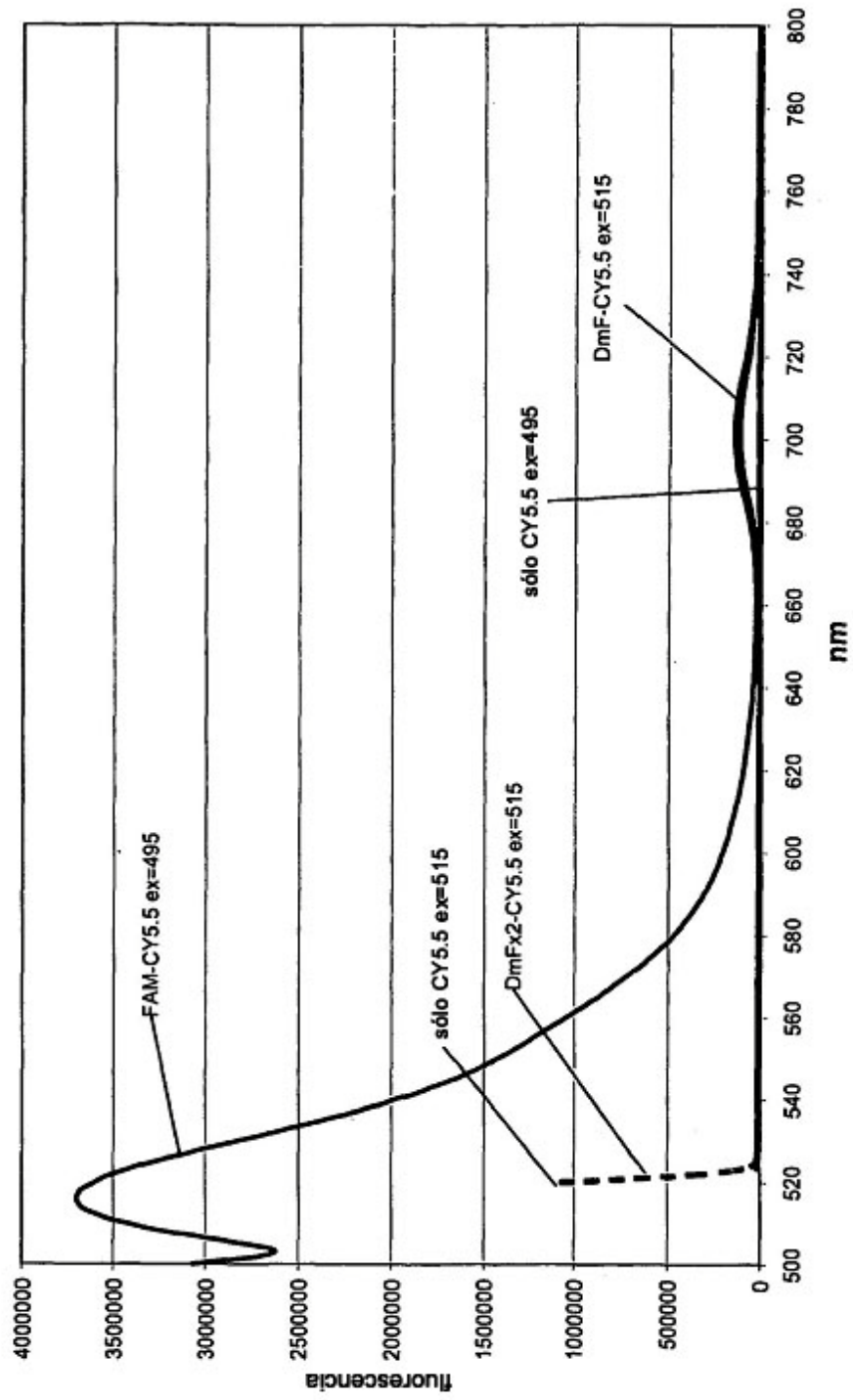


Fig. 46B

