



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 296**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07795916 .1**

96 Fecha de presentación : **06.06.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **1945821**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.07.2008**

54 Título: **Oligonucleótidos marcados y uso de los mismos en métodos de amplificación de ácidos nucleicos.**

30 Prioridad: **06.06.2006 US 811581 P**
21.12.2006 US 871442 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.05.2011

73 Titular/es: **GEN-PROBE INCORPORATED**
Mail Stop 1 / Patent Department
10210 Genetic Center Drive
San Diego, California 92121-43, US

72 Inventor/es: **Becker, Michael, M.;**
Livezey, Kristin, W. y
Lam, Wai-Chung

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 358 296 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

CAMPO DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a métodos, composiciones, mezclas de la reacción y equipos para la amplificación selectiva de múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico específica o "secuencia objetivo" que puede estar presente sola o como componente de una mezcla homogénea o heterogénea de ácidos nucleicos. La mezcla de ácidos nucleicos puede ser la que se halla en una muestra tomada para un ensayo de diagnóstico, cribado de productos sanguíneos, análisis de esterilidad, detección micro-biológica en alimentos, agua, bebidas, muestras industriales o ambientales, estudios de investigación, preparación de reactivos o de materiales para otros procedimientos tales como clonación, o para otros fines. La amplificación selectiva de las secuencias de ácidos nucleicos específicas, tal como se describe en la presente memoria, tiene un valor particular en cualquiera de una diversidad de ensayos de detección para incrementar la exactitud y la fiabilidad de tales ensayos, mientras al mismo tiempo se reducen los requisitos de preparación, purificación y/o esterilización para los reactivos usados en los ensayos, y para el medio en el que se llevan a cabo los ensayos.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

La detección y/o la cuantificación de secuencias de ácidos nucleicos específicas es una técnica importante para detectar y clasificar microorganismos, para diagnosticar enfermedades infecciosas, para medir la respuesta a diversos tipos de tratamientos, y similares. Tales procedimientos son útiles también en la detección y la cuantificación de microorganismos en productos alimenticios, agua, bebidas, muestras industriales y ambientales, reservas de semillas, y otros tipos de materiales en los que puede ser necesario monitorizar la presencia de microorganismos específicos.

Se conocen muy bien numerosos métodos basados en la amplificación para la detección y la cuantificación de ácidos nucleicos objetivo, y están establecidos en la técnica. La reacción en cadena de la polimerasa, denominada habitualmente PCR, usa múltiples ciclos de desnaturalización, renaturalización de los pares de cebadores a las cadenas opuestas, y prolongación de los cebadores para incrementar exponencialmente el número de copias de la secuencia objetivo (p.ej., Mullis *et al.*, "Process for Amplifying, Detecting and/or Cloning Nucleic Acid Sequences", pat. de EE.UU. n° 4.683.195; Mullis, "Process for Amplifying Nucleic Acid Sequences", pat. de EE.UU. n° 4.683.202; Mullis *et al.*, "Process for Amplifying, Detecting and/or Cloning Nucleic Acid Sequences", pat. de EE.UU. n° 4.800.159; Gelfand *et al.*, "Reaction Mixtures for the Detection of Target Nucleic Acids", pat. de EE.UU. n° 5.804.375; Mullis *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.* 155, 335-350; y Murakawa *et al.* (1988) *DNA* 7, 287-295).

En una variación denominada RT-PCR, se usa la transcriptasa inversa (RT) para producir un ADN complementario (cADN) a partir de ARN, y el cADN se amplifica después mediante PCR para producir múltiples copias de ADN (Gelfand *et al.*, "Reverse Transcription with Thermostable DNA Polymerases - High Temperature Reverse Transcription", pat. de EE.UU. n°s 5.322.770 y 5.310.652).

Otro método de amplificación muy conocido es la amplificación mediante desplazamiento de cadenas, denominado habitualmente SDA, que usa ciclos de renaturalización de pares de secuencias de cebadores a las cadenas opuestas de una secuencia objetivo, la prolongación de los cebadores en presencia de un dNTP para producir un producto de prolongación de cebadores hemifosforotioado bicatenario, la formación de una mella mediada por endonucleasa en un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción hemi-modificado, y la prolongación de los cebadores mediada por polimerasa desde el extremo 3' de la mella para desplazar la cadena existente y producir una cadena para la siguiente ronda de renaturalización del cebador, formación de mella y desplazamiento de la cadena, lo que da como resultado la amplificación geométrica del producto (p.ej., Walker, G. *et al.* (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 392-396; Walker *et al.*, "Nucleic Acid Target Generation", pat. de EE.UU. n° 5.270.184; Walker, "Strand Displacement Amplification", pat. de EE.UU. n° 5.455.166; y Walker *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20, 1691-1696). La SDA termófila (tSDA) usa endonucleasas y polimerasas termófilas a temperaturas superiores esencialmente en el mismo método (pat. europea n° 0 684 315).

Otros métodos de amplificación incluyen la amplificación por círculo rodante (RCA) (p.ej., Lizardi, "Rolling Circle Replication Reporter Systems", pat. de EE.UU. n° 5.854.033); la amplificación dependiente de helicasa (HDA) (p.ej., Kong *et al.*, "Helicase Dependent Amplification Nucleic Acids", pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° US 2004-0058378 A1); y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (p.ej., Notomi *et al.*, "Process for Synthesizing Nucleic Acid", pat. de EE.UU. n° 6.410.278).

Los métodos de amplificación basados en la transcripción usados habitualmente en la técnica incluyen la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos, también denominada NASBA (p.ej., Malek *et al.*, pat. de EE.UU. n° 5.130.238); los métodos que se basan en el uso de una ARN replicasa para amplificar la molécula de sonda propiamente dicha, denominada habitualmente Q β replicasa (p.ej., Lizardi, P. *et al.* (1988) *BioTechnol.* 6, 1197-1202); los métodos de amplificación basados en la transcripción (p.ej., Kwoh, D. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1173-1177) y la replicación de secuencias auto-sostenida (p.ej., Guatelli, J. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1874-1878;

Landgren (1993) *Trends in Genetics* 9, 199-202; y HELEN H. LEE *et al.*, NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGIES (1997)).

Otro método de amplificación basado en la transcripción es la amplificación mediada por la transcripción, denominado habitualmente TMA, que sintetiza múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico objetivo de manera autocatalítica en condiciones sustancialmente constantes de temperatura, fuerza iónica y pH, en el que múltiples copias de ARN de la secuencia objetivo generan copias adicionales de manera autocatalítica (p.ej., Kacian *et al.*, "Nucleic Acid Sequence Amplification Methods", pat. de EE.UU. n° 5.480.784; y Kacian *et al.*, pat. de EE.UU. n° 5.399.491). TMA es un sistema de amplificación sólido y sumamente sensible con una eficacia demostrada, que supera muchos de los problemas asociados a los sistemas de amplificación basados en PCR. En particular, los ciclos de temperatura no son necesarios.

Los ensayos de amplificación son especialmente adecuados para la detección de microorganismos en el contexto de los ensayos de laboratorio clínico, la monitorización de bioprocesos, o cualquier otra situación en la que se desea la detección de microorganismos en un tipo de muestra particular, ofreciendo una sensibilidad elevada y un tiempo rápido para la obtención de resultados respecto de las técnicas microbiológicas convencionales. Además, se pueden usar los métodos de amplificación en la detección del gran número de microorganismos que son difíciles o imposibles de cultivar en medios sintéticos. Sin embargo, existen ciertas limitaciones asociadas a los ensayos de amplificación de primera generación que han limitado su aceptación en ciertas situaciones, tales como los laboratorios de microbiología clínica. Un problema intrínseco asociado a la elevada sensibilidad de los sistemas de amplificación de ácidos nucleicos es que el ácido nucleico contaminante introducido en el sistema de amplificación (p.ej., de uno o más reactivos utilizados durante la amplificación, del técnico que lleva a cabo el ensayo, del medio en el que se lleva a cabo la amplificación, etc.) puede proporcionar resultados positivos falsos. Por ejemplo, incluso las cantidades extremadamente pequeñas de contaminación de ácidos nucleicos presentes en los reactivos y/o las enzimas usadas en una reacción de amplificación, o en el medio en el que se lleva a cabo la reacción de amplificación, pueden dar lugar a una señal de amplificación positiva a pesar del hecho de que la secuencia de interés no esté presente en la muestra de ácido nucleico que se esté ensayando. Esto requiere que se invierta un esfuerzo significativo en la preparación de la muestra, la purificación, la esterilización, etc. de los reactivos usados en las reacciones de amplificación para evitar o minimizar los resultados positivos falsos.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de un sistema sólido de amplificación de ácidos nucleicos que pueda amplificar selectivamente una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo de interés a la vez que se reducen o se eliminan los resultados positivos falsos que pueden surgir como resultado del material biológico contaminante, tal como el ácido nucleico contaminante. También sigue existiendo la necesidad de sistemas de amplificación que tengan requisitos reducidos de purificación de reactivos y/o esterilidad. Como se describe adicionalmente en la presente memoria, la presente invención cumple estas necesidades y ofrece otras ventajas relacionadas.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se dirige en general a métodos de amplificación de ácidos nucleicos que reducen o eliminan de manera deseable las señales de amplificación positivas falsas que resultan del material biológico contaminante, p.ej., ácido nucleico, que puede estar presente en uno o más reactivos, componentes o materiales que se usan en una reacción de amplificación, o que están presentes en el medio en el que se lleva a cabo la reacción de amplificación. La invención ofrece además la ventaja de requerir un esfuerzo de purificación y/o esterilidad menos riguroso que el necesario convencionalmente para asegurar que las enzimas y otros reactivos y componentes usados en las reacciones de amplificación están exentos de contaminación por ácidos nucleicos bacterianos y de otro tipo que pueden producir resultados positivos falsos. Tales componentes o materiales incluyen, pero sin limitación, agua, tampones, sales, soportes sólidos (p.ej., partículas o esferas cargadas magnéticamente), y receptáculos (p.ej., objetos de cristal o de plástico). Por lo tanto, los métodos de la invención son útiles para detectar y/o cuantificar microorganismos en muestras clínicas, productos alimenticios, agua, muestras industriales y ambientales, reservas de semillas, y otros tipos de materiales en los que puede ser necesario detectar y/o monitorizar la presencia de microorganismos. Los métodos de la invención tienen ventajas particulares para el análisis de materias primas usadas en la producción de productos para las industrias de biotecnología, farmacia, cosmética y bebidas, para el análisis antes de la comercialización de los productos finales, y para el cribado de la esterilidad para analizar una clase de organismos o los organismos viables totales en un material de interés (bacterianos fúngicos o ambos). En situaciones clínicas, los métodos de la invención serían especialmente útiles para el análisis de la sepsis, especialmente septicemia, que está provocada por organismos patógenos y/o sus toxinas en el torrente sanguíneo. Los métodos de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Según una realización de la presente descripción, se proporcionan métodos para la amplificación selectiva de al menos una secuencia de ácido nucleico objetivo, tal como una secuencia de ADN o una secuencia de ARN, en el que el método comprende las etapas de: (a) tratar una secuencia de ácido

nucleico objetivo en una muestra de ácido nucleico, p.ej., en la que el ácido nucleico objetivo está inmovilizado en un soporte sólido, con una secuencia marcadora heteróloga para producir una secuencia de ácido nucleico objetivo marcada; (b) reducir en dicha muestra la concentración efectiva de las secuencias marcadoras heterólogas que no han formado parte de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo marcada y que están en una forma capaz de producir una secuencia de ácido nucleico objetivo marcada con dicha secuencia de ácido nucleico objetivo; y (c) someter a dicha secuencia de ácido nucleico objetivo marcada a reactivos y condiciones suficientes para la amplificación detectable de la secuencia de ácido nucleico objetivo, en la que la etapa de sometimiento expone la muestra de ácido nucleico a una fuente contaminante conocida de la secuencia de ácido nucleico objetivo tras la etapa (b), y en la que la amplificación detectable de la secuencia de ácido nucleico objetivo se limita sustancialmente a la amplificación de la secuencia de ácido nucleico objetivo aportada por la secuencia de ácido nucleico objetivo marcada de la etapa (a), y no por la secuencia de ácido nucleico objetivo aportada por la fuente contaminante conocida.

Los métodos de la descripción son útiles en particular cuando uno o más reactivos o componentes usados se producen con un material que se sabe que es una fuente contaminante de una secuencia de ácido nucleico objetivo que se va a amplificar. En un ejemplo, uno o más de los reactivos usados en los métodos, tales como las polimerasas de ácidos nucleicos, se producen mediante el uso de un microorganismo que contiene la secuencia de ácido nucleico objetivo. En otro ejemplo, los componentes usados en los métodos, tales como los recipientes de reacción, las puntas de pipeta y los soportes sólidos para la unión de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo marcadas, pueden ser una fuente contaminante conocida de la secuencia de ácido nucleico objetivo. Además, los métodos son útiles cuando las condiciones ambientales en las que se lleva a cabo la amplificación incluyen una fuente contaminante conocida de una secuencia de ácido nucleico objetivo, tal como el aire ambiental, el operador o la instrumentación analítica.

En un aspecto más particular de esta realización, la secuencia de ácido nucleico objetivo marcada está inmovilizada en un soporte sólido durante la etapa (b).

En otro aspecto particular, la etapa (b) comprende diluir o eliminar las secuencias marcadoras heterólogas que no han formado parte de la secuencia de ácido nucleico objetivo marcada de la muestra de ácido nucleico. En un aspecto alternativo, la etapa (b) comprende inactivar las secuencias marcadoras heterólogas que no han formado parte de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo marcada para producir una secuencia marcadora heteróloga inactivada. En un aspecto relacionado, el método comprende además eliminar la secuencia marcadora heteróloga inactivada de dicha muestra de ácido nucleico durante la etapa (b). La secuencia marcadora heteróloga se puede inactivar bloqueando su capacidad de complejarse con la secuencia de ácido nucleico objetivo, mediante el uso de una enzima para digerir un componente o escindir un sitio de una porción complejada de la secuencia marcadora heteróloga, alterando químicamente la secuencia marcadora heteróloga, o alterando por otros medios la capacidad de la secuencia marcadora heteróloga de complejarse con la secuencia de ácido nucleico objetivo en una mezcla de reacción de amplificación.

En otro aspecto, la secuencia marcadora heteróloga está contenida en un oligonucleótido marcado, en el que el oligonucleótido marcado comprende primeras y segundas regiones, y la primera región comprende una secuencia de hibridación al objetivo que hibrida a un extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico objetivo y la segunda región comprende una secuencia marcadora situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación al objetivo, y en la que la secuencia marcadora no hibrida de manera estable a un ácido nucleico objetivo que contiene la secuencia de ácido nucleico objetivo.

Aún en otro aspecto, la secuencia marcadora heteróloga tiene una forma activa durante la etapa (a) que permite que la secuencia marcadora heteróloga produzca la secuencia de ácido nucleico objetivo marcada, y en la que la secuencia marcadora heteróloga que no ha producido la secuencia de ácido nucleico objetivo marcada se convierte en una forma inactiva en la etapa (b) que bloquea que la secuencia marcadora heteróloga produzca una secuencia de ácido nucleico objetivo marcada durante la etapa (c).

La secuencia de hibridación al objetivo, en ciertos aspectos, es un oligonucleótido universal, tal como un oligonucleótido bacteriano o fúngico universal.

La etapa (c) comprende producir productos de amplificación en una reacción de amplificación de ácido nucleico mediante el uso de primeros y segundos oligonucleótidos, y el primer oligonucleótido comprende una secuencia que hibrida a un extremo 3' del complemento de la secuencia de ácido nucleico objetivo y el segundo oligonucleótido comprende una secuencia que hibrida a un complemento de la secuencia marcadora pero que no hibrida de manera estable a la secuencia de ácido nucleico objetivo, en la que cada uno de los productos de amplificación comprende una secuencia de bases que es sustancialmente idéntica o complementaria a la secuencia de bases de la secuencia de ácido nucleico objetivo, y comprende además una secuencia de bases que es sustancialmente idéntica o complementaria a todo o a una parte de la secuencia marcadora.

Son adecuados diversos métodos de amplificación para el uso en la presente invención. Por ejemplo, en un aspecto, la reacción de amplificación es una reacción de PCR. En otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico objetivo se amplifica mediante una reacción de amplificación basada en la transcripción, preferiblemente una reacción TMA, llevada a cabo en condiciones isotérmicas.

5 La secuencia de ácido nucleico objetivo amplificada según los métodos puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico objetivo de interés, pero será en general una secuencia de ácido nucleico obtenida de un microorganismo. Además, el método puede ser selectivo para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo contenida en el ácido nucleico de una única cepa o especie de microorganismos o en múltiples especies de microorganismos. De manera alternativa, el método puede ser selectivo para la amplificación de múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo contenidas en el ácido nucleico de múltiples especies de microorganismos, en las que, por ejemplo, la secuencia de hibridación al objetivo de un oligonucleótido marcado hibrida a una región objetivo presente en cada una de las múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo en la etapa (a).

10 Por ejemplo, en un aspecto particular, el método es selectivo para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo contenida en cada una de una diversidad de ácidos nucleicos objetivo, y en la que la secuencia marcadora heteróloga produce una secuencia de ácido nucleico objetivo marcada con la secuencia de ácido nucleico objetivo de cada una de la diversidad de ácidos nucleicos objetivo presentes en la muestra de ácido nucleico en la etapa (a). En un aspecto más particular, la secuencia de ácido nucleico objetivo contenida en cada una de la diversidad de ácidos nucleicos objetivo es la misma secuencia de ácido nucleico.

15 En otro aspecto particular, el método es selectivo para la amplificación de múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo bacterianas o fúngicas, p.ej., en las que las múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo bacterianas o fúngicas son secuencias de ácidos nucleicos ribosómicas.

20 En otro aspecto particular, el método es selectivo para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos objetivo obtenidas de los miembros de un grupo de especies bacterianas que incluyen *Staphylococci* spp. (p.ej., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y *Staphylococcus haemolyticus*), *Streptococci* spp. (p.ej., *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Viridans streptococci* y *streptococci* beta-hemolíticos), *Enterococcus* spp. (p.ej., *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*), *Escherichia* spp. (p.ej., *Escherichia coli*), *Klebsiella* spp. (p.ej., *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*), *Pseudomonas* spp. (p.ej., *Pseudomonas aeruginosa*), *Enterobacter* spp. (p.ej., *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes*), *Proteus* spp. (p.ej., *Proteus mirabilis*), *Bacterioides* spp., *Clostridium* spp., *Serratia* spp. (p.ej., *Serratia marcescens*), *Acinetobacter* spp. (p.ej., *Acinetobacter baumannii*) y *Stenotrophomonas* spp. (p.ej., *Stenotrophomonas maltophilia*). Al menos una parte de estos microorganismos sería adecuada para la detección en un análisis de sepsis.

30 En otro aspecto, el método es selectivo para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos objetivo obtenidas de los miembros de un grupo de especies fúngicas que incluyen *Candida* spp. (p.ej., *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae*, *Candida krusei*, *Candida zeylanoides*, *Candida guilliermondii*, *Candida pseudotropicalis* y *Candida famata*), *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp. (p.ej., *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii*) *Coccidioides* spp. (p.ej., *Coccidioides immitis*), *Trichosporon* spp. (p.ej., *Trichosporon cutaneum*), *Malassezia* spp. (p.ej., *Malassezia furfur*), *Rhodotorula* spp., *Nocardia* spp. (p.ej., *Nocardia asteroides*), *Fusarium* spp. y *Asperigillus* spp. (p.ej., *Asperigillus fumigatus*). Al menos una parte de estos microorganismos sería adecuada para la detección en un análisis de sepsis.

35 Aún en otro aspecto, al menos una parte de una muestra de ácido nucleico usada en los métodos se obtiene de una fuente clínica, de agua, industrial, ambiental, de semillas, de bebidas o de alimentos.

Los métodos son especialmente adecuados, en ciertos aspectos, para el uso en el análisis de la esterilidad o el análisis diagnóstico de sepsis.

40 Según otra realización de la descripción, se proporciona un método para la amplificación selectiva de al menos una secuencia de ácido nucleico objetivo de una muestra de ácido nucleico, y el método comprende las etapas de: (a) tratar una muestra de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico objetivo con un oligonucleótido marcado que comprende primeras y segundas regiones, y la primera región comprende una secuencia de hibridación al objetivo que hibrida a un extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico objetivo y la segunda región comprende una secuencia marcadora situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación al objetivo, en la que la segunda región no hibrida de manera estable a un ácido nucleico objetivo que contiene la secuencia de ácido nucleico objetivo; (b) reducir en dicha muestra de ácido nucleico la concentración efectiva de oligonucleótido marcado sin hibridar que tiene una forma activa en la que una secuencia de hibridación al objetivo de dicho oligonucleótido marcado sin hibridar está disponible para la hibridación a dicha secuencia de ácido nucleico objetivo; y (c)

producir productos de amplificación en una reacción de amplificación de ácidos nucleicos mediante el uso de primeros y segundos oligonucleótidos, en los que el primer oligonucleótido comprende una secuencia de hibridación que hibrida a un extremo 3' del complemento de la secuencia de ácido nucleico objetivo y el segundo oligonucleótido comprende una secuencia de hibridación que hibrida al complemento de la secuencia marcadora, en el que el segundo oligonucleótido hibrida de manera estable al ácido nucleico objetivo, y en el que cada uno de los productos de amplificación comprende una secuencia de bases que es sustancialmente idéntica o complementaria a la secuencia de bases de la secuencia de ácido nucleico objetivo y que comprende además una secuencia de bases que es sustancialmente idéntica o complementaria a toda o parte de la secuencia marcadora.

En un aspecto de los métodos anteriores, al menos una secuencia de ácido nucleico objetivo está inmovilizada en un soporte sólido durante la etapa (b). En otro aspecto, la etapa (b) no incluye el uso de una enzima que tiene una actividad de nucleasa.

La concentración efectiva del oligonucleótido marcado sin hibridar en forma activa antes de la amplificación se reduce preferiblemente diluyendo la muestra de ácido nucleico o inactivando y/o eliminando el oligonucleótido marcado sin hibridar. En un aspecto, la etapa (b) comprende inactivar el oligonucleótido marcado sin hibridar de forma que el oligonucleótido marcado sin hibridar no hibrida de manera estable a la secuencia de ácido nucleico objetivo durante la etapa (c). En un ejemplo de inactivación, un oligonucleótido marcado tiene una forma activa durante la etapa (a) que permite que la secuencia de hibridación al objetivo hibride a la secuencia de ácido nucleico objetivo, y en el que el oligonucleótido marcado sin hibridar se convierte en una forma inactiva en la etapa (b) que bloquea o impide que el oligonucleótido marcado hibride a la secuencia de ácido nucleico objetivo durante la etapa (c). El oligonucleótido marcado se puede inactivar bloqueando el que la secuencia de hibridación al objetivo hibride a la secuencia de ácido nucleico objetivo, mediante el uso de una enzima para digerir un componente o para escindir un sitio de una molécula bicatenaria formada entre la secuencia de hibridación al objetivo y la secuencia de ácido nucleico objetivo, alterando químicamente la secuencia de hibridación al objetivo, o alterando por otro medio la capacidad del oligonucleótido marcado de hibridar a la secuencia de ácido nucleico objetivo en una mezcla de reacción de amplificación.

En una realización relacionada, las condiciones de las etapas (b) y (c) son menos rigurosas que las condiciones de la etapa (a). En otra realización relacionada, la temperatura de la muestra de ácido nucleico se disminuye entre las etapas (a) y (b).

En otro ejemplo en el que la etapa (b) comprende inactivar el oligonucleótido marcado sin hibridar, el oligonucleótido marcado sin hibridar de la etapa (a) se convierte desde una forma monocatenaria a una forma de molécula bicatenaria en la etapa (b). La forma de molécula bicatenaria puede ser una molécula marcadora en horquilla que comprende una secuencia de cierre del marcador unida a un extremo 5' del oligonucleótido marcado, en el que la secuencia de cierre del marcador hibrida a la secuencia de hibridación al objetivo en las condiciones de la etapa (b), por lo que se bloquea la hibridación del oligonucleótido marcado sin hibridar de la etapa (a) a la secuencia de ácido nucleico objetivo en las etapas (b) y (c). En otro aspecto, la secuencia de cierre del marcador está unida al oligonucleótido marcado mediante un espaciador no nucleotídico. Por ejemplo, un extremo 5' de la secuencia de cierre del marcador puede estar unido a un extremo 5' del oligonucleótido marcado.

El oligonucleótido marcado puede comprender además una tercera región que contiene un promotor para una ARN polimerasa, y la tercera región está situada en 5' respecto de la segunda región.

En otro aspecto, la secuencia de cierre del marcador está modificada para impedir la iniciación de la síntesis de ADN a partir de ella.

Según otro aspecto, una base 3'-terminal de la secuencia de hibridación al objetivo se hibrida a una base 5'-terminal de la secuencia de cierre del marcador. En otro aspecto, un extremo 3' de la secuencia de cierre del marcador se une a un extremo 5' del oligonucleótido marcado.

