

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 940**

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 10184585 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2333113**

54 Título: **Conjugados covalentes de ácidos nucleicos con derivados de 1,4-bis-fenilazo-benceno y fenilazo-fenazina como inhibidores oscuros de la transferencia de energía del donador-aceptor para uso por ejemplo en la síntesis automatizada de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

09.05.2000 US 567863

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

07.11.2017

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:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 640 940 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

Conjugados covalentes de ácidos nucleicos con derivados de 1,4-bis-fenilazo-benceno y fenilazo-fenazina como inhibidores oscuros de la transferencia de energía del donador-aceptor para uso por ejemplo en la síntesis automatizada de ácidos nucleicos

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 preferiblemente nunca, en la naturaleza. La etiqueta debe ser estable y detectable en sistemas acuosos en periodos de tiempo en el intervalo de hasta meses. La detección de la etiqueta es preferiblemente 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 preferiblemente 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 derivados 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 y el fluoróforo, la inhibición 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 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 están atados a ácidos nucleicos. La sonda se configura de forma tal que el fluoróforo está próximo al inhibidor 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 alternativos.

Las sondas que contienen un par fluoróforo-inhibidor 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 se acerca a la molécula reportera en ausencia de una secuencia de ácidos nucleicos complementaria para prevenir la formación de la estructura de horquilla (véase, por ejemplo, documento WO 90/03446; solicitud de patente europea núm. 0 601 889 A2). Cuando está presente una

5 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 inhibidora 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.

10 También 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 (véase, 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 se aproxima a la molécula reportera.

15 Una aplicación particularmente importante para las sondas que incluyen un par de moléculas reportera-inhibidor 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 (véase, 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 (véase, 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)).

25 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.

30 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.

40 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.

45 En el ensayo TaqMan, el donador y el inhibidor se localizan preferiblemente 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 debe alcanzarse solamente cuando estas 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. Así, si el inhibidor no está suficientemente cerca del reportero para alcanzar la inhibición más eficiente las emisiones de fondo de la sonda pueden ser bastante altas.

55 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 lapatente 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, 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

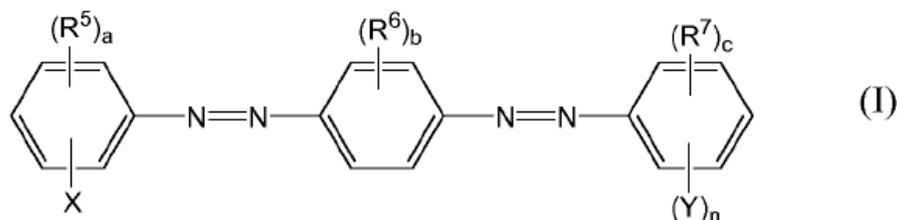
molecular, que se hibrida a una de las hebras del producto de PCR, está en "configuración abierta", y se detecta la fluorescencia, mientras aquellas que permanecen sin hibridar no van a fluorescer. Como un resultado, la cantidad de fluorescencia va a aumentar según aumenta la cantidad de producto de PCR, y así se puede usar como una medida del progreso de la PCR.

5 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, 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 que no es un fluoróforo ("inhibidores oscuros"), tales como derivados de 4-(dimetilamino)azobenceno (DABCYL). DABCYL es útil como agente inhibidor
10 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
15 uso de este inhibidor.

En vista de las limitaciones de los inhibidores oscuros y sondas disponibles actualmente, tales como sondas FET construidas con estos inhibidores, existe en la técnica una necesidad de inhibidores mejorados que se puedan incorporar en sondas para detectar analitos rápidamente, sensiblemente, fiablemente y cuantitativamente. Los inhibidores 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 que tengan propiedades físicas similares, pero
20 distintas propiedades espectrales serían particularmente ventajosas. Bastante sorprendentemente, la presente divulgación proporciona tales inhibidores, sondas que incorporan estos inhibidores y métodos para usar los inhibidores y las sondas.

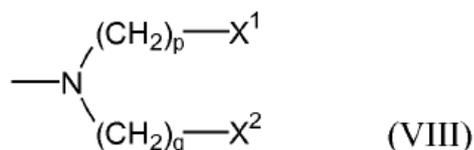
Resumen de la invención

25 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un conjugado covalente de un ácido nucleico y un inhibidor de Fórmula (I) o Fórmula (II), opcionalmente en donde el conjugado también lleva un fluoróforo que tiene una emisión que coincide con la absorbancia del inhibidor, en donde la fórmula (I) se define como:



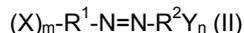
en donde

30 R^5 , R^6 y R^7 son miembros seleccionados independientemente de $-NR'R''$, arilo sustituido o no sustituido, nitro, C_1 - C_6 alquilo sustituido o no sustituido y C_1 - C_6 alcoxi sustituido o no sustituido, en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de H y C_1 - C_6 alquilo sustituido o no sustituido; X y Y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en grupos funcionales reactivos, y en donde X tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula VIII:

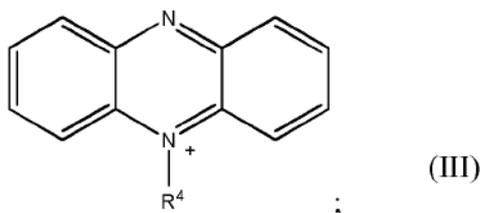


35 en donde X^1 y X^2 son miembros seleccionados independientemente de $-CH_3$, $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$, $-SH$, $-OP(OX^3)N(X^4)_2$ en donde X^3 y X^4 son miembros seleccionados independientemente de alquilo y alquilo sustituido; p y q son números seleccionados independientemente de 1 a 20, inclusive; n es un número de 0 a 1, inclusive; a es un número de 0 a 4, inclusive, de tal manera que cuando a es mayor que 1, los grupos R^5 son los mismos o diferentes;
40 b es un número de 0 a 4, inclusive, de tal manera que cuando b es mayor que 1, los grupos R^6 son los mismos o diferentes; c es un número de 0 a 5, inclusive, de tal manera que cuando c es mayor que 1, los grupos R^7 son los mismos o diferentes;

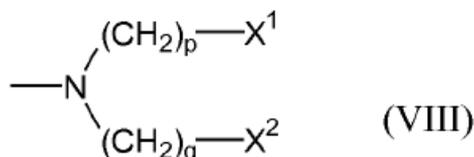
y la Fórmula (II) se define como:



en donde R¹ es una estructura de la fórmula (III):



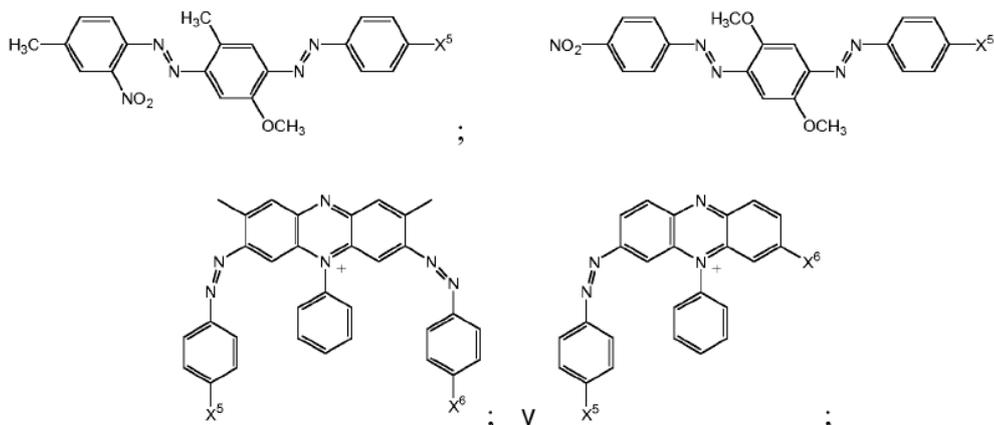
- 5 R² es arilo o arilo sustituido con un miembro seleccionado de amino, derivados amino, nitro, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alcoxi y combinaciones de los mismos; R⁴ es un miembro seleccionado de alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido; X y Y son cada uno independientemente un grupo funcional reactivo, y en donde X tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula VIII:



- 10 en donde X¹ y X² son miembros seleccionados independientemente de -CH₃, -OH, -COOH, -NH₂, -SH, -OP(OX³)N(X⁴)₂ en donde X³ y X⁴ son miembros seleccionados independientemente de alquilo y alquilo sustituido; y p y q son números seleccionados independientemente de 1 a 20, inclusive; m es un miembro seleccionado de 1 a 4, siendo los grupos X los mismos o diferentes cuando m es mayor que 1; y n es un número de 0 a 6 inclusive, siendo los grupos Y los mismos o diferentes cuando n es mayor que 1.

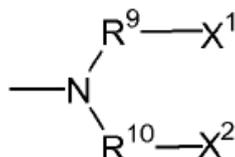
- 15 De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de una estructura (I) o (II) como se define en el primer aspecto en la síntesis automatizada de una sonda de ácido nucleico en la que el ácido nucleico está conjugado con el compuesto.

- 20 De acuerdo con un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método para llevar a cabo la síntesis automatizada de una sonda de ácido nucleico en la que el ácido nucleico está conjugado con un compuesto de la siguiente estructura:



en donde X⁵ y X⁶ son miembros seleccionados independientemente de H, C₁-C₆ alquilo sustituido o no sustituido, -OR', -COOR', -NR'R'', -SH, -OP(OX³)N(X⁴)₂, en donde R' y R'' son miembros seleccionados independientemente del

grupo que consiste en H, y alquilo o alquilo sustituido, en donde X^3 y X^4 son miembros seleccionados independientemente de CN y C_1 - C_6 alquilo sustituido y no sustituido, en donde al menos uno de X^5 y X^6 es un grupo de la fórmula:



5 en donde R^9 y R^{10} son miembros seleccionados independientemente de alquilo sustituido y no sustituido; X^1 y X^2 son miembros seleccionados independientemente de $-\text{CH}_3$, $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$, y $-\text{OP}(\text{OX}^3)\text{N}(\text{X}^4)_2$; donde X^3 y X^4 son miembros seleccionados independientemente de alquilo sustituido y no sustituido; opcionalmente en donde X^3 es cianoetilo y X^4 es isopropilo.

10 De acuerdo con un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un sintetizador automatizado de ácidos nucleicos cuando opera para sintetizar una sonda de ácido nucleico en la que el ácido nucleico está conjugado con un compuesto que tiene una estructura definida en cualquiera de los aspectos anteriores y en donde dicho compuesto y un fluoróforo se introducen ambos durante la síntesis automatizada o dicho compuesto se introduce antes de que comience el procedimiento de síntesis automatizada.