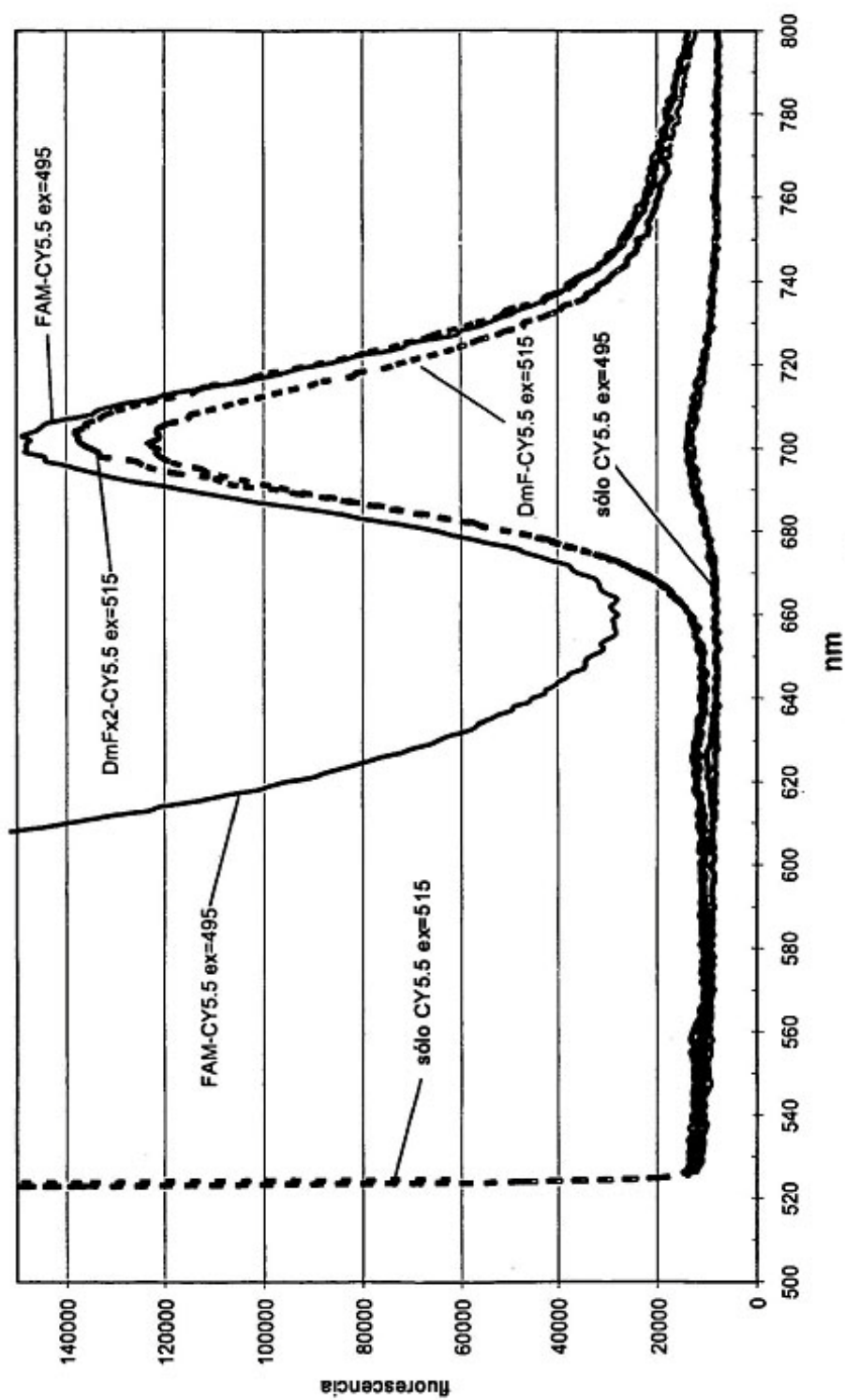


Fig. 46C