Aún en otro aspecto, la secuencia de hibridación al objetivo se hibrida a un oligonucleótido de cierre del marcador en la etapa (b), y el oligonucleótido marcado y el oligonucleótido de cierre del marcador son moléculas distintas. El oligonucleótido de cierre del marcador se puede modificar, si se desea, para impedir la iniciación de la síntesis de ADN a partir de él.

Además, en ciertos aspectos, una base 3'-terminal de la secuencia de hibridación al objetivo se hibrida a una base 5'-terminal del oligonucleótido de cierre del marcador.

En otros aspectos, el oligonucleótido marcado y el oligonucleótido de cierre del marcador están presentes en la muestra de ácido nucleico durante la etapa (a), y en el que la secuencia de hibridación al objetivo favorece la hibridación a la secuencia de ácido nucleico objetivo sobre el oligonucleótido de cierre del marcador en la etapa (a).

Como se indicó anteriormente, los métodos de la invención pueden emplear cualquiera de una diversidad de técnicas de amplificación. En ciertos casos, se puede preferir usar una reacción de amplificación isotérmica, tal como una reacción de amplificación basada en la transcripción, preferiblemente TMA o TMA en tiempo real.

- 5 En un aspecto particular, el primer oligonucleótido comprende un promotor para una ARN polimerasa que está situado en 5' respecto de la secuencia de hibridación. En otro aspecto, el segundo oligonucleótido comprende un promotor para una ARN polimerasa que está situado en 5' respecto de la secuencia de hibridación, y en el que el oligonucleótido marcado comprende además un promotor para una ARN polimerasa que está situado en 5' respecto de la segunda región.
- 10 La secuencia de ácido nucleico objetivo amplificada según los métodos puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico objetivo de interés, pero en general será una secuencia de ácido nucleico obtenida a partir de un microorganismo. Además, el método puede ser selectivo para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo contenida en el ácido nucleico de una única cepa o especie de microorganismos, o en múltiples especies de microorganismos. De manera alternativa, el método puede ser selectivo para la amplificación de múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo contenidas en el ácido nucleico de múltiples especies de microorganismos, en el que, por ejemplo, la secuencia de hibridación al objetivo de un oligonucleótido marcado hibrida a una región objetivo presente en cada una de las múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo en la etapa (a).
- 15 En otro aspecto, el método es selectivo para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo contenida en cada una de una diversidad de ácidos nucleicos objetivo, y en el que la secuencia de hibridación al objetivo hibrida a un extremo 3' de la secuencia de ácido nucleico objetivo de cada una de la diversidad de ácidos nucleicos objetivo presentes en la muestra de ácido nucleico en la etapa (a). En otro aspecto, la secuencia de ácido nucleico objetivo contenida en cada uno de dicha diversidad de ácidos nucleicos objetivo es la misma secuencia de ácido nucleico.
- 20 En una realización particular, el método es selectivo para la amplificación de múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo bacterianas o fúngicas, p.ej., en la que las múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo bacterianas o fúngicas son secuencias de ácidos nucleicos ribosómicas.
- 25 En una realización más particular, el método es selectivo para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos objetivo obtenidas de miembros de un grupo de especies bacterianas que incluyen *Staphylococci* spp. (p.ej., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y *Staphylococcus haemolyticus*), *Streptococci* spp. (p.ej., *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Viridans streptococci* y *streptococci* beta-hemolíticos), *Enterococcus* spp. (p.ej., *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*), *Escherichia* spp. (p.ej., *Escherichia coli*), *Klebsiella* spp. (p.ej., *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*), *Pseudomonas* spp. (p.ej., *Pseudomonas aeruginosa*), *Enterobacter* spp. (p.ej., *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes*), *Proteus* spp. (p.ej., *Proteus mirabilis*), *Bacterioides* spp., *Clostridium* spp., *Serratia* spp. (p.ej., *Serratia marcescens*), *Acinetobacter* spp. (p.ej., *Acinetobacter baumannii*) y *Stenotrophomonas* spp. (p.ej., *Stenotrophomonas maltophilia*). Al menos una parte de estos microorganismos sería adecuada para la detección en un análisis de sepsis.
- 30 En otra realización particular, el método es selectivo para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos objetivo obtenidas de miembros de un grupo de especies fúngicas que incluyen *Candida* spp. (p.ej., *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae*, *Candida krusei*, *Candida zeylanoides*, *Candida guilliermondi*, *Candida pseudotropicalis* y *Candida famata*), *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp. (p.ej., *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii*) *Coccidioides* spp. (p.ej., *Coccidioides immitis*), *Trichosporon* spp. (p.ej., *Trichosporon cutaneum*), *Malassezia* spp. (p.ej., *Malassezia furfur*), *Rhodotorula* spp., *Nocardia* spp. (p.ej., *Nocardia asteroides*), *Fusarium* spp. y *Asperigillus* spp. (p.ej., *Asperigillus fumigatus*). Al menos una parte de estos microorganismos sería adecuada para la detección en un análisis de sepsis.
- 35 En ciertos aspectos, la secuencia de hibridación al objetivo hibrida a un extremo 3' de cada una de las múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo presentes en la muestra de ácido nucleico en la etapa (a). Además, el primer oligonucleótido hibrida a un extremo 3' del complemento de cada una de las múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo presentes en la muestra de ácido nucleico en la etapa (c).
- 40 El método puede comprender además una diversidad de primeros oligonucleótidos, y cada uno de la diversidad de primeros oligonucleótidos hibrida a un extremo 3' del complemento de al menos una, pero menos de todas, de las múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo presentes en la muestra de ácido nucleico en la etapa (c).
- 45 El oligonucleótido marcado, en una realización particular de la invención, es un oligonucleótido bacteriano universal o un oligonucleótido fúngico universal. Tales oligonucleótidos marcados son
- 50
- 55
- 60

especialmente adecuados para los métodos de análisis de la esterilidad, tales como los métodos para analizar materiales de bioprocesos o que son de diagnóstico de sepsis.

5 En un aspecto más particular, la secuencia de hibridación al objetivo hibrida a un extremo 3' del ácido nucleico objetivo de cada uno de la diversidad de ácidos nucleicos objetivo presentes en la muestra de ácido nucleico en la etapa (a), y la diversidad de ácidos nucleicos objetivo pertenecen a una clase de microorganismos seleccionada del grupo que consiste en Eubacterias, bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas y hongos. En otro aspecto, cada uno de la diversidad de ácidos nucleicos objetivo es un ácido nucleico ribosómico.

10 En otro aspecto de la descripción, las múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo incluyen miembros que pertenecen a una clase de microorganismos bacterianos seleccionados del grupo que consiste en *Staphylococci* spp. (p.ej., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y *Staphylococcus haemolyticus*), *Streptococci* spp. (p.ej., *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Viridans streptococci* y *streptococci* beta-hemolíticos), *Enterococcus* spp. (p.ej., *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*), *Escherichia* spp. (p.ej., *Escherichia coli*), *Klebsiella* spp. (p.ej., *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*), *Pseudomonas* spp. (p.ej., *Pseudomonas aeruginosa*), *Enterobacter* spp. (p.ej., *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes*), *Proteus* spp. (p.ej., *Proteus mirabilis*), *Bacterioides* spp., *Clostridium* spp., *Serratia* spp. (p.ej., *Serratia marcescens*), *Acinetobacter* spp. (p.ej., *Acinetobacter baumannii*) y *Stenotrophomonas* spp. (p.ej., *Stenotrophomonas maltophilia*). Al menos una parte de estos microorganismos sería adecuada para la detección en un análisis de sepsis.

25 En un aspecto adicional de la descripción, las múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo incluyen miembros que pertenecen a una clase de microorganismos fúngicos seleccionados del grupo que consiste en *Candida* spp. (p.ej., *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae*, *Candida krusei*, *Candida zeylanoides*, *Candida guilliermondii*, *Candida pseudotropicalis* y *Candida famata*), *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp. (p.ej., *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii*) *Coccidioides* spp. (p.ej., *Coccidioides immitis*), *Trichosporon* spp. (p.ej., *Trichosporon cutaneum*), *Malassezia* spp. (p.ej., *Malassezia furfur*), *Rhodotorula* spp., *Nocardia* spp. (p.ej., *Nocardia asteroides*), *Fusarium* spp. y *Asperigillus* spp. (p.ej., *Asperigillus fumigatus*). Al menos una parte de estos microorganismos sería adecuada para la detección en un análisis de sepsis.

35 La muestra de ácido nucleico se expone a menudo a una fuente contaminante conocida de la secuencia de ácido nucleico objetivo tras la etapa (b), y, por lo tanto, los métodos descritos posibilitan que la producción de los productos de amplificación se limite sustancialmente a la amplificación de la secuencia de ácido nucleico objetivo aportada por la muestra de ácido nucleico, y no por la fuente contaminante de la secuencia de ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, uno o más reactivos o componentes usados en la reacción de amplificación es una fuente contaminante conocida de la secuencia de ácido nucleico objetivo. De manera alternativa, o adicional, uno o más reactivos se producen con un material que se sabe que es una fuente contaminante de la secuencia del ácido nucleico objetivo, tal como polimerasas de ácidos nucleicos producidas mediante el uso de microorganismos que se sabe que contienen la secuencia de ácido nucleico objetivo. Además, las condiciones ambientales en las que se lleva a cabo el método pueden incluir una fuente contaminante conocida de la secuencia de ácido nucleico objetivo. En un aspecto particular, al menos una parte de dicho ácido nucleico se obtiene de una fuente clínica, de agua, industrial, ambiental, de semillas, de bebidas o de alimentos.

45 Según otra realización de la presente descripción, la secuencia de ácido nucleico objetivo es una secuencia objetivo de ARN, y la etapa (c) comprende: prolongar el oligonucleótido marcado hibridado a la secuencia de ácido nucleico objetivo en una reacción de prolongación de cebador con una ADN polimerasa para producir un primer producto de prolongación de cebador que comprende una región complementaria a la secuencia de ácido nucleico objetivo; separar el primer producto de prolongación de cebador del ácido nucleico objetivo mediante el uso de una enzima que degrada de manera selectiva esa parte del ácido nucleico objetivo hibridado al primer producto de prolongación de cebador; tratar el primer producto de prolongación de cebador con el primer oligonucleótido, y el primer oligonucleótido es un oligonucleótido promotor que comprende primeras y segundas regiones, y la primera región comprende una secuencia de hibridación que hibrida a una región del primer producto de prolongación de cebador que es complementaria a un extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico objetivo para formar un híbrido oligonucleótido promotor:primer producto de prolongación de cebador, y la segunda región comprende un promotor para una ARN polimerasa que está situado en 5' respecto de la primera región; transcribir a partir del híbrido oligonucleótido promotor:primer producto de prolongación de cebador múltiples copias de un primer producto de ARN complementario a al menos una parte del primer producto de prolongación de cebador mediante el uso de una ARN polimerasa que reconoce el promotor e inicia la transcripción a partir de él, en el que la secuencia de bases del primer producto de ARN es sustancialmente idéntica a la secuencia de bases de la secuencia de ácido nucleico objetivo y el complemento de la secuencia marcadora; tratar el primer producto de ARN con el segundo oligonucleótido, y el segundo oligonucleótido es un oligonucleótido de cebado que hibrida al complemento de la secuencia marcadora para formar un

híbrido oligonucleótido de cebado:primer producto de ARN de forma que se puede iniciar una reacción de prolongación de cebador a partir del oligonucleótido de cebado; prolongar el oligonucleótido de cebado en una reacción de prolongación de cebador con una ADN polimerasa para producir un segundo producto de prolongación de cebador complementario al primer producto de ARN, y el segundo producto de prolongación de cebador tiene un extremo 3' que es complementario a un extremo 5' del primer producto de ARN; separar el segundo producto de prolongación de cebador del primer producto de ARN mediante el uso de una enzima que degrada de manera selectiva dicho primer producto de ARN; tratar el segundo producto de prolongación de cebador con el oligonucleótido promotor para formar un híbrido oligonucleótido promotor:segundo producto de prolongación de cebador; prolongar un extremo 3' del segundo producto de prolongación de cebador en el híbrido oligonucleótido promotor:segundo producto de prolongación de cebador para añadir una secuencia complementaria a la segunda región del oligonucleótido promotor; y transcribir a partir del híbrido oligonucleótido promotor:segundo producto de prolongación de cebador múltiples copias de un segundo producto de ARN complementario al segundo producto de prolongación de cebador mediante el uso de la ARN polimerasa, en el que la secuencia de bases del segundo producto de ARN es sustancialmente idéntica a la secuencia de bases de la secuencia de ácido nucleico objetivo y el complemento de la secuencia marcadora.

En otro aspecto de esta realización de la descripción, la etapa (a) comprende además tratar la muestra de ácido nucleico con una molécula de unión que se une al ácido nucleico objetivo en posición adyacente o cercana a un extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico objetivo, y en la que el primer producto de prolongación de cebador tiene un extremo 3' que está determinado por la molécula de unión y que es complementario al extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico objetivo.

En otro aspecto, la etapa (c) de la realización anterior comprende además prolongar un extremo 3' del primer producto de prolongación de cebador en el híbrido oligonucleótido promotor:primer producto de prolongación de cebador para añadir una secuencia complementaria al promotor. Aún en otro aspecto, el oligonucleótido promotor se modifica para impedir la iniciación de la síntesis de ADN a partir de él.

El oligonucleótido promotor hibridado al primer producto de prolongación de cebador se prolonga con una ADN polimerasa para producir un producto de prolongación de cebador complementario al primer producto de prolongación de cebador; y el oligonucleótido promotor hibridado a dicho segundo producto de prolongación de cebador se prolonga con una ADN polimerasa para producir un producto de prolongación de cebador complementario al segundo producto de prolongación de cebador.

Las etapas de separación de los métodos descritos se pueden llevar a cabo con una actividad de ribonucleasa proporcionada por la ADN polimerasa. De manera alternativa, las etapas de separación se llevan a cabo con una actividad de ribonucleasa proporcionada por una enzima distinta de dicha ADN polimerasa.

Según otra realización de la presente descripción, la secuencia de ácido nucleico objetivo es una secuencia objetivo de ARN, y la etapa (c) comprende: prolongar el oligonucleótido marcado hibridado a la secuencia de ácido nucleico objetivo en una reacción de prolongación de cebador con una ADN polimerasa para producir un primer producto de prolongación de cebador que comprende una región complementaria a la secuencia de ácido nucleico objetivo, en la que el oligonucleótido marcado comprende además una tercera región situada en 5' respecto de la segunda región, y la tercera región comprende un promotor para una ARN polimerasa; separar el primer producto de prolongación de cebador del ácido nucleico objetivo mediante el uso de una enzima que degrada de manera selectiva esa parte del ácido nucleico objetivo hibridado al primer producto de prolongación de cebador; tratar el primer producto de prolongación de cebador con el primer oligonucleótido, y el primer oligonucleótido es un oligonucleótido de cebado que hibrida a una región del primer producto de prolongación de cebador que es complementaria a un extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico objetivo para formar un híbrido oligonucleótido de cebado:primer producto de prolongación de cebador de manera que se puede iniciar una reacción de prolongación de cebador a partir del oligonucleótido de cebado; prolongar el oligonucleótido de cebado en una reacción de prolongación de cebador con una ADN polimerasa para producir un segundo producto de prolongación de cebador complementario al primer producto de prolongación de cebador; y usar el segundo producto de prolongación de cebador como molde para transcribir múltiples copias de un primer producto de ARN complementario a al menos una parte del segundo producto de prolongación de cebador mediante el uso de una ARN polimerasa que reconoce el promotor e inicia la transcripción a partir de él, en el que la secuencia de bases del primer producto de ARN es sustancialmente idéntica a la secuencia de bases de la secuencia marcadora y el complemento de la secuencia de ácido nucleico objetivo.

En otro aspecto de esta realización, la etapa (c) comprende además: tratar el primer producto de ARN con el oligonucleótido de cebado para formar un híbrido oligonucleótido de cebado:primer producto de ARN de forma que se puede iniciar una reacción de prolongación de cebador a partir del oligonucleótido de cebado; prolongar el oligonucleótido de cebado en una reacción de prolongación de cebador con una ADN polimerasa para producir un tercer producto de prolongación de cebador complementario al primer producto de ARN, y el tercer producto de prolongación de cebador tiene un extremo

3' que es complementario a un extremo 5' del primer producto de ARN; separar el tercer producto de prolongación de cebador del primer producto de ARN mediante el uso de una enzima que degrada de manera selectiva el primer producto de ARN; tratar el tercer producto de prolongación de cebador con el segundo oligonucleótido, y el segundo oligonucleótido es un oligonucleótido promotor que comprende primeras y segundas regiones, y la primera región comprende una secuencia de hibridación que hibrida al complemento de la secuencia marcadora para formar un híbrido oligonucleótido promotor:tercer producto de prolongación de cebador de forma que se puede iniciar una reacción de prolongación de cebador a partir del oligonucleótido promotor, y la segunda región comprende un promotor para una ARN polimerasa que está situado en 5' respecto de la primera región; prolongar el oligonucleótido promotor en una reacción de prolongación de cebador con la ADN polimerasa para producir un cuarto producto de prolongación de cebador complementario al tercer producto de prolongación de cebador; prolongar el tercer producto de prolongación de cebador para añadir una secuencia complementaria al promotor; transcribir a partir del híbrido oligonucleótido promotor:tercer producto de prolongación de cebador múltiples copias de un segundo producto de ARN complementario al tercer producto de prolongación de cebador mediante el uso de una ARN polimerasa que reconoce el promotor e inicia la transcripción a partir de él, en el que la secuencia de bases del segundo producto de ARN es sustancialmente idéntica a la secuencia de bases de la secuencia marcadora y el complemento de la secuencia de ácido nucleico objetivo.

En otro aspecto de esta realización, las etapas de separación se llevan a cabo con una actividad de ribonucleasa proporcionada por la ADN polimerasa. De manera alternativa, las etapas de separación se llevan a cabo con una actividad de ribonucleasa proporcionada por una enzima distinta de la ADN polimerasa.

Según otra realización de la presente descripción, la secuencia de ácido nucleico objetivo es una secuencia objetivo de ADN, y la etapa (c) comprende: prolongar el oligonucleótido marcado hibridado a la secuencia de ácido nucleico objetivo en una reacción de prolongación de cebador con una ADN polimerasa para producir un primer producto de prolongación de cebador que comprende una región complementaria a la secuencia de ácido nucleico objetivo; tratar el primer producto de prolongación de cebador con el primer oligonucleótido, y el primer oligonucleótido es un oligonucleótido promotor que comprende primeras y segundas regiones, y la primera región comprende una secuencia de hibridación que hibrida a una región del primer producto de prolongación de cebador que es complementaria a un extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico objetivo para formar un híbrido oligonucleótido promotor:primer producto de prolongación de cebador, y la segunda región es un promotor para una ARN polimerasa que está situada en 5' respecto de la primera región; transcribir a partir del híbrido oligonucleótido promotor:primer producto de prolongación de cebador múltiples copias de un primer producto de ARN complementario a al menos una parte del primer producto de prolongación de cebador mediante el uso de una ARN polimerasa que reconoce el promotor e inicia la transcripción a partir de él, en el que la secuencia de bases del primer producto de ARN es sustancialmente idéntica a la secuencia de bases de la secuencia de ácido nucleico objetivo y el complemento de la secuencia marcadora; tratar el primer producto de ARN con el segundo oligonucleótido, y el segundo oligonucleótido es un oligonucleótido de cebado que hibrida al complemento de la secuencia marcadora para formar un híbrido oligonucleótido de cebado:primer producto de ARN de forma que se puede iniciar una reacción de prolongación de cebador a partir del oligonucleótido de cebado; prolongar el oligonucleótido de cebado en una reacción de prolongación de cebador con una ADN polimerasa para proporcionar un segundo producto de prolongación de cebador que comprende el complemento del primer producto de ARN, y el segundo producto de prolongación de cebador tiene un extremo 3' que es complementario a un extremo 5' del primer producto de ARN; separar el segundo producto de prolongación de cebador del primer producto de ARN mediante el uso de una enzima que degrada de manera selectiva el primer producto de ARN; tratar el segundo producto de prolongación de cebador con el oligonucleótido promotor para formar un híbrido oligonucleótido promotor:segundo producto de prolongación de cebador; prolongar un extremo 3' del segundo producto de prolongación de cebador en el híbrido oligonucleótido promotor:segundo producto de prolongación de cebador para añadir una secuencia complementaria al promotor; y transcribir a partir del híbrido oligonucleótido promotor:segundo producto de prolongación de cebador múltiples copias de un segundo producto de ARN complementario al segundo producto de prolongación de cebador mediante el uso de la ARN polimerasa, en el que la secuencia de bases del segundo producto de ARN es sustancialmente idéntica a la secuencia de bases de la secuencia de ácido nucleico objetivo y el complemento de la secuencia marcadora.

En un aspecto de esta realización, el oligonucleótido promotor se modifica para impedir la iniciación de la síntesis de ADN a partir de él.

En otro aspecto, la etapa (a) comprende además: tratar la muestra de ácido nucleico con un oligonucleótido desplazador que hibrida al ácido nucleico objetivo en dirección 5' del oligonucleótido marcado de forma que se puede iniciar una reacción de prolongación de cebador desde el oligonucleótido desplazador; y prolongar el oligonucleótido desplazador en una reacción de prolongación de cebador con una ADN polimerasa para producir un tercer producto de prolongación de cebador que desplaza dicho primer producto de prolongación de cebador del ácido nucleico objetivo.

- 5 Aún en otra realización, la etapa (a) comprende además tratar la muestra de ácido nucleico con una molécula de unión que se une al ácido nucleico objetivo en posición adyacente o cercana a un extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico objetivo, en el que el primer producto de prolongación de cebador tiene un extremo 3' que está determinado por dicha molécula de unión y que es complementario al extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico objetivo.
- En un aspecto más particular, la etapa (c) comprende además prolongar un extremo 3' del primer producto de prolongación de cebador en el híbrido oligonucleótido promotor:primer producto de prolongación de cebador para añadir una secuencia complementaria a la secuencia promotora.
- 10 En otro aspecto particular, la etapa (c) comprende además: prolongar el oligonucleótido promotor hibridado al primer producto de prolongación de cebador con una ADN polimerasa para producir un producto de prolongación de cebador complementario al primer producto de prolongación de cebador; y prolongar el oligonucleótido promotor hibridado al segundo producto de prolongación de cebador con una ADN polimerasa para producir un producto de prolongación de cebador complementario al segundo producto de prolongación de cebador.
- 15 Las etapas de separación, en una realización, se llevan a cabo mediante una actividad de ribonucleasa proporcionada por dicha ADN polimerasa. De manera alternativa, las etapas de separación se llevan a cabo mediante una actividad de ribonucleasa proporcionada por una enzima distinta de dicha ADN polimerasa.
- 20 Otra realización de la presente descripción proporciona un equipo para el uso en la amplificación selectiva de al menos una secuencia de ácido nucleico objetivo de una muestra de ácido nucleico, y el equipo comprende: un oligonucleótido marcado que comprende una primera región que comprende una secuencia de hibridación al objetivo que hibrida a un extremo 3' de una secuencia de ácido nucleico objetivo en un primer conjunto de condiciones, de manera que la primera región se puede prolongar de una manera dependiente del molde en presencia de una ADN polimerasa, y una segunda región que comprende una secuencia marcadora situada en 5' respecto de la primera región, en la que la segunda región no hibrida de manera estable a un ácido nucleico objetivo que contiene la secuencia de ácido nucleico objetivo en el primer conjunto de condiciones; una secuencia de cierre del marcador que hibrida a la secuencia de hibridación al objetivo en un segundo conjunto de condiciones, por lo que se bloquea la hibridación del oligonucleótido marcado a la secuencia de ácido nucleico objetivo, en la que la secuencia de cierre del marcador no hibrida de manera estable a la secuencia de hibridación al objetivo en el primer conjunto de condiciones; y un primer oligonucleótido de cebado que hibrida al complemento de la secuencia marcadora en el segundo conjunto de condiciones de forma que el primer oligonucleótido de cebado se puede prolongar de una manera dependiente del molde en presencia de una ADN polimerasa.
- 25 30
- 35 En un aspecto más particular de esta realización, el oligonucleótido marcado comprende además una tercera región que contiene un promotor para una ARN polimerasa, y la tercera región está situada en 5' respecto de la segunda región.
- En otro aspecto, la base 3'-terminal de la secuencia de hibridación al objetivo hibrida a una base 5'-terminal de la secuencia de cierre del marcador cuando la secuencia de hibridación al objetivo no está hibridada a la secuencia de ácido nucleico objetivo en el segundo conjunto de condiciones.
- 40 Aún en otro aspecto, el extremo 5' de la secuencia de cierre del marcador incluye un resto para estabilizar una molécula bicatenaria formada entre la secuencia de cierre del marcador y la secuencia de hibridación al objetivo cuando la secuencia de hibridación al objetivo no está hibridada a la secuencia de ácido nucleico objetivo en el segundo conjunto de condiciones.
- 45 En otro aspecto, el oligonucleótido marcado y la secuencia de cierre del marcador constituyen moléculas diferentes, y la secuencia de cierre del marcador es un oligonucleótido de cierre del marcador. De manera alternativa, el oligonucleótido marcado y la secuencia de cierre del marcador están contenidas en la misma molécula.
- La secuencia de cierre del marcador puede estar unida al oligonucleótido marcado mediante un espaciador no nucleotídico, por ejemplo un espaciador no nucleotídico que comprende al menos uno de nucleótidos abásicos y polietilen glicol.
- 50 En otro aspecto, un extremo 3' de la secuencia de cierre del marcador está unido a un extremo 5' del oligonucleótido marcado. De manera alternativa, un extremo 5' de la secuencia de cierre del marcador está unido a un extremo 5' del oligonucleótido marcado.
- 55 Aún en otro aspecto, la secuencia de cierre del marcador hibrida a la secuencia de hibridación al objetivo para formar una molécula bicatenaria antiparalela cuando la secuencia de hibridación al objetivo no está hibridada a la secuencia de ácido nucleico objetivo en el segundo conjunto de condiciones.

