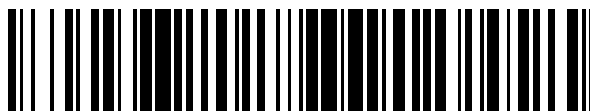


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 511 991**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C09B 35/08 (2006.01)

C07D 241/46 (2006.01)

C09B 62/09 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2001 E 10184701 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 2316974**

54 Título: **Inhibidores de fluorescencia oscuros para transferencia de energía donador-aceptor**

30 Prioridad:

09.05.2000 US 567863

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

23.10.2014

73 Titular/es:

BIOSEARCH TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)

81 Digital Drive

Novato, CA 94949, US

72 Inventor/es:

COOK, RONALD M;

LYTTLE, MATT y

DICK, DAREN

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 511 991 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

Inhibidores de fluorescencia oscuros para transferencia de energía donador-aceptor

5 Antecedentes de la invención

Hay una necesidad continua y en expansión de métodos rápidos, altamente específicos de detección y cuantificación de sustancias químicas, bioquímicas y biológicas como analitos en mezclas de investigación y diagnóstico. De particular valor son los métodos para medir pequeñas cantidades de ácidos nucleicos, péptidos, productos farmacéuticos, metabolitos, microorganismos y otros materiales de valor diagnóstico. Los ejemplos de tales materiales incluyen narcóticos y venenos, fármacos administrados para propósitos terapéuticos, hormonas, microorganismos y virus patogénicos, anticuerpos, y enzimas y ácidos nucleicos, particularmente aquellos implicados en estados de la enfermedad.

La presencia de un analito particular puede a menudo determinarse por métodos de unión que explotan el alto grado de especificidad, que caracteriza muchos sistemas bioquímicos y biológicos. Los métodos que se usan frecuentemente se basan, por ejemplo, en sistemas antígeno-anticuerpo, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, y sistemas proteína-ligando. En estos métodos, la existencia de un complejo de valor diagnóstico se indica típicamente por la presencia o ausencia de una "etiqueta" observable que se une a uno o más de los materiales que interactúan. El método específico de etiquetado escogido frecuentemente dicta la utilidad y versatilidad de un sistema particular para detectar un analito de interés. Las etiquetas preferidas son económicas, seguras y capaces de unirse eficientemente a una amplia variedad de materiales químicos, bioquímicos y biológicos sin alterar significativamente las características de unión importantes de estos materiales. La etiqueta debe dar una señal altamente característica, y debe encontrarse raramente, y preferentemente nunca, en la naturaleza. La etiqueta debe ser estable y detectable en sistemas acuosos en períodos de tiempo en el intervalo de hasta meses. La detección de la etiqueta es preferentemente rápida, sensible, y reproducible sin la necesidad de instalaciones caras, especializadas o la necesidad de precauciones especiales para proteger al personal. La cuantificación de la etiqueta es preferentemente relativamente independiente de variables tales como la temperatura y la composición de la mezcla que se ensaya.

Se han desarrollado una amplia variedad de etiquetas, cada una con ventajas y desventajas particulares. Por ejemplo, las etiquetas radioactivas son bastante versátiles, y pueden detectarse a muy bajas concentraciones, tales etiquetas son, sin embargo, caras, peligrosas, y su uso requiere equipamiento sofisticado y personal entrenado. Así, hay un amplio interés en las etiquetas no-radioactivas, particularmente en las etiquetas que son observables por técnicas espectrofotométricas, de resonancia de spin, y de luminiscencia, y materiales reactivos tales como enzimas que producen tales moléculas.

Las etiquetas que se detectan por medio del uso de espectroscopia de fluorescencia son de particular interés, debido al gran número de tales etiquetas que se conocen en la técnica. Además, la literatura está repleta de síntesis de etiquetas fluorescentes derivatizados para permitir su fácil unión a otras moléculas, y muchas de tales etiquetas fluorescentes están comercialmente disponibles.

Además de detectarse directamente, muchas etiquetas fluorescentes operan para apagar la fluorescencia de una etiqueta fluorescente adyacente secundaria. Debido a su dependencia de la distancia y la magnitud de la interacción entre el inhibidor de fluorescencia y el fluoróforo, la inhibición de la fluorescencia de las especies fluorescentes proporciona una sonda sensible de configuración molecular y unión, u otras, interacciones. Un ejemplo excelente del uso de pares reportero fluorescente inhibidor de fluorescencia se encuentra en la detección y análisis de ácidos nucleicos.

Las sondas de ácidos nucleicos fluorescentes son herramientas importantes para el análisis genético, en la investigación y el desarrollo genéticos, y en la medicina clínica. A medida que se acumula la información del Proyecto del Genoma Humano, el nivel de interrogación genética mediada por sondas fluorescentes se expandirá enormemente. Una clase de sondas fluorescentes particularmente útiles incluyen sondas de auto-apagado, además conocidas como sondas de transferencia de energía de fluorescencia, o sondas FET. El diseño de diferentes sondas por medio del uso de estos motivos puede variar en detalles. En una sonda FET ilustrativa, ambos un fluoróforo y un inhibidor de fluorescencia están atados a ácidos nucleicos. La sonda se configura de forma tal que el fluoróforo está próximo al inhibidor de fluorescencia y la sonda produce una señal solamente como resultado de su hibridación a un objetivo previsto. A pesar de la disponibilidad limitada de sondas FET, las técnicas que incorporan su uso desplazan rápidamente los métodos alterativos.

Las sondas que contienen un par fluoróforo-inhibidor de fluorescencia se desarrollaron para ensayos de hibridación de ácidos nucleicos donde la sonda forma una estructura de horquilla, es decir, donde la sonda se hibrida consigo misma para formar un bucle de forma que la molécula inhibidora de fluorescencia se acerca a la molécula reportera en ausencia de una secuencia de ácidos nucleicos complementaria para prevenir la formación de la estructura de horquilla (*ver*, por ejemplo, documento WO 90/03446; solicitud de patente europea núm. 0 601 889 A2). Cuando está presente una secuencia objetivo

complementaria, la hibridación de la sonda a la secuencia objetivo complementaria interrumpe la estructura de horquilla y provoca que la sonda adopte una configuración donde la molécula inhibidor de fluorescencia ya no está suficientemente cerca de la molécula reportera para inhibir la fluorescencia de la molécula reportera. Como resultado, las sondas proporcionan una señal de fluorescencia mayor cuando se hibridan a una secuencia objetivo que cuando están sin hibridar.

Se han desarrollado ensayos para detectar una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada y para identificar la presencia de una estructura de horquilla por medio del uso de dos sondas separadas, una que contiene una molécula reportera y la otra una molécula inhibidora de fluorescencia (*ver*, Meringue, y otros, *Nucleic Acids Research*, 22: 920-928 (1994)). En estos ensayos, la señal de fluorescencia de la molécula reportera disminuye cuando se hibrida a la secuencia objetivo debido a que la molécula inhibidora de fluorescencia se aproxima a la molécula reportera.

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

Los métodos que se usan comúnmente para detectar los productos de amplificación de ácidos nucleicos requieren que el producto amplificado se separe de los iniciadores sin reaccionar. Esto se logra típicamente ya sea mediante el uso de geles de electroforesis, que separan los productos de la amplificación sobre la base de una diferencia de tamaño, o mediante la inmovilización del producto, lo que permite lavar el iniciador libre. Sin embargo, se han descrito un número de métodos para supervisar el proceso de amplificación sin una separación previa del iniciador. Todos ellos se basan en FET, y ninguno de ellos detecta el producto amplificado directamente. En lugar de esto, los métodos detectan algunos eventos relacionados con la amplificación. Por esa razón, se acompañan de problemas de alto fondo, y no son cuantitativos, como se discute más abajo.

Un método, descrito en Wang y otros (patente de los Estados Unidos núm.. 5,348,853; y *Anal. Chem.*, 67: 1197-1203 (1995)), usa un sistema de transferencia de energía en el que la transferencia de energía ocurre entre dos fluoróforos en la sonda. En este método, la detección de la molécula amplificada tiene lugar en los recipientes de reacción de amplificación, sin la necesidad de un paso de separación. Este método, sin embargo, no detecta el producto amplificado, sino que en su lugar detecta la disociación del iniciador del ácido nucleico "disipador de energía". Así, este método depende de la detección de una disminución en las emisiones; debe usarse una porción significativa del iniciador etiquetado para lograr una diferencia confiable entre las señales antes y después de la reacción.

Un segundo método de detección de un producto amplificado sin una separación previa del iniciador y el producto es el ensayo de PCR de nucleasa 5' (además llamado ensayo TaqMan™) (Holland y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7276-7280 (1991); Lee y otros, *Nucleic Acids Res.*, 21: 3761-3766 (1993)). Este ensayo detecta la acumulación de un producto de PCR específico por hibridación y escisión de una sonda fluorogénica doblemente etiquetada (la sonda "TaqMan") durante la reacción de amplificación. La sonda fluorogénica consiste de un ácido nucleico etiquetado con un colorante reportero fluorescente y un colorante apagador. Durante la PCR, esta sonda se escinde por la actividad exonucleasa 5' de la ADN polimerasa si, y solo si, se hibrida al segmento que se amplifica. La escisión de la sonda genera un aumento en la intensidad de fluorescencia del colorante reportero.

En el ensayo TaqMan, el donador y el inhibidor de fluorescencia se localizan preferentemente en los extremos 3'- y 5'- de la sonda, debido a que el requisito de que la hidrólisis 5'-3' se realice entre el fluoróforo y el inhibidor de fluorescencia debe alcanzarse solamente cuando estos dos porciones no estén demasiado cerca uno del otro. (Lyamichev y otros, *Science*, 260:778-783 (1993)). Este requisito es un serio inconveniente del ensayo ya que la eficiencia de la transferencia de energía disminuye con el inverso de la sexta potencia de la distancia entre el reportero y el inhibidor de fluorescencia. Así, si el inhibidor de fluorescencia no está suficientemente cerca del reportero para alcanzar la inhibición de la fluorescencia más eficiente las emisiones de fondo de la sonda pueden ser bastante altas.

Aún otro método para detectar productos de amplificación que descansa en el uso de transferencia de energía es el método de "sonda de baliza" descrito por Tyagi y otros (*Nature Biotech.*, 14:303-309 (1996)) que es además el tema de la patente de los Estados Unidos núm. 5,312,728 de Lizardi y otros Este método emplea sondas de hibridación de ácido nucleico que pueden formar estructuras de horquillas. En un extremo de la sonda de hibridación (el extremo 5'- o 3'-) hay un fluoróforo

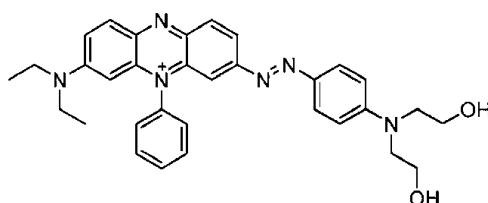
donador, y en el otro extremo, una porción aceptora. En este método, la porción aceptora es un inhibidor de fluorescencia, que absorbe energía del donador. Así cuando la baliza está en una configuración abierta, la fluorescencia del fluoróforo donador es detectable, mientras que cuando la baliza está en configuración de horquilla (cerrada), la fluorescencia del fluoróforo donador está inhibida. Cuando se emplea en la PCR, la sonda de baliza molecular, que se hibrida a una de las hebras del producto de PCR, está en "configuración abierta", y se detecta la fluorescencia, mientras aquellas que permanecen sin hibridar no van a fluorescer. Como un resultado, la cantidad de fluorescencia va a aumentar según aumenta la cantidad de producto de PCR, y así se puede usar como una medida del progreso de la PCR.

Ciertas limitaciones impiden la aplicación y el uso de las sondas FET, o resultan en ensayos que son menos sensibles de lo que podrían ser. La principal de estas limitaciones es la presencia de fluorescencia de fondo atribuible a las emisiones del inhibidor de fluorescencia, que da a la sonda un ruido fluorescente de fondo más alto que lo deseado. Un enfoque que se usa para mejorar esta limitación es el uso de un inhibidor de fluorescencia que no es un fluoróforo ("inhibidores de fluorescencia oscuros"), tales como derivados de 4-(dimetilamino)azobenceno (DABCYL). DABCYL es útil como agente inhibidor de fluorescencia para un número limitado de fluoróforos con cuyas características de emisión, las características de absorción del DABCYL se superponen. El intervalo limitado de absorción del DABCYL restringe la utilidad de este compuesto al permitir el uso de un número limitado de fluoróforos en conjunto con el DABCYL. Debido a que relativamente pocos fluoróforos se pueden usar con DABCYL en pares FET, aplicaciones multiplex, donde se desea usar dos o más fluoróforos con espectros de emisión de fluorescencia claramente resueltos son difíciles de diseñar por medio del uso de este inhibidor de fluorescencia.

En vista de las limitaciones de los inhibidores de fluorescencia oscuros y sondas disponibles actualmente, tales como sondas FET construidas con estos inhibidores de fluorescencia, existe en la técnica una necesidad de inhibidores de fluorescencia mejorados que se puedan incorporar en sondas para detectar analitos rápidamente, sensiblemente, fiablemente y cuantitativamente. Los inhibidores de fluorescencia ideales serían los que tienen de poca a ninguna señal de fluorescencia de apagado, y que se preparan fácilmente y económicamente. Además, una serie de inhibidores de fluorescencia que tengan propiedades físicas similares, pero distintas propiedades espectrales serían particularmente ventajosos. Bastante sorprendentemente, la presente invención proporciona tales inhibidores de fluorescencia, sondas que incorporan estos inhibidores de fluorescencia y métodos para usar los inhibidores de fluorescencia y las sondas.

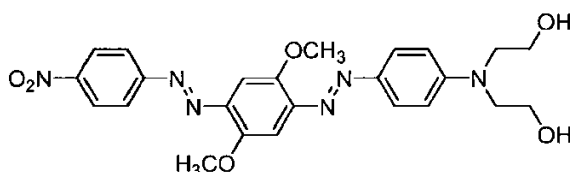
El documento WO 99/64431 describe compuestos que comprenden purinas sustituidas en la posición C-8 y pirimidinas sustituidas en la posición C-4 o C-5 con un enlazador y un inhibidor de fluorescencia.

La US 2,554,443 describe el siguiente compuesto:



como un colorante para teñir la piel.

La US 4,313,87 describe un método para preparar el siguiente compuesto



RESUMEN DE LA INVENCION

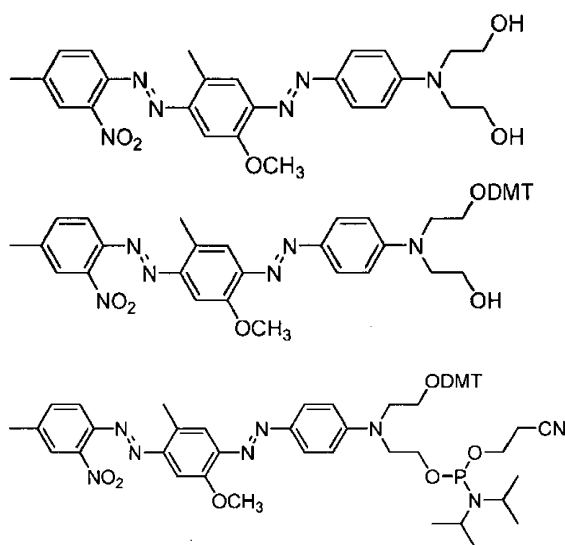
La presente invención proporciona una familia de inhibidores de fluorescencia de energía de estado de excitación que son sustancialmente no-fluorescentes, denominados "inhibidores de fluorescencia del Agujero Negro" ("BHQs"). Los inhibidores de fluorescencia de la invención remedian muchas de las deficiencias de los inhibidores de fluorescencia oscuros usados actualmente, sondas ensambladas por medio del uso de estos inhibidores de fluorescencia y métodos que usan tales inhibidores de fluorescencia y sondas. La presente invención proporciona una clase de inhibidores de fluorescencia oscuros que se funcionalizan para permitir su rápida unión a los componentes de la sonda por medio del uso de técnicas bien conocidas en la técnica, o modificaciones de tales técnicas que están dentro de las habilidades de los expertos en la técnica. Además, la presente invención proporciona una clase de inhibidores de fluorescencia oscuros que pueden modificarse para tener un perfil de absorción de la luz deseado. La provisión de esta clase de inhibidores de fluorescencia oscuros representa una mejora sustancial en el diseño de sondas que incorporan inhibidores de fluorescencia oscuros y métodos que usan tales sondas.

Muchas de las sondas de ácidos nucleicos que se usan actualmente dependen de la interacción entre el fluoróforo y el inhibidor de fluorescencia para minimizar la fluorescencia de la sonda en ausencia de su hibridación a un ácido nucleico complementario. La interacción entre el fluoróforo y el inhibidor de fluorescencia se provoca típicamente por medio del uso de una secuencia de sonda de ácidos nucleicos que forma una estructura secundaria (*por ejemplo*, horquilla, bucle, etc.). Requerir que la sonda adopte una estructura secundaria complica significativamente el diseño de la sonda y restringe grandemente las secuencias de ácidos nucleicos que se pueden usar como componentes de las sondas. En contraste, las sondas de ácidos nucleicos que usan BHQs de la presente invención se encuentra que facilitan la interacción entre el inhibidor de fluorescencia y el fluoróforo sin requerir la formación concomitante de la estructura secundaria de ácidos nucleicos, y de ese modo permite el uso de una diversidad de secuencias de ácidos nucleicos mucho mayor como componentes de las sondas fluorescentes.

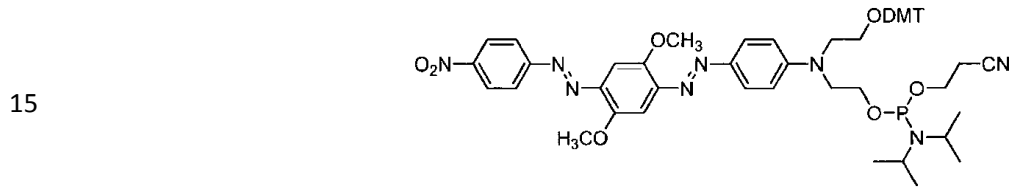
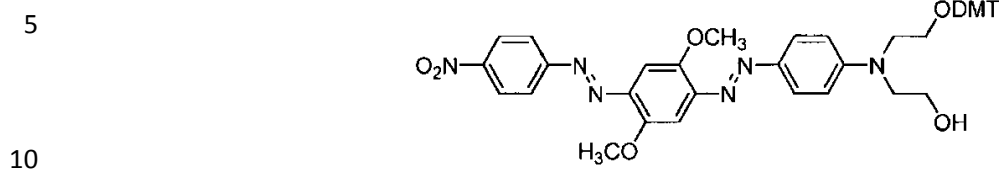
Además, al variar el número y la identidad de los miembros del sistema conjugado de los BHQs, las propiedades espectrales (*por ejemplo*, la absorbancia) de un BHQ se puede "ajustar" para hacer coincidir las características espectrales (*por ejemplo*, la emisión) de uno o más fluoróforos. Por ejemplo, como los BHQs de la presente invención se pueden seleccionar para tener un amplio intervalo de absorbancia máxima, estos inhibidores de fluorescencia son singularmente adecuados para usar en aplicaciones de multiplexación. Además, la habilidad de seleccionar un BHQ que tiene características espectrales particulares permite el uso de BHQs en aplicaciones de multiplexación por medio del uso de uno o más fluoróforos distintos en combinación con uno o más BHQ distintos, y de ese modo expande las opciones de pares donador-aceptor que se pueden incorporar en las sondas.

Los objetos de la presente invención se definen en las reivindicaciones acompañantes.

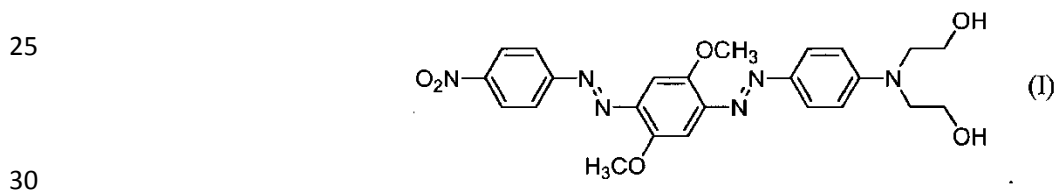
Así, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que tiene una estructura seleccionada de:



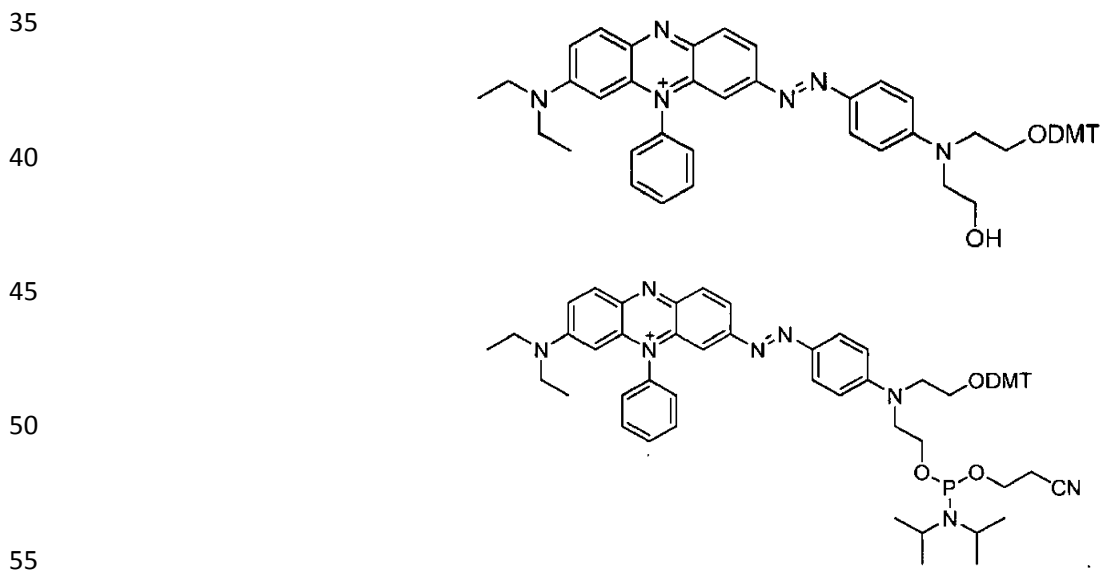
Así, en un segundo aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que tiene una estructura seleccionada de:



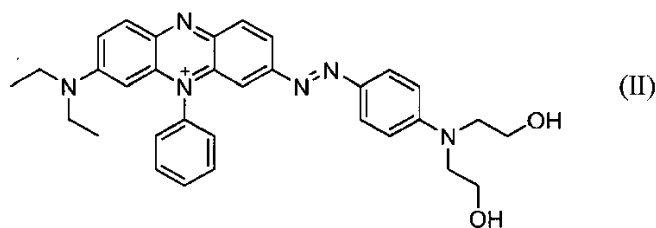
Ciertos aspectos de la invención descrita más abajo involucran un compuesto de la siguiente Fórmula (I):



En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que tiene una estructura seleccionada de:



Ciertos aspectos de la invención descrita más abajo involucran un compuesto de la siguiente Fórmula (II):



En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar si una muestra contiene una enzima. El método incluye: (a) poner en contacto la muestra con un constructo peptídico que incluye un fluoróforo; (b) excitar dicho fluoróforo; y (c) determinar una propiedad de fluorescencia de dicha muestra, en donde la presencia de dicha enzima en dicha muestra resulta en un cambio en dicha propiedad de fluorescencia.

Los constructos peptídicos incluyen: i) un fluoróforo; ii) un compuesto de la invención o un compuesto de la fórmula (I) o la fórmula (II) anteriormente; y iii) un sitio de reconocimiento de escisión para la enzima. Por otra parte, el péptido está en una configuración que permite la transferencia de energía donador-aceptor entre el fluoróforo y el compuesto cuando el fluoróforo se excita.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un compuesto altera una actividad de una enzima. El método comprende (a) poner en contacto una muestra que comprende la enzima y el compuesto con un constructo peptídico que comprende i) un fluoróforo; ii) un compuesto de la invención o un compuesto de la fórmula (I) o fórmula (II); y iii) un sitio de reconocimiento de la escisión para la enzima, en donde el péptido está en una configuración que permite la transferencia de energía donador-aceptor entre el fluoróforo y el compuesto cuando el fluoróforo se excita; (b) excitar dicho fluoróforo; y (c) determinar una propiedad de fluorescencia de la muestra. La actividad de dicha enzima en dicha muestra resulta en un cambio de la propiedad de fluorescencia.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar una secuencia objetivo de ácido nucleico. El método incluye: (a) poner en contacto la secuencia objetivo con un ácido nucleico detector que incluye una secuencia de unión objetivo monocatenaria; (b) hibridar la secuencia de unión objetivo a la secuencia objetivo, y de ese modo alterar la configuración del ácido nucleico detector, causando un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (c) detectar el cambio en el parámetro de fluorescencia, y de ese modo detectar la secuencia objetivo de ácido nucleico.