15 La presente divulgación proporciona una familia de inhibidores de energía de estado de excitación que son sustancialmente no-fluorescentes, denominados "inhibidores del Agujero Negro" ("BHQs"). Los inhibidores de la divulgación remedian muchas de las deficiencias de los inhibidores oscuros usados actualmente, sondas ensambladas por medio del uso de estos inhibidores y métodos que usan tales inhibidores y sondas. La presente divulgación proporciona una clase de inhibidores 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 divulgación proporciona una clase de inhibidores oscuros que pueden modificarse para tener un perfil de absorción de la luz deseado. La provisión de esta clase de inhibidores oscuros representa una mejora sustancial en el diseño de sondas que incorporan inhibidores oscuros y métodos que usan tales sondas.

25 Muchas de las sondas de ácidos nucleicos que se usan actualmente dependen de la interacción entre el fluoróforo y el inhibidor 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 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 divulgación se encuentra que facilitan la interacción entre el inhibidor 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.

35 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 divulgación se pueden seleccionar para tener un amplio intervalo de absorbancia máxima, estos inhibidores 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.

Objetos y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción detallada que sigue.

Breve descripción de las figuras

45 La Fig. 1 es un esquema sintético ilustrativo para la preparación de un BHQ de la divulgación.

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

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.

5 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 divulgación:

(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;

10 (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 de ejemplo de la divulgación.

Descripción detallada de la invención y realizaciones preferidas

Abreviaturas

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

15 "FET," 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 subsumen bajo el término general "transferencia de energía donador-aceptor".

20

Definiciones

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 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 (véase *generalmente*, Sambrook y otros MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), 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.

25

30

35 "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., sin limitación.

40 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. Si el grupo modificador de energía del estado de excitación es un grupo inhibidor, 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 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.

45

50 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 la invención. No hay limitación en la identidad de los miembros individuales del par de transferencia de energía en esta solicitud. 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 complejos pueden incluir, dos grupos fluorescentes, que pueden ser diferentes uno del otro y un grupo inhibidor, o múltiples grupos fluorescentes y múltiples grupos inhibidores. En los casos donde hay múltiples grupos fluorescentes y/o múltiples grupos inhibidores, los grupos individuales pueden ser diferentes unos de otros.

Como se usa en la presente descripción, "grupo modificador de la fluorescencia" se refiere a una molécula 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, pero sin limitación, la atenuación, la inhibición 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.

Como se usa en la presente descripción, "grupo inhibidor" se refiere a cualquier grupo modificador de la fluorescencia 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". Por lo tanto, la iluminación del grupo fluorescente en presencia del grupo inhibidor lleva a una señal de emisión que es menos intensa que la esperada, o incluso completamente ausente. La inhibición típicamente ocurre por la transferencia de energía entre el grupo fluorescente y el grupo inhibidor.

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, pero no se limitan a, 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, pero no se limitan a, 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 aminoácidos son α -aminoácidos, 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, véase, 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 preferiblemente, 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.

- 5 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".
- 10 "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".
- 15 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 aquilo 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 "hidroxilo" se usa en la presente descripción para referirse al grupo $-OH$.
- 20 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 $RC(O)NR'$.
- 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.*
- 25 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.*
- 30 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."
- Como se usa en la presente descripción, el término "mercapto" define porciones de la estructura general $-SR$ en donde R es H, alquilo, arilo o heterocíclico como se describe en la presente descripción.
- 35 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.
- 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.
- 40 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."
- 45 "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.

"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), hidroxilo, 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."

"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.*

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), hidroxilo, 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.

Introducción

La presente divulgación proporciona una clase de modificadores de fluorescencia, particularmente inhibidores, de energía de estado de excitación. Los compuestos de la divulgación 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 la divulgación 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 un ordenador) 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)), Peridina-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.

Los compuestos, sondas y métodos discutidos en las siguientes secciones son generalmente representativos de las composiciones de la divulgación y los métodos en los que se pueden usar tales composiciones. La siguiente discusión pretende ser ilustrativa de aspectos y realizaciones seleccionadas de la presente invención y no debe interpretarse como limitativa del alcance de la presente invención.

Inhibidores del agujero negro

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

Aunque los inhibidores se pueden usar en su forma libre no unida, generalmente se prefiere que estén atados a otra especie, por lo tanto, los inhibidores preferidos comprenden además un grupo funcional reactivo que proporciona un locus para la conjugación del inhibidor a una molécula portadora.

En otra realización preferida, los BHQ de la divulgación descrita aquí no tienen sustancialmente ninguna fluorescencia nativa, particularmente cerca de sus máximos de absorbancia o cerca de los máximos de absorbancia de fluoróforos usados junto con los BHQ. Los BHQ tendrán preferiblemente un máximo de absorbancia de aproximadamente 400 nm a aproximadamente 760 nm, y más preferiblemente, de aproximadamente 500 nm a aproximadamente 600 nm.

La siguiente discusión es generalmente relevante para la identidad de los grupos reactivos de los compuestos de la divulgación y es particularmente relevante para los grupos X^1 y X^2 en cada uno de los aspectos descritos anteriormente de la invención.

En una realización preferida, X^3 es cianoetilo; y X^4 es isopropilo.

En una realización preferida adicional, p y q son números seleccionados independientemente de 2 a 16, inclusive.

Los compuestos de la divulgación se pueden preparar como un isómero individual o una mezcla de isómeros, incluyendo, por ejemplo, isómeros cis, isómeros trans, diastereómeros y estereoisómeros. En una realización preferida, los compuestos son preparados como sustancialmente un solo isómero. Los compuestos isoméricamente puros se preparan usando intermediarios sintéticos que son isoméricamente puros en combinación con reacciones que dejan la estereoquímica en un centro quiral sin cambios o dan como resultado su inversión completa. Alternativamente, el producto final o los intermediarios a lo largo de la ruta sintética se pueden resolver en un solo isómero. Las técnicas para invertir o dejar inalterado un estereocentro particular y aquellas para la resolución de mezclas de estereoisómeros son bien conocidas en la técnica y está dentro de la capacidad de un experto en la técnica para elegir una resolución apropiada o método sintético para una situación particular. Véase, en general, Furniss et al. (eds.), VOGEL'S ENCYCLOPEDIA OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY 5TH ED., Longman Scientific and Technical Ltd., Essex, 1991, pp. 809-816; and Heller, Acc. Chem. Res. 23: 128 (1990)

Grupos funcionales reactivos

Los compuestos de la divulgación contienen un grupo funcional reactivo, que puede estar situado en cualquier posición en un núcleo de arilo o en una cadena, tal como una cadena de alquilo, unida a un núcleo de arilo. Cuando el grupo reactivo está unido a una cadena alquilo o alquilo sustituida unida a un núcleo arilo, el grupo reactivo está preferiblemente situado en una posición terminal de una cadena alquilo. Los grupos reactivos y clases de reacciones útiles en la práctica de la presente invención son generalmente aquellos que se conocen 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 pero no se limitan a 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) grupos carboxilo; y diversos derivados de los mismos que incluyen, pero sin limitarse a, ésteres de N-hidroxisuccinimida, ésteres de N-hidroxibenzotriazol, haluros de ácido, imidazoles de acilo, tioésteres, ésteres de p-nitrofenilo, ésteres de alquilo, alquenilo, alquinilo y aromáticos;

(b) grupos hidroxilo, que pueden convertirse a ésteres, éteres, aldehídos, etc.

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

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

(e) grupos aldehído o cetona, de tal manera que la subsecuente derivación es posible mediante la formación de derivados de carbonilo tales como, por ejemplo, iminas, hidrazonas, semicarbazonas u oximas, o a través de mecanismos tales como adición de Grignard o adición de alquil-litio;

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

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

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

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

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

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

5 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, véase, por ejemplo, Greene y otros, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, John Wiley & Sons, Nueva York, 1991.

10 Porciones donadoras y receptoras.

Una de las ventajas de los compuestos de la divulgación 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. Véase, 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 no limitante de donadores de ejemplo que se pueden usar en conjunto con los inhibidores de la divulgación se proporciona en la Tabla 1.

20

TABLA 1

Porciones adecuadas que se pueden seleccionar como donadores o aceptores en pares de transferencia de energía donador-aceptor
ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbena-2,2'-disulfónico
acridina y derivados:
acridina
acridina isotiocianato
ácido 5-(2'-aminoetilo)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS)
4-amino-N-[3-vinilsulfonil]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)

ES 2 640 940 T3

Porciones adecuadas que se pueden seleccionar como donadores o aceptores en pares de transferencia de energía donador-aceptor
7-amino-4-trifluorometilcoumarina (Coumaran 151)
colorantes de cianina
cianosina
4',6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI)
5', 5"-dibromopirogalol-sulfonaftalina (Bromopirogalol Rojo)
7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcoumarina
pentaacetato de dietilentriamina
ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico
ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico
cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonilo (DNS, dansilcloruro)
ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL)
4-dimetilaminofenilazofenil-4'-isotiocianato (DABITC)
eosina y derivados:
eosina
eosina isotiocianato
eritrosina y derivados:
eritrosina B
eritrosina isotiocianato
etidio
fluoresceína y derivados:
5-carboxifluoresceína (FAM)
5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF)
2',7'-dimetoxi-4'5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE)
fluoresceína

ES 2 640 940 T3

Porciones adecuadas que se pueden seleccionar como donadores o aceptores en pares de transferencia de energía donador-aceptor
fluoresceína isotiocianato
QFITC (XRITC)
fluorescamina
IR144
IR1446
verde malaquita isotiocianato
4-metilumbeliferona
orto cresoltaleína
nitrotirosina
pararosanilina
Rojo de fenol
B-ficoeritrina
o-ftaldialdehído
pireno y derivados:
pireno
pireno butirato
succinimidil 1-pireno butirato
puntos cuántum
Rojo reactivo 4 (Cibacron™ Rojo brillante 3B-A)
rodamina y derivados:
6-carboxi-X-rodamina (ROX)
6-carboxi-rodamina (R6G)
lisamina rodamina B sulfonil cloruro rodamina (rod)
rodamina B

Porciones adecuadas que se pueden seleccionar como donadores o aceptores en pares de transferencia de energía donador-aceptor
rodamina 123
rodamina X isotiocianato
sulforodamina B
sulforodamina 101
derivado sulfonil cloruro de sulforodamina 101 (Texas Rojo)
N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA)
tetrametil rodamina
tetrametil rodamina isotiocianato (TRITC)
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 (véase, 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 derivar las moléculas reportera e inhibidora 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 (aceptor) de la divulgación se seleccionan preferiblemente 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 es la eficiencia de la transferencia de energía donador-aceptor entre ellos. Preferiblemente, 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 acepto de dimerizar o asociarse estrechamente. Si las porciones donador y acepto 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 realización, 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 fosfatasa, 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, véase 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. El enfoque en las sondas de ácido nucleico no pretende limitar el alcance de las moléculas sondas a las que se pueden unir los BHQ. 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 realización 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 preferiblemente 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 preferiblemente por medio del uso de una 6-FAM amidita. Grupos donadores diferentes se introducen además preferiblemente por medio del uso de un derivado de amidita 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 realización preferida, la porción donadora puede unirse al 3'-terminal de un ácido nucleico por el uso de un soporte sintético derivado. 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 deriva 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 derivados con una porción fosforamidita (*véase*, 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 vía 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); Sprout y otros, Nucleic Acids Research, 15: 4837 (1987) (grupo 5-mercapto); 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 divulgación se sintetizan por una combinación adecuada de métodos sintéticos generalmente bien-conocidos. Las técnicas útiles para sintetizar los compuestos de la divulgación 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 divulgación, no se pretende que definan el alcance de las reacciones o secuencias de reacciones que son útiles para preparar los compuestos de la presente divulgación.