En otro aspecto, la secuencia de cierre del marcador se modifica para impedir la iniciación de la síntesis de ADN a partir de ella, por ejemplo incluyendo un resto bloqueante situado en su extremo 3'.

5 En otro aspecto, la secuencia de cierre del marcador hibrida a la secuencia de hibridación al objetivo para formar una molécula bicatenaria paralela cuando la secuencia de hibridación al objetivo no está hibridada a la secuencia de ácido nucleico objetivo en el segundo conjunto de condiciones.

Aún en otro aspecto, la molécula bicatenaria comprende una base 3'-terminal de la secuencia de hibridación al objetivo hibridada a una base 3'-terminal de la secuencia de cierre del marcador.

10 La secuencia de cierre del marcador, en este aspecto, se puede modificar para impedir la iniciación de la síntesis de ADN a partir de ella, por ejemplo incluyendo un resto bloqueante situado en su extremo 3'.

En otro aspecto de esta realización, el primer oligonucleótido de cebado hibrida de manera estable al ácido nucleico objetivo y, por lo tanto, participa en la amplificación detectable de la secuencia de ácido nucleico objetivo en el segundo conjunto de condiciones.

15 En otro aspecto, el equipo comprende además un segundo oligonucleótido de cebado que hibrida al complemento de un extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico objetivo en el segundo conjunto de condiciones de manera que el segundo oligonucleótido de cebado se puede prolongar de una manera dependiente del molde en presencia de una ADN polimerasa.

20 Aún en otro aspecto, un equipo comprende además un oligonucleótido promotor que comprende primeras y segundas regiones, y la primera región comprende una secuencia de hibridación que hibrida al complemento de un extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico objetivo en el segundo conjunto de condiciones, y la segunda región comprende un promotor para una ARN polimerasa que está situado en 5' respecto de la primera región.

El oligonucleótido promotor, en este aspecto, se puede modificar para impedir la iniciación de la síntesis ADN a partir de él, por ejemplo incluyendo un resto bloqueante situado en su extremo 3'.

25 Aún en otro aspecto, el oligonucleótido promotor se puede prolongar de una manera dependiente del molde en presencia de una ADN polimerasa cuando la secuencia de hibridación está hibridada al complemento del extremo 5' de la secuencia de ácido nucleico objetivo en el segundo conjunto de condiciones.

30 Los equipos pueden comprender además uno o más reactivos o componentes seleccionados de uno o más de una ADN polimerasa (tal como una transcriptasa inversa), una ARN polimerasa, trifosfatos de nucleósidos, un soporte sólido para la unión de un complejo que comprende el ácido nucleico objetivo y el oligonucleótido marcado. En otro aspecto, el oligonucleótido marcado está libre en disolución.

35 En otro aspecto, el equipo no incluye una enzima de restricción capaz de escindir una molécula bicatenaria formada entre la secuencia de cierre del marcador y la secuencia de hibridación al objetivo en el segundo conjunto de condiciones.

Aún en otro aspecto, la secuencia de hibridación al objetivo hibrida a un extremo 3' de múltiples secuencias de ácidos nucleicos objetivo en el primer conjunto de condiciones.

40 En otra realización, el oligonucleótido marcado es un oligonucleótido bacteriano universal o un oligonucleótido fúngico universal. Por ejemplo, en un aspecto, la secuencia de hibridación al objetivo hibrida a la región objetivo en un extremo 3' de una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo, y la región objetivo está presente en una diversidad de microorganismos que pertenecen a una clase de microorganismos seleccionada del grupo que consiste en Eubacterias, bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas y hongos en el primer conjunto de condiciones. En otra realización, dicha una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo son secuencias de ácidos nucleicos ribosómicos.

45 En un aspecto más particular, los microorganismos pertenecen a una clase de microorganismos bacterianos seleccionados del grupo que consiste en *Staphylococci* spp. (p.ej., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y *Staphylococcus haemolyticus*), *Streptococci* spp. (p.ej., *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mitis*, *Viridans streptococci* y *streptococci* beta-hemolíticos), *Enterococcus* spp. (p.ej., *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*), *Escherichia* spp. (p.ej., *Escherichia coli*), *Klebsiella* spp. (p.ej., *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*), *Pseudomonas* spp. (p.ej., *Pseudomonas aeruginosa*), *Enterobacter* spp. (p.ej., *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes*), *Proteus* spp. (p.ej., *Proteus mirabilis*), *Bacterioides* spp., *Clostridium* spp., *Serratia* spp. (p.ej., *Serratia marcescens*), *Acinetobacter* spp. (p.ej., *Acinetobacter baumannii*) y *Stenotrophomonas* spp. (p.ej., *Stenotrophomonas maltophilia*). Al menos una parte de estos microorganismos sería adecuada para la detección en un análisis de sepsis.

50

55

En otro aspecto particular, los microorganismos pertenecen a un grupo fúngico de microorganismos seleccionados del grupo que consiste en *Candida* spp. (p.ej., *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitanae*, *Candida krusei*, *Candida zeylanoides*, *Candida guilliermondi*, *Candida pseudotropicalis* y *Candida famata*), *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp. (p.ej., *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus albidus* y *Cryptococcus laurentii*) *Coccidioides* spp. (p.ej., *Coccidioides immitis*), *Trichosporon* spp. (p.ej., *Trichosporon cutaneum*), *Malassezia* spp. (p.ej., *Malassezia furfur*), *Rhodotorula* spp., *Nocardia* spp. (p.ej., *Nocardia asteroides*), *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp. (p.ej., *Aspergillus fumigatus*). Al menos una parte de estos microorganismos sería adecuada para la detección en un análisis de sepsis.

Según otra realización de la descripción, se proporciona una mezcla de reacción para amplificar una secuencia de ácido nucleico objetivo, y la mezcla de reacción comprende: un oligonucleótido marcado que comprende primeras y segundas regiones, y la primera región comprende una secuencia de hibridación al objetivo hibridada a un extremo 3' de una secuencia de ácido nucleico objetivo y la segunda región comprende una secuencia marcadora situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación al objetivo; un primer oligonucleótido que comprende una secuencia de hibridación que hibrida a un extremo 3' del complemento de la secuencia de ácido nucleico objetivo; y un segundo oligonucleótido que comprende una secuencia de hibridación que hibrida al complemento de la secuencia marcadora, en el que el oligonucleótido marcado sin hibridar en la mezcla de reacción tiene una forma inactiva que bloquea o impide que el oligonucleótido marcado sin hibridar hibride a la secuencia de ácido nucleico objetivo.

En un aspecto más particular según esta realización, la forma inactiva del oligonucleótido marcado comprende una secuencia de cierre del marcador hibridada a la secuencia de hibridación al objetivo.

En otro aspecto, el oligonucleótido marcado y dicha secuencia de cierre del marcador son moléculas diferentes, y la secuencia de cierre del marcador es un oligonucleótido de cierre del marcador.

En otro aspecto, el oligonucleótido marcado y la secuencia de cierre del marcador están contenidas en la misma molécula.

Aún en otro aspecto, el oligonucleótido marcado no está unido a un soporte sólido.

Otras realizaciones de la descripción se refieren al uso de los métodos descritos en la presente memoria como medios para monitorizar muestras de bioprocesos, corrientes, y similares. En una realización, por ejemplo, se proporciona un método para monitorizar un bioproceso en busca de la presencia de un ácido nucleico contaminante que comprende las etapas de (a) tratar una primera muestra de bioproceso con un oligonucleótido marcado, en el que dicho oligonucleótido marcado comprende primeras y segundas regiones, y la primera región comprende una secuencia de hibridación al objetivo capaz de hibridar a una secuencia de ácido nucleico objetivo de un organismo de interés, y la segunda región comprende una secuencia marcadora, situada en 5' respecto de dicha secuencia de hibridación al objetivo, que no hibrida de manera estable a la secuencia de ácido nucleico objetivo; en condiciones en las que el oligonucleótido marcado hibrida de manera estable a la secuencia de ácido nucleico objetivo presente en dicha primera muestra; (b) eliminar o inactivar el oligonucleótido marcado sin hibridar de la primera muestra de bioproceso; y (c) exponer una segunda muestra de bioproceso, y la segunda muestra de bioproceso comprende la primera muestra de bioproceso y comprende además muestras de bioprocesos adicionales, a reactivos y condiciones de amplificación suficientes para la amplificación de la secuencia de ácido nucleico objetivo mediante el uso de: (i) un primer oligonucleótido que hibrida a un complemento de la secuencia marcadora y (ii) una segunda secuencia de oligonucleótido que hibrida a un complemento de la secuencia de ácido nucleico objetivo, en el que la amplificación detectable que resulta del primer y segundo oligonucleótidos es aportada por la secuencia de ácido nucleico objetivo de un organismo de interés en la primera muestra de bioproceso, y no por la secuencia de ácido nucleico objetivo aportada por las muestras de bioprocesos adicionales.

En otra realización, la presente descripción proporciona un método para monitorizar un bioproceso en busca de la presencia de un ácido nucleico contaminante que comprende las etapas de (a) tratar una primera muestra de bioproceso con un primer oligonucleótido marcado, en el que el primer oligonucleótido marcado comprende primeras y segundas regiones, y la primera región comprende una secuencia de hibridación al objetivo capaz de hibridar a una secuencia de ácido nucleico objetivo de un organismo de interés y la segunda región comprende una primera secuencia marcadora, situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación al objetivo, que no hibrida de manera estable a la secuencia de ácido nucleico objetivo; en condiciones en las que el primer oligonucleótido marcado hibrida de manera estable a la secuencia de ácido nucleico objetivo presente en dicha primera muestra; (b) tratar una segunda muestra de bioproceso con un segundo oligonucleótido marcado, en el que el segundo oligonucleótido marcado comprende primeras y segundas regiones, y la primera región comprende una secuencia de hibridación al objetivo capaz de hibridar a la secuencia de ácido nucleico objetivo del organismo de interés y la segunda región comprende una segunda secuencia marcadora, situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación al objetivo y diferente de la primera secuencia marcadora, que no

5 hibrida de manera estable a la secuencia de ácido nucleico objetivo; en condiciones en las que el segundo oligonucleótido marcado hibrida de manera estable a la secuencia de ácido nucleico objetivo presente en la segunda muestra; y (c) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico en una tercera muestra de bioproceso, y la tercera muestra de bioproceso comprende la primera y la segunda muestra de bioproceso, mediante el uso de: (i) un primer oligonucleótido que hibrida a un complemento de la primera secuencia marcadora; (ii) una segunda secuencia oligonucleotídica que hibrida a un complemento de la segunda secuencia marcadora; y (iii) un tercer oligonucleótido que hibrida a un complemento de la secuencia de ácido nucleico objetivo; en el que la detección del producto de amplificación que resulta del primer y segundo oligonucleótidos es indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico objetivo del organismo de interés en la primera muestra de bioproceso, y en el que la detección del producto de amplificación que resulta del primer y tercer oligonucleótidos es indicativa de la presencia de la secuencia de ácido nucleico objetivo del organismo de interés en la segunda muestra de bioproceso.

15 En una realización adicional de la descripción, se proporciona una mezcla de reacción de pre-amplificación para la amplificación selectiva de una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo, en la que la mezcla de reacción comprende: un oligonucleótido marcado que comprende primeras y segundas regiones, y dicha primera región comprende una secuencia de hibridación al objetivo hibridada a una región objetivo contenida en un extremo 3' de una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo presentes en la mezcla de reacción y la segunda región comprende una secuencia marcadora situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación al objetivo; un primer oligonucleótido que comprende una secuencia de hibridación que hibrida a un extremo 3' del complemento de una o más de las secuencias de ácido nucleico objetivo; y un segundo oligonucleótido que comprende una secuencia de hibridación que hibrida al complemento de la secuencia marcadora, en la que el segundo oligonucleótido preferiblemente no hibrida de manera estable a un ácido nucleico objetivo que contiene el ácido nucleico objetivo de manera que se puede prolongar enzimáticamente en presencia de una polimerasa de ácidos nucleicos añadida a la mezcla de reacción para producir un producto de prolongación de cebador complementario a una o más de las secuencias de ácido nucleico objetivo, en la que la mezcla de reacción está sustancialmente exenta de una forma activa del oligonucleótido marcado que no está hibridado a la región objetivo contenida en una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo presentes en la mezcla de reacción, en la que la forma activa del oligonucleótido marcado tiene una secuencia de hibridación al objetivo disponible para la hibridación a la región objetivo presente en un ácido nucleico no objetivo añadido a la mezcla de reacción, y en la que la mezcla de reacción no incluye una polimerasa de ácidos nucleicos capaz de prolongar cualquiera de los oligonucleótidos de una manera dependiente del molde. El ácido nucleico "no objetivo" es de una fuente externa a la mezcla de reacción, y puede contener una secuencia idéntica a la de la secuencia de ácido nucleico objetivo. La fuente del ácido nucleico no objetivo puede ser ambiental, o puede ser un componente o reactivo añadido a la mezcla de reacción, tal como una polimerasa de ácidos nucleicos. El oligonucleótido marcado puede ser un oligonucleótido de cebado marcado o un oligonucleótido promotor marcado que tiene un promotor reconocido por una ARN polimerasa situado en 5' respecto de la segunda región.

40 En un aspecto de esta realización, el oligonucleótido de cebado marcado no incluye un promotor para la ARN polimerasa, mientras el primer oligonucleótido incluye un promotor de ARN situado en 5' respecto de la secuencia de hibridación del primer oligonucleótido. En un aspecto preferido, el primer oligonucleótido incluye además un resto bloqueante situado en su extremo 3'. En otro aspecto que es útil para amplificar una secuencia objetivo de *E. coli*, la secuencia de hibridación al objetivo del oligonucleótido marcado consiste en SEQ ID NO:19, su equivalente de ARN o un complemento de la misma, y la primera secuencia de hibridación del primer oligonucleótido consiste en SEQ ID NO:20, su equivalente de ARN o un complemento de la misma.

50 En otro aspecto de esta realización, el oligonucleótido marcado y el primer oligonucleótido pueden incluir cada uno un promotor para una ARN polimerasa situado en 5' respecto de la secuencia marcadora y la secuencia de hibridación, respectivamente. En este aspecto, el primer oligonucleótido puede incluir un resto bloqueante situado en su extremo 3'.

55 Aún en otro aspecto de esta realización, el oligonucleótido marcado incluye una secuencia de cierre del marcador unida a su extremo 3', por lo que se forma una molécula unitaria denominada "molécula marcadora". Dependiendo de la naturaleza de la reacción de amplificación, la molécula marcadora puede incluir o no un promotor para una ARN polimerasa situada en 5' respecto de la secuencia marcadora. En una realización, las moléculas marcadoras que no han hibridado a la región objetivo de al menos una secuencia de ácido nucleico objetivo permanecen "libres" en la mezcla de reacción (es decir, las moléculas marcadoras no forman moléculas bicatenarias híbridas por medios distintos de la auto-hibridación). Las moléculas marcadoras auto-hibridadas se denominan "moléculas marcadoras en horquilla", que son una forma inactiva de la molécula marcadora que impide que hibride a cualquier ácido nucleico complementario que se añada posteriormente a la mezcla de reacción, tal como por medio de una preparación enzimática contaminada o reactivo que contiene ácidos nucleicos no objetivo. Aún en otro aspecto de esta realización, sustancialmente todas las moléculas marcadoras de la mezcla de reacción están en un estado hibridado (hibridado a la región objetivo de una secuencia de

ácido nucleico objetivo o a sí mismas en forma de moléculas marcadoras en horquilla). Al menos una parte de las moléculas marcadoras que no han hibridado a la región objetivo de una secuencia de ácido nucleico objetivo (es decir, moléculas marcadoras en horquilla) se eliminan de la mezcla de reacción, por ejemplo, sometiendo a la mezcla de reacción a un procedimiento de captura y lavado del objetivo.

5 Aun en un aspecto adicional de esta realización, no hay sustancialmente oligonucleótidos marcados que existan en un estado sin hibridar cuando la mezcla de reacción se expone a una preparación de enzima para amplificar una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo. Así, en este aspecto, en la mezcla de reacción se han eliminado sustancialmente los oligonucleótidos marcados sin hibridar específicos para una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo proporcionadas por la muestra de interés. Esto se puede llevar a cabo, por ejemplo, con un procedimiento de captura de objetivo y lavado que separa los oligonucleótidos marcados hibridados de los oligonucleótidos marcados sin hibridar, y después elimina selectivamente los oligonucleótidos marcados sin hibridar de la mezcla de reacción.

15 Aun en otro aspecto de esta realización, el oligonucleótido marcado no incluye una secuencia de cierre del marcador o un oligonucleótido de cierre del marcador. Por lo tanto, en este aspecto el oligonucleótido marcado no se puede caracterizar como una "molécula marcadora".

20 Aun en otro aspecto de esta realización, se incluye una sonda para detectar un producto de amplificación sintetizado en una reacción in vitro que implica la prolongación enzimática del oligonucleótido marcado y del segundo oligonucleótido. El producto de amplificación incluye copias de una o más de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo y/o sus complementos.

25 Aun en otra realización, se proporciona una mezcla de reacción para la amplificación selectiva de una o más secuencias de ácidos nucleicos objetivo, en la que la mezcla de reacción comprende: un oligonucleótido marcado que comprende primeras y segundas regiones, en el que la primera región comprende una secuencia de hibridación al objetivo hibridada a un extremo 3' de una secuencia de ácido nucleico objetivo, y la segunda región comprende una secuencia marcadora situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación al objetivo; un primer oligonucleótido que comprende una secuencia de hibridación que hibrida a un extremo 3' del complemento de la secuencia de ácido nucleico objetivo; y un segundo oligonucleótido que comprende una secuencia de hibridación que hibrida al complemento de la secuencia marcadora, en el que el segundo oligonucleótido preferiblemente no hibrida de manera estable a un ácido nucleico objetivo que contiene el ácido nucleico objetivo, de manera que se puede prolongar enzimáticamente en presencia de una polimerasa de ácidos nucleicos añadida o presente en la mezcla de reacción para producir un producto de prolongación de cebador complementario a una o más de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo, y en el que sustancialmente todo el oligonucleótido marcado sin hibridar en la mezcla de reacción tiene una forma inactiva que bloquea o impide que dicho oligonucleótido marcado sin hibridar hibride a la secuencia de ácido nucleico objetivo.

35 La forma inactiva del oligonucleótido marcado puede comprender una secuencia de cierre del marcador hibridada a la secuencia de hibridación al objetivo. La secuencia de cierre del marcador puede ser una molécula diferente cuando no está hibridada a la secuencia de hibridación al objetivo, o puede estar contenida en una molécula que incluye el oligonucleótido marcado, en cuyo caso la secuencia de cierre del marcador está unida preferiblemente al extremo 5' del oligonucleótido marcado mediante un espaciador no nucleotídico (es decir, los componentes del espaciador no pueden ser copiados por una polimerasa de ácidos nucleicos). El oligonucleótido marcado puede estar unido o no a un soporte sólido, y preferiblemente no está unido directamente al soporte sólido (p.ej., partículas o esferas). Si está unido a un soporte sólido, directa o indirectamente, el oligonucleótido marcado puede funcionar además como una sonda de captura para la unión y la inmovilización de una secuencia de ácido nucleico objetivo.

40 Los oligonucleótidos marcados de las realizaciones de las mezclas de reacción anteriores pueden poseer las características de cualquiera de las diversas realizaciones de los oligonucleótidos marcados descritas más adelante. Y, a menos que se excluya específicamente, las mezclas de reacción pueden incluir además los reactivos y componentes necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación.

45 Estas y otras características y ventajas de la presente descripción serán evidentes tras hacer referencia a la siguiente descripción detallada, los dibujos adjuntos y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 La FIG. 1 ilustra las etapas de una reacción de amplificación basada en la transcripción iniciada con un oligonucleótido de cebado marcado que hibrida a un extremo 3' de una secuencia objetivo de ARN. Un primer producto de prolongación formado con el oligonucleótido de cebado marcado tiene un extremo 3' que está determinado por un oligonucleótido de terminación hibridado en posición adyacente o cercana al extremo 5' de la secuencia objetivo de ARN. Un oligonucleótido promotor bloqueado hibrida a un extremo 3' del primer producto de prolongación y se usa para generar transcritos de ARN que participan cíclicamente en la reacción de amplificación.

La FIG. 2 ilustra el uso de una molécula marcadora en horquilla en la reacción de amplificación de la FIG. 1.

5 Las Figuras 3A y 3B ilustran las etapas de una reacción de amplificación mediada por la transcripción iniciada con un oligonucleótido promotor marcado que hibrida a un extremo 3' de una secuencia objetivo de ARN.

La FIG. 4 ilustra el uso de una molécula marcadora en horquilla en la reacción de amplificación de las Figuras 3A y 3B.

10 La FIG. 5 ilustra las etapas de una reacción de amplificación basada en la transcripción iniciada con un oligonucleótido de cebado marcado que hibrida a un extremo 3' de una secuencia objetivo de ADN monocatenaria. Un primer producto de prolongación formado con el oligonucleótido de cebado marcado tiene un extremo 3' que está determinado por un oligonucleótido de terminación hibridado en posición adyacente o cercana al extremo 5' de la secuencia objetivo de ADN. Un oligonucleótido desplazador hibridado en 5' respecto del oligonucleótido de cebado marcado se prolonga para formar un segundo producto de prolongación que desplaza el primer producto de prolongación de la secuencia objetivo de ADN. Un oligonucleótido promotor bloqueado hibrida a un extremo 3' del primer producto de prolongación y se usa para generar transcritos de ARN que participan cíclicamente en la reacción de amplificación.

La FIG. 6 ilustra el uso de una molécula marcadora en horquilla en la reacción de amplificación de la FIG. 5.

20 La FIG. 7 ilustra las etapas de la reacción en cadena de la polimerasa que se inicia con un oligonucleótido de cebado marcado que hibrida a una secuencia objetivo de ADN.

La FIG. 8 ilustra el uso de una molécula marcadora en horquilla en la reacción de amplificación de la FIG. 7.

La FIG. 9 ilustra las etapas de una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa iniciada con un oligonucleótido de cebado marcado que hibrida a una secuencia objetivo de ARN.

25 La FIG. 10 ilustra el uso de una molécula marcadora en horquilla en la reacción de amplificación de la FIG. 9.

La FIG. 11 ilustra un oligonucleótido de cierre del marcador bloqueado en 3' discreto hibridado de una manera antiparalela al extremo 3' de un oligonucleótido de cebado marcado, por lo que se bloquea la hibridación del oligonucleótido de cebado marcado a una secuencia de ácido nucleico objetivo.

30 La FIG. 12 ilustra un oligonucleótido de cierre del marcador bloqueado en 3' discreto hibridado de una manera antiparalela al extremo 3' de un oligonucleótido promotor marcado, por lo que se bloquea la hibridación del oligonucleótido promotor marcado a una secuencia de ácido nucleico objetivo.

35 La FIG. 13 ilustra una molécula marcadora en horquilla que incluye una secuencia de cierre del marcador bloqueada en 3' hibridada de una manera paralela al extremo 3' de un oligonucleótido de cebado marcado, por lo que se bloquea la hibridación del oligonucleótido de cebado marcado a una secuencia de ácido nucleico objetivo. Un extremo 5' de la secuencia de cierre del marcador está unido al extremo 3' de una secuencia marcadora del oligonucleótido de cebado marcado mediante un espaciador no nucleotídico.

40 La FIG. 14 ilustra una molécula marcadora en horquilla que incluye una secuencia de cierre del marcador bloqueada en 3' hibridada de una manera paralela al extremo 3' de un oligonucleótido promotor marcado, por lo que se bloquea la hibridación del oligonucleótido promotor marcado a una secuencia de ácido nucleico objetivo. Un extremo 5' de la secuencia de cierre del marcador está unido al extremo 3' de una secuencia promotora del oligonucleótido promotor marcado mediante un espaciador no nucleotídico.

45 La FIG. 15 ilustra una molécula marcadora en horquilla que incluye una secuencia de cierre del marcador bloqueada en 3' hibridada de una manera antiparalela al extremo 3' de un oligonucleótido de cebado marcado, por lo que se bloquea la hibridación del oligonucleótido de cebado marcado a una secuencia de ácido nucleico objetivo. Un extremo 5' de la secuencia de cierre del marcador está unido al extremo 3' de una secuencia marcadora del oligonucleótido de cebado marcado mediante un espaciador no nucleotídico.

