

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 773**

51 Int. Cl.:

C40B 30/04 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2014 PCT/US2014/052827**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15094429**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2014 E 14873077 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3084051**

54 Título: **Sondas de hibridación de ácido nucleico ultraespecíficas de ajuste fino**

30 Prioridad:

16.12.2013 US 201361916321 P

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

07.07.2020

73 Titular/es:

**WILLIAM MARSH RICE UNIVERSITY (100.0%)
6100 Main Street
Houston, TX 77005-1892, US**

72 Inventor/es:

**ZHANG, DAVID, YU;
WANG, JUEXIAO y
WU, RUOJIA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 771 773 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

Sondas de hibridación de ácido nucleico ultraespecíficas de ajuste fino

5 **Antecedentes**

Pequeñas diferencias en la secuencia de ADN y ARN pueden llevar a grandes diferencias en la salud. Por ejemplo, un cambio de una sola base en un genoma bacteriano puede llevar a la resistencia a los antibióticos, y un cambio de una sola base en un genoma humano puede llevar a la remisión del cáncer. Con la maduración del campo de la genómica y el descubrimiento que acompaña a muchas secuencias y moléculas de biomarcadores de ácido nucleico, existe una gran demanda de la industria biotecnológica para desarrollar ensayos de ácidos nucleicos fiables, consistentes, económicos y precisos que puedan discriminar los cambios de una sola base. Los métodos de discriminación basados en enzimas para las diferencias de secuencia de ácido nucleico son difíciles de integrar con una amplia variedad de tecnologías debido a que las enzimas requieren temperaturas y condiciones de tamponamiento específicas.

Las técnicas sin enzimas para garantizar la hibridación altamente específica de ácidos nucleicos con sus complementos se ha basado tradicionalmente en la optimización de la temperatura de fusión, pero esto es difícil de predecir y controlar con precisión. Recientemente, se han demostrado sondas de hibridación de extremos cohesivos (*toehold*) en las que los cambios de una sola base en las secuencias de ácido nucleico pueden discriminarse de manera consistente en un amplio intervalo de temperaturas y salinidades. Estas sondas están diseñadas para reaccionar con sus dianas previstas con energía libre estándar de reacción (ΔG°_{rxn}) cerca de cero, para que el rendimiento de hibridación sea cercano al 50 % para la diana prevista. Una variante de la diana que difiere incluso en un solo nucleótido se unirá a la sonda con un rendimiento significativamente menor (mediana del 2 %).

Para lograr la $\Delta G^{\circ}_{rxn} \approx 0$ con propiedad, estas sondas equilibran las energías de unión de una región de "extremos cohesivos" específica de diana con la de una región de "equilibrio" no homóloga de la diana. Se ha demostrado experimentalmente que las sondas de ADN funcionan de manera consistente para discriminar dianas de ADN, y se ha demostrado experimentalmente que las sondas de ARN funcionan de manera consistente para discriminar dianas de ARN.

Estas sondas, sin embargo, tienen varias limitaciones. Por ejemplo, cuando la sonda y la diana son de diferentes formas, como cuando las sondas de ADN están diseñadas específicamente para dianas de ARN, las sondas de ARN 2'-O-metil están diseñadas para unirse a dianas de ARN, y cuando las sondas de ANB están diseñadas para unirse específicamente a dianas de ADN, las diferencias en la termodinámica de la hibridación entre las moléculas de ácido nucleico de diferentes formas dan como resultado un mal diseño de la sonda, con baja especificidad o baja sensibilidad. De manera adicional, la fuerza termodinámica de unión de pares de bases/apilamientos individuales es relativamente grande, prácticamente impidiendo el ajuste fino de la ΔG°_{rxn} de la reacción, lo que a su vez limita la capacidad de ajuste de la compensación entre la especificidad y la sensibilidad del sistema de sonda. Asimismo, se sabe que los parámetros termodinámicos de hibridación de ADN y ARN publicados son incompletos y/o imprecisos en ciertas condiciones. Un sistema de sonda diseñado por simulación computacional puede poseer una ΔG°_{rxn} real que difiere significativamente de la ΔG°_{rxn} ; calculada; sin un método para el ajuste fino del rendimiento de la sonda, debe emplearse con ajustes de prueba y error para lograr un diseño de sonda óptimo con la ΔG°_{rxn} deseada.

Zhang, Chen y Yin (2012) Nature Chemistry 4: 208-213 describe sondas de intercambio de extremos cohesivos diseñadas de acuerdo con las propiedades termodinámicas.

Sumario

La invención es tal y como se define en las reivindicaciones. La presente divulgación proporciona, según determinados casos, sistemas de sonda de hibridación de ácido nucleico altamente específicos, que discriminan de manera fiable los cambios de una sola base en los ácidos nucleicos diana. En comparación con el trabajo anterior, los sistemas de sonda descritos en la presente divulgación se destacan en (1) sondear de manera fiable el ADN, el ARN y las dianas de ácido nucleico modificadas con ADN, ARN y otras sondas de ácido nucleico, y (2) permitir el ajuste fino de la compensación entre sensibilidad y especificidad. Las composiciones y los métodos de la presente divulgación pueden ser útiles en, entre otras cosas, diagnósticos moleculares de cáncer, diagnósticos de enfermedades infecciosas, diagnóstico de seguridad alimentaria y herramientas de descubrimiento de investigación basadas en la detección y cuantificación de ADN y ARN.

En un caso, se proporciona una composición para la interacción selectiva con una molécula de ácido nucleico diana. La composición comprende una primera concentración de una primera cadena de ácido nucleico que comprende una primera región, una segunda región, y una tercera región, y una segunda concentración de una segunda cadena de ácido nucleico que comprende una cuarta región y una quinta región. El ácido nucleico diana comprende una sexta y una séptima región de una secuencia de nucleótidos que es al menos parcialmente, si no completamente, complementaria a una secuencia de nucleótidos de la primera y segunda regiones, respectivamente. La primera y la segunda concentraciones son tales que la interacción entre el ácido nucleico diana y la composición posee una

energía libre estándar (ΔG°_{rxn}) según lo determinado por la expresión 1 ($\Delta G^{\circ}_{rxn} = \Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$) dentro de 5 kcal/mol de una energía libre estándar determinada por la Expresión 2 ($-R\tau \ln\left(\frac{[P]_0 - [C]_0}{[C]_0}\right)$), en donde el término $[P]_0$ de la Expresión 2 es igual a la segunda concentración, y el término $[C]_0$ de la Expresión 2 es igual a la primera concentración, R es igual a la constante de gas universal 8,314 J/mol·K, y τ es igual a la temperatura en Kelvin. En este caso, el término ΔG°_{t-TC} de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la sexta región y la primera región; el término ΔG°_{nh-PC} de la Expresión 1 representa la energía libre de hibridación entre la quinta región y la tercera región; el término ΔG°_{v-TC} de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la séptima región y la segunda región; y el término ΔG°_{h-PC} de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la cuarta región y la segunda región. El método de cálculo de los valores de ΔG° se describe en detalle más adelante en la descripción. En determinados casos, La concentración del ácido nucleico diana es menor que la primera concentración. En ciertos otros casos, La concentración del ácido nucleico diana es igual o mayor que la primera concentración.

En otro caso, las secuencias de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, sexta y séptima regiones son tales que la interacción entre el ácido nucleico diana y la composición posee una energía libre estándar (ΔG°_{rxn}) según lo determinado por la Expresión 1 [$\Delta G^{\circ}_{rxn} = \Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$] de aproximadamente -4 kcal/mol y +4 kcal/mol, mientras que [$\Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC}$] no está entre -1 kcal/mol y +1 kcal/mol. En otros casos, los valores de ΔG°_{t-TC} y ΔG°_{nh-PC} no están dentro del 10 % entre sí.

En otro caso, el ácido nucleico diana comprende además una octava región adyacente a la séptima región, tal que la secuencia de nucleótidos de la octava región no es complementaria a la secuencia de nucleótidos de la tercera región, con menos del 50 % de los nucleótidos alineados emparejados entre la octava y la tercera región en equilibrio.

En otro caso, se proporciona un proceso para crear una sonda de ácido nucleico. El proceso comprende las etapas siguientes: seleccionar una secuencia de nucleótidos diana en una molécula de ácido nucleico, comprendiendo la secuencia de nucleótidos diana una sexta subsecuencia de nucleótidos y una séptima subsecuencia de nucleótidos; seleccionar una primera secuencia de nucleótidos que comprende una primera subsecuencia de nucleótidos, una segunda subsecuencia de nucleótidos, y una tercera subsecuencia de nucleótidos; y seleccionar una segunda secuencia de nucleótidos que comprende una cuarta subsecuencia de nucleótidos y una quinta subsecuencia de nucleótidos. En este caso, las etapas de seleccionar las secuencias de nucleótidos primera, segunda, y diana se basan en las interacciones entre tales que poseen una energía libre estándar de aproximadamente -4 kcal/mol a aproximadamente +4 kcal/mol según lo determinado por la Expresión 1 [$\Delta G^{\circ}_{rxn} = \Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$], en donde el término ΔG°_{t-TC} de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la sexta región y la primera región, en donde el término ΔG°_{nh-PC} de la Expresión 1 representa la energía libre de hibridación entre la quinta región y la tercera región, en donde el término ΔG°_{v-TC} de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la séptima región y la segunda región, y en donde el término ΔG°_{h-PC} de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la cuarta región y la segunda región. El proceso comprende además la etapa de sintetizar una primera cadena de nucleótidos que comprende la primera secuencia de nucleótidos y una segunda cadena de nucleótidos que comprende la segunda secuencia de nucleótidos.

Además de la selección de las secuencias de nucleótidos relevantes basadas en la Expresión 1, el proceso puede comprender de manera alternativa o adicional la selección de la primera y segunda concentraciones de manera que la energía libre estándar determinada por la Expresión 2 ($-R\tau \ln\left(\frac{[P]_0 - [C]_0}{[C]_0}\right)$) está dentro de 5 kcal/mol de la energía libre estándar según lo determinado por la Expresión 1 (ΔG°_{rxn}) en donde los términos $[C]_0$ y $[P]_0$ de la Expresión 2 representan una concentración predeterminada de la primera cadena de nucleótidos y de la segunda cadena de nucleótidos, respectivamente, R es igual a la constante de gas universal 8,314 J/mol·K, y τ es igual a la temperatura en Kelvin. En un caso, si la energía libre estándar determinada por la Expresión 1 no está dentro de las 5 kcal/mol de la energía libre estándar determinada por la Expresión 2, entonces la concentración predeterminada de al menos una de la primera cadena de ácido nucleico o la segunda cadena de ácido nucleico se puede modificar hasta que se cumpla esta condición. Como alternativa, la optimización puede tener lugar repitiendo las etapas del proceso y seleccionando secuencias de nucleótidos modificadas que cumplan con las condiciones deseadas de energía libre.

Se proporciona un método para identificar la presencia o cantidad de una molécula de ácido nucleico que lleva la secuencia de nucleótidos diana en una muestra. El método comprende aplicar una sonda a una muestra que posiblemente comprenda una molécula de ácido nucleico diana y operar la reacción de hibridación a una temperatura de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 75 °C, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 65 °C, o cualquier intervalo de temperatura entre ellos, para permitir la hibridación de la sonda con la molécula de ácido nucleico diana, si la molécula de ácido nucleico diana está presente en la muestra. En este caso, la sonda comprende una primera cadena de ácido nucleico y una segunda cadena de ácido nucleico. La primera cadena de ácido nucleico comprende una primera región, una segunda región y una tercera región, en donde la primera región posee una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una sexta región de la molécula de ácido nucleico diana, y en donde la segunda región posee una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una séptima región de la molécula de ácido nucleico diana. La segunda cadena de ácido nucleico que

comprende una cuarta región y una quinta región, en donde la cuarta región posee una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de la segunda región, y en donde la quinta región posee una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de la tercera región. En un caso, la molécula de ácido nucleico diana es ARN.

5 Un método para amplificar selectivamente una secuencia de ácido nucleico diana de una muestra, comprendiendo dicho método aplicar la sonda como un cebador enzimático a una mezcla que comprende la muestra, una ADN polimerasa o ARN polimerasa y una mezcla de nucleótidos trifosfatos. En algunos casos, la mezcla comprende además un cebador adicional de ADN o ARN, o una enzima adicional, como una enzima nicking, una recombinasa, 10 una helicasa, una enzima de restricción, una nucleasa o una ligasa. En algunos casos, la combinación de la sonda y la mezcla se deja reaccionar isotérmicamente durante entre 1 minuto y 72 horas. En algunos casos, se deja reaccionar la combinación de la sonda y la mezcla a través de varios ciclos de temperatura, que varían entre 5 y 200 ciclos.

15 Las características y ventajas de la presente divulgación serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia tras una lectura de la descripción de los casos que siguen.

Dibujos

20 Algunos casos de ejemplos específicos de la divulgación pueden entenderse haciendo referencia, en parte, a la siguiente descripción y los dibujos adjuntos.

La FIG. 1 proporciona una realización de un sistema de sonda de ácido nucleico 10 adecuado para su uso en la presente invención. El sistema de sonda 10 comprende una cadena complementaria C (también denominada en el presente documento como la "primera cadena" y una cadena protectora P (también denominada en el presente documento como la "segunda cadena") diseñada con respecto a un ácido nucleico diana T (también denominado "molécula de ácido nucleico diana", o "cadena de ácido nucleico diana"). La cadena complementaria C incluye una región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo (también denominada en el presente documento como la "primera región"), una región complementaria 2 homóloga de diana (también denominada en el presente documento como la "segunda región"), y una región complementaria 3 no homóloga de diana (también denominada en el presente documento como la "tercera región"). La protectora comprende una región 4 homóloga de diana (también denominada en el presente documento como la "cuarta región") y una región 5 no homóloga de diana (también denominada en el presente documento como la "quinta región"). La diana comprende una región 6 de diana-extremo cohesivo (también denominada en el presente documento como la "sexta región") y una región 7 de validación de diana (también denominada en el presente documento como la "séptima región"). En ciertas realizaciones, la diana puede comprender además una región 8 aguas arriba de la diana, y/o regiones adicionales aguas arriba y aguas abajo. La región 4 homóloga diana de la protectora P puede diferir en secuencia de la región 7 de validación de la diana de la diana T, por ejemplo, en el caso de que la protectora P y la diana T sean diferentes tipos de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN frente a ADN). Tal como se usa en el presente documento, el término "región" cuando se refiere al sistema de sonda o al ácido nucleico diana define un grupo de bases de nucleótidos contiguas que actúan como una unidad funcional en la hibridación y disociación.

La FIG. 2A proporciona un sistema de sonda 10 a modo de ejemplo y su reacción con el ácido nucleico diana T y la FIG. 2B proporciona un sistema de sonda 10 a modo de ejemplo y su reacción con una variante V de diana que tiene una sola diferencia de bases 12 que la diana T en la región 7 de validación de la diana. Con referencia ahora a la FIG. 2A, el sistema de sonda 10 está diseñado de tal manera que la energía libre estándar de la reacción de hibridación del sistema de sonda 10 con la diana T deseada (ΔG°_{rxn}) es aproximadamente igual a $(-RT \ln((\frac{[P]_0}{[C]_0}) / (\frac{[C]_0}{[P]_0})))$ (Expresión 2), y asegura un rendimiento medio a alto de la cadena del complemento C unida a la diana T. En referencia ahora a la FIG. 2B, el sistema de sonda 10 reacciona con la variante V de diana con una energía libre estándar ΔG°_V , eso es más positivo que ΔG°_{rxn} por $\Delta \Delta G^{\circ}_{SNP}$, (es decir, $\Delta G^{\circ}_V = \Delta G^{\circ}_{rxn} + \Delta \Delta G^{\circ}_{SNP}$) donde $\Delta \Delta G^{\circ}_{SNP}$ denota la penalización termodinámica relativa del cambio de una sola base. Esto da como resultado que el sistema de sonda 10 tenga un rendimiento de unión mucho menor para la variante V de diana debido al desemparejamiento de base única 12 en comparación con la diana T.

La FIG. 3 proporciona las diversas energías libres estándar de los componentes de la región de unión que se usan en la presente invención para calcular la energía libre estándar de reacción (ΔG°_{rxn}).

La FIG. 4 proporciona una distribución de valores ($\Delta G^{\circ}_{v-Tc} - \Delta G^{\circ}_{h-PC}$) para 46 subsecuencias no solapadas de 50 nt diferentes de ARNm expresado (exónico) en BRAF a diferentes temperaturas, asumiendo que la primera molécula de ácido nucleico y la segunda molécula de ácido nucleico son ambas ADN. Tal como se puede observar, hay una amplia difusión, con los valores más grandes de más de 20 kcal/mol mayores que los valores más pequeños. Considerando que una diferencia de 1,4 kcal/mol en ΔG°_{rxn} puede llevar a una diferencia de un factor de 10 en especificidad o sensibilidad, los resultados en este caso demuestran que el término $\Delta G^{\circ}_{v-Tc} - \Delta G^{\circ}_{h-PC}$ debe considerarse en el diseño de las sondas descritas en el presente documento y, por lo tanto, mejora los parámetros de diseño de la técnica anterior.

La FIG. 5 proporciona la contribución de energía libre estándar de la termodinámica del marcador diferencial ($\Delta G^{\circ}_{marcador} = \Delta G^{\circ}_F - \Delta G^{\circ}_{FQ}$). En este caso, el marcador de la cadena protectora P es un inhibidor Q específico del fluoróforo F de la hebra del complemento C.

La FIG. 6 es una representación de un aspecto del presente método para ajustar el comportamiento del sistema de sonda. De manera específica, además de la modulación de la energía libre estándar de reacción (ΔG°_{rxn}) mediante la adición o eliminación de apilamientos de bases (modificación del valor de la Expresión 1), se puede utilizar la modulación de la estequiometría (relación de las concentraciones de P frente a C) para controlar la compensación entre la especificidad y la sensibilidad de la sonda y proporciona un método más eficaz de hacerlo (modificando el valor de la Expresión 2). En este caso, se asume que la concentración diana es menor que la primera concentración, y la sensibilidad se calcula como el rendimiento de unión de equilibrio de la diana deseada $[TC]/([T] + [TC])$, y la especificidad se calcula como uno menos el rendimiento de unión de una variante de diana 1 - $[VC]/([V]+[VC]) = [V]/([V] + [VC])$. En esta figura, la variante difiere de la diana en una sola base y posee $\Delta\Delta G^{\circ}_{SNP} = +2$ kcal/mol a 37 °C. La modulación de la estequiometría P a C también es beneficiosa cuando ΔG°_{rxn} no se puede calcular con precisión en simulación computacional permitiendo el rescate de sistemas de sonda con ΔG°_{rxn} reales que difiere en hasta 5 kcal/mol de su ΔG°_{rxn} calculado.

La FIG. 7 representa diseños de sistemas de variantes de sonda. La FIG. 7A representa un sistema de sonda con orientación opuesta de 5'/3'. La FIG. 7B representa un sistema de sonda en el que la región 1 está embebida en la región 2, o en la que la región 1 existe entre las regiones 2 y 3. La FIG. 7C representa un sistema de sonda en el que las regiones 2 y 4 no son perfectamente complementarias, o en el que las regiones 3 y 5 no son perfectamente complementarias.

La FIG. 8 proporciona una representación gráfica de los diferentes rendimientos deseados para la unión a la diana, y la compensación entre especificidad y sensibilidad. Si la energía libre estándar de la reacción ΔG°_{rxn} según lo determinado por la Expresión 1 (o por la Expresión 3 si se usa un marcador) se desvía de (Expresión 2 o $-R\ln(([P]_0 - [C]_0)/[C]_0)$) por desviación de energía libre X, el rendimiento de la unión a la diana también cambiará. Para valores positivos de X, se mejorará la especificidad (contra una variante V de diana), pero la sensibilidad (rendimiento) se reducirá. Para valores negativos de X, se mejorará la sensibilidad, pero se reducirá la especificidad. Para aplicaciones particulares, la especificidad o la sensibilidad pueden ser más importantes, y la capacidad de ajuste fino de la termodinámica a través de los métodos presentados en el presente documento mejora la técnica anterior.

La FIG. 9 proporciona una sonda a modo de ejemplo de la presente divulgación (Ejemplo 1) dirigida a una subsecuencia de ARNm expresada por BRAF en los nucleótidos 11-30 a $\tau = 37$ °C, $[Na^+] = 1$ M. Basado en parámetros de las referencias, ΔG°_{rxn} se calcula que es +0,15 kcal/mol y $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 0,78$ se recomienda para alcanzar un X = 0. A $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 7,8$, X es +1,42 kcal/mol, y a $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 0,10$, X es -1,27 kcal/mol.

La FIG. 10 proporciona una sonda a modo de ejemplo de la presente divulgación (Ejemplo 2) dirigida a una subsecuencia de ARNm expresada por BRAF en los nucleótidos 71-90 a $\tau = 37$ °C, $[Na^+] = 1$ M. Basado en parámetros de las referencias, ΔG°_{rxn} se calcula que es -0,61 kcal/mol y $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 2,69$ se recomienda para alcanzar un X = 0.

La FIG. 11 proporciona una sonda a modo de ejemplo de la presente divulgación (Ejemplo 3) dirigida a una subsecuencia de ARNm expresada por BRAF en los nucleótidos 131-160 a $\tau = 37$ °C, $[Na^+] = 1$ M. Basado en parámetros de las referencias, ΔG°_{rxn} se calcula que es -1,54 kcal/mol y $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 12,14$ se recomienda para alcanzar un X = 0.

La FIG. 12 proporciona una sonda a modo de ejemplo de la presente divulgación (Ejemplo 4) dirigida a una subsecuencia de ARNm expresada por BRAF en los nucleótidos 191-220 a $\tau = 52$ °C, $[Na^+] = 1$ M. Basado en parámetros de las referencias, ΔG°_{rxn} se calcula que es -0,46 kcal/mol y $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 2,11$ se recomienda para alcanzar un X = 0.

La FIG. 13 proporciona una sonda a modo de ejemplo de la presente divulgación (Ejemplo 5) dirigida a una subsecuencia de ARNm expresada por BRAF en los nucleótidos 251-280 a $\tau = 65$ °C, $[Na^+] = 1$ M. Basado en parámetros de las referencias, ΔG°_{rxn} se calcula que es -1,49 kcal/mol y $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 11,2$ se recomienda para alcanzar un X = 0.

La FIG. 14 proporciona una sonda a modo de ejemplo de la presente divulgación (Ejemplo 6) dirigida a una subsecuencia de ARNm expresada por BRAF en los nucleótidos 311-350 a $\tau = 52$ °C, $[Na^+] = 1$ M. Basado en parámetros de las referencias, ΔG°_{rxn} se calcula que es -0,22 kcal/mol y $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 1,43$ se recomienda para alcanzar un X = 0.

La FIG. 15 proporciona una sonda a modo de ejemplo de la presente divulgación (Ejemplo 7) dirigida a una subsecuencia de ARNm expresada por BRAF en los nucleótidos 431-460 a $\tau = 65$ °C, $[Na^+] = 1$ M. Basado en parámetros de las referencias, ΔG°_{rxn} se calcula que es +1,03 kcal/mol y $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 0,19$ se recomienda para alcanzar un X = 0.

La FIG. 16 proporciona una sonda a modo de ejemplo de la presente divulgación (Ejemplo 8) con una orientación alternativa dirigida a una subsecuencia de ARNm expresada por BRAF en los nucleótidos 491-520 a $\tau = 37$ °C, $[Na^+] = 1$ M. Basado en parámetros de las referencias, ΔG°_{rxn} se calcula que es -0,27 kcal/mol y $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 1,55$ se recomienda para alcanzar un X = 0.

La FIG. 17 proporciona una sonda a modo de ejemplo de la presente descripción (Ejemplo 9) con un desemparejamiento intencional de un solo nucleótido en la región homóloga de diana (la cuarta región) de la cadena protectora dirigida a una subsecuencia de ARNm expresada por BRAF en los nucleótidos 551-580 a $\tau = 37$ °C, $[Na^+] = 1$ M. Basado en parámetros de las referencias, ΔG°_{rxn} se calcula que es -0,37 kcal/mol y $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 1,82$ se recomienda para alcanzar un X = 0.

La FIG. 18 proporciona una sonda a modo de ejemplo de la presente divulgación (Ejemplo 10) dirigida a una subsecuencia de ARNm expresada por BRAF en los nucleótidos 611-630 a $\tau = 25$ °C, $[Na^+] = 1$ M. Basado en

parámetros de las referencias, ΔG°_{rxn} se calcula que es -0,66 kcal/mol y $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 3,0$ se recomienda para alcanzar un $X = 0$.