Un método de sintetizar los compuestos de la divulgación se expone en el Esquema 1 (Fig. 1). El esquema 1 es un esquemático generalizado de un esquema sintético útil con los BHQs de la divulgación. Un derivado azido de un colorante se acopla a un derivado arilo 1, a pH 9, que forma el aducto diazo 2 correspondiente. 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 un material 5 de partida adecuado, para la síntesis de un arreglo de ácidos nucleicos que se derivan en la posición 3' con un BHQ.

Los esquemas sintéticos recitados anteriormente se pretenden que sean de ejemplo de una realización de la divulgación, 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 divulgación, tales como aquellos que se exponen en la Fig. 2. La Fig. 2 proporciona las estructuras de tres BHQs de ejemplo, 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 deBH3, 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 realización 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. Esta discusión pretende ilustrar la invención haciendo referencia a ciertas realizaciones preferidas y no debe interpretarse como limitativa del alcance de sondas y tipos de ensayo en los que los compuestos de la invención encuentran uso. Otros formatos de ensayo que usan los compuestos de la divulgación resultarán evidentes a los expertos en la técnica.

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.

10 Análisis Multiplex

En otra realización preferida, los inhibidores de la divulgación son utilizados como un componente de una o más sondas usadas en el ensayo multiplex para detectar una o más especies en una mezcla.

Las sondas que incluyen los BHQ de la divulgación 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 es eficiente.

La divulgación proporciona una mezcla que comprende al menos una primera molécula portadora y una segunda molécula portadora. La primera molécula portadora ha unido covalentemente a los mismos un primer inhibidor de energía en estado excitado que tiene una estructura que comprende al menos tres radicales seleccionados de arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido y combinaciones de los mismos. Al menos dos de los radicales están unidos covalentemente a través de un enlace diazo exocíclico. La mezcla también incluye una segunda molécula portadora. La segunda molécula portadora se ha unido covalentemente con un segundo inhibidor de energía en estado excitado que tiene una estructura que comprende al menos tres radicales seleccionados de arilo, arilo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido y combinaciones de los mismos, en donde al menos dos de los radicales están unidos covalentemente a través de un enlace diazo exocíclico.

Los BHQs de la divulgación permiten el diseño de ensayos multiplex en los que se usa más de una estructura inhibidora en el ensayo. Un número de ensayos multiplex diferentes que usan los BHQs de la divulgación resultarán evidentes a los expertos en la técnica. En un ensayo ilustrativo, cada uno de los al menos dos inhibidores de 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.

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.

Debido a la fácil disponibilidad de BHQs de la divulgación que tienen diferentes características de absorbancia, los compuestos de la divulgación son particularmente adecuados para usar en aplicaciones multiplex. El acceso a BHQs que tienen una variedad de características 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 (véase, 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.

- 5 Los inhibidores de la presente divulgación 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

- 10 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*.

- 15 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
20 moléculas 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.

- 25 Aún, otra propiedad inesperada de los BHQs de la divulgación 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 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.

- 30 Sondas de moléculas pequeñas

- Los BHQs de la divulgación 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 realización de ejemplo, 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 (véase, por ejemplo, Zlokarnik y otros, Science
35 279: 84-88 (1998)).

Sondas de ácidos nucleicos

- Los inhibidores oscuros de la divulgación 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 derivados 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™. Véase, 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 Rsch., 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).

La divulgación proporciona un método para detectar una secuencia objetivo de ácidos nucleicos. El método incluye: (a) poner en contacto la secuencia objetivo con un ácido nucleico detector; (b) hibridar la secuencia de unión objetivo con la secuencia objetivo, alterando de este modo la conformación del ácido nucleico detector, provocando un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (c) detectar el cambio en el parámetro de fluorescencia, detectando de este modo la secuencia objetivo de ácidos nucleicos.

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 divulgación. Además, antes de su hibridación a una secuencia complementaria, el ácido nucleico detector está preferiblemente 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 preferiblemente 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 preferiblemente 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 divulgación 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 de detector forma una cola de cadena sencilla que está disponible para la hibridación con la secuencia objetivo; (b) extender el ácido nucleico detector hibridado sobre la secuencia objetivo con una polimerasa para producir un producto de extensión de ácido nucleico detector y separar el producto de extensión de ácido nucleico detector de la secuencia objetivo; (c) hibridar un cebador con el producto de extensión de ácido nucleico detector y extender el cebador con la polimerasa, linealizando de este modo la estructura secundaria asociada intramolecularmente y produciendo un cambio en un parámetro de fluorescencia; y (d) detectar el cambio en el parámetro de fluorescencia, detectando de este modo la secuencia objetivo.

En un aspecto aún adicional, la divulgación 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 divulgación. 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 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 oscuros se pueden usar en prácticamente cualquier formato de sonda de ácidos nucleicos conocido ahora o descubierto más tarde. Por ejemplo, los inhibidores 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 se revisan en *NONISOTOPIC DNA PROBE TECHNIQUES*, Academic Press, Inc. 1992.

5 Los ácidos nucleicos que se usan en las sondas de la invención pueden ser de cualquier tamaño adecuado, y están preferiblemente 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 realización particular. Las orientaciones para hacer tales elecciones de diseño se pueden encontrar en muchas referencias reconocidas en la técnica.

15 Preferiblemente, 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.

20 Los ácidos nucleicos pueden comprender ADN, ARN o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de estos. Ambos la sonda y el ácido 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/oceptoras y similares.

25 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-(carboxihidroximetil) 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'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N⁶-isopenteniladenina, uracil-5-ácido oxiacético (v), wibutosina, 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.

30 En otra realización, 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.

35 Aún en otra realización, 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 fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un alquil fosfotriéster, y un formacetal o análogo de estos.

40 Los ácidos nucleicos de la divulgación enlazados a fosfodiéster de la invención 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 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.

45 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 de químicas estándar, tales como química de fosforamidita (véase, *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.

55 Cuando los ácidos nucleicos se sintetizan por medio del uso de un sintetizador automático de ácidos nucleicos, las porciones donadora y aceptora se introducen preferiblemente 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 realización ilustrativa, uno o más de los grupos donador y/o aceptor se introduce después de que la síntesis automática está completa.

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

Una vez que se sintetiza el ácido nucleico deseado, se escinde preferiblemente 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 realizaciones en que un grupo sensible a base se une al ácido nucleico (*por ejemplo*, TAMRA), la desprotección usará preferiblemente 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).

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 realización preferida, los ácidos nucleicos se purifican por medio del uso de HPLC. La concentración y pureza de los ácidos nucleicos aislados se determina preferiblemente por la medición de la densidad óptica a 260 nm en un espectrofotómetro.

Sondas de péptidos

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

La divulgación 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 la enzima en la muestra da como resultado un cambio en la propiedad de fluorescencia.

Los constructos peptídicos útiles en la práctica de la invención incluyen aquellos con las siguientes características: i) un fluoróforo; ii) un BHQ de la invención y iii) un sitio de reconocimiento de escisión o ensamblaje para la enzima. Además, el constructo peptídico es preferiblemente de una longitud y orientación y en una configuración que permite la transferencia de energía donador-aceptor entre el fluoróforo y el BHQ cuando el fluoróforo se excita.

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 aceptor, la relación de la cantidad de fluorescencia de la porción donadora a la cantidad de fluorescencia de la porción aceptor o la duración del estado de excitación de la porción donadora.

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.

Los métodos de ensayo también pueden usarse también para determinar si un compuesto altera la actividad de una enzima, es decir, ensayos de selección. La divulgación proporciona métodos para determinar la cantidad de actividad de una enzima en una muestra de un organismo. El método incluye: (a) poner en contacto una muestra que comprende la enzima y el compuesto con un constructo peptídico que comprende (b) excitar el fluoróforo; y (c) determinar una propiedad de fluorescencia de la muestra, en donde la actividad de la enzima en la muestra da como resultado un cambio en la propiedad de fluorescencia. Los constructos peptídicos útiles en este aspecto de la invención son sustancialmente similares a los descritos inmediatamente antes.

En una realización 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.

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, asemblina de citomegalovirus, leishmanolisina, β -secretasa para proteína precursora amiloide, trombina, renina, enzima de conversión de angiotensina, catepsina-D y una quininogenasa, y proteasas en general.

5 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
10 producidos por química combinatoria requiere ensayos enzimáticos convenientes.

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

Los ensayos de la divulgación son además útiles para determinar y caracterizar secuencias de escisión del sustrato de proteasas o para identificar proteasas, tales como proteasas huérfanas. En una realización el método involucra la sustitución de una secuencia de amino ácidos de la porción enlazadora definida con una que contiene una selección
20 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
25 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
30 o la duración del estado de excitación de la porción donadora.

En los constructos en tándem de la invención, las porciones donadora y aceptora se conectan mediante una porción enlazadora. La porción enlazadora, preferiblemente, incluye una porción peptídica, pero puede ser o puede incluir otra porción molecular orgánica, también. En una realización 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
35 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 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.
40

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
45 escisión se pueden incluir en la porción enlazadora. Véase, 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).

50 Análogos de BHQ inmovilizados en un soporte sólido.

Los BHQs de la divulgación 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, pero no se limitan a, vidrio de poro controlado, placas de vidrio, poliestireno, perlas de poliestireno recubiertas de avidina, celulosa, náilon, gel de acrilamida y dextrano activado. Estos soportes sólidos se prefieren debido a su estabilidad química, facilidad de funcionamiento y área de superficie bien definida. Los soportes sólidos tales como, vidrio de poro controlado (CPG, 500 Å, 1000 Å) y poliestireno altamente reticulado no-hinchado (1000 Å) se prefieren particularmente.
55

De acuerdo con la presente invención, la superficie de un soporte sólido es funcionalizado con un inhibidor de la divulgación o una especie que incluye un inhibidor de la divulgación. 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.

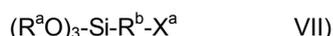
Los BHQs se unen preferiblemente a un soporte sólido por la formación de un enlace entre un grupo reactivo en el BHQ y un grupo reactivo sobre la superficie del soporte sólido o un enlazador unido al soporte sólido, de ese modo derivar el soporte sólido con uno o más análogos de BHQ. El enlace entre el soporte sólido y el BHQ es preferiblemente 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 carboxílicos, derivados de ácidos carboxílico, alquenos, sulfidrilos, siloxanos, etc.

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.