En los métodos descritos en la presente descripción, a menos que se indique lo contrario, un ácido nucleico detector preferido incluye una secuencia de unión objetivo monocatenaria. La secuencia de unión se enlaza a: i) un fluoróforo; y ii) un compuesto de la invención o de la fórmula (I) o fórmula (II).

En un séptimo aspecto, la invención proporciona un método para detectar la amplificación de una secuencia objetivo. El método incluye el uso de una reacción de amplificación que incluye las siguientes etapas: (a) hibridar la secuencia objetivo y un ácido nucleico detector. El ácido nucleico detector incluye una secuencia de unión objetivo monocatenaria y una estructura 5' secundaria intramolecularmente asociada a la secuencia de unión objetivo. al menos una porción de la secuencia detectora forma una cola monocatenaria que está disponible para la hibridación de la secuencia objetivo; (b) extender el ácido nucleico detector hibridado en la secuencia objetivo con una polimerasa para producir un producto de extensión de ácido nucleico detector y separar el producto de extensión de ácido nucleico detector desde la secuencia objetivo; (c) hibridar un iniciador para el producto de extensión de ácido nucleico detector y extender el iniciador con la polimerasa, y de ese modo linealizar la estructura secundaria intramolecularmente asociada y producir un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (d) detectar el cambio en el parámetro de fluorescencia, y de ese modo detectar la secuencia objetivo.

En un octavo aspecto, la invención proporciona un método para determinar si un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico se hibridan. En este método, el primer ácido nucleico incluye un compuesto de acuerdo con la invención o de la fórmula (I) o fórmula (II). El método incluye: (a) poner en contacto el primer ácido nucleico con el segundo ácido nucleico; (b) detectar una alteración en una propiedad fluorescente de un elemento seleccionado del primer ácido nucleico, el segundo ácido nucleico y una combinación de estos, y de ese modo determinar si ocurre la hibridación.

La invención proporciona adicionalmente un microarreglo que comprende un compuesto de la invención o de la fórmula (I) o la fórmula (II). El compuesto se conjuga directamente con un soporte sólido o con una molécula portadora unida al soporte sólido.

La invención proporciona además un método para probar un microarreglo para la presencia de un compuesto. El método incluye: (a) poner en contacto el microarreglo con una sonda que interactúa con el compuesto. Las sondas incluyen un compuesto de la invención o de la fórmula (I) o fórmula (II); y (b) detectar una diferencia en una propiedad de fluorescencia de un elemento seleccionado de la sonda, el compuesto y combinaciones de estos, y de ese modo determinar la presencia del compuesto.

La presente invención incluye además una mezcla que incluye al menos una primera molécula portadora y una segunda molécula portadora. La primera molécula portadora une covalentemente a ella un compuesto de la invención o de la fórmula (I) o fórmula (II). La segunda molécula portadora tiene covalentemente unida a ella un compuesto de la invención o de la fórmula (I) o la fórmula (II). En relación con esto, se proporciona un método para detectar o cuantificar unas especies moleculares, el método comprende: poner en contacto las especies moleculares con una mezcla como se describió; y detectar un cambio en la propiedad fluorescente de un componente de dicha mezcla, las especies moleculares y una combinación de ellas, y de ese modo detectar o cuantificar dichas especies moleculares.

Los aspectos adicionales de la invención son:

- (A) un compuesto de la invención que está unido covalentemente a: una molécula pequeña con un peso molecular de menos de 1000 dalton, una proteína, un péptido, un polímero sintético, un soporte sólido;
- (B) una sonda que incluye un compuesto de la invención o un compuesto de la fórmula (I) o fórmula (II) conjugado con un receptor, una enzima, un ligando para una especie objetivo que es un ácido nucleico o un péptido, o a una molécula pequeña con un peso molecular de menos de 1000 dalton;
- (C) un compuesto de la invención o un conjugado que comprende uno o más de dichos compuestos inmovilizados en un polímero, biomolécula o material sólido o semisólido que tenga cualquier configuración útil;
- (D) una especie que contiene un compuesto de la invención y dentro una matriz de acrilamida.

Los objetos y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica después de examinar la descripción detallada que sigue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Fig. 1** es un esquema sintético ilustrativo para la preparación de un BHQ de la invención.

La **Fig. 2** es una colección de estructuras de BHQ ilustrativas (BH1, BH2 y BH3) de la invención.

La **Fig. 3** es una colección de estructuras de un BHQ ilustrativas unidas a un soporte de vidrio de poro controlado (BH1-CPG) e intermedios a lo largo de síntesis de BH1-CPG.

La **Fig. 4** es una colección de estructuras de un BHQ ilustrativo unido a un soporte de vidrio de poro controlado (BH2-CPG) e intermedios a lo largo de síntesis de BH2-CPG.

La **Fig. 5** es una colección de estructuras de un BHQ ilustrativo unido a un soporte de vidrio de poro controlado (BH3-CPG) e intermedios a lo largo de síntesis de BH3-CPG.

La **Fig. 6** es una colección de estructuras de derivados activados de BH1.

La **Fig. 7 (a-b)** es una comparación del espectro de absorbancia del Dabcyl y los BHQs de la invención:

(a) es un gráfico de superposición del espectro de absorbancia de BH1 y el espectro de emisión de tres fluoróforos usados comúnmente FAM, TET y JOE;

(b) es un gráfico de superposición del espectro de absorbancia de DABCYL y el espectro de emisión de tres fluoróforos usados comúnmente FAM, TET y JOE.

La **Fig. 8** es una serie de estructuras de ácido nucleico que incorporan los BHQ ilustrativos de la invención.

Descripción detallada de la invención y modalidades preferidas

Abreviaturas

"BHQ," como se usa en la presente descripción, se refiere a "Inhibidor de fluorescencia del Agujero Negro."

"FRET," como se usa en la presente descripción, se refiere a "Transferencia de energía de fluorescencia." "FRET," como se usa en la presente descripción, se refiere a "Transferencia de energía de resonancia fluorescente." Estos términos se usan en la presente descripción para referirse a procesos de transferencia de energía radioactivos y no radioactivos. Por ejemplo, los procesos en los que un protón se emite y aquellos que involucran transferencia de electrones de intervalo prolongado se

incluyen en estos términos. A lo largo de estas especificaciones, ambos fenómenos se subsuman bajo el término general "transferencia de energía donador-aceptor".

Definiciones

- 5 A menos que se defina de cualquier otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen, generalmente, el mismo significado que el conocido comúnmente por aquellos con experiencia en la técnica a la que pertenece esta invención. Generalmente, la nomenclatura usada en la presente descripción y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química de ácidos nucleicos e hibridación descritos
- 10 más abajo son aquellos bien conocidos y empleados en la técnica. Se usan técnicas estándar para la síntesis de ácidos nucleicos y polipéptidos. Generalmente, las reacciones enzimáticas y las etapas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales en la técnica y varias referencias generales (*ver generalmente*, Sambrook y otros MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., que se incorpora
- 15 en la presente descripción como referencia), que se proporcionan a través de todo este documento. La nomenclatura usada en la presente descripción y en los procedimientos de laboratorio en la química analítica, y síntesis orgánica descrita más abajo son aquellos conocidos y que se emplean comúnmente en la técnica. Técnicas estándar, o modificaciones de estas, se usan para síntesis química y análisis químicos.
- 20 "Analito", como se usa en la presente descripción significa cualquier compuesto o molécula de interés para el cual se realiza una prueba diagnóstica. Un analito puede ser, por ejemplo, una proteína, péptido, carbohidrato, polisacárido, glicoproteína, hormona, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, sustrato, metabolito, análogo al estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, colorante, nutriente, factor de crecimiento, etc.
- 25 Como se usa en la presente descripción, "transferencia de energía" se refiere al proceso por el cual la energía en estado de excitación de un grupo excitado se altera por un grupo modificador, tal como un inhibidor de fluorescencia. Si el grupo modificador de energía del estado de excitación es un grupo inhibidor de la fluorescencia, entonces la emisión de fluorescencia del grupo fluorescente se atenúa (se inhibe la fluorescencia). La transferencia de energía puede ocurrir mediante la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, o mediante la transferencia de energía directa. Los
- 30 mecanismos exactos de transferencia de energía en estos dos casos son diferentes. Ha de entenderse que cualquier referencia a transferencia de energía en la presente aplicación abarca todos estos fenómenos con mecanismos distintos.
- Como se usa en la presente descripción, "par de transferencia de energía" se refiere a dos moléculas cualquiera que participan en la transferencia de energía. Típicamente, una de las moléculas actúa como un grupo fluorescente, y la otra actúa como un grupo modificador de la fluorescencia. El par de transferencia de energía preferido de la presente invención comprende un grupo fluorescente y un grupo de inhibición de fluorescencia de la invención. Todo lo que se requiere es que las propiedades espectroscópicas del par de transferencia de energía como un todo cambien en alguna forma medible si la distancia entre los miembros individuales se altera en alguna cantidad crítica. "Par de transferencia de energía" se usa para referirse a un grupo de moléculas que forman un complejo dentro del cual ocurre la transferencia de energía. Tales
- 35 complejos pueden incluir, dos grupos fluorescentes, que pueden ser diferentes uno del otro y un grupo inhibidor de la fluorescencia, o múltiples grupos fluorescentes y múltiples grupos inhibidores de la fluorescencia. En los casos donde hay múltiples grupos fluorescentes y/o múltiples grupos inhibidores de la fluorescencia, los grupos individuales pueden ser diferentes unos de otros.
- 40 Como se usa en la presente descripción, "grupo modificador de la fluorescencia" se refiere a una molécula de la invención que puede alterar en cualquier forma la emisión de fluorescencia de un grupo fluorescente. Un grupo modificador de la fluorescencia generalmente logra esto mediante un mecanismo de transferencia de energía. En dependencia de la identidad del grupo modificador de la fluorescencia, la emisión de fluorescencia puede sufrir un número de alteraciones, que incluyen la atenuación, la inhibición de la fluorescencia completa, el aumento, un desplazamiento en la longitud de onda, un desplazamiento en la polaridad, y un cambio en la duración de la fluorescencia. Un ejemplo de un grupo modificador de la fluorescencia es un grupo inhibidor de la fluorescencia.
- 45 Como se usa en la presente descripción, "grupo inhibidor de la fluorescencia" se refiere a cualquier grupo modificador de la fluorescencia de la invención que puede atenuar al menos parcialmente la luz emitida por un grupo fluorescente. A esta atenuación se hace referencia en la presente descripción como "inhibición de la fluorescencia". Por lo tanto, la iluminación del grupo fluorescente en presencia del grupo inhibidor de la fluorescencia lleva a una señal de emisión que es menos intensa que la esperada, o incluso completamente ausente. La inhibición de la fluorescencia típicamente ocurre por la transferencia de energía entre el grupo fluorescente y el grupo inhibidor de la fluorescencia.
- 50 Como se usa en la presente descripción, "ácidos nucleicos" significa ADN, ARN, monocatenario, de doble cadena, o motivos

de hibridación más altamente agregados, y cualquier modificación de estos. Las modificaciones incluyen aquellas que proporcionan grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, y fluxionalidad a las bases del ligando de ácido nucleico o al ligando de ácido nucleico como un todo. Tales modificaciones incluyen ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), modificaciones del grupo fosfodiéster (*por ejemplo*, fosforotioatos, metilfosfonatos), modificaciones del azúcar en la posición 2', modificaciones de la pirimidina en la posición 5, modificaciones de la purina en la posición 8, las modificaciones en las aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-iodo-uracilo; las modificaciones en la cadena principal, metilaciones, combinaciones de apareamiento de bases inusual tales como las isobases, isocitidina e isoguanidina y similares. Los ácidos nucleicos pueden incluir además bases no naturales, tal como, por ejemplo, nitroindol. Las modificaciones pueden además incluir las modificaciones 3' y 5' tales como el tapado con un BHQ, un fluoróforo u otra porción.

"Péptido" se refiere a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen mediante enlaces amida, alternativamente denominados polipéptidos. Cuando los amino ácidos son α -amino ácidos, se puede usar ya sea el isómero óptico-L o el isómero óptico-D. Además, se incluyen también los aminoácidos no naturales, por ejemplo, β -alanina, fenilglicina y homoarginina. Los aminoácidos que comúnmente se encuentran y que no son codificados por genes también se pueden usar en la presente invención. Todos los aminoácidos usados en la presente invención pueden ser D-o L-isómeros. Se prefieren generalmente los L -isómeros. Adicionalmente, otros peptidomiméticos son útiles además en la presente invención. Para una revisión general, ver, Spatola, A. F., en CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF AMINO ACIDS, PEPTIDES AND PROTEINS, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, Nueva York, p. 267 (1983).

"Especies bioactivas" se refiere a moléculas que, cuando se administran al organismo afectan ese organismo. Las especies bioactivas ilustrativas incluyen productos farmacéuticos, pesticidas, herbicidas, reguladores de crecimiento y similares. Las especies bioactivas abarcan moléculas pequeñas (*por ejemplo*, aproximadamente <1000 dalton), oligómeros, polímeros y similares. Además se incluyen los ácidos nucleicos y sus análogos, péptidos y sus análogos y similares.

El término "alquilo" se usa en la presente descripción para referirse a un radical hidrocarburo monovalente, ramificado o no ramificado, saturado o insaturado, que tiene generalmente aproximadamente de 1-30 carbonos y preferentemente, de 4-20 carbonos y con mayor preferencia de 6-18 carbonos. Cuando el grupo alquilo tiene de 1-6 átomos de carbono, se denomina "alquilo inferior". Los radicales alquilo incluyen, por ejemplo, estructuras que contienen uno o más grupos metileno, metina y/o meteno. Las estructuras ramificadas tienen un motivo ramificador similar a i-propilo, t-butilo, i-butilo, 2-etilpropilo, etc. Como se usa en la presente descripción, el término abarca "alquilos sustituidos," y "alquilo cíclico."

"Alquilo sustituido" se refiere a alquilo como se describió que incluyen uno o más sustituyentes tales como, por ejemplo, alquilo inferior, arilo, acilo, halógeno (*es decir*, haloalquilos, *por ejemplo*, CF_3), hidroxilo, amino, alcoxi, alquilamino, acilamino, tioamido, aciloxi, ariloxi, ariloxialquilo, mercapto, tia, aza, oxo, hidrocarburos cíclicos saturados e insaturados, heterociclos y similares. Estos grupos pueden unirse a cualquier carbono o sustituyente de la porción alquilo. Además, estos grupos pueden ser colgantes de, o integrales con, la cadena de alquilo.

El término "arilo" se usa en la presente descripción para referirse a un sustituyente aromático, que puede ser un solo anillo aromático o múltiples anillos aromáticos que se fusionan juntos, se enlazan covalentemente, o se enlazan a un grupo común tal como porción diazo, metileno o etileno. El grupo de enlace común puede ser además un carbonilo como en la benzofenona. El(los) anillo(s) pueden incluir fenilo, naftilo, bifenilo, difenilmetilo y benzofenona entre otros. El término "arilo" abarca "arilalquilo" y "arilo sustituido".

"Arilo sustituido" se refiere a arilo como se describió que incluye uno o más grupos funcionales tales como alquilo inferior, acilo, halógeno, haloalquilos (*por ejemplo*, CF_3), hidroxilo, amino, alcoxi, alquilamino, acilamino, aciloxi, fenoxi, mercapto e hidrocarburos cíclicos ambos saturados e insaturados que se funden al anillo(s) aromático, enlazado covalentemente o enlazado a grupos comunes tales como una porción diazo, metileno o etileno. El grupo de enlace puede además ser un carbonilo tal como ciclohexil fenil cetona. El término "arilo sustituido" abarca "arilalquilo sustituido".

El término "arilalquilo" se usa en la presente descripción para referirse a un subconjunto de "arilo" en el cual el grupo arilo se une a otro grupo por un grupo alquilo como se define en la presente descripción.

"Arilalquilo sustituido" define un subconjunto de "arilo sustituido" en donde el grupo arilo sustituido está unido a otro grupo por un grupo alquilo como se define en la presente descripción.

El término "acilo" se usa para describir un sustituyente cetona, $-C(O)R$, donde R es alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido como se define en la presente descripción.

El término "halógeno" se usa en la presente descripción para referirse a átomos de flúor, bromo, cloro y yodo.

El término "hidroxi" se usa en la presente descripción para referirse al grupo -OH.

5 El término "amino" se usa para -NRR', en donde R y R' son independientemente H, alquilo, arilo o análogos sustituidos de estos. "Amino" abarca "alquilamino" que denota aminas secundarias y terciarias y "acilamino" que describe el grupo RC(O)NR'.

10 El término "alcoxi" se usa en la presente descripción para referirse al grupo -OR, donde R es alquilo, o un análogo sustituido de este. Los radicales alcoxi adecuados incluyen, por ejemplo, metoxi, etoxi, t-butoxi, etc.

15 Como se usa en la presente descripción, el término "ariloxi" denota grupos aromáticos que se enlazan a otro grupo directamente mediante un átomo de oxígeno. Este término abarca porciones "ariloxi sustituidas" en que el grupo aromático se sustituye como se describió anteriormente para "arilo sustituido." Las porciones ariloxi ilustrativas incluyen fenoxi, fenoxi sustituido, benciloxi, fenetiloxi, etc.

20 Como se usa en la presente descripción "ariloxialquilo" define grupos aromáticos unidos, mediante un átomo de oxígeno a un grupo alquilo, como se define en la presente descripción. El término "ariloxialquilo" abarca porciones "ariloxialquilo sustituidas" en las que el grupo aromático se sustituye como se describió para "arilo sustituido."

25 Como se usa en la presente descripción, el término "mercapto" define porciones de la estructura general -S-R en donde R es H, alquilo, arilo o heterocíclico como se describe en la presente descripción.

El término "hidrocarburo cíclico saturado" denota grupos tales como el ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, etc, y análogos sustituidos de esas estructuras. Estos hidrocarburos cíclicos pueden ser estructuras de un solo o múltiples anillos.

25 El término "hidrocarburo cíclico insaturado" se usa para describir un grupo no aromático monovalente con al menos un enlace doble, tal como ciclopenteno, ciclohexeno, etc. y análogos sustituidos de estos. Estos hidrocarburos cíclicos pueden ser estructuras de un solo o múltiples anillos.

30 El término "heteroarilo" como se usa en la presente descripción se refiere a anillos aromáticos en los cuales uno o más átomos de carbono del anillo aromático se sustituyen por un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno o azufre. Heteroarilo se refiere a estructuras que pueden ser un solo anillo aromático, anillo aromático(s), múltiple o uno o más anillos aromáticos unidos a uno o más anillos no-aromático(s). En estructuras que tienen múltiples anillos, los anillos se pueden fundir juntos, enlazarse covalentemente, o enlazarse a un grupo común tal como una porción diazo, metileno o etileno. El grupo de enlace puede ser además un carbonilo como en fenil piridil cetona. Como se usa en la presente descripción, los anillos como tiofeno, piridina, isoxazol, ftalimida, pirazol, indol, furano, etc. o análogos benzo-fusionados de estos anillos se definen por el término "heteroarilo."

40 "Heteroarilalquilo" define un subconjunto de "heteroarilo" en donde un grupo alquilo, como se define en la presente descripción, une el grupo heteroarilo a otro grupo.

45 "heteroarilo sustituido" se refiere a heteroarilo como el descrito en donde el núcleo del heteroarilo es sustituido con uno o más grupos funcionales tales como alquilo inferior, acilo, halógeno, haloalquilos (*por ejemplo*, CF₃), hidroxi, amino, alcoxi, alquilamino, acilamino, aciloxi, mercapto, etc. Por lo tanto, los análogos sustituidos de anillos heteroaromáticos como tiofeno, piridina, isoxazol, ftalimida, pirazol, indol, furano, etc. o análogos benzo-fusionados de estos anillos se definen por el término "heteroarilo sustituido."

50 "Heteroalquilo sustituido" se refiere a un subconjunto "heteroarilo sustituido" como se describe anteriormente en el que un grupo alquilo, como se define en la presente descripción, enlaza el grupo heteroarilo a otro grupo.

El término "heterocíclico" se usa en la presente descripción para describir un grupo monovalente saturado o insaturado no-aromático que tiene un solo anillo o múltiples anillos condensados desde 1-12 átomos de carbono y desde 1-4 heteroátomos seleccionados de nitrógeno, sulfuro u oxígeno dentro del anillo. Tales heterociclos son, por ejemplo, tetrahidrofurano, morfolina, piperidina, pirrolidina, etc.

55 El término "heterocíclico sustituido" como se usa en la presente descripción describe un subconjunto de "heterocíclicos" en donde el núcleo heterocíclico se sustituye con uno o más grupos funcionales tales como alquilo inferior, acilo, halógeno, haloalquilos (*por ejemplo*, CF₃), hidroxi, amino, alcoxi, alquilamino, acilamino, aciloxi, mercapto, etc.

El término "alquilo heterocíclico" define un subconjunto de "heterocíclico" en donde un grupo alquilo, como se define en la presente descripción, enlaza el grupo heterocíclico a otro grupo.

5 Introducción

La presente invención proporciona una clase de modificadores de fluorescencia, particularmente inhibidores de fluorescencia, de energía de estado de excitación. Los compuestos de la invención absorben energía de estado de excitación de un fluoróforo reportero, pero son ellos mismos sustancialmente no-fluorescentes. El fluoróforo que transfiere la energía de estado de excitación a los inhibidores de fluorescencia de la invención será generalmente una etiqueta que se une a un analito o una especie que interactúa con, y permite la detección y/o cuantificación del analito.

Las etiquetas fluorescentes tienen la ventaja de requerir pocas precauciones en su manipulación, y ser dóciles para técnicas de visualización de alto flujo (los análisis ópticos incluyen la digitalización de imágenes para el análisis en un sistema integrado que incluye una computadora) Las etiquetas preferidas se caracterizan típicamente por uno o más de los siguientes: alta sensibilidad, alta estabilidad, bajo fondo, baja sensibilidad ambiental y alta especificidad en el etiquetado. Muchas etiquetas fluorescentes están disponibles comercialmente de la compañía química SIGMA (Saint Louis, MO), Molecular Probes (Eugene, OR), R&D systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica- Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas por los expertos. Además, los expertos en la técnica reconocerán cómo seleccionar un fluoróforo apropiado para una aplicación particular y, si no está fácilmente disponible comercialmente, serán capaces de sintetizar el fluoróforo necesario de novo o modificar sintéticamente compuestos fluorescentes comercialmente disponibles para llegar a la etiqueta fluorescente deseada.

Adicionalmente un fluoróforos de moléculas pequeñas, proteínas fluorescentes de origen natural y análogos modificados de tales proteínas son útiles en la presente invención. Tales proteínas incluyen, por ejemplo, proteína verde fluorescente de los cnidarios (Ward y otros, Photochem. Photobiol. 35:803-808 (1982); Levine y otros, Comp. Biochem. Physiol., 72B:77-85 (1982)), proteína amarilla fluorescente de la cepa *Vibrio fischeri* (Baldwin y otros, Biochemistry 29:5509-15 (1990)), Peridinin-clorofila de *Symbiodinium* dinoflagelado sp. (Morris y otros, Plant Molecular Biology 24:673:77 (1994)) ficobiliproteínas de cianobacterias marinas, tales como *Synechococcus*, por ejemplo, ficoeritrina y ficocianina (Wilbanks y otros, J. Biol. Chem. 268:1226-35 (1993)), y similares.

35 Inhibidor de fluorescencia del Agujero Negro

La presente invención se refiere a una familia de inhibidores de fluorescencia oscuros que se denominan en la presente descripción como "Inhibidor de fluorescencia del Agujero Negro™" ("BHQ"). Los inhibidores de fluorescencia de la invención incluyen sistemas π -enlazados conjugados que son preferentemente especies aromáticas azo-enlazadas.

La presente invención proporciona un inhibidor de fluorescencia de energía de estado de excitación que tiene una estructura que comprende al menos tres radicales seleccionados de arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y combinaciones de estos, en donde al menos dos de los residuos se enlazan covalentemente a través de un enlace diazo exocíclico, el inhibidor de fluorescencia adicionalmente comprende un grupo funcional reactivo que proporciona un locus para la conjugación del inhibidor de fluorescencia a la molécula portadora. Aunque los inhibidores de fluorescencia se pueden usar en su forma libre no enlazada, generalmente se prefiere que estén atados a otra especie, así los inhibidores de fluorescencia preferidos además comprenden un grupo funcional reactivo que proporciona un locus para la conjugación del inhibidor de fluorescencia a una molécula portadora. Más particularmente, las estructuras son como las que se expusieron anteriormente bajo el encabezamiento "Resumen de la invención".