La FIG. 19 proporciona una sonda a modo de ejemplo de la presente divulgación (Ejemplo 11) dirigida a una subsecuencia de ARNm expresada por BRAF en los nucleótidos 671-700 a $\tau = 25^{\circ}\text{C}$, $[\text{Na}^+] = 1\text{M}$, formamida al 30 %. Según los parámetros de las referencias y la suposición de que la formamida al 1 % es equivalente a un aumento de temperatura de $0,6^{\circ}\text{C}$, ΔG°_{rxn} se calcula que es 0,32 kcal/mol y $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 0,58$ se recomienda para alcanzar un $X = 0$.

La FIG. 20 proporciona una sonda a modo de ejemplo de la presente divulgación (Ejemplo 12) dirigida a una secuencia de ADN en los nucleótidos 671-700 a $\tau = 62^{\circ}\text{C}$, $[\text{Mg}^{2+}] = 3\text{mM}$. Basado en parámetros de las referencias, ΔG°_{rxn} se calcula que es -3,07 kcal/mol y $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0 = 100$ se recomienda para alcanzar un $X = 0$.

La FIG. 21 proporciona una visión general esquemática de la PCR de multiplexado de puntos calientes utilizando sondas de la presente divulgación como cebadores. Una muestra 20 que comprende las moléculas de ácido nucleico diana deseadas 22 se mezcla con la enzima 23, un cebador directo 24 y un cebador inverso establecido 10a-10d. Las moléculas de ácido nucleico diana 22 comprenden mutaciones de una sola base que residen en loci cercanos entre sí (un "punto caliente" o *hotspot*), y son normalmente difíciles de detectar mediante cebadores de PCR convencionales. Debido al hecho de que las presentes sondas poseen selectividad para desemparejamiento de un solo nucleótido a lo largo de toda la longitud del cebador, las presentes sondas pueden ser excepcionalmente ventajosas en los cebadores de PCR multiplexados por puntos calientes. De manera adicional, el uso de las presentes sondas como cebadores de PCR, que son principalmente bicatenarios, suprimirá la formación de dímeros de cebador, que a menudo limita las capacidades de amplificación multiplexada para PCR. Mediante el uso de diferentes canales de fluorescencia (1, 2, 3 y 4), cada diana podría cuantificarse con muy poca interacción cruzada no deseada.

La FIG. 22 proporciona un conjunto de cebador inverso de PCR de multiplexado de puntos calientes a modo de ejemplo usando sondas de la presente divulgación que se dirigen a cuatro mutaciones diferentes del codón 61 de NRAS. El diseño de secuencia y los cálculos de energía se basan en las descripciones de diseño anteriores, y la proporción de $[P]_0/[C]_0$ que teóricamente alcanza $X = 0$ se calcula para cada sistema de cebador.

La FIG. 23 proporciona un ajuste fino de las sondas dirigidas a una diana de ADN modificando la proporción de $[P]_0/[C]_0$. Las sondas en esta figura fueron diseñadas para unirse a la misma diana de ADN con diferentes energías libres de reacción estándar. Cada cadena complementaria se modificó mediante un fluoróforo TAMRA en el extremo 3', mientras que cada cadena protectora lo hizo mediante un inactivador Iowa Black RQ en el extremo 5'. Los rendimientos de hibridación se obtuvieron experimentalmente a diferentes proporciones $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0$ mediante fluorescencia. Los resultados indican que cada sonda que se muestra en esta figura es ajustable en especificidad y sensibilidad. Todos los experimentos se realizaron con IX PBS a 25°C .

La FIG. 24 proporciona un ajuste fino de sondas dirigidas a una secuencia de ARN (miR-122 sintético) modificando la proporción $[P]_0/[C]_0$. El proceso de diseño de la sonda fue similar al de la Fig. 22, excepto que se usaron parámetros de unión de ARN-ADN. Los procedimientos experimentales fueron los mismos que los de la diana de ADN. Los resultados muestran que la compensación de sensibilidad/especificidad de las sondas para la diana de ARN también es ajustable.

La FIG. 25 proporciona una visión esquemática de la amplificación selectiva de una molécula de ácido nucleico diana usando sondas de la presente divulgación como cebadores auto-reporteros. La primera cadena de ácido nucleico del cebador 10 comprende un fluoróforo F en un extremo, y la segunda cadena de ácido nucleico del cebador comprende un inactivador Q en el otro extremo. Durante el proceso de amplificación 30, tras la hibridación con la molécula de ácido nucleico diana deseada 25, la señal de fluorescencia aumenta a medida que la segunda cadena de ácido nucleico del cebador P se difunde, indicando la formación de amplicón 26.

La FIG. 26 proporciona una visión general esquemática de la amplificación de una molécula de ácido nucleico diana usando sondas de la presente divulgación como sondas marcadas con fluoróforo para cuantificar la cantidad de amplicones deseados formados a través de la amplificación. Una muestra que posiblemente comprende la molécula de ácido nucleico diana deseada 22 se mezcla con la enzima 23, el cebador directo 27, el cebador inverso (no se muestra) y sonda 10 marcada con fluoróforo. La primera cadena de ácido nucleico de la sonda C está funcionalizada con un fluoróforo F internamente y un inactivador en el extremo 3', de modo que la sonda es naturalmente oscura debido a la proximidad del fluoróforo y el inactivador. El cebador directo y la primera cadena de ácido nucleico de la sonda C hibridan con la molécula de nucleótido diana deseada durante el proceso de hibridación 31, mientras que la segunda cadena de ácido nucleico es desplazada por la molécula de ácido nucleico diana. Durante el proceso de extensión 32, la enzima 23 con actividad exonucleasa extiende el cebador y escinde los enlaces fosfodiéster de la primera cadena de ácido nucleico, dando como resultado el aumento de la señal de fluorescencia.

Si bien la presente divulgación es susceptible de diversas modificaciones y formas alternativas, se han mostrado ejemplos de casos específicos en las figuras y se describen en el presente documento con más detalle. Debería entenderse, sin embargo, que la descripción de ejemplos de casos específicos no pretende limitar la invención a las formas particulares descritas.

Descripción

Los sistemas de sonda de ácido nucleico descritos en este documento poseen varias ventajas sobre el sistema

descrito anteriormente. En primer lugar, los métodos y composiciones descritas en el presente documento proporcionan sondas de ADN más económicas para analizar dianas de ARN de secuencia específica; las sondas de ADN para dianas de ARN también pueden mostrar una especificidad mejorada porque la hibridación de ARN es generalmente menos específica que la hibridación de ADN. De manera adicional, los métodos y composiciones en este caso permiten que las sondas de ácido nucleico modificadas, tales como las que incorporan 2'-O-metil nucleótidos o ácido nucleico bloqueado (ANB), se beneficien de la especificidad consistente de un solo nucleótido; estas sondas de ácido nucleico modificadas pueden poseer propiedades deseables tales como resistencia a la nucleasa. En segundo lugar, los métodos y composiciones descritas en el presente documento proporcionan especificidad y rendimiento de sensibilidad que pueden ajustarse finamente mediante la modificación de las concentraciones relativas de la cadena protectora y la complementaria en el sistema de sonda. De manera adicional, los sistemas de sonda también poseen otras dos características deseables: las sondas descritas en el presente documento son extremadamente específicas y las sondas descritas en este documento son operables en un amplio intervalo de temperaturas y concentraciones de sal y, por lo tanto, son funcionalmente fiables en muchas condiciones experimentales diferentes. Por ejemplo, un cambio de una sola base da como resultado rendimientos de unión que difieren en aproximadamente 30 veces en temperaturas de 10 °C a 70 °C. Finalmente, las sondas descritas en el presente documento son cinéticamente rápidas. Por ejemplo, la sonda de la presente divulgación interactúa con la molécula de ácido nucleico diana dentro de un factor de hibridación de 10.

En las Fig. 2A y B se muestra una visión general del sistema de sonda 10 consistente con la presente divulgación que reacciona con su diana T deseada. En este ejemplo, el sistema de sonda 10 consiste en un oligonucleótido/cadena protectora P y un oligonucleótido/cadena complementaria C estando la protectora P en exceso con respecto a la complementaria C. La protectora P y la complementaria C pueden hibridar para formar un complejo parcialmente bicatenario; esto es cierto independientemente de si la protectora P y la complementaria C se introducen por separado en la diana T, o de si reaccionan previamente para formar el complejo. De manera adicional, en algunos casos, puede haber un exceso de complementaria C o de protectora P, de modo que el exceso de cadena puede existir como una molécula monocatenaria además del complejo parcialmente bicatenario de protectora y complementaria. En la FIG. 2A, la proporción de concentración $[P]_0 / [C]_0$ se selecciona de modo que la reacción entre la diana T y el sistema de sonda 10 tenga una energía libre estándar de reacción (ΔG°_{rxn}) igual a $(-RT \ln((\frac{[P]_0}{[C]_0} - [C]_0) / [C]_0))$. Esto resulta, en algún caso, en la mitad de todas las moléculas diana T en una muestra unida a la cadena complementaria C en equilibrio. Con referencia ahora a la FIG. 2B, una variante V de diana que difiere en secuencia de la diana T en la región 7 o en la región 6 de diana-extremo cohesivo, potencialmente por una sola base, se unirá con más energía libre estándar positiva (ΔG°_v) y posee un rendimiento de equilibrio significativamente menor (por ejemplo, del 2 %).

Las secuencias de la cadena protectora P y de la cadena complementaria C están diseñadas basándose en la secuencia de la diana T deseada. Cada cadena se divide conceptualmente en varias regiones no superpuestas, como se muestra en la FIG. 1. Es importante tener en cuenta que la región 7 de validación de la diana (también denominada en el presente documento como la "séptima región") y la región 4 homóloga de diana (también denominada en el presente documento como la "cuarta región"), mientras que ambas son parcial o totalmente complementarias a la región complementaria 2 homóloga de diana (también denominada en el presente documento como la "segunda región"), puede poseer diferentes secuencias. Por ejemplo, una diana de ARN tendrá una región 7 de validación de diana que contiene uracilo, mientras que una protectora P de ADN comprenderá timina en la región 4 homóloga de diana. Como otro ejemplo, la región 4 puede estar parcialmente desemparejada con la región 2 en ciertas posiciones, mientras que la región 7 se adapta perfectamente a la región 2. Como otro ejemplo, tanto la región 4 como la región 7 pueden estar parcialmente desemparejadas con la región 2, pero en diferentes bases de nucleótidos.

La energía libre estándar de la reacción para el sistema de sonda sin un marcador se proporciona mediante $\Delta G^{\circ}_{rxn} = \Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ al que también se hace referencia en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas como "Expresión 1". La energía libre estándar de la reacción para el sistema de sonda con un grupo funcionalizado o marcador se proporciona mediante sin un marcador se proporciona mediante $\Delta G^{\circ}_{rxn} = \Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC}) + \Delta G^{\circ}_{marcador}$ que se menciona en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas como "Expresión 3". Debe entenderse que todos los términos de energía libre estándar usados en el presente documento se evalúan a las condiciones de temperatura y tampón en las que la composición se aplica a la molécula de ácido nucleico diana.

Como se muestra en las FIG. 3 y 5, las Expresiones 1 y 3 se componen de una serie de componentes que representan la energía libre estándar de hibridación entre las diversas regiones de las cadenas protectoras/complementarias/diana de ácido nucleico. Como se muestra en ellas, el término ΔG°_{t-TC} representa la energía libre estándar de hibridación entre la región 6 de diana-extremos cohesivos del ácido nucleico diana T y la región 1 de cadena complementaria C del sistema de sonda 10. Estas regiones pueden ser parcialmente complementarias o totalmente complementarias. En este caso, la expresión "parcialmente complementario" se define como que más del 60 % de los nucleótidos en la primera región son complementarios a los nucleótidos alineados de la sexta región. Sin embargo, debe entenderse que la expresión "parcialmente complementario" con respecto a otras secuencias emparejadas puede tener un significado diferente.

El término ΔG°_{nh-PC} representa la energía libre estándar de hibridación entre la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P y la región 3 complementaria C no homóloga de diana. Estas regiones pueden ser parcialmente complementarias o totalmente complementarias. En este caso, la expresión "parcialmente complementario" se define como que más del 60 % de los nucleótidos en la tercera región son complementarios a los nucleótidos alineados de la quinta región.

El término ΔG°_{v-TC} representa la energía libre estándar de hibridación entre la región 7 de validación del ácido nucleico diana T y la región complementaria 2 homóloga de la diana de la cadena complementaria C. Estas regiones pueden ser parcialmente complementarias o totalmente complementarias. En este caso, el término "parcialmente complementario" se define como que más del 60 % de los nucleótidos en la segunda región son complementarios a los nucleótidos alineados de la séptima región.

El término ΔG°_{h-PC} representa la energía libre estándar de hibridación entre la región 4 homóloga de la cadena protectora P y la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C. Estas regiones pueden ser parcialmente complementarias o totalmente complementarias. En este caso, la expresión "parcialmente complementario" se define como que más del 60 % de los nucleótidos en la segunda región son complementarios a los nucleótidos alineados de la cuarta región.

El término $\Delta G^{\circ}_{\text{marcador}}$ es igual a la energía libre estándar de un marcador en la cadena del complemento (ΔG°_F) menos la energía libre estándar de la interacción entre el marcador y la cadena protectora, incluyendo cualquier otro grupo funcionalizado en la cadena protectora. En el ejemplo en la FIG. 5, el marcador de la cadena protectora (Q) es un inactivador específico para el fluoróforo (F) de la cadena complementaria.

Con referencia todavía a la FIG. 1, en determinados casos, el diseño de las secuencias del sistema de sonda es tal que (1) hay poca o ninguna estructura secundaria en la región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo, y (2) hay poca o ninguna unión entre la región 8 aguas arriba de la diana y la región complementaria 3 no homóloga de diana. En este caso, "poca o ninguna estructura secundaria pequeña" en la región complementaria de diana-extremo cohesivo se define como menos del 50 % de los nucleótidos en la región que se encuentra en estado bicatenario en la estructura de energía libre mínima evaluada, tal como se calcula en las condiciones operativas de temperatura y salinidad. En este caso, "poca o ninguna unión" entre la región aguas arriba de la diana y la región complementaria 3 no homóloga de diana se define como menos del 50 % de los nucleótidos en la región complementaria 3 no homóloga de diana que está en estado bicatenario en la estructura de energía libre mínima evaluada, tal como se calcula en las condiciones operativas de temperatura y salinidad.

Además de la energía libre estándar de la reacción (ΔG°_{rxn}) tal como se determinó, por ejemplo, por la Expresión 1, el diseño de la presente sonda incluye la consideración de las concentraciones relativas de las cadenas protectoras y complementarias de la sonda. Esto permite un ajuste fino de las reacciones modificando la proporción de la cadena protectora frente a la cadena complementaria independientemente del diseño de la secuencia de la sonda. Por lo tanto, en un caso, el diseño del presente sistema de sonda de hibridación de ácido nucleico se basa en lo siguiente:

$$\Delta G^{\circ}_{rxn} = \Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC}) = -R_{\text{tln}}\left(\frac{[P]_0 - [C]_0}{[C]_0}\right) + X$$

o

$$\Delta G^{\circ}_{rxn} = \Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC}) + \Delta G^{\circ}_{\text{marcador}} = -R_{\text{tln}}\left(\frac{[P]_0 - [C]_0}{[C]_0}\right) + X$$

donde X es un valor entre -5 kcal/mol y +5 kcal/mol. El valor de X además permite al usuario controlar la compensación entre la alta sensibilidad molecular y la alta especificidad molecular, con valores más positivos de X que favorecen una mayor especificidad.

Debe entenderse que los valores de los términos de ΔG° solo se pueden calcular aproximadamente en función de los valores de las referencias actualmente disponibles, mientras que las sondas reivindicadas están descritas y limitadas por términos de ΔG° reales. Basándose en los estudios experimentales de los presentes autores sobre valores de ΔG° , los cálculos basados en los parámetros y en los programas informáticos actualmente disponibles pueden diferir de los valores reales en hasta 3 kcal/mol o el 15 %, el que sea más grande.

Por el contrario, el documento WO 2012/058488 describe el diseño de sondas de hibridación de ácido nucleico en las que la restricción de diseño principal es $\Delta G^{\circ}_{t-TC} \approx \Delta G^{\circ}_{nh-PC}$, en el lenguaje de la presente divulgación, donde aproximadamente igual a se define como dentro del 10 % entre sí. En una realización, las energías libres estándar ΔG°_{t-TC} y ΔG°_{nh-PC} para las sondas de la presente invención difieren en más del 10 % porque el valor deseado de X difiere significativamente de 0. En otra realización, las energías libres estándar ΔG°_{t-TC} y ΔG°_{nh-PC} para las sondas de la presente invención difieren en más del 10 % porque $(\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ difiere significativamente de 0. En otra realización, las energías libres estándar ΔG°_{t-TC} y ΔG°_{nh-PC} para las sondas de la presente invención difieren en más del 10 % porque $\frac{[P]_0 - [C]_0}{[C]_0}$ difiere significativamente de 1. En otra realización, las energías libres estándar ΔG°_{t-TC} y ΔG°_{nh-PC} para las sondas de la presente invención difieren en más del 10 % porque $\Delta G^{\circ}_{\text{marcador}}$ difiere

significativamente de 0.

Por lo tanto, el presente sistema de sonda difiere de la técnica anterior en la consideración de los términos ΔG°_{v-TC} , ΔG°_{h-PC} , $\Delta G^{\circ}_{\text{marcador}}$, $\left(\frac{[P]_0 - [C]_0}{[C]_0}\right)$. La negligencia de los términos ΔG°_{v-TC} , ΔG°_{h-PC} lleva a un mal diseño de la sonda en muchos entornos donde las secuencias de nucleótidos de la región 4 y la región 7 no son idénticas, la negligencia del término $\Delta G^{\circ}_{\text{marcador}}$ lleva a un mal diseño de la sonda cuando se utilizan fluoróforos u otros marcadores, la negligencia del término X impide diferentes compensaciones entre especificidad y sensibilidad, y la negligencia de la proporción estequiométrica de los términos impide el ajuste fino del comportamiento del sistema de sonda independiente del diseño de la secuencia y además hace que las sondas funcionen mal en ciertas estequiometrías de P y C. Cada una de estas se discutirá con más detalle a continuación.

En primer lugar, haciendo referencia de nuevo a la FIG. 2A, la región 7 de validación de diana de la diana T y la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P pueden diferir en la secuencia y las propiedades termodinámicas por varias razones, de manera importante en casos donde T y P son diferentes tipos de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la diana T puede ser una molécula de ARN debido a un interés científico/clínico, mientras que la cadena protectora P puede ser una molécula de ADN debido a las capacidades económicas/de síntesis. Como otro ejemplo, la cadena protectora P puede comprender un ácido nucleico modificado, tal como 2'-O-metil nucleótidos o ácido nucleico bloqueado (ANB). Como otro ejemplo, la región 4 y la región 7 pueden ser ADN, pero difieren en la secuencia de nucleótidos para beneficiarse del aumento de la cinética o la disminución de la respuesta biológica no deseada.

Cuando la región 7 de validación de la diana y la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P difieren, entonces los términos ΔG°_{v-TC} y ΔG°_{h-PC} son desiguales y deben considerarse en el proceso de diseño del sistema de sonda dirigido por ΔG°_{rxn} . El valor de $\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC}$ puede desviarse significativamente de cero. Ahora con referencia a la FIG. 4, se muestra la distribución de estos valores para 46 subsecuencias no solapadas diferentes del ARN de transcripción por BRAF (cada una de 50 nt de longitud) frente a las secuencias de ADN homólogas en la unión a un complemento de ADN, utilizando valores de termodinámica de hibridación de ARN-ADN dados por Sugimoto et al. [7] y los valores termodinámicos de hibridación de ADN-ADN dados por SantaLucia y Hicks [8]. Como se puede ver en esos documentos, no solo el valor de $\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC}$ varía de -20 kcal/mol a +20 kcal/mol, sino que los valores también dependen de la temperatura. Por el contrario, incluso una diferencia de 1 kcal/mol en ΔG°_{rxn} puede conducir a cambios significativos en la sensibilidad y/o en la especificidad.

La detección de dianas T de ARN usando sondas de ADN (P y C) es solo una aplicación en la que se debe considerar $\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC}$. Existen otras variaciones del sistema de sonda donde la región de la cadena protectora P homóloga de diana difiere de la región de validación de diana de la diana T, ya sea porque T y P son diferentes tipos de ácidos nucleicos (ARN, ADN, ANB, ANP, ADN de fosfotioato, ácidos 2'-metoxi nucleicos, etc.) o debido a pequeños cambios en la secuencia, que se tratarán en más detalle a continuación.

Al ignorar el término $\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC}$, se debe suponer que el valor total de este término es de 0 kcal/mol. Esta suposición se cumple solo cuando la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P tiene el mismo carácter y secuencia que la región 7 de validación de diana de la diana T, tal como para aplicaciones de dianas de ADN que usan cadenas protectoras de ADN y cuando las regiones 7 y 4 poseen una secuencia de nucleótidos idéntica.

En segundo lugar, muchas aplicaciones de detección o de obtención de imágenes de ácidos nucleicos utilizan marcadores para ayudar a visualizar la existencia o la cantidad de ácidos nucleicos diana. Estos marcadores pueden ser fluoróforos orgánicos, nanopartículas metálicas, o haptenos que reclutan anticuerpos. Con frecuencia, estos marcadores pueden tener efectos termodinámicos significativos, hibridación estabilizante o desestabilizadora de ácido nucleico. El diseño adecuado de los sistemas de sonda que utilizan marcadores debe tener en cuenta las energías libres estándar diferenciales de los marcadores con la cadena protectora y con la diana tal como se muestra en la FIG. 5.

En tercer lugar, como se ha mencionado anteriormente, las concentraciones relativas de la cadena protectora P y complementaria C sirven como un parámetro de ajuste importante para el presente sistema de sonda que existe independientemente del diseño de la secuencia del sistema de sonda. Dado que la comprensión actual de la termodinámica de hibridación de ADN y ARN y la termodinámica de marcadores son imperfectas, la capacidad de modular el rendimiento de un sistema de sonda particular después del diseño y la síntesis es de vital importancia para aplicaciones prácticas que involucren estos sistemas de sonda.

Para comprender el papel de las concentraciones relativas de P y C en el ajuste del rendimiento del sistema de sonda, se debe considerar el equilibrio de la reacción entre la diana y el sistema de sonda. La reacción química general se puede escribir como la expresión a continuación.



Normalmente, las dianas (moléculas biológicas de ADN o ARN) tienen una concentración mucho más baja que los

componentes de la sonda P y PC; las concentraciones más altas de P y PC ayudan a conducir la reacción al equilibrio rápidamente. Una medida útil para juzgar el comportamiento de la reacción es el rendimiento o la sensibilidad del sistema de sonda a la diana T, que se puede expresar como $(\frac{[TC]}{[T]+[TC]})$. Cuando la sensibilidad es aproximadamente del 50 %, es decir, cuando la concentración de equilibrio de T no unido es igual a la concentración de equilibrio de T unido a C ($[T] = [TC]$), la discriminación de veces de cambio contra una variante V de diana ($[TC]/[VC]$) está dentro de un factor de 2 óptimo. El valor de la constante de equilibrio K_{eq} que permite $[T] = [TC]$ puede resolverse analíticamente mediante la siguiente expresión.

$$K_{eq} = \frac{[TC][P]}{[T][TC]} = \frac{[P]}{[PC]}$$

La energía libre estándar de una reacción se puede relacionar con la constante de equilibrio de la reacción mediante la siguiente expresión.

$$\Delta G_{rxn}^{\circ} = -R\tau \ln(K_{eq}) = -R\tau \ln\left(\frac{[P]}{[PC]}\right) = -R\tau \ln\left(\frac{[P]_0 - [C]_0}{[C]_0}\right)$$

En la ecuación anterior, $[P]_0$ denota la concentración inicial de la cadena protectora y $[C]_0$ denota la concentración inicial de la cadena complementaria. Debido a que la concentración de la diana $[T]$ es normalmente mucho más baja que las concentraciones de cualquier cadena protectora o sonda, las concentraciones de equilibrio de $[P]$ y $[PC]$ pueden aproximarse como $[P]_0 - [C]_0$ y $[C]_0$, respectivamente. El término $(\frac{[P]_0 - [C]_0}{[C]_0})$ es invariante de escala y las concentraciones utilizadas para $[P]_0$ y $[C]_0$ por lo tanto, puede ser la alta concentración de la solución madre añadida a una muestra o la concentración final lograda después de la dilución por la muestra. Téngase en cuenta que $[P]_0$ y $[C]_0$ se refieren a las concentraciones totales de P y C, incluidos los presentes en las especies de PC parcialmente bicatenarias. Un método alternativo para escribir esta expresión es $([P]_{libre}]_0 / [PC]_0)$, donde $[P]_{libre}]_0$ denota la concentración inicial de P libre y $[PC]_0$ denota la concentración inicial de PC.