Además, para aplicaciones en las que un soporte sólido adecuado no está comercialmente disponible, una amplia variedad de tipos de reacciones está disponible para funcionalizar la superficie de un soporte sólido. Por ejemplo, los soportes construidos de un plástico tales como polipropileno, se puede derivar 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 derivar por la superficie por clorometilación y manipulación subsecuente del grupo funcional. Además, los sustratos funcionalizados de pueden fabricar a partir de poliuretano grabado, reducido.

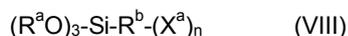
Cuando el soporte se construye de un material silíceo tal como el vidrio, la superficie se puede derivar al hacer reaccionar los grupos Si-OH, SiO-H, y/o Si-Si de la superficie con un reactivo funcionalizante

En una realización preferida, en donde los sustratos se fabrican de vidrio, el enlazamiento covalente del grupo reactivo a la superficie del vidrio se puede lograr 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.

En otra realización 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:

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

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 → aminopropilo

4. Aminoalquil siloxanos diméricos secundarios

a. bis (3-trimetoxisililpropil) amina → bis(sililoxilpropil)amina.

5 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.

10 Los grupos R de uso por R^b en las realizaciones descritas más arriba de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, 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.

15 Sondas de captura de ácidos nucleicos

En una realización, 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.

En aún otra realización 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 preferiblemente 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.

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.

Una amplia variedad de enlazadores se conoce 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 polietilén glicol 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.

Los enlaces entre el soporte sólido, el enlazador y la sonda preferiblemente 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.

Sondas inmovilizadas en acrilamida.

50 En otra realización preferida, una especie está dentro de una matriz, tal como una matriz de acrilamida y la especie contiene un BHQ, o es comprobada la presencia de la especie inmovilizada por medio del uso de una sonda que contiene un BHQ. En una realización preferida, la inmovilización se logra en conjunto con el proceso "Acrydite" inventado y comercializado por Mosaic Technologies (Cambridge, MA, véase, 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 poliacrilamina 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 realización, las sondas que contiene 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.

Microarreglos

La divulgación proporciona microarreglos que incluyen BHQs y compuestos inmovilizados (*por ejemplo*, péptidos, ácidos nucleicos, agentes bioactivos, *etc.*) funcionalizado con BHQs. Además, la divulgación 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, véase, 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. Este enfoque pretende ser ilustrativo y no limita el alcance de los materiales con los que se puede practicar este aspecto de la presente invención.

En otra realización preferida, los compuestos de la presente divulgación 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.

Así, en una realización 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 BHQ e interrogar al microarreglo por regiones de fluorescencia. En una realización de ejemplo, las regiones fluorescentes son indicativas de la presencia de una interacción entre la sonda que contiene BHQ 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 el BHQ, lo que indica nuevamente la presencia de una interacción entre la sonda que contiene BHQ y un componente del microarreglo.

En otra realización preferida, el arreglo comprende sondas de transferencia de energía donador-aceptor que contienen BHQ inmovilizadas como las especies que se van a interrogar. En esta realización, 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 que contienen BHQ son herramientas valiosas para análisis de expresión y tamizaje genómico clínico.

En otra realización preferida, la sonda que contiene BHQ inmovilizado 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 del analito a partir de la interacción entre la sonda y el analito.

En una realización 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 realización 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 realización 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.

En aún otra realización preferida, la invención también 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 está actualmente disponible para fabricar arreglos de macromoléculas biológicas, tales como arreglos de moléculas de ácidos nucleicos. La siguiente discusión se enfoca en el ensamblaje de un microarreglos de sondas que contienen BHQ, este enfoque es por razones de brevedad y pretende ser ilustrativo y no limitativo.

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 cocción 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.

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. Véase, 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).

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 preferiblemente 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)).

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 poli(acrilamida). El punteo se hace manualmente con una micropipeta.

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.

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. Véase, 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 µm. Véase, 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.

En una realización actualmente preferida, 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 realización 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 realización, 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. Véase, por ejemplo, Kleinfield 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. Véase, Mrkish y otros Ann. Rev. Biophys. Biomol. 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 realización preferida, que usa soportes sólidos el constructo inmovilizado incluye un espaciador entre el grupo reactivo del soporte sólido y el análogo de BHQ. El enlazador es preferiblemente 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 realizaciones, 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.

5 En una realización 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.

10 En aún una realización preferida, un grupo espaciador usado 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. Véase, 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);
15 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.

20 Una realización de ejemplo 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.

25 Kits

La divulgación también proporciona kits que contienen uno o más de los BHQs o composiciones que contienen BHQ de la divulgación. En una realización, un kit incluirá un reactivo derivado de BHQ y orientaciones para unir este derivado a otra molécula. En otra realización, 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.
30 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. Estos ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada

Ejemplos

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

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

40 El Ejemplo 4 expone la incorporación de inhibidores de ejemplo de la invención en sondas de transferencia de energía donador-aceptor basadas en ácidos nucleicos. La eficiencia de la inhibición de los BHQs en las sondas se ensaya y compara a la del inhibidor 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-nitrobenzilazo-2'-metil-5'-nitrobenzilazo-4"-N,N-di(2-hidroxietil) azobenceno, (BHI diol), 6

45 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,
50 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-nitrobencilazo-2'-metil-5'-nitrobencilazo-4"-N,N-(2-hidroxietil)-(2-O-(4,4'dimetoxitritil)etilazobenceno (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-nitrobencilazo-2'-metil-5'-nitrobencilazo-4"-N,N-(2-O-(N',N'-diisopropil-2-cianoetilfosfito)etil)-(2-O-4,4dimetoxitritil)-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-corrída, 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-nitrobencilazo-2',5'-dimetoxibencilazo-4"-N,N-di (2-hidroxietil) 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 saturado 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-nitrobencilazo-2',5'-dimetoxibencilazo-4"-N,N-(2-hidroxi-etil)-(2-O-(4,4'dimetoxitritil)etilazobenceno 1, (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).

5

2.3 Síntesis de 4-nitrobencilazo-2',5'-dimetoxibencilazo-4"-N,N-(2-O-(N',N',-diisopropil-2-cianoetilfosfito) etil)-(2-O-(4,4'dimetoxi-tritil)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).

15

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.

20

25

30

Ejemplo 3

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

3.1 Síntesis de cloruro de 3-dietilamino-5-fenilfenazío-7-(4'-N,N-di(2-hidroxi)etil) 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).

35

40

3.2 Síntesis de cloruro de 3-dietilamino-5-fenilfenazío-7-(4'-N,N-(2-hidroxi)etil)-(2-O-(4,4'dimetoxitritil)etil)azobenceno (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)

45

50

3.3 Síntesis de cloruro de 3-dietilamino-5-fenilfenazío-7-(4'-N,N-(2-O-(N',N'-diisopropil-2-cianoetilfosfito)etil)-(2-O-(4,4'dimetoxitritil)etil)azobenceno, (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-corrida, 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).

10 Síntesis de BH3-CPG, 17

2 g de vidrio de poro controlado DMT-2,2'-sulfonilidietanol-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 CH₂Cl₂. El material se secó durante la noche bajo alto vacío. La determinación de la carga de DMT en el material seco fue 12 µM/g.

Ejemplo 4

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

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) (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 si mismo en un aumento de la intensidad de fluorescencia del reportero.

35 4.1 Síntesis y Caracterización de sondas BHQ

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

40 4.1a Materiales y métodos

Los ácidos nucleicos se sintetizaron en un sintetizador de ADN automático Biosearch 8700 por medio del uso de química estándar de fosforamidita. Las fosforamiditas 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 al 3'-terminal de los ácidos nucleicos. El etiquetado 5' fluoróforo se logró por medio del uso de fluoróforos fosforamiditas 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 fosforamidita 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:H₂O 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.

5 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 MgCl₂, 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:

10

Tabla 2. Sondas doble etiquetadas para ensayo de hibridación

Reportero (5')	em max (nm)	Secuencia (5' a 3')	Inhibidor (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

15

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

5 La inhibición 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.

10

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

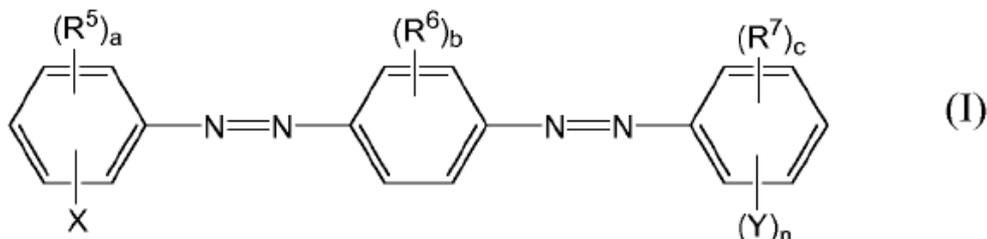
Tabla 3. Relaciones señal a ruido de sondas doble etiquetadas FRET

donador/aceptor	Ruido			Señal			Ruido promedio	Señal promedio	S:N	
	núm.de medición	#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

15

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado covalente de un ácido nucleico y un inhibidor de Fórmula (I) o Fórmula (II), opcionalmente en donde el conjugado también lleva un fluoróforo que tiene una emisión que coincide con la absorbancia del inhibidor, en donde la Fórmula (I) se define como:

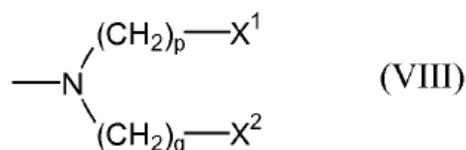


5

en donde

R^5 , R^6 y R^7 son miembros seleccionados independientemente de $-NR'R''$, arilo sustituido o no sustituido, nitro, C_1-C_6 alquilo sustituido o no sustituido, y C_1-C_6 alcoxi sustituido o no sustituido, en donde R' y R'' se seleccionan independientemente de H y C_1-C_6 alquilo sustituido o no sustituido;

10 X y Y se seleccionan independientemente del grupo que consiste en grupos funcionales reactivos, y en donde X tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula VIII:



en donde

15 X^1 y X^2 son miembros seleccionados independientemente de $-CH_3$, $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$, $-SH$, $-OP(OX^3)N(X^4)_2$ en donde X^3 y X^4 son miembros seleccionados independientemente de alquilo y alquilo sustituido;

p y q son números seleccionados independientemente de 1 a 20, inclusive;

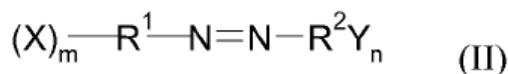
n es un número de 0 a 1, inclusive;

a es un número de 0 a 4, inclusive, de tal manera que cuando a es mayor que 1, los grupos R^5 son los mismos o diferentes;

20 b es un número de 0 a 4, inclusive, de tal manera que cuando b es mayor que 1, los grupos R^6 son los mismos o diferentes;

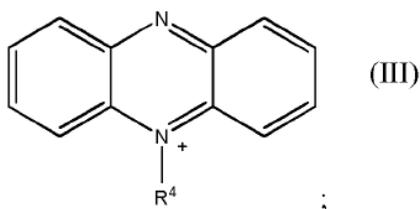
c es un número de 0 a 5, inclusive, de tal manera que cuando c es mayor que 1, los grupos R^7 son el mismo o diferentes;

y la Fórmula (II) se define como:



25

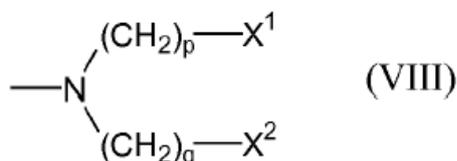
en donde R^1 es una estructura de fórmula (III):



R² es arilo o arilo sustituido con un miembro seleccionado de amino, derivados amino, nitro, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alcoxi y combinaciones de los mismos;

R⁴ es un miembro seleccionado de alquilo, alquilo sustituido, arilo, arilo sustituido, heteroarilo y heteroarilo sustituido;

- 5 X y Y son cada uno independientemente un grupo funcional reactivo y en donde X tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula VIII:



en donde

- 10 X¹ y X² son miembros seleccionados independientemente de -CH₃, -OH, -COOH, -NH₂, -SH, -OP(OX³)N(X⁴)₂ en donde X³ y X⁴ son miembros seleccionados independientemente de alquilo y alquilo sustituido; y

p y q son números seleccionados independientemente de 1 a 20, inclusive;

m es un miembro seleccionado de 1 a 4, siendo los grupos X los mismos o diferentes cuando m es mayor que 1; y

n es un número de 0 a 6 inclusive, siendo los grupos Y los mismos o diferentes cuando n es mayor que 1.

