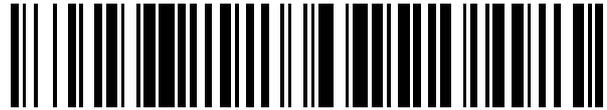


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 920**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2004 E 09175515 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 2161343**

54 Título: **Métodos y composiciones para la detección y análisis de interacciones de proteínas que se unen a polinucleótidos utilizando multicromóforos captadores de luz**

30 Prioridad:

13.02.2003 US 447860 P

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

31.01.2014

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
1111 FRANKLIN STREET
OAKLAND, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**BAZAN, GUILLERMO;
LIU, BIN y
WANG, SHU**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 440 920 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para la detección y análisis de interacciones de proteínas que se unen a polinucleótidos utilizando multicromóforos captadores de luz

5

CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a métodos, artículos y composiciones para la detección y análisis de polinucleótidos en una muestra.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los métodos que permiten el análisis de polinucleótidos en tiempo real y con alta sensibilidad son de gran interés científico y económico.^{1,2,3} Sus aplicaciones incluyen el diagnóstico médico, la identificación de mutaciones genéticas, la monitorización de la liberación de genes y técnicas genómicas específicas.⁴ Los colorantes orgánicos catiónicos, tales como bromuro de etidio y naranja de tiazol, emiten cuando están intercalados en los surcos de la cadena doble de ADN (ADNs), y sirven como sondas de hibridación directas de ADN, pero carecen de la especificidad de secuencia.^{5,6} Existen parejas de cromóforos de transferencia de energía/electrones para análisis específicos de cadena, pero requieren un marcaje químico de dos ácidos nucleicos, o una doble modificación de la misma cadena alterada (por ejemplo, sondas moleculares).^{7,8} Las dificultades para etiquetar dos sitios de ADN dan lugar a bajos rendimientos, altos costes e impurezas marcadas individualmente que disminuyen la sensibilidad de detección.⁹

15

20

25

[0003] Existe la necesidad en la técnica de métodos de detección y análisis de polinucleótidos particulares en una muestra, y de composiciones y artículos de fabricación útiles en dichos métodos.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0004] Se proporcionan métodos, composiciones y artículos de fabricación para la detección y el análisis de un polinucleótido diana en una muestra.

30

[0005] En una primera realización, se pone en contacto una muestra sospechosa de contener el polinucleótido diana con un multicromóforo policatiónico y una proteína que se une a polinucleótido (PBP) sensor que puede unirse al polinucleótido diana. La PBP sensor comprende un cromóforo de señalización. Sin desear estar limitado por la teoría, en presencia de polinucleótido diana en la muestra, se cree que el cromóforo de señalización se aproxima al multicromóforo catiónico mediante la utilización de interacciones electrostáticas con el esqueleto del polinucleótido diana unido al PBP sensor (véase la figura 1). El cromóforo de señalización puede adquirir a continuación energía del multicromóforo policatiónico excitado y emitir luz que se puede detectar. El polinucleótido diana puede analizarse tal como se encuentra en la muestra, o se puede amplificar antes de o junto con el análisis.

35

40

[0006] Se proporcionan soluciones que comprenden reactivos útiles para realizar los métodos de la invención, como son kits que contienen dichos reactivos. Los métodos se pueden utilizar en las múltiples configuraciones en las que se utiliza una pluralidad de diferentes PBP sensor para el análisis de una pluralidad de diferentes polinucleótidos diana. Los métodos opcionalmente se pueden realizar en una superficie, por ejemplo, usando un multicromóforo policatiónico asociado a la superficie, la superficie puede ser un sensor. Los métodos también se pueden disponer en formatos homogéneos. Los métodos y artículos descritos en este documento se pueden utilizar como alternativas a otras técnicas para detectar polinucleótidos.

45

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

50

[0007]

La figura 1 representa el método de la invención, utilizando un polímero policatiónico como multicromóforo captador de luz. Una PBP sensor (PBP-C*) comprende un cromóforo de señalización y una especificidad de unión para el polinucleótido diana de interés. Tras ponerse en contacto el polinucleótido diana en una muestra, el multicromóforo policatiónico se aproxima al cromóforo de señalización debido a sus propias interacciones con el polinucleótido diana. La excitación del multicromóforo produce a continuación la emisión de luz del cromóforo de señalización.

55

La Figura 2 representa las estructuras moleculares de Tat-C* utilizadas en los ejemplos de trabajo (donde C* es la fluoresceína), ARN de TAR y ARN de dTAR.

60

La Figura 3 muestra los espectros ópticos del polímero 1 y Tat-C*. Las excitaciones se realizaron a 380 nm y 480 nm para el polímero 1 y Tat-C*, respectivamente. Las condiciones de ensayo son solución tampón de TRIS EDTA (10 mM) y pH = 7,4.

65

La Figura 4 muestra los espectros ópticos de oligómero 1 y Tat-C*. Las excitaciones se realizaron a 365 nm y 480

nm para el oligómero 1 y Tat-C*, respectivamente. Las condiciones de ensayo son solución tampón de TRIS EDTA (10 mM) y pH = 7,4.

5 La Figura 5 muestra los espectros ópticos del oligómero 2 y Tat-C*. Las excitaciones se realizaron a 375 nm y 480 nm para el oligómero 2 y Tat-C*, respectivamente. Las condiciones de ensayo son solución tampón de TRIS EDTA (10 mM) y pH = 7,4.

10 La Figura 6 muestra los espectros de emisión de Tat-C* en presencia de ARN de TAR y ARN de dTAR por excitación del oligómero 1 a 365 nm. Las condiciones son en solución tampón de TRIS EDTA (10 mM) y pH = 7,4. Los espectros se normalizan con respecto a la emisión del oligómero 1.

15 La figura 7 muestra los espectros de emisión de Tat-C* en presencia de ARN de TAR y ARN de dTAR por excitación del oligómero 2 a 375 nm. Las condiciones son en solución tampón TRIS EDTA (10 mM) y pH = 7,4. Los espectros se normalizan con respecto a la emisión del oligómero 2.

La Figura 8 muestra los espectros de emisión de Tat-C* en presencia de ARN de TAR y ARN de dTAR por excitación del polímero 1 a 380 nm. Las condiciones son en solución tampón TRIS EDTA (10 mM) y pH = 7,4. Los espectros se normalizan con respecto a la emisión del polímero 1.

20 La figura 9 muestra los espectros de emisión de SH3-C* y Tat-C* en presencia de ARN de TAR por excitación del oligómero 1 a 365 nm. Las condiciones son en solución tampón TRIS EDTA (10 mM) y pH = 7,4. Los espectros se normalizan con respecto a la emisión del oligómero 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 **[0008]** Las tecnologías actuales para sensores de ADN y ARN (incluyendo "chips de genes" y "chips de ADN") dependen de la unión covalente de etiquetas fluorescentes (lumóforos) a hebras individuales de ADN. La mayoría de estos sensores se ven obligados a confiar en el etiquetado de la muestra de analito, con los problemas inevitables que resultan de las variaciones en la eficacia de la reacción de marcaje de muestra, requiriendo calibraciones cruzadas complejas. Otros sistemas se basan en la estrategia de "sonda molecular", que requiere la unión de lumóforos e inhibidores a secuencias diseñadas de manera precisa.

30 **[0009]** Se proporciona un método para el análisis de polinucleótidos que comprende poner en contacto una muestra con por lo menos dos componentes: (a) un sistema multicromóforo luminiscente captador de luz, tal como, por ejemplo, un polímero conjugado, una estructura de semiconductor de punto cuántico o dendrítica que es soluble en agua, y (b) una PBP sensor conjugada con un cromóforo de señalización luminiscente ("PBP-C*"). La emisión de una longitud de onda de luz característica del cromóforo-C* de señalización tras la excitación del multicromóforo indica la presencia en la solución del polinucleótido diana. Mediante el uso de múltiples PBP sensores diferentes, cada uno con una secuencia de bases diferente y un cromóforo de señalización diferente (PBP1-C1*, PBP2-C2*, PBP3-C3*, PBP4-C4*, etc.), se pueden detectar y analizar de manera independiente múltiples polinucleótidos diferentes.

35 **[0010]** El cromóforo captador de luz y el cromóforo de señalización (C*) se eligen de manera que las bandas de absorción de los dos cromóforos tienen un solapamiento mínimo y de manera que los espectros de emisión luminiscente de las dos especies se encuentran a diferentes longitudes de onda. Cuando se prepara en solución acuosa, el sistema multicromóforo luminiscente captador de luz está cargado positivamente, o es catiónico, y es preferiblemente policatiónico (por ejemplo, un polielectrolito conjugado policatiónico). La PBP sensor y el multicromóforo se eligen de manera que existe una interacción mínima entre ellos en ausencia de la diana. Tras la adición de un polinucleótido diana que puede unirse a la PBP sensor, el polinucleótido diana forma un complejo con la PBP sensor. Debido a que el polinucleótido diana está cargado negativamente, la PBP sensor se asocia con el multicromóforo policatiónico, permitiendo la transferencia de energía desde el multicromóforo policatiónico al cromóforo de señalización, por ejemplo a través del mecanismo de transferencia de energía de Förster. Cuando se añade un polinucleótido que no se une a la PBP sensor, no se produce la formación de complejos entre el multicromóforo y la PBP sensor. Debido a que la distancia promedio entre el multicromóforo policatiónico y el cromóforo de señalización es demasiado grande para la transferencia de energía eficaz en ausencia de dicha formación de complejos, existe poca o ninguna emisión desde el cromóforo de señalización. El esquema general sirve para detectar la presencia del polinucleótido diana en la solución de ensayo.

40 **[0011]** Además del método descrito, la presente invención proporciona una solución predominantemente acuosa que comprende por lo menos dos componentes: (a) un multicromóforo catiónico, y (b) una "PBP sensor" (PBP-C*) que comprende una proteína que se une a polinucleótido conjugada con un cromóforo de señalización.

45 **[0012]** Tal como se demuestra en los Ejemplos, la amplificación óptica proporcionada por un multicromóforo soluble en agua, tal como un polímero conjugado, puede utilizarse para detectar la unión del polinucleótido a PBP sensor. La amplificación se puede mejorar mediante el uso de polímeros conjugados solubles en agua de peso molecular más elevado u otras estructuras como multicromóforo policatiónico tal como se describe en el presente documento.

La presente invención se puede proporcionar en un formato homogéneo que utiliza la facilidad de métodos de detección de fluorescencia. La presente invención se puede utilizar para detectar polinucleótidos diana amplificados o, debido a la gran amplificación de señal, como un ensayo independiente, sin necesidad de amplificación de polinucleótidos.

[0013] Las ventajas únicas de la presente invención con respecto a la tecnología actual de chips de genes incluyen de este modo la elusión del requisito de etiquetar primero cada muestra a analizar mediante acoplamiento covalente de lumóforos o cromóforos a los polinucleótidos contenidos o derivados de la muestra antes de su análisis. Estos métodos de acoplamiento tienen dificultades inherentes en la reproducibilidad de la eficacia de acoplamiento y dan lugar a la necesidad de una calibración cruzada entre muestra y muestra.

[0014] Las invenciones descritas en el presente documento son útiles para cualquier análisis en el que una muestra puede ser interrogada con respecto a un polinucleótido diana. Los análisis habituales implican la determinación de la presencia del polinucleótido diana en la muestra o su cantidad relativa, o los análisis pueden ser cuantitativos o semicuantitativos.

[0015] Los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo en múltiples formatos. Se puede utilizar un conjunto de diferentes PBP sensor para detectar los correspondientes polinucleótidos diana diferentes en una muestra mediante el uso de diferentes cromóforos de señalización conjugados a las PBP sensor respectivas. Se proporcionan múltiples métodos empleando 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 400 o más PBP sensor diferentes que se pueden utilizar simultáneamente para el análisis de los correspondientes polinucleótidos diana diferentes.

[0016] Los métodos se pueden realizar sobre un sustrato, así como en solución, aunque se espera que el formato de solución sea más rápido debido a cuestiones de difusión. De este modo, el análisis se puede realizar, por ejemplo, en un formato de matriz sobre un sustrato, que puede ser un sensor. Esto se puede lograr mediante el anclaje o de otro modo la incorporación de un componente de análisis sobre el sustrato, por ejemplo, la PBP sensor, el multicromóforo policatiónico, o ambos. Estos sustratos pueden ser superficies de vidrio, de silicio, de papel, de plástico, o las superficies de semiconductores optoelectrónicos (tales como, pero sin limitación, nitruro de galio dopado con indio o polianilinas poliméricas, etc.) empleadas como transductores optoelectrónicos. La ubicación de una PBP sensor determinada puede ser conocida o determinable en un formato de matriz, y el formato de matriz puede ser microdirigible o nanodirigible.

[0017] Antes de describir con más detalle la presente invención, se debe entender que la presente invención no se limita a la metodología, dispositivos, soluciones o aparatos particulares descritos, ya que dichos métodos, dispositivos, soluciones o aparatos pueden, naturalmente, variar. También se debe entender que la terminología usada en este documento es con el propósito de describir realizaciones particulares únicamente, y no se pretende limitar el alcance de la presente invención.