Para su uso en el presente sistema de sonda, la concentración para $[P]_0$ puede ser menor que, igual o mayor que, pero generalmente es mayor que la concentración para $[C]_0$. Por ejemplo, la concentración para $[P]_0$ puede ser de aproximadamente 1,01 veces a aproximadamente 10.000 veces la de $[C]_0$, de aproximadamente 1,1 veces a aproximadamente 1.000 veces la de $[C]_0$, o de aproximadamente 1,2 veces a aproximadamente 100 veces la de $[C]_0$ e incluyendo cualquier intervalo intermedio entre cualquiera de los intervalos proporcionados anteriormente.

En un caso, el comportamiento de la sonda se puede ajustar para lograr aproximadamente un 50 % de sensibilidad mediante el diseño del sistema de sonda de modo que ΔG_{rxn}° está cerca de 0, o de aproximadamente -5 kcal/mol a aproximadamente +5 kcal/mol, y luego se ajusta la $[P]_0$ y la $[C]_0$ de modo que se satisface $\Delta G_{rxn}^{\circ} = -R\tau \ln\left(\frac{[P]_0 - [C]_0}{[C]_0}\right)$. De manera importante, sin ajustar el sistema de sonda a través de $[P]_0$ y $[C]_0$, llega a ser prácticamente imposible obtener una sensibilidad del 50 % (o cualquier otra sensibilidad deseada), debido a la naturaleza de grano grueso de ajustar ΔG_{rxn}° mediante la adición o eliminación de pares de bases/apilamientos.

La FIG. 6 demuestra que un solo par de bases adicional cambia el valor de ΔG_{rxn}° entre -0,6 kcal/mol y -2,2 kcal/mol en 37 °C, Na^+ 1 M.

En la presente divulgación, se proporciona, por lo tanto, un concepto novedoso de ajuste de ΔG_{rxn}° mediante la relación estequiométrica de la cadena protectora P frente a la complementaria C. La precisión de la relación estequiométrica entre P y C está limitada solo por la precisión de los sistemas de manejo de líquidos (por ejemplo, la precisión del pipeteador), y generalmente se puede controlar dentro del 2 %. Este 2 % de precisión de estequiometría, a su vez, da como resultado la misma precisión de rendimiento de ajuste de la sonda $-R\tau \ln(1,02) = -0,012$ kcal/mol como resolución en ΔG_{rxn}° . Por lo tanto, ajustar la termodinámica a través de la estequiometría de P frente a C tiene un factor de 50 más de grano fino que los métodos de la técnica anterior de ajuste de la termodinámica a través de pares de bases adicionales (-0,012 kcal/mol frente a -0,60 kcal/mol). El ajuste de la estequiometría de P y C puede ocurrir en la fase de diseño, o dinámicamente a medida que la sonda se optimiza iterativamente para una aplicación particular.

Los resultados experimentales proporcionados en las FIG. 22 y 23 demuestran la efectividad de ajustar la proporción $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0$ para ajustar la especificidad/sensibilidad de la compensación. La Fig. 22 representa el diseño de secuencia de cuatro sondas diferentes dirigidas a una diana de ADN, cada una diseñada con una ΔG_{rxn}° diferente y el rendimiento observado de la diana de ADN para cada sonda para diferentes valores de $([P]_0 - [C]_0)/[C]_0$. La FIG. 23 representa el diseño de secuencia de cinco sondas diferentes dirigidas a una diana de ARN, cada una diseñada con una ΔG_{rxn}° diferente y el rendimiento observado de la diana de ARN para cada sonda para diferentes valores de

$([P]_{0o}-[C]_{0o})/[C]_{0o}$. Como se enseñó anteriormente, los mayores valores de $([P]_{0o}-[C]_{0o})/[C]_{0o}$ reducen monótonicamente el rendimiento de la hibridación entre la diana y la sonda.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un sistema de sonda en el que $\Delta G_{rxn}^o = -R\gamma \ln \left(\frac{[P]_{0o}-[C]_{0o}}{[C]_{0o}} \right)$ no se satisface, sino que proporciona una ligera variación en la que los valores no son iguales para lograr una compensación diferente entre especificidad y sensibilidad. Con este fin, la propiedad termodinámica del presente sistema de sonda puede expresarse de la siguiente manera:

$$\Delta G_{rxn}^o = -R\gamma \ln \left(\frac{[P]_{0o}-[C]_{0o}}{[C]_{0o}} \right) + X$$

donde X es la desviación de 0. En un caso, el valor de X es de aproximadamente -5 kcal/mol a aproximadamente +5 kcal/mol. Para valores positivos de X, se mejorará la especificidad (contra una variante V de diana), pero la sensibilidad (rendimiento) se reducirá. Para valores negativos de X, se mejorará la sensibilidad pero se reducirá la especificidad como se demuestra en la FIG. 8. En la práctica, ciertas aplicaciones (como las que tratan con alelos raros) pueden requerir una mayor especificidad a costa de la sensibilidad, o viceversa. Los métodos actuales para el ajuste fino de la termodinámica son particularmente útiles para estas aplicaciones que requieren un control complejo de sensibilidad y especificidad (véase también Variantes).

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona diferencias de secuencia menores entre la validación de la diana y las regiones homólogas de diana. La región de validación de la diana (de la diana T) y la región homóloga de la diana (de la cadena protectora P) están destinadas a ser complementarias de la región complementaria homóloga de la diana (de la cadena complementaria C). Sin embargo, puede haber casos en los que sea deseable tener modificaciones de secuencia menores en la validación de la diana y/o en la región homóloga de la diana, de modo que la validación de la diana y/o la región homóloga de la diana son solo parcialmente complementarias de la región complementaria homóloga de la diana. Con este fin, en el caso de que más del 60 % de las bases en la región complementaria homóloga de la diana sean complementarias de la región de validación de diana, y más del 60 % de las bases en la región complementaria homóloga de la diana sean complementarias de la región homóloga de la diana, las sondas resultantes mantienen la coherencia con los principios de construcción de la sonda descritos en el presente documento.

Además, la presente divulgación proporciona un sistema de sonda en el que las orientaciones de 5' a 3' de la cadena protectora y la cadena complementaria se invierten con respecto a las posiciones de las regiones no homólogas y de extremos cohesivos tal como se muestra en la FIG. 7. La síntesis moderna de ácido nucleico ocurre desde el extremo 3' hasta el extremo 5', dando como resultado truncamientos y deleciones que se concentran en el extremo 5'. Por consiguiente, se espera que la orientación original mostrada en las FIG. 1-6 sería deseable porque los truncamientos en la cadena protectora y la complementaria tenderán a equilibrarse entre sí energéticamente, manteniendo la ΔG_{rxn}^o deseada. Por el contrario, en la orientación de diseño mostrada en la FIG. 7, los truncamientos tanto en el protector como en el complemento tenderán a producir una ΔG_{rxn}^o más negativa, reduciendo la fiabilidad y especificidad del sistema de sonda. Estos efectos se mitigan cuando los oligonucleótidos de la cadena protectora y complementaria se purifican después de la síntesis, tal como por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

En el análisis de la energía libre estándar de reacción (ΔG_{rxn}^o), la energía libre estándar de formación ΔG^o de un oligonucleótido no estructurado se define como 0. La constante de equilibrio (K_{eq}) de la reacción entre la diana T y el sistema de sonda (P y C) puede calcularse directamente a partir de la energía libre estándar de la reacción ΔG_{rxn}^o a través de la siguiente expresión:

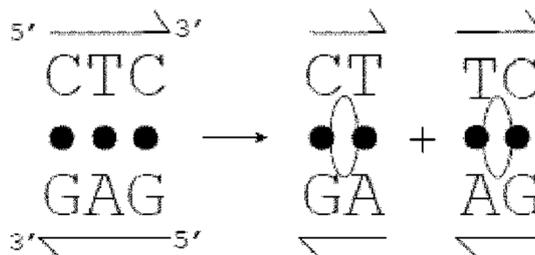
$$K_{eq} = e^{-\Delta G_{rxn}^o/R\tau}$$

donde R = 8,314 J/mol K es la constante de los gases ideales (como alternativa, la constante de Boltzmann), y τ es la temperatura ambiente en Kelvin.

En el diseño del presente sistema de sonda, la reacción ΔG_{rxn}^o se divide en la suma de un número de términos de ΔG^o que denotan la energía libre estándar de hibridación de diversas regiones de la cadena complementaria con la cadena diana y la cadena complementaria con la cadena protectora (por ejemplo, ΔG_{h-PC}^o denota la hibridación de la región no homóloga de diana con la región complementaria no homóloga de diana). Los valores de estos términos se pueden calcular aproximadamente agregando las energías libres estándar de los apilamientos de bases como se describe con más detalle a continuación, aunque los valores actuales de energía libre estándar proporcionados por la bibliografía son incompletos y de precisión limitada. Se necesitan pruebas experimentales para determinar los valores verdaderos de ΔG_{rxn}^o para cada sonda, pero los valores guiados por la bibliografía proporcionan una estimación aproximada de la ΔG_{rxn}^o (generalmente dentro de 3 kcal/mol o del 15 %).

En un caso, las energías libres estándar de hibridación entre regiones del presente sistema de sonda se calculan basándose en un enfoque de apilamiento de pares de bases. En este método, dos pares de bases adyacentes

comprenden un apilamiento, que tiene unos valores de entalpía (ΔH°) y entropía (ΔS°) definidos. La energía libre estándar de cada apilamiento (ΔG°) a una temperatura particular τ (en Kelvin) se puede calcular a partir de la ecuación $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - \tau \Delta S^\circ$. Las energías libres estándar de varios apilamientos se pueden sumar para evaluar la energía libre estándar de una región de unión. Por ejemplo, La energía libre estándar de una región 'CTC' emparejada con una región 'GAG' es la energía libre estándar del apilamiento 'CT/GA' más la energía libre estándar del apilamiento 'TC/AG'. A 37 ° C en Na^+ 1 M, la energía libre estándar del apilamiento 'CT/GA' es de -1,28 kcal/mol y la energía libre estándar del apilamiento 'TC/AG' es -1,30 kcal/mol, entonces la energía libre estándar del emparejamiento de 'CTC' con 'GAG' es de -2,58 kcal/mol.



Los valores de ΔH° y ΔS° de los apilamientos de ADN-ADN, basándose en el trabajo publicado por SantaLucia y Hicks se muestran en la Tabla 1. El cambio de entalpía estándar y el cambio de entropía estándar de los apilamientos de ARN-ADN, basándose en el trabajo publicado por Sugimoto et al., se muestra en la Tabla 2. El cambio de entalpía estándar y el cambio de entropía estándar de los apilamientos de ARN-ARN, basándose en el trabajo publicado por Turner et al., se muestra en la Tabla 3. En la bibliografía se acepta que los valores de ΔH° para los apilamientos de bases son los mismos, independientemente de la salinidad. Por el contrario, el ΔS° de los apilamientos de bases se ajustan a $0,368 \cdot \ln([\text{Na}^+])$ cal/mol*K, independientemente de la identidad de las bases de nucleótidos, debido a las propiedades de cribado electrostático de los cationes. De manera adicional, cationes divalentes (tales como el Mg^{2+}) también se pueden usar en la solución de reacción; los efectos de los cationes divalentes en la termodinámica del emparejamiento de bases se describen en la bibliografía, como por Owczarzy, Biochemistry, 2008. Por último, se pueden usar desnaturalizantes como la formamida para facilitar las reacciones de hibridación, particularmente para aplicaciones de hibridación in situ. Se ha documentado en la bibliografía que cada porcentaje (%) de que el agua es reemplazada por formamida aumenta eficazmente la temperatura en 0,6 °C para propósitos de termodinámica de emparejamiento de bases de ácido nucleico, véase Blake y Delcourt, Nucleic Acids Research, 1996.

Tabla 1. Parámetros termodinámicos para pares de ADN de Watson-Crick en NaCl 1 M.

Secuencia de propagación	ΔH° (kcal mol ⁻¹)	ΔS° (u. a.)
AA/TT	-7,6	-21,3
AT/TA	-7,2	-20,4
TA/AT	-7,2	-21,3
CA/GT	-8,5	-22,7
GT/CA	-8,4	-22,4
CT/GA	-7,8	-21,0
GA/CT	-8,2	-22,2
CG/GC	-10,6	-27,2
GC/CG	-9,8	-24,4
GG/CC	-8,0	-19,9
Iniciación	+0,2	-5,7

Tabla 2. Parámetros termodinámicos para pares dúplex de ARN-ADN en NaCl 1 M.

Secuencia	ΔH° / kcal mol ⁻¹	ΔS° / cal mol ⁻¹ K ⁻¹
rAA dTT	-7,8	-21,9
rAC dTG	-5,9	-12,3
rAG dTC	-9,1	-23,5
rAU dTA	-8,3	-23,9
rCA dGT	-9,0	-26,1
rCC dGG	-9,3	-23,2
rCG dGC	-16,3	-47,1
rCU dGA	-7,0	-19,7
rGA dCT	-5,5	-13,5
rGC dCG	-8,0	-17,1
rGG dCC	-12,8	-31,9
rGU dCA	-7,8	-21,6

(continuación)

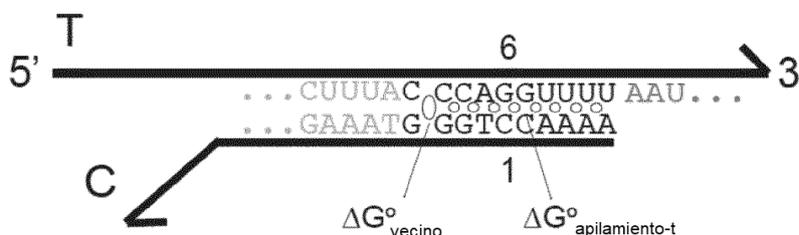
Secuencia	ΔH° / kcal mol ⁻¹	ΔS° / cal mol ⁻¹ K ⁻¹
rUA dAT	-7,8	-23,2
rUC dAG	-8,6	-22,9
rUG dAC	-10,4	-28,4
rUU dAA	-11,5	-36,4
iniciación	1,9	-3,9

Tabla 3. Parámetros termodinámicos para pares dúplex de ARN-ARN en NaCl 1 M.

Secuencia	ΔH° / kcal mol ⁻¹	ΔS° / cal mol ⁻¹ K ⁻¹
AA/UU	-6,6	-18,4
AU/UA	-5,7	-15,5
AC/UG	-10,2	-26,2
AG/UC	-7,6	-19,2
UA/AU	-8,1	-22,6
UC/AG	-13,3	-35,5
UG/AC	-10,5	-27,8
CC/GG	-12,2	-29,7
CG/GC	-8,0	-19,4
GC/CG	-12,2	-29,7
Iniciación	0,0	-10,8

5 En un caso, La energía libre estándar de reacción (ΔG°_{rxn} de la expresión 1 o 3) de hibridación para las diversas regiones del presente sistema de sonda se calcula como se describe a continuación.

10 ΔG°_{t-TC} (la hibridación de la región de diana-extremo cohesivo (región 6) con las regiones complementarias de diana-extremo cohesivo (región 1)) se compone sumando la energía libre estándar de todos los apilamientos de ácido nucleico de la región de extremos cohesivos, el apilamiento vecino y una penalización de energía de iniciación (ΔG°_{ini}), debido a la pérdida entrópica de orientar dos moléculas de ácido nucleico para la hibridación. El valor de la ΔG°_{ini} se puede calcular a partir de ΔH°_{ini} y ΔS°_{ini} a través de $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$



$$\Delta G^\circ_{t-TC} = \Delta G^\circ_{vecino} + \Delta G^\circ_{ini} + \sum \Delta G^\circ_{apilamiento-t}$$

15 Para la hibridación de ADN-ADN como se proporciona en la Tabla 1, $\Delta H^\circ_{ini} = 0,2$ kcal/mol y $\Delta S^\circ_{ini} = -5,7$ cal/(mol•K). Para la hibridación de ARN-ADN como se proporciona en la Tabla 2, $\Delta H^\circ_{ini} = 1,9$ kcal/mol y $\Delta S^\circ_{ini} = -3,9$ cal/(mol•K). Para la hibridación de ARN-ARN como se proporciona en la Tabla 3, $\Delta H^\circ_{ini} = 0,0$ kcal/mol y $\Delta S^\circ_{ini} = -10,8$ cal/(mol•K).

20 En un caso, las sondas descritas en el presente documento tienen un ΔG°_{t-TC} de aproximadamente -2 kcal/mol a aproximadamente -16 kcal/mol, de aproximadamente -5 kcal/mol a aproximadamente -13 kcal/mol, o de aproximadamente -7 kcal/mol a aproximadamente -10 kcal/mol en condiciones de operación.

25 ΔG°_{nh-PC} (la hibridación de la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P con la región complementaria 3 no homóloga de diana de la cadena complementaria C) se compone sumando la energía libre estándar de todas los apilamientos en la región no homóloga, el apilamiento vecino en la región homóloga, y la energía de iniciación de hibridación ΔG°_{ini} . Cada término de energía libre estándar de apilamiento y el término de energía libre estándar de iniciación se calculan basándose en los métodos tratados anteriormente.

30 ΔG°_{v-TC} (la hibridación de la región 7 de validación de diana de la diana T con la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C) es igual a la suma de todos los apilamientos de ácido nucleico en la región

de validación de diana. Cada término de energía libre estándar se calcula basándose en los métodos tratados anteriormente en el presente documento. En este caso, la energía de iniciación ΔG_{ini}° no se aplica en el cálculo de este término.

5 ΔG_{h-PC}° (la hibridación de la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P con la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C) es igual a la suma de todos los apilamientos de ácido nucleico en la región homóloga de diana. Cada término de energía libre estándar se calcula basándose en los métodos tratados anteriormente en el presente documento. En este caso, la energía de iniciación ΔG_{ini}° no se aplica en el cálculo de este término.

10 En un caso, la suma de la energía libre estándar de hibridación entre la región complementaria de diana-extremo cohesivo (región 1) y la región de diana-extremo cohesivo (región 6) y entre la región complementaria homóloga de diana (región 2) y la región de validación de diana (región 7) ($\Delta G_{l-TC}^{\circ} + \Delta G_{v-TC}^{\circ}$) es más negativo que -7 kcal/mol, por ejemplo entre aproximadamente -7 kcal/mol y aproximadamente -70 kcal/mol, entre aproximadamente -7 kcal/mol y aproximadamente -50 kcal/mol, y entre -7 kcal/mol y aproximadamente -30 kcal/mol. En este caso o en otros casos, La suma de la energía libre estándar de hibridación entre la región complementaria no homóloga de diana (región 3) y la región no homóloga de diana (región 5) y entre la región homóloga de diana (región 4) y la región complementaria homóloga de diana (región 2) ($\Delta G_{nh-PC}^{\circ} + \Delta G_{h-PC}^{\circ}$) es más negativa que -10 kcal/mol, por ejemplo entre aproximadamente -10 kcal/mol y aproximadamente -70 kcal/mol, entre aproximadamente -10 kcal/mol y aproximadamente -50 kcal/mol, y entre -10 kcal/mol y aproximadamente -30 kcal/mol.

25 Además de los sistemas de detección de ácidos nucleicos libres de enzimas, las sondas de la presente divulgación son útiles en la aplicación de PCR u otros sistemas de amplificación isotérmica como cebador, por ejemplo, en reacciones de PCR con multiplexado de puntos calientes. Al aplicar las sondas a las reacciones de PCR, la amplificación no deseada se puede minimizar después de un diseño cuidadoso y un ajuste fino. Por lo tanto, dos o más sistemas de cebadores para dianas no idénticas se pueden combinar en una solución para la PCR con multiplexado de puntos calientes. En la Fig. 21 se muestra un esquema de PCR de multiplexado de puntos calientes. Las secuencias de dianas en un grupo de multiplexación pueden ser muy similares debido a la característica de alta especificidad del sistema cebador. El proceso de diseño para cada sistema de cebador en el conjunto de cebadores es el mismo que el de las sondas como se describió anteriormente. La especificidad y la sensibilidad de cada sistema de cebador podrían ajustarse de acuerdo con los resultados experimentales. Un ejemplo de sistemas de cebadores para PCR de multiplexado de puntos calientes se muestra en la FIG. 22.

35 En un aspecto, el método de generación de señal para PCR u otros sistemas de amplificación isotérmica está utilizando una cadena complementaria modificada con fluoróforo y una cadena protectora modificada con inactivador. La cadena protectora se desprendería de la complementaria a medida que avanza la amplificación, entonces la señal de fluorescencia es proporcional al número de copias de la diana amplificada. Se pueden cuantificar diferentes diana simultáneamente mediante el uso de fluoróforos espectrales no superpuestos. Un método de generación de señal similar es el uso de una cadena complementaria modificada con fluoróforo y de una protectora modificada con inactivador como cebadores auto-reporteros como se muestra en la FIG. 25. Otro método de generación de señal similar a las sondas TaqMan tradicionales es el uso de la cadena complementaria modificada con fluoróforo e inactivador y de la protectora no modificada como sondas de detección tal como se muestra en la FIG. 26. En la configuración de multiplexado, las sondas que contienen diferentes fluoróforos se pueden usar para diferentes dianas deseadas. A diferencia de las sondas TaqMan tradicionales que se pueden aplicar solo cuando las dianas deseadas son muy diferentes, para que cada sonda TaqMan solo se una específicamente a una diana y no interfiera con la reacción de otras dianas, las sondas de tipo TaqMan presentadas en la presente divulgación pueden ser especialmente ventajosas para distinguir dianas similares.

50 Cada sistema de sonda descrito en el presente documento puede estar compuesto por ADN, ARN o análogos de los mismos, y/o combinaciones de los mismos. En determinados casos, un sistema de sonda comprende uno o más nucleótidos no naturales. La incorporación de nucleótidos no naturales en los cebadores puede aumentar aún más el rendimiento de los sistemas de sonda, tal como proporcionando una afinidad de unión por base mejorada y una mayor resistencia a la nucleasa.

55 Los sistemas de sonda descritos en el presente documento también se pueden aplicar en el contexto de iniciar reacciones enzimáticas; en tales usos, los sistemas de sonda se denominan sistemas de cebadores, aunque la composición y el método de acción siguen siendo los mismos. Los sistemas de cebadores tal como se describen en la presente divulgación poseen una alta especificidad y capacidad para el ajuste fino del rendimiento, ofreciendo ventajas a los ensayos enzimáticos de ácidos nucleicos.

60 En determinados casos, los cebadores descritos en el presente documento sirven como puntos de partida para extensiones de polimerasa, incluidas, pero sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa para la replicación de moldes de ADN, la transcripción para la producción de ARN a partir de moldes de ADN, y la transcripción inversa para la producción de ADN a partir de moldes de ARN, métodos isotérmicos de amplificación de ADN y ARN, tales como la amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), la amplificación dependiente de helicasa (HDA), la amplificación de recombinasa polimerasa (ARP), la

65

reacción de amplificación exponencial isotérmica (EXPAR), la reacción de amplificación de la enzima nicking (NEAR), la amplificación de círculo rodante (RCA) y amplificación mediada por transcripción (TMA). La naturaleza de alta especificidad de los cebadores desvelados en el presente documento los hace adecuados para investigación y aplicaciones clínicas en las que solo se deben extender y amplificar subconjuntos de ácidos nucleicos con secuencias particulares.

Una "diana" para un sistema de sonda descrito en el presente documento puede ser cualquier ácido nucleico monocatenario, tal como ADN monocatenario y ARN monocatenario, incluyendo ADN y ARN bicatenarios que se vuelven monocatenarios mediante choque térmico, amplificación asimétrica, unión competitiva, y otros métodos estándar para la técnica. Una "diana" para un sistema de cebador puede ser cualquier ácido nucleico monocatenario (ss) o bicatenario (ds), por ejemplo, ADN, ARN, o el producto de ADN de ARN sometido a transcripción inversa. En algunos casos, una diana puede ser una mezcla (quimera) de ADN y ARN. En otros casos, una diana comprende análogos artificiales de ácido nucleico, por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (Nielsen et al. *Science* 254(5037): 1497-500 (1991)) o ácidos nucleicos bloqueados (Alexei et al. *Tetrahedron* 54(14): 3607-30 (1998)). En algunos casos, una diana puede ser de origen natural (por ejemplo, ADN genómico) o puede ser sintético (por ejemplo, de una biblioteca genómica). Tal como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico "de origen natural" es una secuencia que está presente en las moléculas de ácido nucleico de organismos o virus que existe en la naturaleza en ausencia de intervención humana. En algunos casos, una diana es ADN genómico, ARN mensajero, ARN ribosómico, micro-ARN, pre-micro-ARN, pro-micro-ARN, ARN largo no codificante, ARN pequeño, ADN modificado epigenéticamente, ARN modificado epigenéticamente, ADN vírico, ARN vírico o piwi-ARN. En determinados casos, un ácido nucleico diana es un ácido nucleico de origen natural de un organismo o virus. En algunos casos, un ácido nucleico diana es el ácido nucleico de un organismo patógeno o virus. En ciertos casos, la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana en un sujeto es indicativo de que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno o está predispuesto a adquirir una enfermedad o trastorno. En ciertos casos, la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana en un sujeto es indicativo de que el sujeto responderá bien o mal a un tratamiento, tal como un fármaco, para tratar una enfermedad o trastorno. En ciertos casos, la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana en un sujeto es indicativo de que el sujeto que ha sido tratado previamente por cáncer y está en remisión puede estar en riesgo de recurrencia del cáncer.