50 La FIG. 16 ilustra una molécula marcadora en horquilla que incluye una secuencia de cierre del marcador bloqueada en 3' hibridada de una manera antiparalela al extremo 3' de un oligonucleótido promotor marcado, por lo que se bloquea la hibridación del oligonucleótido promotor marcado a una secuencia de ácido nucleico objetivo. Un extremo 5' de la secuencia de cierre del marcador está unido al extremo 3' de una secuencia promotora del oligonucleótido promotor marcado mediante un espaciador no nucleotídico.

55

La FIG. 17 muestra las curvas en bruto para las aplicaciones de HCV en las que no se añadió objetivo en el reactivo de amplificación. No hubo una amplificación detectable cuando el transcrito de HCV no se añadió a los reactivos de captura del objetivo o de amplificación, mientras el tiempo medio para las reacciones que contenían 1×10^6 copias del transcrito de HCV en el reactivo de captura del objetivo fue de 6,3 minutos.

La FIG. 18 muestra las curvas en bruto para las amplificaciones de HCV en las que se añadió objetivo en el reactivo de amplificación. No hubo una amplificación detectable cuando el transcrito de HCV se añadió en el reactivo de amplificación, mientras el tiempo medio para las reacciones que contenían 1×10^6 copias del transcrito de HCV en el reactivo de captura del objetivo fue de 6,3 minutos. Las muestras cero en la captura del objetivo no amplificaron, incluso con 1 millón de copias de HCV 1a añadidas en el reactivo de amplificación.

La FIG. 19 muestra las curvas en bruto para las amplificaciones de HCV en las que se añadió objetivo y cebador marcado que no era de T7 en el reactivo de amplificación. El tiempo medio para 1 millón de copias de objetivo HCV 1a presente solamente en la etapa de captura del objetivo con cebador marcado que no era de T7 y oligonucleótido de terminación añadido en el reactivo de amplificación fue de 7,2 minutos. Las muestras cero en la captura del objetivo con objetivo, oligonucleótido de terminación y cebador marcado que no era de T7 en el reactivo de amplificación también produjeron una amplificación sólida, con un tiempo medio = 8,6 minutos.

La FIG. 20 es un gráfico que muestra los resultados de la monitorización dependiente del tiempo de reacciones de amplificación de ácido nucleico que incluyeron 0 o 10^5 copias de un molde de rARN de *E. coli* sintético. La línea discontinua fina muestra los resultados para la reacción llevada a cabo mediante el uso de 0 copias de molde, y la línea continua gruesa muestra los resultados para la reacción llevada a cabo mediante el uso de 10^5 copias de molde.

La FIG. 21 es un gráfico que muestra los resultados de la monitorización dependiente del tiempo de reacciones de amplificación de ácido nucleico que incluyó 0, 10^3 ó 10^5 copias de un molde de rARN de *E. coli* sintético.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan métodos de amplificación de ácidos nucleicos que reducen o eliminan de manera deseable las señales de amplificación positivas falsas que resultan del material biológico contaminante que puede estar presente en un reactivo o componente de una reacción de amplificación. Los métodos proporcionados también posibilitan una purificación y/o esfuerzos de esterilidad menos rigurosos que los que han sido necesarios de manera convencional para asegurar que las enzimas y otros reactivos o componentes usados en las reacciones de amplificación, y el medio en el que se llevan a cabo las reacciones de amplificación, están exentos de contaminación por microorganismos o los componentes de los mismos, tales como material de ácido nucleico, que pueden proporcionar resultados positivos falsos.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología molecular, ADN recombinante, y química, que están dentro de la experiencia en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, p.ej., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Sambrook *et al.*, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); *DNA Cloning*, volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis *et al.*, pat. de EE.UU. n° 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); el tratado *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); y en Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

Definiciones

Las siguientes expresiones tienen los siguientes significados, a menos que se indique expresamente lo contrario. Se debe observar que el término "una" entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, se entiende que "un ácido nucleico" representa uno o más ácidos nucleicos. Como tales, los términos "un" (o "uno"), "uno o más", y "al menos uno" se pueden usar de manera intercambiable en la presente memoria.

Ácido nucleico

La expresión "ácido nucleico" pretende abarcar un "ácido nucleico" en singular así como "ácidos nucleicos" en plural, y se refiere a cualquier cadena de dos o más nucleótidos, nucleósidos, o nucleobases (p.ej., desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos) unidos de manera covalente entre sí. Los ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitación, los genomas virales, o las porciones de los mismos, ADN o ARN, genomas bacterianos, o las porciones de los mismos, genomas fúngicos, vegetales o animales, o las porciones de los mismos, ARN mensajero (mARN), ARN ribosómico (rARN), ARN de transferencia

(tARN), ADN plasmídico, ADN mitocondrial, o ADN o ARN sintético. Un ácido nucleico se puede proporcionar en una forma lineal (p.ej., mARN), circular (p.ej., plásmido), o ramificada, así como en forma bicatenaria o monocatenaria. Los ácidos nucleicos pueden incluir bases modificadas para alterar la función o el comportamiento del ácido nucleico, p.ej., la adición de un didesoxinucleótido 3'-terminal para bloquear la adición de nucleótidos adicionales al ácido nucleico. Tal como se usa en la presente memoria, una "secuencia" de un ácido nucleico se refiere a la secuencia de bases que constituye un ácido nucleico. El término "polinucleótido" se puede usar en la presente memoria para indicar una cadena de ácido nucleico. A lo largo de esta solicitud, se indica que los ácidos nucleicos tienen un extremo 5' y un extremo 3'. Los ácidos nucleicos estándar, p.ej., ADN y ARN, se sintetizan en general de "3' a 5'", es decir, mediante la adición de nucleótidos al extremo 5' de un ácido nucleico en crecimiento.

Un "nucleótido" es una subunidad de un ácido nucleico que consiste en un grupo fosfato, un carbohidrato de 5 carbonos y una base nitrogenada. El carbohidrato de 5 carbonos hallado en el ARN es ribosa. En el ADN, el carbohidrato de 5 carbonos es 2'-desoxirribosa. El término también incluye los análogos de tales subunidades, tales como un grupo metoxi en la posición 2' de la ribosa (2'-O-Me). Tal como se usa en la presente memoria, los metoxi oligonucleótidos que contienen residuos "T" tienen un grupo metoxi en la posición 2' del resto de ribosa, y un uracilo en la posición de la base del nucleótido.

Una "unidad no nucleotídica" es una unidad que no participa de manera significativa en la hibridación de un polímero. Tales unidades, por ejemplo, no deben participar en la formación significativa de enlaces de hidrógeno con un nucleótido, y excluirían las unidades que tienen como componente una de las cinco bases de nucleótidos o los análogos de las mismas.

Ácido Nucleico Objetivo/Secuencia Objetivo

Un "ácido nucleico objetivo" es un ácido nucleico presente en una muestra de ácido nucleico que comprende una "secuencia objetivo" a amplificar. Los ácidos nucleicos objetivo pueden ser ADN o ARN, tal como se describe en la presente memoria, y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. El ácido nucleico objetivo puede incluir otras secuencias además de la secuencia objetivo que pueden no amplificarse. Los ácidos nucleicos objetivo típicos incluyen los genomas virales, genomas bacterianos, genomas fúngicos, genomas vegetales, genomas animales, rARN, tARN, o mARN de virus, bacterias o células eucarióticas, ADN mitocondrial, o ADN cromosómico.

Los ácidos nucleicos objetivo se pueden aislar a partir de cualquier número de fuentes basándose en el fin del ensayo de amplificación que se va a llevar a cabo. Las fuentes de los ácidos nucleicos objetivo incluyen, pero sin limitación, muestras clínicas (p.ej., sangre, ya sea sangre completa o plaquetas, orina, saliva, heces, semen, o líquido cefalorraquídeo), muestras ambientales (p.ej., muestras de agua o tierra), muestras de alimentos, bebidas, muestras industriales (p.ej., productos y materiales de procesos, lo que incluye agua), reservas de semillas, bibliotecas de cADN, o ARN celular total. "Aislado" significa que se toma de su medio natural una muestra que contiene un ácido nucleico objetivo; sin embargo, el término no connota ningún grado particular de purificación. Si es necesario, los ácidos nucleicos objetivo de la presente invención se hacen disponibles para la interacción con los diversos oligonucleótidos de la presente invención. Esto puede incluir, por ejemplo, la lisis de células o la permeabilización de células para liberar el ácido nucleico objetivo de las células, lo cual puede ir seguido después por una o más etapas de purificación, tales como una serie de etapas de aislamiento y lavado. Véase, p.ej., Clark *et al.*, "Method for Extracting Nucleic Acids from a Wide Range of Organisms", pat. de EE.UU. n° 5.786.208; y Hogan, "Polynucleotide Matrix-Based Method of Identifying Microorganisms", pat. de EE.UU. n° 6.821.770. Esto puede ser especialmente importante cuando la fuente de la muestra o el material celular liberado en la muestra puede interferir con la reacción de amplificación. Los métodos para preparar ácidos nucleicos objetivo a partir de diversas fuentes para la amplificación son muy conocidos para las personas de experiencia habitual en la técnica. Los ácidos nucleicos objetivo de la presente invención se pueden purificar hasta cierto punto antes de las reacciones de amplificación descritas en la presente memoria, pero en otros casos la muestra se añade a la reacción de amplificación sin ninguna manipulación adicional.

La expresión "secuencia objetivo" se refiere a la secuencia de nucleótidos particular del ácido nucleico objetivo que se va a amplificar. La "secuencia objetivo" incluye las secuencias de complejación a las que los oligonucleótidos (p.ej., oligonucleótidos marcados, oligonucleótidos de cebado y/o oligonucleótidos promotores) se complejan durante los procedimientos de la presente invención. Cuando el ácido nucleico objetivo es originariamente monocatenario, la expresión "secuencia objetivo" se referirá también a la secuencia complementaria a la "secuencia objetivo" tal como está presente en el ácido nucleico objetivo. Cuando el "ácido nucleico objetivo" es originariamente bicatenario, la expresión "secuencia objetivo" se refiere a las cadenas sentido (+) y antisentido (-). Al elegir una secuencia objetivo, el técnico experto entenderá que se debería elegir una secuencia "única" para distinguir entre ácidos nucleicos objetivo no relacionados o estrechamente relacionados. Como entenderán las personas de experiencia habitual en la técnica, las secuencias "únicas" se juzgan a partir del medio de análisis. Al menos las secuencias reconocidas por la secuencia de hibridación al objetivo de un oligonucleótido marcado y la sonda o las sondas de detección asociadas (como se describen con más detalle en otra

parte en la presente memoria) deberían ser únicas en el medio que se está analizando, pero no necesitan ser únicas dentro del universo de todas las posibles secuencias. Además, aunque la secuencia objetivo debería contener una secuencia "única" para el reconocimiento mediante un oligonucleótido marcado o una sonda de detección, no siempre se da el caso de que el oligonucleótido de cebado y/o el oligonucleótido promotor reconozcan secuencias "únicas". En ciertas realizaciones, puede ser deseable elegir una secuencia objetivo que sea común a una clase de organismos, por ejemplo, una secuencia que sea común a todas las cepas de *E. coli* que podrían estar en una muestra. En otras situaciones, se elegiría una secuencia objetivo sumamente específica, o una secuencia objetivo que tuviera al menos una región sumamente específica reconocida por la sonda de detección, para distinguir entre organismos estrechamente relacionados, por ejemplo, entre *E. coli* patógenas y no patógenas. Una secuencia objetivo de la presente invención puede ser de cualquier longitud práctica. Una secuencia objetivo mínima incluye una región que hibrida a la secuencia de hibridación al objetivo de un oligonucleótido marcado, el complemento de una región que hibrida a un oligonucleótido de cebado o la región de hibridación de un oligonucleótido promotor, y una región usada para la detección, p.ej., una región (o el complemento de la misma) que hibrida a una sonda de detección, tal como se describe con más detalle en otra parte en la presente memoria. La región que hibrida con la sonda de detección puede solapar o estar contenida en la región que hibrida al oligonucleótido de cebado (o su complemento) o la región de hibridación del oligonucleótido promotor (o su complemento). Además de los requisitos mínimos, la longitud óptima de una secuencia objetivo depende de varias consideraciones, por ejemplo, la cantidad de estructura secundaria, o las regiones de auto-hibridación en la secuencia. Las personas de experiencia habitual en la técnica llevan a cabo fácilmente la determinación de la longitud óptima mediante el uso de métodos de optimización rutinarios. En general, las secuencias objetivo de la presente invención tienen una longitud que oscila de alrededor de 100 nucleótidos a alrededor de 150 a alrededor de 250 nucleótidos. La longitud óptima o preferida puede variar en las diferentes condiciones, que pueden ser analizadas fácilmente por una persona de experiencia habitual en la técnica según los métodos descritos en la presente memoria. La expresión "amplicón" se refiere a una molécula de ácido nucleico generada durante un procedimiento de amplificación que es sustancialmente complementaria o idéntica a una secuencia contenida dentro de la secuencia objetivo. La expresión "producto de amplificación" se refiere a un amplicón o a algún otro producto indicativo de una reacción de amplificación.

30 **Oligonucleótidos**

Tal como se usa en la presente memoria, el término "oligonucleótido" u "oligo" u "oligómero" pretende abarcar un "oligonucleótido" en singular, así como "oligonucleótidos" en plural, y se refiere a cualquier polímero de dos o más nucleótidos, nucleósidos, nucleobases o compuestos relacionados usados como reactivo en los métodos de amplificación de la presente invención, así como en los métodos de detección posteriores. El oligonucleótido puede ser ADN y/o ARN y/o los análogos de los mismos. El término oligonucleótido no indica ninguna función particular para el reactivo, y en su lugar, y en su manera genérica para cubrir todos esos reactivos descritos en la presente memoria. Un oligonucleótido puede cumplir diversas funciones diferentes, p.ej., puede funcionar como un cebador si es capaz de hibridar a una cadena complementaria y además puede ser prolongado en presencia de una polimerasa de ácidos nucleicos, puede proporcionar un promotor si contiene una secuencia reconocida por una ARN polimerasa y posibilita la transcripción, y puede funcionar para impedir la hibridación o impedir la prolongación del cebador si está situado y/o modificado de manera apropiada. Los oligonucleótidos específicos de la presente invención se describen con más detalle más adelante. Tal como se usa en la presente memoria, un oligonucleótido puede tener prácticamente cualquier longitud, y está limitado solamente por su función específica en la reacción de amplificación o en la detección de un producto de amplificación de la reacción de amplificación.

Los oligonucleótidos de una secuencia y una estructura química definidas se pueden producir mediante técnicas conocidas para las personas de experiencia habitual en la técnica, tales como mediante síntesis química o bioquímica, y mediante la expresión *in vitro* o *in vivo* a partir de moléculas de ácidos nucleicos recombinantes, p.ej., vectores bacterianos o virales. Tal como se pretende en esta descripción, un oligonucleótido no consiste únicamente en ADN cromosómico de tipo natural o en los productos de transcripción *in vivo* del mismo.

Se pueden modificar los oligonucleótidos de cualquier manera, con tal de que una modificación dada sea compatible con la función deseada de un oligonucleótido dado. Una persona de experiencia habitual en la técnica puede determinar fácilmente si una modificación dada es adecuada o deseada para cualquier oligonucleótido dado de la presente invención. Las modificaciones incluyen las modificaciones de las bases, las modificaciones de carbohidratos o las modificaciones del esqueleto. Las modificaciones de las bases incluyen, pero sin limitación, el uso de las siguientes bases además de adenina, citidina, guanosina, timina y uracilo: C-5 propina, 2-amino adenina, 5-metil citidina, inosina, y las bases dP y dK. Los grupos de carbohidratos de las subunidades de nucleósido pueden ser ribosa, desoxirribosa y los análogos de las mismas, que incluyen, por ejemplo, los ribonucleósidos que tienen una sustitución 2'-O-metil (2'-O-ME) en el resto de ribofuranosilo. Véase Becker *et al.*, "Method for Amplifying Target Nucleic Acids Using Modified Primers", pat. de EE.UU. n° 6.130.038. Otras modificaciones de los carbohidratos incluyen, pero sin limitación, las modificaciones 2'-amino, 2'-fluoro, (L)-alfa-treofuranosilo, y

pentopuranasilo. Las subunidades de nucleósidos pueden estar unidas por enlaces tales como enlaces fosfodiéster, enlaces modificados o mediante restos no nucleotídicos que no impiden la hibridación del oligonucleótido a su secuencia de ácido nucleico objetivo complementaria. Los enlaces modificados incluyen aquellos enlaces en los que un enlace fosfodiéster estándar está sustituido por un enlace diferente, tal como un enlace de fosforotioato o un enlace de metilfosfonato. Las subunidades de nucleobases se pueden unir, por ejemplo, sustituyendo el esqueleto de fosfato de desoxirribosa natural del ADN con un esqueleto pseudo-peptídico, tal como un esqueleto de 2-aminoetilglicina que acopla las subunidades de nucleobases por medio de un espaciador de carboximetilo a la amina secundaria central (los análogos del ADN que tienen un esqueleto pseudo-peptídico se denominan habitualmente "ácidos nucleicos peptídicos" o "PNA", y se describen en Nielsen *et al.*, "Peptide Nucleic Acids", pat. de EE.UU. n° 5.539.082). Otras modificaciones de los enlaces incluyen, pero sin limitación, los enlaces morfolino.

Los ejemplos no limitantes de oligonucleótidos u oligómeros contemplados por la presente invención incluyen los análogos de ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleósidos y nucleótidos bicíclicos y tricíclicos (LNAs). Véase Imanishi *et al.*, "Bicyclonucleoside and Oligonucleotide Analogues", pat. de EE.UU. n° 6.268.490; y Wengel *et al.*, "Oligonucleotide Analogues", pat. de EE.UU. n° 6.670.461). La presente invención contempla cualquier análogo de ácido nucleico con tal de que el oligonucleótido modificado pueda llevar a cabo su función deseada, p.ej., hibridar a un ácido nucleico objetivo en condiciones de hibridación o en condiciones de amplificación rigurosas, o interactuar con una ADN o ARN polimerasa, por lo que se inicia la prolongación o la transcripción. En el caso de las sondas de detección, los oligonucleótidos modificados deben ser capaces también de hibridar de manera preferente al ácido nucleico objetivo en condiciones de hibridación rigurosas.

Aunque el diseño y la secuencia de los oligonucleótidos para la presente invención dependen de su función tal como se describe más adelante, se deben tener en cuenta en general diversas variables. Entre las más críticas están: la longitud, la temperatura de fusión (T_m), la especificidad, la complementariedad con otros oligonucleótidos en el sistema, el contenido de G/C, los tramos de polipirimidina (T, C) o polipurina (A, G), y la secuencia del extremo 3'. El control de estas y otras variables es un aspecto habitual y muy conocido del diseño de oligonucleótidos, y están disponibles fácilmente varios programas informáticos para cribar un gran número de oligonucleótidos potenciales en busca de los óptimos.

El extremo 3' de un oligonucleótido (u otro ácido nucleico) se puede bloquear en una diversidad de maneras mediante el uso de un resto bloqueante, tal como se describe más adelante. Un oligonucleótido "bloqueado" no se prolonga de manera eficaz mediante la adición de nucleótidos a su extremo 3', mediante una ADN polimerasa dependiente de ADN o ARN, para producir una cadena complementaria de ADN. Como tal, un oligonucleótido "bloqueado" no puede ser un "cebador".

Tal como se usa en esta descripción, la frase "un oligonucleótido que tiene una secuencia de ácido nucleico 'que comprende', 'que consiste en' o 'que consiste esencialmente en' una secuencia seleccionada de" un grupo de secuencias específicas significa que el oligonucleótido, como una característica básica y nueva, es capaz de hibridar de manera estable a un ácido nucleico que tiene el complemento exacto de una de las secuencias de ácidos nucleicos enumeradas del grupo en condiciones de hibridación rigurosas. Un complemento exacto incluye la secuencia de ADN o ARN correspondiente.

La frase "un oligonucleótido que corresponde sustancialmente a una secuencia de ácido nucleico" significa que el oligonucleótido al que se hace referencia es lo suficientemente similar a la secuencia de ácido nucleico de referencia de forma que el oligonucleótido tiene propiedades de hibridación similares a la secuencia de ácido nucleico de referencia, ya que hibridaría a la misma secuencia de ácido nucleico objetivo en condiciones de hibridación rigurosas.

Un experto en la técnica entenderá que los oligonucleótidos "que corresponden sustancialmente" de la invención pueden variar de la secuencia a la que se hace referencia y todavía hibridar a la misma secuencia de ácido nucleico objetivo. Esta variación del ácido nucleico se puede indicar en cuanto a un porcentaje de bases idénticas dentro de la secuencia o el porcentaje de bases perfectamente complementarias entre la sonda o el cebador y su secuencia objetivo. Así, un oligonucleótido de la presente invención corresponde sustancialmente a una secuencia de ácido nucleico de referencia si estos porcentajes de identidad de bases o complementariedad son del 100% a alrededor del 80%. En las realizaciones preferidas, el porcentaje es del 100% a alrededor del 85%. En las realizaciones más preferidas, este porcentaje puede ser del 100% a alrededor del 90%; en otras realizaciones preferidas, este porcentaje es del 100% a alrededor del 95%. Un experto en la técnica entenderá las diversas modificaciones de las condiciones de hibridación que podrían ser necesarias en los diversos porcentajes de complementariedad para permitir la hibridación a una secuencia objetivo específica sin provocar un nivel inaceptable de hibridación inespecífica.

Oligonucleótido Marcado/Secuencia Marcadora Heteróloga

Un "oligonucleótido marcado", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un oligonucleótido que comprende al menos una primera región y una segunda región, en el que la primera región comprende una "secuencia de hibridación al objetivo" que hibrida al extremo 3' de una secuencia de ácido nucleico objetivo de interés, y en el que la segunda región comprende una "secuencia marcadora" situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación al objetivo y que no hibrida o se une de manera estable a un ácido nucleico objetivo que contiene la secuencia de ácido nucleico objetivo. La hibridación de la secuencia de hibridación al objetivo a la secuencia de ácido nucleico objetivo produce una "secuencia de ácido nucleico objetivo marcada". Las características y las consideraciones de diseño para el componente de la secuencia de hibridación al objetivo serían las mismas que para los oligonucleótidos de cebado discutidos más adelante.

La "secuencia marcadora" o "secuencia marcadora heteróloga" puede ser esencialmente cualquier secuencia heteróloga con tal de que no hibride de manera estable a la secuencia de ácido nucleico objetivo de interés y, por tanto, participe en una amplificación detectable. La secuencia marcadora preferiblemente no hibrida de manera estable a ninguna secuencia derivada del genoma de un organismo que se está analizando o, más en particular, a ningún ácido nucleico objetivo en las condiciones de reacción. Una secuencia marcadora que está presente en un oligonucleótido marcado se diseña preferiblemente de manera que no perjudique o interfiera sustancialmente con la capacidad de la secuencia de hibridación al objetivo de hibridar a su secuencia objetivo. Además, la secuencia marcadora será de suficiente longitud y composición de manera que una vez que un complemento de la secuencia marcadora se haya incorporado a un producto de prolongación de cebador de ADN inicial, se pueda usar un oligonucleótido de cebado específico de marcador para participar en las rondas de amplificación posteriores tal como se describe en la presente memoria. Una secuencia marcadora de la presente invención tiene generalmente una longitud de al menos 10 nucleótidos, y se puede prolongar hasta una longitud de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más nucleótidos. Los técnicos expertos reconocerán que el diseño de las secuencias marcadoras y los oligonucleótidos marcados para el uso en la presente invención puede seguir cualquiera de una diversidad de estrategias adecuadas, a la vez que se alcanzan los objetivos y las ventajas descritos en la presente memoria.

En ciertas realizaciones, el oligonucleótido marcado es un "oligonucleótido de cebado marcado" que comprende una secuencia marcadora y una secuencia de hibridación al objetivo. En otras realizaciones, el oligonucleótido marcado es un "oligonucleótido promotor marcado" que comprende una secuencia marcadora, una secuencia de hibridación al objetivo y una secuencia promotora situada en 5' respecto de la secuencia marcadora, y es eficaz para iniciar la transcripción a partir de ella.

Inactivación

El término "inactivación" significa que una secuencia marcadora heteróloga se altera de forma que no se une de manera estable a una secuencia de ácido nucleico objetivo en condiciones de amplificación. En el caso de un oligonucleótido marcado sin hibridar, el término "inactivación" significa que el oligonucleótido marcado se altera desde una conformación "activa" que permite que la secuencia de hibridación al objetivo hibride a la secuencia de ácido nucleico objetivo hasta una conformación "inactiva" que bloquea o que impide de otra manera que la secuencia de hibridación al objetivo hibride a la secuencia de ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, se puede formar una conformación inactiva en condiciones de rigurosidad que permiten que la secuencia de cierre del marcador forme un híbrido estable con la secuencia de hibridación al objetivo (p.ej., en condiciones menos rigurosas que las condiciones para formar una conformación activa del oligonucleótido marcado). A menos que se altere adicionalmente, el híbrido secuencia de cierre del marcador:secuencia de hibridación al objetivo permanece cerrado en las condiciones de amplificación. De manera alternativa, una molécula bicatenaria formada entre la secuencia de cierre del marcador y la secuencia de hibridación al objetivo puede ser alterada por una enzima, tal como una ADNasa, una S1 nucleasa, una endonucleasa, tal como una enzima de restricción que escinde un sitio de restricción bicatenario formado entre la secuencia de cierre del marcador y la secuencia de hibridación al objetivo, una actividad de ribonucleasa (p.ej., actividad de RNasa H) para digerir el componente de ARN (p.ej., secuencia de hibridación al objetivo) de un híbrido ADN:ARN, o una exonucleasa que tiene una actividad 3'-a-5' o 5'-a-3' para eliminar nucleótidos de la secuencia de hibridación al objetivo hibridada a la secuencia de cierre del marcador. Sin embargo, para evitar exponer una muestra a una fuente potencialmente contaminante de la secuencia de ácido nucleico objetivo, en general no se prefiere el uso de enzimas para inactivar los oligonucleótidos marcados que no han hibridado a la secuencia de ácido nucleico objetivo. Otros medios de inactivación incluyen productos químicos para alterar la secuencia de hibridación al objetivo de manera que sea incapaz de hibridar a una secuencia de ácido nucleico objetivo en las condiciones de amplificación.