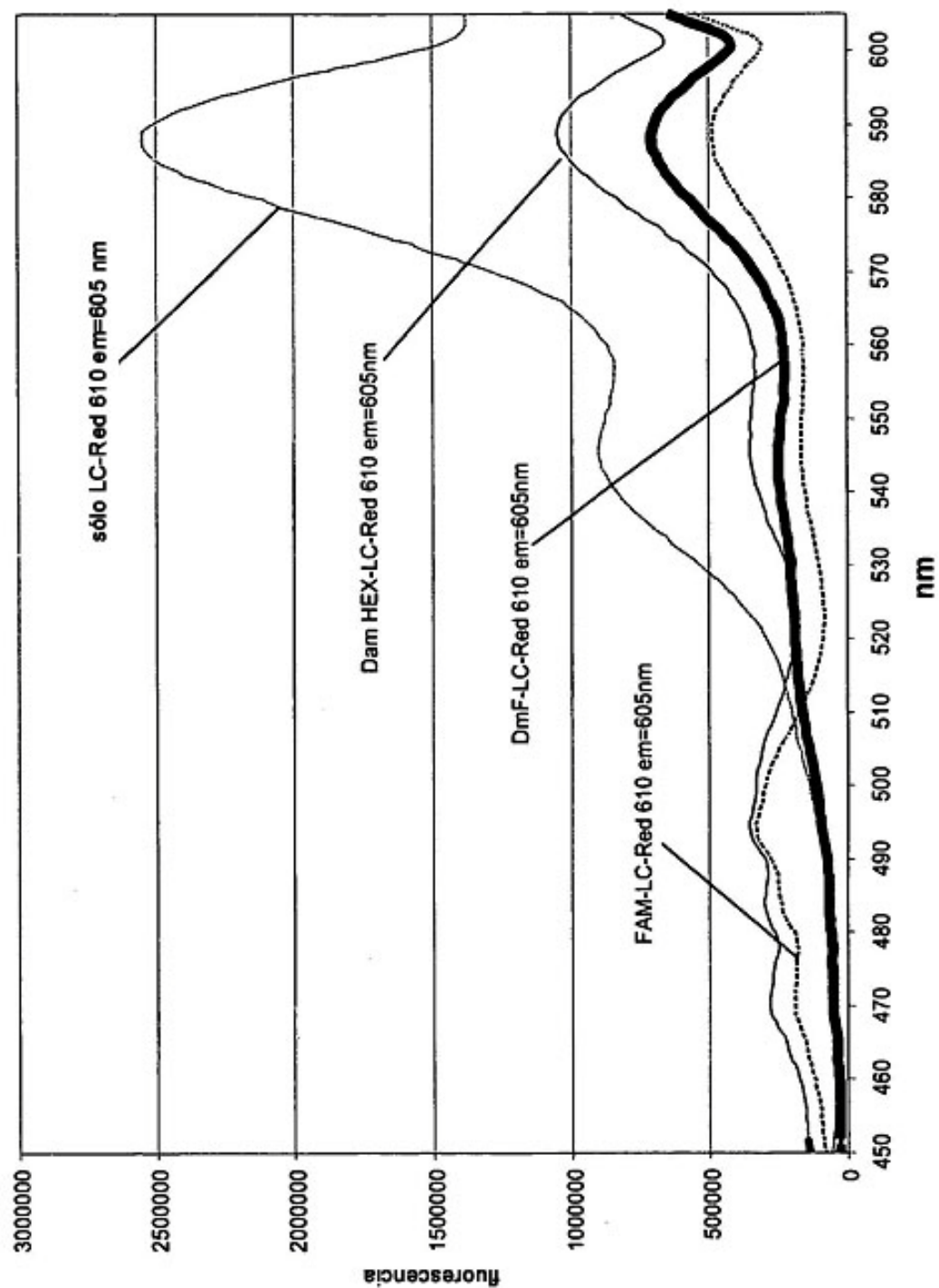


Fig. 47A