Los términos "polinucleótido", "ácido nucleico", "oligonucleótido", y "molécula de ácido nucleico" se usan indistintamente. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden realizar cualquier función. Los siguientes son ejemplos no limitantes de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento de gen, loci (locus) definidos a partir del análisis de enlace, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos. Si está presente, pueden impartirse modificaciones a la estructura de los nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje. El término polinucleótido "recombinante" se refiere a un polinucleótido de origen genómico, ADNc, semisintético o sintético que no se produce en la naturaleza o está unido a otro polinucleótido en una disposición no natural. La expresión "ácido nucleico aislado" se refiere a un polinucleótido de origen natural o sintético o alguna combinación de los mismos, que (1) no está asociado con la célula en la que el "ácido nucleico aislado" se encuentra en la naturaleza, y/o (2) está operativamente unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza.

Un ácido nucleico también puede abarcar ADN y ARN monocatenarios y bicatenarios, así como cualquiera y todas las formas de ácido nucleico alternativas que contienen bases, azúcares y estructuras principales modificadas. La expresión "ácido nucleico", por lo tanto, se entenderá que incluye, pero sin limitación, ADN o ARN monocatenario o bicatenario (y formas de los mismos que pueden ser parcialmente monocatenarios o parcialmente bicatenarios), ADNc, aptámeros, ácido nucleico peptídico (ANP), ADN 2'-5' (un material sintético con una estructura principal acortada que tiene un espaciado de bases que coincide con la conformación A del ADN; el ADN 2'-5' normalmente no hibridará con el ADN en la forma B, pero hibridará fácilmente con ARN) y ácidos nucleicos bloqueados ("ANB"). Los análogos de ácido nucleico incluyen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen una unión similar o mejorada, hibridación de propiedades de emparejamiento de bases. Las formas "análogas" de purinas y pirimidinas son bien conocidas en la técnica e incluyen, pero sin limitación, aziridinilcitosina, 4-acetilcitosina, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N.sup.6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, éster metílico de ácido uracilo-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracilo-5-oxiacético y 2,6-diaminopurina. Los análogos de la estructura principal de ADN proporcionados en el presente documento incluyen fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, alquilfosfotriéster, sulfamato, 3'-tioacetato, metileno(metilimino), 3'-N-carbamato, carbamato de morfolino y ácidos nucleicos peptídicos (ANP), enlaces de metilfosfonato o enlaces alternos de metilfosfonato y fosfodiéster (Strauss-Soukup, 1997, *Biochemistry* 36:8692-8698), y enlaces de bencilfosfonato, tal como se discute

en la patente de EE.UU. N.º 6.664.057; véase también OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES, A PRACTICAL APPROACH, editado por F. Eckstein, IRL Press en Oxford University Press (1991); Antisense Strategies, Annals of the New York Academy of Sciences, Volumen 600, Eds. Baserga y Denhardt (NYAS 1992); Milligan, 1993, J. Med. Chem. 36: 1923-1937; Antisense Research and Applications (1993, CRC Press). Los ácidos nucleicos de presente documento se pueden extraer de células o se pueden preparar sintéticamente de acuerdo con cualquier medio conocido por los expertos en la materia; por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden sintetizar químicamente o se pueden transcribir o transcribirse inversamente a partir de ADNc o ARNm, entre otras fuentes.

Un ácido nucleico diana utilizado en el presente documento puede ser cualquier ácido nucleico, por ejemplo, ácido nucleico humano, ácido nucleico bacteriano o ácido nucleico vírico. Una muestra de ácido nucleico diana o una muestra que comprende un ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, una muestra de ácido nucleico de una o más muestras biológicas que incluye, pero sin limitación, sangre completa, ácidos nucleicos extraídos de sangre completa, plasma, ácidos nucleicos extraídos del plasma, esputo, deposiciones, orina, células, tejidos o fluidos corporales de frotis bucal o nasal. Las muestras biológicas diana se pueden obtener de cualquier fuente, incluyendo, pero sin limitación, eucariotas, plantas, animales, vertebrados, animales marinos, mamíferos, seres humanos, seres no humanos, bacterias, microbios, virus, fuentes biológicas, suero, plasma, sangre, orina, semen, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, biopsias, biopsias por aspiración con aguja, cánceres, tumores, tejidos, células, lisados celulares, lisados de células sin tratamiento, lisados de tisulares, células de cultivo tisular, frotis bucales, enjuagues bucales, deposiciones, tejido momificado, fuentes forenses, autopsias, fuentes arqueológicas, infecciones, infecciones nosocomiales, fuentes de producción, preparaciones de fármacos, producciones de moléculas biológicas, preparaciones proteicas, preparaciones lipídicas, preparaciones de carbohidratos, objetos inanimados, aire, suelo, savia, metal, fósiles, materiales excavados y/u otros materiales y fuentes terrestres o extraterrestres. La muestra también puede contener mezclas de material de una fuente o de fuentes diferentes. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de una bacteria o virus infeccioso se pueden amplificar junto con los ácidos nucleicos humanos cuando los ácidos nucleicos de tales células o tejidos infectados se amplifican usando los métodos desvelados. Los tipos de muestras diana útiles incluyen muestras eucariotas, muestras de plantas, muestras de animales, muestras de vertebrados, muestras de animales marinos, muestras de mamíferos, muestras humanas, muestras no humanas, muestras bacterianas, muestras microbianas, muestras víricas, muestras biológicas, muestras de suero, muestras de plasma, fósiles, materiales de sangre, muestras de orina, muestras de semen, muestras de líquido linfático, muestras de líquido cefalorraquídeo, muestras de líquido amniótico, muestras de biopsia, muestras de biopsia por aspiración con aguja, muestras de cáncer, muestras de tumor, muestras de tejido, muestras celulares, muestras de lisado celular, muestras de lisado celulares sin tratamiento, muestras de lisado tisular, muestras de células de cultivo tisular, muestras de frotis bucales, muestras de enjuague bucal, muestras de heces, muestras de tejido momificado, muestras de autopsia, muestras arqueológicas, muestras de infección, muestras de infección nosocomial, muestras de producción, muestras de preparación de medicamentos, muestras de producción de moléculas biológicas, muestras de preparación de proteínas, muestras de preparación de lípidos, muestras de preparación de carbohidratos, muestras de objetos inanimados, muestras de aire, muestras de suelo, muestras de savia, muestras de metal, muestras fósiles, muestras de material excavado y/u otras muestras terrestres o extraterrestres. En algunos casos, los ácidos nucleicos diana utilizados en el presente documento comprenden una secuencia repetitiva, estructura secundaria, y/o un elevado contenido de G/C.

En determinados casos, una molécula de ácido nucleico diana de interés tiene una longitud de aproximadamente 19 a aproximadamente 1.000.000 de nucleótidos (nt). En algunos casos, la diana es de aproximadamente 19 a aproximadamente 100, de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 1000 a aproximadamente 10.000, de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 100.000, o de aproximadamente 100.000 a aproximadamente 1.000.000 de nucleótidos de longitud. En algunos casos, la diana es de aproximadamente 20, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900, aproximadamente 1.000, aproximadamente 2.000, aproximadamente 3.000, aproximadamente 4.000, aproximadamente 5.000, aproximadamente 6.000, aproximadamente 7.000, aproximadamente 8.000, aproximadamente 9.000, aproximadamente 10.000, aproximadamente 20.000, aproximadamente 30.000, aproximadamente 40.000, aproximadamente 50.000, aproximadamente 60.000, aproximadamente 70.000, aproximadamente 80.000, aproximadamente 90.000, aproximadamente 100.000, aproximadamente 200.000, aproximadamente 300.000, aproximadamente 400.000, aproximadamente 500.000, aproximadamente 600.000, aproximadamente 700.000, aproximadamente 800.000, aproximadamente 900.000, o aproximadamente 1.000.000 de nucleótidos de longitud. Debe entenderse que el ácido nucleico diana puede proporcionarse en el contexto de un ácido nucleico más largo (por ejemplo, como una secuencia o gen codificante dentro de un cromosoma o un fragmento de cromosoma).

En determinados casos, una diana de interés es lineal, mientras que en otros casos, una diana es circular (por ejemplo, ADN plasmídico, ADN mitocondrial o ADN plástido).

En algunos casos, en el presente este documento se proporcionan sistemas de cebador-diana. Un sistema de cebador-diana comprende una o más dianas de ácido nucleico, una polimerasa y uno o más cebadores (por ejemplo, un cebador dúplex). El término "cebador" abarca uno cualquiera de los cebadores o sistemas de cebadores descritos en el presente documento. En determinados casos, los sistemas de cebador-diana descritos en el presente

documento comprenden una pluralidad de cebadores diferentes. En algunos casos, un sistema de cebador-diana puede comprender al menos dos cebadores, que se puede usar para identificar y, por ejemplo, amplificar, una molécula de ácido nucleico diana. Una molécula de ácido nucleico diana puede estar presente entre una pluralidad de moléculas de ácido nucleico no diana, por ejemplo, como una sola copia o en número de copia bajo. Cualquiera de los sistemas cebador-diana descritos en el presente documento puede comprender condiciones similares a las utilizadas en la amplificación de ácidos nucleicos o reacciones de secuenciación (por ejemplo, reactivos similares, temperatura de reacción, etc.).

En el presente documento se proporcionan kits que comprenden (1) al menos una cadena complementaria que tiene una región complementaria homóloga de diana (región 2), una región complementaria no homóloga de diana (región 3) y una región complementaria de diana-extremo cohesivo (región 1), y (2) al menos una cadena protectora que tiene una región homóloga de diana (región 4) y una región no homóloga diana (región 5). En el presente documento se proporcionan kits que comprenden al menos un cebador dúplex que comprende (1) al menos una cadena complementaria que tiene una región complementaria homóloga de diana, una región complementaria no homóloga de diana, y una región complementaria de diana-extremo cohesivo, y (2) al menos una cadena protectora que tiene una región homóloga de diana y una región no homóloga de diana.

Cualquiera de los kits descritos en el presente documento puede comprender además una polimerasa, incluida la transcriptasa inversa. Cualquiera de los kits proporcionados en el presente documento puede comprender además uno o más agentes seleccionados de tampón (por ejemplo, KC1, MgCl₂, Tris-HCl), dNTP (por ejemplo, dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y agua. Cualquiera de los kits proporcionados en el presente documento puede comprender que la cadena protectora esté en exceso molar del cebador. Cualquiera de los kits proporcionados en el presente documento puede comprender además instrucciones o directrices para obtener instrucciones (por ejemplo, de un sitio web) para el uso de los componentes de los kits. Cualquiera de los kits proporcionados en el presente documento puede comprender además al menos un tubo de reacción, un pocillo, una cámara o similar.

Salvo que se indique otra cosa, se comprende que todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción y otros que se usan en la memoria descriptiva están previstos como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante la presente invención. Como mínimo, y no en un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos indicados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo habituales.

El uso de la palabra "un" o "uno/a", cuando se usa junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar "uno/a" pero también está en consonancia con el significado de "uno/a o más", "al menos uno/a", y "uno/a o más de uno/a". Tal como se usa en el presente documento, "otro" puede significar al menos un segundo o más.

Se contempla que cualquier caso tratado en la presente memoria descriptiva puede implementarse con respecto a cualquier método o composición de la invención, y viceversa. Asimismo, las composiciones de la invención se pueden usar para conseguir los métodos de la invención.

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación de error inherente para el dispositivo, el método que se está empleando para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para dar a entender "y/o" a menos que se indique explícitamente para referirse solo a alternativas o las alternativas sean mutuamente excluyentes.

Tal y como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las palabras "comprendiendo" (y cualquier forma de comprendiendo, tal como "comprender" y "comprende"), "teniendo" (y cualquier forma de teniendo, tal como "tener" y "tiene"), "incluyendo" (y cualquier forma de incluyendo, tal como "incluir" e "incluye") o "conteniendo" (y cualquier forma de conteniendo, tal como "contener" y "contiene") son inclusivas o abiertas y no excluyen elementos o etapas de métodos adicionales que no se hayan mencionado.

Para facilitar una mejor comprensión de la presente invención, se dan los siguientes ejemplos de casos específicos. De ninguna manera deben leerse los siguientes ejemplos para limitar o definir el alcance completo de la invención.

Ejemplos

Doce ejemplos de sistemas de sonda de ADN para una diana de ARN se muestran en las Figuras 9-20.

Los siguientes ejemplos demuestran los principios de diseño, ilustran las matemáticas de los cálculos de la energía libre estándar de reacción (ΔG°) para las diferentes regiones, y ejemplifican los sistemas de sonda típicos generados

en el método descrito en la presente divulgación. Estos ejemplos representativos abarcan un intervalo de diferentes secuencias diana biológicas, se calculan para varias temperaturas de operación y salinidades diferentes. El ejemplo 11 muestra además el diseño de una sonda destinada a operar en una concentración de la formamida desnaturalizante. También se proporcionan las relaciones estequiométricas $[P]_0/[C]_0$ necesarias para satisfacer el valor de energía libre estándar de la Expresión 1 que es igual al valor de energía libre estándar de la Expresión 2.

Tabla 4: Energía libre estándar y datos estequiométricos para las sondas de los Ejemplos 1-12.

Ej.	ΔG°_{h-PC} (kcal/mol)	ΔG°_{nh-PC} (kcal/mol)	ΔG°_{v-TC} (kcal/mol)	ΔG°_{t-TC} (kcal/mol)	ΔG°_{rxn} (kcal/mol)	$[P]_0 - [C]_0$	$[P]_0$
						$[C]_0$	$[C]_0$
1	-24,16	-11,68	-27,60	-8,09	0,15	0,78 7,8 0,1	1,78 8,8 1,10
2	-28,45	-10,02	-32,83	-6,26	-0,61	2,69	3,69
3	-31,15	-7,71	-26,44	-8,61	-1,54	12,14	13,14
4	-17,06	-9,59	-16,75	-10,36	-0,46	2,11	3,11
5	-11,68	-9,20	-13,42	-8,94	-1,49	11,2	12,2
6	-25,43	-5,25	-21,76	-9,12	-0,22	1,43	2,43
7	-12,95	-14,35	-15,94	-10,33	1,03	0,19	1,19
8	-31,64	-11,59	-34,77	-8,73	-0,27	1,55	2,55
9	-22,50	-14,81	-28,20	-9,48	-0,37	1,82	2,82
10	-19,12	-9,45	-19,84	-9,39	-0,66	3,00	4,00
11	-20,56	-11,09	-22,58	-8,75	0,32	0,58	1,58
12	-7,45	-4,43	-7,54	-7,50	-3,07	100,0	101,0

Ejemplo 1

El ejemplo 1 proporciona una sonda dirigida al ácido nucleico diana por BRAF 11-30 como se muestra en la FIG. 9. Los siguientes valores de ΔG° para la hibridación de la sonda con la diana a 37 °C, Na^+ 1 M se proporcionan en la Tabla 4: (1) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{h-PC}); (2) hibridación de la región complementaria 3 no homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{nh-PC}); (3) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 7 de validación de diana de la diana T (ΔG°_{v-TC}); (4) hibridación de la región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo de la cadena complementaria C con la región 6 de diana-extremo cohesivo de la diana T (ΔG°_{t-TC}); y (5) ΔG°_{rxn} que es $\Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ (Expresión 1). Además, la relación estequiométrica $([P]_0/[C]_0)$ que permite que el valor proporcionado por ΔG°_{rxn} según la Expresión 1 tenga un valor idéntico al proporcionado por la Expresión 2 también se proporciona en la Tabla 4. Por último, el valor X proporciona la variación en la Expresión 2 para obtener un valor igual a la Expresión 1 dadas las proporciones estequiométricas correspondientes y fue 0,00, 1,42 y -1,27 kcal/mol, respectivamente.

Ejemplo 2

El ejemplo 2 proporciona una sonda dirigida al ácido nucleico diana por BRAF 71-90 como se muestra en la FIG. 10. Los siguientes valores de ΔG° para la hibridación de la sonda con la diana a 37 °C, Na^+ 1 M se proporcionan en la Tabla 4: (1) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{h-PC}); (2) hibridación de la región complementaria 3 no homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{nh-PC}); (3) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 7 de validación de diana de la diana T (ΔG°_{v-TC}); (4) hibridación de la región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo de la cadena complementaria C con la región 6 de diana-extremo cohesivo de la diana T (ΔG°_{t-TC}); y (5) ΔG°_{rxn} que es $\Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ (Expresión 1). Además, la relación estequiométrica $([P]_0/[C]_0)$ que permite que el valor proporcionado por ΔG°_{rxn} según la Expresión 1 tenga un valor idéntico al proporcionado por la Expresión 2 también se proporciona en la Tabla 4.

Ejemplo 3

El ejemplo 3 proporciona una sonda dirigida al ácido nucleico diana por BRAF 131-160 como se muestra en la FIG. 11. Los siguientes valores de ΔG° para la hibridación de la sonda con la diana a 37 °C, Na^+ 1 M se proporcionan en la Tabla 4: (1) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{h-PC}); (2) hibridación de la región complementaria 3 no homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{nh-PC}); (3) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 7 de validación de diana de la diana T (ΔG°_{v-TC}); (4) hibridación de la región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo de la cadena complementaria C con la región 6 de diana-extremo cohesivo de la diana T (ΔG°_{t-TC});

y (5) ΔG°_{rxn} que es $\Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ (Expresión 1). Además, la relación estequiométrica $([P]_0/[C]_0)$ que permite que el valor proporcionado por ΔG°_{rxn} según la Expresión 1 tenga un valor idéntico al proporcionado por la Expresión 2 también se proporciona en la Tabla 4.

5 Ejemplo 4

El ejemplo 4 proporciona una sonda dirigida al ácido nucleico diana por BRAF 191-220 como se muestra en la FIG. 12. Los siguientes valores de ΔG° para la hibridación de la sonda con la diana a 52 °C, Na^+ 1 M se proporcionan en la Tabla 4: (1) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{h-PC}); (2) hibridación de la región complementaria 3 no homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{nh-PC}); (3) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 7 de validación de diana de la diana T (ΔG°_{v-TC}); (4) hibridación de la región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo de la cadena complementaria C con la región 6 de diana-extremo cohesivo de la diana T (ΔG°_{t-TC}); y (5) ΔG°_{rxn} que es $\Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ (Expresión 1). Además, la relación estequiométrica $([P]_0/[C]_0)$ que permite que el valor proporcionado por ΔG°_{rxn} según la Expresión 1 tenga un valor idéntico al proporcionado por la Expresión 2 también se proporciona en la Tabla 4.

20 Ejemplo 5

El ejemplo 5 proporciona una sonda dirigida al ácido nucleico diana por BRAF 251-280 como se muestra en la FIG. 13. Los siguientes valores de ΔG° para la hibridación de la sonda con la diana a 65 °C, Na^+ 1 M se proporcionan en la Tabla 4: (1) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{h-PC}); (2) hibridación de la región complementaria 3 no homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{nh-PC}); (3) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 7 de validación de diana de la diana T (ΔG°_{v-TC}); (4) hibridación de la región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo de la cadena complementaria C con la región 6 de diana-extremo cohesivo de la diana T (ΔG°_{t-TC}); y (5) ΔG°_{rxn} que es $\Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ (Expresión 1). Además, la relación estequiométrica $([P]_0/[C]_0)$ que permite que el valor proporcionado por ΔG°_{rxn} según la Expresión 1 tenga un valor idéntico al proporcionado por la Expresión 2 también se proporciona en la Tabla 4.

30 Ejemplo 6

El ejemplo 6 proporciona una sonda dirigida al ácido nucleico diana por BRAF 311-350 como se muestra en la FIG. 14. Los siguientes valores de ΔG° para la hibridación de la sonda con la diana a 52 °C, Na^+ 1 M se proporcionan en la Tabla 4: (1) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{h-PC}); (2) hibridación de la región complementaria 3 no homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{nh-PC}); (3) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 7 de validación de diana de la diana T (ΔG°_{v-TC}); (4) hibridación de la región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo de la cadena complementaria C con la región 6 de diana-extremo cohesivo de la diana T (ΔG°_{t-TC}); y (5) ΔG°_{rxn} que es $\Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ (Expresión 1). Además, la relación estequiométrica $([P]_0/[C]_0)$ que permite que el valor proporcionado por ΔG°_{rxn} según la Expresión 1 tenga un valor idéntico al proporcionado por la Expresión 2 también se proporciona en la Tabla 4.

50 Ejemplo 7

El ejemplo 7 proporciona una sonda dirigida al ácido nucleico diana por BRAF 431-460 como se muestra en la FIG. 15. Los siguientes valores de ΔG° para la hibridación de la sonda con la diana a 65 °C, Na^+ 1 M se proporcionan en la Tabla 4: (1) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{h-PC}); (2) hibridación de la región complementaria 3 no homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{nh-PC}); (3) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 7 de validación de diana de la diana T (ΔG°_{v-TC}); (4) hibridación de la región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo de la cadena complementaria C con la región 6 de diana-extremo cohesivo de la diana T (ΔG°_{t-TC}); y (5) ΔG°_{rxn} que es $\Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ (Expresión 1). Además, la relación estequiométrica $([P]_0/[C]_0)$ que permite que el valor proporcionado por ΔG°_{rxn} según la Expresión 1 tenga un valor idéntico al proporcionado por la Expresión 2 también se proporciona en la Tabla 4.

60 Ejemplo 8

El ejemplo 8 proporciona una sonda dirigida al ácido nucleico diana por BRAF 491-520 como se muestra en la FIG. 16. Los siguientes valores de ΔG° para la hibridación de la sonda con la diana a 37 °C, Na^+ 1 M se proporcionan en la Tabla 4: (1) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{v-TC}); (2) hibridación de la región complementaria 3 no

homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{nh-PC}); (3) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 7 de validación de diana de la diana T (ΔG°_{v-TC}); (4) hibridación de la región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo de la cadena complementaria C con la región 6 de diana-extremo cohesivo de la diana T (ΔG°_{t-TC}); y (5) ΔG°_{rxn} que es $\Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ (Expresión 1). Además, la relación estequiométrica ($[P]_0/[C]_0$) que permite que el valor proporcionado por ΔG°_{rxn} según la Expresión 1 tenga un valor idéntico al proporcionado por la Expresión 2 también se proporciona en la Tabla 4.

Ejemplo 9

El ejemplo 9 proporciona una sonda dirigida al ácido nucleico diana por BRAF 551-580 como se muestra en la FIG. 17. Los siguientes valores de ΔG° para la hibridación de la sonda con la diana a 37 °C, Na^+ 1 M se proporcionan en la Tabla 4: (1) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{h-PC}); (2) hibridación de la región complementaria 3 no homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{nh-PC}); (3) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 7 de validación de diana de la diana T (ΔG°_{v-TC}); (4) hibridación de la región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo de la cadena complementaria C con la región 6 de diana-extremo cohesivo de la diana T (ΔG°_{t-TC}); y (5) ΔG°_{rxn} que es $\Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ (Expresión 1). Además, la relación estequiométrica ($[P]_0/[C]_0$) que permite que el valor proporcionado por ΔG°_{rxn} según la Expresión 1 tenga un valor idéntico al proporcionado por la Expresión 2 también se proporciona en la Tabla 4.

Ejemplo 10

El ejemplo 10 proporciona una sonda dirigida al ácido nucleico diana por BRAF 611-630 como se muestra en la FIG. 18. Los siguientes valores de ΔG° para la hibridación de la sonda con la diana a 25 °C, Na^+ 1 M se proporcionan en la Tabla 4: (1) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{h-PC}); (2) hibridación de la región complementaria 3 no homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{nh-PC}); (3) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 7 de validación de diana de la diana T (ΔG°_{v-TC}); (4) hibridación de la región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo de la cadena complementaria C con la región 6 de diana-extremo cohesivo de la diana T (ΔG°_{t-TC}); y (5) ΔG°_{rxn} que es $\Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ (Expresión 1). Además, la relación estequiométrica ($[P]_0/[C]_0$) que permite que el valor proporcionado por ΔG°_{rxn} según la Expresión 1 tenga un valor idéntico al proporcionado por la Expresión 2 también se proporciona en la Tabla 4.