Se pueden incluir restos en la secuencia de hibridación al objetivo para estabilizar adicionalmente los híbridos formados entre la secuencia de cierre del objetivo y la secuencia de hibridación al objetivo de los oligonucleótidos marcados, en especial cuando se prevé que al menos algunos de los oligonucleótidos marcados inactivos se introducirán en la mezcla de la reacción de amplificación. Los restos adecuados

incluyen nucleótidos modificados, que incluyen LNAs, 2'-O-ME ribonucleótidos, 2,6-diamino purina, 5-metil citosina, y C-5 propinil citosina o uracilo. Los expertos en la técnica podrán seleccionar fácilmente el número y las posiciones de tales nucleótidos modificados para limitar la desnaturalización parcial local en los extremos 5' y 3' de la secuencia de cierre del marcador y para conseguir una temperatura de fusión deseada del híbrido sin acometer una experimentación excesiva. Otros restos adecuados incluyen agentes de unión al surco menor y grupos colgantes, tales como purina, DABCYL, pirina y 5'-trimetoxi estilbeno CAP.

Eliminación

Tal como se usa en la presente memoria, el término "eliminación" se refiere a la separación física de las secuencias de ácidos nucleicos objetivo marcadas de los oligonucleótidos marcados sin hibridar. Las secuencias de ácidos nucleicos objetivo marcadas se pueden separar físicamente de los oligonucleótidos marcados sin hibridar (o las secuencias marcadoras heterólogas) presentes en una muestra de ácido nucleico mediante una diversidad de métodos conocidos para los expertos en la técnica. A modo de ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos objetivo marcadas pueden estar unidas a un soporte sólido e inmovilizadas en una muestra de ácido nucleico mientras se elimina el material sin unir. Para eliminar el material sin unir, el soporte sólido se puede someter a una o más etapas de lavado/aclarado. Las etapas de lavado pretenden eliminar los oligonucleótidos marcados sin hibridar restantes e interferir potencialmente el material celular o el material de la muestra. Generalmente se incluye una etapa de aclarado cuando la disolución de lavado contiene un componente que es inhibitorio para la amplificación cuando está presente en una concentración suficientemente elevada, tal como un detergente. El soporte sólido preferiblemente se une específicamente a los ácidos nucleicos objetivo o las secuencias de ácidos nucleicos objetivo marcadas para impedir que el oligonucleótido marcado sin hibridar (o las secuencias marcadoras heterólogas sin unir) participen en la reacción de amplificación. Los medios ejemplares para capturar, inmovilizar y purificar ácidos nucleicos objetivo se discuten más adelante, un ejemplo de los cuales se describe en Weisburg *et al.*, "Two-Step Hybridization and Capture of a Polynucleotide", pat. de EE.UU. nº 6.534.273.

Secuencia de Cierre del Marcador/Oligonucleótido de Cierre del Marcador

Las frases "secuencia de cierre del marcador" y "oligonucleótido de cierre del marcador" se refieren a un oligonucleótido que es complementario a una parte de la secuencia de hibridación al objetivo de un oligonucleótido marcado. La longitud y la secuencia de la secuencia de cierre del marcador se seleccionan de manera que la secuencia de cierre del marcador no hibrida de manera estable a la secuencia de hibridación al objetivo del oligonucleótido marcado en un primer conjunto de condiciones que permiten la hibridación estable de la secuencia de hibridación al objetivo a una secuencia objetivo. La secuencia de cierre del marcador puede incluir nucleótidos abásicos o emparejamientos incorrectos de bases con la secuencia de hibridación al objetivo. Con tal de que el oligonucleótido marcado no esté hibridado a la secuencia objetivo, la secuencia de cierre del marcador hibrida de manera estable a la secuencia de hibridación al objetivo en un segundo conjunto de condiciones menos rigurosas, por lo que "inactiva" o bloquea que el oligonucleótido marcado hibride a la secuencia objetivo. La secuencia de cierre del marcador puede estar en forma de un oligonucleótido discreto o puede estar unida al extremo 5' de un oligonucleótido marcado ("molécula marcadora"), de manera que forma una estructura en horquilla con el oligonucleótido marcado en el segundo conjunto de condiciones ("molécula marcadora en horquilla"). Si forma parte de una molécula marcadora, la secuencia de cierre del marcador está unida preferiblemente al oligonucleótido marcado por medio de una región espaciadora no nucleotídica (p.ej., nucleótidos abásicos o polietilen glicol) de una longitud suficiente para que la secuencia de cierre del marcador hibride a la secuencia de hibridación al objetivo en el segundo conjunto de condiciones. La secuencia de cierre del marcador se puede modificar para impedir la iniciación de la síntesis de ADN a partir de ella, que puede incluir un resto bloqueante situado en su extremo 3'. La secuencia de cierre del marcador tiene una longitud de al menos 3, pero no más de 20 bases. Las secuencias de cierre del marcador típicas tienen una longitud de 10 a 16 bases.

Amplificación o Amplificación de Ácido Nucleico

"Amplificación" o "amplificación de ácido nucleico" significa la producción de múltiples copias de un ácido nucleico objetivo que contiene al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico objetivo específica deseada. Las múltiples copias se pueden denominar amplicones o productos de amplificación. En ciertas realizaciones, el objetivo amplificado contiene menos de la secuencia génica objetivo completa (intrones y exones) o una secuencia génica objetivo expresada (transcrito de corte y empalme de exones y secuencias flanqueantes que no se traducen). Por ejemplo, se pueden producir amplicones específicos amplificando una parte del polinucleótido objetivo mediante el uso de cebadores de amplificación que hibridan a, y que inician la polimerización desde, posiciones internas del polinucleótido objetivo. Preferiblemente, la porción amplificada contiene una secuencia objetivo detectable que se puede detectar mediante el uso de una diversidad de métodos bien conocidos.

Muchos métodos bien conocidos de amplificación de ácidos nucleicos requieren el termociclado para desnaturar ácidos nucleicos bicatenarios e hibridar cebadores alternativamente; sin embargo, otros métodos muy conocidos de amplificación de ácidos nucleicos son isotérmicos. La reacción en cadena de la polimerasa (Mullis *et al.*, pat. de EE.UU. n° 4.683.195; Mullis, pat. de EE.UU. n° 4.683.202; y Mullis *et al.*, pat. de EE.UU. n° 4.800.159), denominada habitualmente PCR, usa múltiples ciclos de desnaturación, renaturalización de pares de cebadores a cadenas opuestas, y prolongación de los cebadores para incrementar exponencialmente el número de copias de la secuencia objetivo. En una variación denominada RT-PCR, se usa la transcriptasa inversa (RT) para producir un ADN complementario (cADN) a partir de mRNA, y el cADN se amplifica después mediante PCR para producir múltiples copias de ADN (Gelfand *et al.*, "Reverse Transcription with Thermostable DNA Polymerases - High Temperature Reverse Transcription", pat. de EE.UU. n°s 5.322.770 y 5.310.652). Otro método es la amplificación mediante desplazamiento de cadenas (Walker, G. *et al.* (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 392-396; Walker *et al.*, "Nucleic Acid Target Generation", pat. de EE.UU. n° 5.270.184; Walker, "Strand Displacement Amplification", pat. de EE.UU. n° 5.455.166; y Walker *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20, 1691-1696), denominada habitualmente SDA, que usa ciclos de renaturalización de pares de secuencias de cebadores a las cadenas opuestas de una secuencia objetivo, prolongación de los cebadores en presencia de un dNTP para producir un producto de prolongación de cebadores hemifosforotioado bicatenario, la formación de una mella mediada por endonucleasa en un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción hemi-modificado, y la prolongación de los cebadores mediada por polimerasa desde el extremo 3' de la mella para desplazar la cadena existente y producir una cadena para la siguiente ronda de renaturalización de cebadores, formación de mella y desplazamiento de la cadena, lo que da como resultado la amplificación geométrica del producto. La SDA termófila (tSDA) usa endonucleasas y polimerasas termófilas a temperaturas superiores esencialmente en el mismo método (pat. europea n° 0 684 315). Otros métodos de amplificación incluyen: la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (Malek *et al.*, pat. de EE.UU. n° 5.130.238), denominada habitualmente NASBA; una que usa una ARN replicasa para amplificar la molécula de sonda propiamente dicha (Lizardi, P. *et al.* (1988) *BioTechnol.* 6, 1197-1202), denominada habitualmente Q β replicasa; un método de amplificación basado en la transcripción (Kwoh, D. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1173-1177); la replicación de secuencias auto-sostenida (Guatelli, J. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1874-1878; Landgren (1993) *Trends in Genetics* 9, 199-202; y Lee, H. *et al.*, NUCLEIC ACID AMPLIFICATION TECHNOLOGIES (1997)); y la amplificación mediada por la transcripción (Kacian *et al.*, "Nucleic Acid Sequence Amplification Methods", pat. de EE.UU. n° 5.480.784; y Kacian *et al.*, pat. de EE.UU. n° 5.399.491), denominada habitualmente TMA. Para una discusión adicional de los métodos de amplificación conocidos, véase Persing, David H., 1993, "In Vitro Nucleic Acid Amplification Techniques" en *Diagnostic Medical Microbiology: Principles and Applications* (Persing *et al.*, Eds.), págs. 51-87 (American Society for Microbiology, Washington, D.C.). Otros métodos de amplificación ilustrativos adecuados para el uso de acuerdo con la presente invención incluyen la amplificación por círculo rodante (RCA) (Lizardi, "Rolling Circle Replication Reporter Systems", pat. de EE.UU. n° 5.854.033); la amplificación dependiente de helicasa (HDA) (Kong *et al.*, "Helicase Dependent Amplification Nucleic Acids", pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° US 2004-0058378 A1); y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Notomi *et al.*, "Process for Synthesizing Nucleic Acid", pat. de EE.UU. n° 6.410.278).

Los sistemas de amplificación preferidos basados en la transcripción de la presente invención incluyen TMA, que emplea una ARN polimerasa para producir múltiples transcritos de ARN de una región objetivo (p.ej., Kacian *et al.*, pat. de EE.UU. n°s 5.480.784 y 5.399.491; y Becker *et al.*, "Single-Primer Nucleic Acid Amplification Methods", pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° US 2006-0046265 A1). TMA usa un "oligonucleótido promotor" o "promotor-cebador" que hibrida a un ácido nucleico objetivo en presencia de una transcriptasa inversa y una ARN polimerasa para formar un promotor bicatenario a partir del cual la ARN polimerasa produce transcritos de ARN. Estos transcritos se pueden convertir en moldes para las rondas adicionales de TMA en presencia de un segundo cebador capaz de hibridar a los transcritos de ARN. A diferencia de la PCR, la LCR u otros métodos que requieren una desnaturación térmica, la TMA es un método isotérmico que usa una actividad de ARNasa H para digerir la cadena de ARN de un híbrido ARN:ADN, por lo que se consigue que la cadena de ADN esté disponible para la hibridación a un cebador o a un promotor-cebador. En general, se usa la actividad de ARNasa H asociada a la transcriptasa inversa proporcionada para la amplificación.

En un método de TMA ilustrativo, un cebador de amplificación es un oligonucleótido promotor-cebador que comprende una secuencia promotora que se hace funcional cuando está en forma bicatenaria, localizada en 5' de una secuencia de unión al objetivo, que es capaz de hibridar en un sitio de unión de un ARN objetivo en una localización 3' respecto de la secuencia a amplificar. Un promotor-cebador se puede denominar "cebador de T7" cuando es específico para el reconocimiento por una ARN polimerasa de T7. En ciertas circunstancias, el extremo 3' de un promotor-cebador, o una subpoblación de tales promotores-cebadores, se puede modificar para bloquear o reducir la prolongación de los cebadores. A partir de un promotor-cebador sin modificar, la transcriptasa inversa crea una copia de cADN del ARN objetivo, mientras la actividad de ARNasa H degrada el ARN objetivo. Un segundo cebador de amplificación se une entonces al cADN. Este cebador se puede denominar "cebador que no es de T7" para distinguirlo del "cebador de T7". A partir de este segundo cebador de amplificación, la

transcriptasa inversa crea otra cadena de ADN, lo que da como resultado un ADN bicatenario con un promotor funcional en un extremo. Cuando está en forma bicatenaria, la secuencia promotora es capaz de unirse a una ARN polimerasa para comenzar la transcripción de la secuencia objetivo a la que está hibridado en el promotor-cebador. Una ARN polimerasa usa esta secuencia promotora para producir múltiples transcritos de ARN (es decir, amplicones), en general alrededor de 100 a 1.000 copias. Cada amplicón recién sintetizado puede renaturalizar con el segundo cebador de amplificación. La transcriptasa inversa puede crear entonces una copia de ADN, mientras la actividad de ARNasa H degrada el ARN de esta molécula bicatenaria ARN:ADN. El promotor-cebador se puede unir después al ADN recién sintetizado, lo que posibilita que la transcriptasa inversa cree un ADN bicatenario, a partir del cual la ARN polimerasa produce múltiples amplicones. Así, se puede llevar a cabo una amplificación isotérmica de un billón de veces mediante el uso de dos cebadores de amplificación.

En otro método de TMA ilustrativo, se incorporan opcionalmente una o más características descritas en Becker *et al.*, pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° US 2006-0046265 A1. Los métodos de TMA preferidos a este respecto incluyen el uso de restos bloqueantes, restos de terminación, y otros restos modificantes que proporcionan una sensibilidad y una exactitud mejoradas al proceso de TMA. Así, ciertas realizaciones preferidas de la presente invención emplean oligonucleótidos marcados, como se describe en la presente memoria, junto con los métodos descritos en Becker *et al.*, pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° US 2006-0046265 A1.

"Amplificación detectable" significa que una señal detectable asociada a un producto de amplificación en una mezcla de reacción de amplificación se eleva por encima de un nivel de fondo o umbral predeterminado (amplificación a punto final) o se eleva por encima de un nivel de fondo o umbral en un período de tiempo predeterminado (amplificación en tiempo real). Véase, p.ej., Light *et al.*, "Method for Determining the Amount of an Analyte in a Sample", pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° US 2006-0276972, párrafos 506-549. El producto de amplificación contiene una secuencia que tiene una identidad de secuencias con una secuencia de ácido nucleico objetivo o su complemento y que se puede detectar, por ejemplo, con un colorante intercalante o una sonda de detección que tiene especificidad hacia una región de la secuencia de ácido nucleico objetivo o su complemento.

"Amplificación Selectiva"

"Amplificación selectiva", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a la amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo según la presente invención en la que la amplificación detectable de la secuencia objetivo está limitada o sustancialmente limitada a la amplificación de la secuencia objetivo aportada por la muestra de interés que se está analizando, y no es aportada por la secuencia de ácido nucleico objetivo aportada por alguna otra fuente de la muestra, p.ej., la contaminación presente en los reactivos o componentes usados durante las reacciones de amplificación o en el medio o las condiciones ambientales en las que se llevan a cabo las reacciones de amplificación.

Condiciones de Amplificación

Las "condiciones de amplificación" quieren decir las condiciones que permiten la amplificación de ácidos nucleicos según la presente invención. Las condiciones de amplificación pueden ser, en ciertas realizaciones, menos rigurosas que las "condiciones de hibridación rigurosas" descritas en la presente memoria. Los oligonucleótidos usados en las reacciones de amplificación de la presente invención hibridan a sus objetivos deseados en las condiciones de amplificación, pero pueden o no hibridar en condiciones de hibridación rigurosas. Por otra parte, las sondas de detección de la presente invención hibridan en condiciones de hibridación rigurosas. Aunque la sección de Ejemplos más adelante proporciona las condiciones de amplificación preferidas para amplificar las secuencias de ácidos nucleicos objetivo según la presente invención, alguien que tenga una experiencia habitual en la técnica podría idear fácilmente otras condiciones aceptables para llevar a cabo las amplificaciones de ácidos nucleicos según la presente invención dependiendo del método particular de amplificación empleado.

Hibridar/Hibridación

La hibridación de ácidos nucleicos es el proceso por el cual dos cadenas de ácidos nucleicos que tengan secuencias de nucleótidos completamente o parcialmente complementarias se unen entre sí en condiciones de reacción predeterminadas para formar un híbrido bicatenario estable. Cada cadena de ácido nucleico puede ser un ácido desoxirribonucleico (ADN) o un ácido ribonucleico (ARN) o los análogos de los mismos. Así, la hibridación puede implicar híbridos ARN:ARN, híbridos ADN:ADN, híbridos ARN:ADN, o los análogos de los mismos. Las dos cadenas constituyentes de esta estructura bicatenaria, a veces denominada híbrido, se mantienen unidas entre sí mediante enlaces de hidrógeno. Aunque estos enlaces de hidrógeno se forman habitualmente entre nucleótidos que contienen las bases adenina y timina o uracilo (A y T o U) o citosina y guanina (C y G) en las cadenas de ácidos nucleicos monocatenarias, el emparejamiento de bases se puede formar también entre bases que no son miembros de estos pares "canónicos". El emparejamiento de bases que no es canónico se conoce bien en la técnica

(véase, p.ej., ROGER L.P. ADAMS ET AL., THE BIOCHEMISTRY OF THE NUCLEIC ACIDS (11ª ed., 1992)).

5 Las "condiciones de hibridación rigurosas" o "condiciones rigurosas" se refieren a condiciones en las que una sonda de detección específica es capaz de hibridar a ácidos nucleicos objetivo sobre otros ácidos nucleicos presentes en la muestra de análisis. Se apreciará que estas condiciones pueden variar dependiendo de factores que incluyen el contenido de GC y la longitud de la sonda, la temperatura de hibridación, la composición del reactivo o disolución de hibridación, y el grado de especificidad de hibridación deseado. Se proporcionan condiciones de hibridación rigurosas específicas más adelante en la descripción.

10 Un "híbrido de ácido nucleico" o "híbrido" o "molécula bicatenaria" significa una estructura de ácido nucleico que contiene una región bicatenaria, con enlaces de hidrógeno, en la que cada cadena es complementaria a la otra, y en la que la región es lo suficientemente estable en condiciones de hibridación rigurosas para ser detectada por medios que incluyen, pero sin limitación, detección quimioluminiscente o con luz fluorescente, autorradiografía, o electroforesis en gel. Tales híbridos pueden comprender moléculas bicatenarias ARN:ARN, ARN:ADN, o ADN:ADN.

15 "Complementario" significa que las secuencias de nucleótidos de las regiones similares de dos ácidos nucleicos monocatenarios, o de diferentes regiones en el mismo ácido nucleico monocatenario, tienen una composición de bases nucleotídicas que permite que las regiones monocatenarias hibriden entre sí en una región bicatenaria, estable con enlaces de hidrógeno en condiciones rigurosas de hibridación o amplificación. Cuando una secuencia contigua de nucleótidos de una región monocatenaria es capaz de formar una serie de pares de bases "canónicas" con enlaces de hidrógeno con una secuencia análoga de nucleótidos de la otra región monocatenaria, de forma que A se empareja con U o T y C se empareja con G, las secuencias de nucleótidos son "perfectamente" complementarias.

25 "Hibridar de manera preferente" significa que en condiciones de hibridación rigurosas, ciertas secuencias de nucleótidos o de nucleobases complementarias hibridan para formar un híbrido estable de manera preferente sobre otras moléculas bicatenarias menos estables. "No hibrida de manera estable" significa que no se forma un híbrido estable en cantidades apreciables y/o detectables en un conjunto definido de condiciones.

30 "Estable" o "hibridar de manera estable" significa que la temperatura de una mezcla de reacción está al menos 2 °C por debajo de la temperatura de fusión de una molécula bicatenaria de ácido nucleico.

Oligonucleótido Promotor/Secuencia Promotora

35 Tal como se conoce bien en la técnica, un "promotor" es una secuencia de ácido nucleico específica que es reconocida por una ARN polimerasa dependiente de ADN ("transcriptasa") como señal para unirse al ácido nucleico y comenzar la transcripción del ARN en un sitio específico. Para la unión, se pensaba en general que tales transcriptasas necesitaban ADN que se había hecho bicatenario en la región que comprende la secuencia promotora por medio de una reacción de prolongación, sin embargo, los presentes inventores han determinado que puede tener lugar una transcripción eficaz del ARN incluso en condiciones en las que no se forma un promotor bicatenario por medio de una reacción de prolongación con el ácido nucleico molde. No es necesario que el ácido nucleico molde (la secuencia a transcribir) sea bicatenario. Las ARN polimerasas dependientes de ADN individuales reconocen una diversidad de secuencias promotoras diferentes, que pueden variar notablemente en su eficacia al estimular la transcripción. Cuando una ARN polimerasa se une a una secuencia promotora para iniciar la transcripción, esa secuencia promotora no es parte de la secuencia transcrita. Así, los transcritos de ARN producidos por ella no incluirán esa secuencia.

45 Según la presente invención, un "oligonucleótido promotor" se refiere a un oligonucleótido que comprende primeras y segundas regiones, y que preferiblemente está modificado para impedir la iniciación de la síntesis de ADN a partir de su extremo 3'. La "primera región" de un oligonucleótido promotor de la presente invención comprende una secuencia de bases que hibrida a un molde de ADN, en la que la secuencia de hibridación está situada en 3', pero no necesariamente adyacente, respecto de una región promotora. La porción de hibridación de un oligonucleótido promotor de la presente invención tiene generalmente una longitud de al menos 10 nucleótidos, y se puede prolongar hasta una longitud de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más nucleótidos. La "segunda región" comprende un promotor para una ARN polimerasa. Un oligonucleótido promotor de la presente invención se modifica de tal manera que es incapaz de ser prolongado por una ADN polimerasa dependiente de ARN o ADN, p.ej., transcriptasa inversa, preferiblemente que comprende un resto bloqueante en su extremo 3' tal como se describió anteriormente. Los oligonucleótidos promotores adecuados y preferidos se describen en la presente memoria.

Pan Oligonucleótidos / Oligonucleótidos Universales

Los oligonucleótidos "universales" o los "pan" oligonucleótidos incluyen los oligonucleótidos que se pueden usar en una reacción de amplificación para identificar la presencia de secuencias de ácidos nucleicos de una clase de organismos basándose en las secuencias sumamente conservadas que son únicas para una clase de organismos (tal como se usa en la presente memoria, el término "clase" no implica necesariamente un agrupamiento filogenético reconocido de organismos). Por ejemplo, las secuencias codificantes muy conservadas de ARN ribosómico 16S contienen regiones que se hallan en bacterias, o agrupaciones de bacterias (p.ej., Eubacterias, bacterias grampositivas o bacterias gramnegativas), pero no existen en humanos y en otros organismos superiores, y así los oligonucleótidos se pueden diseñar y usar en una reacción de amplificación de ácido nucleico para detectar la presencia de secuencias bacterianas en una muestra de interés. Véase, p.ej., McCabe *et al.* (1999) *Molecular Genetics and Metabolism* 66, 205-211; Schmidt, T. *et al.* (1994) *Meth. Enzymol.* 235, 205-222 (método para la identificación de patógenos); Kunishima, S. *et al.*, (2000) *Transfusion* 40, 1420 (método para la detección de bacterias en la sangre); Greisen, K. (1994) *J. Clin. Microbiol.* 32, 335-351 (método para la detección de bacterias patógenas en el líquido cefalorraquídeo); Jordan, J. (2005) *J. Mol. Diag.* 7, 575-581 (método para el diagnóstico de sepsis en neonatos); Rothman, R. *et al.* (2002) *J. Infect. Dis.* 186, 1677-1681 (método para el diagnóstico de endocarditis bacteriana aguda); y Cox, C. *et al.* (2002) *Arthritis Res. Ther.* 5, R1-R8 (detección de bacterias en líquido sinovial). De manera similar, se han descrito oligonucleótidos universales para otras clases de organismos, tales como patógenos fúngicos. Véase, p.ej., Maaroofi, Y. *et al.* (2003) *J. Clin. Microbiol.* 41, 3293-3298 (método para la cuantificación de *Candida albicans* en la sangre); Carr, M. *et al.* (2005) *J. Clin. Microbiol.* 43, 3023-3026 (método para la detección de *Candida dubliniensis* en la sangre); y White, P. *et al.* (2003) *J. Med. Microbiol.* 52, 229-238 (método para la detección de infecciones fúngicas sistémicas). Se puede emplear de manera ventajosa esencialmente cualquier oligonucleótido universal conocido o desarrollado para una clase dada de organismo en los métodos descritos en la presente memoria.