[0018] El uso de las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias a plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a "un polinucleótido diana" incluye un conjunto de polinucleótidos diana, la referencia a "un cromóforo de señalización" incluye un conjunto de dichos cromóforos, la referencia a "una PBP sensor" incluye un conjunto de PBP sensor, y similares. Además, el uso de referencias de plural específicas, tales como "dos", "tres", etc, se interpretan como un mayor número del mismo concepto a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0019] Los términos como "conectado", "unido" y "ligado" se utilizan indistintamente en este documento y abarcan la conexión, unión, ligado o conjugación directa, así como indirecta, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Cuando se menciona un intervalo de valores, debe entenderse que cada valor entero que interviene, y cada fracción del mismo, entre los límites superior e inferior indicados de ese intervalo, también se describen específicamente, junto con cada subintervalo entre estos valores. Los límites superior e inferior de cualquier intervalo pueden estar de manera independiente incluidos o excluidos del intervalo, y cada intervalo en el que se incluyen cualquiera de los dos, ninguno de los dos o ambos límites también se comprende dentro de la invención. Cuando un valor en cuestión tiene límites inherentes, por ejemplo, cuando un componente puede estar presente en una concentración de 0 a 100%, o cuando el pH de una solución acuosa puede variar de 1 a 14, estos límites inherentes están descritos específicamente. Cuando un valor se indica explícitamente, debe entenderse que los valores que son aproximadamente la misma cantidad o cuantía que el valor indicado están también dentro del alcance de la invención, ya que son intervalos basados en los mismos. Cuando se describe una combinación, cada subcombinación de los elementos de esa combinación también se describe específicamente y está dentro del alcance de la invención. En cambio, cuando se describen diferentes elementos o grupos de elementos, también se describen las combinaciones de los mismos. Cuando se describe cualquier elemento de la invención que tiene un conjunto de alternativas, también se describen por referencia ejemplos de la invención en los que cada alternativa se excluye individualmente o en cualquier combinación con las otras alternativas; más de un elemento de la invención puede tener dichas exclusiones, y se describen por referencia todas las combinaciones de elementos que tienen dichas exclusiones.

[0020] A menos que defina lo contrario o el contexto indique claramente lo contrario, todos los términos técnicos y

científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la invención, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación.

5 [0021] Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia con el propósito de divulgar y describir los materiales y metodologías específicos para los que se citó la referencia. Las publicaciones descritas en el presente documento se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anticipar dicha divulgación en virtud de una invención anterior.

DEFINICIONES

15 [0022] En la descripción de la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que estén definidos como se indica a continuación.

20 [0023] Los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, y pueden comprender ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, análogos de los mismos, o mezclas de los mismos. Estos términos se refieren sólo a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, los términos incluyen ácido desoxirribonucleico ("ADN") de triple, doble y de cadena sencilla, así como de triple, ácido ribonucleico ("ARN") de triple, doble y de cadena sencilla. También se incluyen formas modificadas del polinucleótido, por ejemplo, mediante alquilación, y/o mediante bloqueo, y formas no modificadas.

25 [0024] Ya sea modificado o no modificado, el nucleótido diana debe tener un esqueleto polianiónico, preferiblemente un esqueleto de azúcar-fosfato, de suficiente carga negativa para interactuar electrostáticamente con el multicromóforo policatiónico en los métodos descritos en el presente documento, aunque pueden participar adicionalmente otras fuerzas en la interacción. La PBS sensor es una proteína que se une a polinucleótidos que interactúan mínimamente con el multicromóforo en ausencia de la diana. Las condiciones de unión adecuadas para un formato de ensayo determinado pueden determinarse por un experto en la materia; los parámetros no limitantes que pueden ajustarse incluyen las concentraciones de componentes de análisis, pH, sales usadas y su concentración, fuerza iónica, temperatura, etc

35 [0025] Más particularmente, los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" incluyen polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), incluyendo ARNt, ARNr, ARNh, y ARNm, ya sean empalmado o no, cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N- o C-glicósido de una base de purina o pirimidina, y otros polímeros que contienen un fosfato u otro esqueleto polianiónico, y otros polímeros sintéticos de ácido nucleico específicos de secuencia siempre que los polímeros contengan nucleobases en una configuración que permita el apareamiento de las bases y el apilamiento de bases, tal como se encuentran en el ADN y el ARN. No hay una distinción prevista en la longitud entre los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico," y estos términos se utilizan indistintamente en este documento. Estos términos se refieren sólo a la estructura primaria de la molécula. Por lo tanto, estos términos incluyen, por ejemplo, 3'-desoxi-2',5'-ADN, oligodesoxirribonucleótido N3' P5' fosforamidatos, ARN sustituido con 2'-O-alkilo, ADN de doble y de cadena sencilla, así como ARN de doble y de cadena sencilla, e híbridos de los mismos, incluyendo, por ejemplo, híbridos entre ADN y ARN, y también incluyen tipos conocidos de modificaciones, por ejemplo, marcadores, alquilación, "agente de terminación", sustitución de uno o más de los nucleótidos con un análogo, modificaciones internucleótidos, tales como, por ejemplo, aquellos con enlaces cargados negativamente (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc), aquellos que contienen grupos colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (incluyendo enzimas (por ejemplo, nucleasas), toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc), aquellos que contienen quelatos (de, por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc), así como formas no modificadas del polinucleótido u oligonucleótido.

55 [0026] Se entenderá que, tal como se usa en el presente documento, los términos "nucleósido" y "nucleótido" incluirán aquellos grupos que contienen no sólo las bases de purina y pirimidina conocidas, sino también otras bases heterocíclicas que han sido modificadas. Dichas modificaciones incluyen purinas o pirimidinas metiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros heterociclos. Los nucleósidos o nucleótidos modificados pueden incluir también modificaciones en el grupo azúcar, por ejemplo, en el que uno o más de los grupos hidroxilo se reemplazan por halógeno, grupos alifáticos, o están funcionalizados como éteres, aminas, o similares. El término "unidad nucleotídica" pretende abarcar nucleósidos y nucleótidos.

65 [0027] Además, las modificaciones de unidades nucleotídicas incluyen la reordenación, adición, sustitución o en cualquier caso la alteración de los grupos funcionales en la base de purina o pirimidina que forman enlaces de hidrógeno con una pirimidina o purina complementaria respectiva. La unidad nucleotídica modificada resultante puede formar opcionalmente un par de bases con otras de dichas unidades nucleotídicas modificadas, pero no

con A, T, C, G o U. Se pueden incorporar sitios abásicos que no impidan la función del polinucleótido; preferiblemente, el polinucleótido no comprende sitios abásicos. Algunos o todos los residuos en el polinucleótido opcionalmente se pueden modificar de una o más maneras.

5 **[0028]** Los pares de bases estándar AT y GC se forman bajo condiciones que permiten la formación de enlaces de hidrógeno entre N3-H y C4-oxi de timidina y N1 y C6-NH₂, respectivamente, de la adenosina y entre C2-oxi, N3 y C4-NH₂, de la citidina y C2-NH₂, N'-H y C6-oxi, respectivamente, de guanosina. De este modo, por ejemplo, la guanosina (2-amino-6-oxi-9-[beta]-D-ribofuranosil-purina) puede modificarse para formar isoguanosina (2-oxi-6-amino-9-[beta]-D-ribofuranosil-purina). Dicha modificación da como resultado una base de nucleósido que no
10 formará ya de forma eficaz un par de bases estándar con citosina. Sin embargo, la modificación de la citosina (1-[beta]-D-ribofuranosil-2-oxi-4-amino-pirimidina) para formar isocitosina (1-[beta]-D-ribofuranosil-2-amino-4-oxipirimidina) da como resultado un nucleótido modificado que no formará un par de bases de forma eficaz con guanosina pero formará un par de bases con isoguanosina. La isocitosina está disponible de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO); la isocitidina puede prepararse mediante el método descrito por Switzer et al. (1993) *Biochemistry* 32:10489-10496 y las referencias citadas en el mismo; la 2'-desoxi-5-metil-isocitidina puede prepararse mediante el
15 método de Tor et al. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115:4461-4467 y las referencias citadas en el mismo, y los nucleótidos de isoguanina pueden prepararse usando el método descrito por Switzer et al. (1993), supra, y Mantsch et al. (1993) *Biochem.* 14:5593-5601, o por el método descrito en la Patente de EE.UU. N° 5.780.610 de Collins et al. Se pueden sintetizar otros pares de bases no naturales por el método descrito en Piccirilli et al. (1990) *Nature* 343:33-37 para la síntesis de 2,6-diaminopirimidina y su complemento (1-metilpirazolo-[4,3] pirimidina-5,7- (4H, 6H)-diona). Se conocen otras de dichas unidades nucleotídicas modificadas que forman pares de bases únicas, tales como las descritas en Leach et al. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:3675-3683 y Switzer et al., supra.

25 **[0029]** "Complementario" o "sustancialmente complementario" se refiere a la capacidad de hibridarse o emparejar bases entre nucleótidos o ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, entre una proteína que se une a polinucleótido sensor y un polinucleótido diana. Los nucleótidos complementarios son, generalmente, A y T (o A y U), o C y G. Se dice que dos polinucleótidos de cadena simple son sustancialmente complementarios cuando las bases de una cadena, óptimamente alineadas y comparadas y con inserciones o deleciones apropiadas, se empareja con al menos aproximadamente el 80% de las bases de la otra cadena, habitualmente al menos aproximadamente del 90%
30 al 95%, y más preferiblemente de aproximadamente el 98 a 100%.

[0030] Alternativamente, existe una complementariedad sustancial cuando un polinucleótido o PNA se hibridará bajo condiciones de hibridación selectivas a su complemento. Habitualmente, la hibridación selectiva se producirá cuando haya al menos aproximadamente el 65% de complementariedad sobre un tramo de al menos 14 a 25 bases, preferiblemente de al menos aproximadamente el 75%, más preferiblemente de al menos aproximadamente el 90% de complementariedad. Véase, M. Kanehisa *Nucleic Acids Res.* 12:203 (1984).

40 **[0031]** "Unión preferencial" o "hibridación preferencial" se refiere al aumento de la tendencia de un miembro de un par de unión de unirse a su pareja de unión en comparación con otro componente de la muestra.

[0032] Las condiciones de hibridación incluirán habitualmente concentraciones de sal inferiores a aproximadamente 1 M, más habitualmente inferiores a aproximadamente 500 mM y preferiblemente inferiores a aproximadamente 200 mM. En el caso de la hibridación entre un ácido nucleico peptídico y un polinucleótido, la hibridación se puede realizar en soluciones que contienen poco o nada de sal. Las temperaturas de hibridación pueden ser como mínimo de 5°C, pero habitualmente son superiores a 22°C, más habitualmente superior a aproximadamente 30°C, y preferiblemente superior a aproximadamente 37°C. Los fragmentos más largos pueden requerir temperaturas de hibridación más altas para la hibridación específica. Otros factores pueden afectar a la rigurosidad de la hibridación, incluyendo la composición de las bases y la longitud de las cadenas complementarias, la presencia de disolventes orgánicos y el grado de desapareamiento de las bases, y la combinación de parámetros usados es más importante que la medida absoluta de uno cualquiera solo. Otras condiciones de hibridación que se pueden controlar incluyen el tipo de tampón y la concentración, pH de la solución, presencia y concentración de reactivos de bloqueo para reducir la unión base, tal como secuencias repetidas, o el bloqueo de las soluciones de proteínas, el tipo o tipos de detergentes y concentraciones, moléculas, tales como polímeros que aumentan la concentración relativa de los polinucleótidos, ion o iones de metales y su concentración o concentraciones, agente o agentes quelantes y sus
55 concentraciones y otras condiciones conocidas en la técnica.

[0033] "Múltiples" en el presente documento se refiere a un análisis u otro método analítico en el que múltiples analitos pueden analizarse simultáneamente.

60 **[0034]** "Opcional" u "opcionalmente" significa que puede producirse o no el evento o circunstancia descritos a continuación y que la descripción incluye casos en los que el evento o circunstancia tiene lugar y casos en los que no.

[0035] Se proporciona un polinucleótido sensor que comprende dos componentes: (a) un multicromóforo policatiónico soluble en agua luminiscente captador de luz, tal como un polímero conjugado, oligómero o molécula dendrítica; (b) una proteína que se une a polinucleótido sensor o un fragmento de unión de la misma marcada con

un cromóforo de señalización luminiscente (PBP-C*). La unión de PBP-C* a un polinucleótido diana da como resultado la formación de un complejo de carga negativa suficiente para interactuar con el multicromóforo policatiónico. Las interacciones electrostáticas (e hidrofóbicas) con la molécula catiónica captadora de luz aproxima el cromóforo de señalización (C*) a la molécula captadora de luz. La excitación de la molécula captadora de luz en la frecuencia apropiada da lugar a la transferencia de energía al cromóforo de señalización. La emisión de C* confirma la unión entre PBP-C* y el polinucleótido diana. Si las interacciones sensor-diana son específicas, entonces la emisión de C* corresponde a la presencia de una secuencia específica de ADN o ARN en solución.

[0036] En la figura 1 se muestra un diagrama esquemático de la operación del sensor. En solución acuosa, existe una mínima interacción entre las moléculas catiónicas captadoras de luz (que se muestran en negro) y la sonda PBP-C* (en rojo). La PBP y la molécula captadora de luz se eligen de modo que no interactúen significativamente en ausencia de la diana. Tras la adición de una muestra que contiene polinucleótidos, pueden tener lugar dos situaciones. La situación A muestra los resultados de la unión de PBP-C* de señalización al polinucleótido diana (en azul). Bajo estas condiciones, el complejo de ADN-PBP-C* o ARN-PBP-C* cargado negativamente se asocia mediante múltiples interacciones electrostáticas con las moléculas conjugadas cargadas positivamente captadoras de luz. La proximidad resultante da lugar a la transferencia de energía de las moléculas conjugadas captadoras de luz al cromóforo de señalización de PBP-C*, por ejemplo a través del mecanismo de transferencia de energía de Förster^{10,11}. La emisión de luz con longitud de onda característica de C* de señalización indica el reconocimiento entre la proteína y el ARN o ADN. Cuando está presente un polinucleótido que no interactúa con el PBP-C* (en verde), el PBP-C* no es adyacente a una macromolécula cargada negativamente y la distancia entre la molécula captadora de luz catiónica y C* es demasiado grande para la transferencia de energía (situación B).