En otra modalidad preferida, los BHQs de la invención descritos en la presente descripción no tienen sustancialmente fluorescencia nativa, particularmente cerca de su absorbancia máxima o cerca de la absorbancia máxima del fluoróforos usado en conjunto con los BHQs. Los BHQ tendrán preferentemente una absorbancia máxima de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 760 nm, y con mayor preferencia, de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 600 nm.

55 Grupos funcionales reactivos

Los compuestos de la invención contienen un grupo funcional reactivo. Los grupos reactivos y clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente aquellos que se conocidos en la técnica de química de bioconjugados. Actualmente las clases favorecidas de reacciones disponibles con reactivos BHQs son aquellas que

proceden bajo condiciones relativamente suaves. Estas incluyen sustituciones nucleofílicas (*por ejemplo*, reacciones de aminas y alcoholes con acil haluros, ésteres activos), sustituciones electrofílicas (*por ejemplo*, reacciones de enamina) y adiciones a múltiples enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo (*por ejemplo*, reacción de Michael, adición de Diels-Alder). Estas y otras reacciones útiles se discuten en, por ejemplo, Marzo, *ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY*, 3ra Ed., John Wiley & Sons, Nueva York, 1985; Hermanson, *BIOCONJUGATE TECHNIQUES*, Academic Press, San Diego, 1996; y Feeney y otros, *MODIFICATION OF PROTEINS*; Serie Advances in Chemistry, Vol. 198, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982.

Los grupos funcionales reactivos útiles incluyen, por ejemplo:

- (a) los grupos hidroxilo, que pueden convertirse a ésteres, éteres, aldehídos, *etc.* y
- (b) fosforamiditas y otros grupos funcionales estándar útiles en la síntesis de ácidos nucleicos.

Los grupos funcionales reactivos se pueden elegir de forma que ellos no participen en, o interfieran con, las reacciones necesarias para ensamblar en análogo BHQ reactivo. Alternativamente, un grupo funcional reactivo se puede proteger de participar en la reacción por la presencia de un grupo protector. Aquellos con experiencia en la técnica entienden cómo proteger un grupo funcional particular de manera que no interfiera con un conjunto seleccionado de condiciones de reacción. Para ejemplos de grupos protectores útiles, *ver*, por ejemplo, Greene y otros, *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

Porciones donadoras y aceptoras.

Una de las ventajas de los compuestos de la invención es que se pueden usar una amplia variedad de moléculas donadoras de energía en conjunto con los BHQs. Un amplio arreglo de fluoróforos se conoce por los expertos en la técnica. *Ver*, por ejemplo, Cardullo y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8790-8794 (1988); Dexter, D.L., *J. of Chemical Physics* 21: 836-850 (1953); Hochstrasser y otros, *Biophysical Chemistry* 45: 133-141 (1992); Selvin, P., *Methods in Enzymology* 246: 300-334 (1995); Steinberg, I. *Ann. Rev. Biochem.*, 40: 83-114 (1971); Stryer, L. *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 819-846 (1978); Wang y otros, *Tetrahedron Letters* 31: 6493-6496 (1990); Wang y otros, *Anal. Chem.* 67: 1197-1203 (1995).

Una lista de donadores ilustrativos que se pueden usar en conjunto con los inhibidores de fluorescencia de la invención se proporciona en la Tabla 1.

TABLA 1

Porciones adecuadas que se pueden seleccionar como donadores o aceptores en pares de transferencia de energía donador-aceptor
ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'disulfónico
acridina y derivados:
acridina
acridina isotiocianato
ácido 5-(2'-aminoetilo)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS)
4-amino-N-[3-vinilsulfonyl]fenil]naftalimida-3,5 disulfonato
N-(4-anilino-1-naftilo)maleimida
antranilamida
BODIPY
Amarillo Brillante
cumarina y derivados:
cumarina
7-amino-4-metilcumarina (AMC, cumarina 120)
7-amino-4-trifluorometilcumarina (Coumaran 151)

Porciones adecuadas que se pueden seleccionar como donadores o aceptores en pares de transferencia de energía donador-aceptor	
	colorantes de cianina
5	cianosina
	4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI)
	5', 5"-dibromopirogalol-sulfonaftalina (Bromopirogalol Rojo)
10	7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina
	pentaacetato de dietilentriamina
	ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico
15	ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico
	cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonilo (DNS, dansilcloruro)
	ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL)
20	4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC)
	eosina y derivados:
	eosina
	eosina isotiocianato
25	eritrosina y derivados:
	eritrosina B
	eritrosina isotiocianato
30	etidio
	fluoresceína y derivados:
	5-carboxifluoresceína (FAM)
35	5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF)
	2',7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE)
	fluoresceína
40	fluoresceína isotiocianato
	QFITC (XRITC)
	fluorescamina
45	IR144
	IR1446
	verde malaquita isotiocianato
50	4-metilumbeliferona
	orto cresoltaleína
	nitrotirosina
	pararrosanilina
55	Rojo de fenol
	B-ficoeritrina
60	o-ftaldialdehído

	pireno y derivados:
	pireno
	pireno butirato
	succinimidil 1-pireno butirato
5	puntos cuántum
	Rojo reactivo 4 (Cibacron™ Rojo brillante 3B-A)
	rodamina y derivados:
10	6-carboxi-X-rodamina (ROX)
	6-carboxirodamina (R6G)
	lisamina rodamina B sulfonil cloruro rodamina (rod)
15	rodamina B
	rodamina 123
	rodamina X isotiocianato
20	sulforodamina B
	sulforodamina 101
	derivado sulfonil cloruro de sulforodamina 101 (Texas Rojo)
25	N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA)
	tetrametil rodamina
	tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC)
30	riboflavina
	ácido rosólico
	derivados de quelato de terbio

Hay gran cantidad de orientaciones prácticas disponible en la literatura para seleccionar pares donador-aceptor apropiados para sondas particulares, como se ejemplifica por las siguientes referencias: Pesce y otros, Eds., FLUORESCENCE SPECTROSCOPY (Marcel Dekker, Nueva York, 1971); White y otros, FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH (Marcel Dekker, Nueva York, 1970); y similares. La literatura también incluye referencias que proporcionan listas exhaustivas de las moléculas fluorescentes y cromogénicas y sus propiedades ópticas relevantes para la elección de parejas reportero-inhibidor de fluorescencia (ver, por ejemplo, Berlman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2da Edición (Academic Press, Nueva York, 1971); Griffiths, COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES (Academic Press, Nueva York, 1976); Bishop, Ed., INDICATORS (Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT sondas y RESEARCH CHEMICALS (Molecular sondas, Eugene, 1992) Pringsheim, FLUORESCENCE y PHOSPHORESCENCE (Interscience Publishers, Nueva York, 1949); y similares. Más aun, hay extensivas orientaciones en la literatura para derivatizar las moléculas reportera e inhibidora de fluorescencia para la unión covalente a través de grupos reactivos comunes que se pueden añadir a un ácido nucleico, como se ejemplifica por las siguientes referencias: Haugland (*supra*); Ullman y otros, patente de los Estados Unidos núm. 3,996,345; Khanna y otros, patente de los Estados Unidos núm. 4,351,760. Así, está bien dentro de las habilidades de los expertos en la técnica elegir un par intercambiador de energía para una aplicación particular y para conjugar los miembros de este par a una molécula sonda, tal como, por ejemplo, un ácido nucleico, péptido u otro polímero.

Generalmente, se prefiere que una banda de absorbancia del BHQ se superponga sustancialmente a la banda de emisión de fluorescencia del donador. Cuando el donador (fluoróforo) es un componente de una sonda que usa transferencia de energía donador-aceptor, la porción donadora fluorescente y el inhibidor de fluorescencia (aceptor) de la invención se seleccionan preferentemente de forma que las porciones donadora y aceptora exhiban transferencia de energía donador-aceptor cuando la porción donadora se excita. Un factor a considerar en la elección del par fluoróforo-inhibidor de fluorescencia es la eficiencia de la transferencia de energía donador-aceptor entre ellos. Preferentemente, la eficiencia de FRET entre las porciones donador y acepto es al menos 10%, con mayor preferencia al menos 50% y aún con mayor

preferencia al menos 80%. La eficiencia de FRET se puede probar empíricamente fácilmente por medio del uso de los métodos descritos en la presente descripción y conocidos en la técnica.

La eficiencia de la transferencia de energía entre el par donador-aceptor se puede además ajustar por el cambio de la habilidad de los grupos donador y aceptor de dimerizar o asociarse estrechamente. Si las porciones donador y aceptor se conoce o se determina que están estrechamente asociadas, se puede promover un aumento o disminución de la asociación por el ajuste de la longitud de la porción enlazadora, o de la misma sonda, entre el donador y el aceptor. La habilidad del par donador-aceptor de asociarse se puede aumentar o disminuir al ajustar las interacciones hidrofóbicas o iónicas, o las repulsiones estéricas en el constructo de la sonda. Así, las interacciones intramoleculares responsables por la asociación del par donador-aceptor se pueden aumentar o atenuar. Así, por ejemplo, la asociación entre el par donador-aceptor se puede aumentar por, por ejemplo, usar un donador que contiene una carga total negativa y un aceptor con una carga total positiva.

Adicionalmente a los fluoróforos que se unen directamente a una sonda, los fluoróforos pueden además unirse por medios indirectos. En esta modalidad, una molécula ligando (*por ejemplo*, biotina) se une generalmente covalentemente a las especies sonda. El ligando después se une a otras moléculas (*por ejemplo*, estreptavidina) molécula, que es ya sea inherentemente detectable o se une covalentemente a un sistema señal, tal como un compuesto fluorescente, o una enzima que produce un compuesto fluorescente por la conversión de un compuesto no fluorescente. Las enzimas útiles de interés como etiquetas incluyen, por ejemplo, hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterasas y glicosidasas, hidrolasas, peptidasas u oxidasas, particularmente peroxidasas, y los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbeliferona, *etc.*, como se discutió anteriormente. Para una revisión de diversos sistemas de etiquetado o producción de la señal que se pueden usar, *ver* la patente de los Estados Unidos núm. 4,391,904.

Actualmente los donadores preferidos para usar en conjunto con BHQ, incluyen, por ejemplo, colorantes de xanteno, que incluyen fluoresceínas, colorantes de cianina y colorantes de rodamina. Muchas formas adecuadas de estos compuestos están ampliamente disponibles comercialmente con sustituyentes en sus porciones fenilo, que se pueden usar como sitio para enlazamiento o como la funcionalidad de enlazamiento para la unión a un ácido nucleico. Otro grupo de compuestos fluorescentes preferidos son las naftilaminas, que tienen un grupo amino en la posición alfa o beta. Incluidos entre tales compuestos naftilaminos están 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, 1-anilino-8-naftaleno sulfonato y 2-p-touidil-6-naftaleno sulfonato. Otros donadores incluyen 3-fenil-7-isocianatocumarina, acridinas, tales como 9-isotiocianatoacridina y naranja de acridina; N-(p-(2-benzoxazolil)fenil)maleimida; benzoxadiazoles, estilbenos, pirenos, y similares.

Para claridad de ilustración, la discusión más abajo se enfoca en unir BHQs y fluoróforos a ácidos nucleicos. Los expertos en la técnica apreciarán que los BHQs pueden además unirse a moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, polímeros sintéticos, soportes sólidos y similares por medio del uso de química sintética estándar.

En una modalidad preferida actualmente, en la que la sonda es una sonda de ácidos nucleicos, la molécula reportera es un colorante fluoresceína (FAM). La porción fluoresceína se une preferentemente a ya sea al 3'- o el 5'- terminal del ácido nucleico, aunque los sitios internos son además accesibles y tienen utilidad para propósitos seleccionados. A cualquier terminal que se una el derivado FAM, el BHQ generalmente se unirá a su antípoda, o a una posición interna a la cadena de ácidos nucleicos. El donador FAM se introduce preferentemente por medio del uso de una 6-FAM amidada. Grupos donadores diferentes se introducen además preferentemente por medio del uso de un derivado de amidada del donador. Alternativamente, los grupos donadores que comprenden grupos reactivos (*por ejemplo*, isotiocianatos, ésteres activos, *etc.*) se pueden introducir a través de una reacción con una porción reactiva en un brazo atador o enlazador unido a los ácidos nucleicos (*por ejemplo*, hexil amina).

En otra modalidad preferida, la porción donadora puede unirse al 3'-terminal de un ácido nucleico por el uso de un soporte sintético derivatizado. Por ejemplo, TAMRA (tetrametilrodamina ácido carboxílico) se une al 3'-terminal de un ácido nucleico por medio del uso de un soporte sólido que se derivatiza con un análogo de este fluoróforo (Biosearch Technologies, Inc.)

En vista del bien desarrollado cuerpo de literatura relacionado a la conjugación de moléculas pequeñas a ácidos nucleicos, muchos otros métodos de unir pares donador/aceptor a ácidos nucleicos resultarán evidentes a los expertos en la técnica. Por ejemplo, los colorantes rodamina y fluoresceína están convenientemente unidos al 5'-hidroxilo de un ácido nucleico en la conclusión de la síntesis de fase sólida por vía de colorantes derivatizados con una porción fosforamidita (*ver*, por ejemplo, Woo y otros, patente de los Estados Unidos núm. 5,231,191; y Hobbs, Jr., patente de los Estados Unidos núm. 4,997,928).

Más específicamente, hay muchas porciones de enlace y metodologías para unir los grupos a los 5'-o 3'-terminales de los ácidos nucleicos, como se ejemplifica en las siguientes referencias: Eckstein, editor, *Nucleic acids and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckerman y otros, *Nucleic Acids Research*, 15: 5305-5321 (1987) (grupo 3'-tiol en los ácidos nucleicos); Sharma y otros, *Nucleic Acids Research*, 19: 3019 (1991) (3'-sulfhidrilo); Giusti y otros, PCR

Methods and Applications, 2: 223-227 (1993) y Fung y otros, patente de los Estados Unidos núm. 4,757,141 (grupo 5'-fosfoamino via Aminolink TM II disponible de P.E. Biosistemas, CA.) Stabinsky, patente de los Estados Unidos núm. 4,739,044 (grupo 3-aminoalquilfosforilo); Agrawal y otros, Tetrahedron Letters, 31: 1543-1546 (1990) (unión a través de enlaces fosforamidato); Sproat y otros, Nucleic Acids Research, 15: 4837 (1987) (grupo 5-mercaptop); Nelson y otros, Nucleic Acids Research, 17: 7187-7194 (1989) (grupo 3'-amino), y similares.

Los medios para detectar etiquetas fluorescentes son bien conocidos para los expertos en la técnica. Así, por ejemplo, las etiquetas fluorescentes se pueden detectar por la excitación del fluoróforo con la longitud de onda de luz adecuada y detectar la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, por medio de una película fotográfica, por el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos asociados a carga (CCDs) o fotomultiplicadores y similares. Similarmente, las etiquetas enzimáticas se pueden detectar al proporcionar el sustrato adecuado para la enzima y detectar el producto de reacción resultante.

Síntesis

Los compuestos de la invención se sintetizan por una combinación adecuada de métodos sintéticos generalmente bien conocidos. Las técnicas útiles para sintetizar los compuestos de la invención son evidentes y accesibles para los expertos en la técnica relevante. La discusión más abajo se ofrece para ilustrar algunos de los diversos métodos disponible para usar en el ensamblaje de los compuestos de la invención, no se pretende que definan el alcance de las reacciones o secuencias de reacciones que son útiles para preparar los compuestos de la presente invención.

Un método de sintetizar los compuestos de la invención se exponen en el Esquema 1 (**Fig. 1**). El esquema 1 es un esquemático generalizado de un esquema sintético útil con los BHQs de la invención. Un derivado azido de un colorante se acopla a un derivado arilo 1, a pH 9, forma el aducto diazo correspondiente **2**. El diol **2** se monoprotege con un grupo, tal como el grupo dimetoxitritil para formar el compuesto **3**, que tiene una porción hidroxilo libre. El compuesto **3** se convierte a fosforamidita **4** al ponerlo en contacto con un agente, tal como 2-cianoetil diisopropilclorofosforamidita en presencia de un activador ácido suave, tal como tetrazol. La fosforamidita se acopla a un soporte de vidrio de poro controlado que contiene hidroxilo y subsecuentemente se oxida al derivado de fosfotriéster correspondiente, y de ese modo forma la materia prima adecuada, **5**, para la síntesis de un arreglo de ácidos nucleicos que se derivatizan en la posición 3' con un BHQ.

Los esquemas sintéticos recitados anteriormente se pretende que sean ilustrativos de una modalidad de la invención, los expertos en la técnica reconocerán que muchas otras estrategias sintéticas que emplean análogos reactivos de BHQ están disponibles. Por ejemplo, por una ligera modificación al método anterior, es fácilmente accesible un derivado adecuado para la modificación de un ácido nucleico en la posición 5'. En un esquema alternativo, el compuesto **4**, no está atado a un soporte sólido, sino que se añade como la subunidad final durante la síntesis de ácidos nucleicos, para preparar un ácido nucleico con un grupo 5'-BHQ.

El esquema sintético descrito anteriormente se puede practicar por medio del uso de una variedad de compuestos BHQ de la invención, tales como aquellos que se exponen en la **Fig. 2**. La **Fig. 2** proporciona las estructuras de tres BHQs ilustrativos, BH1 (**6**), BH2 (**10**) y BH3 (**14**).

La **Fig. 3** expone las estructuras de una fosforamidita (**8**) de BH1 (**7**), y un derivado de BH1, que está atado a un soporte de vidrio de poro controlado (**9**). Ambos la fosforamidita y el conjugado de CPG se pueden preparar por métodos reconocidos en la técnica, que incluyen aquellos expuestos en la presente descripción. Similarmente, la **Fig. 4** expone las estructuras de una fosforamidita (**12**) de BH2 (**11**), y un derivado de BH2, que está atado a un soporte de vidrio de poro controlado (**13**) y la **Fig. 5** expone las estructuras de una fosforamidita (**16**) de BH1 (**15**), y un derivado de BH3, que está atado a un soporte de vidrio de poro controlado (**17**).

Todavía en una modificación adicional del esquema de la **Fig. 1**, el compuesto **4** se acopla a un ácido nucleico intermedio entre las posiciones 3'- y 5', el grupo DMT se elimina por medio del uso de química estándar de ácidos nucleicos, o una modificación de esta, y una subunidad de ácido nucleico se ata al grupo hidroxilo primario desprotegido como si el grupo hidroxilo fuera el 5'-hidroxilo de una subunidad de ácido nucleico anterior, y de ese modo proporciona un ácido nucleico que tiene una porción BHQ en una posición interna.

Ensayos y sondas que contienen BHQ.

En otra modalidad preferida, la presente invención proporciona un BHQ que se ata a otra molécula, tal como una molécula sonda y ensayos que usan estas sondas.

Ensayos

La siguiente discusión es generalmente relevante para los ensayos descritos en la presente descripción. Otros formatos de ensayo que usan los compuestos de la invención resultarán evidentes a los expertos en la técnica.

5 En general, para determinar la concentración de una molécula objetivo, tal como, por ejemplo, un ácido nucleico, se prefiere primero obtener datos de referencia en los que cantidades constantes de la sonda y el ligando de ácido nucleico se ponen en contacto con cantidades variables del objetivo. La emisión de fluorescencia de cada mezcla de referencia se usa para derivar un gráfico o tabla en los que la concentración del objetivo se compara a la emisión de fluorescencia. Por ejemplo, una sonda que: a) hibrida a un ligando de ácido nucleico libre de objetivo; y b) tiene una arquitectura de tallo-bucle con los 5' y 3' terminales que son los sitios del grupo fluorescente y el etiquetado BHQ, se puede usar para obtener tales datos de referencia. Tal sonda da un perfil de emisión característico en el que la emisión de fluorescencia disminuye a medida que aumenta la concentración del objetivo en presencia de una cantidad constante de sonda y ligando de ácido nucleico. Después, una mezcla de prueba con una cantidad desconocida del objetivo se pone en contacto con la misma cantidad primero del ligando de ácido nucleico y segundo la sonda, y se determina la emisión de fluorescencia. El valor de la emisión de fluorescencia después se compara con los datos de referencia para obtener la concentración del objetivo en la mezcla de prueba.

Análisis Multiplex

20 En otra modalidad preferida, los inhibidores de fluorescencia de la invención se usan como un componente de una o más sondas usadas en el ensayo multiplex para detectar una o más especies en una mezcla.

25 Las sondas que incluyen los BHQs de la invención son particularmente útiles para realizar análisis y ensayos de tipo multiplex. En un análisis multiplex típico, dos o más especies distintas (o regiones de una o más especies) se detectan por medio del uso de una o más sondas, en donde cada una de las sondas se etiqueta con un fluoróforo diferente. Las especies preferidas usadas en análisis multiplex que dependen de la transferencia de energía donador-aceptor cumplen al menos dos criterios: la especie fluorescente es brillante y espectralmente bien-resuelta; y la transferencia de energía entre la especie fluorescente y el inhibidor de fluorescencia es eficiente.

30 Así, en una modalidad adicional, la invención proporciona una mezcla que comprende al menos una primera molécula portadora y una segunda molécula portadora. La primera molécula portadora tiene covalentemente unido a ella un primer inhibidor de fluorescencia de energía de estado de excitación que tiene una estructura que comprende al menos tres radicales seleccionados de arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido y combinaciones de estos. Al menos dos de los radicales se enlazan covalentemente a través de un enlace diazo exocíclico. La mezcla incluye además una segunda molécula portadora. La segunda molécula portadora tiene covalentemente unido a ella un segundo inhibidor de fluorescencia de energía de estado de excitación que tiene una estructura que comprende al menos tres radicales seleccionados de arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido y combinaciones de estos, en donde al menos dos de los radicales están covalentemente enlazados a través de un enlace diazo exocíclico.

40 Los BHQs de la invención permiten el diseño de ensayos multiplex en los que se usa más de una estructura inhibidora de fluorescencia en el ensayo. Un número de ensayos multiplex diferentes que usan los BHQs de la invención resultarán evidentes a los expertos en la técnica. En un ensayo ilustrativo, cada uno de los al menos dos inhibidores de fluorescencia BHQ distintos se usan para inhibir la energía derivada de uno o más fluoróforos idénticos. Alternativamente, se puede practicar un ensayo en el que distintos BHQ inhiben la energía derivada de un fluoróforo distinto al cual el BHQ "corresponde." Los fluoróforos se pueden enlazar a la misma molécula que el BHQ o a una molécula diferente. Además, similar a los BHQs y los fluoróforos, las moléculas portadoras de uso en un sistema de ensayo particular pueden ser las mismas o diferentes.

50 Adicionalmente a las mezclas descritas anteriormente, la presente invención además proporciona un método para detectar o cuantificar una especie molecular particular. El método incluye: (a) poner en contacto las especies con una mezcla tal como las descritas anteriormente; y (b) detectar un cambio en una propiedad fluorescente de uno o más componentes de la mezcla, las especies moleculares o una combinación de estas, y de ese modo detectar o cuantificar las especies moleculares.

55 Debido a la fácil disponibilidad de BHQs de la invención que tienen diferentes características de absorbancia, los compuestos de la invención son particularmente adecuados para usar en aplicaciones multiplex. El acceso a BHQs que tienen una variedad de características de absorbancia permiten el diseño de sondas de transferencia de energía donador-aceptor en las que las propiedades de emisión del aceptor y las propiedades de absorbancia del BHQ se corresponden sustancialmente, y de ese modo proporcionan un nivel útil de superposición espectral (ver, por ejemplo, Fig. 7).

El uso simultáneo de dos o más sondas que usan la transferencia de energía donador-aceptor se conoce en la técnica. Por ejemplo, se han descrito ensayos multiplex que usan sondas de ácidos nucleicos con diferentes especificidades de secuencia. Se usan sondas fluorescentes para determinar si un individuo es homocigoto silvestre, homocigoto mutante o heterocigoto para una mutación particular. Por ejemplo, por medio del uso de una baliza molecular de fluoresceína con la fluorescencia inhibida que reconoce la secuencia silvestre y otra baliza molecular de rodamina con la fluorescencia inhibida que reconoce un alelo mutante, es posible determinar el genotipo de individuos para el receptor de β -quimocina (Kostrikis y otros Science 279:1228-1229 (1998)). La presencia de solamente una señal de fluoresceína indica que el individuo es silvestre, y la presencia de la señal de rodamina solamente indica que el individuo es homocigoto mutante. La presencia de ambas señales de rodamina y fluoresceína es diagnóstico de un heterocigoto. Tyagi y otros Nature Biotechnology 16: 49-53 (1998) describieron el uso simultáneo de cuatro balizas moleculares etiquetadas diferentemente para la discriminación alélica, y Lee y otros, BioTechniques 27: 342-349 (1999) describieron la detección homogénea de siete colores de seis productos de PCR.