Oligonucleótido de Cebado

Un oligonucleótido de cebado es un oligonucleótido en el que al menos el extremo 3' es complementario a un molde de ácido nucleico, y que se compleja (mediante la formación de enlaces de hidrógeno o hibridación) con el molde para proporcionar un complejo cebador:molde adecuado para la iniciación de la síntesis mediante una ADN polimerasa dependiente de ARN o ADN. Un oligonucleótido de cebado se prolonga mediante la adición de bases nucleotídicas unidas de manera covalente en su extremo 3', cuyas bases son complementarias al molde. El resultado es un producto de prolongación de cebador. Un oligonucleótido de cebado de la presente invención generalmente tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos, y se puede prolongar hasta una longitud de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más nucleótidos. Los oligonucleótidos de cebado adecuados y preferidos se describen en la presente memoria. Prácticamente todas las ADN polimerasas (que incluyen las transcriptasas inversas) que se conocen requieren la complejación de un oligonucleótido a un molde monocatenario ("cebado") para iniciar la síntesis de ADN, mientras la replicación de ARN y la transcripción (la copia de ARN a partir de ADN) generalmente no requiere un cebador. Por su propia naturaleza de ser prolongado por una ADN polimerasa, un oligonucleótido de cebado no comprende un resto bloqueante en 3'.

Oligonucleótido Desplazador

Un "oligonucleótido desplazador" es un oligonucleótido de cebado que hibrida a un ácido nucleico molde en posición 5' respecto de un oligonucleótido de cebado cercano hibridado en el extremo 3' de una secuencia objetivo (denominado en la presente memoria "oligonucleótido de cebado directo"). "En posición 5'" significa que un extremo 3' del oligonucleótido desplazador se compleja con el ácido nucleico molde en 5' respecto de un extremo 3' del oligonucleótido de cebado directo. Cuando está hibridado al ácido nucleico molde, la base 3'-terminal del oligonucleótido desplazador está preferiblemente adyacente a, o espaciada de, la base 5'-terminal del oligonucleótido de cebado directo. Más preferiblemente, la base 3'-terminal del oligonucleótido desplazador está espaciada de 5 a 35 bases de la base 5'-terminal del oligonucleótido de cebado directo. El oligonucleótido desplazador se puede proporcionar a la mezcla de reacción a la vez que el oligonucleótido de cebado directo o después de que el oligonucleótido de cebado directo haya tenido un tiempo suficiente para hibridar al ácido nucleico molde. La prolongación del oligonucleótido de cebado directo se puede iniciar antes o después de proporcionar el oligonucleótido desplazador a la mezcla de reacción. En las condiciones de amplificación, el oligonucleótido desplazador se prolonga de una manera dependiente del molde, por lo que desplaza el producto de prolongación de cebador que comprende el oligonucleótido de cebado directo que está complejado con el ácido nucleico molde. Una vez desplazado del ácido nucleico molde, el producto de prolongación de cebador que comprende el oligonucleótido de cebado directo está disponible para la complejación con el oligonucleótido promotor. El oligonucleótido de cebado directo y el oligonucleótido desplazador hibridan de manera preferente al ácido nucleico objetivo. Los ejemplos de oligonucleótidos desplazadores y sus usos se describen en Becker *et al.*, "Methods and Kits for Amplifying DNA", sol. de pat. de EE.UU. de nº de serie 11/681.104, que disfruta de propiedad común con la presente.

Resto Bloqueante

Tal como se usa en la presente memoria, un "resto bloqueante" es una sustancia usada para "bloquear" el extremo 3' de un oligonucleótido u otro ácido nucleico de forma que no puede ser prolongado de manera eficaz por una polimerasa de ácidos nucleicos. Un resto bloqueante puede ser una molécula pequeña, p.ej., un grupo fosfato o amonio, o puede ser un nucleótido modificado, p.ej., un 3'2' didesoxinucleótido o 5'-trifosfato de 3'-desoxiadenosina (cordicepina), u otro nucleótido modificado. Los restos bloqueantes adicionales incluyen, por ejemplo, el uso de un nucleótido o de una secuencia nucleotídica corta que tiene una orientación 3'-a-5', de forma que no hay un grupo hidroxilo libre en el extremo 3', el uso de un grupo alquilo en 3', un resto no nucleotídico en 3' (véase, p.ej., Arnold *et al.*, "Non-Nucleotide Linking Reagents for Nucleotide Probes", pat. de EE.UU. nº 6.031.091), fosforotioato, residuos de alcano-diol, ácido nucleico peptídico (PNA), residuos de nucleótidos que carecen de un grupo hidroxilo en 3' en el extremo 3', o una proteína de unión al ácido nucleico. Preferiblemente, el resto bloqueante en 3' comprende un nucleótido o una secuencia de nucleótidos que tienen una orientación 3'-a-5' o un resto no nucleotídico en 3', y no un 3'2'-didesoxinucleótido o un extremo 3' que tiene un grupo hidroxilo libre. Las personas de experiencia habitual en la técnica conocen bien otros métodos para preparar oligonucleótidos bloqueantes de 3'.

Molécula de Unión

Tal como se usa en la presente memoria, una "molécula de unión" es una sustancia que hibrida o que se une de otra manera a un ácido nucleico objetivo de ARN en posición adyacente o cercana al extremo 5' de la secuencia objetivo deseada, para limitar un producto de prolongación de cebador de ADN a una longitud deseada, es decir, un producto de prolongación de cebador que tenga un extremo 3' definido en general. Tal como se usa en la presente memoria, la frase "extremo 3' definido" significa que el extremo 3' de un producto de prolongación de cebador no es completamente indeterminado, como sería el caso en una reacción de prolongación de cebador ocurriese en ausencia de una molécula de unión, sino que el extremo 3' del producto de prolongación de cebador se conoce en general en un pequeño intervalo de bases. En ciertas realizaciones, una molécula de unión comprende una región de bases. La región de bases puede ser ADN, ARN, una molécula quimérica ADN:ARN, o un análogo de los mismos. Las moléculas de unión que comprenden una región de bases se pueden modificar de una o más maneras, tal como se describe en la presente memoria. Las regiones de bases ejemplares incluyen oligonucleótidos de terminación y de digestión, tal como se describe más adelante. En otras realizaciones, una molécula de unión puede comprender, por ejemplo, una proteína o un fármaco capaz de unirse al ARN con una afinidad y especificidad suficientes para limitar un producto de prolongación de cebador de ADN a una longitud predeterminada.

Oligonucleótido de Terminación

En la presente invención, un "oligonucleótido de terminación" es un oligonucleótido que comprende una secuencia de bases que es complementaria a una región del ácido nucleico objetivo cerca del extremo 5' de la secuencia objetivo, para "terminar" la prolongación de cebador de un ácido nucleico naciente que incluye un oligonucleótido de cebado, por lo que se proporciona un extremo 3' definido para la cadena de ácido nucleico naciente. Un oligonucleótido de terminación se diseña para que hibride al ácido nucleico objetivo en una posición suficiente para conseguir el extremo 3' deseado para la cadena de ácido nucleico naciente. El posicionamiento del oligonucleótido de terminación es flexible dependiendo de su diseño. Un oligonucleótido de terminación puede estar modificado o sin modificar. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos de terminación se sintetizan con al menos uno o más 2'-O-ME ribonucleótidos. Se ha demostrado que estos nucleótidos modificados tienen una estabilidad térmica superior en las moléculas bicatenarias complementarias. Los 2'-O-ME ribonucleótidos también funcionan para incrementar la resistencia de los oligonucleótidos a las exonucleasas, por lo que se incrementa la semivida de los oligonucleótidos modificados. Véase, p.ej., Majlessi *et al.* (1988) *Nucleic Acids Res.* 26, 2224-9. Se pueden utilizar otras modificaciones tal como se describe en otra parte en la presente memoria además o en lugar de los 2'-O-ME ribonucleótidos. Por ejemplo, un oligonucleótido de terminación puede comprender PNA o un LNA. Véase, p.ej., Petersen *et al.* (2000) *J. Mol. Recognit.* 13, 44-53. Un oligonucleótido de terminación de la presente invención incluye generalmente un resto bloqueante en su extremo 3' para impedir la prolongación. Un oligonucleótido de terminación puede comprender también una proteína o péptido unido al oligonucleótido para terminar la prolongación adicional de una cadena de ácido nucleico naciente por una polimerasa. Un oligonucleótido de terminación de la presente invención tiene generalmente una longitud de al menos 10 bases, y se puede prolongar hasta una longitud de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más nucleótidos. Los oligonucleótidos de terminación adecuados y preferidos se describen en la presente memoria. Se debería indicar que aunque un oligonucleótido de terminación incluye generalmente o necesariamente un resto bloqueante en 3', los oligonucleótidos "bloqueados en 3'" no son necesariamente oligonucleótidos de terminación. Otros oligonucleótidos de la presente invención, p.ej., los oligonucleótidos promotores y los oligonucleótidos protectores también están bloqueados generalmente o necesariamente en 3'.

Secuencia de Inserción

Tal como se usa en la presente memoria, una "secuencia de inserción" es una secuencia colocada entre la primera región (es decir, la porción de unión al molde) y la segunda región de un oligonucleótido promotor. Las secuencias de inserción tienen preferiblemente una longitud de 5 a 20 nucleótidos, más preferiblemente 6 a 18 nucleótidos, y lo más preferiblemente 6 a 12 nucleótidos. La inclusión de secuencias de inserción en los oligonucleótidos promotores incrementa la velocidad a la que se forman los productos de amplificación de ARN. Las secuencias de inserción ejemplares se describen en la presente memoria.

Captura del Objetivo

La captura del objetivo, tal como se usa en la presente memoria, incluye cualquier técnica eficaz para eliminar todo o sustancialmente todo el oligonucleótido marcado sin hibridar tras la hibridación del oligonucleótido marcado con una secuencia de ácido nucleico objetivo, pero antes de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico objetivo. En general, la captura del objetivo implica capturar un polinucleótido objetivo en un soporte sólido, tal como partículas atraíbles magnéticamente, en las que el soporte sólido retiene el polinucleótido objetivo durante una o más etapas de lavado del procedimiento de purificación del polinucleótido objetivo. De esta manera, un polinucleótido objetivo se purifica sustancialmente del oligonucleótido marcado sin hibridar antes de una etapa posterior de amplificación de ácido nucleico. Se conocen numerosos métodos de captura de objetivos, y son adecuados para el uso junto con los métodos descritos en la presente memoria.

Por ejemplo, una aproximación ilustrativa descrita en la pub. de sol. de pat. de EE.UU. nº US 2006-0068417 A1 usa al menos un oligonucleótido de sonda de captura que contiene una región complementaria al objetivo y un miembro de un par de unión específico que une el ácido nucleico objetivo a una sonda inmovilizada en un soporte de captura, por lo que se forma un híbrido de captura que se separa de los otros componentes de la muestra. En otro método ilustrativo, Weisburg *et al.*, en la pat. de EE.UU. nº 6.110.678, describe un método para capturar un polinucleótido objetivo en una muestra en un soporte sólido, tal como partículas atraíbles magnéticamente, con una sonda inmovilizada unida mediante el uso de una sonda de captura y dos condiciones de hibridación diferentes, que preferiblemente difieren solamente en la temperatura. Las dos condiciones de hibridación controlan el orden de la hibridación, en las que las primeras condiciones de hibridación permiten la hibridación de la sonda de captura al polinucleótido objetivo, y las segundas condiciones de hibridación permiten la hibridación de la sonda de captura a la sonda inmovilizada. El método se puede usar para detectar la presencia de un polinucleótido objetivo en una muestra detectando el polinucleótido objetivo capturado o el polinucleótido objetivo amplificado.

Otra técnica ilustrativa de captura del objetivo implica una técnica de hibridación en sándwich para capturar y para detectar la presencia de un polinucleótido objetivo. Véase Ranki *et al.*, "Detection of Microbial Nucleic Acids By a One-Step Sandwich Hybridization Test", pat. de EE.UU. nº 4.486.539. La técnica implica la captura del polinucleótido objetivo mediante una sonda unida a un soporte sólido y la hibridación de una sonda de detección al polinucleótido objetivo capturado. Las sondas de detección no hibridadas al polinucleótido objetivo se eliminan fácilmente mediante lavado del soporte sólido. Así, el marcador restante está asociado al polinucleótido objetivo presente inicialmente en la muestra.

Otra técnica ilustrativa de captura del objetivo implica un método que usa un polinucleótido mediador que hibrida tanto al polinucleótido objetivo como al polinucleótido fijado en un soporte sólido. Véase Stabinsky, "Methods and Kits for Performing Nucleic Acid Hybridization Assays", pat. de EE.UU. nº 4.751.177. El polinucleótido mediador une el polinucleótido objetivo al soporte sólido para producir un objetivo unido. Una sonda marcada se puede hibridar al objetivo unido, y la sonda marcada sin unir se puede eliminar mediante lavado del soporte sólido.

Aún otra técnica ilustrativa de captura del objetivo se describe en Englehardt, "Capture Sandwich Hybridization Method and Composition", pat. de EE.UU. nº 5.288.609, que describe un método para detectar un polinucleótido objetivo. El método utiliza dos segmentos polinucleotídicos monocatenarios complementarios a la misma cadena o a cadenas opuestas del objetivo, y da como resultado la formación de un híbrido bicatenario con el polinucleótido objetivo. En una realización, el híbrido se captura en un soporte.

En otra técnica ilustrativa de captura del objetivo, los métodos y equipos para la detección de ácidos nucleicos usan cebadores oligonucleotídicos marcados con moléculas de unión específicas para inmovilizar los cebadores y los productos de prolongación de los cebadores. Véase Burdick *et al.*, "Diagnostic Kit and Method Using a Solid Phase Capture Means for Detecting Nucleic Acids", sol. de pat. europea nº 0 370 694 A2. El marcador se compleja de manera específica con su receptor, que está unido a un soporte sólido.

Las técnicas de captura anteriores son solamente ilustrativas, y no son limitantes. De hecho, se puede usar prácticamente cualquier método disponible para el técnico experto con tal de que sea eficaz

para eliminar todo o sustancialmente todo el oligonucleótido marcado sin hibridar tras la hibridación del oligonucleótido marcado con una secuencia de ácido nucleico objetivo, pero antes de la amplificación de la secuencia de ácido nucleico objetivo, como se describe en la presente memoria.

Sonda

5 La "sonda" o "sonda de detección" significa una molécula que comprende un oligonucleótido que tiene una secuencia de bases parcialmente o completamente complementaria a una región de una secuencia objetivo que se desea detectar, de manera que hibrida a ella en condiciones de hibridación rigurosas. Como entendería alguien que tenga una experiencia habitual en la técnica, una sonda comprende una molécula de ácido nucleico aislada, o un análogo de la misma, en una forma que no se halla en la naturaleza sin la intervención humana (p.ej., recombinada con un ácido nucleico exógeno, aislada, o purificada hasta cierto punto).

10 Las sondas de esta invención pueden tener nucleósidos o nucleobases adicionales fuera de la región seleccionada como objetivo con tal de que tales nucleósidos o nucleobases no afecten de manera sustancial a la hibridación en condiciones de hibridación rigurosas y, en el caso de las sondas de detección, no eviten la hibridación preferente al ácido nucleico objetivo. También se puede incluir una secuencia no complementaria, tal como una secuencia de captura del objetivo (en general un tramo de homopolímero, tal como una cola de poli-A, poli-T o poli-U), una secuencia promotora, un sitio de unión para la transcripción de ARN, un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción, o pueden contener secuencias que conferirán una estructura secundaria o terciaria deseada, tal como un sitio activo catalítico o una estructura en horquilla en la sonda, en el ácido nucleico objetivo, o en ambos.

15 Las sondas incluyen preferiblemente al menos un marcador detectable. El marcador puede ser cualquier sustancia marcadora adecuada, lo que incluye, pero sin limitación, un radioisótopo, una enzima, un cofactor enzimático, un sustrato enzimático, un colorante, un hapteno, una molécula quimioluminiscente, una molécula fluorescente, una molécula fosforescente, una molécula electroquimioluminiscente, un cromóforo, una región de una secuencia de bases que es incapaz de hibridarse de manera estable al ácido nucleico objetivo en las condiciones indicadas, y las mezclas de éstos. En una realización preferida en particular, el marcador es un éster de acridinio. Las sondas también pueden incluir marcadores interaccionantes que emiten señales diferentes dependiendo de si las sondas han hibridado a las secuencias objetivo. Los ejemplos de marcadores interaccionantes incluyen enzima/sustratos, enzima/cofactor, molécula luminiscente/apagadora, molécula luminiscente/aducto, dímeros de colorantes, y pares de transferencia de energía de Förrester. Ciertas sondas de la presente invención no incluyen un marcador. Por ejemplo, se pueden usar sondas de "captura" sin marcar para enriquecer las secuencias objetivo o los replicados de las mismas, que se pueden detectar después mediante una segunda sonda de "detección". Véase, p.ej., Weisburg *et al.*, pat. de EE.UU. nº 6.534.273. Aunque las sondas de detección generalmente están marcadas, ciertas técnicas de detección no requieren que la sonda esté marcada. Véase, p.ej., Nygren *et al.*, "Devices and Methods for Optical Detection of Nucleic Acid Hybridization", pat. de EE.UU. nº 6.060.237.

20 "Estable" o "estable para la detección" significa que la temperatura de una mezcla de reacción está al menos 2 °C por debajo de la temperatura de fusión de un ácido nucleico bicatenario. La temperatura de la mezcla de reacción está preferiblemente al menos 5 °C por debajo de la temperatura de fusión del ácido nucleico bicatenario, e incluso más preferiblemente al menos 10 °C por debajo de la temperatura de fusión de la mezcla de reacción.

25 "Hibridar preferentemente" significa que en condiciones de hibridación rigurosas, las sondas de la presente invención hibridan a sus secuencias objetivo, o los replicados de las mismas, para formar híbridos sonda:objetivo estables, mientras al mismo tiempo se minimiza la formación de híbridos sonda:no objetivo. Así, una sonda hibrida a una secuencia objetivo o replicado de la misma hasta un punto lo suficientemente mayor que una secuencia no objetivo, para permitir que una persona que tenga una experiencia habitual en la técnica cuantifique con exactitud los replicados de ARN o el ADN complementario (cADN) de la secuencia objetivo formados durante la amplificación.

30 Las sondas de una secuencia definida se pueden producir mediante técnicas conocidas para las personas de experiencia habitual en la técnica, tales como mediante síntesis química, y mediante expresión *in vitro* o *in vivo* a partir de moléculas de ácidos nucleicos recombinantes. Preferiblemente, las sondas tienen una longitud de 10 a 100 nucleótidos, más preferiblemente una longitud de 12 a 50 bases, y aún más preferiblemente una longitud de 18 a 35 bases.

55 "Identidad" de Ácidos Nucleicos

60 En ciertas realizaciones, un ácido nucleico de la presente invención comprende una región de bases contiguas que es al menos un 80%, 90%, o 100% idéntica a una región de bases contiguas de un ácido nucleico de referencia. Para los ácidos nucleicos cortos, p.ej., ciertos oligonucleótidos de la presente invención, el grado de identidad entre una región de bases de un ácido nucleico "problema" y una región de bases de un ácido nucleico de referencia se puede determinar mediante alineación manual.

La "identidad" se determina comparando solamente la secuencia de bases nitrogenadas, independientemente de las regiones de carbohidratos y del esqueleto de los ácidos nucleicos que se están comparando. Así, la alineación de secuencias de bases problema:referencia puede ser ADN:ADN, ARN:ARN, ADN:ARN, ARN:ADN, o cualquier combinación o análogos de las mismas. Las secuencias de bases de ARN y ADN equivalentes se pueden comparar convirtiendo los U (en ARN) en T (en ADN).

Molde

Un "molde" es una molécula de ácido nucleico que va a ser copiada por una polimerasa de ácidos nucleicos. Un molde puede ser monocatenario, bicatenario, o parcialmente bicatenario, dependiendo de la polimerasa. La copia sintetizada es complementaria al molde o al menos a una cadena de un molde bicatenario o parcialmente bicatenario. Tanto el ARN como el ADN se sintetizan en general en la dirección 5'-a-3', y las dos cadenas de un ácido nucleico bicatenario se alinean de manera que los extremos 5' de las dos cadenas están en los extremos opuestos de la molécula bicatenaria (y, necesariamente, también lo están los extremos 3'). Aunque según la presente invención, una "secuencia objetivo" es siempre un "molde", los moldes pueden incluir también productos de prolongación de cebadores secundarios y productos de amplificación.

ADN Polimerasa Dependiente de ADN

Una "ADN polimerasa dependiente de ADN" es una enzima que sintetiza una copia de ADN complementaria a partir de un molde de ADN. Los ejemplos son la ADN polimerasa *Taq*, una ADN polimerasa muy termoestable de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, para las reacciones de amplificación de PCR, la ADN polimerasa I de *E. coli*, la ADN polimerasa del bacteriófago T7, o las ADN polimerasas de los bacteriófagos T4, Phi-29, M2, o T5. Las ADN polimerasas dependientes de ADN de la presente invención pueden ser enzimas naturales aisladas a partir de bacterias o bacteriófagos o expresadas de manera recombinante, o pueden ser formas modificadas o "evolucionadas" que se han modificado para que posean ciertas características deseables, p.ej., termoestabilidad, o la capacidad de reconocer o sintetizar una cadena de ADN a partir de diversos moldes modificados. Todas las ADN polimerasas dependientes de ADN conocidas requieren un cebador complementario para iniciar la síntesis. Se sabe que en condiciones adecuadas una ADN polimerasa dependiente de ADN puede sintetizar una copia de ADN complementaria a partir de un molde de ARN. Las ADN polimerasas dependientes de ARN (descritas más adelante) tienen también generalmente actividad de ADN polimerasa dependiente de ADN. Un ejemplo de tal polimerasa es la ADN polimerasa MasterAmp™ *Tth*, que tiene actividad de ADN polimerasa tanto dependiente de ADN como dependiente de ARN (es decir, transcriptasa inversa) que se pueden usar en reacciones de amplificación de PCR y RT-PCR (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI).

ARN Polimerasa Dependiente de ADN (Transcriptasa)

Una "ARN polimerasa dependiente de ADN" o "transcriptasa" es una enzima que sintetiza múltiples copias de ARN a partir de una molécula de ADN bicatenaria o parcialmente bicatenaria que tiene una secuencia promotora que es normalmente bicatenaria. Las moléculas de ARN ("transcritos") se sintetizan en la dirección 5'-a-3' comenzando en una posición específica justo en posición 3' del promotor. Los ejemplos de transcriptasas son la ARN polimerasa dependiente de ADN de *E. coli* y de los bacteriófagos T7, T3, y SP6.

ADN Polimerasa Dependiente de ARN (Transcriptasa Inversa)

Una "ADN polimerasa dependiente de ARN" o "transcriptasa inversa" ("RT") es una enzima que sintetiza una copia de ADN complementaria a partir de un molde de ARN. Todas las transcriptasas inversas conocidas tienen también la capacidad de producir una copia de ADN complementaria a partir de un molde de ADN; así, son ADN polimerasas dependientes tanto de ADN como de ARN. Las RTs pueden tener también una actividad de ARNasa H. Se prefiere la transcriptasa inversa derivada del virus de leucemia murina de Moloney (MMLV-RT). Es necesario un cebador para iniciar la síntesis con los moldes de ARN y ADN.

ARNasas Selectivas

Tal como se usa en la presente memoria, una "ARNasa selectiva" es una enzima que degrada la porción de ARN de una molécula bicatenaria ARN:ADN pero no el ARN monocatenario, ARN bicatenario o ADN. Una ARNasa selectiva ejemplar es la ARNasa H. También se contemplan en la presente invención las enzimas distintas de la ARNasa H que poseen la misma actividad o una actividad similar. Las ARNasas selectivas pueden ser endonucleasas o exonucleasas. La mayoría de las enzimas transcriptasas inversas contienen una actividad de ARNasa H además de sus actividades de polimerasa. Sin embargo, están disponibles otras fuentes de ARNasa H sin una actividad de polimerasa asociada. La degradación puede dar como resultado la separación del ARN de un complejo ARN:ADN. De manera alternativa, una ARNasa selectiva puede cortar simplemente el ARN en diversas posiciones de manera que las porciones del ARN se desnaturalizan o permiten que las enzimas desenrollen porciones del ARN.

Otras enzimas que degradan selectivamente las secuencias objetivo de ARN o los productos de ARN de la presente invención serán fácilmente evidentes para las personas de experiencia habitual en la técnica.

Cadena(s) Sentido/Antisentido

5 Las discusiones sobre la síntesis de ácidos nucleicos se simplifican enormemente y se clarifican adoptando términos para nombrar las dos cadenas complementarias de una molécula bicatenaria de ácido nucleico. Tradicionalmente, la cadena que codifica las secuencias usadas para producir proteínas o ARNs estructurales se denomina cadena "sentido (+)" y su complemento cadena "antisentido (-)". Ahora se sabe que en muchos casos ambas cadenas son funcionales, y la asignación de la denominación "sentido" a una y "antisentido" a la otra debe ser arbitraria. Sin embargo, los términos son muy útiles para denominar la orientación de la secuencia de los ácidos nucleicos, y se empleará en la presente memoria para ese fin.