Ejemplo 11

El ejemplo 11 proporciona una sonda dirigida al ácido nucleico diana por BRAF 670-700 como se muestra en la FIG. 19. Los siguientes valores de ΔG° para la hibridación de la sonda con la diana a 25 °C, Na^+ 1 M en formamida al 30 % se proporcionan en la Tabla 4: (1) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{h-PC}); (2) hibridación de la región complementaria 3 no homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{nh-PC}); (3) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 7 de validación de diana de la diana T (ΔG°_{v-TC}); (4) hibridación de la región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo de la cadena complementaria C con la región 6 de diana-extremo cohesivo de la diana T (ΔG°_{t-TC}); y (5) ΔG°_{rxn} que es $\Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ (Expresión 1). Además, la relación estequiométrica ($[P]_0/[C]_0$) que permite que el valor proporcionado por ΔG°_{rxn} según la Expresión 1 tenga un valor idéntico al proporcionado por la Expresión 2 también se proporciona en la Tabla 4.

El ejemplo 12 proporciona una sonda dirigida a un ácido nucleico diana de ADN tal como se muestra en la FIG. 20. Los siguientes valores de ΔG° para la hibridación de la sonda con la diana a 62 °C, Mg^{2+} 3 mM se proporcionan en la Tabla 4: (1) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 4 homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{h-PC}); (2) hibridación de la región complementaria 3 no homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 5 no homóloga de diana de la cadena protectora P (ΔG°_{nh-PC}); (3) hibridación de la región complementaria 2 homóloga de diana de la cadena complementaria C con la región 7 de validación de diana de la diana T (ΔG°_{v-TC}); (4) hibridación de la región complementaria 1 de diana-extremo cohesivo de la cadena complementaria C con la región 6 de diana-extremo cohesivo de la diana T (ΔG°_{t-TC}); y (5) ΔG°_{rxn} que es $\Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$ (Expresión 1). Además, la relación estequiométrica ($[P]_0/[C]_0$) que permite que el valor proporcionado por ΔG°_{rxn} según la Expresión 1 tenga un valor idéntico al proporcionado por la Expresión 2 también se proporciona en la Tabla 4.

A pesar de que los intervalos numéricos y parámetros que establecen el amplio alcance de la invención sean aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se presentan de la forma más precisa posible. Cualquier valor numérico, sin embargo, inherentemente contiene ciertos errores necesariamente resultantes de la desviación estándar encontrada en sus respectivas mediciones de prueba, así como errores

experimentales en los valores documentados en la bibliografía.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> WILLIAM MARSH RICE UNIVERSITY	
	<120> SONDAS DE HIBRIDACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO ULTRAESPECÍFICAS DE AJUSTE FINO	
	<130> 13-21120-WO	
10	<140> PCT/US2014/052827	
	<141> 27/08/2014	
	<150> 61/916.321	
15	<151> 16/12/2013	
	<160> 70	
	<170> PatentIn versión 3.5	
20	<210> 1	
	<211> 18	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 1	
30	cuuuaccag guuuuau	18
	<210> 2	
	<211> 15	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 2	
	aaaacctggg taaag	15
	<210> 3	
	<211> 27	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
50	<400> 3	
	actttaaga agtgagcgtg ggcggtg	27
	<210> 4	
55	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 4	
	gccaccaccg ccaccgtca cttctaaaa gt	32
65	<210> 5	
	<211> 40	

ES 2 771 773 T3

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 5	
	auggcggcgc ugagcggugg cggugguggc ggcgcggagc	40
10	<210> 6	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 6	
20	caaaatgaac agcccgaggc cggcgc	26
	<210> 7	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 7	
30	gccggcgcgc gcctcgggct gttcattttg	30
	<210> 8	
	<211> 40	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 8	
	ggggacaugg agcccgaggc cggcgcgggc gccggcgcgc	40
	<210> 9	
	<211> 29	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
50	<400> 9	
	gacatgtcgc ggaggagggt tggaatatc	29
	<210> 10	
	<211> 39	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 10	
	tcattgttt gatattccac acctcctccg cgacatgtc	39
65	<210> 11	
	<211> 50	

ES 2 771 773 T3

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 11	
	ccugccauuc cggaggaggu guggaauauc aaacaaauga uuaaguugac	50
10	<210> 12	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 12	
20	catgctggtg tattggacaa atttgggtg	29
	<210> 13	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 13	
30	gattatgctc cccaccaaattgtccaata caccagcatg	40
	<210> 14	
	<211> 50	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 14	
	auagaggccc uauuggacaa auuugguggg gagcauauc caccaucaau	50
	<210> 15	
	<211> 29	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
50	<400> 15	
	gcacggattc ccaatacacc agcaagcta	29
	<210> 16	
	<211> 42	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 16	
	gttgagtgct atctagctg ctggtgtatt gggaatccgt gc	42
65	<210> 17	
	<211> 50	

ES 2 771 773 T3

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 17	
	gccuaugaag aauacaccag caagcuagau gcacuccaac aaagagaaca	50
10	<210> 18	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 18	
20	gcttcatgga acggaactga ttttctgtt tctag	35
	<210> 19	
	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 19	
30	attgatgcag agctagaaac agaaaaatca gtccgttcc atgaagc	47
	<210> 20	
	<211> 55	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 20	
	aaaaacaagu ggaacggaac ugauuuuuucu guuucuagcu cugcaucaau aaugu	55
	<210> 21	
	<211> 32	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
50	<400> 21	
	acgcgccttg gattgcatg gcaaggagca ac	32
	<210> 22	
55	<211> 48	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 22	
	ttgtggtga ctgggggtg ctccgtgcca tgcaaatcca aggcgct	48
65	<210> 23	
	<211> 50	

ES 2 771 773 T3

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 23	
	cccacagaug uggcacggag caacccaag ucaccacaaa aaccuaucgu	50
10	<210> 24	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 24	
20	gacagtggta cctgcaagggt gtgcgctaac tc	32
	<210> 25	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 25	
30	gagttagcgc acacctgca ggtaccactg tcctctgtt	39
	<210> 26	
	<211> 50	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 26	
	cugccaaca aacagaggac agugguaccu gcaaggugug gaguuacagu	50
	<210> 27	
	<211> 36	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
50	<400> 27	
	gactccacta tctcactgat gatagagagg tctaata	36
	<210> 28	
	<211> 43	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 28	
	actctgggat tagacctctc atcatcagtg agatagtgga gtc	43
65	<210> 29	
	<211> 50	

ES 2 771 773 T3

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 29	
	cuaaagaag cacugaugau gagaggucua auccagagu gcugugugu	50
10	<210> 30	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 30	
20	ttgctacaga agaaaccaat t	21
	<210> 31	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 31	
30	ccaaccaatt ggtttctct gtagcaa	27
	<210> 32	
	<211> 40	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Synthetic oli gonucleotide	
40	<400> 32	
	caggauggag agaagaaacc aaugguugg gacacugaua	40
	<210> 33	
	<211> 29	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
50	<400> 33	
	ctgaacaagg ttggaagtgt tggagaatg	29
	<210> 34	
	<211> 41	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 34	
	ttgtaagtgg aacattctcc aacactcca acctgttca g	41
65	<210> 35	
	<211> 50	

ES 2 771 773 T3

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 35	
	gaaugcaug uggaaguguu ggagauguu ccacuuaca cacacaacuu	50
10	<210> 36	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 36	
20	tcgaggagct ggatacagct g	21
	<210> 37	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 37	
30	ctgtactctt ctcgtccagc tgtatccagc tcctcga	37
	<210> 38	
	<211> 39	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 38	
	gacatactgg atacagctgg acgagaagag tacagtgcc	39
	<210> 39	
	<211> 29	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
50	<400> 39	
	ctggatacag ctggacgaga agagtacag	29
	<210> 40	
	<211> 22	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 40	
	cgagaagagt acagccgagg ag	22
65	<210> 41	
	<211> 37	

ES 2 771 773 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 41	
	ctcctcggct gtactcttct cgtccagctg tatccag	37
10	<210> 42	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 42	
20	atactggata cagctggaca tgaagagtac ag	32
	<210> 43	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 43	
30	catgaagagt acagccggag tacg	24
	<210> 44	
	<211> 42	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 44	
	aacatgcacg ctgtactctt catgtccagc tgtatccagt at	42
	<210> 45	
	<211> 34	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
50	<400> 45	
	acatactgga tacagctgga aaagaagagt acag	34
	<210> 46	
55	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 46	
	ggaaaagaag agtacagcgt gcatggt	27
65	<210> 47	
	<211> 44	

ES 2 771 773 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 47	
	aacatgcacg ctgtactctt ctttccagc tgatccagt atgt	44
10	<210> 48	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 48	
20	catactggat acagctggac tagaagagta cag	33
	<210> 49	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 49	
30	gactagaaga gtacagcctt ctgcagt	27
	<210> 50	
	<211> 44	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 50	
	actgcagaag gctgtactct tctagtccag ctgtatccag tatg	44
	<210> 51	
	<211> 24	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
50	<400> 51	
	cactcattca atacctacg tcac	24
	<210> 52	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 52	
	tcaaaccac tcattcaata ccc	23
65	<210> 53	
	<211> 31	

ES 2 771 773 T3

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 53 gtgacgtagg gtattgaatg agtggggttg a	31
10	<210> 54 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
20	<400> 54 taccaaccac tcattcaata ccct	24
25	<210> 55 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 55 gtgacgtagg gtattgaatg agtgggttg a	31
35	<210> 56 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 56 ttcatccac tcattcaata ccctac	26
45	<210> 57 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 57 gtgacgtagg gtattgaatg agtggatgaa a	31
55	<210> 58 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 58 ttctactcca tcattcaat acctac	27
65	<210> 59 <211> 32	

ES 2 771 773 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 59	
	gtgacgtagg gtattgaatg agtggagtag aa	32
10	<210> 60	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 60	
20	uggaguguga caaugguguu ug	22
	<210> 61	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 61	
30	aagcatgtgg agtgtgacaa t	21
	<210> 62	
	<211> 29	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
40	<400> 62	
	caaacaccat tgtcacactc cacatgctt	29
	<210> 63	
	<211> 19	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
50	<400> 63	
	agatgggtgg agtgtgaca	19
	<210> 64	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 64	
	caaacaccat tgtcacactc cacccatct	29
65	<210> 65	
	<211> 23	

ES 2 771 773 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 65	
	agcttagtg gagtggaca atg	23
10	<210> 66	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 66	
20	caaacacat tgcacactc cactaaagct	30
	<210> 67	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 67	
30	aggaaagtgg agtggaca tg	22
	<210> 68	
	<211> 29	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
40	<400> 68	
	caaacacat tgcacactc cactttct	29
	<210> 69	
	<211> 24	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
50	<400> 69	
	atgtatagtg gagtggaca atgg	24
	<210> 70	
55	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda sintética	
	<400> 70	
	caaacacat tgcacactc cactatacat	30

REIVINDICACIONES

1. Una composición para la interacción selectiva con una molécula de ácido nucleico diana, en donde la molécula de ácido nucleico diana comprende una sexta región y una séptima región, comprendiendo la composición:
- 5 una primera concentración de una primera cadena de ácido nucleico que comprende una primera región, una segunda región y una tercera región;
una segunda concentración de una segunda cadena de ácido nucleico que comprende una cuarta región y una quinta región;
- 10 en donde la primera y la segunda concentración son tales que una interacción entre la composición y la molécula de ácido nucleico diana posee una energía libre estándar determinada por la Expresión 1 [$\Delta G^{\circ}_{rxn} = \Delta G^{\circ}_{t-TC} - \Delta G^{\circ}_{nh-PC} + (\Delta G^{\circ}_{v-TC} - \Delta G^{\circ}_{h-PC})$] que es igual a la energía libre estándar determinada por la Expresión 2 [$-R\tau \ln\left(\frac{[P]_0}{[C]_0}\right)$], donde el término $[P]_0$ término de la expresión 2 es igual a la segunda concentración y el término $[C]_0$ de la Expresión 2 es igual a la primera concentración, y donde la segunda concentración es mayor que la primera concentración; y en donde la composición posee una energía libre estándar de hibridación con la molécula de ácido nucleico diana de aproximadamente -5 kcal/mol a aproximadamente +5 kcal/mol tal como se determina mediante la Expresión 1; y
- 15 en donde el término ΔG°_{t-TC} de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la sexta región y la primera región, en donde el término ΔG°_{nh-PC} de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la quinta región y la tercera región, en donde el término ΔG°_{v-TC} de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la séptima región y la segunda región, en donde el término ΔG°_{h-PC} de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la cuarta región y la segunda región, y en donde los valores para ΔG°_{t-TC} y ΔG°_{nh-PC} difieren en más del 10 %.
- 20
- 25 2. La composición de la reivindicación 1 que comprende además un marcador conjugado con la primera cadena de ácido nucleico y en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste en fluoróforos orgánicos, haptenos, nanopartículas y radioisótopos, opcionalmente que comprende además un marcador conjugado con la segunda cadena de ácido nucleico y en donde el marcador se selecciona del grupo que consiste en fluoróforos orgánicos, haptenos, nanopartículas y radioisótopos, y en donde
- 30 la Expresión 1 se sustituye por la Expresión 3.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la segunda concentración es de aproximadamente 1,01 veces a aproximadamente 10.000 veces la de la primera concentración, opcionalmente de aproximadamente 1,1 veces a aproximadamente 1000 veces la de la primera concentración, opcionalmente de aproximadamente 1,2 veces a
- 35 aproximadamente 100 veces la de la primera concentración.
4. La composición de la reivindicación 1 en la que la primera o la segunda cadena de ácido nucleico comprenden:
- 40 a) un análogo de ácido nucleico sintético seleccionado del grupo que consiste en ANB, ANP, ARN sustituido con 2'-O-metilo, ADN sustituido con fosforotioato o ARN L-ADN, y spiegelmeros; o
b) un análogo de nucleótido sintético o natural, y en donde el análogo de nucleótido sintético se selecciona del grupo que consiste en inosina, 5'-nitroindol, nucleótidos metilados, isocitosina e isoguanina, nucleótidos de spiegelmero y ADNx.
- 45 5. La composición de la reivindicación 1 en la que la segunda región es:
- a) totalmente complementaria a la cuarta región; o
b) totalmente complementaria a la séptima región; o
c) totalmente complementaria a la sexta región; o
- 50 d) totalmente complementaria a la quinta región.
6. La composición de la reivindicación 1 en donde:
- 55 a) más del 60 % de los nucleótidos de la segunda región son complementarios a los nucleótidos alineados de la cuarta región;
b) más del 60 % de los nucleótidos de la segunda región son complementarios a los nucleótidos alineados de la séptima región; o
c) más del 60 % de los nucleótidos de la primera región son complementarios a los nucleótidos alineados de la sexta región; o
- 60 d) más del 60 % de los nucleótidos de la tercera región son complementarios a los nucleótidos alineados de la quinta región.
7. La composición de la reivindicación 1 en donde ΔG°_{t-TC} es de aproximadamente -2 kcal/mol a aproximadamente -16 kcal/mol, opcionalmente de aproximadamente -5 kcal/mol a aproximadamente -15 kcal/mol, opcionalmente de aproximadamente -7 kcal/mol a aproximadamente -13 kcal/mol, opcionalmente es de aproximadamente -10 kcal/mol.
- 65

8. La composición de la reivindicación 1, en donde la primera cadena de ácido nucleico y la segunda cadena de ácido nucleico forman:

- a) una sonda de ácido nucleico parcialmente bicatenario, que comprende opcionalmente además un exceso de la segunda cadena de ácido nucleico; o
 b) un cebador de ácido nucleico parcialmente bicatenario, que opcionalmente comprende además un exceso de la segunda cadena de ácido nucleico, en donde el cebador se usa en el contexto de una o más enzimas.

9. La composición de la reivindicación 1, en donde menos del 50 % de los nucleótidos en la primera región están en un estado bicatenario en la estructura de energía libre mínima evaluada, tal como se calcula en las condiciones operativas de temperatura y salinidad.

10. La composición de la reivindicación 1, en donde la energía libre estándar de hibridación de la composición con respecto a la molécula de ácido nucleico diana determinada por la Expresión 1 está dentro de 3 kcal/mol de una energía libre estándar de hibridación determinada por la Expresión 2, en donde los términos $[C]_0$ y $[P]_0$ de la Expresión 2 representan la primera concentración y la segunda concentración, respectivamente.

11. La composición de la reivindicación 1, en donde la primera cadena de ácido nucleico y la segunda cadena de ácido nucleico forman una molécula de ácido nucleico parcialmente bicatenaria, y en donde la primera región posee poca o ninguna estructura secundaria.

12. La composición de la reivindicación 1, en donde la suma de la energía libre estándar de hibridación entre:
 a) la primera región y la sexta región y entre la segunda región y la séptima región ($\Delta G_{t-TC}^{\circ} + \Delta G_{v-TC}^{\circ}$) es más negativa que -15 kcal/mol; o
 b) la tercera región y la quinta región y entre la cuarta región y la segunda región ($\Delta G_{nh-PC}^{\circ} + \Delta G_{h-PC}^{\circ}$) es más negativa que -15 kcal/mol.

13. Un método para amplificar selectivamente múltiples moléculas de ácido nucleico diana que comprende las etapas de:

aplicar un primer cebador y un segundo cebador a una muestra para determinar la presencia o la cantidad en el mismo de una primera secuencia de ácido nucleico diana y de una segunda secuencia de ácido nucleico diana, en donde la aplicación del primer y el segundo cebador a la muestra produce una mezcla de reacción, en donde la primera y la segunda secuencia de ácido nucleico diana incluyen, cada una, una sexta región y una séptima región, en donde las secuencias de ácido nucleico diana primera y segunda se solapan en al menos cinco nucleótidos proporcionando de ese modo una región solapada, en donde, dentro de la región solapada, las primeras secuencias de ácido nucleico diana difieren de la segunda secuencia de ácido nucleico diana en uno o dos nucleótidos, en donde el primer y el segundo cebador comprenden cada uno:

una primera concentración de una primera cadena de ácido nucleico que comprende una primera región, una segunda región y una tercera región; una segunda concentración de una segunda cadena de ácido nucleico que comprende una cuarta región y una quinta región; en donde la primera y segunda concentración son tales que el primer cebador interactúa con la primera secuencia de ácido nucleico diana y el segundo cebador interactúa con la segunda secuencia de ácido nucleico diana a una energía libre estándar determinada por la Expresión 1 que es igual a una energía libre estándar según lo determinado por la Expresión 2, en donde el término $[P]_0$ de la Expresión 2 es igual a la segunda concentración y el término $[C]_0$ de la Expresión 2 es igual a la primera concentración, y donde la segunda concentración es mayor que la primera concentración; y en donde la composición posee una energía libre estándar de hibridación con la molécula de ácido nucleico diana de aproximadamente -5 kcal/mol a aproximadamente +5 kcal/mol tal como se determina mediante la Expresión 1; y en donde el término ΔG_{t-TC}° de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la sexta región y la primera región, en donde el término ΔG_{nh-PC}° de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la quinta región y la tercera región, en donde el término ΔG_{v-TC}° de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la séptima región y la segunda región, en donde el término ΔG_{h-PC}° de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la cuarta región y la segunda región, y en donde los valores para ΔG_{t-TC}° y ΔG_{nh-PC}° difieren en más del 10 %; y someter la mezcla de reacción a un protocolo de reacción suficiente para amplificar las secuencias primera y segunda de ácido nucleico diana.

14. El método de la reivindicación 13, en donde las condiciones de reacción son suficientes para la reacción en cadena de la polimerasa, opcionalmente en donde la primera o la segunda cadena de ácido nucleico del primer y del segundo cebador tienen un marcador conjugado con las mismas, en donde la Expresión 3 se sustituye por la Expresión 1, en donde opcionalmente el marcador se selecciona entre el grupo que consiste en fluoróforos orgánicos, haptenos, nanopartículas y radioisótopos.

15. Un proceso que comprende las etapas de:

5 seleccionar una secuencia de nucleótidos diana en una molécula de ácido nucleico, comprendiendo la secuencia de nucleótidos diana una sexta subsecuencia de nucleótidos, una séptima subsecuencia de nucleótidos y una octava subsecuencia de nucleótidos; seleccionar una primera secuencia de nucleótidos que comprende una primera subsecuencia de nucleótidos, una segunda subsecuencia de nucleótidos, y una tercera subsecuencia de nucleótidos;

10 seleccionar una segunda secuencia de nucleótidos que comprende una cuarta subsecuencia de nucleótidos y una quinta subsecuencia de nucleótidos;

calcular una energía libre estándar usando la Expresión 1, en donde el término ΔG°_{t-TC} de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la sexta región y la primera región, en donde el término ΔG°_{nh-PC} de la Expresión 1 representa la energía libre de hibridación entre la quinta región y la tercera región, en donde el término ΔG°_{v-TC} de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la séptima región y la segunda región, y en donde el término ΔG°_{h-PC} de la Expresión 1 representa la energía libre estándar de hibridación entre la cuarta región y la segunda región; y

15 determinar si la energía libre estándar calculada usando la Expresión 1 cumple una condición predeterminada; y sintetizar una primera cadena de ácido nucleico que comprende la primera secuencia de nucleótidos y una segunda cadena de ácido nucleico que comprende la segunda secuencia de nucleótidos si se cumple la condición predeterminada, y los valores para ΔG°_{t-TC} y ΔG°_{nh-PC} difieren en más del 10 %, y la composición posee una energía libre estándar de hibridación con la molécula de ácido nucleico diana de aproximadamente -5 kcal/mol a aproximadamente +5 kcal/mol según lo determinado por la Expresión 1.

20

16. El proceso de la reivindicación 15 que comprende además la etapa de calcular una energía libre estándar usando la Expresión 2, en donde la condición predeterminada comprende ser igual a la energía libre estándar calculada usando la Expresión 2, y en donde los términos $[C]_0$ y $[P]_0$ de la Expresión 2 representan una primera concentración predeterminada de la primera cadena de ácido nucleico y una segunda concentración predeterminada de la segunda cadena de ácido nucleico, respectivamente, y en donde la segunda concentración es mayor que la primera concentración, opcionalmente

25 en donde en el caso de que la energía libre estándar determinada por la Expresión 1 no sea igual a la energía libre estándar determinada por la Expresión 2, entonces el proceso se repite al menos en parte hasta que la energía libre estándar determinada por la Expresión 1 sea igual a la energía libre estándar determinada por la Expresión 2, de modo que el proceso comprenda además al menos una de las siguientes etapas:

30

35 (1) seleccionar un nuevo conjunto de secuencias y subsecuencias de nucleótidos; y
(2) modificar la concentración predeterminada de al menos una de la primera cadena de ácido nucleico o la segunda cadena de ácido nucleico.

17. El proceso de la reivindicación 15 en donde la condición predeterminada comprende que la energía libre estándar calculada por la Expresión 1 es de aproximadamente -4 kcal/mol a aproximadamente +4 kcal/mol.