[0037] Como ejemplo de trabajo específico del sensor se han utilizado los dos componentes siguientes: (a) moléculas conjugadas solubles en agua luminiscentes captadoras de luz, tales como polímeros conjugados y oligómeros conjugados; (b) un péptido de 16 residuos marcado con un cromóforo de señalización luminiscente en el extremo N-terminal (Tat-C*). Las moléculas captadoras de luz y el cromóforo de señalización (C*) son elegidos de manera que los espectros de emisión luminiscente de las dos especies se encuentran en diferentes longitudes de onda y de manera que la absorción de C* se superpone con la emisión de las especies captadoras de luz. Tras la adición de ARN de TAR, el péptido de señalización Tat-C* se une específicamente con ARN de TAR. El complejo ARN de TAR/Tat-C* cargado negativamente se asocia a continuación con las moléculas conjugadas captadoras de luz cargadas positivamente (situación A). La proximidad resultante da lugar a la transferencia de energía de las moléculas conjugadas captadoras de luz al cromóforo de señalización de Tat-C*. La emisión de luz con una longitud de onda característica del Tat-C* de señalización indica la presencia de ARN de TAR de VIH. Cuando se utiliza un ARN que no interactúa con Tat, el ARN y la molécula catiónica interactúan, aunque no hay transferencia de energía a C*.

[0038] El desarrollo de tecnologías fiables para la detección del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) es de interés clínico significativo.^{12,13,14,15} Las tecnologías de detección tradicionales para la infección por VIH es una prueba de ELISA para el anticuerpo de VIH, en la que los antígenos virales se adsorben sobre una fase sólida.^{22,16} Para esta tarea también es habitual una separación electroforética por acoplamiento con un ensayo de transferencia western con detección de radioisótopos.^{22,17} Los inconvenientes de estas tecnologías incluyen la instrumentación compleja, el tiempo requerido para el ensayo y las complicaciones causadas por la vida media corta y la naturaleza peligrosa de sondas radiomarcadas. Para la detección del virus de VIH son muy deseables métodos de tiempo real, simples, muy sensibles y específicos.

[0039] La secuencia de ARN del elemento sensible a transactivación (TAR) del VIH se expresa en altos niveles en las células infectadas por virus.¹⁸ La capacidad de monitorizar convenientemente el ARN de TAR en tiempo real tal como se describe en el presente documento proporciona un método viable para la detección rápida de la presencia del virus del VIH. Amplios estudios demuestran que la proteína transactivada (Tat) se une al ARN de TAR con gran especificidad y una afinidad de aproximadamente 1 nM, para formar complejos bien definidos estables.^{19,20,21} La unión específica de Tat a ARN de TAR desencadena así la transducción de señales para la detección en tiempo real clínicamente relevante de VIH usando los métodos descritos en el presente documento.

[0040] Los ejemplos de trabajo demuestran un nuevo sensor bioóptico de VIH que acopla la especificidad de unión y pliegue del péptido TAT al ARN de TAR con una gran amplificación óptica de polímeros y oligómeros conjugados. El sensor de ARN del VIH comprende dos componentes: (a) moléculas conjugadas solubles en agua luminiscentes captadoras de luz, tales como polímeros conjugados y oligómeros conjugados; (b) un péptido de 16 residuos marcado con un cromóforo de señalización luminiscente en el extremo N-terminal (Tat-C*). La unión del péptido de la sonda y las moléculas conjugadas luminiscentes al ARN de TAR da lugar a la formación de un complejo e introduce transferencia de energía de las moléculas conjugadas a Tat-C*. La emisión de luz con longitud de onda característica del Tat-C* de señalización indica la presencia de ARN de TAR de VIH-1.

[0041] Tal como se demuestra en los ejemplos, la amplificación óptica de las moléculas conjugadas solubles en agua se puede utilizar para detectar la presencia de ARN del TAR del VIH. La presente invención se puede usar en un formato homogéneo que utiliza la facilidad de métodos de detección de fluorescencia y el comportamiento de unión específica que se encuentra en las interacciones de proteína-polinucleótidos, tales como interacciones de

ARN de TAR-Tat y proporciona la capacidad de detectar ARN del TAR en tiempo real. Las estructuras de péptido Tat, ARN de TAR y ARN de dTAR utilizadas en los ejemplos de trabajo se muestran en la Figura 2 (con los aminoácidos mostrados en código de una letra para Tat-C*).

5 **[0042]** Tal como se muestra por Förster²², las interacciones dipolo-dipolo conducen a una transferencia de energía de resonancia de intervalo largo (FRET) de un cromóforo donante a un cromóforo aceptor. La eficacia de la transferencia de energía (E) es proporcional a $1/r^6$, donde r es la distancia donante-aceptor, y la integral de solapamiento, tal como se muestra en la Ecuación 1.

10

$$E \propto \frac{1}{r^6} \cdot \int_0^{\infty} \sigma_{FD}(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1)$$

15

El requisito de distancia para la transferencia de energía en los métodos descritos en el presente documento estará controlado por las interacciones en la Figura 1. La integral de solapamiento expresa la superposición espectral entre la emisión del donante y la absorción del aceptor²³. Tal como se ejemplifica en el presente documento, los componentes del sensor pueden ser elegidos de manera que sus propiedades ópticas cumplen con este requisito.

20

LA MUESTRA

25 **[0043]** La parte de la muestra que comprende o se sospecha que comprende el polinucleótido diana puede ser cualquier fuente de material biológico que comprenda polinucleótidos que se pueden obtener a partir de un organismo vivo directa o indirectamente, incluyendo células, tejido o fluido, y los depósitos dejados por ese organismo, incluidos los virus, micoplasma y fósiles. La muestra puede comprender un polinucleótido diana preparado mediante medios sintéticos, de forma global o en parte. Habitualmente, la muestra se obtiene como un medio predominantemente acuoso o se dispersa en el mismo. Los ejemplos no limitantes de la muestra incluyen sangre, orina, semen, leche, esputo, moco, un hisopo bucal, un frotis vaginal, un hisopo rectal, un aspirado, una biopsia con aguja, una sección de tejido obtenida, por ejemplo, mediante cirugía o autopsia, plasma, suero, fluido espinal, fluido linfático, las secreciones externas de la piel, tractos respiratorio, intestinal, y genitourinario, lágrimas, saliva, tumores, órganos, muestras de constituyentes de cultivos in vitro de células (incluyendo, pero sin limitación, medio condicionado resultante del crecimiento de las células en un medio de cultivo celular, células supuestamente infectadas por virus, células recombinantes, y componentes celulares), y una biblioteca recombinante que comprende secuencias de polinucleótidos.

35

[0044] La muestra puede ser una muestra de control positivo que se sabe que contiene el polinucleótido diana o un sustituto para el mismo. También se puede utilizar una muestra de control negativo que, aunque no se espera que contenga el polinucleótido diana, se sospecha de que lo contiene (a través de la contaminación de uno o más de los reactivos) u otro componente capaz de producir un falso positivo, y se prueba con el fin de confirmar la ausencia de contaminación por el polinucleótido diana de los reactivos utilizados en un ensayo determinado, así como para determinar si un conjunto determinado de condiciones de ensayo produce falsos positivos (una señal positiva incluso en ausencia de polinucleótido diana en la muestra).

40

45 **[0045]** La muestra puede diluirse, disolverse, suspenderse, extraerse o tratarse de otro modo para solubilizar y/o purificar cualquier polinucleótido diana presente o volverlo accesible a los reactivos que se usan en un esquema de amplificación o a reactivos de detección. Cuando la muestra contiene células, las células se pueden lisar o permeabilizar para liberar los polinucleótidos dentro de las células. Se pueden utilizar tampones de permeabilización de una etapa para lisar células que permiten realizar etapas posteriores directamente después de la lisis, por ejemplo una reacción en cadena de la polimerasa.

50

EL POLINUCLEÓTIPO DIANA Y LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN PRODUCIDOS A PARTIR DEL MISMO

55 **[0046]** El polinucleótido diana puede ser de cadena sencilla, de cadena doble, o de orden superior, y puede ser lineal o circular. Los ejemplos de polinucleótidos diana de cadena sencilla incluyen genomas virales con ARNm, ARNr, ARNt, ARNhn, ARNss o ADNss, aunque estos polinucleótidos pueden contener secuencias internamente complementarias y una estructura secundaria significativa. Los ejemplos de polinucleótidos diana de doble cadena incluyen genomas virales con ADN genómico, ADN mitocondrial, ADN de cloroplasto, ARNds o ADNds, plásmidos, fagos, y viroides. El polinucleótido diana puede prepararse sintéticamente o purificarse a partir de una fuente biológica. El polinucleótido diana puede purificarse para eliminar o disminuir uno o más componentes no deseados de la muestra o para concentrar el polinucleótido diana. En cambio, cuando el polinucleótido diana está demasiado concentrado para el ensayo particular, el polinucleótido diana se puede diluir.

60

[0047] Después de la recogida de la muestra y la extracción opcional de ácido nucleico, la parte de ácido nucleico de la muestra que comprende el polinucleótido diana puede someterse a una o más reacciones preparativas. Estas reacciones preparativas pueden incluir la transcripción in vitro (IVT), el marcaje, la fragmentación, la amplificación y

65

otras reacciones. En primer lugar, el ARNm puede tratarse con la transcriptasa inversa y un cebador para crear ADNc antes de la detección y/o amplificación; esto se puede realizar in vitro con ARNm purificado o in situ, por ejemplo, en células o tejidos fijados a un portamuestras. La amplificación de ácidos nucleicos aumenta el número de copias de secuencias de interés, tales como el polinucleótido diana. Existe una variedad de métodos de amplificación adecuados para su uso, incluyendo el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), replicación de secuencia autosostenida (3SR), la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), el uso de Q Beta replicasa, la transcripción inversa, "nick translation", y similares.

5 [0048] Cuando el polinucleótido diana es de cadena sencilla y se va a amplificar, el primer ciclo de amplificación forma un producto de extensión del cebador complementario al polinucleótido diana. Si el polinucleótido diana es ARN de cadena sencilla, se utiliza una polimerasa con actividad de transcriptasa inversa en la primera amplificación para transcribir inversamente el ARN a ADN, y se pueden realizar ciclos de amplificación adicionales para copiar los productos de extensión del cebador. Los cebadores para una PCR deben, naturalmente, estar diseñados para hibridarse con las regiones en su correspondiente plantilla que producirán un segmento amplificable; de este modo, cada cebador debe hibridarse de manera que su nucleótido 3' se empareja a un nucleótido en su cadena molde complementaria que está situado en 3' del nucleótido 3' del cebador utilizado para replicar la cadena molde complementaria en la PCR.

10 [0049] El polinucleótido diana se amplifica habitualmente poniendo en contacto una o más cadenas del polinucleótido diana con un cebador y una polimerasa que tiene actividad adecuada para extender el cebador y copiar el polinucleótido diana para producir un polinucleótido complementario de longitud completa o una parte más pequeña del mismo. Se puede utilizar cualquier enzima que tiene una actividad de la polimerasa que puede copiar el polinucleótido diana, incluyendo ADN polimerasas, ARN polimerasas, transcriptasas inversas, enzimas que tienen más de un tipo de actividad de la polimerasa, y la enzima puede ser termolábil o termoestable. También se pueden utilizar mezclas de enzimas. Los enzimas de ejemplo incluyen: ADN polimerasas, tales como ADN polimerasa I ("Pol I"), el fragmento Klenow de Pol I, ADN polimerasas de T4, T7, Sequenase® T7, Sequenase® Versión 2.0 T7, *Tub*, *Taq*, *Tth*, *Pfx*, *Pfu*, *TSP*, *Tfl*, *Tli* y GB-D de *Pyrococcus sp*; ARN polimerasas, tales como ARN polimerasas de *E. coli*, SP6, T3 y T7, y transcriptasas inversas, tales como transcriptasas inversas de AMV, M-MuLV, MMLV, ARNasa H-MMLV (SuperScript®), SuperScript® II, ThermoScript®, VIH-1, y RAV2. Todas estas enzimas están disponibles comercialmente. Las polimerasas de ejemplo con múltiples especificidades incluyen las (exo-)polimerasas RAV2 y *Tli*. Las polimerasas termoestables de ejemplo incluyen ADN polimerasas de *Tub*, *Taq*, *Tth*, *Pfx*, *Pfu*, *Tsp*, *Tfl*, *Tli* y GB-D de *Pyrococcus sp*.

20 [0050] Las condiciones de reacción adecuadas se eligen para permitir la amplificación del polinucleótido diana, incluyendo el pH, tampón, fuerza iónica, la presencia y concentración de una o más sales, presencia y concentración de reactivos y cofactores, tales como nucleótidos y magnesio y/u otros iones metálicos (por ejemplo, manganeso), codisolventes opcionales, temperatura, perfil de ciclado térmico para esquemas de amplificación que comprende una reacción en cadena de la polimerasa, y puede depender en parte de la polimerasa que se utiliza, así como de la naturaleza de la muestra. Los codisolventes incluyen formamida (normalmente de aproximadamente 2 a aproximadamente 10%), glicerol (normalmente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10%), y DMSO (normalmente de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 10%). Se pueden utilizar técnicas en el esquema de amplificación con el fin de minimizar la producción de falsos positivos o artefactos producidos durante la amplificación. Éstas incluyen PCR "touchdown", técnicas "hot-start", uso de cebadores anidados, o el diseño de cebadores de PCR de modo que formen estructuras de tallo-bucle en el caso de la formación de cebador-dímero y por lo tanto no se amplifican. Se pueden utilizar técnicas para acelerar la PCR, por ejemplo, PCR centrífuga, que permite una mayor convección dentro de la muestra, y que comprende etapas de calentamiento por infrarrojos para un rápido calentamiento y enfriamiento de la muestra. Se pueden realizar uno o más ciclos de amplificación. Se puede utilizar un exceso de un cebador para producir un exceso de un producto de extensión del cebador durante la PCR; preferiblemente, el producto de extensión del cebador producido en exceso es el producto de amplificación a detectar. Se puede utilizar un conjunto de diferentes cebadores para amplificar diferentes polinucleótidos diana o diferentes regiones de un polinucleótido diana particular en la muestra.