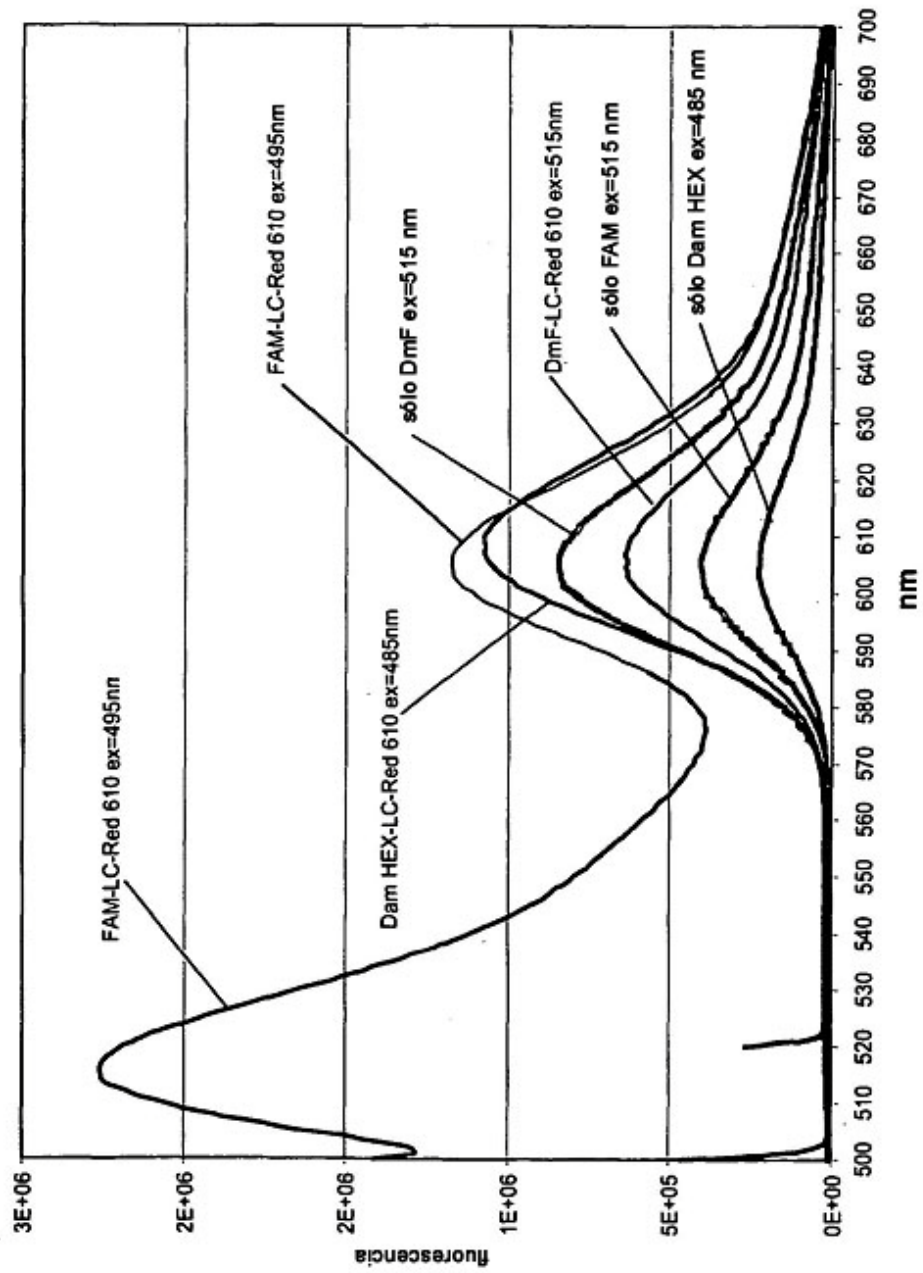


Fig. 47B