40

Fig. 1

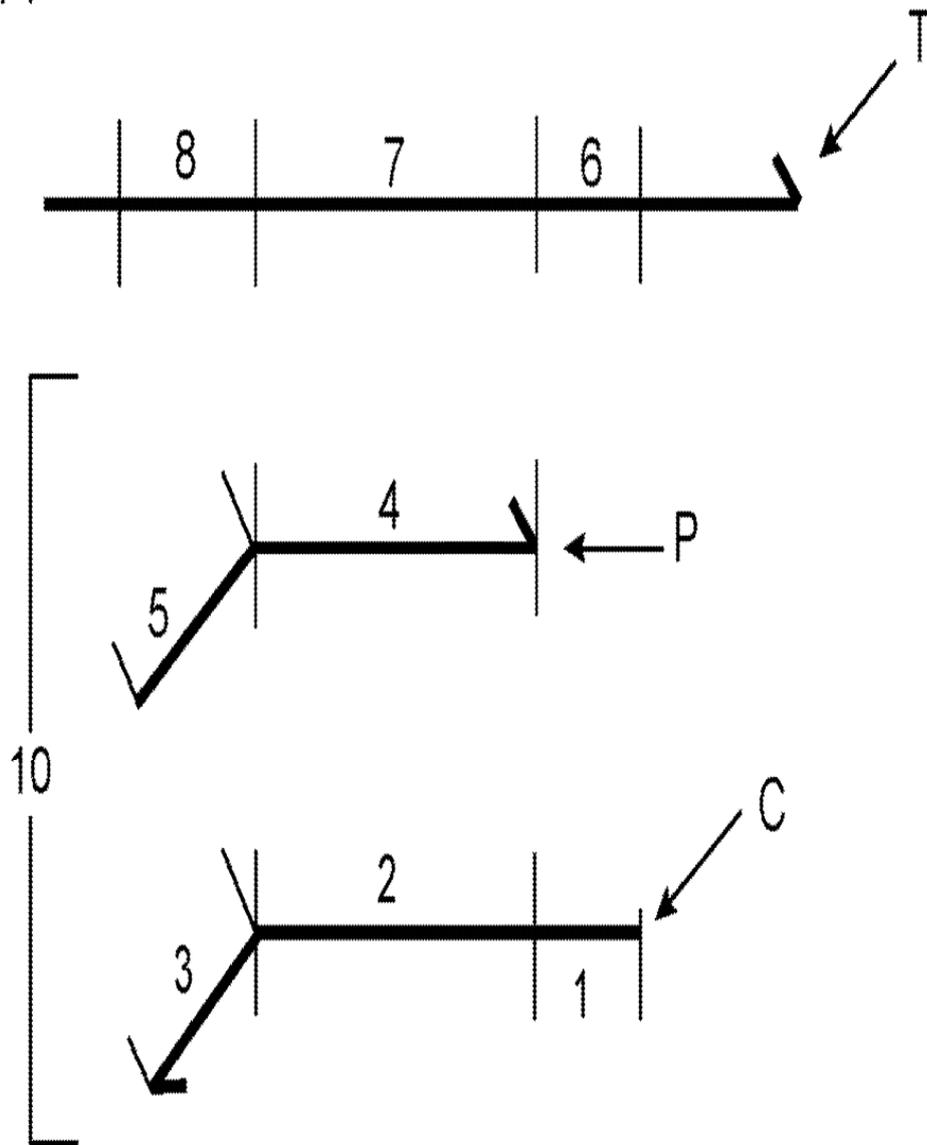
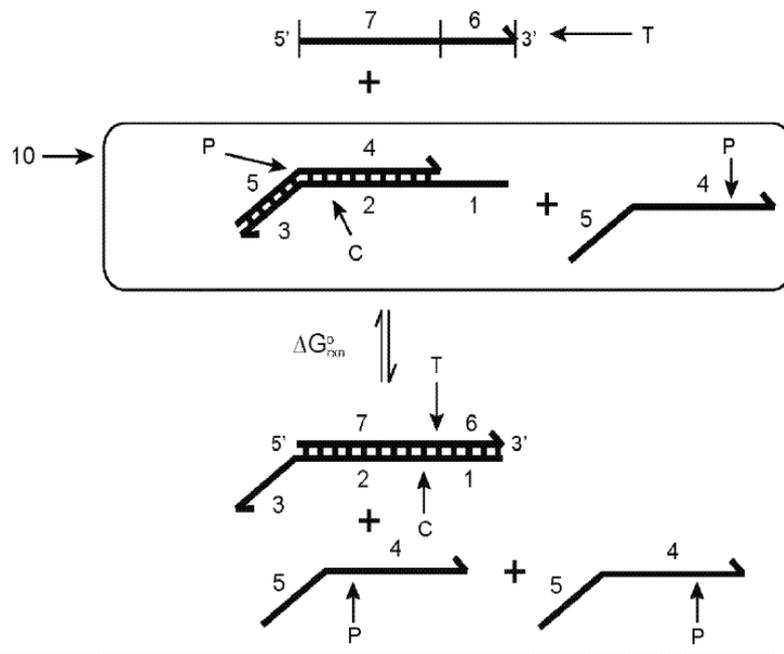


Fig. 2

A



B

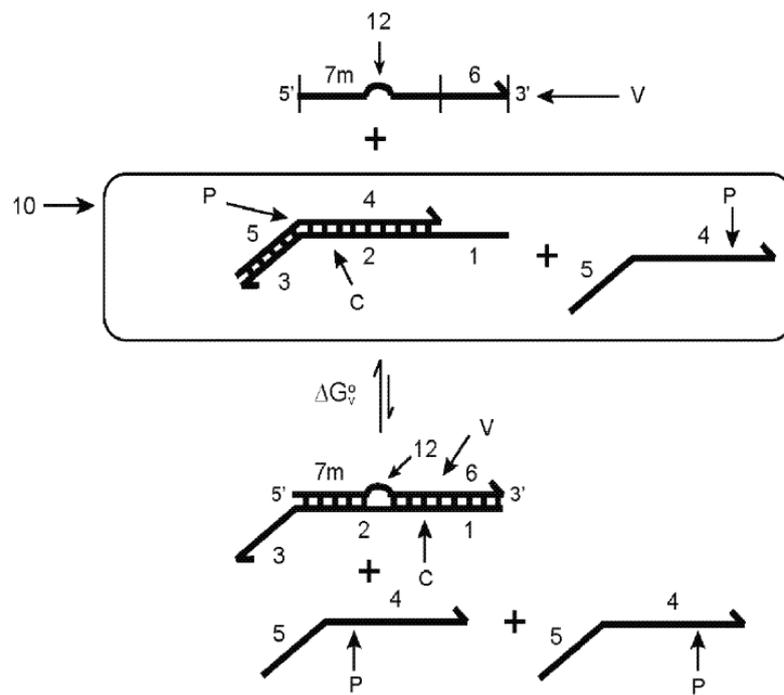


Fig. 3

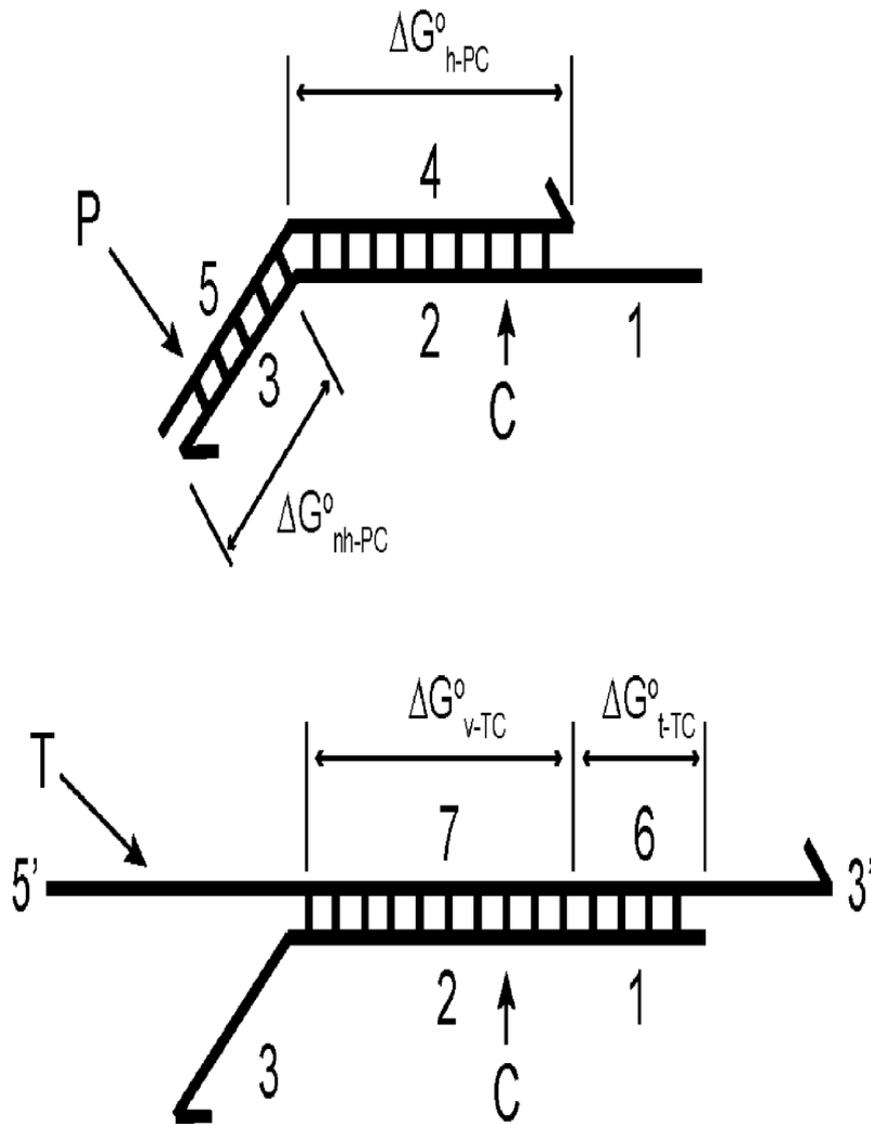


Fig. 4:

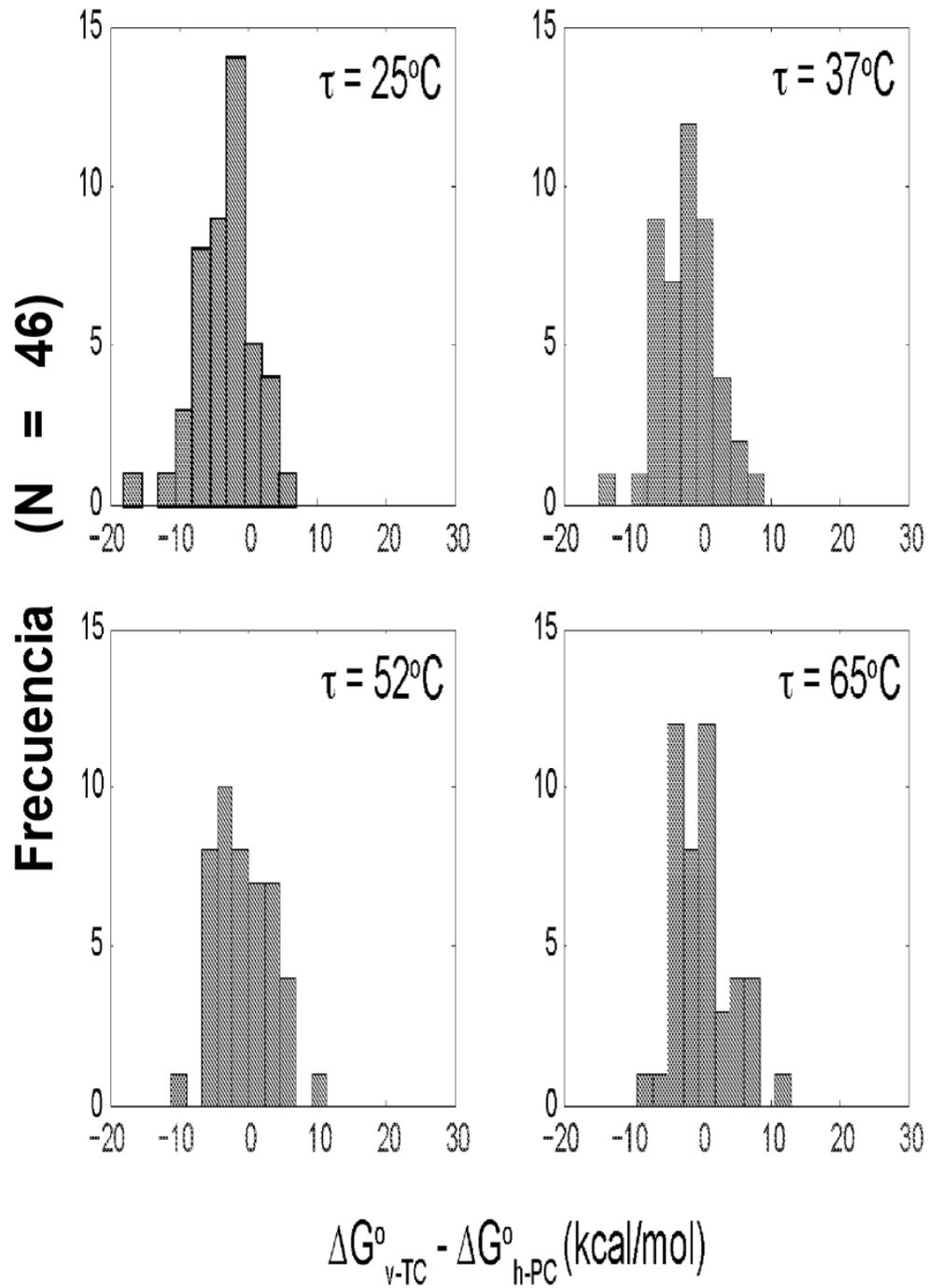


Fig. 5

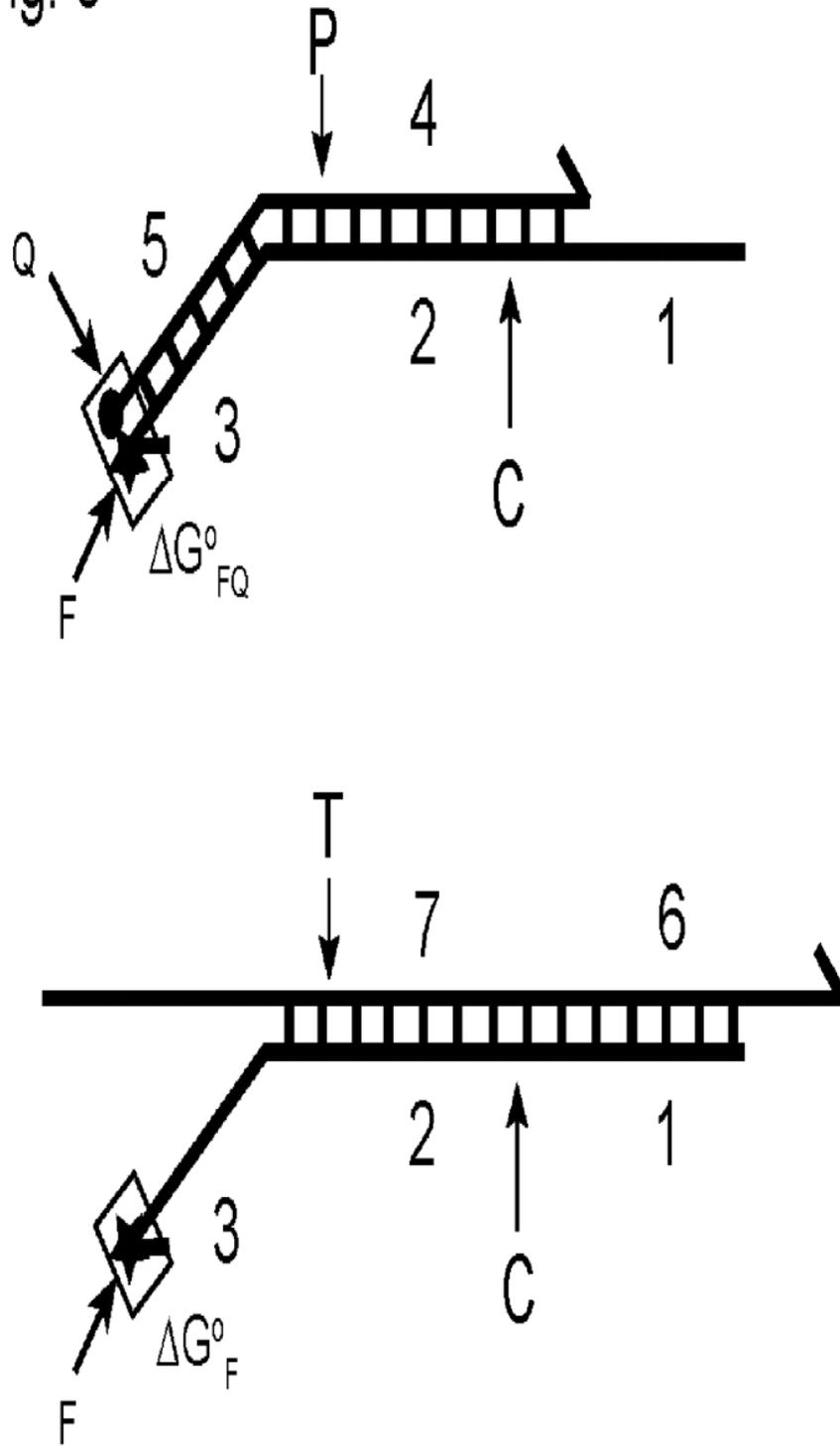


Fig. 6

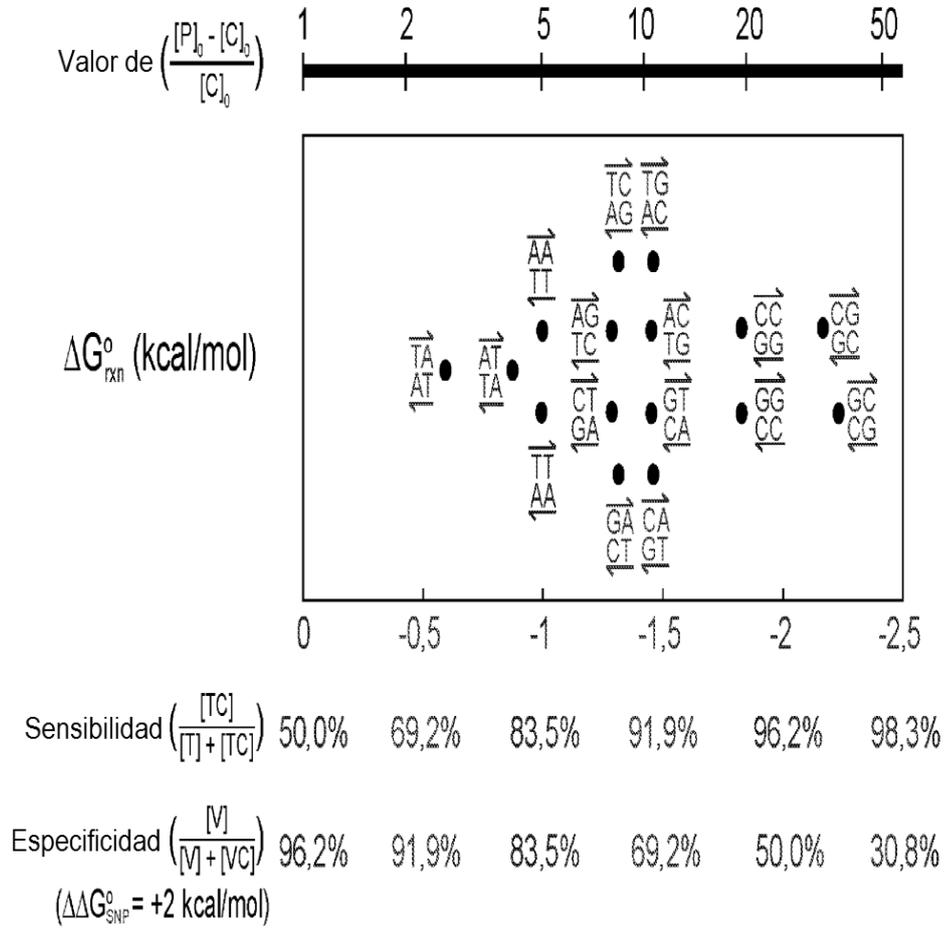
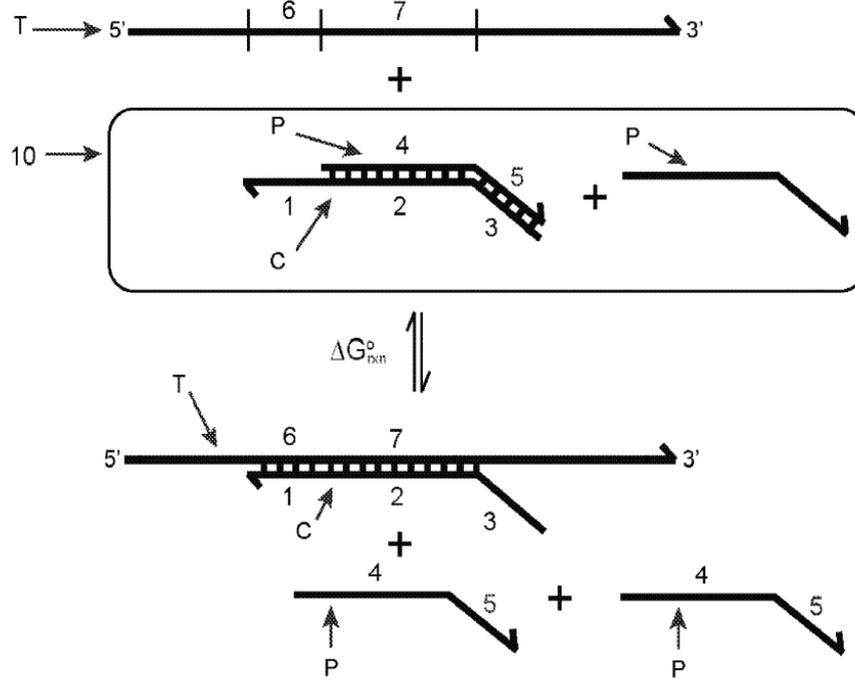
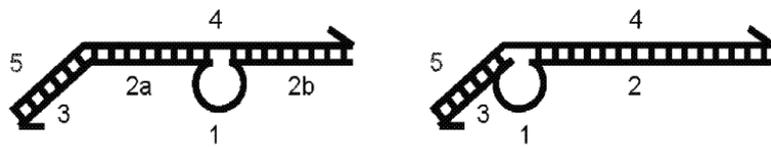


Fig. 7

a.



b.



c.