35 [0051] Los polinucleótidos diana amplificados pueden someterse a tratamientos después de la amplificación. Por ejemplo, en algunos casos, puede ser deseable fragmentar el polinucleótido diana antes de la hibridación con el fin de proporcionar segmentos que son más fácilmente accesibles. La fragmentación de los ácidos nucleicos puede llevarse a cabo mediante cualquier método de producción de fragmentos de un tamaño útil en el ensayo que se realiza; son conocidos en la técnica métodos físicos, químicos y enzimáticos adecuados.

40 [0052] Se puede realizar una reacción de amplificación bajo condiciones que permitan al PBP sensor unirse al producto de amplificación durante por lo menos parte de un ciclo de amplificación. Cuando se realiza el ensayo de este modo, la detección en tiempo real de esta hibridación puede tener lugar mediante la monitorización de un cambio en la emisión de luz del cromóforo de señalización que tiene lugar tras dicha hibridación durante el esquema de amplificación.

65 EL MULTICROMÓFORO POLICATIÓNICO

5 [0053] Se ha demostrado que los sistemas multicromóforos captadores de luz son absorbentes de luz eficientes debido a los múltiples cromóforos que comprenden. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, polímeros conjugados, agregados de moléculas conjugadas, colorantes luminiscentes unidos a través de cadenas laterales a polímeros saturados, puntos cuánticos semiconductores y estructuras dendríticas. Por ejemplo, cada unidad de repetición en un polímero conjugado puede considerarse como un cromóforo contribuyente, los puntos cuánticos se componen de muchos átomos, un polímero saturado se puede funcionalizar con muchas moléculas de colorante luminiscente en las cadenas laterales, y los dendrímeros puede sintetizarse conteniendo muchos cromóforos individuales unidos covalentemente. La unión de ensamblajes de cromóforos sobre soportes sólidos, tales como microesferas de polímero o superficies, también se puede utilizar para la captación de luz.

15 [0054] Los sistemas multicromóforos de captación de luz pueden transferir eficientemente la energía a especies cercanas luminiscentes (por ejemplo, "cromóforos de señalización"). Los mecanismos para la transferencia de energía incluyen, por ejemplo, la transferencia de energía de resonancia (transferencia de energía de resonancia Förster (o fluorescencia), FRET), intercambio de carga cuántica (transferencia de energía Dexter) y similares. Habitualmente, sin embargo, estos mecanismos de transferencia de energía son de intervalo relativamente corto; es decir, se requiere una estrecha proximidad del sistema multicromóforos captador de luz al cromóforo de señalización para una transferencia de energía eficiente. Bajo condiciones para la transferencia de energía eficiente, la amplificación de la emisión desde el cromóforo de señalización se produce cuando la capacidad de absorción global del multicromóforo supera la del cromóforo de señalización, por ejemplo, cuando el número de cromóforos individuales en el sistema multicromóforo captador de luz es grande; es decir, la emisión del cromóforo de señalización es más intensa cuando la luz incidente (la "luz de bombeo") está en una longitud de onda que es absorbida por el sistema multicromóforo captador de luz que cuando el cromóforo de señalización se excita directamente por la luz de bombeo.

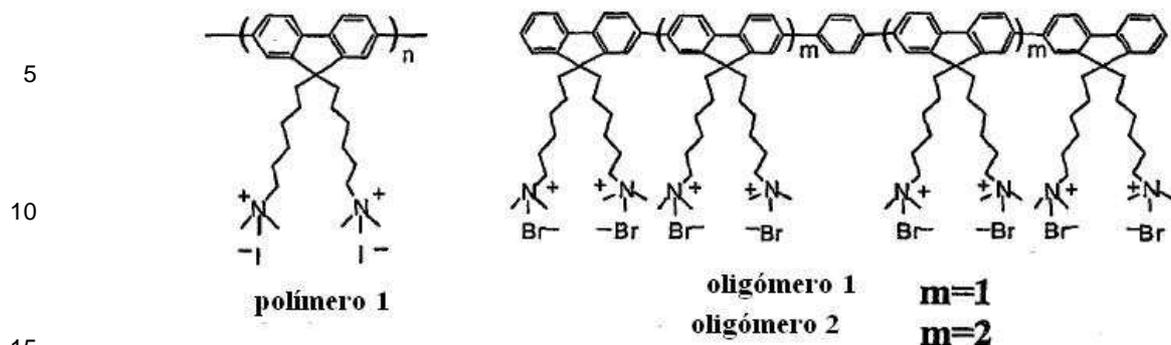
25 [0055] Los polímeros conjugados (CP) se caracterizan por una estructura electrónica deslocalizada y se pueden utilizar como informadores ópticos muy sensibles para dianas químicas y biológicas.^{24,25} Debido a que la longitud efectiva de conjugación es sustancialmente más corta que la longitud de la cadena de polímero, el esqueleto contiene un gran número de segmentos conjugados en estrecha proximidad. De este modo, los polímeros conjugados son eficientes para la captación de luz y permiten la amplificación óptica a través de la transferencia de energía Förster.²⁶ Los CP solubles en agua muestran eficiencias de inhibición de la fluorescencia excepcionales en presencia de aceptores de carga opuesta y son de particular interés para la transducción de casos de reconocimiento biológico.^{27,28}

35 [0056] Se ha descrito la formación espontánea de complejos entre polímeros entre polielectrolitos catiónicos y ADN ha sido descrito y es ampliamente el resultado de las fuerzas electrostáticas de cooperación.^{29,30,31} Las interacciones hidrofóbicas entre las unidades de polímeros aromáticos y bases de ADN también se han reconocido recientemente.^{32,33} La energía libre de las interacciones de polielectrolito/ADN está controlada por la estructura de las especies que participan utilizadas en conjunción con las variables de la solución, tales como pH, fuerza iónica, y temperatura.³⁴ La fuerza y la especificidad de estas interacciones recientemente se ha coordinado para reconocer la estructura terciaria de ADN plásmido.³⁵

45 [0057] Los multicromóforos utilizados en la presente invención son policatiónicos de manera que puedan interactuar con un polinucleótido diana electrostáticamente y con ello aproximar un cromóforo de señalización en una PBP sensor no cargada a la recepción de energía debido a la unión entre la PBP sensor y el polinucleótido diana. En los métodos descritos se puede utilizar cualquier multicromóforo policatiónico que pueda absorber luz y transferir energía a un cromóforo de señalización en una PBP sensor. Los multicromóforos de ejemplo que se pueden usar incluyen polímeros conjugados, polímeros saturados o dendrímeros que incorporan múltiples cromóforos de cualquier manera factible, y nanocristales semiconductores (SCNC). Los polímeros conjugados, polímeros saturados y dendrímeros se pueden preparar para incorporar múltiples especies catiónicas o pueden derivatizarse para hacerlos policatiónicos después de la síntesis; los nanocristales semiconductores se pueden hacer policatiónicos mediante la adición de especies catiónicas a su superficie.

55 [0058] En una realización preferida, se utiliza un polímero conjugado como multicromóforo policatiónico.

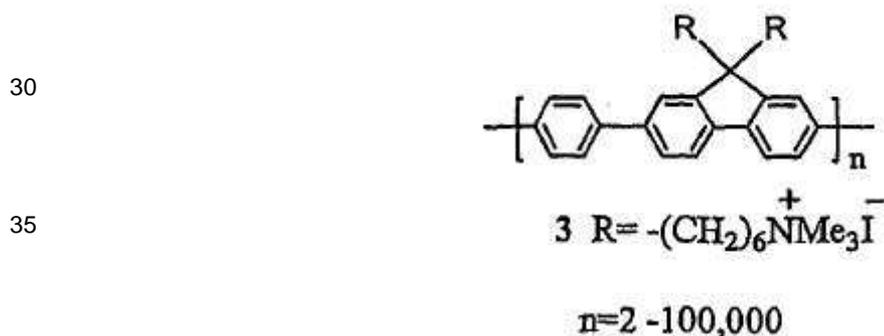
[0059] Los multicromóforos policatiónicos de ejemplo se muestran a continuación, donde las moléculas conjugadas catiónicas solubles en agua son el polímero 1 (donde $n = 2-100.000$), el oligómero 1 y el oligómero 2. Esta estructura molecular específica no es crítica; se puede utilizar cualquier molécula captadora de luz catiónica soluble en agua.



[0060] Estructura molecular de moléculas conjugadas luminiscentes catiónicas solubles en agua.

20 [0061] Otro ejemplo se muestra en el polímero 3 en el que el polímero conjugado catiónico soluble en agua es poli ((9,9-bis (6'-NNN-trimetilamonio)-hexil)-fluoreno fenileno) con contraiones de yoduro (indicado a continuación como el polímero 3).³⁶ El tamaño particular de este polímero no es crítico, siempre que sea capaz de absorber la luz y transferir energía a los cromóforos de señalización aproximados. Los valores típicos de "n" se encuentran dentro del intervalo de dos a aproximadamente 100.000. Esta estructura molecular específica no es crítica; se puede utilizar cualquier polímero conjugado catiónico soluble en agua con relativamente alta eficiencia cuántica de luminiscencia.

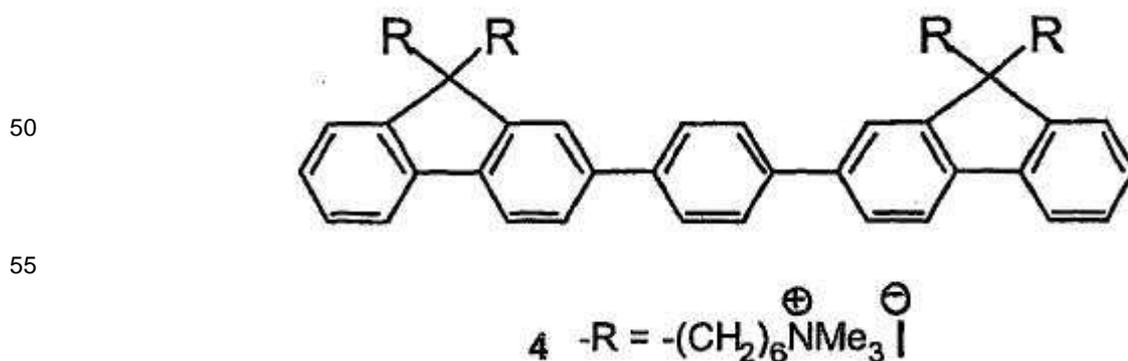
25



40

[0062] También se pueden utilizar oligómeros conjugados solubles en agua como multicromóforo policatiónico. A continuación se muestra un ejemplo de dicho oligómero conjugado luminiscente catiónico soluble en agua con contraiones de yoduro (indicado en el presente documento como oligómero 4):

45



60

[0063] Aunque el oligómeros 4 más pequeño no muestra la gran amplificación de la señal característica de un polímero de alto peso molecular, dichas moléculas más pequeñas son útiles para deconvolutar las relaciones de propiedades de la estructura, que son difíciles de determinar con la polidispersidad inherente y las variaciones de lote a lote halladas en los polímeros. Además, en medios acuosos, los oligómeros, tales como 4, son más solubles que sus homólogos poliméricos, y se espera que las interacciones hidrófobas sean menos importantes para 4 que para estructuras de polímero. De este modo, pueden ser deseables ensamblajes de oligómeros para aplicaciones

65

específicas.

LA PBP SENSOR

5 **[0064]** Se proporciona una PBP sensor que se une al polinucleótido diana a analizar. Se conocen métodos químicos para unir el cromóforo de señalización a la PBP sensor. Las estructuras de PBP sensor específicas, incluyendo las estructuras conjugadas a cromóforos, se pueden hacer a medida utilizando fuentes comerciales o se pueden sintetizar químicamente.

10 **[0065]** Se puede utilizar en los métodos descritos cualquier proteína que pueda unirse a un polinucleótido diana de interés. Los ejemplos no limitantes de PBP incluyen proteínas de unión al ADN, incluyendo factores de transcripción, factores de empalme, proteínas de unión a poli(A), componentes de la cromatina, proteínas virales, proteínas que detectan la infección viral, factores de replicación, y proteínas implicadas en la división celular mitótica y/o meiótica. Las interacciones proteína-ARN median en importantes procesos celulares que incluyen la transcripción, modificación post-transcripcional, empalme de ARN y la traducción^{37,38,39,40}. El ciclo de replicación de muchos virus patógenos, tales como el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)⁴¹, picornavirus⁴² y el virus de la gripe⁴³, se basa en interacciones específicas proteína-ARN. La especificidad de tales interacciones se puede utilizar como la base para sensores específicos de secuencia para la utilidad en el diagnóstico médico y estudios de genómica. Las proteínas de unión a polinucleótido de ejemplo incluyen proteínas dedo de zinc, proteínas homeodominio, proteínas de hélice alada (forkhead), proteínas leucina-cremallera, proteínas hélice-bucle-hélice, proteínas hélice-giro-hélice, y las proteínas de tipo histona.

20 **[0066]** Las PBP se pueden aislar a partir de una fuente de células, o se pueden producir in vitro, por ejemplo a través de métodos in vitro de transcripción/traducción o a través de métodos completamente sintéticos. Las PBP pueden ser proteínas naturales, mutantes de proteínas de origen natural, proteínas producidas aleatoriamente producidas, por ejemplo, por métodos de evolución molecular, o proteínas de unión a polinucleótido sospechosas de especificidad de unión desconocida.