Los inhibidores de fluorescencia de la presente invención se pueden usar en ensayos multiplex diseñados para detectar y/o cuantificar sustancialmente cualquier especie, lo que incluye, por ejemplo, células enteras, virus, proteínas (*por ejemplo*, enzimas, anticuerpos, receptores), glicoproteínas, lipoproteínas, partículas subcelulares, organismos (*por ejemplo*, Salmonella), ácidos nucleicos (*por ejemplo*, ADN, ARN, y análogos de estos), polisacáridos, lipopolisacáridos, lípidos, ácidos grasos, polímeros no-biológicos y moléculas pequeñas (*por ejemplo*, toxinas, fármacos, pesticidas, metabolitos, hormonas, alcaloides, esteroides).

Sondas

La invención proporciona sondas que incluyen porciones BHQ conjugadas a, por ejemplo, una especie objetivo (*por ejemplo*, receptor, enzima, etc.) un ligando para una especie objetivo (*por ejemplo*, ácidos nucleicos, péptido, etc. una molécula pequeña (*por ejemplo*, fármaco, pesticida, etc.), y similares. Las sondas pueden usarse para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*.

Una ventaja particularmente inesperada y sorprendente de los BHQs es su habilidad de inhibir la energía de estado de excitación de fluoróforos unidos a molécula portadoras (*por ejemplo*, ácidos nucleicos) sin la necesidad de diseñar componentes que formen estructuras secundarias (*por ejemplo*, horquillas, bucles, etc.) dentro de la molécula portadora para aproximar el fluoróforo y el BHQ. Los pares de sondas de transferencia de energía que se usan actualmente en la técnica típicamente requieren la introducción de alguna forma de estructura secundaria para funcionar apropiadamente, y de ese modo limita seriamente la identidad de las especies que se pueden usar como molécula portadoras. Así, las sondas de la presente invención pueden ser de diseño simple, se pueden producir más económicamente y usarse para sondear una variedad de sistemas mucho mayor en mucho menos tiempo que las sondas actualmente reconocidas en la técnica.

Aún, otra propiedad inesperada de los BHQs de la invención es su robustez bajo una variedad de condiciones sintéticas usadas para unir los BHQs a una molécula portadora. Por ejemplo, muchos de los BHQs de la invención sobreviven las condiciones necesarias para la síntesis automática de ácidos nucleicos sin sufrir ningún grado sustancial de degradación o alteración. En contraste, muchos de los inhibidores de fluorescencia reconocidos en la técnica actualmente en uso requieren del uso de condiciones especiales para ensamblar la molécula portadora a la cual se unen, o tienen que unirse después de completarse la síntesis de la molécula portadora. La complejidad adicional de la síntesis de una sonda aumenta la duración y el costo de la síntesis.

Sondas de moléculas pequeñas

Los BHQs de la invención se pueden usar como componentes de sondas de moléculas pequeñas. En un diseño preferido, una sonda de molécula pequeña incluye un fluoróforo o precursor de fluoróforo y un BHQ. En una modalidad ilustrativa, un agente, tal como una enzima escinde el BHQ, el fluoróforo o ambos de la molécula pequeña lo que genera fluorescencia en el sistema bajo investigación (*ver*, por ejemplo, Zlokarnik y otros, Science 279: 84-88 (1998)).

Sondas de ácidos nucleicos

Los inhibidores de fluorescencia oscuros de la invención son útiles en conjunto con sondas de ácidos nucleicos y se pueden usar como componentes de agentes de detección en una variedad de estrategias de amplificación/cuantificación de ADN que incluyen, por ejemplo, ensayo de nucleasa 5', amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación en círculo rodante (RCA), así como para ensayos de detección directa de objetivos en fase en solución o fase sólida (*por ejemplo*, arreglos). Además, los ácidos nucleicos derivatizados de BHQ se pueden usar en sondas de prácticamente cualquier formato, que incluyen, por ejemplo, el formato seleccionado de

balizas moleculares, sondas Scorpion™, sondas Sunrise™, sondas conformacionalmente asistidas, sondas de encendido, sondas de detección de invasor, y sondas TaqMan™. Ver, por ejemplo, Cardullo, R., y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8790-8794 (1988); Dexter, D.L., J. Chem. Physics, 21:836-850 (1953); Hochstrasser, R.A., y otros, Biophysical Chemistry, 45:133-141 (1992); Selvin, P., Methods in Enzymology, 246:300-334 (1995); Steinberg, I., Ann. Rev. Biochem., 40:83-114 (1971); Stryer, L., Ann. Rev. Biochem., 47:819-846 (1978); Wang, G., y otros, Tetrahedron Letters, 31:6493-6496 (1990); Wang, Y. y otros, Anal. Chem., 67:1197-1203 (1995); Debouck, C. y otros, en suplemento a nature genetics, 21:48-50 (1999); Rehman, F.N., y otros, Nucleic Acids Research, 27:649-655 (1999); Cooper, J.P., y otros, Biochemistry, 29:9261-9268 (1990); Gibson, E.M., y otros, Genome Methods, 6:995-1001 (1996); Hochstrasser, R.A., y otros, Biophysical Chemistry, 45:133-141 (1992); Holland, P.M., y otros, Proc Natl. Acad. Sci USA, 88:7276-7289 (1991); Lee, L.G., y otros, Nucleic Acids Resch., 21:3761-3766 (1993); Livak, K.J., y otros, PCR Methods y Applications, Cold Spring Harbor Press (1995); Vamosi, G., y otros, Biophysical Journal, 71:972-994 (1996); Wittwer, C.T., y otros, Biotechniques, 22:176-181 (1997); Wittwer, C.T., y otros, Biotechniques, 22:130-38 (1997); Giesendorf, B.A.J., y otros, Clinical Chemistry, 44:482-486 (1998); Kostrikis, L.G., y otros, Science, 279:1228-1229 (1998); Matsuo, T., Biochemica et Biophysica Acta, 1379:178-184 (1998); Piatek, A.S., y otros, Nature Biotechnology, 16:359-363 (1998); Schofield, P., y otros, Appl. Environ. Microbiology, 63:1143-1147 (1997); Tyagi S., y otros, Nature Biotechnology, 16:49-53 (1998); Tyagi, S., y otros, Nature Biotechnology, 14:303-308 (1996); Nazarenko, LA., y otros, Nucleic Acids Research, 25:2516-2521 (1997); Uehara, H., y otros, Biotécnicas, 26:552-558 (1999); D. Whitcombe, y otros, Nature Biotechnology, 17:804-807 (1999); Lyamichev, V., y otros, Nature Biotechnology, 17:292 (1999); Daubendiek, y otros, Nature Biotechnology, 15:273-277 (1997); Lizardi, P.M., y otros, Nature Genetics, 19:225-232 (1998); Walker, G., y otros, Nucleic Acids Res., 20:1691-1696 (1992); Walker, G.T., y otros, Clinical Chemistry, 42:9-13 (1996); y Compton, J., Nature, 350:91-92 (1991).

Así, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para detectar una secuencia objetivo de ácido nucleico. El método incluye: (a) poner en contacto la secuencia objetivo con un ácido nucleico detector; (b) hibridar la secuencia de enlace objetivo a la secuencia objetivo, y de ese modo alterar la configuración del ácido nucleico detector, lo que causa un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (c) detectar el cambio en el parámetro de fluorescencia, y de ese modo detectar la secuencia objetivo de ácido nucleico.

En los métodos descritos en la presente descripción, a menos que se indique lo contrario, un ácido nucleico detector preferido incluye una secuencia de unión objetivo monocatenaria. La secuencia de unión tiene enlazada a ella: i) un fluoróforo; y ii) un BHQ de la invención. Además, antes de su hibridación a una secuencia complementaria, el ácido nucleico detector está preferentemente en una configuración que permite la transferencia de energía donador-aceptor entre el fluoróforo y el BHQ cuando el fluoróforo se excita. Además, en cada uno de los métodos descritos en esta sección, un cambio en la fluorescencia se detecta como una indicación de la presencia de una secuencia objetivo. El cambio en la fluorescencia se detecta preferentemente en tiempo real.

Actualmente las sondas de ácidos nucleicos preferidas no requieren que la molécula portadora adopte una estructura secundaria para que la sonda funcione.

En este método, y a menos que se indique lo contrario, en los otros métodos descritos en esta sección, el detector de ácido nucleico puede asumir prácticamente cualquier estructura secundaria asociada intramolecularmente, pero esta estructura es preferentemente un miembro seleccionado de horquilla, estructura tallo-bucle, pseudonudos, triple hélices y estructuras asistidas conformacionalmente. Además, la estructura secundaria de bases apareadas intramolecularmente comprende una porción de la secuencia de unión objetivo.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para detectar la amplificación de una secuencia objetivo. El método incluye el uso de una reacción de amplificación que incluye las siguientes etapas: (a) hibridar la secuencia objetivo y un ácido nucleico detector. El ácido nucleico detector incluye una secuencia de unión objetivo monocatenaria y una estructura 5' secundaria intramolecularmente asociada a la secuencia de unión objetivo. Al menos una porción de la secuencia detectora forma una cola monocatenaria que está disponible para la hibridación de la secuencia objetivo; (b) extender el ácido nucleico detector hibridado sobre la secuencia objetivo con una polimerasa para producir un producto de extensión de ácido nucleico detector y separar el producto de extensión de ácido nucleico detector de la secuencia objetivo; (c) hibridar un iniciador para el producto de extensión de ácido nucleico detector y extender el iniciador con la polimerasa, y de ese modo linealizar la estructura secundaria intramolecularmente asociada y producir un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (d) detectar el cambio en el parámetro de fluorescencia, y de ese modo detectar la secuencia objetivo.

Aún en un aspecto adicional, la invención proporciona un método para determinar si un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico se hibridan. En este método, el primer ácido nucleico incluye un BHQ de acuerdo con la invención. El método incluye: (a) poner en contacto el primer ácido nucleico con el segundo ácido nucleico; (b) detectar una alteración en una propiedad fluorescente de un elemento seleccionado del primer ácido nucleico, el segundo ácido nucleico y una combinación de estos, y de ese modo determinar si ocurre la hibridación.

Una sonda que contiene ambos un BHQ y un fluoróforo se puede usar o, alternativamente, uno o más de los ácidos nucleicos se puede etiquetar individualmente con un BHQ o fluoróforo. Cuando un ácido nucleico individualmente etiquetado con un BHQ es la sonda, la interacción entre el primero y el segundo ácidos nucleicos se puede detectar por la observación de la interacción entre el BHQ y el ácido nucleico o, con mayor preferencia, la inhibición de la fluorescencia por el BHQ de la fluorescencia de un fluoróforo unido al segundo ácido nucleico.

Además de su utilidad general en sondas diseñadas para investigar la amplificación, detección y cuantificación de ácidos nucleicos, los presentes inhibidores de fluorescencia oscuros se pueden usar en prácticamente cualquier formato de sonda de ácidos nucleicos conocido ahora o descubierto más tarde. Por ejemplo, los inhibidores de fluorescencia oscuros de la invención se pueden incorporar dentro de los motivos de la sonda, tales como sondas Taqman™ (Held y otros, Genome Res. 6: 986-994 (1996), Holland y otros, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280 (1991), Lee y otros, Nucleic Acids Res. 21: 3761-3766 (1993)), balizas moleculares (Tyagi y otros, Nature Biotechnology 14:303-308 (1996), Jayasena y otros, patente de los Estados Unidos núm. 5,989,823, concedida el 23 de noviembre de 1999) sondas Scorpion (Whitcomb y otros, Nature Biotechnology 17: 804-807 (1999)), sondas sunrise (Nazarenko y otros, Nucleic Acids Res. 25: 2516-2521 (1997)), sondas de conformación asistida (Cook, R., solicitud provisional de los Estados Unidos copendiente y cedida en forma mancomunada 60/138,376, presentada el 9 de junio de 1999), sondas de encendido basadas en ácido nucleico peptídico (PNA) (Kubista y otros, documento WO 97/45539, diciembre de 1997), colorantes específicos de ADN de doble cadena (Higuchi y otros, Bio/Technology 10: 413-417 (1992), Wittwer y otros, BioTechniques 22: 130-138 (1997)) y similares. Estos y otros motivos de sonda con los que se pueden usar los presentes inhibidores de fluorescencia se revisan en NONISOTOPIC DNA PROBE TECHNIQUES, Academic Press, Inc. 1992.

Los ácidos nucleicos que se usan en las sondas de la invención pueden ser de cualquier tamaño adecuado, y están preferentemente en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos, con mayor preferencia de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 nucleótidos y aún con mayor preferencia, de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos. La secuencia y longitud precisa de una sonda de ácidos nucleicos de la invención depende en parte de la naturaleza del polinucleótido objetivo al que se une. La localización y longitud de la unión puede variar para lograr las propiedades de hibridación y fusión apropiadas para una modalidad particular. Las orientaciones para hacer tales elecciones de diseño se pueden encontrar en muchas referencias reconocidas en la técnica.

Preferentemente, el nucleótido del extremo 3' de la sonda de ácidos nucleicos se bloquea o incapacita para extenderse por una polimerasa de ácidos nucleicos. Tal bloqueo se lleva a cabo convenientemente por la unión de una porción donadora o aceptora a la posición 3' terminal de la sonda de ácidos nucleicos, ya sea directamente o por una porción de enlace.

Los ácidos nucleicos pueden comprender ADN, ARN o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de estos. Ambos la sonda y el ácidos nucleico objetivo se pueden presentar como monocatenario, bicatenario, tricatenario, etc. Además, el ácido nucleico se puede modificar en la porción base, la porción azúcar o el esqueleto fosfato con otros grupos tales como etiquetas radioactivas, enlazadores de hendidura menor, agentes intercalantes, porciones donadoras y/o aceptoras y similares.

Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden comprender al menos una porción base modificada que se selecciona del grupo que incluye, pero no se limita a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-iodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metil uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidroouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminonietiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N⁶-isopenteniladenina, uracil-5-ácido oxiacético (v), wibutososina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, uracil-5-ácido oxiacético metil éster, uracil-5-ácido oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracil, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, nitroindol, y 2,6-diaminopurina.

En otra modalidad, los ácidos nucleicos comprenden al menos una porción azúcar modificada seleccionada del grupo que incluye, pero no se limita a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosa.

Aún en otra modalidad, los ácidos nucleicos comprenden al menos un esqueleto fosfato modificado seleccionado del grupo que incluye, pero no se limita a, un híbrido ácido nucleico peptídico, un fosforotioato, un fosforditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un alquil fosfotriéster, y un formacetal o análogo de estos.

Los ácidos nucleicos de la invención enlazados a fosfodiéster se pueden sintetizar por métodos estándar conocidos en la técnica, *por ejemplo* por el uso de un sintetizador automático de ADN (tales como están disponibles comercialmente de P.E. Biosystems, etc.) por medio del uso de químicas de amidita comercialmente disponibles. Los ácidos nucleicos que contienen

5 grupos de enlace a fosfodiéster modificado se pueden sintetizar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos fosforotioato se pueden sintetizar por el método de Stein y otros (Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988)), los ácidos nucleicos metilfosfonato se pueden preparar por el uso de soportes de polímero de vidrio de poro controlado (Sarin y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451 (1988)). Otros métodos de sintetizar ácidos nucleicos enlazados a ambos fosfodiéster- y fosfodiéster modificado resultarán evidentes a los expertos en la técnica.

10 Las sondas de ácido nucleico de la invención pueden sintetizarse por un número de enfoques, *por ejemplo*, Ozaki y otros, Nucleic Acids Research, 20: 5205-5214 (1992); Agrawal y otros, Nucleic Acids Research, 18: 5419-5423 (1990); o similares. Las sondas de ácidos nucleicos de la invención se sintetizan convenientemente en un sintetizador automático de ADN, *por ejemplo*, un Sintetizador ADN/ARN modelo 392 o 394 P.E. Biosistemas, Inc. (Foster City, Calif.), por medio del uso que químicas estándar, tales como química de fosforamidita (*ver*, por ejemplo, descrito en las siguientes referencias, Beaucage y otros, Tetrahedron, 48: 2223-2311 (1992); Molko y otros, patente de los Estados Unidos núm. 4,980,460; Koster y otros, patente de los Estados Unidos núm. 4,725,677; Caruthers y otros, patente de los EE.UU. núms. 4,415,732; 4,458,066; y 4,973,679. Además se pueden emplear químicas alternativas que resultan en grupos del esqueleto no naturales, tales como fosforotioato, fosforamidato, y similares.

15 Cuando los ácidos nucleicos se sintetizan por medio del uso de un sintetizador automático de ácidos nucleicos, las porciones donadora y aceptora se introducen preferentemente durante la síntesis automática. Alternativamente, una o más de estas porciones se puede introducir ya sea antes o después de que comience el procedimiento de síntesis automática. Por ejemplo, los grupos donador y/o aceptor se pueden introducir en el 3'-terminal por medio del uso de un soporte sólido modificado con el grupo(s) deseado. Además, los grupos donador y/o aceptor se pueden introducir en el 5'-terminal por, por ejemplo un derivado del grupo que incluye una fosforamidita. En otra modalidad ilustrativa, uno o más de los grupos donador y/o aceptor se introduce después de que la síntesis automática está completa.

20 En las sondas doble etiquetadas, la porción donadora se separa preferentemente del BHQ por al menos aproximadamente 10 nucleótidos, y con mayor preferencia por al menos aproximadamente 15 nucleótidos. La porción donadora se une preferentemente a cualquiera de los nucleótidos terminales 3'- o 5'- de la sonda. La porción BHQ además se une preferentemente a cualquiera de los nucleótidos terminales 3'- o 5'- de la sonda. Con mayor preferencia, las porciones donadora y aceptora se unen a los nucleótidos terminales 3'- y 5'- o 5'- y 3'- de la sonda, respectivamente, aunque la localización interna es además útil.

25 Una vez que se sintetiza el ácido nucleico deseado, se escinde preferentemente del soporte sólido en el que se sintetizó y se trata, por métodos conocidos en la técnica, para eliminar cualquier grupo protector presente (*por ejemplo*, 60 °C, 5h, amoniaco concentrado). En aquellas modalidades en que un grupo sensible a base se une al ácido nucleico (*por ejemplo*, TAMRA), la desprotección usará preferentemente condiciones suaves (*por ejemplo*, butilamina: agua 1:3, 8 hours, 70 °C). La desprotección bajo estas condiciones se facilita por el uso de amiditas desprotectoras rápidas (*por ejemplo*, dC-acetil, dG-dmf).

30 Después de la escisión del soporte y la desprotección, el ácido nucleico se purifica por cualquier método conocido en la técnica, que incluyen cromatografía, extracción y purificación en gel. En una modalidad preferida, los ácidos nucleicos se purifican por medio del uso de HPLC. La concentración y pureza de los ácidos nucleicos aislados se determina preferentemente por la medición de la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro.

45 Sondas de péptidos

Los péptidos, proteínas y ácidos nucleicos peptídicos que se etiquetan con un fluoróforo y un inhibidor de fluorescencia de la invención se pueden usar en ensayos enzimáticos ambos *in vivo* e *in vitro*.

50 Así, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar si una muestra contiene una enzima. El método comprende: (a) poner en contacto la muestra con un constructo peptídico; (b) excitar el fluoróforo; y (c) determinar una propiedad de fluorescencia de la muestra, en donde la presencia de una enzima en la muestra resulta en un cambio en la propiedad de fluorescencia.

55 Los constructos peptídicos que se usan en la práctica de este aspecto de la invención son aquellos con las siguientes características: i) un fluoróforo; ii) un compuesto de la invención o de fórmula (I) o fórmula (II); y iii) un sitio de reconocimiento de escisión o ensamblaje para la enzima. Además, el constructo peptídico es preferentemente de una longitud y orientación y en una configuración que permite la transferencia de energía donador-aceptor entre el fluoróforo y dicho compuesto cuando el fluoróforo se excita.

5 Cuando la sonda se usa para detectar una enzima, tal como una enzima degradativa (*por ejemplo*, proteasa), y se observa un grado de transferencia de energía donador-aceptor que es más bajo que una cantidad esperada, esto es generalmente indicativo de la presencia de una enzima. El grado de transferencia de energía donador-aceptor en la muestra se puede determinar, por ejemplo, como una función de la cantidad de fluorescencia de la porción donadora, la cantidad de fluorescencia de la porción aceptora, la relación de la cantidad de fluorescencia de la porción donadora a la cantidad de fluorescencia de la porción aceptora o la duración del estado de excitación de la porción donadora.

10 El ensayo además es útil para determinar la cantidad de enzima en una muestra por la determinación del grado de transferencia de energía donador-aceptor en un primer y segundo tiempo después del contacto entre la enzima y el constructo tándem, y la determinación de la diferencia en el grado de transferencia de energía donador-aceptor. La diferencia en el grado de transferencia de energía donador-aceptor refleja la cantidad de enzima en la muestra.

15 En una modalidad preferida, la cantidad de actividad enzimática en la muestra se determina como una función del grado de transferencia de energía donador-aceptor en la muestra y la cantidad de actividad en la muestra se compara con una actividad estándar para la misma cantidad de la enzima. Una diferencia entre la cantidad de actividad enzimática en la muestra y la actividad estándar indica que el compuesto altera la actividad de la enzima.

20 Las enzimas representativas con las que se puede practicar la presente invención incluyen, por ejemplo, tripsina, enteroquinasa, VIH-1 proteasa, prohormona convertasa, enzima convertina de interleucina-1b, endopeptidasa de adenovirus, assemblina de citomegalovirus, leishmanolisina, β -secretasa para proteína precursora amiloide, trombina, renina, enzima de conversión de angiotensina, catepsina-D y una quinogenasa, y proteasas en general.

25 Las proteasas juegan papeles esenciales en muchos procesos de enfermedades tales como de Alzheimer, hipertensión, inflamación, apoptosis, y AIDS. Los compuestos que bloquean o aumentan su actividad tienen potencial como agentes terapéuticos. Debido a que los sustratos normales de las peptidasas son péptidos lineales y debido a que existen procedimientos establecidos para fabricar análogos no-peptídicos, los compuestos que afectan la actividad de las proteasas son sujetos naturales de la química combinatoria. El tamizaje de compuestos producidos por química combinatoria requiere ensayos enzimáticos convenientes.

30 Los ensayos más convenientes para proteasas se basan en la transferencia de energía donador-aceptor de un donador fluoróforo a un inhibidor de fluorescencia colocado en el extremo opuesto de una cadena peptídica corta que contiene el sitio de escisión potencial(ver, Knight C. G., *Methods in Enzymol.* 248:18-34 (1995)). La proteólisis separa el fluoróforo y el inhibidor de fluorescencia, lo que resulta en una intensidad aumentada en la emisión del donador fluoróforo. Los ensayos de proteasas existentes usan sustratos peptídicos cortos que incorporan amino ácidos cromóforos no naturales, ensamblados por síntesis de péptido en fase sólida.

35 Los ensayos de la invención son además útiles para determinar y caracterizar secuencias de escisión del sustrato de proteasas o para identificar proteasas, tales como proteasas huérfanas. En una modalidad el método involucra la sustitución de una secuencia de amino ácidos de la porción enlazadora definida con una que contiene una selección de aminoácidos aleatoria. Una genoteca de sondas fluorescentes que contienen BHQ, en donde el fluoróforo y el BHQ se enlazan por una porción enlazadora peptídica aleatorizada se puede generar por medio del uso de técnicas de ingeniería recombinante o técnicas de química sintética. El tamizaje de los miembros de la genoteca se puede lograr por la medición de una señal relacionada a la escisión, tal como transferencia de energía donador-aceptor, después de poner en contacto la enzima de escisión con cada uno de los miembros de la genoteca del constructo peptídico fluorescente en tándem. Un grado de transferencia de energía donador-aceptor que es más bajo que la cantidad esperada indica la presencia de una secuencia enlazadora que se escinde por la enzima. El grado de transferencia de energía donador-aceptor en la muestra se puede determinar, por ejemplo, como una función de la cantidad de fluorescencia de la porción donadora, la cantidad de fluorescencia de la porción aceptora donadora, o la relación de la cantidad de fluorescencia de la porción donadora a la cantidad de fluorescencia de la porción aceptora o la duración del estado de excitación de la porción donadora.