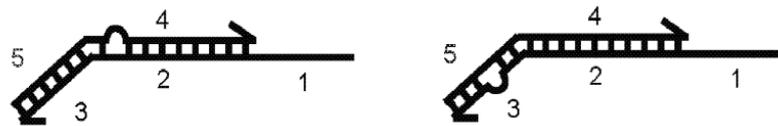


Fig. 8

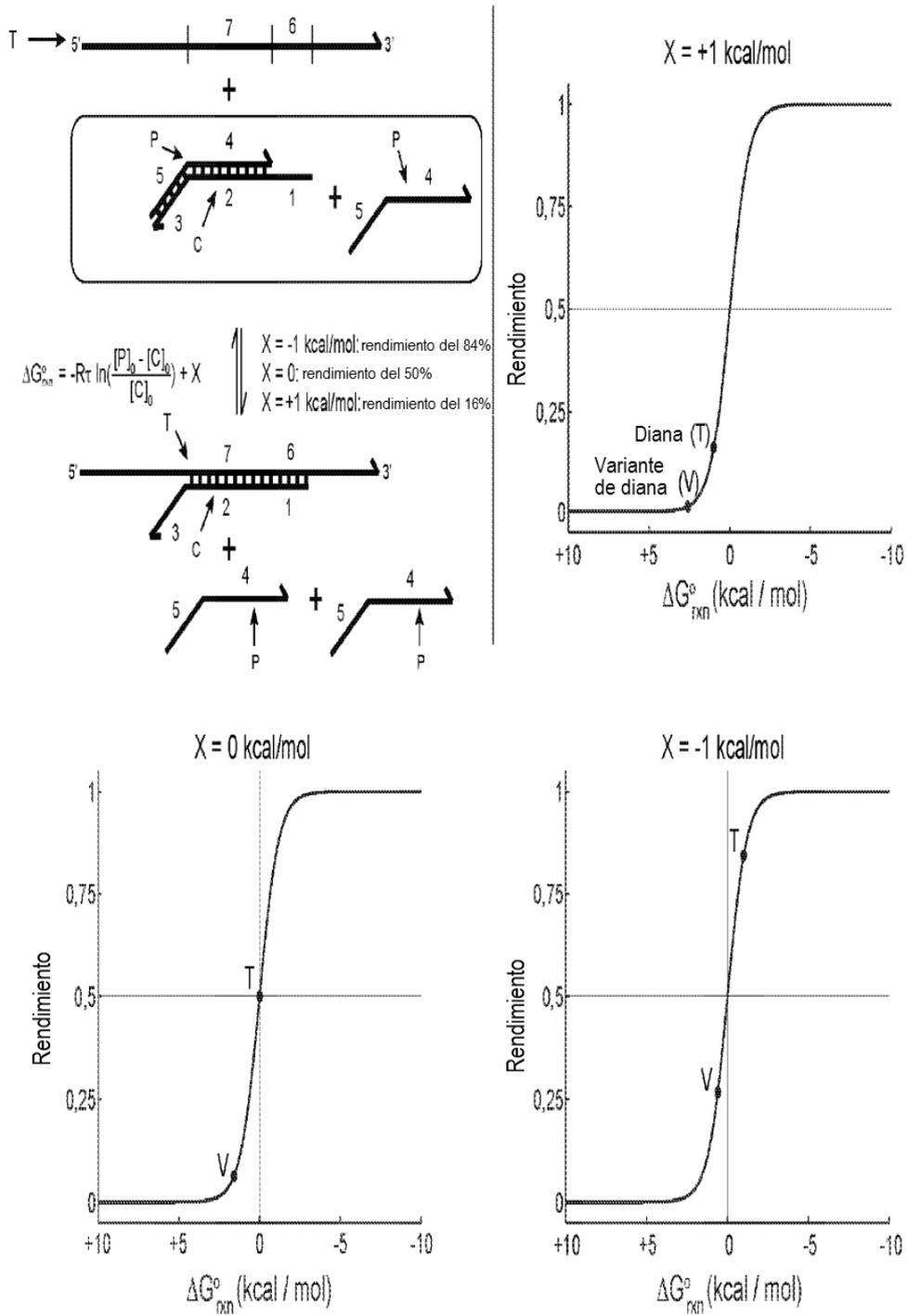


Fig. 9

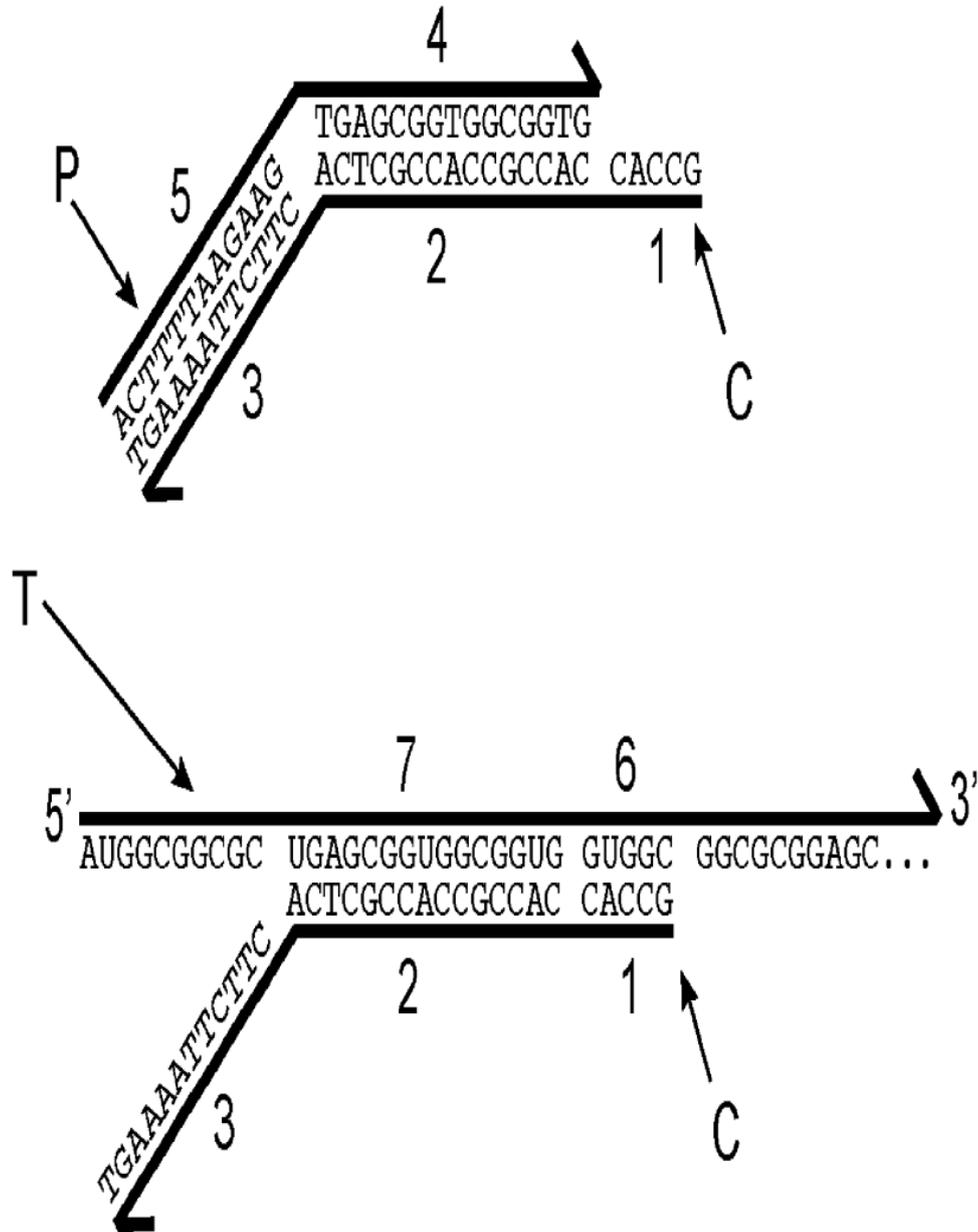


Fig. 10

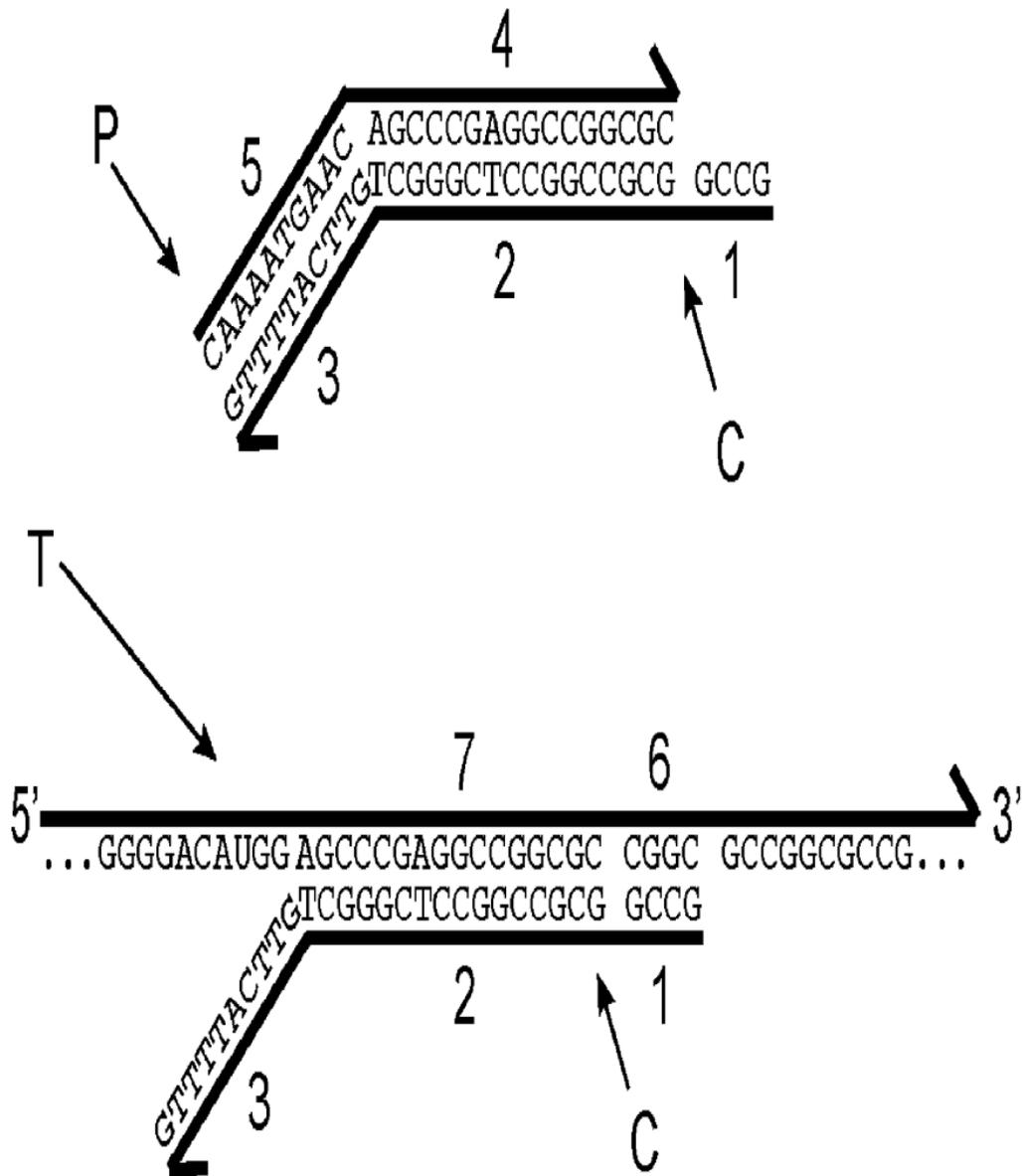


Fig. 11

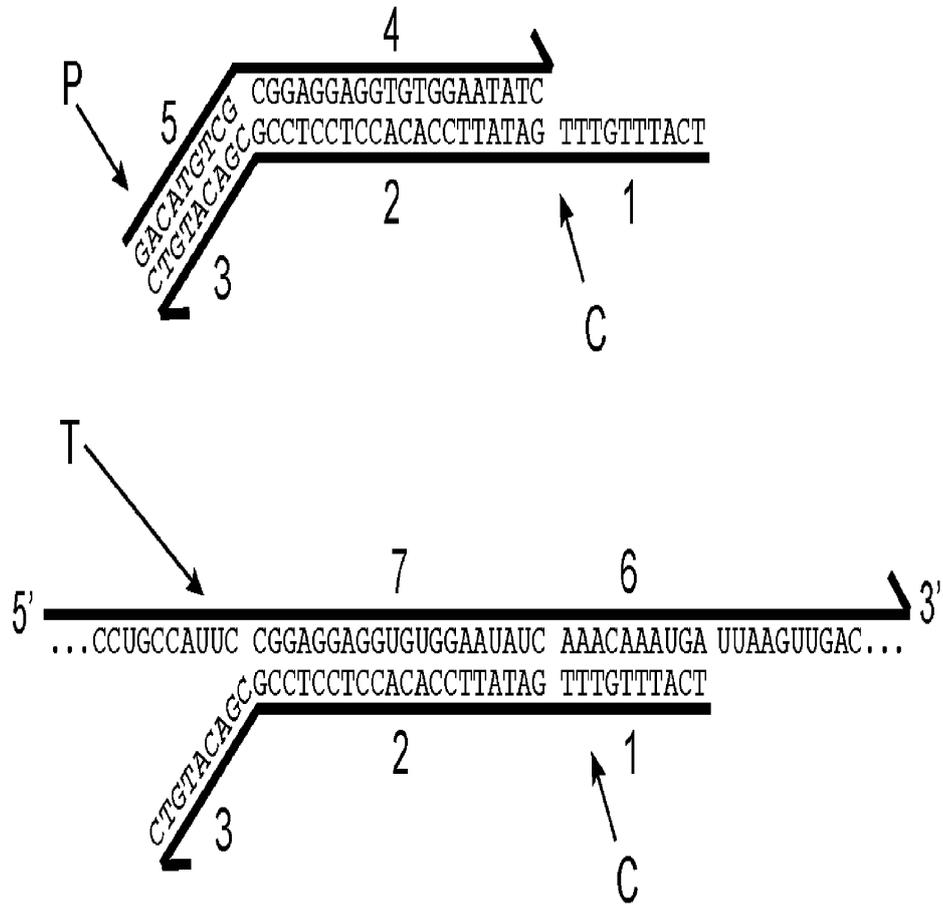


Fig. 12

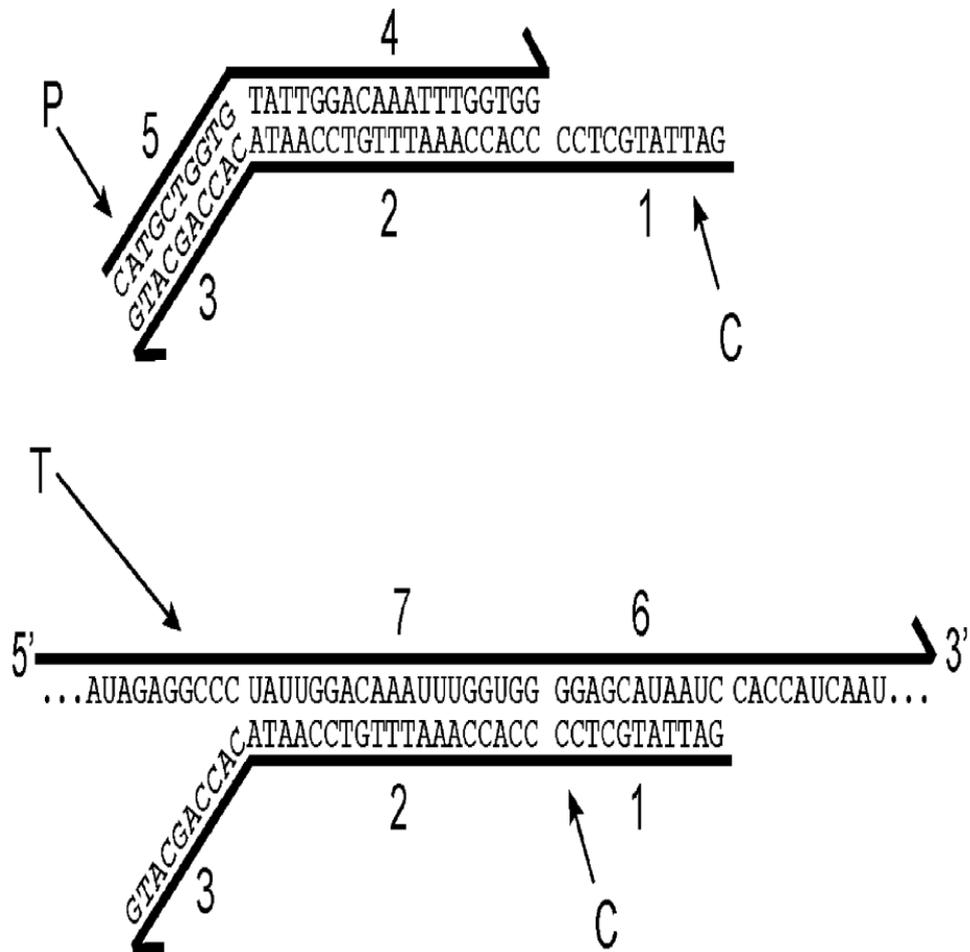


Fig. 13

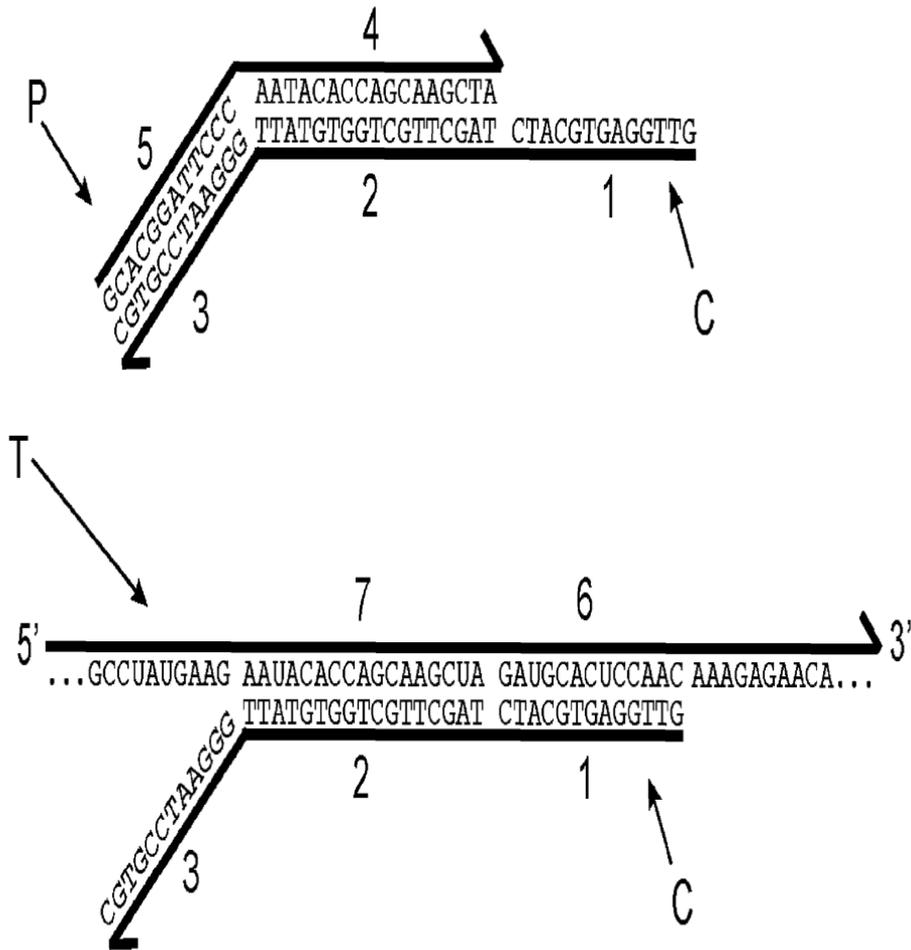


Fig. 14

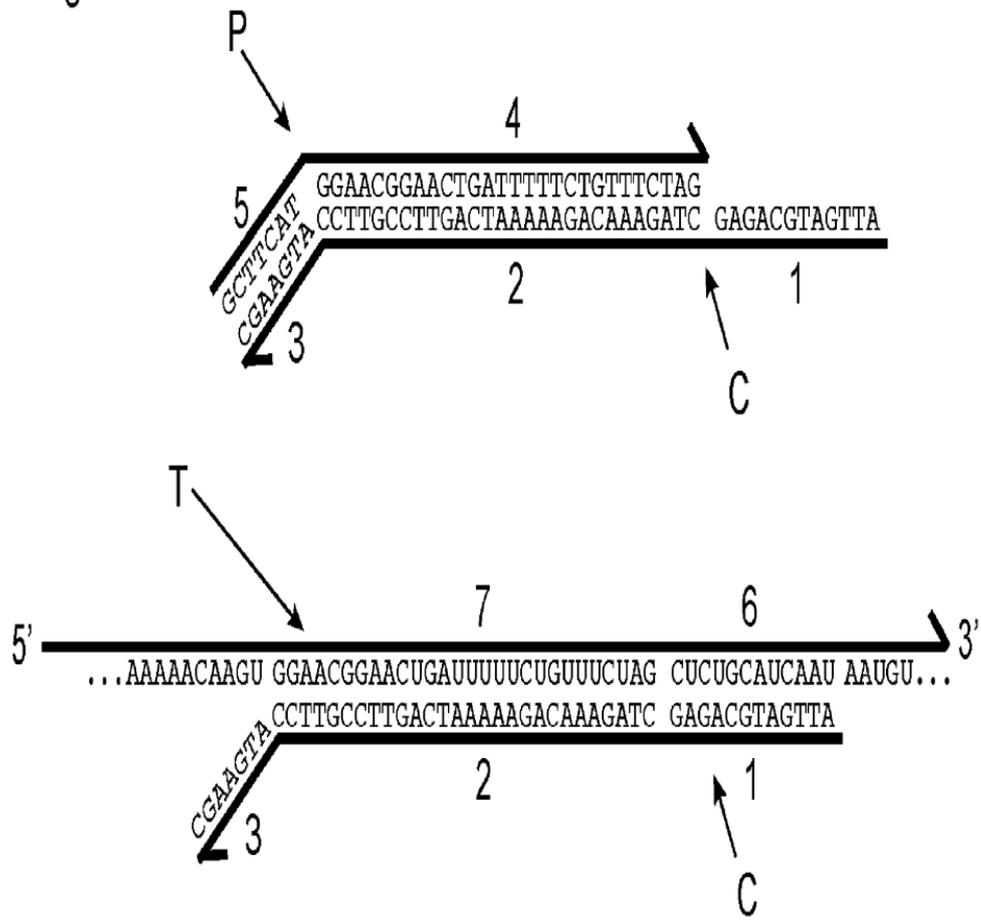


Fig. 15

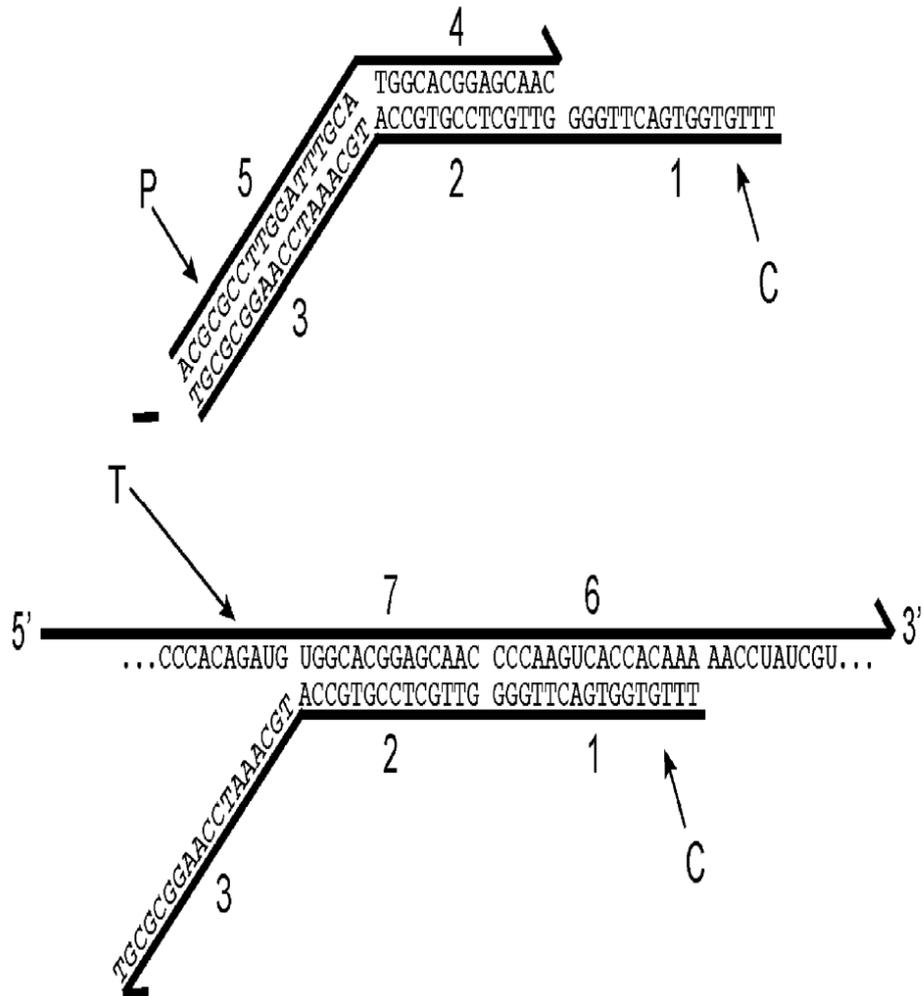


Fig. 16

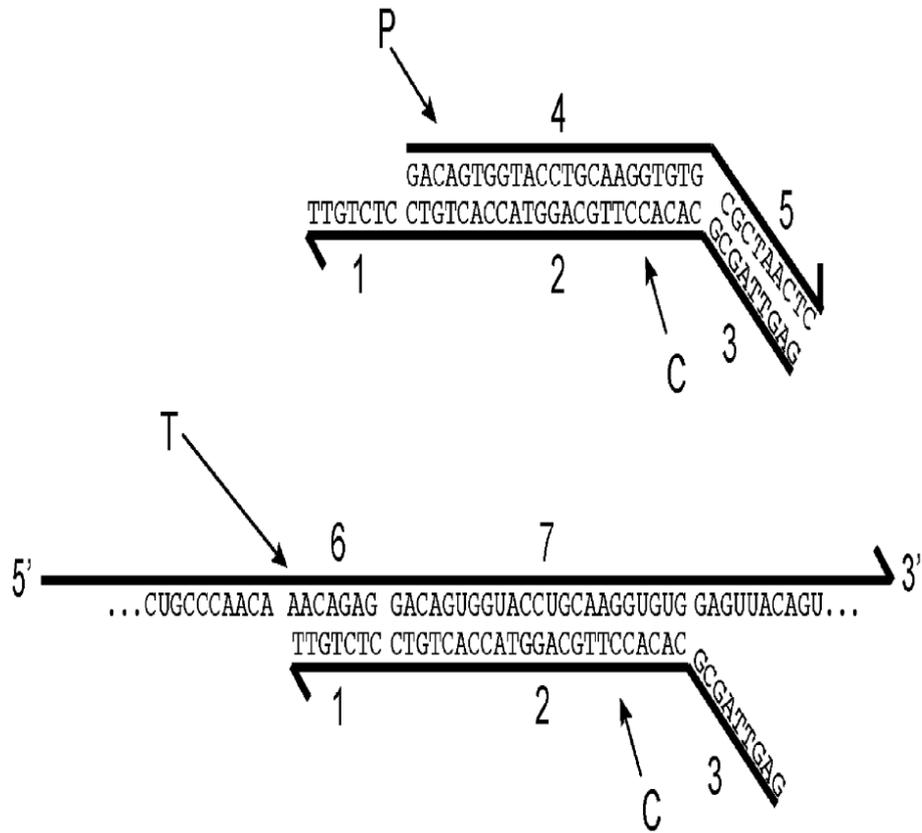


Fig. 17

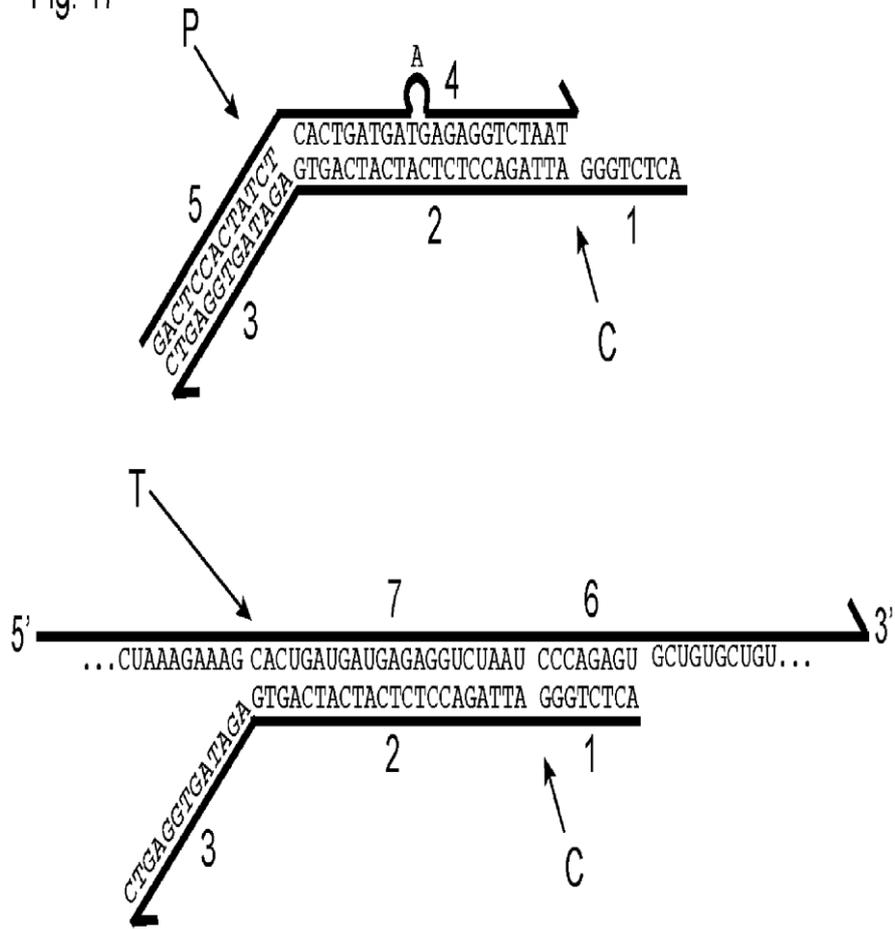