Especificidad del Sistema

15 El término "especificidad", en el contexto de un sistema de amplificación, se usa en la presente memoria para referirse a la característica de un sistema de amplificación que describe su capacidad de distinguir entre las secuencias objetivo y las secuencias no objetivo dependiendo de la secuencia y de las condiciones del ensayo. En cuanto a la amplificación de un ácido nucleico, la especificidad se refiere en general a la proporción del número de amplicones específicos producidos respecto del número de productos secundarios (es decir, la proporción de señal respecto del ruido), descrita con más detalle más adelante.

Sensibilidad

20 El término "sensibilidad" se usa en la presente memoria para referirse a la precisión con la que una reacción de amplificación de ácido nucleico se puede detectar o cuantificar. La sensibilidad de una reacción de amplificación es generalmente una medida del número de copias más pequeño del ácido nucleico objetivo que se puede detectar de manera fiable en el sistema de amplificación, y dependerá, por ejemplo, del ensayo de detección que se esté empleando, y de la especificidad de la reacción de amplificación, es decir, la proporción de amplicones específicos respecto de los productos secundarios.

Bioproceso

30 Un "bioproceso", tal como se usa en la presente memoria, se refiere en general a cualquier proceso en el que hay presentes células vivas, o componentes de las mismas, de manera intencionada o no intencionada. Por ejemplo, esencialmente cualquier proceso de fabricación o de otro tipo que emplee una o más muestras o corrientes de muestras, al menos una de las cuales comprende células vivas, o los componentes de las mismas, o que puede comprender tales células o componentes como resultado de una contaminación no intencionada, se considera un bioproceso. En muchos de tales procesos es deseable tener la capacidad de detectar, identificar y/o controlar la presencia y/o fuentes de células vivas o componentes de las mismas dentro del proceso. Mediante el uso de los métodos de la presente invención, por ejemplo, se puede monitorizar la presencia y/o las fuentes de microorganismos contaminantes o de otro material biológico o componentes de las mismas en una o más muestras o corrientes de bioprocesos. Además, los requisitos de purificación/esterilización en ciertas muestras/corrientes de un bioproceso se pueden reducir ventajosamente mediante el uso de los métodos de la invención tal como se exponen en la presente memoria.

* * * * *

45 Como se discutió anteriormente, la presente invención se dirige en general a métodos de amplificación de ácidos nucleicos que reducen o eliminan de manera deseable las señales de amplificación positivas falsas que resultan del material biológico contaminante, tal como el material de ácido nucleico, que puede estar presente en uno o más reactivos, muestras o componentes que se usan en una reacción de amplificación, o que pueden estar presentes en el medio en el que se llevan a cabo las reacciones de amplificación. La invención ofrece además la ventaja de requerir esfuerzos menos rigurosos de purificación y/o esterilidad que los necesarios de manera convencional para asegurar que las enzimas y otros reactivos usados en las reacciones de amplificación, y el medio en el que las reacciones de amplificación se llevan a cabo, están exentos de contaminación por ácidos nucleicos bacterianos y de otro tipo que pueden producir resultados positivos falsos. Por lo tanto, los métodos de la invención son especialmente útiles para detectar, monitorizar y/o cuantificar microorganismos (o ácidos nucleicos contaminantes de otras fuentes) en muestras clínicas, muestras de bioprocesos o en corrientes de muestras, alimentos, agua, muestras industriales y ambientales, reservas de semillas, y otros tipos de materiales en los que puede ser necesario detectar y/o monitorizar la presencia de microorganismos o de otras formas de contaminación.

55 La presente invención se puede adaptar para el uso en prácticamente cualquier procedimiento de amplificación que requiera un oligonucleótido de cebado de unión al molde capaz de prolongarse en

presencia de una polimerasa de ácidos nucleicos. La incorporación de los oligonucleótidos marcados (o secuencias marcadoras heterólogas) en tales procedimientos de amplificación dependientes de cebadores se puede llevar a cabo sin modificar sustancialmente los reactivos y las condiciones de reacción de tales procedimientos. Cualquier modificación necesaria debería ser de menor importancia, y entraría dentro del conocimiento y la capacidad de un biólogo molecular experto. A continuación se exponen descripciones de diversos procedimientos de amplificación ilustrativos que adoptan los oligonucleótidos marcados.

La FIG. 1 ilustra una adaptación de una reacción de amplificación isotérmica, basada en la transcripción, conocida como amplificación mediada por transcripción inversa (rTMA), diversos aspectos de la cual se describen en Becker *et al.*, pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° US 2006-0046265 A1. La reacción de esta realización ilustrativa se inicia tratando una secuencia objetivo de ARN de una muestra de ácido nucleico con un oligonucleótido de cebado marcado y un oligonucleótido de terminación. El oligonucleótido de cebado marcado incluye una secuencia de hibridación al objetivo que hibrida a un extremo 3' de la secuencia objetivo y una secuencia marcadora situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación al objetivo. El oligonucleótido de terminación hibrida a un ácido nucleico objetivo que contiene la secuencia objetivo cerca del extremo 5' de la secuencia objetivo. El oligonucleótido de terminación se usa para finalizar la prolongación del cebador de un ácido nucleico naciente que incluye el oligonucleótido de cebado marcado. Así, el ácido nucleico objetivo forma un complejo estable con el oligonucleótido de cebado marcado en el extremo 3' de la secuencia objetivo y el oligonucleótido de terminación localizado en posición adyacente o cercana al extremo 5' de la secuencia objetivo antes de iniciar una reacción de prolongación de cebador. Véase la FIG. 1, Etapa 1. Se hace que el oligonucleótido de cebado marcado sin hibridar no esté disponible para la hibridación a la secuencia objetivo antes de iniciar una reacción de prolongación de cebador con el oligonucleótido de cebado marcado, preferiblemente inactivando y/o eliminando el oligonucleótido de cebado marcado sin hibridar de la muestra de ácido nucleico.

Después se inicia una reacción de prolongación a partir del extremo 3' del oligonucleótido de cebado marcado con una ADN polimerasa, p.ej., transcriptasa inversa, para producir un primer producto de prolongación de cebador de ADN que incluye la secuencia marcadora y una región complementaria a la secuencia objetivo. Véase la FIG. 1, Etapas 2 y 3. El primer producto de prolongación de cebador de ADN se separa después de la secuencia objetivo mediante el uso de una enzima que degrada de manera selectiva la secuencia objetivo (p.ej., actividad de ARNasa H). Véase la FIG. 1, Etapa 4.

A continuación, el primer producto de prolongación de cebador de ADN se trata con un oligonucleótido promotor que tiene una secuencia de hibridación y un promotor para una ARN polimerasa situado en 5' respecto de la secuencia de hibridación. La secuencia de hibridación hibrida a una región del primer producto de prolongación de cebador de ADN que es complementaria al extremo 3' de la secuencia objetivo, por lo que se forma un híbrido oligonucleótido promotor:primer producto de prolongación de cebador de ADN. En la reacción ilustrada, el oligonucleótido promotor se modifica para impedir la iniciación de la síntesis de ADN, preferiblemente situando un resto bloqueante en el extremo 3' del oligonucleótido promotor (p.ej., una secuencia de nucleótidos que tiene una orientación 3'-a-5'). Véase la FIG. 1, Etapa 5. El extremo 3' del primer producto de prolongación de cebador de ADN se prolonga preferiblemente para añadir una secuencia complementaria al promotor, lo que da como resultado la formación de una secuencia promotora bicatenaria. Véase la FIG. 1, Etapas 6 y 7. Después se transcriben múltiples copias de un primer producto de ARN complementario a al menos una parte del primer producto de prolongación de cebador de ADN, que no incluye la porción del promotor, mediante el uso de una ARN polimerasa que reconoce el promotor bicatenario y que inicia la transcripción a partir de él. Véase la FIG. 1, Etapas 8 y 9. Como resultado, la secuencia de bases del primer producto de ARN es sustancialmente idéntica a la secuencia de bases de la secuencia objetivo y el complemento de la secuencia marcadora.

Los primeros productos de ARN se tratan con un oligonucleótido de cebado que hibrida al complemento de la secuencia marcadora para formar un híbrido oligonucleótido de cebado:primer producto de ARN, y el extremo 3' del oligonucleótido de cebado se prolonga con la ADN polimerasa para producir un segundo producto de prolongación de cebador de ADN complementario al primer producto de ARN. Véase la FIG. 1, Etapas 10-12. El segundo producto de prolongación de cebador de ADN se separa después del primer producto de ARN mediante el uso de una enzima que degrada de manera selectiva el primer producto de ARN (p.ej., actividad de ARNasa H). Véase la FIG. 1, Etapa 13.

El segundo producto de prolongación de cebador de ADN se trata con el oligonucleótido promotor, que hibrida al extremo 3' del segundo producto de prolongación de cebador de ADN para formar un híbrido oligonucleótido promotor:segundo producto de prolongación de cebador de ADN. Véase la FIG. 1, Etapa 14. El híbrido oligonucleótido promotor:segundo producto de prolongación de cebador de ADN vuelve a entrar después en el ciclo de amplificación en la Etapa 6 de la FIG. 1, en el que se inicia la transcripción a partir del promotor bicatenario y el ciclo continúa.

La FIG. 3 ilustra una adaptación de una reacción de amplificación isotérmica, basada en la transcripción, denominada amplificación mediada por la transcripción (TMA), diversos aspectos de la cual se describen en Kacian *et al.*, pat. de EE.UU. n°s 5.399.491 y 5.824.518. La reacción de esta realización

ilustrativa se inicia tratando una secuencia objetivo de ARN de una muestra de ácido nucleico con un oligonucleótido promotor marcado. El oligonucleótido promotor marcado incluye una secuencia marcadora, una secuencia de hibridación al objetivo y una secuencia promotora para una ARN polimerasa, en la que la secuencia de hibridación al objetivo hibrida a un extremo 3' de la secuencia objetivo. Así, la secuencia objetivo forma un complejo estable con el oligonucleótido promotor marcado en el extremo 3' de la secuencia objetivo antes de iniciar una reacción de prolongación de cebador. Véase la FIG. 3, Etapa 1. La secuencia promotora está situada en 5' respecto de la secuencia marcadora, y la secuencia marcadora está situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación al objetivo. Se hace que el oligonucleótido promotor marcado sin hibridar no esté disponible para la hibridación a la secuencia objetivo antes de iniciar una reacción de prolongación de cebador con el oligonucleótido de cebado marcado, preferiblemente inactivando y/o eliminando el oligonucleótido de cebado marcado sin hibridar de la muestra de ácido nucleico.

Después se inicia una reacción de prolongación a partir del extremo 3' del oligonucleótido promotor marcado con una ADN polimerasa, p.ej., transcriptasa inversa, para producir un primer producto de prolongación de cebador de ADN que incluye la secuencia marcadora y la secuencia promotora y una región complementaria a la secuencia objetivo. Véase la FIG. 1, Etapas 2 y 3. El primer producto de prolongación de cebador de ADN se separa después de la secuencia objetivo a la que está hibridado mediante el uso de una enzima que degrada de manera selectiva esa parte de la secuencia objetivo que hibrida al primer producto de prolongación de cebador de ADN (p.ej., actividad de ARNasa H). Véase la FIG. 3, Etapa 4.

A continuación, el primer producto de prolongación de cebador de ADN se trata con un oligonucleótido de cebado que hibrida a una región del primer producto de prolongación de cebador de ADN que es complementaria a un extremo 5' de la secuencia objetivo, por lo que se forma un híbrido oligonucleótido de cebado:primer producto de prolongación de cebador de ADN. Véase la FIG. 3, Etapa 5. El extremo 3' del oligonucleótido de cebado se prolonga mediante una ADN polimerasa para producir un segundo producto de prolongación de cebador de ADN complementario a al menos una parte del primer producto de prolongación de cebador de ADN, y que contiene una secuencia promotora bicatenaria. Véase la FIG. 3, Etapas 6 y 7. Este segundo producto de prolongación de cebador de ADN se usa como molde para transcribir múltiples copias de un primer producto de ARN complementario al segundo producto de prolongación de cebador de ADN, que no incluye la porción del promotor, mediante el uso de una ARN polimerasa que reconoce el promotor bicatenario e inicia la transcripción a partir de él. Véase la FIG. 3, Etapas 8 y 9. La secuencia de bases del primer producto de ARN es sustancialmente idéntica a la secuencia de bases de la secuencia marcadora y al complemento de la secuencia objetivo.

El primer producto de ARN se trata con el oligonucleótido de cebado, cuyo extremo 3' se prolonga mediante la ADN polimerasa para producir un tercer producto de prolongación de cebador de ADN complementario al primer producto de ARN. Véase la FIG. 3, Etapas 10-12. El tercer producto de prolongación de cebador de ADN se separa después del primer producto de ARN mediante el uso de una enzima que degrada de manera selectiva el primer producto de ARN (p.ej., actividad de ARNasa H). Véase la FIG. 3, Etapa 13. El tercer producto de prolongación de cebador de ADN se trata con un oligonucleótido promotor que tiene una secuencia de hibridación que hibrida a un complemento de la secuencia marcadora en el extremo 3' del tercer producto de prolongación de cebador de ADN, y además comprende un promotor para una ARN polimerasa que está situado en 5' respecto de la secuencia de hibridación. Véase la FIG. 3, Etapa 14. El extremo 3' del tercer producto de prolongación de cebador de ADN se prolonga para añadir una secuencia complementaria a la secuencia promotora. Véase la FIG. 3, Etapa 15. El extremo 3' del oligonucleótido promotor se prolonga con la ADN polimerasa para producir un cuarto producto de prolongación de cebador de ADN complementario al tercer producto de prolongación de cebador de ADN. Véase la FIG. 3, Etapa 16. Se transcriben múltiples copias de un segundo producto de ARN complementario al tercer producto de prolongación de cebador de ADN, que no incluyen la porción del promotor, a partir del promotor bicatenario y vuelven a entrar en el ciclo de amplificación en la Etapa 9 de la FIG. 3. La secuencia de bases del segundo producto de ARN es sustancialmente idéntica a la secuencia de bases de la secuencia marcadora y al complemento de la secuencia objetivo.

La FIG. 5 ilustra una adaptación de una reacción de amplificación de rTMA para amplificar una secuencia objetivo de ADN, diversos aspectos de la cual se describen en Becker *et al.*, sol. de pat. de EE.UU. de nº de serie 11/681.104. La reacción de esta realización ilustrativa se inicia tratando una secuencia objetivo de ADN de una muestra de ácido nucleico con un oligonucleótido de cebado marcado y un oligonucleótido de terminación. El oligonucleótido de cebado marcado incluye una secuencia de hibridación al objetivo hibridada a un extremo 3' de la secuencia objetivo y una secuencia marcadora situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación al objetivo. La secuencia de hibridación al objetivo hibrida preferiblemente a una forma monocatenaria de la secuencia objetivo, aunque puede hibridar a una forma bicatenaria de la secuencia objetivo por medio de la invasión de la cadena, que se puede facilitar, por ejemplo, mediante la desnaturalización parcial local del ADN (p.ej., regiones ricas en AT), condiciones de salinidad baja, y/o el uso de DMSO y/o osmolitos, tales como betaína. La secuencia objetivo preferiblemente se hace monocatenaria calentando la muestra de ácido nucleico. El oligonucleótido de terminación hibrida a una región de un ácido nucleico objetivo que contiene la secuencia objetivo cerca

del extremo 5' de la secuencia objetivo. El oligonucleótido de terminación se usa para finalizar la prolongación del cebador de un ácido nucleico naciente que incluye el oligonucleótido de cebado marcado. Así, el ácido nucleico objetivo forma un complejo estable con el oligonucleótido de cebado marcado en el extremo 3' de la secuencia objetivo y el oligonucleótido de terminación localizado en posición adyacente o cercana al extremo 5' de la secuencia objetivo. Véase la FIG. 5, Etapas 1-3. Se hace que el oligonucleótido de cebado marcado sin hibridar no esté disponible para la hibridación a la secuencia objetivo antes de iniciar una reacción de prolongación de cebador con el oligonucleótido de cebado marcado, preferiblemente inactivando y/o eliminando el oligonucleótido de cebado marcado sin hibridar de la muestra de ácido nucleico.

Después se inicia una reacción de prolongación a partir del extremo 3' del oligonucleótido de cebado marcado con una ADN polimerasa, p.ej., transcriptasa inversa, para producir un primer producto de prolongación de cebador de ADN que incluye la secuencia marcadora y una región complementaria a la secuencia objetivo. Véase la FIG. 5, Etapas 4 y 5.

La muestra de ácido nucleico se trata posteriormente con un oligonucleótido desplazador que hibrida al ácido nucleico objetivo en posición 5' del oligonucleótido marcado de manera que se puede iniciar una reacción de prolongación de cebador a partir de él, de forma que el primer producto de prolongación de cebador de ADN se desplaza cuando el extremo 3' del oligonucleótido desplazador es prolongado por la ADN polimerasa. Véase la FIG. 5, Etapas 6-8. El orden de las etapas ilustradas no pretende implicar que la muestra de ácido nucleico de esta realización se deba tratar con el oligonucleótido de cebado marcado antes de tratarla con el oligonucleótido desplazador para que sea operativa. En ciertas realizaciones, es preferible hacer que estos dos oligonucleótidos hibriden al ácido nucleico objetivo de una manera sustancialmente simultánea.

A continuación, el primer producto de prolongación de cebador de ADN se trata con un oligonucleótido promotor que tiene una secuencia de hibridación y un promotor para una ARN polimerasa situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación. La secuencia de hibridación hibrida a una región del primer producto de prolongación de cebador de ADN que es complementaria al extremo 3' de la secuencia objetivo, por lo que se forma un híbrido oligonucleótido promotor:primer producto de prolongación de cebador de ADN. En la reacción ilustrada, el oligonucleótido promotor se modifica para impedir la iniciación de la síntesis de ADN situando un resto bloqueante en el extremo 3' del oligonucleótido promotor (p.ej., una secuencia de nucleótidos que tiene una orientación 3'-a-5'). Véase la FIG. 5, Etapa 9. El extremo 3' del primer producto de prolongación de cebador de ADN se prolonga para añadir secuencias complementarias al promotor, lo que da como resultado la formación de una secuencia promotora bicatenaria. Véase la FIG. 5, Etapas 10 y 11. Se transcriben múltiples copias de un primer producto de ARN complementario a al menos una parte del primer producto de prolongación de cebador de ADN, que no incluyen el promotor, mediante el uso de una ARN polimerasa que reconoce el promotor bicatenario e inicia la transcripción a partir de él. Véase la FIG. 5, Etapa 12 y 13. Como resultado, la secuencia de bases del primer producto de ARN es sustancialmente idéntica a la secuencia de bases de la secuencia objetivo y el complemento de la secuencia marcadora.

Los primeros productos de ARN se ponen en contacto con un oligonucleótido de cebado que hibrida al complemento de la secuencia marcadora para formar un híbrido oligonucleótido de cebado:primer producto de ARN, y el extremo 3' del oligonucleótido de cebado se prolonga con la ADN polimerasa para producir un segundo producto de prolongación de cebador de ADN complementario al primer producto de ARN. Véase la FIG. 5, Etapa 14-16. El segundo producto de prolongación de cebador de ADN se separa del primer producto de ARN mediante el uso de una enzima que degrada de manera selectiva el primer producto de ARN (p.ej., actividad de ARNasa H). Véase la FIG. 5, Etapa 17.

El segundo producto de prolongación de cebador de ADN se trata con el oligonucleótido promotor para formar un híbrido oligonucleótido promotor:segundo producto de prolongación de cebador de ADN. Véase la FIG. 5, Etapa 18. El híbrido oligonucleótido promotor:segundo producto de prolongación de cebador vuelve a entrar después en el ciclo de amplificación en la Etapa 10 de la FIG. 5, en el que se inicia la transcripción a partir del promotor bicatenario y el ciclo continúa.

La FIG. 7 ilustra una adaptación de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), diversos aspectos de la cual se describen, por ejemplo, en Mullis *et al.*, pat. de EE.UU. n°s 4.683.195 y 4.800.159; Mullis, pat. de EE.UU. n° 4.682.202; y Gelfand *et al.*, pat. de EE.UU. n° 5.804.375. La reacción de esta realización ilustrativa se inicia tratando una secuencia objetivo de ADN desnaturalizada de una muestra de ácido nucleico con un oligonucleótido de cebado marcado. El oligonucleótido de cebado marcado incluye una secuencia de hibridación al objetivo que hibrida a un extremo 3' de la secuencia objetivo y una secuencia marcadora situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación al objetivo. Así, la secuencia objetivo forma un complejo estable con el oligonucleótido de cebado marcado en el extremo 3' de la secuencia objetivo antes de iniciar una reacción de prolongación de cebador. Véase la FIG. 7, Etapas 1-3. Se hace que el oligonucleótido de cebado marcado sin hibridar no esté disponible para la hibridación a la secuencia objetivo antes de iniciar una reacción de prolongación de cebador con el oligonucleótido de

cebado marcado, preferiblemente inactivando y/o eliminando el oligonucleótido de cebado marcado sin hibridar de la muestra de ácido nucleico.

5 Después se inicia una reacción de prolongación a partir del extremo 3' del oligonucleótido de cebado marcado con una ADN polimerasa, p.ej., ADN polimerasa *Taq*, para producir un primer producto de prolongación de cebador de ADN que incluye la secuencia marcadora y una región complementaria a la secuencia objetivo. Véase la FIG. 7, Etapas 4 y 5. A continuación, el producto bicatenario resultante de la primera reacción de prolongación de cebador se desnaturaliza, y el primer producto de prolongación de cebador de ADN se pone en contacto con un primer oligonucleótido de cebado que hibrida a una región del primer producto de prolongación de cebador de ADN que es complementaria al extremo 5' de la secuencia objetivo. Véase la FIG. 7, Etapas 6 y 7.

15 En una segunda reacción de prolongación de cebador, el extremo 3' del primer oligonucleótido de cebado se prolonga con la ADN polimerasa para producir un segundo producto de prolongación de cebador de ADN que es complementario a una parte del primer producto de prolongación de cebador y que incluye la secuencia objetivo y el complemento de la secuencia marcadora. Véase la FIG. 7, Etapas 8 y 9. El producto bicatenario resultante de la segunda reacción de prolongación de cebador se desnaturaliza, y el segundo producto de prolongación de cebador de ADN se pone en contacto con un segundo oligonucleótido de cebado que hibrida al complemento de la secuencia marcadora. Véase la FIG. 7, Etapas 10 y 11.

20 El extremo 3' del segundo oligonucleótido de cebado se prolonga después en una tercera reacción de prolongación de cebador con la ADN polimerasa para producir un tercer producto de prolongación de cebador de ADN que es complementario al segundo producto de prolongación de cebador de ADN. Véase la FIG. 7, Etapas 12 y 13. El producto bicatenario resultante de la tercera reacción de prolongación de cebador se desnaturaliza, y el segundo y el tercer productos de prolongación de cebador de ADN están disponibles para la participación en los ciclos repetidos de una reacción en cadena de la polimerasa mediante el uso como cebadores del primer y segundo oligonucleótidos de cebado. Véase la FIG. 7, Etapas 14-16.

30 La FIG. 9 ilustra una adaptación de una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), diversos aspectos de la cual se describen, por ejemplo, en Gelfand et. al., pat. de EE.UU. n°s 5.322.770 y 5.310.652. La reacción de esta realización ilustrativa se inicia tratando una secuencia objetivo de ARN en una muestra de ácido nucleico con un oligonucleótido de cebado marcado. El oligonucleótido de cebado marcado incluye una secuencia de hibridación al objetivo y una secuencia marcadora situada en 5' respecto de la secuencia de hibridación al objetivo. Así, la secuencia objetivo forma un complejo estable con el oligonucleótido de cebado marcado en el extremo 3' de la secuencia objetivo antes de iniciar una reacción de prolongación de cebador. Véase la FIG. 9, Etapa 1. Se hace que el oligonucleótido de cebado marcado sin hibridar no esté disponible para la hibridación a la secuencia objetivo antes de iniciar una reacción de prolongación de cebador con el oligonucleótido de cebado marcado, preferiblemente inactivando y/o eliminando el oligonucleótido de cebado marcado sin hibridar de la muestra de ácido nucleico.

40 Después se inicia una reacción de prolongación a partir del extremo 3' del oligonucleótido de cebado marcado con una ADN polimerasa, p.ej., ADN polimerasa MasterAmp™ *Tth*, para producir un primer producto de prolongación de cebador de ADN que incluye la secuencia marcadora y una región complementaria a la secuencia objetivo. Véase la FIG. 9, Etapas 2 y 3. El primer producto de prolongación de cebador de ADN se separa después de la secuencia de ácido nucleico objetivo a la que se hibrida mediante el uso de una enzima que degrada selectivamente esa parte del ácido nucleico objetivo que contiene la secuencia objetivo que es complementaria al primer producto de prolongación de cebador de ADN (p.ej., actividad de ARNasa H). Véase la FIG. 9, Etapa 4.