30 **[0067]** Una de las razones de que la monitorización de las interacciones ARN/proteína puede ser importante es que las estructuras de proteínas pueden servir como antibióticos que inhiben la función del ARN. Un ejemplo es la interacción de la proteína reguladora, Rev, con el elemento de respuesta a Rev (RRE, una subdominio del ARN viral) que es básico para la replicación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La Rev, que contiene 116 aminoácidos, facilita la expresión mediante la inducción de la acumulación de transcritos de ARNm viral empalmados de forma incompleta en el citoplasma. La unión y las interacciones de proteínas/ADN son importantes porque estos eventos regulan diversas funciones y el metabolismo del ADN. Las proteínas que presentan esta propiedad se denominan proteínas de unión a ADN específicas de secuencia. Median en la replicación del ADN, la recombinación, la escisión de cadena y la transcripción.

40 **[0068]** El péptido Tat utilizado en los ejemplos de trabajo se sintetiza fácilmente por el método de fase sólida y puede purificarse por HPLC y se caracteriza por el espectro de masas MALDI-TOF y el análisis de aminoácidos. Se conocen los métodos químicos para unir el cromóforo de señalización al péptido para formar el sensor de señalización PBP-C*.⁴⁴ Un ejemplo específico es Tat-C* de señalización con fluoresceína en el extremo N-terminal. Se pueden producir estructuras de PBP-C* específicas a medida por fuentes comerciales.

45 **[0069]** Otros ejemplos de PBP que se pueden utilizar incluyen la proteína de matriz (M1, con una secuencia de "DPNNMDKAVKLYRKLKR" en código de una letra) que se une a ARN del virus de la gripe de tipo A, y la proteína hnRNP U ("MRGGNFRGGAPGNRGGYNRRGN" en código de una letra) que se une a ARN pre-ribosómico. Por ejemplo, M1 se puede utilizar en un ensayo para detectar el virus de la gripe en una muestra, similar al ejemplo de trabajo mostrado para VIH.

50 EL CROMÓFORO DE SEÑALIZACIÓN

[0070] Los cromóforos útiles en las invenciones descritas en el presente documento incluyen cualquier sustancia que pueda recibir energía de un multicromóforo policatiónico excitado en una solución apropiada y emita luz. Para los ensayos múltiples, se puede utilizar un conjunto de diferentes cromóforos de señalización con espectros de emisión detectables de forma diferente. El cromóforo puede ser un lumóforo o un fluoróforo. Los fluoróforos habituales incluyen colorantes fluorescentes, nanocristales semiconductores, quelatos lantánidos, y proteína verde fluorescente.

60 **[0071]** Los ejemplos de colorantes fluorescentes incluyen fluoresceína, 6-FAM, rodamina, rojo Texas, tetrametilrodamina, una carboxirodamina, carboxirodamina 6G, carboxirodol, carboxirodamina 110, Cascada Azul, Cascada Amarilla, cumarina, Cy2®, Cy3®, Cy3,5®, Cy5®, Cy5,5®, Cy-Chrome, ficoeritrina, PerCP (Proteína peridinin clorofila-a), PerCP-Cy5,5, JOE (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína), NED, ROX (5-(y -6)-carboxi-X-rodamina), HEX, Amarillo Lucifer, Azul Marina, Verde Oregon 488, Verde Oregon 500, Verde Oregon 514, Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 430, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 633, Alexa Fluor® 647, Alexa Fluor® 660, Alexa Fluor® 680, ácido 7-amino-4-metil-

cumarin-3-acético, BODIPY® FL, BODIPY® FL-Br₂, BODIPY® 530/550, BODIPY® 558/568, BODIPY® 564/570, BODIPY® 576/589, BODIPY® 581/591, BODIPY® 630/650, BODIPY® 650/665, BODIPY® R6G, BODIPY® TMR, BODIPY® TR, conjugados de los mismos, y combinaciones de los mismos. Los quelatos de lantánidos de ejemplo incluyen quelatos de europio, quelatos de terbio y quelatos de samario.

[0072] En la técnica se conoce una amplia variedad de nanocristales semiconductores fluorescentes ("SCNC"); los métodos de producción y utilización de nanocristales semiconductores se describen en: publicación de PCT. N ° WO 99/26299 publicada el 27 de mayo de 1999, los inventores Bawendi et al.; patente de Estados Unidos 5.990.479 concedida el 23 de noviembre 1999 a Weiss et al., y Bruchez et. al., Science 281:2013, 1998. Los nanocristales semiconductores se pueden obtener con bandas de emisión muy estrechas con longitudes de onda de emisión de pico bien definidos, lo que permite utilizar un gran número de diferentes SCNC como cromóforos de señalización en el mismo ensayo, opcionalmente en combinación con otros tipos no SCNC de cromóforos de señalización.

[0073] El término "proteína verde fluorescente" se refiere tanto a la proteína verde fluorescente nativa de *Aequorea* como a versiones mutadas que han sido identificadas por presentar características de fluorescencia alteradas, incluyendo los máximos de excitación y emisión alterados, así como espectros de excitación y emisión de diferentes formas (Delgrave, S. et al. (1995) Bio/Technology 13:151-154; Heim, R. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:12501-12504; Heim, R. et al. (1995) Nature 373:663-664). Delgrave et al. aislaron mutantes de GFP de *Aequorea victoria* clonados que tenían espectros de excitación desplazados al rojo. Bio/Technology 13:151-154 (1995). Heim, R. et al. describieron un mutante (Tyr66 a His) que tenía una fluorescencia azul (Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) USA. 91:12501-12504).

EL SUSTRATO

[0074] Para aquellas variaciones del ensayo realizado sobre un sustrato, el sustrato puede comprender una amplia variedad de materiales, ya sean biológicos, no biológicos, orgánicos, inorgánicos, o una combinación de cualquiera de éstos. Por ejemplo, el sustrato puede ser una película polimerizada de Langmuir Blodgett, vidrio funcionalizado, Si, Ge, GaAs, GaP, SiO₂, SiN₄, silicio modificado, o cualquiera de una amplia variedad de geles o polímeros, tales como (poli)tetrafluoroetileno, (poli)vinilidendifluoruro, poliestireno, poliestireno reticulado, ácido poliacrílico, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poli (láctido coglicólico), polianhídridos, poli(metacrilato de metilo), poli (etileno-acetato de vinilo), polisiloxanos, sílice polimérico, látex, polímeros de dextrano, epoxis, policarbonatos, o combinaciones de los mismos. Se pueden utilizar polímeros conductores y materiales fotoconductores.

[0075] Los sustratos pueden ser sustratos cristalinos planas, tales como sustratos de base sílice (por ejemplo, vidrio, cuarzo, o similares), o sustratos cristalinos utilizados en, por ejemplo, las industrias de semiconductores y de microprocesadores, tales como el silicio, el arseniuro de galio, GaN dopado con indio y similares, e incluye nanocristales semiconductores.

[0076] El sustrato puede tomar la forma de un fotodiodo, un sensor optoelectrónico, tal como un chip semiconductor optoelectrónico o un semiconductor optoelectrónico de película delgada, o un biochip. La localización o localizaciones de la o las PBS sensor individuales en el sustrato puede ser dirigible; esto se puede conseguir en formatos muy densos y la localización o localizaciones puede ser microdirigible o nanodirigible.

[0077] Los aerogeles de sílice también pueden utilizarse como sustratos, y se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica. Los sustratos de aerogel se pueden utilizar como sustratos independientes o como un revestimiento de superficie para otro material de sustrato.

[0078] El sustrato puede tener cualquier forma y habitualmente es una placa, portamuestras, microesferas, pélet, disco, partículas, micropartículas, nanopartículas, filamentos, precipitado, gel opcionalmente poroso, láminas, tubos, esfera, contenedor, capilar, almohadilla, corte, película, chip, placa o plato de múltiples pocillos, fibra óptica, etc. El sustrato puede tener cualquier forma que sea rígida o semirígida. El sustrato puede contener regiones elevadas o disminuidas en la que se encuentra un componente de ensayo. La superficie del sustrato puede grabarse usando técnicas bien conocidas para proporcionar características superficiales deseadas, por ejemplo, zanjas, ranuras en V, estructuras de mesa, o similares.

[0079] Las superficies sobre el sustrato puede estar compuestas del mismo material que el sustrato o pueden estar fabricadas de un material diferente, y se pueden acoplar al sustrato por medios químicos o físicos. Dichas superficies acopladas pueden estar compuestas de cualquiera de una amplia variedad de materiales, por ejemplo, polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales de base sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos, membranas, o cualquiera de los materiales de sustrato mencionados anteriormente. La superficie puede ser ópticamente transparente y puede tener funciones Si-OH en la superficie, tales como las que se encuentran en superficies de sílice.

[0080] El sustrato y/o su superficie opcional se eligen para proporcionar características ópticas adecuadas para los métodos sintéticos y/o de detección utilizados. El sustrato y/o la superficie pueden ser transparentes para permitir la exposición del sustrato por la luz aplicada desde múltiples direcciones. El sustrato y/o la superficie pueden estar

provistos de estructuras reflectantes de "espejo" para aumentar la recuperación de la luz.

[0081] El sustrato y/o su superficie es generalmente resistente a, o se trata para resistir, las condiciones a las que se va a exponer en el uso, y se pueden tratar opcionalmente para eliminar cualquier material resistente después de la exposición a dichas condiciones.

[0082] Los componentes de ensayo se pueden fabricar o unirse al sustrato por cualquier método adecuado, por ejemplo los métodos descritos en la Patente de Estados Unidos N ° 5.143.854, PCT Publ. N ° WO 92/10092, Solicitud de Patente de Estados Unidos. Ser. N ° 07/624,120, presentada el 06 de diciembre 1990 (ahora abandonada), Fodor et al., Science, 251: 767-777 (1991), y PCT Publ. N ° WO 90/15070). Las técnicas para la síntesis de matrices usando estrategias de síntesis mecánica se describen en, por ejemplo, la publicación PCT N ° WO 93/09668 y la Patente de Estados Unidos N ° 5.384.261.

[0083] Técnicas adicionales incluyen técnicas basadas en microesferas, tales como las descritas en el documento PCT Appl. No. PCT/US93/04145 y métodos basados en "pin", tales como los descritos en la patente de Estados Unidos N ° 5.288.514.

[0084] En la Solicitud de Patente de Estados Unidos. Ser. N ° 07/980, 523, presentada el 20 de noviembre de 1992, y la Patente de Estados Unidos N ° 5.384.261 se describen métodos adicionales de de canales de flujo o "spotting" aplicables a la unión de las PBP al sustrato. Los reactivos se suministran al sustrato por cualquiera de (1) flujo en un canal definido en regiones predefinidas o (2) "spotting" en regiones predefinidas. Se puede utilizar un revestimiento protector, tal como un revestimiento hidrófilo o hidrófobo, (dependiendo de la naturaleza del disolvente) sobre partes del sustrato a proteger, a veces en combinación con materiales que facilitan la humectación por la solución reactiva en otras regiones. De esta manera, se evita además que las soluciones que fluyen pasen fuera de sus trayectorias de flujo designadas.

[0085] Los dispensadores habituales incluyen una micropipeta opcionalmente controlada robóticamente, una impresora de chorro de tinta, una serie de tubos, un colector, una matriz de pipetas, o similar, de manera que diversos reactivos pueden ser liberados a las regiones de reacción secuencial o simultáneamente.

EXCITACIÓN Y DETECCIÓN DE LOS CROMÓFOROS

[0086] Se puede utilizar para la excitación cualquier instrumento que proporcione una longitud de onda que pueda excitar el multicromóforo policatiónico y sea más corta que la longitud o longitudes de onda de emisión a detectar. La fuente de excitación preferiblemente no excita significativamente el cromóforo de señalización directamente. La fuente puede ser: una fuente de luz UV de banda ancha, tal como una lámpara de deuterio con un filtro apropiado, la salida de una fuente de luz blanca, tal como una lámpara de xenón o una lámpara de deuterio, después de pasar a través de un monocromador para extraer las longitudes de onda deseadas, un láser de gas de onda continua (cw), un láser de diodo en estado sólido, o cualquiera de los láseres pulsados. La luz emitida por el cromóforo de señalización se puede detectar a través de cualquier dispositivo o técnica adecuada; muchas estrategias adecuadas son conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar un fluorímetro o espectrofotómetro para detectar si la muestra de ensayo emite luz de una longitud de onda característica del cromóforo de señalización tras la excitación del multicromóforo.

KITS

[0087] También se proporcionan kits que comprenden reactivos útiles para realizar los métodos de la invención. En una realización, un kit comprende una PBP sensor que se une a un polinucleótido diana de interés y un multicromóforo policatiónico. La PBP sensor se conjuga a un cromóforo de señalización. En presencia del polinucleótido diana en la muestra, la PBP sensor se aproxima al multicromóforo tras la unión a la diana, que se asocia electrostáticamente con el multicromóforo policatiónico.

[0088] Los componentes del kit son retenidos por una carcasa. Las instrucciones para usar el kit para llevar a cabo un método de la invención se proporcionan con la carcasa y se pueden disponer en cualquier medio fijado. Las instrucciones pueden estar situadas dentro de la carcasa o fuera de la carcasa, y pueden estar impresas en el interior o exterior de cualquier superficie que forma la carcasa que hace que las instrucciones legibles. El kit puede estar en forma múltiple, que contiene pluralidades de una o más PBP sensor diferentes que pueden unirse a los correspondientes polinucleótidos diana diferentes.

EJEMPLOS

[0089] Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos en la materia una descripción completa de cómo realizar y utilizar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que se considera como la invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, la temperatura es grados

centígrados y la presión es la atmosférica o próxima a la misma, y todos los materiales están disponibles comercialmente. Los oligonucleótidos de ARN de TAR y ARN de dTAR descritos a continuación fueron adquiridos de Dharmacon Research Inc. (Lafayette, Estados Unidos). Los polipéptidos modificados por fluoresceína en el extremo N-terminal (Tat-C* y SH3-C*) se produjeron a medida por Sigma-Genosys (Texas, Estados Unidos). El polímero 1 y el oligómero 2 se preparan como se describe en la literatura⁴⁵. Todos los experimentos de fluorescencia y FRET se llevaron a cabo utilizando un fluorómetro PTI Quantum Master equipado con una fuente de excitación de lámpara de xenón en solución tampón Tris-EDTA (10 mM, pH = 7,4).