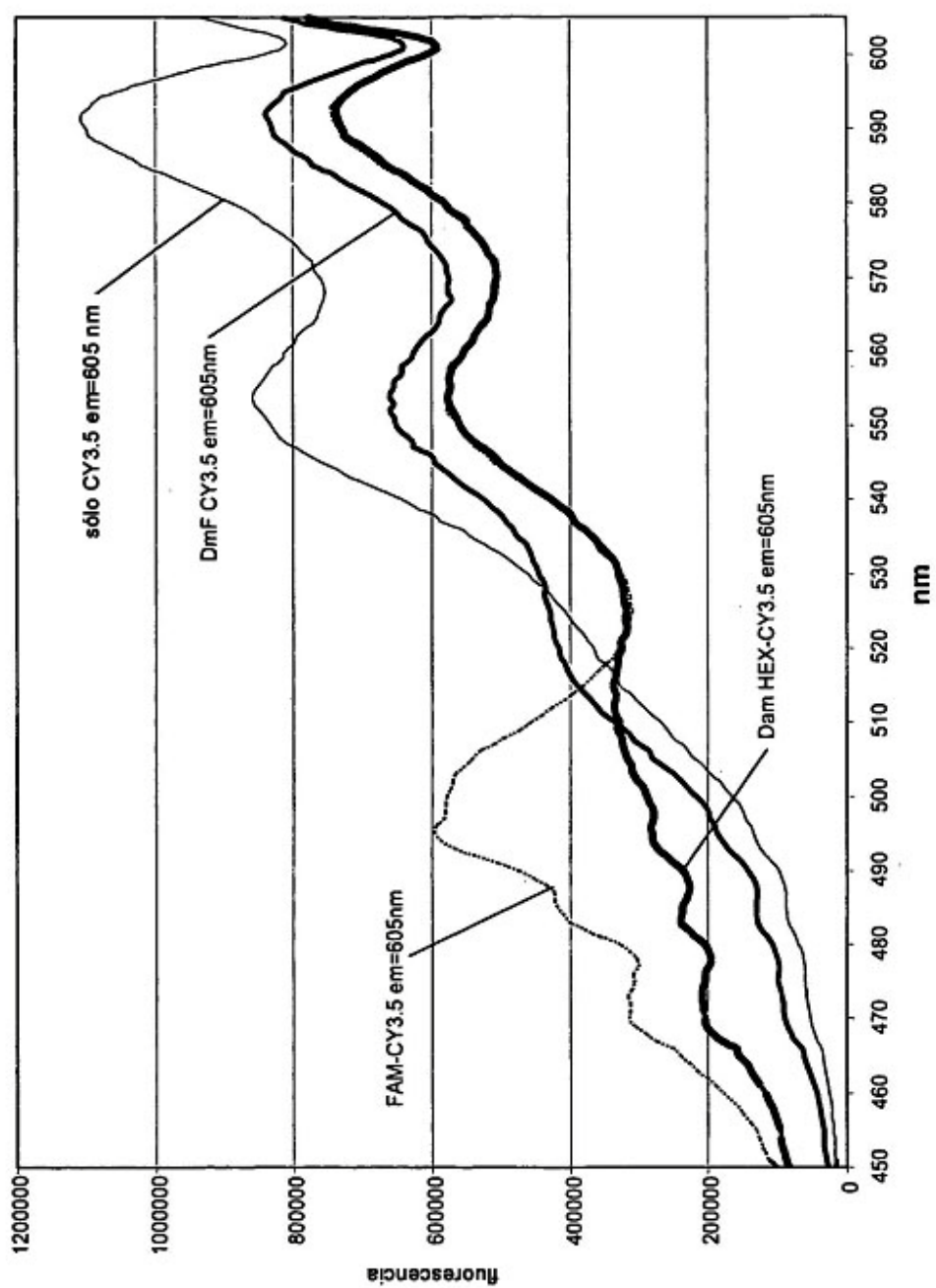


Fig. 48A