2. Un conjugado covalente de la reivindicación 1, caracterizado por (A) o (B) a continuación:

- 15 (A) un dicho inhibidor o un fluoróforo está unido al nucleótido de terminal 3', ya sea directamente o mediante una porción enlazante;

- (B), el ácido nucleico lleva tanto un dicho inhibidor como un fluoróforo y se caracteriza además por una o una combinación de los siguientes (siempre que los elementos de la combinación no sean mutuamente exclusivos): (i) el fluoróforo y dicho inhibidor están separados por al menos 10 nucleótidos y preferiblemente por al menos 15 nucleótidos;

- (ii) el fluoróforo está unido bien sea al nucleótido terminal 3' o 5';

(iii) dicho inhibidor está unido bien sea al nucleótido terminal 3' o 5';

(iv) el fluoróforo y dicho inhibidor están respectivamente unidos a los nucleótidos terminales 3'- o 5'- o terminales 5'- o 3'-;

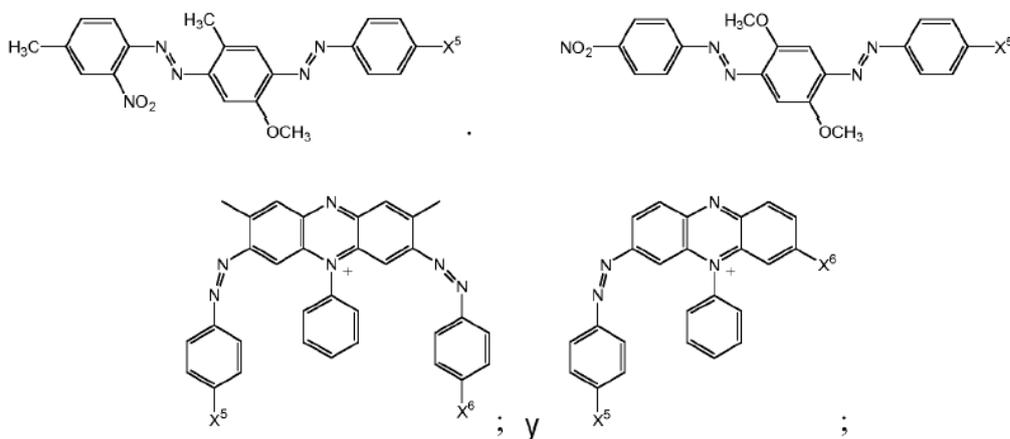
- 25 (v) en relación con el fluoróforo y dicho inhibidor, el ácido nucleico tiene localización interna.

3. El uso de un inhibidor de una estructura (I) o (II) como se define en la reivindicación 1 en la síntesis automatizada de una sonda de ácido nucleico en donde el ácido nucleico se conjuga con el inhibidor.

4. El uso de la reivindicación 3, en donde, después de haber sintetizado el ácido nucleico deseado, se escinde del soporte sólido sobre el que se sintetizó y se trató para eliminar cualesquier grupos protectores presente.

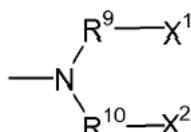
- 30 5. El conjugado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o el uso de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el inhibidor es de Fórmula (I).

6. El conjugado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o el uso de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el inhibidor es de Fórmula (II).
7. El conjugado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde
- 5 X^3 es cianoetilo; y
 X^4 es isopropilo.
8. El conjugado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en donde p y q son números seleccionados independientemente entre 2 y 16, inclusive.
- 10 9. El conjugado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde el inhibidor comprende un dicho grupo fosforamidita $-OP(OX^3)N(X^4)_2$.
10. El conjugado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o el uso de la reivindicación 3 o la reivindicación 4, en donde el inhibidor tiene un grupo fosforamidita como un grupo funcional reactivo.
11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en donde el inhibidor se conjuga con el nucleótido terminal 5' de la sonda.
- 15 12. Un método para llevar a cabo la síntesis automatizada de una sonda de ácido nucleico en donde el ácido nucleico se conjuga con un inhibidor tal como se define en la reivindicación 1 de la siguiente estructura:



en donde,

- 20 X^5 y X^6 son miembros seleccionados independientemente de H, C_1 - C_6 alquilo sustituido o no sustituido, $-OR'$, $-COOR'$, $-NR'R''$, $-SH$, $-OP(OX^3)N(X^4)_2$, en donde R' y R'' son miembros seleccionados independientemente del grupo que consiste en H, y alquilo o alquilo sustituido, en donde X^3 y X^4 son miembros seleccionados independientemente de CN y C_1 - C_6 alquilo sustituido y no sustituido, en donde al menos uno de X^5 y X^6 es un grupo de la fórmula:

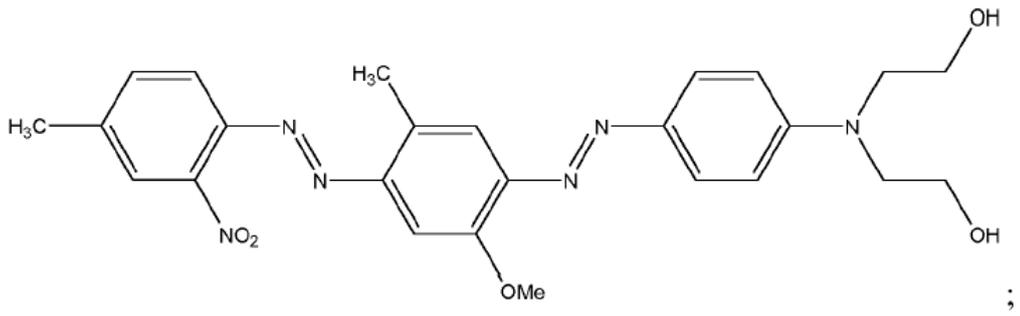


en donde R^9 y R^{10} son miembros seleccionados independientemente de alquilo sustituido y no sustituido;

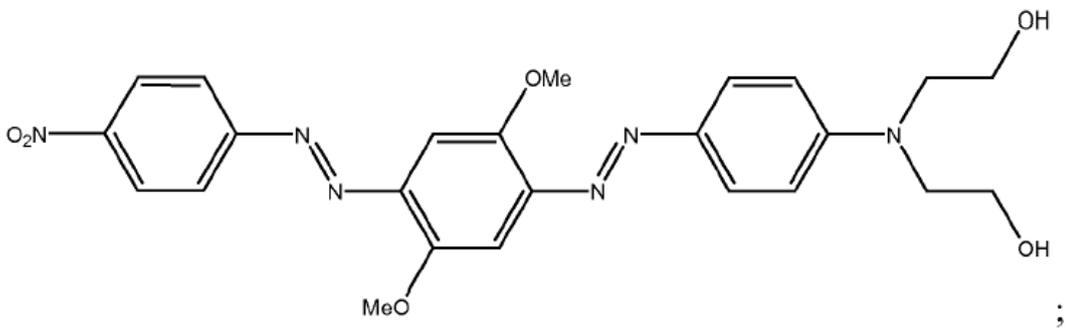
- 25 X^1 y X^2 son miembros seleccionados independientemente de $-CH_3$, $-OH$, $-COOH$, $-NH_2$, $-SH$, y $-OP(OX^3)N(X^4)_2$;

en donde X^3 y X^4 son miembros seleccionados independientemente de alquilo sustituido y no sustituido; opcionalmente en donde X^3 es cianoetilo y X^4 es isopropilo.

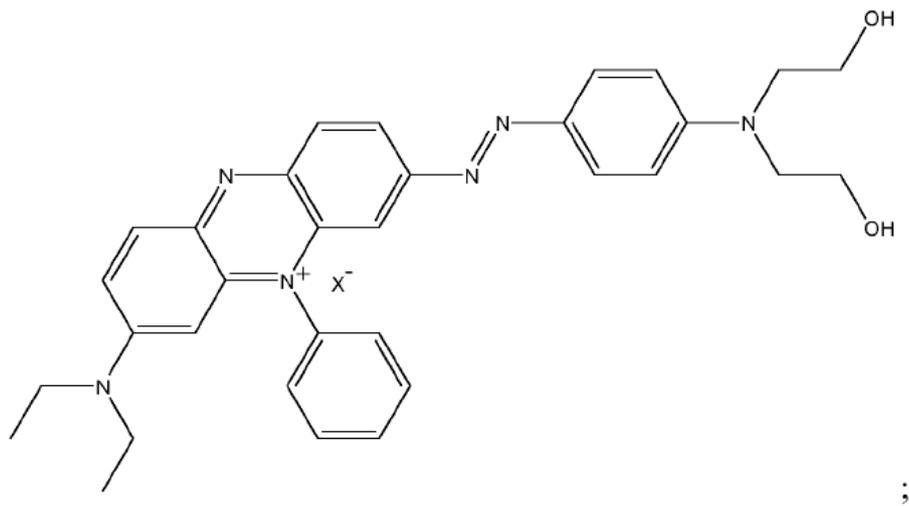
13. El método de la reivindicación 12, en donde el inhibidor tiene la estructura:



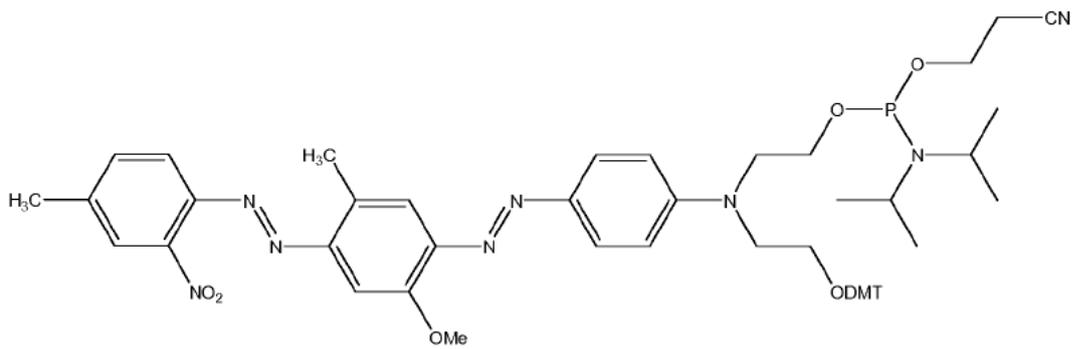
o



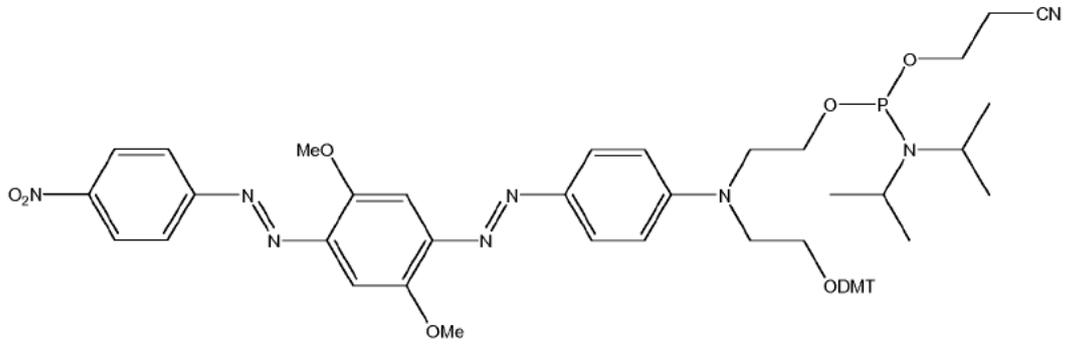
o,



o,

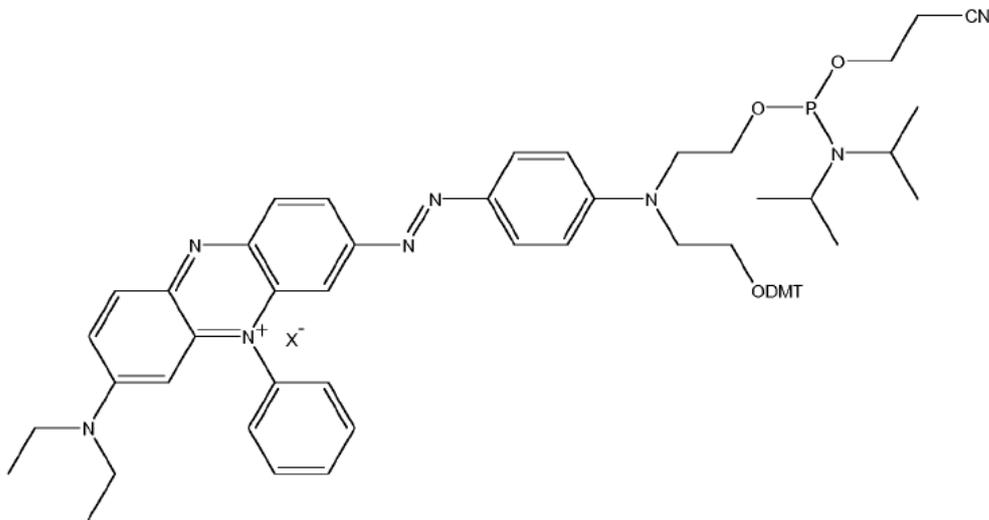


o



;

o



5 14. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en donde se introduce un fluoróforo en la sonda antes, durante o después de la síntesis automatizada.

10 15. Un sintetizador automatizado de ácidos nucleicos cuando se opera para sintetizar una sonda de ácido nucleico en la que el ácido nucleico se conjuga con un inhibidor que tiene una estructura definida en cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 10 o 12 a 13 y en donde dicho inhibidor y un fluoróforo son ambos introducidos durante la síntesis automatizada o dicho inhibidor se introduce antes de que comience el procedimiento de síntesis automatizada.

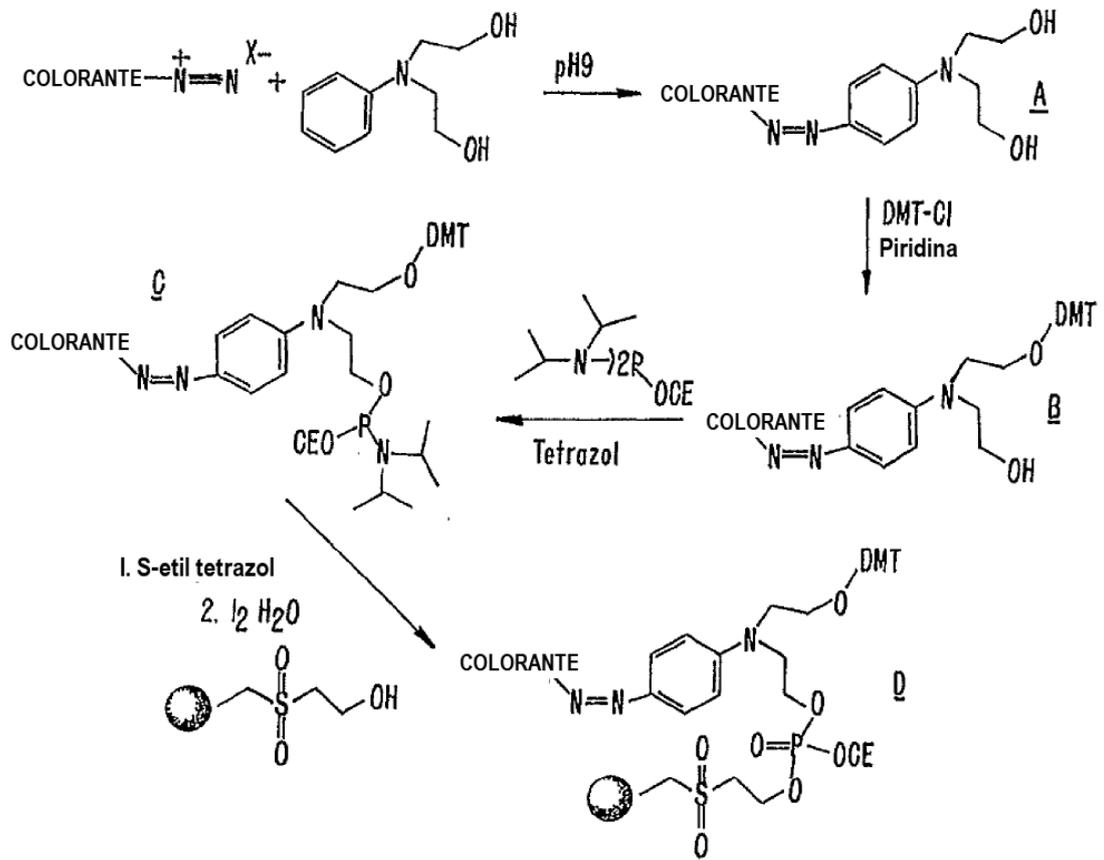


FIG. 1.

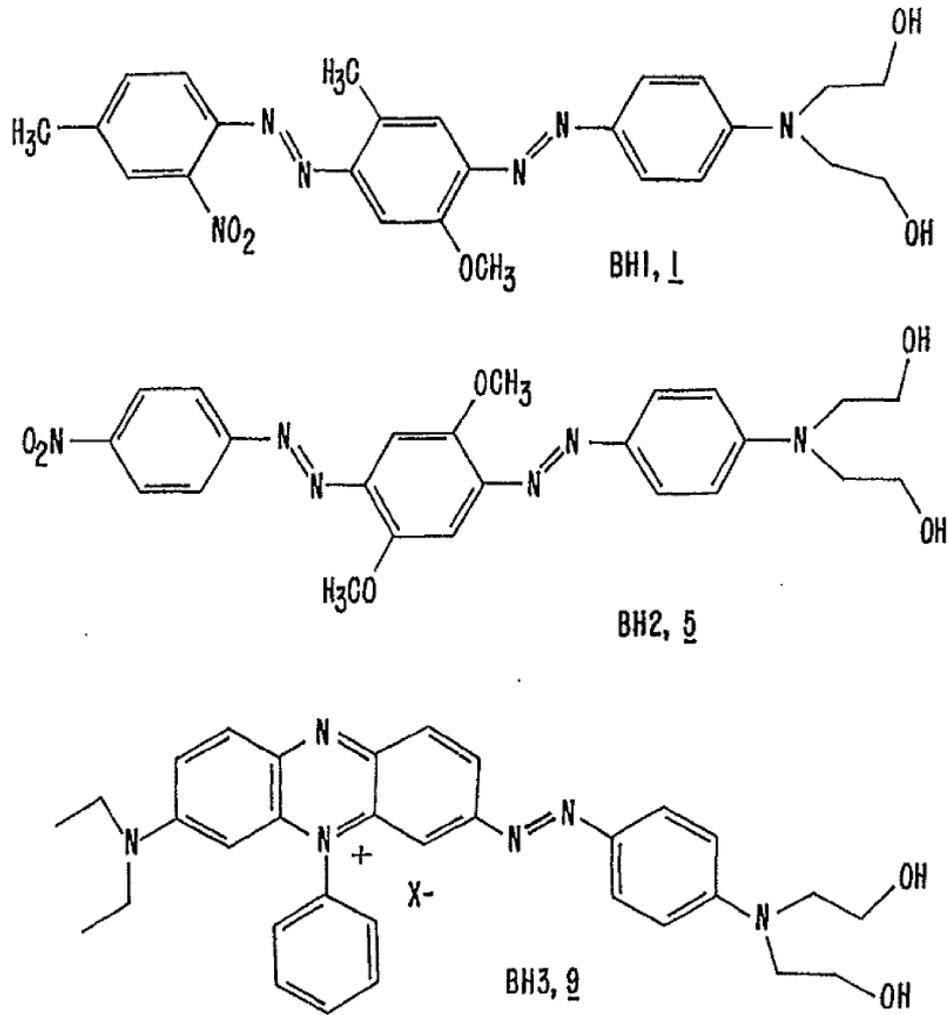


FIG. 2.