Ejemplo 1

[0090] Los espectros de emisión del polímero 1, Tat-C* y los espectros de absorción de Tat-C* se muestran en la Figura 3. Los datos muestran que existe un solapamiento excelente entre la emisión del polímero 1 y la absorción de Tat-C* para asegurar la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia.

Ejemplo 2

[0091] Los espectros de emisión del oligómero 1, Tat-C* y los espectros de absorción de Tat-C* se muestran en la Figura 4. Los datos muestran que existe un solapamiento excelente entre la emisión del oligómero 1 y la absorción de Tat-C* para asegurar la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia.

Ejemplo 3

[0092] Los espectros de emisión del oligómero 2, Tat-C* y los espectros de absorción de Tat-C* se muestran en la Figura 5. Los datos muestran que existe un solapamiento excelente entre la emisión del oligómero 2 y la absorción de Tat-C* para asegurar la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia.

Ejemplo 4:

[0093] La sonda Tat-C* ($[Tat-C^*] = 1,0 \cdot 10^{-8}$ M) se mezcló con una cantidad equimolar del ARN de TAR a temperatura ambiente, y de una manera idéntica con un ARN de dTAR no específico. Se sabe que una estructura en saliente en el ARN de TAR es un requisito para la unión del péptido Tat a ARN de TAR.^{46, 47} El ARN de dTAR está estrechamente relacionado en la estructura con el ARN de TAR ARN, que carece de la estructura en saliente de tres bases necesaria para la unión a Tat.

[0094] La adición de oligómero 1 en agua ($[oligómero\ 1] = 8,0 \cdot 10^{-8}$ M) y la posterior comparación de la fluorescencia resultante de Tat-C* obtenida mediante excitación a 365 nm (Figura 6) revela una relación de intensidad > 10 veces mayor que para la Tat-C*/ARN de TAR, en relación con la pareja de Tat-C*/ARN de dTAR no específico. Estas diferencias de FRET demuestran la especificidad del sensor de ARN de TRA de VIH para un ARN específico. Además, la emisión de fluoresceína es más de 25 veces mayor que la obtenida a partir de la excitación directa de Tat-C* en el máximo de absorción de fluoresceína en ausencia de oligómero 1. El aumento de la emisión de Tat-C* en el complejo de transferencia de energía indica que la amplificación óptica es proporcionada por el oligómero 1 conjugado.

Ejemplo 5:

[0095] La sonda Tat-C* ($[Tat-C^*] = 1,0 \cdot 10^{-8}$ M) se mezcló con una cantidad equimolar del ARN de TAR a temperatura ambiente, y de una manera idéntica con un ARN de dTAR no específico. La adición de oligómero 2 en agua ($[oligómero\ 2] = 6,0 \cdot 10^{-8}$ M) y la posterior comparación de la fluorescencia resultante de Tat-C* obtenida mediante excitación a 375 nm (Figura 7) revela una relación de intensidad 15 veces mayor que para la Tat-C*/ARN de TAR, en relación con la pareja de Tat-C*/ARN de dTAR no específico. Estas diferencias de FRET demuestran la especificidad del sensor de ARN de TRA de VIH de la presente invención para un ARN específico. Además, la emisión de fluoresceína es más de 30 veces mayor que la obtenida a partir de la excitación directa de Tat-C* en ausencia de oligómero 2. El aumento de la emisión de Tat-C* en el complejo de transferencia de energía indica que la amplificación óptica es proporcionada por el oligómero 2 conjugado.

Ejemplo 6:

[0096] Se utilizó el polímero 1 conjugado soluble en agua (n promedio = aprox. 15) como cromóforo captador de luz. La sonda Tat-C* ($[Tat-C^*] = 1,0 \cdot 10^{-8}$ M) se mezcló con una cantidad equimolar del ARN de TAR a temperatura ambiente, y de una manera idéntica con un ARN de dTAR no específico. La adición de polímero 1 en agua ($[polímero\ 1] = 4,8 \cdot 10^{-7}$ M) en la mezcla de Tat-C* y ARN de TAR da lugar a una fluorescencia de Tat-C* (figura 8) con una relación de intensidad > 15 veces mayor que para la Tat-C*/ARN de TAR y 10 veces mayor que la obtenida a partir de la excitación directa de Tat-C* en ausencia de polímero 1. De este modo, se pueden conseguir relaciones de FRET significativamente superiores y sensibilidades correspondientemente más elevadas. La valoración de 1 frente a la mezcla de Tat-C* y ARN de TAR reveló que la relación de FRET aumentaba con la concentración de 1 hasta una relación de cargas de 1 a ARN de TAR próxima a 4:1, después de lo cual se observó que disminuía la

relación de FRET. Se observó un patrón similar para el oligómero 2.

Ejemplo 7:

5 [0097] También se utilizó como sonda señal otra secuencia de péptido marcada con fluoresceína en el extremo N-terminal (SH3-C*; AKPRPPRPLPVAC en código de una letra) que no puede unirse específicamente a ARN de TAR. La figura 9 ([SH3-C* o Tat-C*] = $1,0 \cdot 10^{-8}$ M, [ARN de TAR] = $1,0 \cdot 10^{-8}$ M y [oligómero 1] = $8,0 \cdot 10^{-8}$ M) muestra la emisión de C* sólo cuando Tat-C* estaba presente. Estas diferencias de FRET demuestran que el sensor de ARN de TRA de VIH de la presente invención depende de la interacción específica de la secuencia de péptido Tat con ARN de TAR.

Referencias

[0098]

- 15 1 Wang, J. *Nucleic Acid Res.* 2000 28 3011.
 2 Umek, R.M.; Lin, S.W.; Vielmetter, J.; Terbruggen, R.H.; Irvine, B.; Yu, C.J.; Kayyem, J.F.; Yowanto, H.; Blackburn, G.F.; Farkas, D.H.; Chen, Y.P. *J. Mol. Diag.* 2001 3 74.
 3 Schork N.J.; Fallin D.; Lanchbury J.S. *Clini. Genet.* 2000 58 250.
 20 4 Balakin, K. V.; Korshun, V.A.; Mikhalev, I.I.; Maleev, G.V.; Malakhov A.D.; Prokhorenko, I.A.; Berlin, Yu.A. *Biosensors and Bioelectronics* 1998 13 771.
 5 LePecq, J.B.; Paoletti, C. *J. Mol. Biol.* 1967 27 87.
 6 Petty, J.T.; Bordelon, J.A.; Robertson, M.E. *J. Phys. Chem. B* 2000 104 7221.
 7 Cardullo, R.A.; Agrawal, S.; Flores, C.; Zamechnik, P.C.; Wolf, D.E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988 85 8790.
 25 8 Castro, A.; Williams, J.G.K. *Anal. Chem.* 1997 69 3915.
 9 Knemeyer, J.; Marmé, N.; Sauer, M. *Anal. Chem.* 2000 72 3717.
 10 N. J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books: Sausalito, CA 1991.
 11 J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999.
 12 R. Gallo, L. Montagnier, *Sci. Am.* 1988, 259 (10), 41.
 30 13 J. Wang, X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, P. A. M. Farias, N. Dontha, *Anal. Chem.* 1996, 68, 2629. N. R. Isola, D. L. Stokes, T. Vo-Dinh, *Anal. Chem.* 1998, 70, 1352.
 14 J. Kubly, *Immunology*, W. Freeman Inc.: New York, 1991.
 15 D. S. Hage, *Anal. Chem.* 1999, 71, 294R.
 16 P. Nishanian, K. Huskins, S. Stehn, R. Detels, J. Fahey, J. Infect. Dis. 1990, 162, 21.
 35 17 J. Kam, M. J. Churcher, K. Rittner, A. Kelly, P. J. G. Butler, D. A. Mann, M. J. Gait, *HIV, a practical approach*, J. Karn, Ed., pp 147-165, IRL Press, New York, 1995.
 18 L. Chen, A. D. Frankel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, 92, 5077.
 19 A. D. Frankel, *Prot. Sci.* 1992, 1, 1539.
 20 C. Matsumoto, K. Hamasaki, H. Mihara, A. Ueno, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 1857.
 40 21 I. C. Kwon, Y. H. Bae, S. W. Kim, *Nature*, 1991, 354, 291.
 22 D. Frankel, *Prot. Sci.* 1, 1539 (1992).
 23 K. M. Weeks, C. Ampe, S. C. Schultz, T. A. Steitz, D. M. Crothers, *Science* 249, 1281 (1990).
 24 McQuade, D.T.; Pullen, A. E.; Swager, T.M. *Chem. Rev.* 2000 100 2537.
 25 Chen, L.; McBranch, D.W.; Wang, H.-L.; Helgeson, R.; Wudl, F.; Whitten, D.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999
 45 96 12287.
 26 Dogariu, A., Gupta, R., Heeger, A.J., Wang, H. *Synthetic Metals* 1999 100 95.
 27 Wang, J.; Wang, D.; Miller, E.K.; Moses, D.; Bazan, G.C.; Heeger, A.J. *Macromolecules* 2000 33 5153.
 28 Stork, M.S.; Gaylord, B.S.; Heeger, A.J.; Bazan, G.C. *Adv. Mater.* 2002 14 361. The molecular weight of polymer 1 was determined to be 8,600 g/mole (Mn).
 50 29 Kabanov, A.V.; Felgner, P.; Seymour, L.W., Eds. *Self-Assembling Complexes for Gene Delivery. From Laboratory to Clinical Trial*; John Wiley: Chichester, 1998.
 30 Kircheis, R.; Blessing, T.; Brunner, S.; Wightman, L.; Wagner, E. *J. Controlled Release* 2001 72 165.
 31 Wolfert, MA.; Dash, P.R.; Navarova, O.; Oupicky, D.; Seymour, L.W.; Smart, S.; Strohmalm, J.; Ulbrich, K. *Bioconjugate Chem.* 1999 10 993.
 55 32 Ganachaud, F.; Elaïssari, A.; Pichot, C.; Laayoun, A. ; Cros, P. *Langmuir* 1997 13 701.
 33 Smith, J.O.; Olson, D.A.; Armitage, B.A. *J. Am. Chem. Soc.* 1999 121 2628.
 34 Harada, A.; Kataoka, K. *Science* 1999 283 65.
 35 Bronich, T.K.; Nguyen, H.K.; Eisenberg, A.; Kabanov, A.V. *J. Am. Chem. Soc.* 2000 122 8339.
 36 Stork, M.S.; Gaylord, B.S.; Heeger, A.J.; Bazan, G.C. *Adv. Mater.* 2002 14 361.
 60 37 K. Nagai, I. W. Mattay, *RNA-Protein Interactions. Frontiers in Molecular Biology Series* (Oxford University Press, Oxford, UK, 1994).
 38 G. Varani, *Acc. Chem. Res.* 30, 189 (1997).
 39 Y. N. Vaishnav, F. Wong-Staal, *Ann. Rev. Biochem.* 60, 577 (1991).
 40 C. Jain. *J. G. Belasco, Methods Enzymol.* 318, 309 (2000).
 65 41 B. A. Sullenger, E. Gilboa, *Nature* 418, 252 (2002).
 42 E. V. Pilipenko et al., *Genes Dev.* 14, 2028 (2000).

5 Met Arg Gly Gly Asn Phe Arg Gly Gly Ala Pro Gly Asn Arg Gly Gly
1 5 10 15
Tyr Asn Arg Arg Gly Asn
20

10

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 6

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Arg Pro Leu Pro Val Ala Cys
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Método para el análisis de polinucleótidos que comprende

5 (a) poner en contacto una muestra con por lo menos dos componentes

- un sistema multicromóforo luminiscente captador de luz, por ejemplo, un polímero conjugado, una estructura de semiconductor de punto cuántico o dendrítica que es soluble en agua, y

10 - una proteína que se une a polinucleótido (PBP) sensor conjugada con un cromóforo de señalización luminiscente ("PBP-C*"), en el que el polinucleótido diana forma un complejo con la PBP sensor;

en el que la emisión de una longitud de onda de luz característica del cromóforo C* de señalización tras la excitación del multicromóforo indica la presencia en solución del polinucleótido diana.

15 2. Método, según la reivindicación 1, que comprende

- combinar un polímero conjugado y una proteína que se une a polinucleótido sensor conjugada a un cromóforo de señalización luminiscente con una muestra sospechosa de contener un polinucleótido diana bajo condiciones en las que la proteína que se une a polinucleótido se une a la diana para formar un complejo, y

20 - detectar la emisión del cromóforo de señalización tras la excitación del polímero conjugado indica la formación de complejo, en el que la emisión es mayor que la obtenida de la excitación directa del cromóforo de señalización.

25 3. Método, según la reivindicación 1, que comprende poner en contacto una muestra con una polímero conjugado luminiscente captador de luz y una proteína que se une a polinucleótido sensor conjugada a un cromóforo de señalización luminiscente en una solución predominantemente acuosa, en el que la emisión de luz característica del cromóforo de señalización tras la excitación del polímero conjugado luminiscente indica la presencia en la muestra del polinucleótido diana, y en el que la emisión del cromóforo de señalización es mayor que la obtenida de la excitación directa del cromóforo de señalización.

30 4. Método, según la reivindicación 1, que comprende añadir a una muestra biológica un polímero conjugado y una proteína que se une a polinucleótido sensor conjugada a un cromóforo de señalización luminiscente; y detectar la emisión del cromóforo de señalización mediante la excitación del polímero conjugado, en el que la emisión del cromóforo de señalización es mayor que la obtenida de la excitación directa del cromóforo de señalización.