40 En los constructos en tándem de la invención, las porciones donadora y aceptora se conectan mediante una porción enlazadora. La porción enlazadora, preferentemente, incluye una porción peptídica, pero puede ser o puede incluir otra porción molecular orgánica, también. En una modalidad preferida, la porción enlazadora incluye un sitio de reconocimiento de escisión específico para una enzima u otro agente de escisión de interés. Un sitio de escisión en la porción enlazadora es útil porque cuando un constructo tándem se mezcla con el agente de escisión, el enlazador es un sustrato para la escisión por el agente de escisión. La ruptura de la porción enlazadora resulta en la separación del fluoróforo y el inhibidor de fluorescencia de la invención. La separación se mide como un cambio en la transferencia de energía donador-aceptor. Alternativamente, el ensamblaje del péptido se puede detectar por un aumento en la transferencia de energía donador-aceptor entre un fragmento de péptido que contiene un BHQ y un fragmento de péptido que contiene una porción donadora.

5 Cuando el agente de escisión de interés es una proteasa, el enlazador generalmente incluye un péptido que contiene una secuencia de reconocimiento de escisión para la proteasa. Una secuencia de reconocimiento de escisión para una proteasa es una secuencia de amino ácidos específica reconocida por la proteasa durante la escisión proteolítica. Muchos sitios de escisión de proteasas se conocen en la técnica, y estos y otros sitios de escisión se pueden incluir en la porción enlazadora. Ver, por ejemplo, Matayoshi y otros Science 247: 954 (1990); Dunn y otros Meth. Enzymol. 241: 254 (1994); Seidah y otros Meth. Enzymol. 244: 175 (1994); Thornberry, Meth. Enzymol. 244: 615 (1994); Weber y otros Meth. Enzymol. 244: 595 (1994); Smith y otros Meth. Enzymol. 244: 412 (1994); Bouvier y otros Meth. Enzymol. 248: 614 (1995), Hardy y otros, en AMYLOID PROTEIN PRECURSOR IN DEVELOPMENT, AGING, AND ALZHEIMER'S DISEASE, ed. Masters y otros págs. 190-198 (1994).

10 Análogos de BHQ inmovilizados en un soporte sólido.

15 Los BHQs de la invención se pueden inmovilizar en prácticamente cualquier polímero, biomolécula, y material sólido o semi-sólido que tiene cualquier configuración útil. Además, cualquier conjugado que comprende uno o más BHQs se puede inmovilizar de manera similar. Cuando el soporte es un sólido o semi-sólido, ejemplos de tipos preferidos de soportes para la inmovilización de la sonda de ácidos nucleicos incluyen vidrio de poro controlado, placas de vidrio, poliestireno, perlas de poliestireno recubiertas de avidina, celulosa, nailon, gel de acrilamida y dextrana activada. Estos soporte sólidos se prefieren debido a su estabilidad química, facilidad de funcionamiento y área de superficie bien definida. Los soportes sólido tales como, vidrio de poro controlado (CPG, 500 Å, 1000 Å) y poliestireno altamente reticulado no-hinchado (1000 Å) se prefieren particularmente.

20 La superficie de un soporte sólido se puede funcionalizar con un inhibidor de fluorescencia de la invención o una especie que incluye un inhibidor de fluorescencia de la invención. Para claridad de ilustración, la siguiente discusión se concentra en unir un BHQ reactivo a un soporte sólido. La siguiente discusión es además ampliamente relevante para unir una especie que incluye dentro de su estructura un BHQ reactivo a un soporte sólido, y la unión de tal especie y análogos del BHQ reactivo a otras moléculas y estructuras.

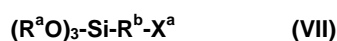
25 Los BHQs se unen preferentemente a un soporte sólido por la formación de un enlace entre un grupo reactivo en el BHQ y un grupo reactivo sobre la superficie del soporte sólido o un enlazador unido al soporte sólido, de ese modo derivatizar el soporte sólido con uno o más análogos de BHQ. El enlace entre el soporte sólido y el BHQ es preferentemente un enlace covalente, aunque enlaces iónicos, dativos, y otros son útiles también. Los grupos reactivos que se pueden usar en la práctica de la presente invención se discuten en detalle anteriormente e incluyen, por ejemplo, aminas, grupos hidroxilo, ácidos carboxílico, derivados de ácidos carboxílico, alquenos, sulfidrilos, siloxanos, etc.

30 Un gran número de soportes sólidos apropiados para practicar la presente invención están disponibles comercialmente e incluyen, por ejemplo, resinas de síntesis de péptidos, ambas con y sin amino ácidos y/o péptidos unidos (por ejemplo, resina de alcoxibenzil alcohol, resina de aminometilo, resina de aminopoliestireno, resina de benzidrilamina, etc. (Bachem)), vidrio de poro controlado funcionalizado (BioSearch Technologies, Inc.), medio de intercambio iónico (Aldrich), membranas funcionalizadas (por ejemplo, membranas -COOH; Asahi Chemical Co., Asahi Glass Co., y Tokuyama Soda Co.), y similares.

35 Además, para aplicaciones en las que un soporte sólido adecuado no está comercialmente disponible, una amplia variedad de tipos de reacciones están disponibles para funcionalizar la superficie de un soporte sólido. Por ejemplo, los soportes construidos de un plástico tales como polipropileno, se puede derivatizar por la superficie por oxidación por ácido crómico, y subsecuentemente convertirse en una superficie hidroxilada o aminometilada. El soporte funcionalizado después se hace reaccionar con un BHQ de reactividad complementaria, tal como un BHQ éster activo, cloruro de ácido o éster sulfonato, por ejemplo. Los soportes fabricados a partir de divinilbenceno altamente reticulado se pueden derivatizar por la superficie por clorometilación y manipulación subsecuente del grupo funcional. Además, los sustratos funcionalizados de pueden fabricar a partir de poliuretano grabado, reducido.

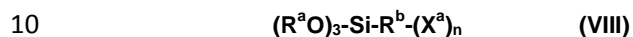
40 Cuando el soporte se construye de un material silíceo tal como el vidrio, la superficie se puede derivatizar al hacer reaccionar los grupos Si-OH, SiO-H, y/o Si-Si de la superficie con un reactivo funcionalizante

45 En una modalidad preferida, en donde los sustratos se fabrican de vidrio, el enlazamiento covalente del grupo reactivo a la superficie del vidrio se logra por la conversión de los grupos sobre la superficie del sustrato por reactivos modificadores de silicio tales como:



Donde R^a es un grupo alquilo, tales como metilo o etilo, R^b es un grupo enlazador entre silicio y X^a , y X^a es un grupo reactivo o un grupo reactivo protegido. Derivados de silano que tienen halógenos u otros grupos salientes además de los grupos alcoxi expuestos son además útiles en la presente invención.

5 En otra modalidad preferida, el reactivo usado para funcionalizar el soporte sólido proporciona más de un grupo reactivo por cada molécula reactiva. Por medio del uso de reactivos, tales como el compuesto más abajo, cada sitio reactivo sobre la superficie del sustrato, en esencia, se "amplifica" a dos o más grupos funcionales:



Donde R^a es un grupo alquilo (*por ejemplo*, metilo, etilo), R^b es un grupo enlazador entre silicio y X^a , X^a es un grupo reactivo o un grupo reactivo protegido y n es un entero entre 2 y 50, y con mayor preferencia entre 2 y 20. La amplificación de un BHQ por su unión a un sustrato que contiene silicio se pretende que sea ilustrativa del concepto general de amplificación de BHQ. Esta estrategia de amplificación se aplica igualmente a otros aspectos de la invención en los que un análogo de BHQ se une a otra molécula o soporte sólido.

Se puede usar un número de agentes funcionalizantes de siloxano, por ejemplo:

- 20 1. hidroxialquil siloxanos (superficie de sililato, funcionalizada con diborano, y H_2O_2 para oxidar a alcohol)
 a. alil triclorosilano $\rightarrow \rightarrow$ 3-hidroxipropilo
 b. 7-oct-1-enil triclorosilano $\rightarrow \rightarrow$ 8-hidroxioctilo
- 25 2. Diol (dihidroxialquil) siloxanos (superficie de sililato e hidrolizar a diol) a. (glicidil trimetoxisilano $\rightarrow \rightarrow$ (2,3-dihidroxipropilo)propilo
3. Aminoalquil siloxanos (aminas que no requieren etapas de funcionalización intermedias) a. 3-aminopropil trimetoxisilano \rightarrow aminopropilo
- 30 4. Aminoalquil siloxanos diméricos secundarios
 a. bis (3-trimetoxisililpropil) amina \rightarrow bis(sililoxilpropil)amina.

Resultará evidente a los expertos en la técnica que un arreglo de químicas funcionalizadoras similarmente útil está disponible cuando se usan componentes del soporte diferentes de siloxanos. Así, por ejemplo alquil tioles, funcionalizados como se discutió anteriormente en el contexto de reactivos modificadores de siloxano, se pueden unir a películas de metal y subsecuentemente reaccionar con un BHQ para producir el compuesto inmovilizado de la invención.

Los grupos R de uso por R^b en las modalidades descritas anteriormente de la presente invención incluyen alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilalquilo, arilo sustituido, arilalquilo sustituido, acilo, halógeno, hidroxilo, amino, alquilamino, acilamino, alcoxi, aciloxi, ariloxi, ariloxialquilo, mercapto, hidrocarburo cíclico saturado, hidrocarburo cíclico insaturado, heteroarilo, heteroarilalquilo, heteroarilo sustituido, heteroarilalquilo sustituido, heterocíclico, heterocíclico sustituido y grupos heterocíclicoalquilo y combinaciones de estos.

45 Sondas de captura de ácidos nucleicos

En una modalidad, un ácido nucleico inmovilizado que comprende un BHQ se usa como una sonda de captura. La sonda de ácido nucleico se puede unir directamente a un soporte sólido, por ejemplo por unión del nucleótido terminal 3'- o 5'- de la sonda al soporte sólido. Con mayor preferencia, sin embargo, la sonda se une al soporte sólido por un enlazador (*es decir*, brazo espaciador, *supra*). El enlazador sirve para distanciar la sonda del soporte sólido. El enlazador es con la máxima preferencia de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 átomos en longitud, con mayor preferencia de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 átomos en longitud.

Aún en otra modalidad preferida, el soporte sólido se usa además como soporte de la síntesis en la preparación de la sonda. La longitud y estabilidad química del enlazador entre el soporte sólido y la primera unidad 3' de ácidos nucleicos juega un papel importante en la síntesis eficiente e hibridación de los ácidos nucleicos unidos al soporte. El brazo enlazador debe ser suficientemente largo de forma que se alcance un alto rendimiento (> 97%) durante la síntesis automática. La longitud requerida del enlazador dependerá del soporte sólido particular usado. Por ejemplo, un enlazador de seis átomos es generalmente suficiente para alcanzar un > 97% de rendimiento durante la síntesis automática de ácidos nucleicos cuando se usa poliestireno altamente reticulado como el soporte sólido. El brazo enlazador es preferentemente de al menos 20

átomos de largo con el objetivo de lograr un alto rendimiento (> 97%) durante la síntesis automática cuando se usa CPG como soporte sólido.

5 La hibridación de una sonda inmovilizada sobre un soporte sólido generalmente requiere que la sonda se separe del soporte sólido por al menos 30 átomos, con mayor preferencia al menos 50 átomos. Para lograr esta separación, el enlazador generalmente incluye un espaciador posicionado entre el enlazador y el 3' terminal. Para la síntesis de ácidos nucleicos, el brazo enlazador se une usualmente al 3'-OH del 3'-terminal por un enlace éster que puede escindirse con reactivos básicos para liberar los ácidos nucleicos del soporte sólido.

10 Una amplia variedad de enlazadores se conocen en la técnica, que se pueden usar para unir la sonda de ácidos nucleicos al soporte sólido. El enlazador puede estar formado por cualquier compuesto, que no interfiera significativamente con la hibridación de la secuencia objetivo a la sonda unida al soporte sólido. El enlazador puede estar formado de, por ejemplo, un ácido nucleico homopolimérico que se puede añadir fácilmente al enlazador por síntesis automática. Alternativamente, polímeros tales como polietilenglicol funcionalizado se pueden usar como el enlazador. Tales polímeros se prefieren en la actualidad sobre los ácidos nucleicos homopoliméricos porque no interfieren significativamente con la hibridación de la sonda al ácido nucleico objetivo. El polietilenglicol es particularmente preferido porque está disponible comercialmente, es soluble en ambos medios orgánico y acuoso, fácil de funcionalizar, y completamente estable bajo las condiciones de síntesis y post-síntesis de ácidos nucleicos.

20 Los enlaces entre el soporte sólido, el enlazador y la sonda preferentemente no se escinden durante la síntesis o eliminación del grupo protector de base bajo condiciones básicas a alta temperatura. Estos enlaces pueden, sin embargo, seleccionarse del grupo que se escinde bajo una variedad de condiciones. Ejemplos de enlaces preferidos actualmente incluyen enlaces carbamato, éster y amida.

25 Sondas inmovilizadas en acrilamida.

En otra modalidad preferida, una especie está dentro de una matriz, tal como una matriz de acrilamida y la especie contiene un BHQ, o la presencia de la especie inmovilizada se comprueba por medio del uso de una sonda que contiene un BHQ. En una modalidad preferida, la inmovilización se logra en conjunto con el proceso "Acrydite" inventado y comercializado por Mosaic Technologies (Cambridge, MA, ver, Rehman y otros, Nucleic Acids Research, 27: 649-655 (1999)). El método Acrydite permite la inmovilización de una sonda de captura etiquetada con alqueno dentro de una red de poli(acrilamina) polimerizada. Cuando las mezclas objetivo pasan sobre la banda de sonda inmovilizada bajo condiciones de electroforesis, el ácido nucleico objetivo se captura sustancialmente cuantitativamente. Sin embargo, la detección de este evento actualmente requiere una segunda sonda. En una modalidad, sondas que contienen un BHQ, y/o un fluoróforo, se inmovilizan en una matriz de acrilamida y subsecuentemente se ponen en contacto con la mezcla objetivo. Por medio del uso de sondas fluorescentes como sondas de capturas, las señales de las mezclas objetivo se pueden detectar directamente en tiempo real.

40 Microarreglos

La presente invención además proporciona microarreglos que incluyen BHQs y compuestos inmovilizados (*por ejemplo*, péptidos, ácidos nucleicos, agentes bioactivos, etc.) funcionalizado con BHQs. Además, la invención proporciona métodos de interrogar microarreglos por medio del uso de sondas que se funcionalizan con BHQs. La especie inmovilizada y las sondas se seleccionan de prácticamente cualquier tipo de molécula, lo que incluye, pero no se limita a, moléculas pequeñas, péptidos, enzimas, ácidos nucleicos y similares.

Los microarreglos de ácidos nucleicos que consisten en una multitud de ácidos nucleicos inmovilizados son herramientas revolucionarias para la generación de información genómica, ver, Debouck y otros, en suplemento a Nature Genetics, 21:48-50 (1999)**. La discusión que sigue se concentra en el uso de BHQs en conjunto con microarreglos de ácidos nucleicos.

50 En otra modalidad preferida, los compuestos de la presente invención se usan en un formato de microarreglo. Los BHQs, o especies que contienen BHQs pueden ellos mismos ser componentes de un microarreglo o, alternativamente pueden usarse como herramientas para tamizar los componentes de un microarreglo.

55 Así, en una modalidad preferida, la presente invención proporciona un método de tamizar un microarreglo. El método incluye poner en contacto los miembros del microarreglo con, por ejemplo, una sonda que contiene un compuesto de la invención o de fórmula (I) o fórmula (II) e interrogar al microarreglo por regiones de fluorescencia. En una modalidad ilustrativa, regiones fluorescentes son indicativas de la presencia de una interacción entre la sonda y un componente del microarreglo. En otra versión de este método, el microarreglo se interroga para regiones en las que la fluorescencia está inhibida por dicho compuesto, lo que indica nuevamente la presencia de una interacción entre la sonda y un componente del microarreglo.

5 En otra modalidad preferida, el arreglo comprende sondas de transferencia de energía donador-aceptor que contienen BHQ inmovilizadas que contienen un compuesto de la invención o de fórmula (I) o fórmula (II) como las especies a interrogar. En esta modalidad, la sonda "se enciende" cuando se hibrida a su objetivo. Tales arreglos se preparan y se leen fácilmente, y se pueden diseñar para dar datos cuantitativos. Los arreglos que comprenden sondas son herramientas valiosas para análisis de expresión y tamizaje genómico clínico.

10 En otra modalidad preferida, la sonda inmovilizada que contiene el compuesto de la invención o de fórmula (I) o fórmula (II) no es una sonda de transferencia de energía donador-aceptor. Un microarreglo basado en tal formato se puede usar para sondear la presencia de interacciones entre un analito y la sonda inmovilizada por, por ejemplo, la observación de la inhibición de la fluorescencia del analito a partir de la interacción entre la sonda y el analito.

15 En una modalidad preferida adicional, los microarreglos comprenden n regiones que comprenden especies idénticas o diferentes (*por ejemplo*, secuencias de ácidos nucleicos, agentes bioactivos). Por ejemplo, el microarreglo puede comprender una mezcla de n regiones que comprenden grupos de especies idénticas. En una modalidad preferida, n es un número de 2 a 100, con mayor preferencia, de 10 a 1,000, y con mayor preferencia de 100 a 10,000. Aún en una modalidad preferida adicional, las n regiones se modelan sobre un sustrato como n localizaciones distintas en una manera que permite comprobar la identidad de cada una de las n localizaciones.

20 Todavía en otra modalidad preferida, la invención además proporciona un método para preparar un microarreglo de n sondas que contienen BHQ. El método incluye unir sondas que contienen BHQ a regiones seleccionadas de un sustrato. Una variedad de métodos están actualmente disponibles para fabricar arreglos de macromoléculas biológicas, tales como arreglos de moléculas de ácidos nucleicos.

25 Un método para fabricar arreglos ordenados de sondas que contienen BHQ sobre un sustrato es un enfoque "membrana de transferencia puntual." En este método, un colector al vacío transfiere una pluralidad, *por ejemplo*, 96, de muestras de sondas acuosas desde pozos de 3 milímetros de diámetro a un sustrato. La sonda se inmoviliza sobre la membrana porosa por la coacción de la membrana o exposición a la radiación UV. Una variante común de este procedimiento es un método de "membrana de transferencia por ranuras" en el que los pozos tienen forma oval altamente alargada.

30 Otra técnica empleada para fabricar arreglos ordenados de sondas usa un arreglo de pines sumergidos en los pozos, *por ejemplo*, los 96 pozos de una placa de microtitulación, para transferir un arreglo de muestras a un sustrato, tal como una membrana porosa. Un arreglo incluye pines que se diseñan para marcar una membrana de forma escalonada, para crear un arreglo de 9216 puntos en un área de 22 x 22 cm. Ver, Lehrach, y otros, HYBRIDIZATION FINGERPRINTING IN GENOME MAPPING AND SEQUENCING, GENOME ANALYSIS, Vol. 1, Davies y otros, Eds., Cold Springs Harbor Press, págs. 39-81 (1990).

35 Un método alternativo de crear arreglos ordenados de sondas es análogo al descrito por Pirrung y otros (patente de los Estados Unidos núm. 5,143,854, concedida 1992), y además por Fodor y otros, (Science, 251: 767-773 (1991)). Este método involucra la síntesis de diferentes sondas en diferentes regiones discretas de una partícula u otro sustrato. Este método se usa preferentemente con moléculas sonda relativamente cortas, *por ejemplo*, menos de 20 bases. Un método relacionado se describió por Southern y otros (Genomics, 13: 1008-1017 (1992)).

40 Khrapko, y otros, DNA Sequence, 1: 375-388 (1991) describe un método de fabricar una matriz de ácidos nucleicos por el punteo de ADN en una capa fina de poliacrilamida. El punteo se hace manualmente con una micropipeta.

45 El sustrato también se puede modelar por medio del uso de técnicas tales como la fotolitografía (Kleinfield y otros, J. Neurosci. 8:4098-120 (1998)), fotograbado, grabado químico y la impresión por microcontacto (Kumar y otros, Langmuir 10:1498-511 (1994)). Otras técnicas para formar patrones sobre un sustrato serán evidentes para los expertos en la técnica.

50 El tamaño y complejidad del patrón sobre el sustrato se limita solamente por la resolución de la técnica usada y la finalidad para la que se destina el patrón. Por ejemplo, por medio del uso de la impresión por microcontacto, elementos tan pequeños como de 200 nm se estratifican sobre un sustrato. Ver, Xia, Y., J. Am. Chem. Soc. 117:3274-75 (1995). Similarmente, por medio del uso de fotolitografía, se producen patrones con elementos tan pequeños como 1 μ m. Ver, Hickman y otros, J. Vac. Sci. Technol. 12:607-16 (1994). Los patrones que son útiles en la presente invención incluyen aquellos que incluyen elementos tales como pozos, cerramientos, particiones, cavidades, entradas, salidas, canales, depresiones, redes de difracción y similares.

55 En una modalidad preferida actualmente, el modelado se usa para producir un sustrato que tenga una pluralidad de pozos adyacentes, hendiduras u orificios para contener las sondas. En general, cada uno de estos elementos del sustrato se aísla

de los otros pozos por una pared elevada o partición y los pozos no se comunican fácilmente de manera fluida. Así, una partícula, reactivo u otra sustancia, colocada en el pozo particular permanece sustancialmente confinada a ese pozo. En otra modalidad preferida, el modelado permite la creación de canales a través del dispositivo por los cuales un analito u otra sustancia puede entrar y/o salir del dispositivo.

En otra modalidad, las sondas se inmovilizan por "imprimirlas" directamente sobre el sustrato o, alternativamente, se puede usar una técnica de "despegue". En la técnica de despegue, una resistencia modelada se coloca sobre el sustrato, y una sonda se coloca en las áreas no cubiertas por la resistencia y la resistencia subsecuentemente se elimina. Resistencias adecuadas para usar con los sustratos de la presente invención se conocen por los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Kleinfeld y otros, J. Neurosci. 8:4098-120 (1998). Después de eliminar la fotoresistencia, una segunda sonda, que tiene una estructura diferente de la primera sonda se puede unir al sustrato en aquellas áreas inicialmente cubiertas por la resistencia. Por medio del uso de esta técnica, se pueden producir sustratos con patrones de sondas que tienen diferentes características. Configuraciones similares del sustrato son accesibles mediante la microimpresión de una capa con las características deseadas sobre el sustrato. Ver, Mrkish y otros Ann. Rev. Biophys. Biotitol. Struct. 25:55-78 (1996).

Grupos espaciadores

Como se usa en la presente descripción, el término "grupo espaciador," se refiere a constituyentes de sondas que contienen BHQ. El grupo espaciador enlaza las porciones donadora y/o aceptora y otros grupos al ácido nucleico, péptido u otro componente de la sonda. El grupo espaciador puede ser hidrofílico (*por ejemplo*, tetraetilenglicol, hexaetilenglicol, polietilenglicol) o ellos pueden ser hidrofóbicos (*por ejemplo*, hexano, decano, etc.).

En una modalidad preferida, por medio del uso de soportes sólidos el constructo inmovilizado incluye un espaciador entre el grupo reactivo del soporte sólido y el análogo de BHQ. El enlazador es preferentemente seleccionado de C₆-C₃₀ grupos alquilo, C₆-C₃₀ grupos alquilo sustituidos, polioles, poliéteres (*por ejemplo*, poli(etilenglicol)), poliaminas, poliamino ácidos, polisacáridos y combinaciones de estos.

En ciertas modalidades, es ventajoso tener el donador y/o aceptor de la sonda unidos a otro componente polimérico por un grupo que proporciona flexibilidad y distancia del componente polimérico. Por medio del uso de tales grupos espaciadores, las propiedades del donador y/o aceptor adyacente a otro componente de la sonda componente se modulan. Las propiedades que se controlan útilmente incluyen, por ejemplo, hidrofobicidad, hidrofiliidad, actividad superficial, la distancia del donador y/o porción BHQ de los otros componentes de la sonda (*por ejemplo*, molécula portadora) y la distancia del donador al BHQ.

En una modalidad ilustrativa, el espaciador sirve para distanciar el BHQ de un ácido nucleico. Los espaciadores con estas características tienen varios usos. Por ejemplo, un BHQ que se mantiene demasiado cerca del ácido nucleico puede no interactuar con el grupo donador, o puede interactuar con una afinidad muy baja. Cuando un BHQ es él mismo estéricamente exigente, la interacción que conduce a la inhibición puede debilitarse indeseablemente, o puede no ocurrir en absoluto, debido a una obstaculización de la aproximación de los dos componentes inducida estéricamente.

Cuando el constructo que comprende el BHQ se inmoviliza por unión a, por ejemplo, un soporte sólido, el constructo puede además incluir una porción espaciadora entre el grupo reactivo del soporte sólido y el análogo de BHQ, u otro componente de la sonda unido al soporte sólido.