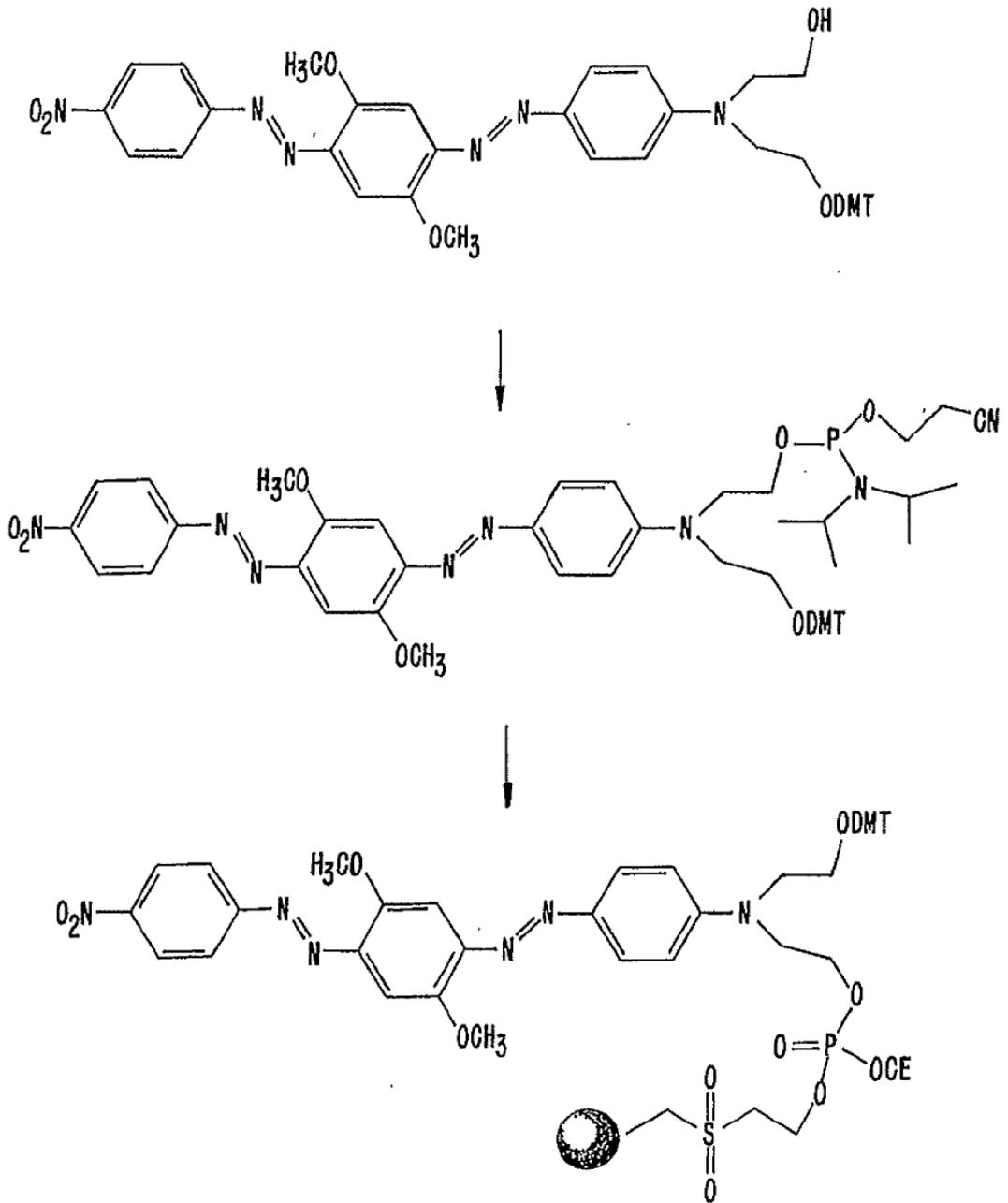


FIG. 3.

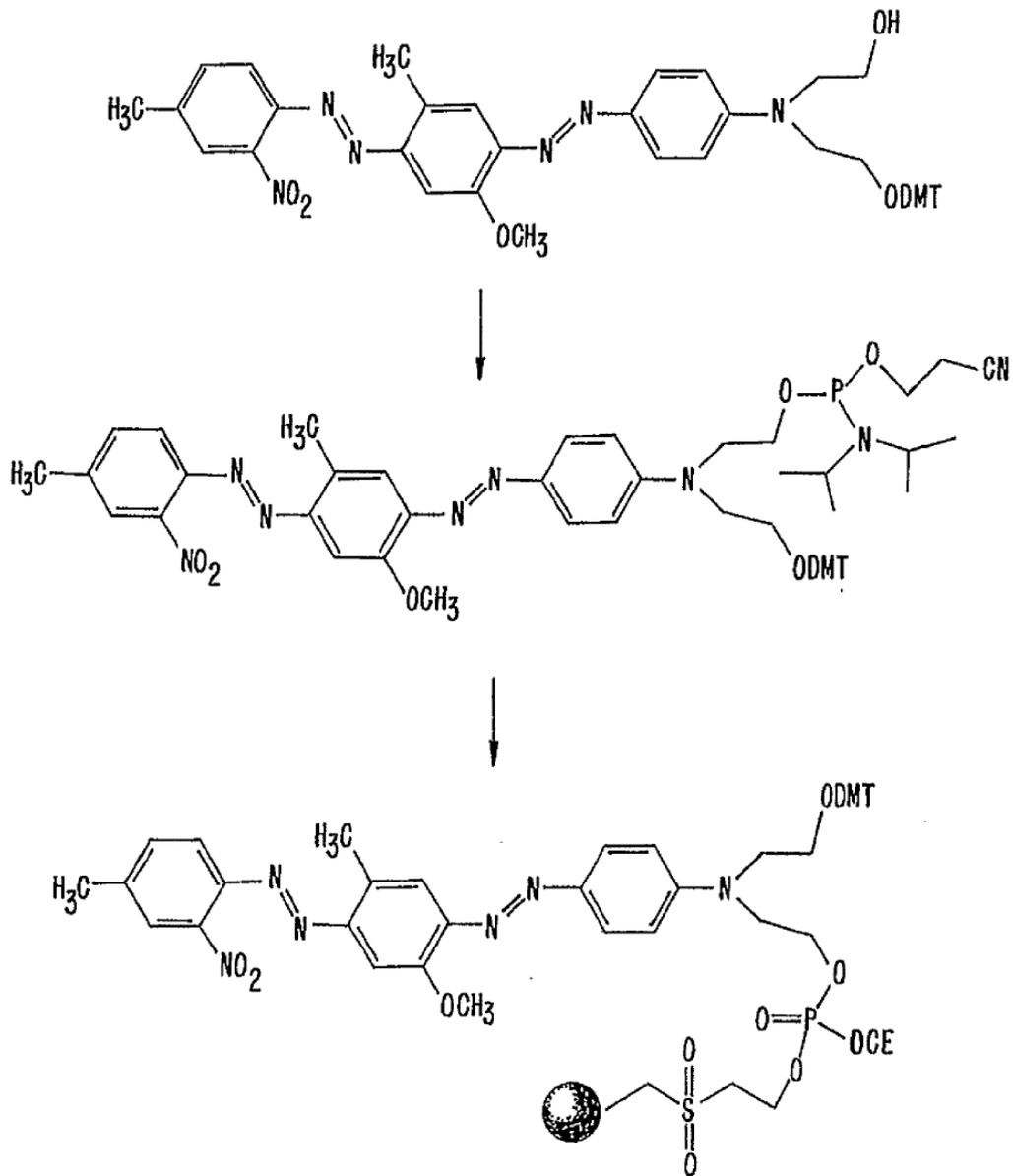


FIG. 4.

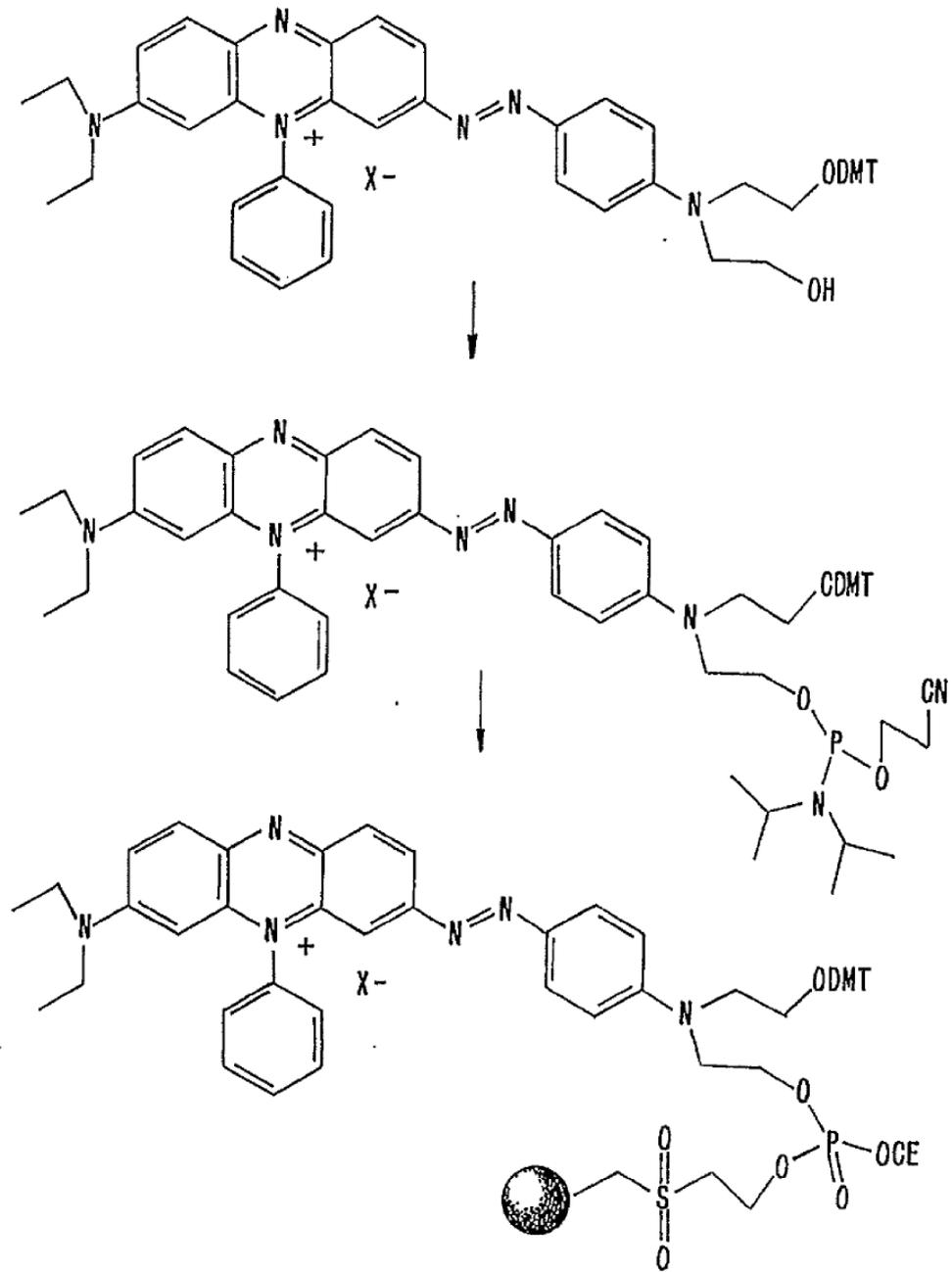


FIG. 5.