35 5. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la muestra se pone en contacto con un conjunto de proteínas que se unen a polinucleótidos (PBP) diferentes, comprendiendo dichas PBP diferentes un cromóforo de señalización correspondiente diferente, en el que cada una de dichas PBP diferentes se une selectivamente a un polinucleótido diana correspondiente diferente.

40 6. Método, según la reivindicación 1, en el que el multicromóforo es un fluoróforo seleccionado del grupo que consiste en un nanocrystal semiconductor, un colorante fluorescente, una proteína verde fluorescente y un quelato de lantánido.

45 7. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que se cuantifica la cantidad de luz emitida del cromóforo de señalización y se utiliza para determinar la cantidad del polinucleótido diana en la muestra.

50 8. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la luz emitida del cromóforo de señalización por encima de un nivel umbral indica que el polinucleótido diana está presente en la muestra.

9. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el método se realiza sobre un sustrato.

10. Solución de detección de polinucleótido, que comprende:

55 un polímero conjugado y una proteína que se une a polinucleótido (PBP) sensor que se une a un polinucleótido diana y que se conjuga a un cromóforo de señalización luminiscente, en la que el polímero conjugado es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización tras la excitación cuando está próximo al mismo y que provoca que se emita una mayor cantidad de energía del cromóforo de señalización tras la excitación del polímero conjugado que de la excitación directa del cromóforo de señalización.

60 11. Kit para analizar en una muestra un polinucleótido diana, que comprende:

una proteína que se une a polinucleótido (PBP) sensor que se une al polinucleótido diana y que se conjuga a un cromóforo de señalización luminiscente, y un polímero conjugado, en el que el polímero conjugado es capaz de transferir energía al cromóforo de señalización tras la excitación cuando está próximo al mismo y que provoca que se emita una mayor cantidad de energía del cromóforo de señalización tras la excitación del polímero conjugado que

de la excitación directa del cromóforo de señalización;
una carcasa para contener la PBP y el polímero conjugado; y
instrucciones proporcionadas con dicha carcasa que describen cómo utilizar los componentes del kit para analizar
en una muestra el polinucleótido diana.

5

12. Complejo de transferencia de energía que comprende una proteína que se une a polinucleótido (PBP) sensor
conjugada a un cromóforo de señalización luminiscente ("PBP-C*"), un polímero conjugado y un polinucleótido
diana, en el que el cromóforo de señalización es capaz de recibir energía de un estado excitado del polímero
conjugado.

10

13. Complejo de transferencia de energía, según la reivindicación 12, en el que la emisión de luz del cromóforo de
señalización es más intensa cuando la luz incidente se encuentra en una longitud de onda que se absorbe por el
polímero conjugado que cuando el cromóforo de señalización se excita directamente por la luz incidente.