Aún en una modalidad adicional, un grupo espaciador que se usa en las sondas de la invención se proporciona con un grupo que se puede escindir para liberar una porción enlazada, tal como, por ejemplo, un BHQ, fluoróforo, enlazadores de hendidura menor, porción intercalante, y similares del componente polimérico. Muchos grupos escindibles se conocen en la técnica. Ver, por ejemplo, Jung y otros, Biochem. Biophys. Acta, 761: 152-162 (1983); Joshi y otros, J. Biol. Chem., 265: 14518-14525 (1990); Zarling y otros, J. Immunol., 124: 913-920 (1980); Bouizar y otros, Eur. J. Biochem., 155: 141-147 (1986); Park y otros, J. Biol. Chem., 261: 205-210 (1986); Browning y otros, J. Immunol., 143: 1859-1867 (1989). Además una amplia variedad de brazos espaciadores escindibles, bifuncionales (ambos homo- y hetero-bifuncionales) están disponibles comercialmente de suministradores tales como Pierce.

Una modalidad ilustrativa que usa grupos espaciadores se expone en las fórmulas VII y VIII, anteriormente. En estas fórmulas, R^b es estable o puede escindirse por reacciones químicas o fotoquímicas. Por ejemplo, grupos R^b que comprenden enlaces éster o disulfuro pueden escindirse por hidrólisis y reducción, respectivamente. Además dentro del alcance de la presente invención está el uso de grupos R^b que se escinden por luz tales como, por ejemplo, derivados nitrobenzilo, grupos fenacilo, ésteres de benzoína, etc. Otros grupos escindibles de este tipo se conocen bien por los expertos en la técnica.

Kits

En otro aspecto, la presente invención proporciona kits que contienen uno o más de los BHQs o composiciones que contienen BHQ de la invención. En una modalidad, un kit incluirá un reactivo derivado de BHQ y orientaciones para unir este derivado a otra molécula. En otra modalidad, el kit incluye un ácido nucleico etiquetado con BHQ que opcionalmente además se etiqueta con un fluoróforo y direcciones para usar este ácido nucleico en uno o más formatos de ensayo. Otros formatos para kits resultarán evidentes a los expertos en la técnica y están dentro del alcance de la presente invención.

Los materiales y métodos de la presente invención se ilustran más aún por los ejemplos que siguen.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran la síntesis y la caracterización de las especies ilustrativas de la invención.

Ejemplo 1 expone la síntesis del inhibidor de fluorescencia BH1 y su conversión en un vidrio de poro controlado conjugado. Ejemplos 2 y 3, proporcionan similares detalles con respecto a los inhibidores de fluorescencia BH2 y BH3.

Ejemplo 4 expone la incorporación de inhibidores de fluorescencia ilustrativos de la invención en sondas de transferencia de energía donador-aceptor basadas en ácidos nucleicos. La eficiencia de la inhibición de la fluorescencia de los BHQs en las sondas se ensaya y compara a la del inhibidor de fluorescencia oscuro DABCYL reconocido en la técnica.

EJEMPLO 1

Este ejemplo expone la síntesis y caracterización de BH1 y derivados de este.

1.1 Síntesis de 4-metil-2-nitrofenilazo-2'-metil-5'-metoxifenilazo-4"-N,N-di(2-hidroxietil) azobenceno, (BHI diol), 6

A una suspensión agitada rápidamente de 25 g (60 mmol) sal Fast Corinth V (Aldrich 22,736-5) en 400 ml de agua helada (baño de hielo) se añadieron 50 g (276 mmol) N - fenildietanolamina disuelta en 400 ml de metanol y 300 ml NaHCO₃ saturada durante 20 min. La mezcla cambió de color de amarillo a rojo intenso durante la adición. La mezcla se enfrió por 1 hr adicional después de la adición, después se filtró a través de un filtro de vidrio poroso medio. El sólido rojo oscuro se lavó con 300 ml de agua helada y se secó al aire por 3 días. El rendimiento de **6** fue 27 g, (91 %). TLC rf 0.15 (Placa de sílice, 5% MeOH en CH₂Cl₂). MALDI M/e 493.11 (Calcul. 492.5). ¹H NMR (CDCl₃, δ) 7.9 (d, 2H), 7.65 (m, 2H), 7.6 (s, 1H), 7.45(d, 1H), 7.4(s, 1H), 6.8(d, 2H), 4.0(s, 3H), 3.95(t, 2H), 3.85(t, 2H), 3.7(t, 2H), 3.6(t, 2H), 2.7(s, 3H), 2.5(s, 3H).

1.2 Síntesis de 4-metil-2-nitrofenilazo-2'-metil-5'-nietoxifenilazo-4"-N,N-(2-hidroxietil)-(2-O-(4,4'dimetoxitritil)etil)azobenceno (DMT-BH1), 7

Una solución de 25 g (50 mmol) **6** en 400 ml de piridina seca evaporó a sequedad, y se añadieron 7 g (21 mmol) de DMT-cloruro en 300 ml de piridina seca. La solución se asentó por 3 días a temperatura ambiente, se eliminó después hasta un alquitrán. El residuo negro se disolvió en 600 ml de acetato de etilo, y se lavó con 300 ml de 1 N ácido cítrico acuoso, seguido por un lavado con 300 ml de NaHCO₃ saturado acuoso. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se eliminó hasta un alquitrán. El residuo se cargó en una columna de cromatografía de 55 por 8 cm de alúmina neutra, 7% en peso de agua, y se eluyó primero con una fase móvil de 0.5% MeOH, 0.5% de piridina en CH₂Cl₂. Después que 1 l de solvente se eluyó, se corrió un gradiente de 2 % de MeOH en 4 l. Las fracciones que contenía **7** puro (0.42 rf, placa de sílice, 2% MeOH, 2% piridina en CH₂Cl₂) se reunieron y se evaporaron. El rendimiento fue 2.8 g (17% de rendimiento) de **7** como una espuma oscura. MALDI M/e 793.88 (Calcul. 794.5). ¹H NMR (CDCl₃, δ) 7.85 (d, 2H), 7.7 (m, 4H), 7.6 (s, 1H), 7.45(d, 1H), 7.4 - 7.1 (m, 10H), 6.8(m, 6H), 4.0(s, 3H), 3.85(m, 2H), 3.75 (s, 6H), 3.7(m, 2H), 3.5 - 3.3(m, 4H), 2.7(s, 3H), 2.5(s, 3H).

1.3 Síntesis de 4-metil-2-nitrofenilazo-2'-metil-5'-metoxifenilazo-4"-NN-(2-O-(N',N'-diisopropil-2-cianoetilfosfito)etil)-(2-O-4,4'dimetoxitritil)-etil)azobenceno, (DMT BH1 amidita), 8

Una solución de 2.8 g (3.5 mmol) de **7** en 50 ml de piridina seca se evaporó hasta secarse y se aplicó alto vacío por varias horas. Una solución de 1.5 g (5 mmol) de N,N,N',N'-tetraisopropil-2-cianoetilfosfano y 60 mg de tetrazol se mezclaron en 20 ml de acetonitrilo seco y se añadió al matraz que contenía el **7** seco. Después de 2 hrs, el solvente se eliminó, y el residuo se disolvió en 200 ml de EtOAc. La capa orgánica se lavó con 100 ml NaHCO₃ saturado acuoso y se secó sobre MgSO₄. El solvente se evaporó, y el residuo se aplicó a una columna de cromatografía de 25 por 3 cm de alúmina neutra, 7% en peso de agua, y se eluyó con una fase móvil de 75% éter de Pet., 23% EtOAc, 2% piridina. Las fracciones que contenía **8** puro (0.67 rf, placa de sílice pre-corrida, 50% éter de pet., 48% EtOAc, 2% piridina) se reunieron y se evaporaron. El rendimiento fue 1 g (20% de rendimiento) de **8** como una espuma oscura. MALDI M/e 995.5 (Calcul. 994.5).

1.4 Síntesis de BH1-CPG, 9

11 g de vidrio de poro controlado DMT-2,2'-sulfonildietanol-succinil, 500Å, Biosearch parte # BGS-5000, se lavó tres veces con ácido dicloroacético 3% para efectuar la eliminación del grupo DMT. El CPG se lavó bien con tres porciones de 50 ml de CH₂Cl₂, seguido por un lavado de 50 ml con piridina seca. El CPG se añadió al matraz que contenía 1 g de **8**. 25 ml de piridina seca se añadieron, y el solvente se eliminó mediante evaporación rotatoria, seguido por alto vacío por 3 hrs. El CPG seco y la amidita se trataron con una solución de 1 g S-etil tetrazol en 20 ml de acetonitrilo seco por 20 min. El CPG se lavó en un embudo de vidrio sinterizado dos veces con 50 ml de acetonitrilo, después se añadieron 50 ml de 0.02 M yodo en 90% de THF, 8% de agua y 2% piridina. Después de 5 min, la solución de yodo se lavó fuera del CPG con tres porciones de 50 ml de acetonitrilo, y después se añadió un solución de recubrimiento de 10% Ac₂O, 10% N-metilimidazol y 10 % piridina en THF. Después de 20 min, la solución se lavó fuera del CPG con tres porciones de 50 ml de acetonitrilo, seguido por tres porciones de 50 ml de CH₂Cl₂. El material se secó durante la noche bajo alto vacío. La determinación de la carga de DMT en el material seco fue 6 µM/g.

EJEMPLO 2

Este ejemplo expone la síntesis y caracterización de BH2 y derivados de este.

2.1 Síntesis de 4-nitrofenilazo-2',5'-dimetoxifenilazo-4"-N,N-di(2-hidroxietyl) azobenceno, (BH2 diol), **10**

A una suspensión agitada rápidamente de 25 g (60 mmol) sal Fast Black K (Aldrich 20,151-0) en 400 ml de agua helada (baño de hielo) se añadieron 50 g (276 mmol) de N-fenildietanolamina disuelta en 400 ml de metanol y 300 ml NaHCO₃ sat'd durante 20 min.. La mezcla cambió de color de marrón a azul intenso durante la adición. La mezcla se enfrió por 1 hr adicional después de la adición, después se filtró a través de un filtro de vidrio poroso medio. El sólido azul intenso se lavó con 300 ml de agua helada y se secó al aire por 3 días. El rendimiento de **10** fue 22 g, (74%). TLC rf 0.2 (Placa de sílice, 5% MeOH en CH₂Cl₂). MALDI M/e 493.13 (Calcul. 494.4). ¹H NMR (CDCl₃, δ) 8.3 (d, 2H), 8.0(d, 2H), 7.85(d, 2H), 7.4(d, 2H), 6.7(m, 2H), 4.1(s, 3H), 3.95(s, 3H), 3.9(t, 2H), 3.8(t, 2H), 3.7(t, 2H), 3.5(t, 3H).

2.2 Síntesis de 4-nitrofenilazo-2',5'-dimetoxifenilazo-4"-N,N-(2-hidroxi-etil)-(2-O-(4,4' dimetoxitritil)etilazobencenol, (DMT-BH2), **11**

Una solución de 22 g (44 mmol) **10** en 400 ml de piridina seca se eliminó hasta secarse, y 7 g (21 mmol) de DMT-cloruro se añadió en 300 ml de piridina seca. La solución se asentó por 3 días a temperatura ambiente, se eliminó después hasta un alquitrán. El residuo negro se disolvió en 600 ml de acetato de etilo, y se lavó con 300 ml de 1 N ácido cítrico acuoso, seguido por un lavado con 300 ml de NaHCO₃ saturado acuoso. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se eliminó hasta un alquitrán. El residuo se cargó en una columna de cromatografía de 55 por 8 cm de alúmina neutra, 7% en peso de agua, y se eluyó primero con una fase móvil de 0.5% MeOH, 0.5% de piridina en CH₂Cl₂. Después que 1 l de solvente se eluyó, se corrió un gradiente de 2 % de MeOH en 4 l. Las fracciones que contenían **11** puro (0.4 rf, placa de sílice, 2% MeOH, 2% piridina en CH₂Cl₂) se reunieron y se evaporaron. El rendimiento fue 2.8 g (17% de rendimiento) de **11** como una espuma oscura. MALDI M/e 794.2 (Calcul. 796.4). ¹H NMR (CDCl₃, δ) 8.3 (d, 2H), 7.9(d, 2H), 7.75(d, 2H), 7.4 - 7.1(m, 9H), 6.7 - 6.5(m, 6H), 4.1(s, 3H), 3.95(s, 3H), 3.9 - 3.6(m, 12H), 3.3(t, 3H).

2.3 Síntesis de 4-nitrofenilazo-2',5'-dimetoxifenilazo-4"-N,N-(2-O-(N',N'-diisopropil-2-cianoetilfosfito)etil)-(2-O-(4,4'dimetoxitritil)etil)-azobenceno, (DMT-BH2 amidita), **12**

Una solución de 2.8 g (3.5 mmol) **11** en 50 ml de piridina seca se evaporó hasta secarse y se aplicó alto vacío por varias horas. Una solución de 1.5 g (5 mmol) de N,N,N',N'-tetraisopropil-2-cianoetilfosfano y 60 mg de tetrazol se mezclaron en 20 ml de acetonitrilo seco y se añadió al matraz que contenía el **11** seco. Después de 2 hrs, el solvente se eliminó, y el residuo se disolvió en 200 ml de EtOAc. La capa orgánica se lavó con 100 ml NaHCO₃ saturado acuoso y se secó sobre MgSO₄. El solvente se evaporó, y el residuo se aplicó a una columna de cromatografía de 25 por 3 cm de alúmina neutra, 7% en peso de agua, y se eluyó con una fase móvil de 75% éter de pet., 23% EtOAc, 2% piridina. Las fracciones que contenía **12** puro (0.71 rf, placa de sílice pre-corrida, 50% Pet. éter, 48% EtOAc, 2% piridina) se reunieron y se evaporaron. El rendimiento fue 1 g (20% de rendimiento) de **11** como una espuma oscura. MALDI M/e 996.06 (Calcul. 996.4).

2.4 Síntesis de BH2-CPG, **13**

10 g de vidrio de poro controlado DMT-2,2'-sulfonildietanol-succinilo, 500Å, Biosearch parte # BG5-5000, se lavaron tres veces con 3% ácido dicloroacético para efectuar la eliminación del grupo DMT. El CPG se lavó bien con tres porciones de 50 ml de CH₂Cl₂, seguido por un lavado de 50 ml con piridina seca. El CPG se añadió al matraz que contenía 1 g de **12**. 25

ml de piridina seca se añadieron, y el solvente se eliminó mediante evaporación rotatoria, seguido por alto vacío por 3 hrs. El CPG seco y la amidita se trataron con una solución de 1 g S-etil tetrazol en 20 ml de acetonitrilo seco por 20 min. El CPG se lavó en un embudo de vidrio sinterizado dos veces con 50 ml de acetonitrilo, después se añadieron 50 ml de 0.02 M yodo en 90% de THF, 8% de agua y 2% piridina. Después de 5 min, la solución de yodo se lavó fuera del CPG con tres porciones de 50 ml de acetonitrilo, y después se añadió un solución de recubrimiento de 10% Ac₂O, 10% N-metilimidazol y 10 % piridina en THF. Después de 20 min, la solución se lavó fuera del CPG con tres porciones de 50 ml de acetonitrilo, seguido por tres porciones de 50 ml de CH₂Cl₂. El material se secó durante la noche bajo alto vacío. La determinación de la carga de DMT en el material seco fue 30 µM/g.

10 EJEMPLO 3

Este ejemplo expone la síntesis y caracterización de BH3 y derivados de este.

15 3.1 Síntesis de cloruro de 3-dietilamino-5 fenilfenazium-7-(4'-N,N di(2-hidroxietil) azobenceno), (BH3 diol), 14

3-amino-7- (dietilamino)-5-fenilfenazium cloruro (metileno violeta 3RAX, Aldrich 30,750-5), 10 g (26 mmol) se agitó en 200 ml 1 N HCl en un baño de hielo. Una solución de 2 g NaNO₂ en 20 ml de agua fría se añadió en forma de gotas durante 20 min. La solución se agitó por 30 min. N-fenildietanolamina, 4.7 g (27 mmol), se disolvió en 100 ml de metanol y se añadió a la solución violeta de metileno, después que el pH se ajustó a 6 con solución de NaOH. La solución cambió el color de violeta a verde oscuro. La solución se agitó por 1 hr, después se extrajo tres veces con 200 ml de CH₂Cl₂. La capa acuosa se evaporó, y el sólido verde oscuro se trituró con 3 porciones de 200 ml de piridina. La piridina se evaporó para dar 2.9g (21 % de rendimiento) de **14** como un sólido verde oscuro. (0.85 rf, placa de sílice, 15% MeOH, 2% piridina en CH₂Cl₂) MALDI M/e 535.6 (calcul. 535.75).

25 3.2 Síntesis de cloruro de 3-dietilamino-5 phenylphenazium-7-(4'-N,N (2-hidroxietil)-(2-O-(4,4'dimetoxitritil)etilazobenceno, (DMT BH3), 15

El compuesto **14**, 2.9 g (5.4 mmol) se secó por eliminación con 100 ml de piridina seca, y después se re-disolvió en 100 ml de piridina seca junto con 2 g (5.9 mmol) de cloruro de DMT. La mezcla se asentó durante la noche, y el solvente se eliminó. El residuo se disolvió nuevamente en 200 ml CH₂Cl₂ y se lavó con 200 ml de 1 M ácido cítrico acuoso. La capa acuosa se lavó nuevamente con dos porciones de 200 ml de CH₂Cl₂, las capas orgánicas combinadas se evaporaron hasta un alquitrán. El residuo se cargó sobre una columna de cromatografía de 20 por 3 cm de alúmina neutra, 7% en peso de agua, y se eluyó primero con una fase móvil de 2% MeOH, 1% piridina en CH₂Cl₂. Se corrió un gradiente de 6 % MeOH en 3 L. Las fracciones que contenían **15** puro (0.9 rf, placa de sílice, 15% MeOH, 1% piridina en CH₂Cl₂) se reunieron y se evaporaron. El rendimiento fue 0.5 g (11% de rendimiento) de **15** como una espuma oscura. MALDI M/e 837.6 (calcul. 836.75)

40 3.3 Síntesis de 3-dietilamino-5-phenylphenazium-7-(4'-N,N-(2-O-(N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosfito)etil)-(2-O-(4,4'dimetoxitritil)etil)azobenceno cloruro, (DMT BH3 amidita), 16

Una solución de 0.5 g (0.6 mmol) **15** en 50 ml de piridina seca se evaporó hasta secarse y se aplicó alto vacío por varias horas. Una solución de 0.5 g (1.7 mmol) de N,N,N',N'-tetraisopropil-2-cianoetilfosfano y 20 mg de tetrazol se mezclaron en 20 ml de acetonitrilo seco y se añadió al matraz que contenía el **15** seco. Después de 2 hrs, el solvente se eliminó, y el residuo se disolvió en 100 ml de EtOAc. La capa orgánica se lavó con 50 ml NaHCO₃ saturado acuoso y se secó sobre MgSO₄. El disolvente se evaporó, y el residuo se aplicó a una columna de cromatografía de 15 por 3 cm de alúmina neutra, 7% en peso de agua, y se eluyó primero con una fase móvil de 1% MeOH, 1% piridina en CH₂Cl₂. Se corrió un gradiente de 6 % MeOH en 2 L. Las fracciones que contenía **16** puro (0.82 rf, placa de sílice de pre-corrída, 5% MeOH, 1% piridina en CH₂Cl₂) se reunieron y se evaporaron. El rendimiento fue 0.26 g (42% de rendimiento) de **16** como una espuma oscura. MALDI M/e 1037.3 (Calcul. 1036.75).

50 Síntesis de BH3-CPG, 17

2 g de vidrio de poro controlado DMT-2,2'-sulfonildietanol-succinil, 500Å, Biosearch parte # BGS-5000, se lavaron tres veces con 3% ácido dicloroacético para efectuar la eliminación del grupo DMT. El CPG se lavó bien con tres porciones de 20 ml de CH₂Cl₂, seguido por un lavado de 20 ml con piridina seca. El CPG se añadió al matraz que contenía 0.26 g de **16**. 25 ml de piridina seca se añadieron, y el solvente se eliminó mediante evaporación rotatoria, seguido por alto vacío por 3 hrs. El CPG seco y la amidita se trataron con una solución de 0.5 g S-etil tetrazol en 10 ml de acetonitrilo seco por 20 min. El CPG se lavó en un embudo de vidrio sinterizado dos veces con 20 ml de acetonitrilo, después se añadieron 20 ml de 0.02 M yodo en 90% de THF, 8% de agua y 2% piridina. Después de 5 min, la solución de yodo se lavó fuera del CPG con tres porciones de 20 ml de acetonitrilo, y después se añadió un solución de recubrimiento de 10% Ac₂O, 10% N-metilimidazol y 10 % piridina

en THF. Después de 20 min, la solución se lavó fuera del CPG con tres porciones de 20 ml de acetonitrilo, seguido por tres porciones de 20 ml de CH_2Cl_2 . El material se secó durante la noche bajo alto vacío. La determinación de la carga de DMT en el material seco fue 12 $\mu\text{M/g}$.

5 EJEMPLO 4

Este ejemplo expone la preparación y caracterización de ácidos nucleicos análogos de BHQs ilustrativos de la invención. Los conjugados ácido nucleico-BHQ se comparan a un conjugado similar de DABCYL.

10 La eficiencia de la transferencia de energía donador-aceptor (FRET) es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre las moléculas donadora y aceptora (Stryer, L. Annu. Rev. Biochem. 1978, 47, 819-846). Esta propiedad se puede usar para supervisar la hibridación de los ácidos nucleicos etiquetados en un extremo con un fluoróforo donador (reportero) y en el extremo opuesto con un aceptor (inhibidor de fluorescencia) (Parkhurst y otros, Biochemistry 1995, 34, 285-292). En ausencia de una secuencia objetivo complementaria la sonda doble etiquetada es muy flexible y sufre rápidos cambios de configuración de forma que la distancia promedio entre el donador (D) y el aceptor (A) es suficientemente cercana para que ocurra FRET eficiente. A partir de la hibridación a un objetivo complementario, se forma un ADN híbrido rígido que separa el par D-A y reduce la eficiencia de la transferencia. Esto se manifiesta por sí mismo en un aumento de la intensidad de fluorescencia del reportero.

20 4.1 Síntesis y Caracterización de sondas BHQ

Para evaluar la eficiencia de los colorantes inhibidores de la fluorescencia del agujero negro (BHQs), la habilidad de estos colorantes de inhibir una serie de fluoróforos comunes se comparó con los colorantes inhibidores de fluorescencia estándar DABCYL y TAMRA en un ensayo de complementación. Como TAMRA exhibe su propia fluorescencia nativa, solo se puede usar para inhibir la fluorescencia de colorantes de longitudes de onda más bajas y así solo se usó para inhibir FAM en este ensayo.

4.1a Materiales y Métodos

30 Los ácidos nucleicos se sintetizaron en un sintetizador de ADN automático Biosearch 8700 por medio del uso de química estándar de fosoramidita. Las fosoramiditas A^{BZ} , C^{AC} , T, y G^{DMF} se suplementaron por Chruachem. Los soportes de vidrio de poro controlado (CPG) TAMRA, DABCYL, y BHQ de Biosearch Technologies se usaron para la unión de los colorantes inhibidores de fluorescencia al 3'-terminal de los ácidos nucleicos. El etiquetado 5' fluoróforo se logró por medio del uso de fluoróforos fosoramiditas con la excepción de Cy5 que se añadió como un succinimidil éster a los ácidos nucleicos amino 5' por medio del uso del protocolo del fabricante. 6-FAM y TFA-aminohexil amidita fueron de Biosearch. Cy3 fosoramidita y Cy5 succinimidil éster fueron de Amersham Pharmacia Biotech. La escisión y desprotección de los oligos se llevó a cabo en amoniaco a 60 °C por 3 hrs, con la excepción de los oligos TAMRA 3' que se desprotegeron en 1:3 t-butilamina: H_2O por 8 horas a 60 °C, y oligos BH3 3' que se desprotegeron por 1 hora a 60 °C en amoniaco. Después de la desprotección, las sondas doble etiquetadas se evaporaron hasta secarse después se resuspendieron en agua grado HPLC y se filtraron a través de filtros de 0.45 μM para prepararse para la filtración HPLC. Un método de dos etapas de purificación HPLC de intercambio aniónico seguido por HPLC de fase reversa se usó para purificar todas las sondas doble etiquetadas. Las sondas purificadas se analizaron por ambas HPLC de intercambio aniónico y fase reversa. El ácido nucleico complementario se purificó en un cartucho de fase reversa Biosearch Micropure II por medio del uso del protocolo estándar.