Fig. 18

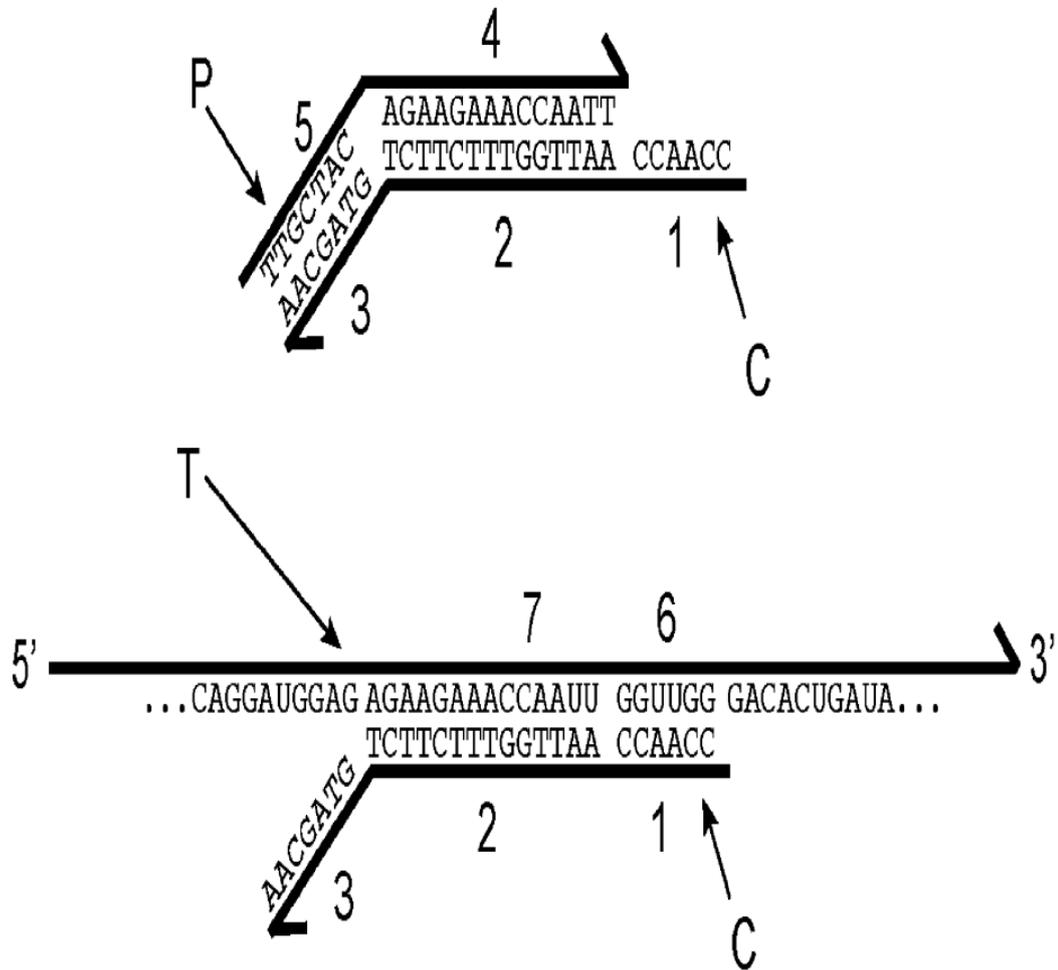


Fig. 19

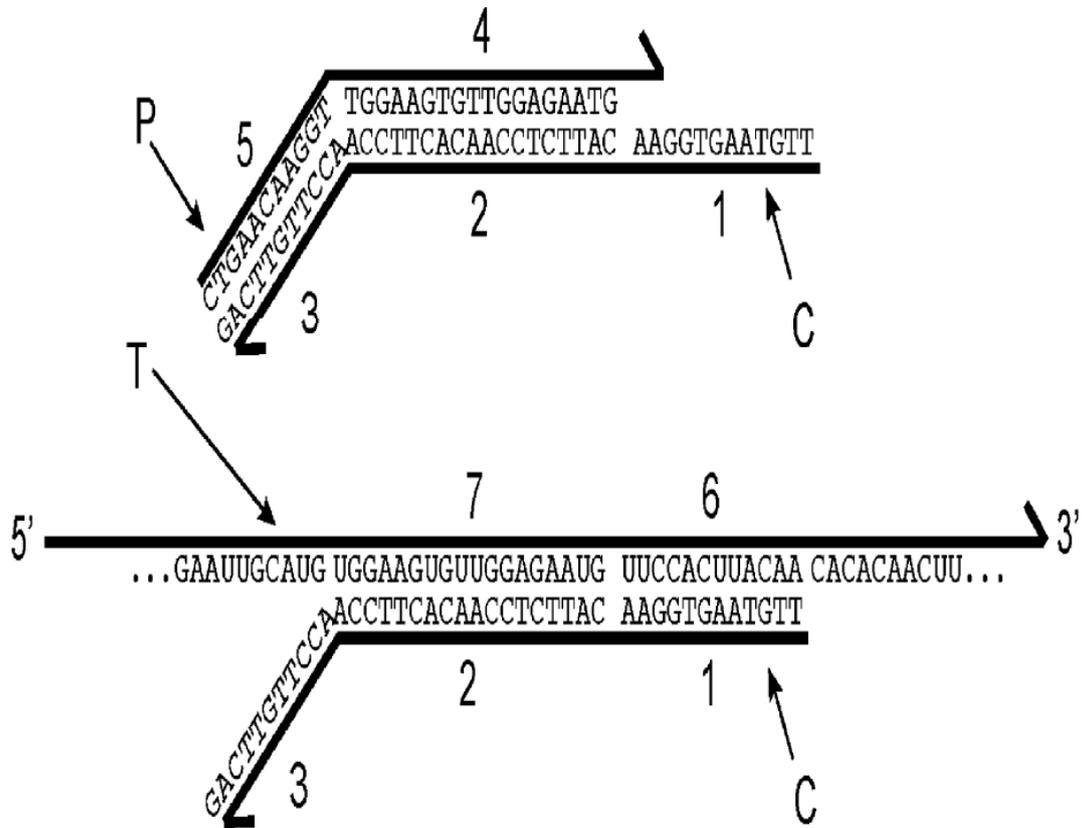


Fig. 20

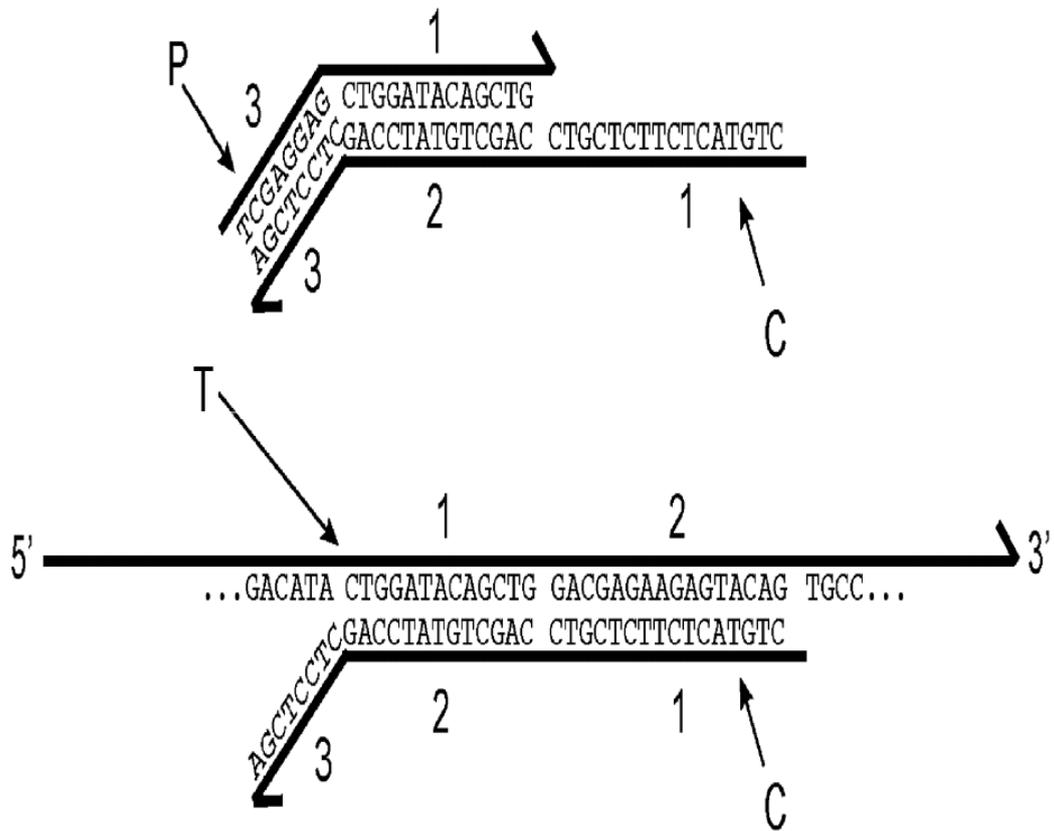


Fig. 21

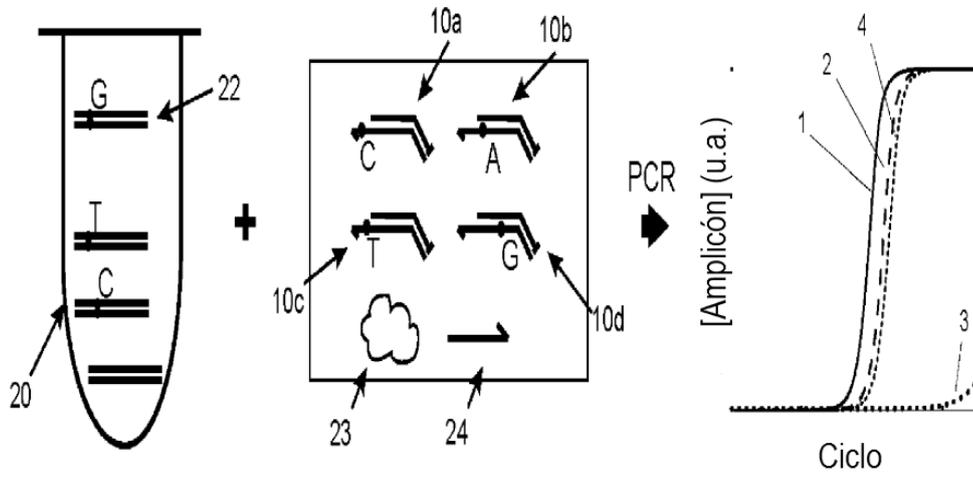


Fig. 22

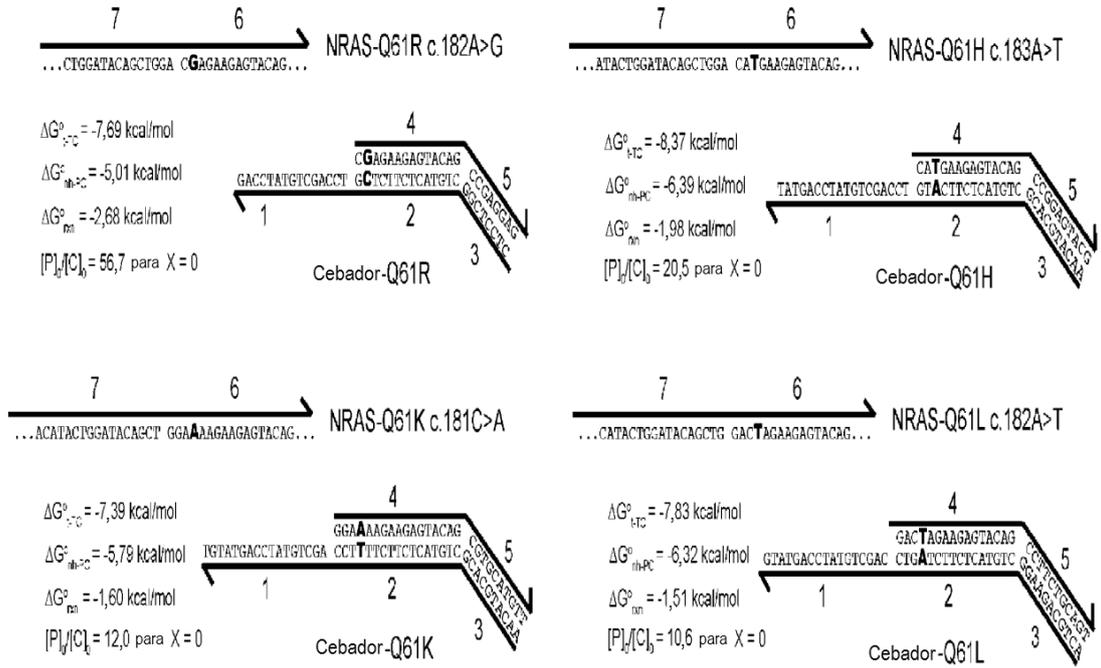


Fig. 23

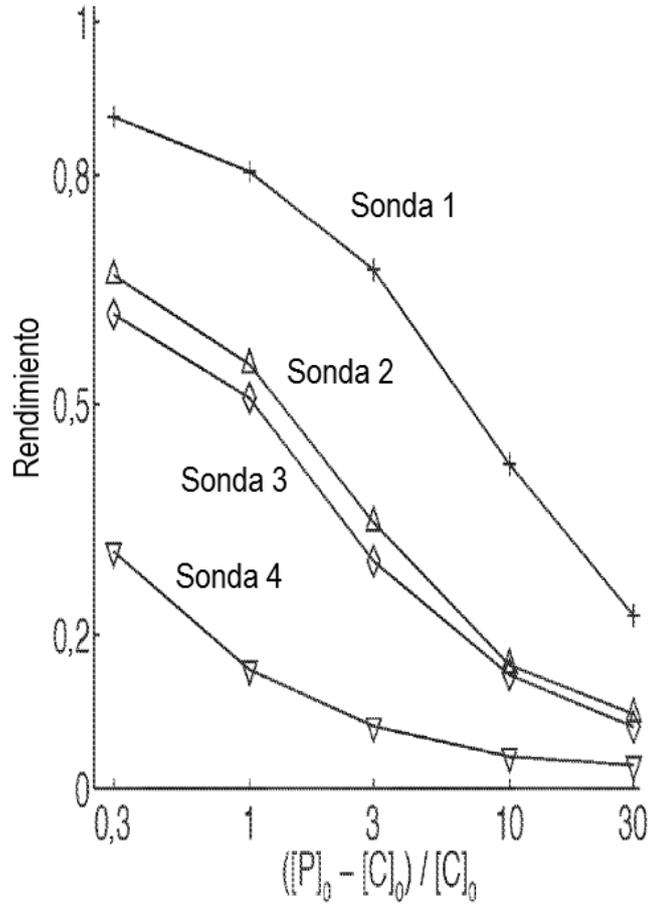
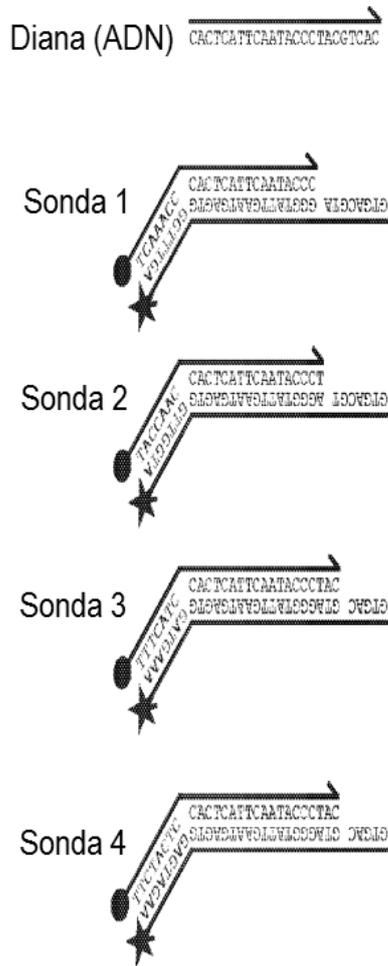


Fig. 24

Diana
(ARN miR-122)

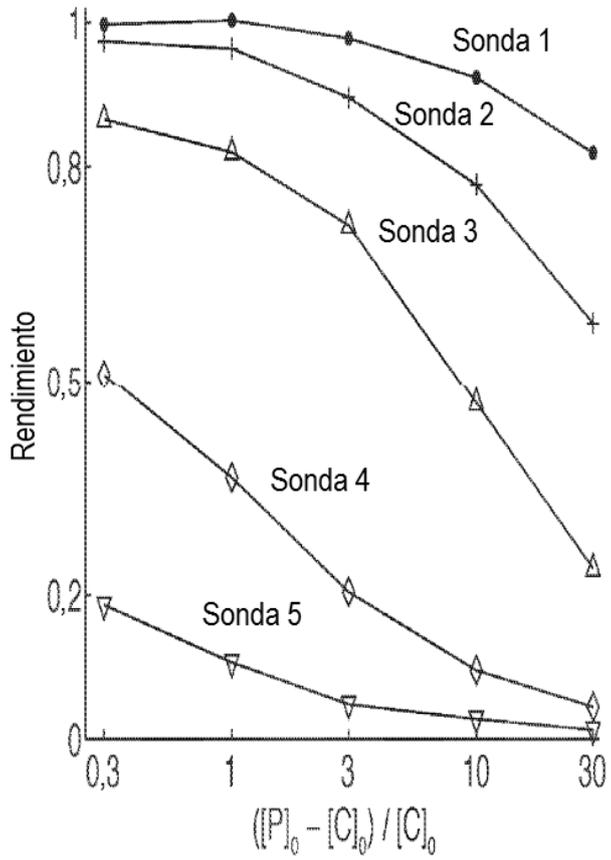
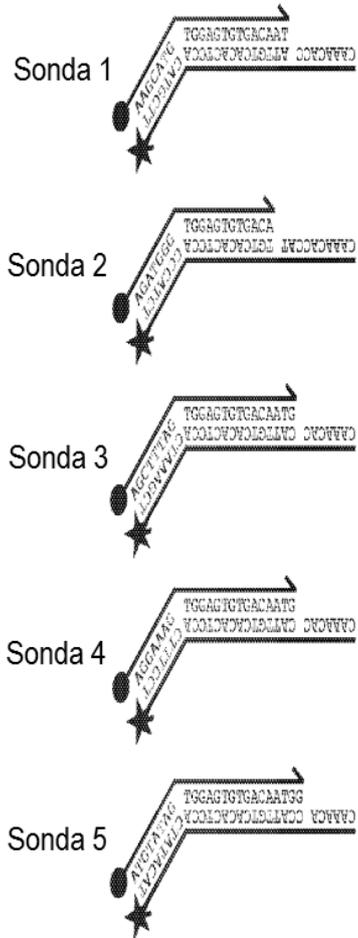


Fig. 25

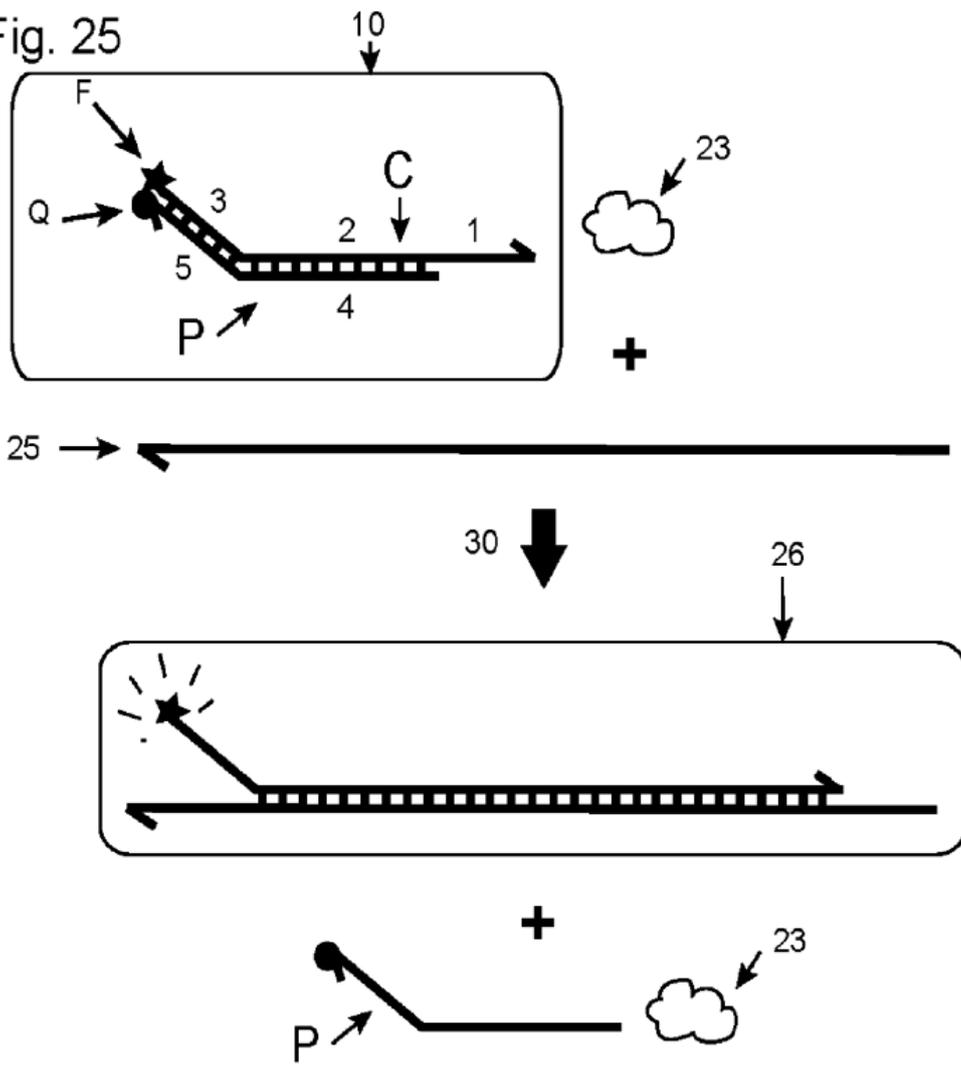


Fig. 26