15

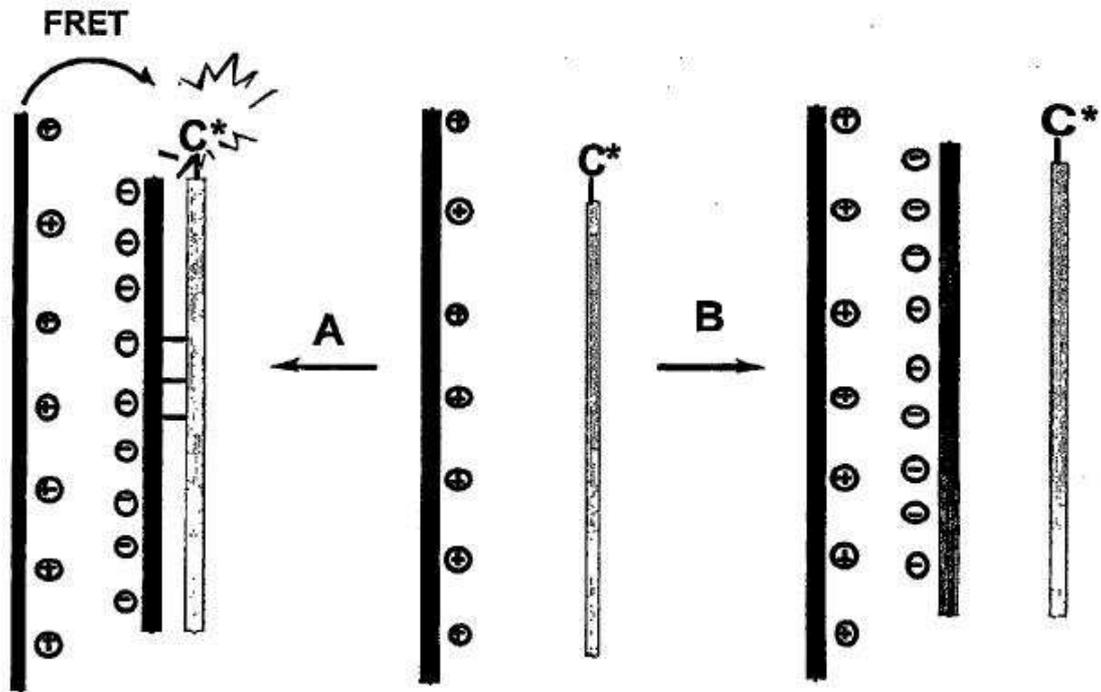


Figura 1

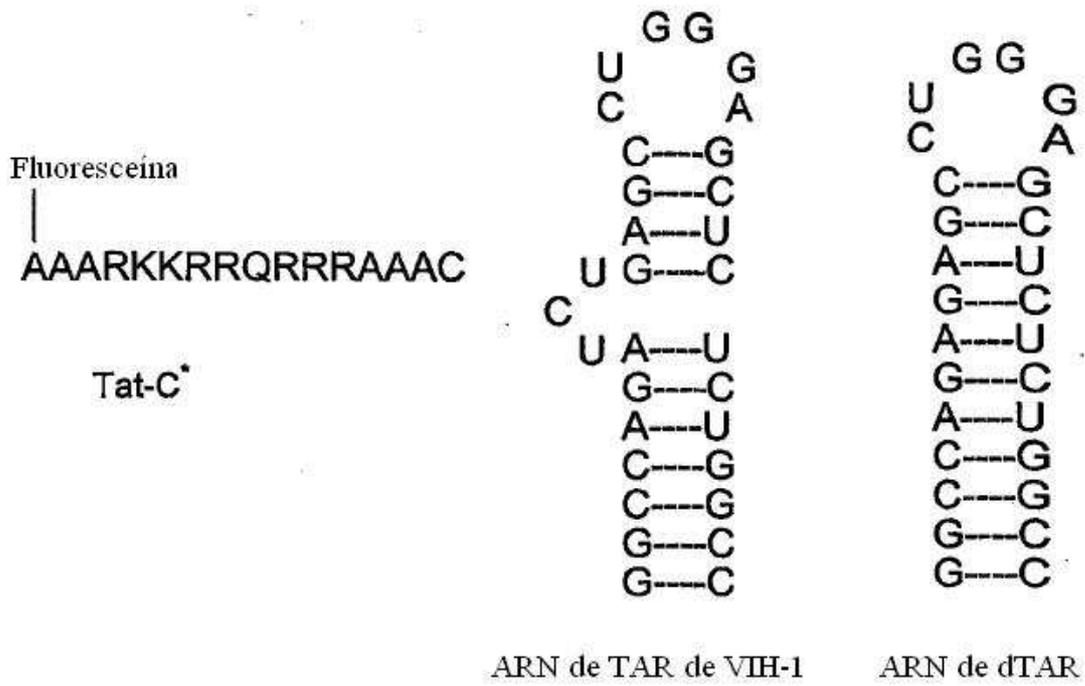


Figura 2

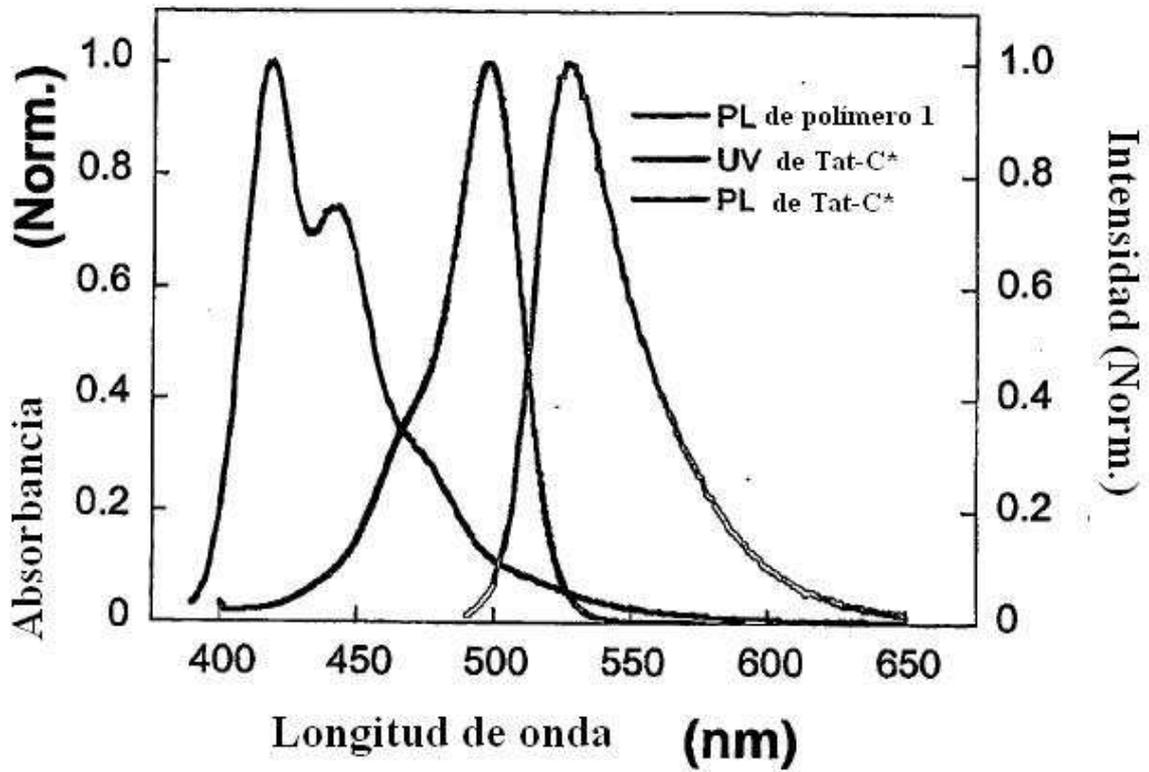


Figura 3

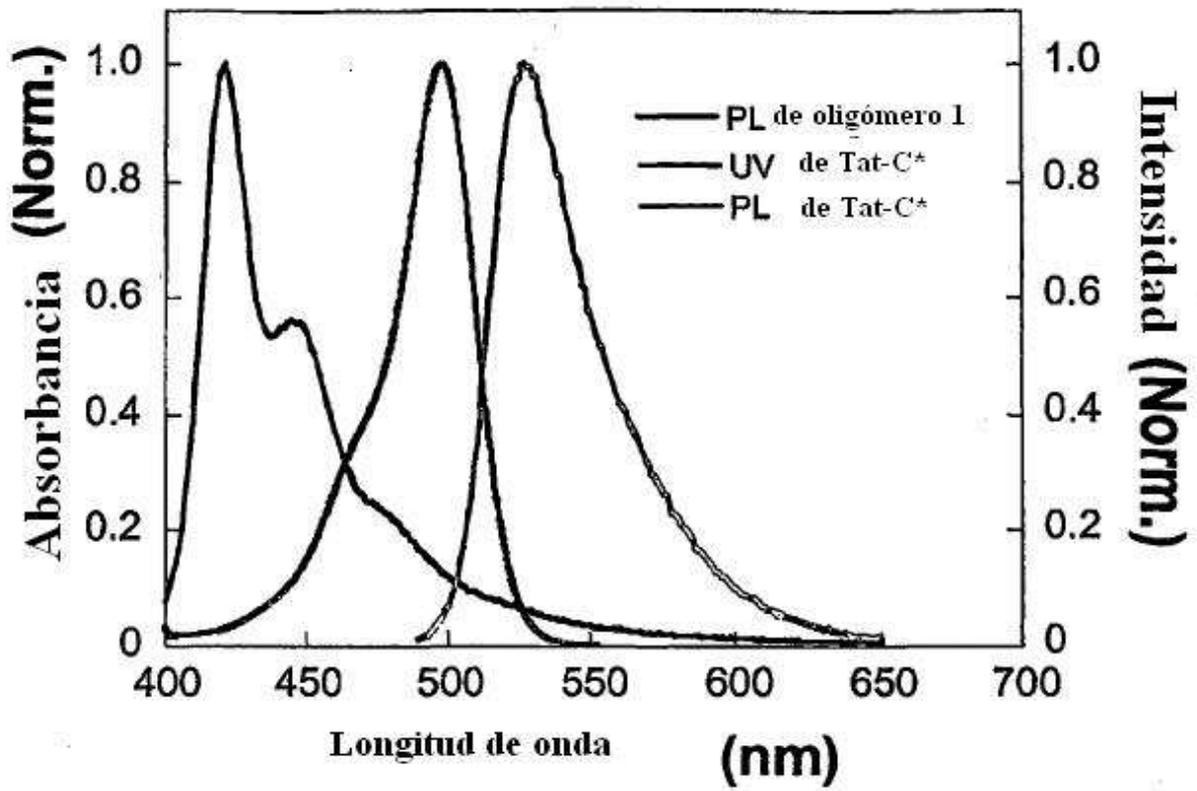


Figura 4

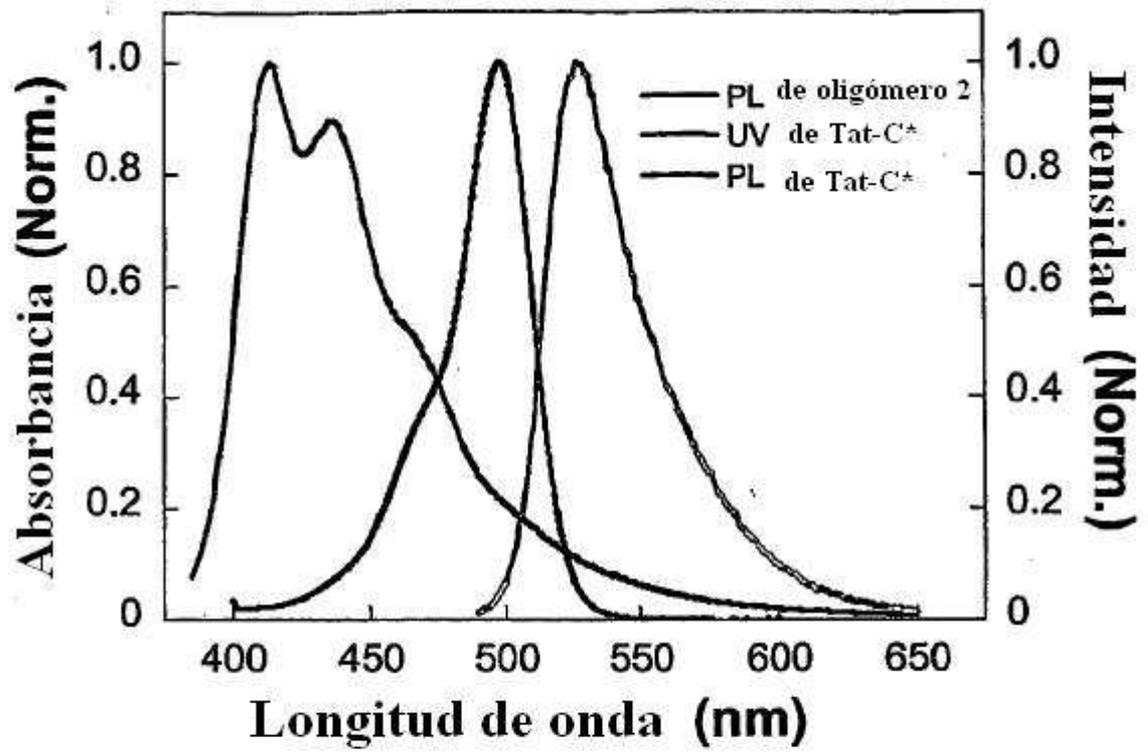


Figura 5

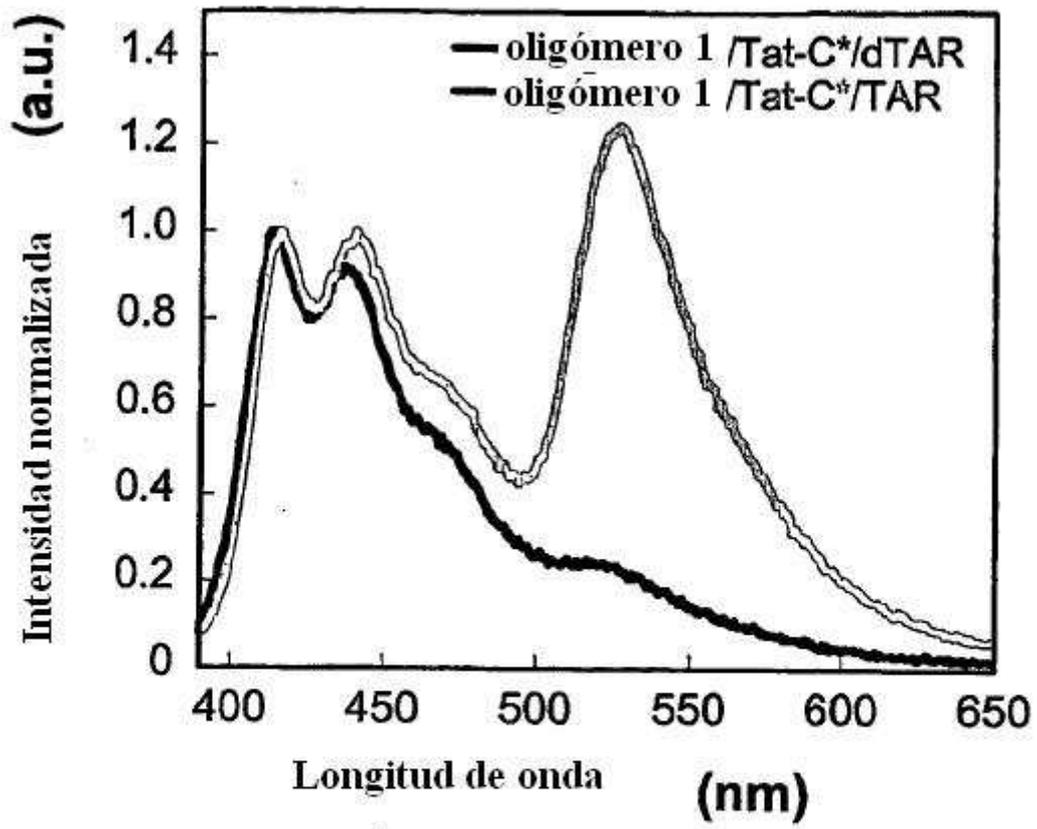


Figura 6

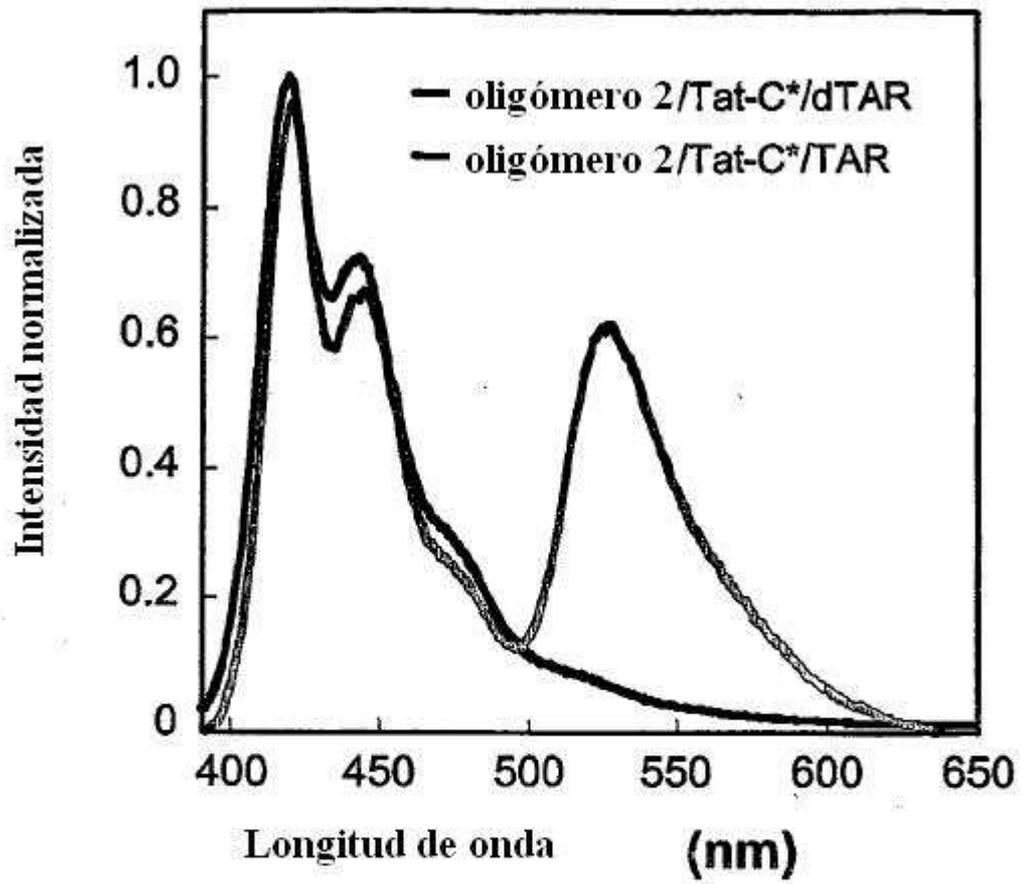


Figura 7

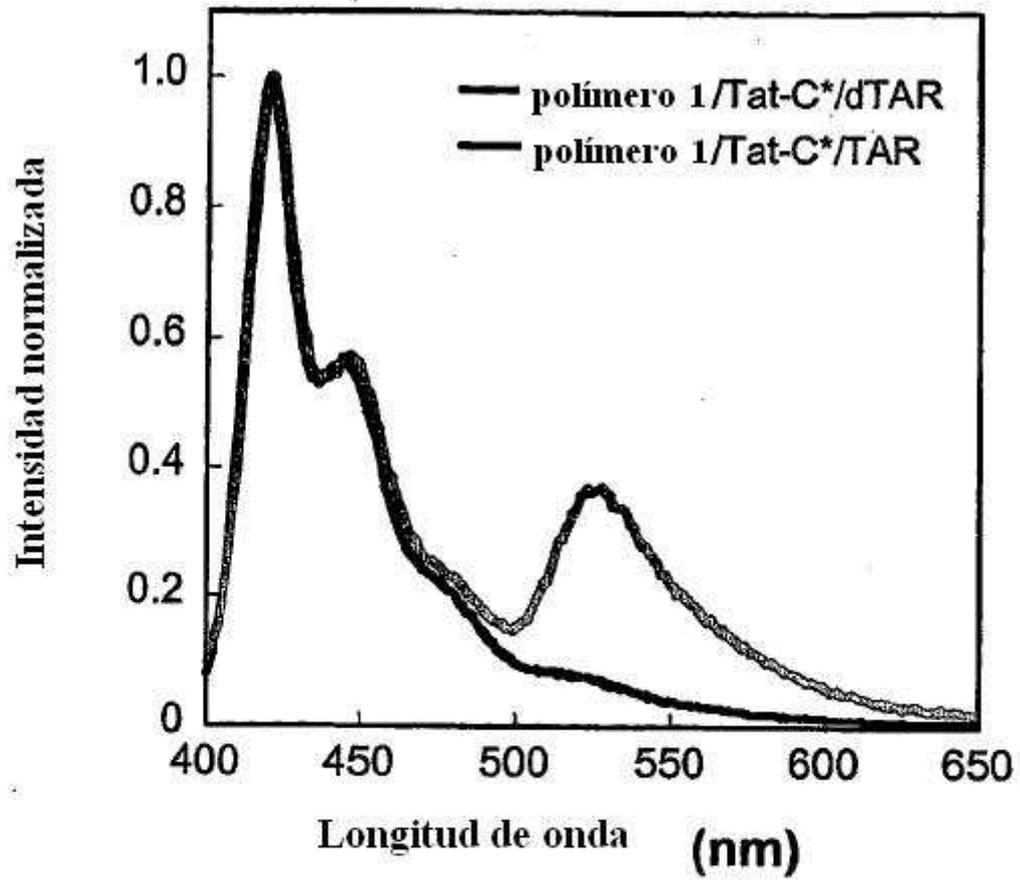


Figura 8

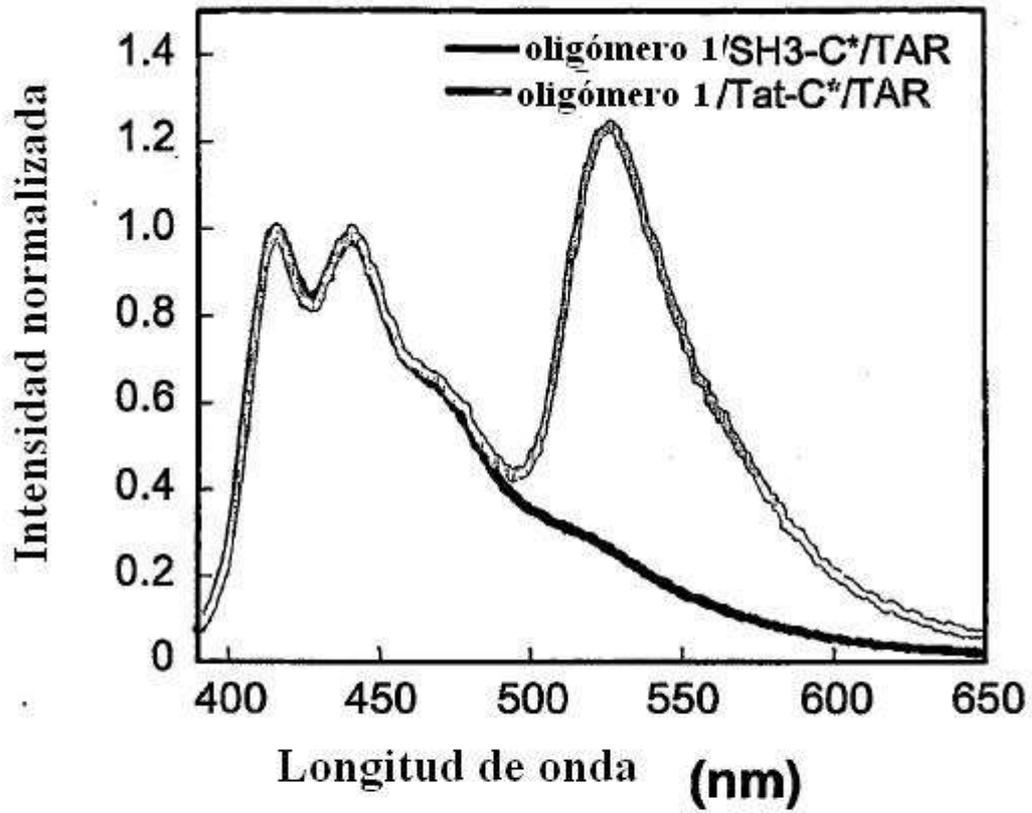


Figura 9