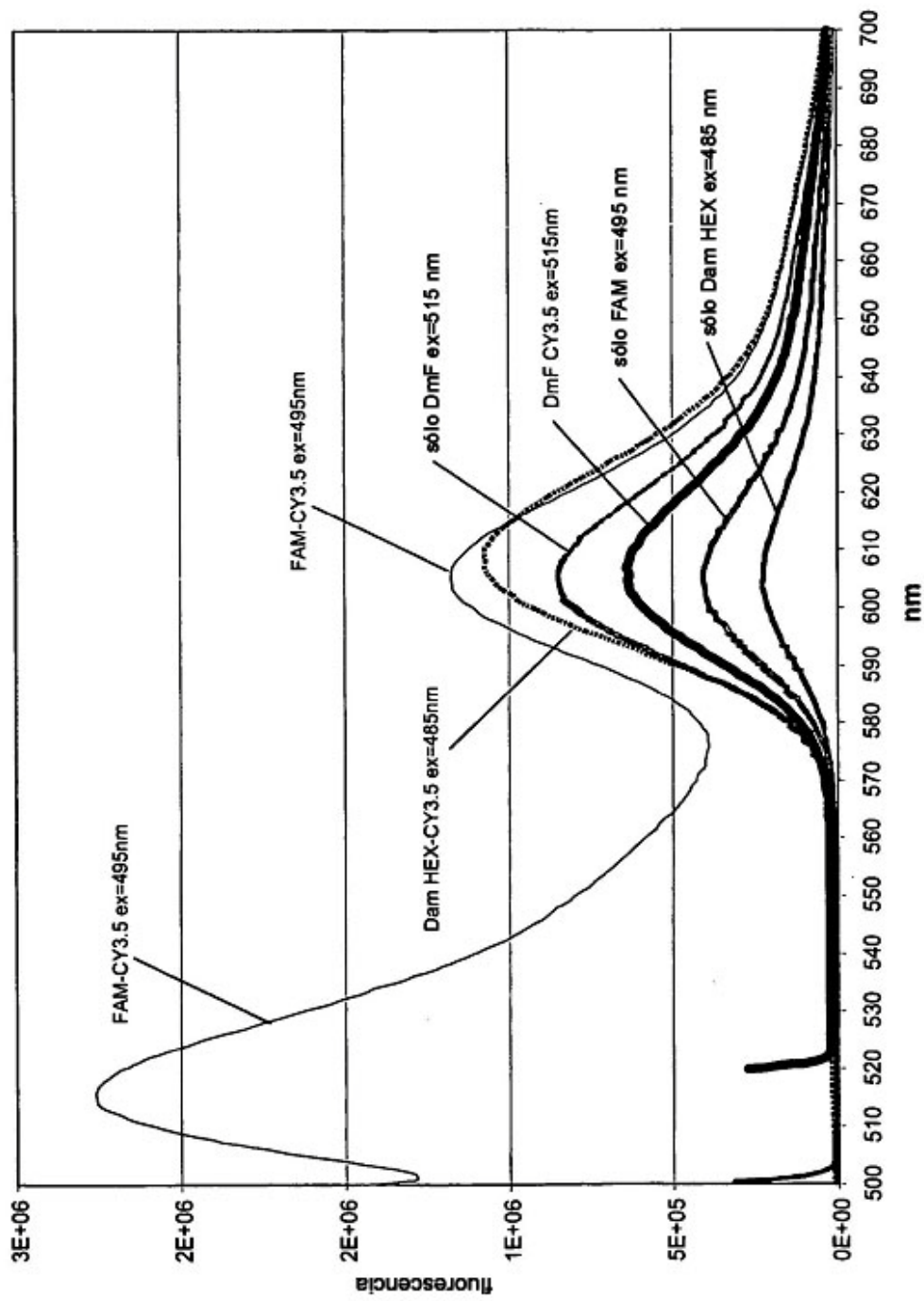


Fig. 48B