45 Todas las mediciones de fluorescencia se tomaron por medio del uso de un lector de microplaca fluorescente Spectramax Gemini. Las sondas se disolvieron a 200 nM en un amortiguador compuesto de 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, y 3.5 mM MgCl_2 , pH 8.3, ambos en presencia y ausencia de un exceso de cinco veces de ácido nucleico perfectamente complementario. La fluoresceína se excitó a 470 nm y la emisión se leyó a 530 nm con un filtro de corte de 515 nm en el lugar. Cy3 se excitó a 510 nm y se leyó a 567 nm con un filtro de corte de 550 nm. Cy5 se excitó a 630 nm y se leyó a 660 nm con un filtro de corte de 630 nm. La intensidad de fluorescencia promedio de un conjunto de ocho amortiguadores blanco se sustrajo de todas las medidas de fluorescencia de la sonda antes de calcular las relaciones señal a ruido.

El conjunto de ácidos nucleicos expuestos en la Tabla 2 se sintetizó y purificó rigurosamente por HPLC:

55

60

Tabla 2. Sondas doble etiquetadas para ensayo de hibridación

Reportero (5')	em max (nm)	Secuencia (5' a 3')	Inhibidor de fluorescencia (3')
FAM	518	ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC G	TAMRA
FAM	518	ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC G	DABCYL
FAM	518	ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC G	BH1
FAM	518	ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC G	BH2
Cy3	573	ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC G	DABCYL
Cy3	573	ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC G	BH1
Cy3	573	ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC G	BH2
Cy5	678	ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC G	DABCYL
Cy5	678	ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC G	BH2
Cy5	678	ATG CCC TCC CCC ATG CCA TCC TGC G	BH3

La relación de señal a ruido (S:N) de hibridación para cada sonda se midió en presencia de un exceso molar de cinco veces de ácidos nucleicos perfectamente complementarios. Todos los ensayos de hibridación se realizaron en un amortiguador de 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, y 3.5 mM MgCl₂, pH 8.3. S:N se calculó al dividir la intensidad de la fluorescencia de la sonda en presencia de complemento por la intensidad de fluorescencia de la sonda sola después de sustraer la intensidad de fluorescencia del amortiguador blanco de cada una. Todas las mediciones de fluorescencia se tomaron en triplicado por medio del uso de un lector de placa fluorescente Spectramax Gemini.

4.2 Resultados

La inhibición de la fluorescencia mejorada por los BHQs se demostró para tres fluoróforos ampliamente separados. Un aumento de dos veces en la relación señal a ruido se alcanzó al reemplazar DABCYL con BH1 para la sonda de fluoresceína. Los aumentos de S:N son más impactantes para las sondas etiquetadas con cianina, con aproximadamente un aumento de diez veces en S:N observada para la sonda Cy3 inhibida con BH2 y un aumento de treinta veces S:N para la sonda Cy3 inhibida con BH3 sobre estructuras idénticas inhibidas con DABCYL. Esto es consistente con la teoría de que la eficiencia de FRET es proporcional a la magnitud de superposición entre el donador y aceptor (Haugland y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1969, 63, 23-30). DABCYL, que absorbe máximamente a 474 nm, inhibe la fluorescencia de los colorantes reporteros desplazados al rojo con eficiencia disminuida, mientras los BHQs se pueden elegir en consecuencia para tener máxima superposición de espectros con el reportero de interés.

Los datos del ensayo de hibridación se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Relaciones señal a ruido de sondas doble etiquetadas FRET

donador/aceptor núm.de medición	Ruido			Señal			Ruido promedio	Señal promedio	S:N
	#1	#2	#3	#1	#2	#3			
FAMTAM	89.18	91.50	89.54	279.13	277.08	272.78	90.08	276.33	3.07
FAMDAB	89.97	81.03	86.74	348.98	323.82	352.00	85.92	341.61	3.98
FAMBH1	39.24	37.05	38.85	296.53	316.24	311.15	38.38	307.97	8.02
FAMBH2	67.12	66.64	56.79	445.48	415.78	442.75	63.52	434.34	6.84
Cy3DAB	19.66	19.65	19.39	147.70	139.83	154.35	19.57	147.29	7.53
Cy3BH1	1.86	2.09	2.41	140.72	135.20	135.25	2.12	137.06	64.51
Cy3BH2	2.02	1.94	2.08	149.65	148.89	150.40	2.02	149.65	74.15
Cy5/DAB	57.09	59.15	50.50	157.36	176.04	216.59	55.58	183.33	3.30
Cy5/BH2	19.92	21.47	22.53	263.64	288.20	256.07	21.31	269.31	12.64
Cy5/BH3	1.65	2.17	1.55	197.96	210.71	208.06	1.79	205.58	114.79

Reivindicaciones

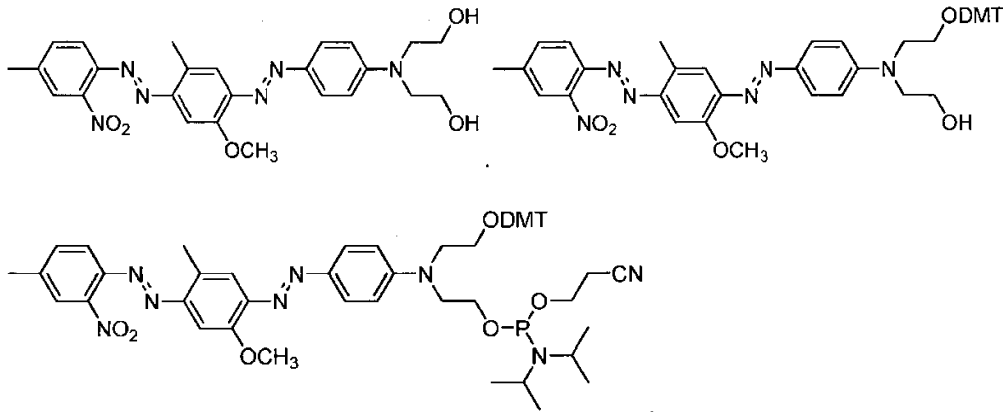
1. Un compuesto que tiene una estructura seleccionada de:

5

10

15

20



25

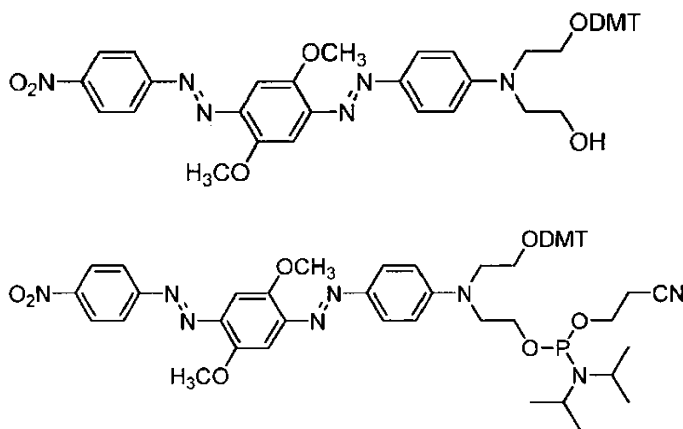
2. Un compuesto que tiene una estructura seleccionada de:

30

35

40

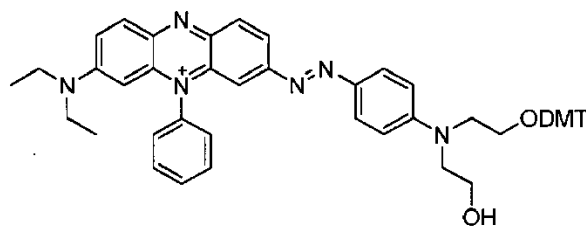
45

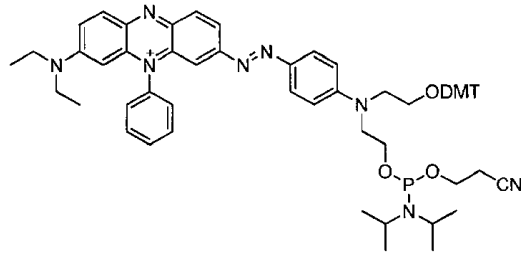


50

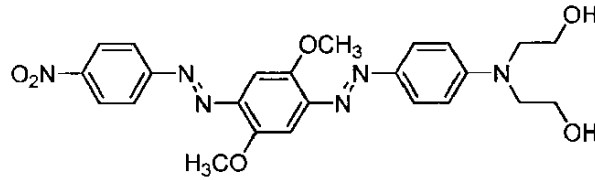
55

3. Un compuesto que tiene una estructura seleccionada de:

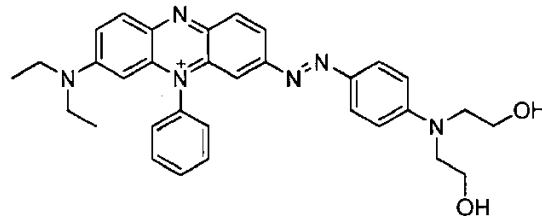




4. Un microarreglo que comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un compuesto que tiene una fórmula seleccionada de



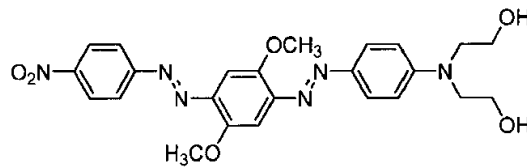
y



en donde dicho compuesto se conjuga directamente con un soporte sólido o con una molécula portadora unida a dicho soporte sólido.

5. Una mezcla que comprende al menos una primera molécula portadora y una segunda molécula portadora:

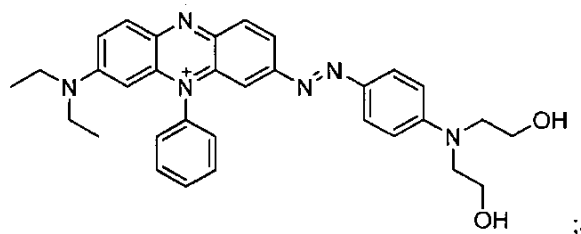
en donde dicha primera molécula portadora está enlazada covalentemente a un primer compuesto, el primer compuesto es un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un compuesto que tiene una fórmula seleccionada de



y

5

10

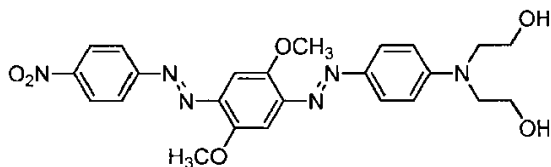


15

en donde dicha segunda molécula portadora está enlazada covalentemente a un segundo compuesto, el segundo compuesto es un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un compuesto que tiene una fórmula seleccionada de

20

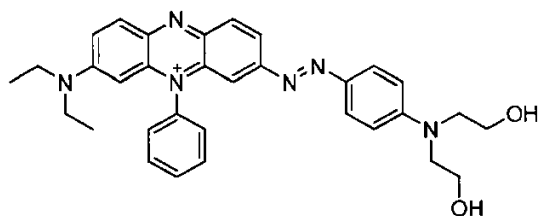
25



y

30

35



40

6. Un método para detectar o cuantificar especies moleculares, dicho método comprende:

poner en contacto dichas especies moleculares con una mezcla de acuerdo con la reivindicación 5; y
 detectar un cambio en una propiedad fluorescente de un componente de dicha mezcla, dichas especies moleculares y una combinación de estas, y de ese modo detectar o cuantificar dichas especies moleculares.

45

7. Un método para determinar si una muestra contiene una enzima, dicho método comprende:

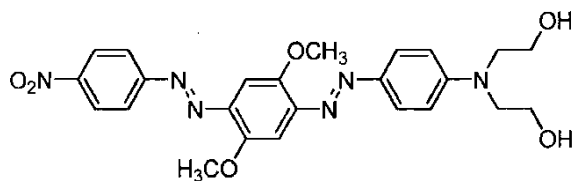
(a) poner en contacto dicha muestra con un constructo peptídico que comprende

50

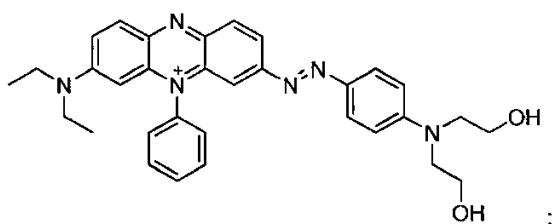
- i) un fluoróforo;
- ii) un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un compuesto que tiene una fórmula seleccionada de

55

60



y



y

iii) un sitio de reconocimiento de la escisión para dicha enzima,

en donde dicho péptido está en una configuración que permite la transferencia de energía donador-aceptor entre dicho fluoróforo y dicho inhibidor de la fluorescencia cuando dicho fluoróforo se excita;

(b) excitar dicho fluoróforo; y

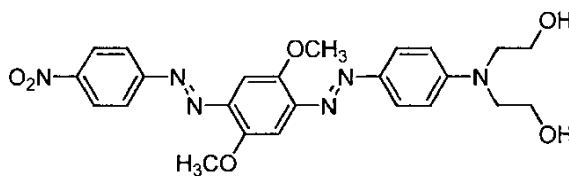
(c) determinar una propiedad de fluorescencia de dicha muestra, en donde la presencia de dicha enzima en dicha muestra resulta en un cambio en dicha propiedad de fluorescencia.

8. Un método para determinar si un compuesto altera una actividad de una enzima, dicho método comprende:

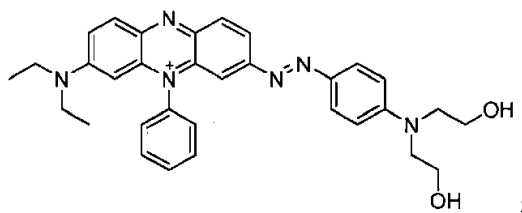
(a) poner en contacto una muestra que comprende dicha enzima y dicho compuesto con un constructo peptídico que comprende

i) un fluoróforo;

ii) un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un compuesto que tiene una fórmula seleccionada de



y



60

y

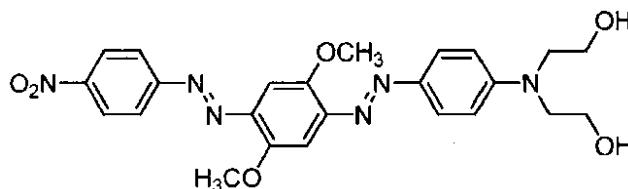
iii) un sitio de reconocimiento de la escisión para dicha enzima, en donde dicho péptido está en una configuración que permite la transferencia de energía donador-aceptor entre dicho fluoróforo y dicho compuesto cuando dicho fluoróforo se excita; (b) excitar dicho fluoróforo; y (c) determinar una propiedad de fluorescencia de dicha muestra, en donde dicha actividad de dicha enzima en dicha muestra resulta en un cambio en dicha propiedad de fluorescencia.

9. Un método para detectar una secuencia objetivo de ácido nucleico, dicho método comprende:

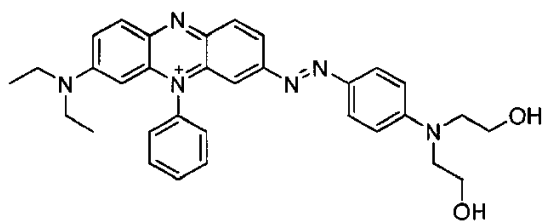
(a) poner en contacto dicha secuencia objetivo con un ácido nucleico detector que comprende una secuencia de unión objetivo monocatenaria, dicho ácido nucleico detector está enlazado a ella,

i) un fluoróforo; y

ii) un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un compuesto que tiene una fórmula seleccionada de



y



en donde dicho ácido nucleico detector está en una configuración que permite la transferencia de energía donador aceptor entre dicho fluoróforo y dicho compuesto cuando dicho fluoróforo se excita;

(b) hibridar dicha secuencia de unión objetivo a dicha secuencia objetivo, y de ese modo alterar dicha configuración de dicho ácido nucleico detector, causando un cambio en un parámetro de fluorescencia; y

(c) detectar dicho cambio en dicho parámetro de fluorescencia, y de ese modo detectar dicha secuencia objetivo de ácido nucleico.

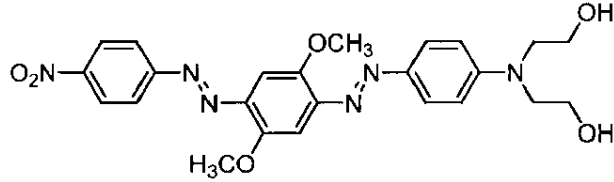
10. Un método para detectar la amplificación de una secuencia objetivo que comprende, en una reacción de amplificación :

(a) hibridar a dicha secuencia objetivo un ácido nucleico detector que comprende una secuencia de unión objetivo monocatenaria y una estructura secundaria intramolecularmente asociada 5' a dicha secuencia de unión objetivo, en donde al menos una porción de dicha secuencia detectora forma una cola monocatenaria que está disponible para la hibridación a dicha secuencia objetivo, dicho oligonucleótido detector tiene unido a él,

i) un fluoróforo; y

ii) un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un compuesto que tiene una fórmula seleccionada de

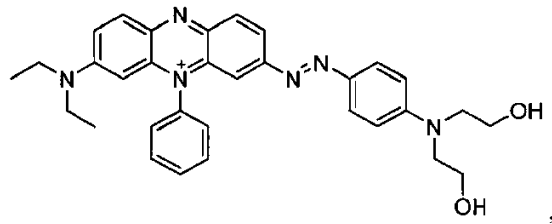
5



10

y

15



20

25

en donde dicho ácido nucleico detector está en una configuración que permite la transferencia de energía donador aceptor entre dicho fluoróforo y dicho compuesto cuando dicho fluoróforo se excita;

30

(b) extender dicho ácido nucleico detector hibridado en dicha secuencia objetivo con una polimerasa para producir un producto de extensión de ácido nucleico detector y separar dicho producto de extensión de ácido nucleico detector de dicha secuencia objetivo;

35

(c) hibridar un iniciador a dicho producto de extensión de ácido nucleico detector y extender el iniciador con dicha polimerasa, y de ese modo linealizar dicha estructura secundaria intramolecularmente asociada y producir un cambio en un parámetro de fluorescencia; y

(d) detectar dicho cambio en dicho parámetro de fluorescencia, y de ese modo detectar dicha secuencia objetivo.

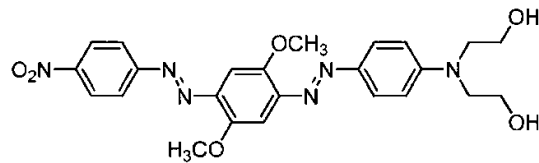
40

11. Un método de la reivindicación 9 o la reivindicación 10 en donde el ácido nucleico es un oligonucleótido.

45

12. Un método para determinar si un primer ácido nucleico y un segundo ácido nucleico hibridan, dicho primer ácido nucleico comprende un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un compuesto que tiene una fórmula seleccionada de

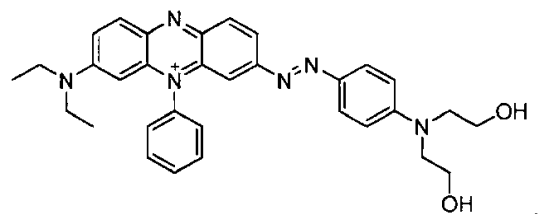
50



55

y

60

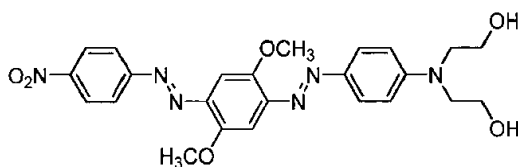


covalentemente unido a dicho ácido nucleico, dicho método comprende:

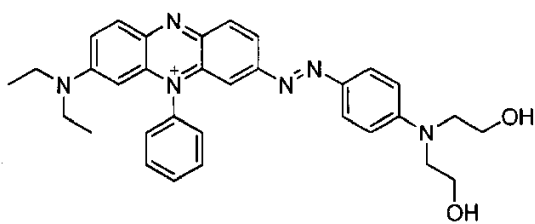
- (a) poner en contacto dicho primer ácido nucleico con dicho segundo ácido nucleico;
 (b) detectar una alteración en una propiedad fluorescente de un elemento seleccionado de dicho primer ácido nucleico, dicho segundo ácido nucleico y una combinación de estos, y de ese modo determinar si ocurre la hibridación.

13. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que está covalentemente unido a: una molécula pequeña con un peso molecular de menos de 1000 dalton, una proteína, un péptido, un polímero sintético o un soporte sólido.

14. Una sonda que incluye un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un compuesto que tiene una fórmula seleccionada de



y



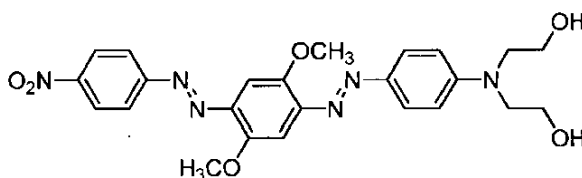
conjugado a un receptor, una enzima, un ligando para una especie objetivo que es un ácido nucleico o un péptido, o a una molécula pequeña con un peso molecular de menos de 1000 dalton.

15. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un conjugado que comprende uno o más de dichos compuestos inmovilizados en un polímero, biomolécula o material sólido o semisólido que tenga cualquier configuración útil.

16. Una especie que contiene un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y dentro de una matriz acrilamida.

17. Un método para probar un microarreglo para la presencia de un compuesto, el método incluye:

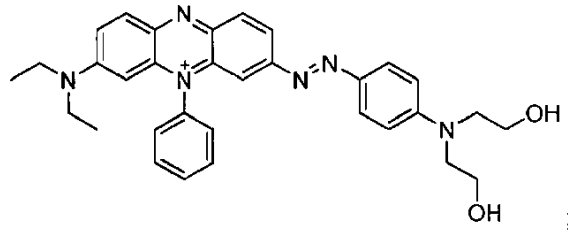
- (a) poner en contacto el microarreglo con una sonda que interactúa con el compuesto, la sonda incluye un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un compuesto que tiene la fórmula seleccionada de



y

5

10



15

y

(b) detectar una diferencia en una propiedad de fluorescencia de un elemento seleccionado de la sonda, el compuesto y combinaciones de estos, y de ese modo determinar la presencia del compuesto.