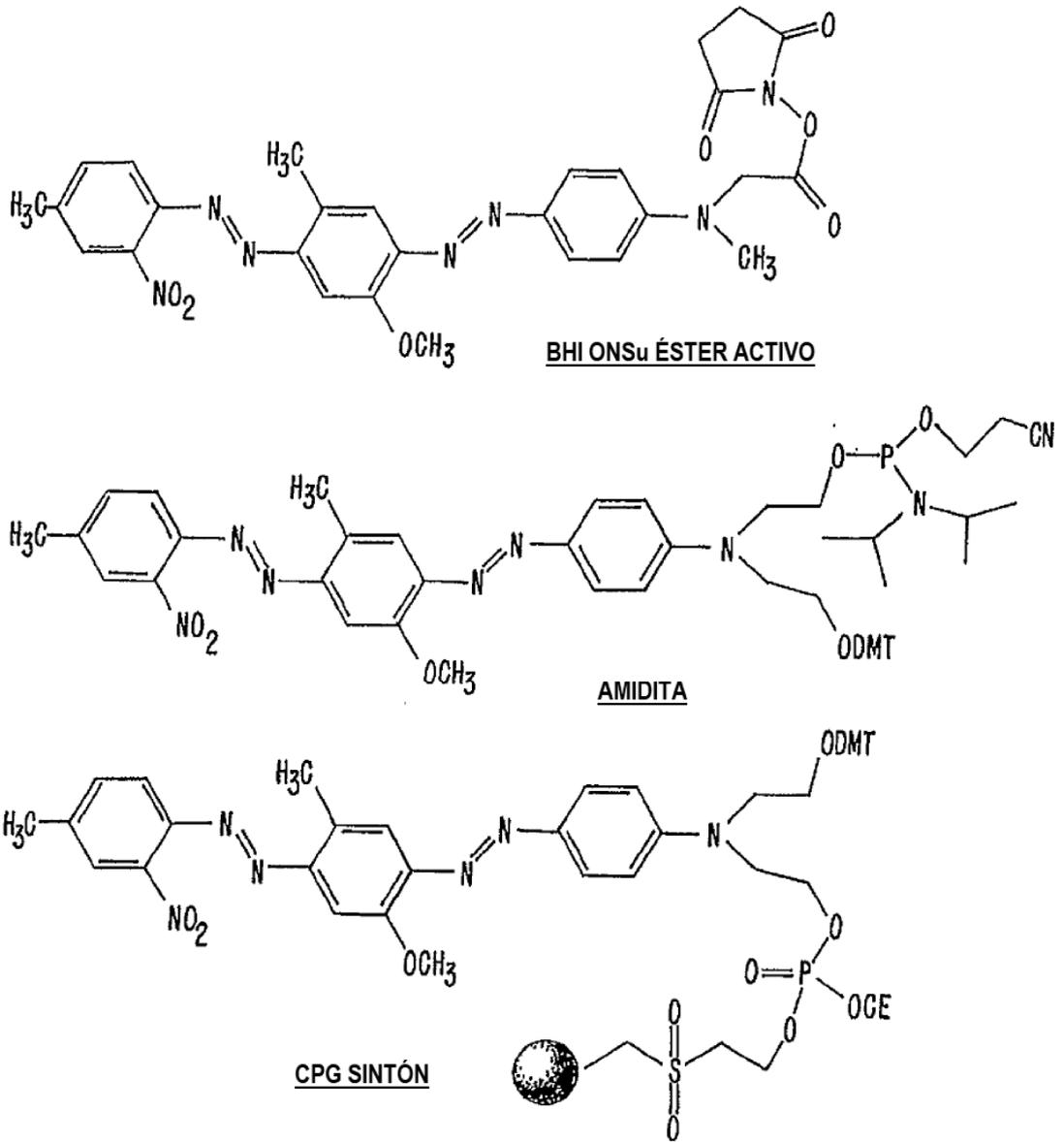


FIG. 6.

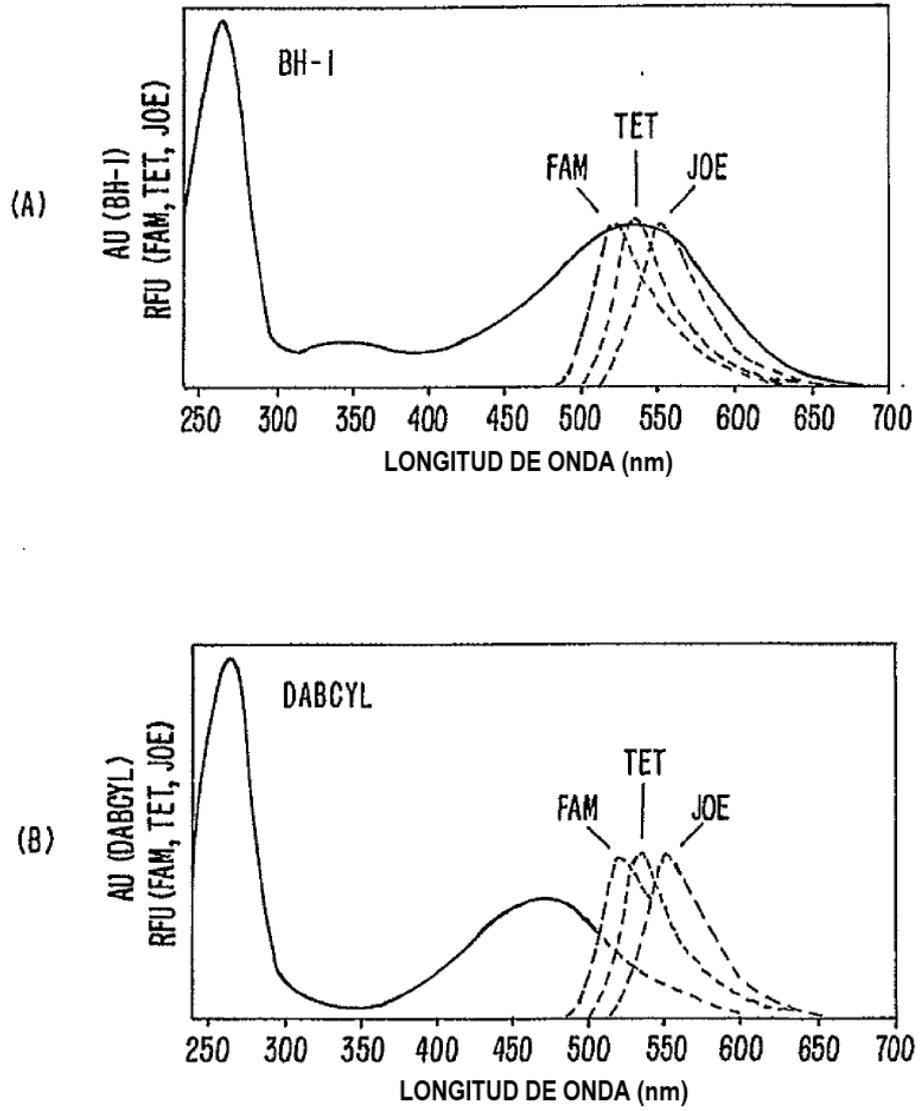


FIG. 7.

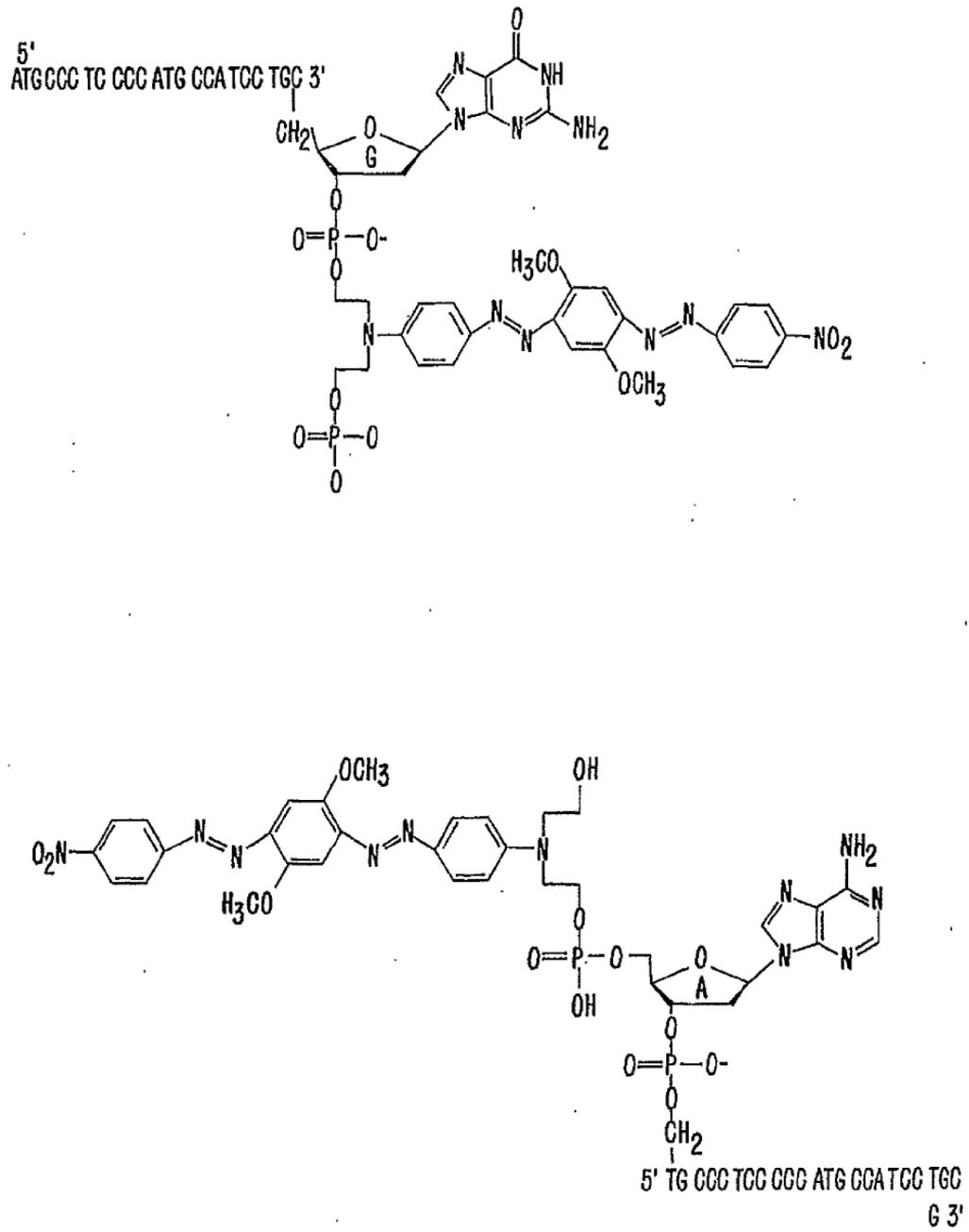


FIG. 8.