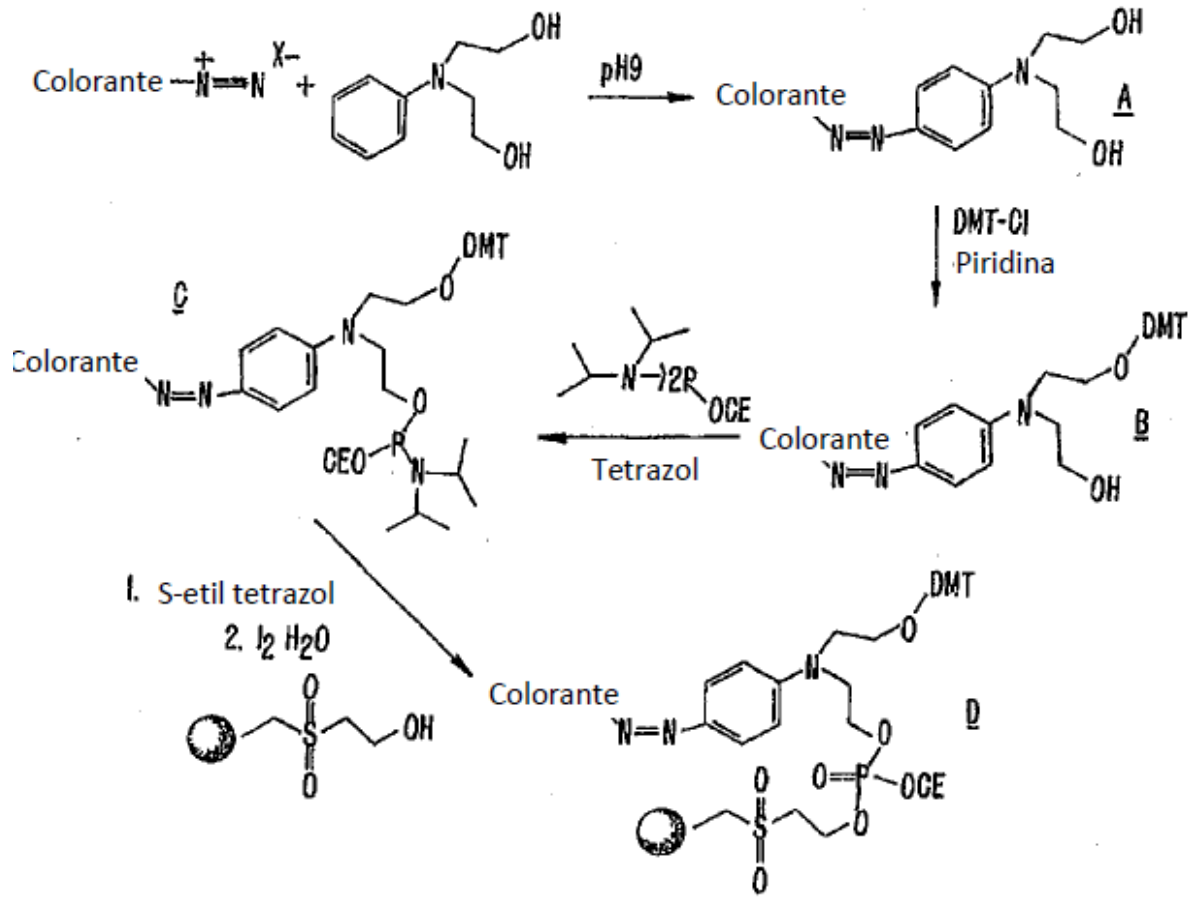


Figura 1

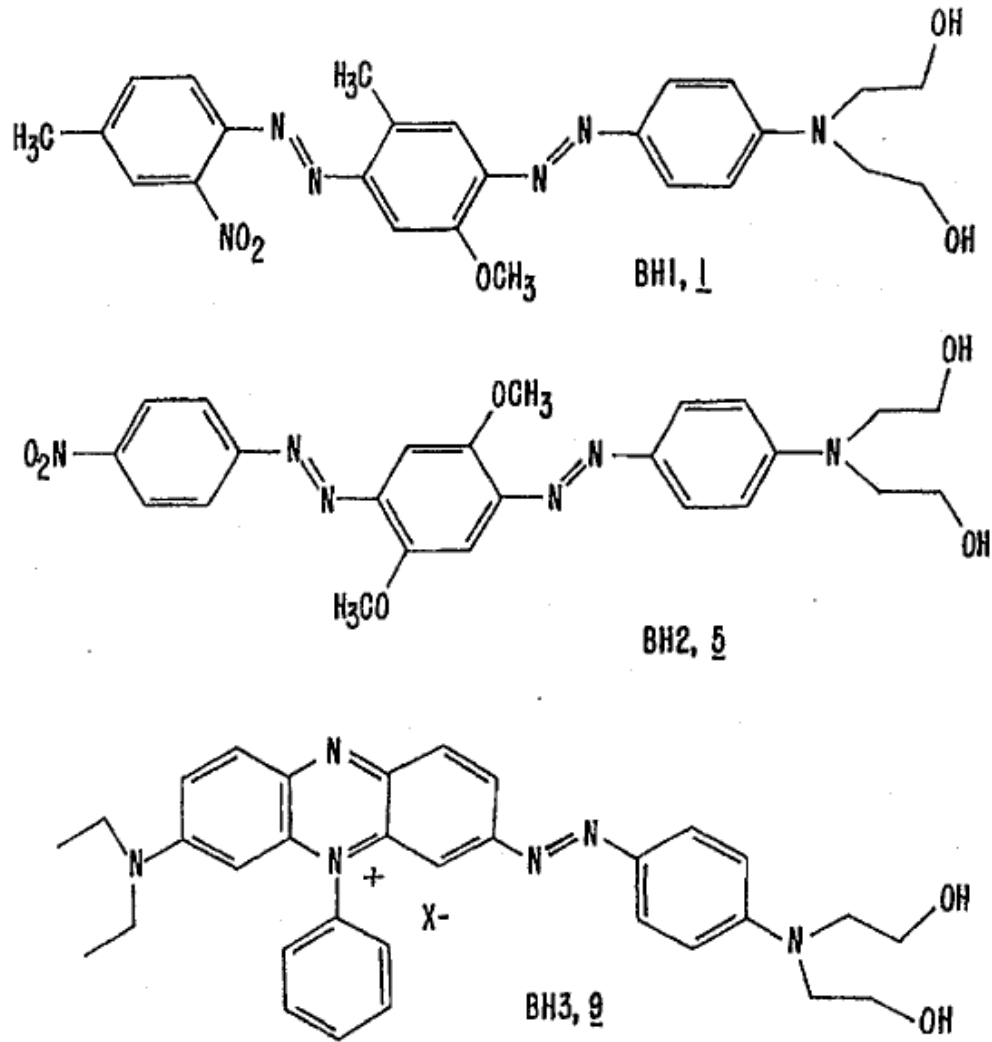


Figura 2

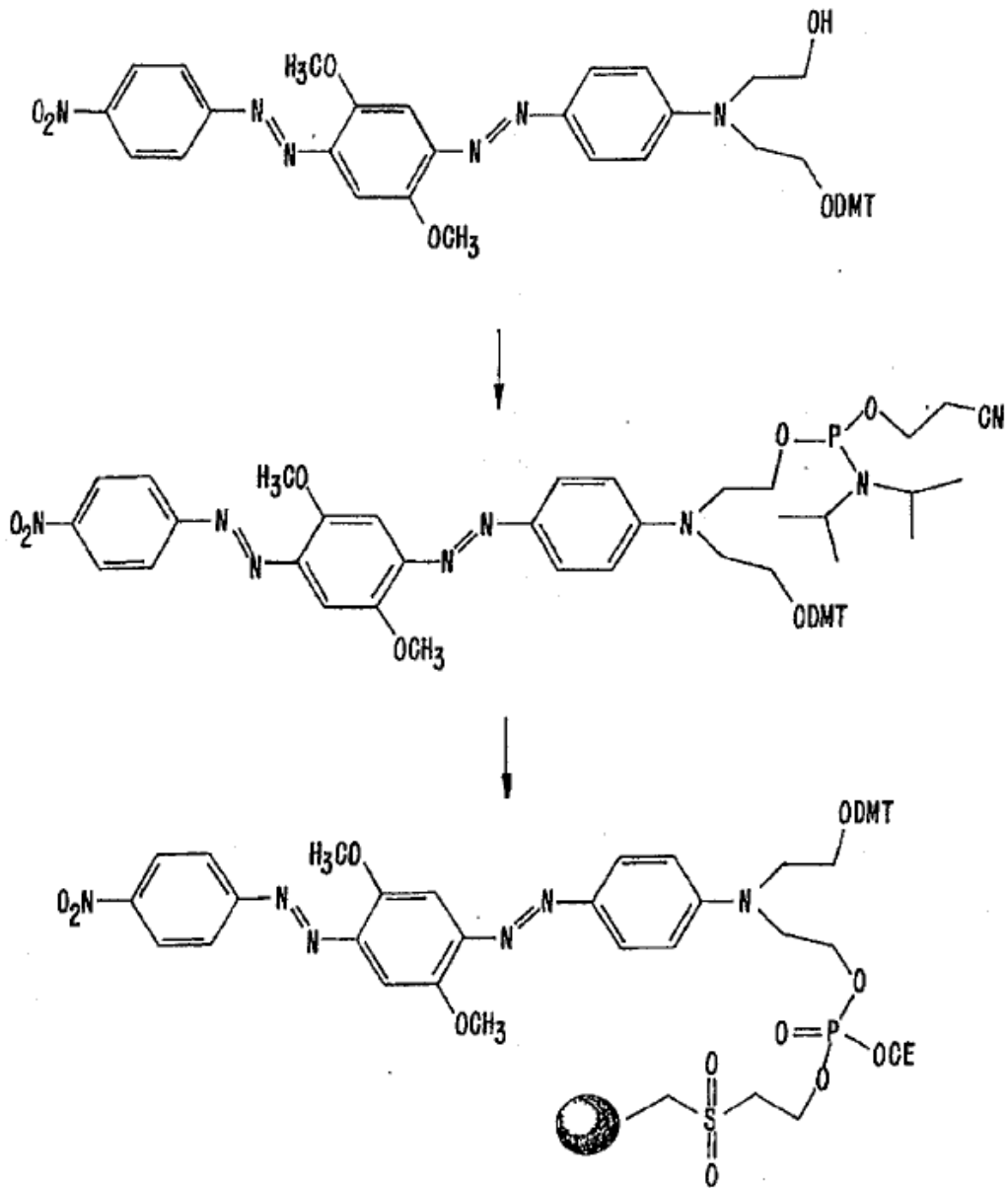


Figura 3

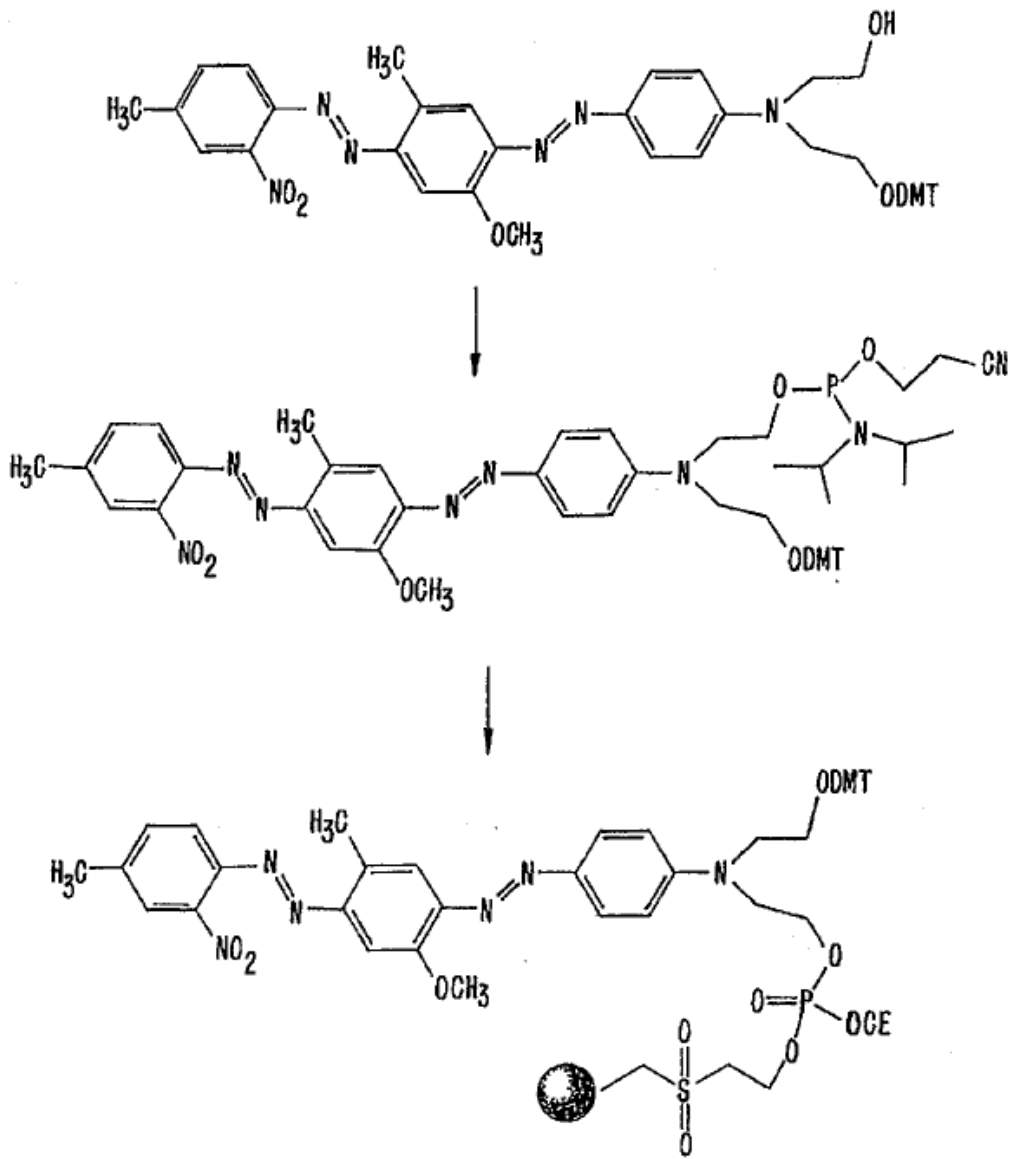


Figura 4

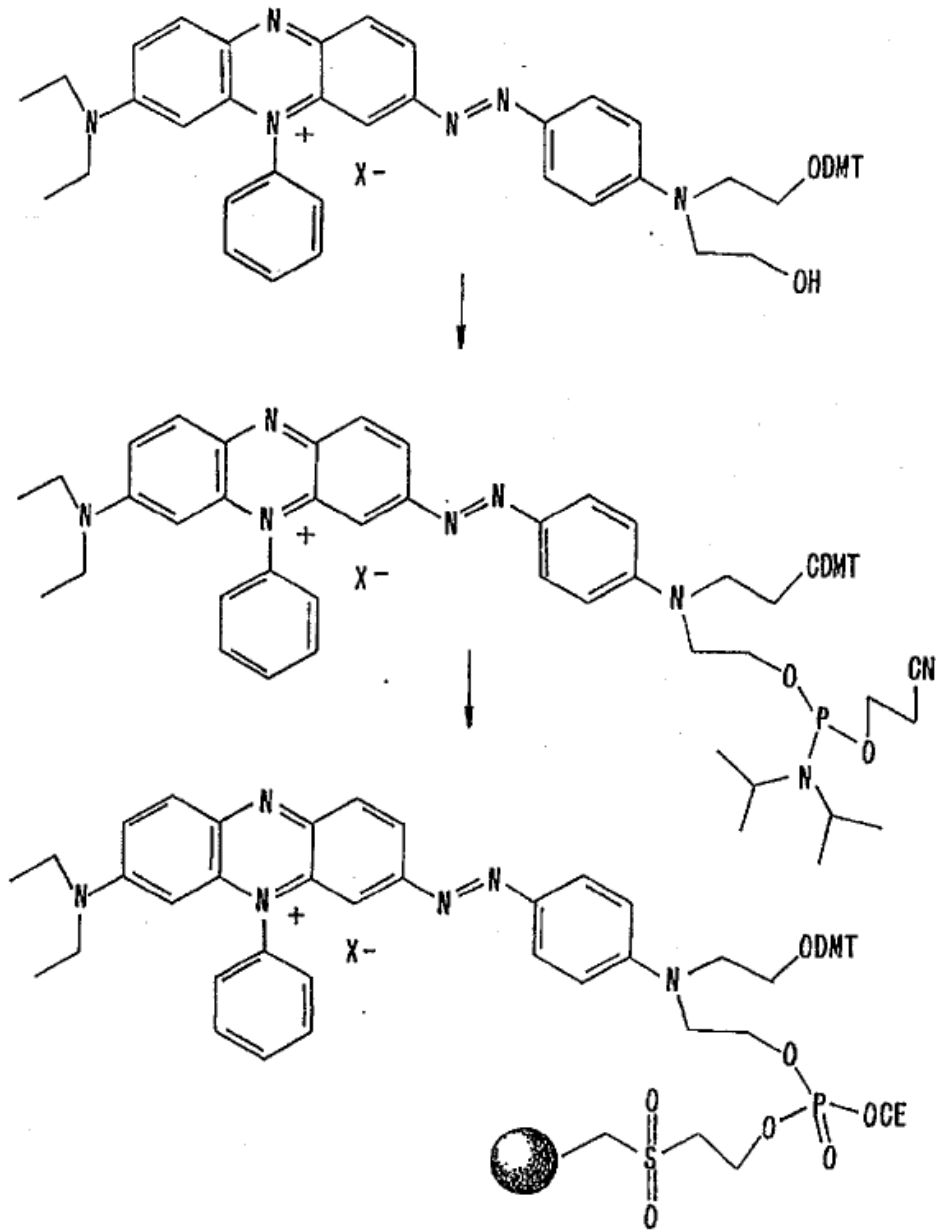


Figura 5

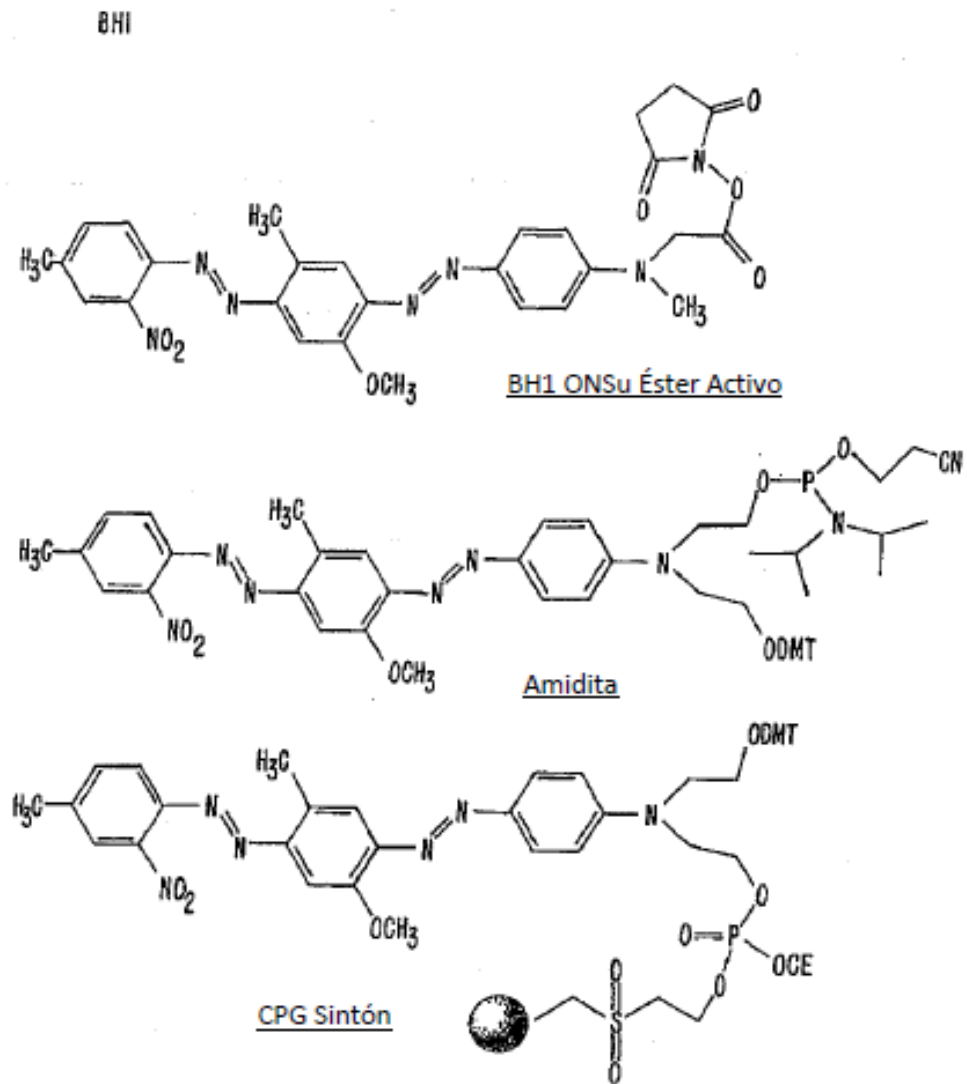


Figura 6

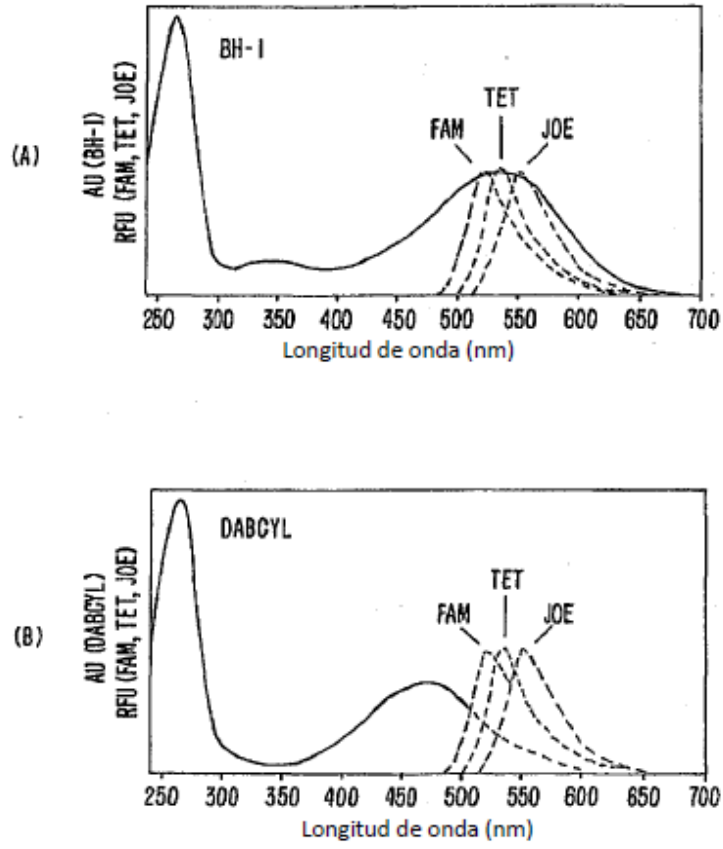


Figura 7

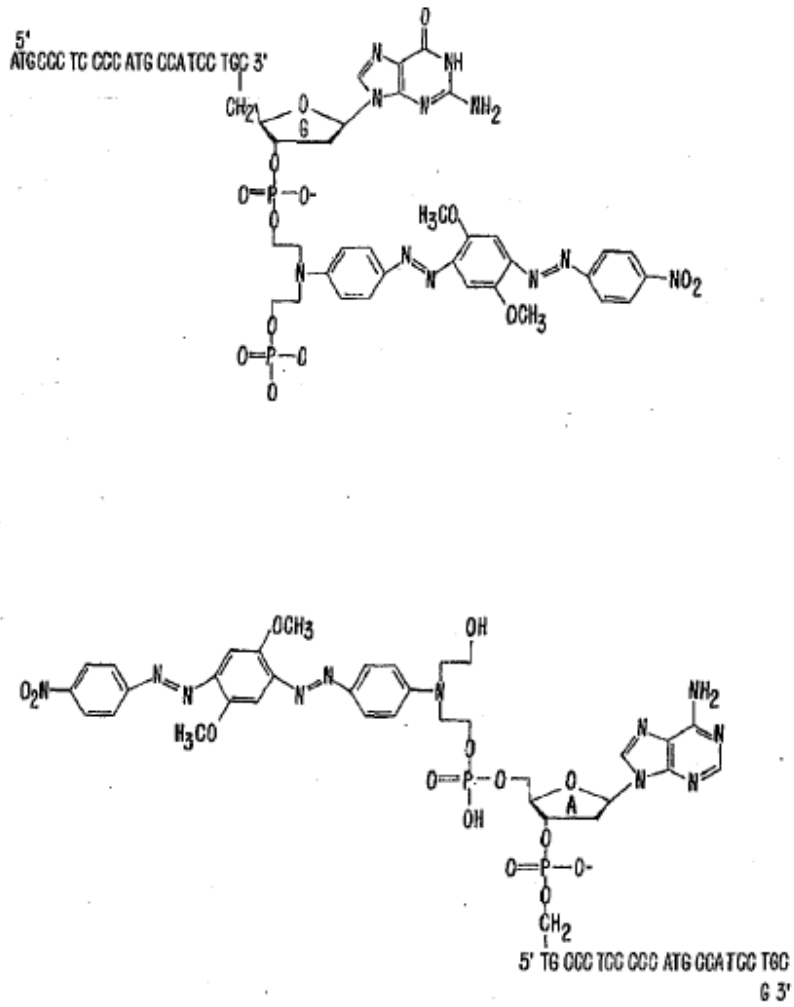


Figura 8

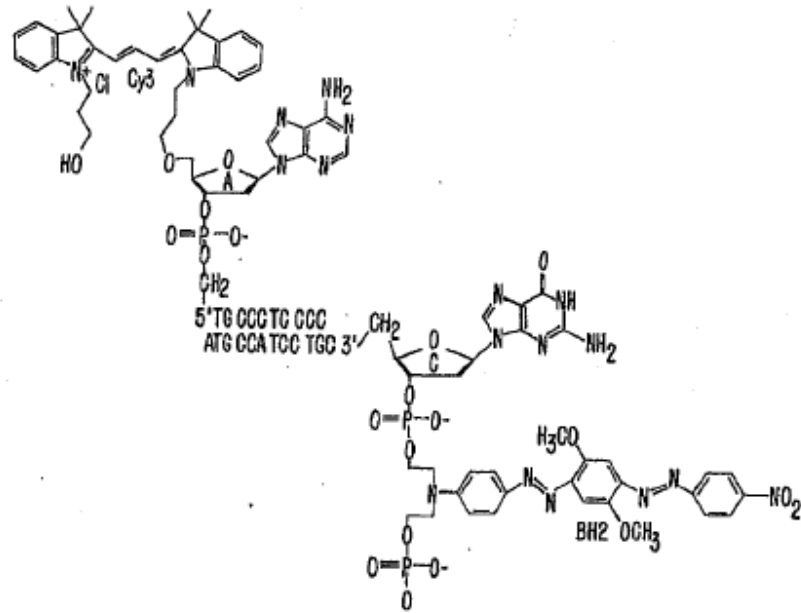


Figura 8 (continuación)