50 A continuación, el primer producto de prolongación de cebador de ADN se trata con un primer oligonucleótido de cebado que hibrida a una región del primer producto de prolongación de cebador de ADN que es complementario al extremo 5' de la secuencia objetivo para formar un híbrido primer producto de prolongación de cebador de ADN:primer oligonucleótido de cebado. Véase la FIG. 9, Etapa 5. Una segunda reacción de prolongación de cebador prolonga el extremo 3' del primer oligonucleótido de cebado con la ADN polimerasa para producir un segundo producto de prolongación de cebador de ADN complementario a al menos una parte del primer producto de prolongación de cebador e incluye la secuencia objetivo y el complemento de la secuencia marcadora. Véase la FIG. 9, Etapas 6 y 7. El primer y el segundo productos de prolongación de cebador de ADN se separan después el uno del otro mediante desnaturalización. Véase la FIG. 9, Etapa 8. El primer y el segundo productos de prolongación están disponibles después para participar en los ciclos repetidos de una reacción en cadena de la polimerasa mediante el uso como cebadores del primer oligonucleótido de cebado y un segundo oligonucleótido de cebado que hibrida al complemento de la secuencia marcadora. Véase la FIG. 9, Etapas 9 y 10; FIG. 7, Etapas 13-16.

En otras realizaciones ilustrativas de la presente descripción, una secuencia marcadora heteróloga que no ha formado parte de una secuencia de ácido nucleico objetivo marcada se inactiva antes de exponer la secuencia de ácido nucleico objetivo marcada a reactivos y condiciones suficientes para la amplificación detectable de una secuencia de ácido nucleico objetivo. En un aspecto preferido, la secuencia marcadora heteróloga inactivada está en forma de un oligonucleótido marcado que no se hibridó a la secuencia de ácido nucleico objetivo. Los oligonucleótidos marcados se describieron anteriormente, e incluyen primeras y segundas regiones, en las que la primera región comprende una secuencia de hibridación al objetivo que hibrida a un extremo 3' de una secuencia de ácido nucleico objetivo en un primer conjunto de condiciones, y la segunda región comprende una secuencia marcadora que está localizada en 5' respecto de la primera región del oligonucleótido marcado. La secuencia de hibridación al objetivo tiene un grupo hidroxilo libre en 3' que se puede prolongar enzimáticamente en presencia de una ADN polimerasa de una manera dependiente del molde. El oligonucleótido marcado tiene una conformación "activa" que permite que la secuencia de hibridación al objetivo hibride a la secuencia de ácido nucleico objetivo y una conformación "inactiva" que bloquea que la secuencia de hibridación al objetivo hibride a la secuencia de ácido nucleico objetivo. La conformación inactiva se forma generalmente en condiciones menos rigurosas que las condiciones para la formación de la conformación activa del oligonucleótido marcado.

La conformación inactiva del oligonucleótido marcado se puede formar hibridando una secuencia de cierre del marcador a la secuencia de hibridación al objetivo del oligonucleótido marcado. La secuencia de cierre del marcador puede constituir una molécula discreta o puede estar unida al oligonucleótido marcado mediante un espaciador que une el extremo 3' o el extremo 5' de la secuencia de cierre del marcador al extremo 5' de una región del oligonucleótido marcado que contiene una secuencia marcadora ("oligonucleótido de cebado marcado") o una secuencia promotora localizada en 5' respecto de una secuencia marcadora ("oligonucleótido promotor marcado"), por lo que se forma una molécula marcadora en horquilla auto-hibridada que comprende el oligonucleótido marcado. El espaciador no incluye bases nucleotídicas que puedan ser copiadas por una polimerasa, y es preferiblemente un espaciador no nucleotídico que comprende constituyentes que no son nucleotídicos. Los espaciadores no nucleotídicos adecuados para unir la secuencia de cierre del marcador al oligonucleótido marcado incluyen nucleótidos abásicos y polietilen glicol. Otros espaciadores adecuados incluyen análogos de nucleótidos, tales como LNAs y 2'-O-Me. La cinética de la asociación es la mejor cuando la secuencia de cierre del marcador y la secuencia de hibridación al objetivo del oligonucleótido marcado están contenidas en la misma molécula.

En condiciones selectivas, la secuencia de cierre del marcador puede hibridar a la secuencia de hibridación al objetivo del oligonucleótido marcado en una orientación antiparalela, como se muestra en las Figuras 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 15 y 16, o en una orientación paralela, como se muestra en las Figuras 13 y 14. Si la secuencia de cierre del marcador es una molécula discreta, como se ilustra en las Figuras 11 y 12, o está unida al oligonucleótido marcado mediante un espaciador no nucleotídico unido a su extremo 5', como se ilustra en las Figuras 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 16, la secuencia de cierre del marcador se modifica preferiblemente para impedir la prolongación de cebadores por una ADN polimerasa, tal como colocando un resto bloqueante en su extremo 3'. Los restos bloqueantes adecuados se describen en la presente memoria. Cuando se hibrida en una orientación antiparalela, como se ilustra en las Figuras 13 y 14, la base 3'-terminal de la secuencia de cierre del marcador se hibrida preferiblemente a la base 3'-terminal de la secuencia de hibridación al objetivo del oligonucleótido marcado. Más preferiblemente, la secuencia de cierre del marcador se modifica para impedir la prolongación del cebador por una ADN polimerasa.

La longitud y el contenido de bases de la secuencia de cierre del marcador se seleccionan de manera que la hibridación del oligonucleótido marcado a la secuencia de ácido nucleico objetivo se favorece en un primer conjunto de condiciones, y cuando el oligonucleótido marcado no está hibridado a la secuencia de ácido nucleico objetivo, de manera que la secuencia de cierre del marcador puede formar un híbrido estable con la secuencia de hibridación al objetivo en un segundo conjunto de condiciones menos rigurosas. Se debería seleccionar la secuencia de cierre del marcador de manera que no se desplace fácilmente de la secuencia de hibridación al objetivo en las condiciones de amplificación a las que puede estar sometida. En general, la secuencia de cierre del marcador hibridará con 5 a 20 bases contiguas o no contiguas de la secuencia de hibridación al objetivo. Las secuencias de cierre del marcador adecuadas preferiblemente oscilan en una longitud de 5 a 15 bases. Para favorecer la secuencia de hibridación al objetivo hacia el ácido nucleico objetivo en el primer conjunto de condiciones, la secuencia de cierre del marcador puede incluir, por ejemplo, uno o más nucleótidos abásicos, emparejamientos incorrectos de bases o miembros de pares de bases que no son canónicos. Las secuencias de cierre del marcador se seleccionan preferiblemente para que hibriden de manera específica a la secuencia de hibridación al objetivo más intensamente que cualquier interacción inespecífica con otros ácidos nucleicos presentes en una reacción de amplificación.

Tras la inactivación, los oligonucleótidos marcados inactivos se eliminan preferiblemente de la muestra para limitar las interacciones no intencionadas con secuencias de ácidos nucleicos objetivo que se introduzcan en la muestra a partir de una fuente potencialmente contaminante. La eliminación se puede llevar a cabo inmovilizando los ácidos nucleicos objetivo en una muestra con un soporte sólido, y

después eliminando otros componentes de la muestra, lo que incluye los oligonucleótidos marcados inactivados. Para asegurar que se eliminan los oligonucleótidos marcados inactivos, se debería limitar el número de interacciones inespecíficas entre el soporte sólido y los ácidos nucleicos presentes en la muestra. Se puede usar cualquier soporte sólido conocido para el procesamiento de la muestra, tal como

5

Las técnicas de amplificación especialmente preferidas para incorporar los oligonucleótidos marcados de la presente invención incluyen las reacciones de amplificación isotérmicas, tales como TMA y las variaciones de TMA, como TMA en tiempo real, que incorpora una o más características de los métodos descritos por Becker *et al.*, pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° US 2006-0046265 A1, y Becker *et al.*, sol. de pat. de EE.UU. de n° de serie 11/681.104. Por ejemplo, ciertos métodos preferidos de TMA en tiempo real incluyen el uso de restos bloqueantes, restos de terminación, y/o otros restos modificantes que proporcionan una sensibilidad y exactitud mejoradas al procedimiento de TMA.

10

15

Los oligonucleótidos promotores se pueden modificar para impedir la síntesis de ADN a partir de ellos. Por ejemplo, un oligonucleótido promotor puede comprender un resto bloqueante unido a su extremo 3' para impedir la prolongación del cebador en presencia de una polimerasa. En un ejemplo, al menos alrededor del 80% de los oligonucleótidos presentes en la reacción de amplificación que comprenden un promotor comprenden además un resto bloqueante en 3'. En otra realización, al menos alrededor del 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los oligonucleótidos proporcionados a la reacción de amplificación que comprenden un promotor están modificados adicionalmente para que comprendan un resto bloqueante en 3'. En otra realización, cualquier oligonucleótido usado en una reacción de amplificación de la presente descripción que comprende una secuencia promotora comprende además un resto bloqueante en el extremo 3'.

20

25

Ciertas realizaciones de la presente descripción se refieren a la amplificación de un ácido nucleico objetivo que comprende una secuencia objetivo de ARN. En algunos casos, el ácido nucleico objetivo tiene extremos 3' y 5' indeterminados respecto de la secuencia objetivo de ARN deseada. El ácido nucleico objetivo se trata con un oligonucleótido de cebado que tiene una región de bases lo suficientemente complementaria a un extremo 3' de la secuencia objetivo de ARN como para hibridar con él y, como se discutió anteriormente, comprende además una secuencia marcadora heteróloga en la primera reacción de prolongación de cebador. Los oligonucleótidos de cebado se diseñan para hibridar a una región adecuada de cualquier secuencia objetivo deseada, según los métodos de diseño de cebadores conocidos para las personas de experiencia habitual en la técnica. Aunque la presencia de la secuencia marcadora en un oligonucleótido de cebado puede alterar las características de unión de una región de hibridación al objetivo a una secuencia de ácido nucleico objetivo, el técnico experto en las técnicas moleculares puede diseñar fácilmente oligonucleótidos de cebado que contienen tanto regiones de hibridación al objetivo como secuencias marcadoras que se pueden usar de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. Los oligonucleótidos de cebado adecuados se describen con más detalle en la presente memoria. Además, el extremo 5' de un oligonucleótido de cebado (preferiblemente no un oligonucleótido de cebado marcado) pueden incluir una o más modificaciones que mejoran las propiedades de unión (p.ej., hibridación o apilamiento de bases) del oligonucleótido de cebado a un producto de prolongación de ADN o a un producto de amplificación de ARN, como se discute con más detalle más adelante, con tal de que las modificaciones no interfieran sustancialmente con la función de cebado del oligonucleótido de cebado o con la escisión de un producto de amplificación de ARN al cual está hibridado el oligonucleótido de cebado. El extremo 3' del oligonucleótido de cebado se prolonga mediante una ADN polimerasa adecuada, p.ej., una ADN polimerasa dependiente de ARN ("transcriptasa inversa") en una reacción de prolongación mediante el uso de la secuencia objetivo de ARN o producto de amplificación como molde para proporcionar un producto de prolongación de cebador de ADN que es complementario al molde de ARN o producto de amplificación.

30

35

40

45

50

Los productos de prolongación de cebador de ADN se separan (al menos parcialmente) de un molde de ARN mediante el uso de una enzima que degrada el molde de ARN o producto de amplificación. Las enzimas adecuadas, es decir, las "ARNasas selectivas", son aquellas que actúan sobre la cadena de ARN de un complejo ARN:ADN, e incluyen las enzimas que comprenden una actividad de ARNasa H. Algunas transcriptasas inversas incluyen una actividad de ARNasa H, que incluyen las derivadas del virus de la leucemia murina de Moloney y el virus de mieloblastosis aviar. Según las realizaciones de amplificación preferidas, la ARNasa selectiva se puede proporcionar en forma de una actividad de ARNasa H de una transcriptasa inversa, o se puede proporcionar en forma de una enzima separada, p.ej., como una ARNasa H de *E. coli* o una ARNasa H de *T. thermophilus*. También se pueden usar otras enzimas que degradan selectivamente el ARN presente en una molécula bicatenaria ARN:ADN.

55

60

Cuando la secuencia objetivo es ADN, se puede separar un producto de prolongación de cebador de ADN del molde tratando el ácido nucleico objetivo con un oligonucleótido desplazador. El oligonucleótido desplazador tiene una función de cebado, y está diseñado para hibridar al ácido nucleico

objetivo en posición 5' del oligonucleótido de cebado (denominado "oligonucleótido de cebado directo" en esta realización). "En posición 5'" significa que el extremo 3' del oligonucleótido desplazador hibrida al ácido nucleico objetivo en posición 5' respecto del extremo 3' del oligonucleótido de cebado directo. Así, el oligonucleótido desplazador y el oligonucleótido de cebado directo pueden hibridar a regiones solapantes o diferentes del ácido nucleico objetivo. En las realizaciones preferidas, el extremo 3' del oligonucleótido desplazador está adyacente o espaciado hasta 5 a 35 bases del extremo 5' del oligonucleótido de cebado directo respecto del ácido nucleico objetivo (es decir, el ácido nucleico objetivo tiene hasta 5 a 35 nucleótidos contiguos sin unir situados entre la base 3'-terminal del oligonucleótido desplazador y la base 5'-terminal del oligonucleótido de cebado cuando ambos oligonucleótidos están hibridados al ácido nucleico objetivo). El oligonucleótido desplazador tiene generalmente una longitud de 10 a 50 nucleótidos y puede incluir una o más modificaciones en el extremo 5' que mejoran las propiedades de unión (p.ej., hibridación o apilamiento de bases) del oligonucleótido desplazador al ácido nucleico objetivo, con tal de que las modificaciones no interfieran sustancialmente con la función de cebado del oligonucleótido desplazador. El oligonucleótido desplazador y el oligonucleótido de cebado directo están diseñados para hibridar al ácido nucleico objetivo en las mismas condiciones. El ácido nucleico objetivo se trata preferiblemente con el oligonucleótido desplazador después de que el oligonucleótido de cebado directo haya tenido suficiente tiempo para hibridar al ácido nucleico objetivo. De manera alternativa, el ácido nucleico objetivo se trata con el oligonucleótido desplazador y el oligonucleótido de cebado directo antes de exponer a la mezcla a una polimerasa adecuada para prolongar el extremo 3' del oligonucleótido desplazador y el oligonucleótido de cebado directo. En presencia de la ADN polimerasa, el extremo 3' del oligonucleótido desplazador se prolonga de una manera dependiente del molde para formar un segundo producto de prolongación de cebador de ADN que desplaza el primer producto de prolongación de cebador de ADN del ácido nucleico objetivo, por lo que pasa a estar disponible para la hibridación a un oligonucleótido promotor. En una aproximación alternativa, se podrían establecer condiciones por las que el oligonucleótido promotor consigue tener acceso al primer producto de prolongación de cebador de ADN por medio de la invasión de la cadena facilitada, por ejemplo, por la desnaturalización parcial local del ADN (p.ej., regiones ricas en AT), condiciones de salinidad baja, y/o el uso de DMSO y/o osmolitos, tal como betaína. El oligonucleótido promotor de esta realización es el mismo que el descrito anteriormente y, de manera similar, se modifica para impedir que el oligonucleótido promotor funcione como un oligonucleótido de cebado para una ADN polimerasa (p.ej., el oligonucleótido promotor incluye un resto bloqueante en su extremo 3').

En ciertas realizaciones, los métodos de la presente invención comprenden además tratar el ácido nucleico objetivo como se describió anteriormente para limitar la longitud del producto de prolongación de cebador de ADN hasta una cierta longitud deseada. Tal limitación de la longitud se lleva a cabo en general por medio del uso de una "molécula de unión" que hibrida o que se une de otra manera al ácido nucleico objetivo de ARN adyacente o cercano al extremo 5' de la secuencia objetivo deseada. En ciertas realizaciones, una molécula de unión comprende una región de bases. La región de bases puede ser ADN, ARN, una molécula quimérica ADN:ARN, o un análogo de la misma. Las moléculas de unión que comprenden una región de bases se pueden modificar de una o más maneras, tal como se describe en otra parte en la presente memoria. Las moléculas de unión adecuadas incluyen, pero sin limitación, una molécula de unión que comprende un oligonucleótido de terminación o una proteína de terminación que se une al ARN e impide la prolongación del cebador más allá de su región de unión, o una molécula de unión que comprende una molécula modificadora, por ejemplo, un oligonucleótido modificador tal como un oligonucleótido de "digestión" que dirige la hidrólisis de esa parte del ARN objetivo hibridado al oligonucleótido de digestión, o una nucleasa específica de secuencia que corta el objetivo de ARN.

Los oligonucleótidos de terminación ilustrativos de la presente descripción tienen una región de bases en 5' lo suficientemente complementaria al ácido nucleico objetivo en una región en posición adyacente, o cercana, o solapante con el extremo 5' de la secuencia objetivo, como para hibridar con él. En ciertas realizaciones se sintetiza un oligonucleótido de terminación para que incluya uno o más nucleótidos modificados. Por ejemplo, ciertos oligonucleótidos de terminación comprenden uno o más 2'-O-ME ribonucleótidos, o están sintetizados completamente con 2'-O-ME ribonucleótidos. Véase, p.ej., Majlessi *et al.* (1998) *Nucleic Acids Res.*, 26, 2224-2229. Un oligonucleótido de terminación también comprende en general un resto bloqueante en su extremo 3' para impedir que el oligonucleótido de terminación funcione como cebador para una ADN polimerasa. En ciertas realizaciones, el extremo 5' de un oligonucleótido de terminación solapa y es complementario a al menos alrededor de 2 nucleótidos del extremo 5' de la secuencia objetivo. En general, el extremo 5' de un oligonucleótido de terminación de la presente invención solapa y es complementario a al menos 3, 4, 5, 6, 7, o 8 nucleótidos del extremo 5' de la secuencia objetivo, pero no más de alrededor de 10 nucleótidos del extremo 5' de la secuencia objetivo. (Tal como se usa en la presente memoria, el término "extremo" se refiere a una región de 5' o 3' de un oligonucleótido, ácido nucleico o región de ácido nucleico que incluye, respectivamente, la base 5'- o 3'-terminal del oligonucleótido, el ácido nucleico o la región de ácido nucleico). Los oligonucleótidos de terminación adecuados se describen con más detalle en la presente memoria.

Un producto de prolongación de cebador de ADN monocatenario, o "primer" producto de prolongación de cebador de ADN, que tiene un extremo 3' definido o un extremo 3' indeterminado, se trata

con un oligonucleótido promotor que comprende una primera región lo suficientemente complementaria a una región de 3' del producto de prolongación de cebador de ADN para hibridar con ella, una segunda región que comprende un promotor para una ARN polimerasa, p.ej., polimerasa de T7, que se sitúa en 5' respecto de la primera región, p.ej., inmediatamente en 5' respecto de o espaciado de la primera región, y modificado para impedir que el oligonucleótido promotor funcione como un cebador para una ADN polimerasa (p.ej., el oligonucleótido promotor incluye un resto bloqueante unido a su extremo 3'). Tras identificar una "primera región" de hibridación deseada, una persona de experiencia habitual en la técnica puede construir oligonucleótidos promotores adecuados mediante el uso solamente de procedimientos rutinarios. Las personas de experiencia habitual en la técnica entenderán fácilmente que una región promotora tiene ciertos nucleótidos que son necesarios para el reconocimiento por una ARN polimerasa dada. Además, ciertas variaciones de nucleótidos en una secuencia promotora podrían mejorar el funcionamiento del promotor con una enzima dada, lo que incluye el uso de secuencias de inserción.

Las secuencias de inserción se pueden colocar entre las primeras y segundas regiones de oligonucleótidos promotores y funcionar para incrementar las velocidades de amplificación. (La secuencia marcadora de un oligonucleótido promotor marcado puede proporcionar este efecto beneficioso). Las velocidades de amplificación mejoradas se pueden atribuir a varios factores. En primer lugar, debido a que una secuencia de inserción incrementa la distancia entre el extremo 3' y la secuencia promotora de un oligonucleótido promotor, es menos probable que una polimerasa, p.ej., transcriptasa inversa, unida al extremo 3' del oligonucleótido promotor interfiera con la unión de la ARN polimerasa a la secuencia promotora, por lo que se incrementa la velocidad a la que se puede iniciar la transcripción. En segundo lugar, la secuencia de inserción seleccionada puede mejorar ella misma la velocidad de la transcripción funcionando como un molde mejor para la transcripción que la secuencia objetivo. En tercer lugar, debido a que la ARN polimerasa iniciará la transcripción en la secuencia de inserción, el producto de prolongación de cebador sintetizado por el oligonucleótido de cebado, mediante el uso del producto de transcripción de ARN como molde, contendrá el complemento de la secuencia de inserción cerca del extremo 3' del producto de prolongación de cebador. Al proporcionar una región de unión al objetivo mayor, es decir, una que incluye el complemento de la secuencia de inserción, el oligonucleótido promotor se puede unir al producto de prolongación de cebador más rápido, por lo que conduce a la producción de productos de transcripción de ARN adicionales en menos tiempo. Las secuencias de inserción tienen preferiblemente una longitud de 5 a 20 nucleótidos, y se deberían diseñar para minimizar el plegamiento intramolecular y la unión intermolecular con otros oligonucleótidos presentes en la mezcla de reacción de amplificación. Los programas que ayudan a minimizar la estructura secundaria se conocen bien en la técnica, e incluyen el soporte informático *mfold* de Michael Zucker para predecir la estructura secundaria del ARN y ADN mediante el uso de reglas termodinámicas de vecinos más cercanos. La última versión del soporte informático *mfold* de Michael Zucker se puede obtener en la página de Internet www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold mediante el uso de un protocolo de transferencia de hipertexto (http) en la URL. Las secuencias de inserción útiles se pueden identificar mediante el uso de métodos de selección *in vitro* muy conocidos en la técnica sin acometer más que experimentación rutinaria.

El técnico experto lleva a cabo fácilmente el ensayo de oligonucleótidos promotores con las variaciones de las secuencias promotoras mediante el uso de métodos rutinarios. Además, si se desea utilizar una ARN polimerasa diferente, la secuencia promotora en el oligonucleótido promotor se sustituye fácilmente por un promotor diferente. La sustitución de las secuencias promotoras diferentes entra dentro del conocimiento y la capacidad de las personas de experiencia habitual en la técnica. Para la TMA en tiempo real, los oligonucleótidos promotores proporcionados a la mezcla de reacción de amplificación se modifican para impedir la iniciación eficaz de la síntesis de ADN a partir de sus extremos 3', y preferiblemente comprenden un resto bloqueante unido a sus extremos 3'. Además, los oligonucleótidos de terminación y los oligonucleótidos protectores, e incluso las sondas usadas en ciertas realizaciones también comprenden opcionalmente un resto bloqueante unido a sus extremos 3'.

Cuando se usa un oligonucleótido de terminación, la primera región del oligonucleótido promotor se diseña para que hibride a un extremo 3' deseado del producto de prolongación de cebador de ADN con precisión sustancial, pero no necesariamente exacta. Posteriormente, la segunda región del oligonucleótido promotor puede actuar como molde, lo que permite que el primer producto de prolongación de cebador de ADN se prolongue adicionalmente para añadir una región de bases complementaria a la segunda región del oligonucleótido promotor, es decir, la región que comprende la secuencia promotora, lo que hace que el promotor sea bicatenario. Una ARN polimerasa que reconoce el promotor se une a la secuencia promotora, e inicia la transcripción de múltiples copias de ARN complementarias al producto de prolongación de cebador de ADN, cuyas copias son sustancialmente idénticas a la secuencia objetivo. "Sustancialmente idénticas" significa que las múltiples copias de ARN pueden tener nucleótidos adicionales en 5' o 3' respecto de la secuencia objetivo, o pueden tener menos nucleótidos en 5' o 3' respecto de la secuencia objetivo, dependiendo de, p.ej., los límites de "la secuencia objetivo", el punto de iniciación de la transcripción, o si el oligonucleótido de cebado comprende nucleótidos adicionales en 5' de la región del cebador (p.ej., una "protección" unida como se describe en la presente memoria). Cuando la secuencia objetivo es ADN, la secuencia de las copias de ARN se describe en la presente memoria como "sustancialmente idéntica" a la secuencia objetivo. Se debe

entender, sin embargo, que una secuencia de ARN que tiene residuos de uridina en lugar de los residuos de timidina de la secuencia objetivo de ADN todavía tiene una secuencia "sustancialmente idéntica". Los transcritos de ARN así producidos pueden recircular automáticamente en el sistema anterior sin manipulación adicional. Así, esta reacción es autocatalítica. En aquellas realizaciones en las que no se use una molécula de unión u otro medio para terminar la reacción de prolongación de cebador, la primera región del oligonucleótido promotor se diseña para que hibride a una región seleccionada del primer producto de prolongación de cebador de ADN que se espera que esté en 5' respecto del extremo 3' del primer producto de prolongación de cebador de ADN, pero debido a que el extremo 3' del primer producto de prolongación de cebador de ADN es indeterminado, la región en la que el oligonucleótido promotor hibrida probablemente no será el extremo 3' real del primer producto de prolongación de cebador de ADN. Según esta realización, generalmente ocurre que al menos la base 3'-terminal del primer producto de prolongación de cebador de ADN no hibrida al oligonucleótido promotor. Así, según esta realización, probablemente el primer producto de prolongación de cebador de ADN no se prolongará adicionalmente para formar un promotor bicatenario.

La formación de una secuencia promotora bicatenaria por medio de la prolongación de un ácido nucleico molde no es necesaria para permitir la iniciación de la transcripción de ARN complementario al primer producto de prolongación de cebador de ADN. Los "primeros" productos de ARN resultantes son sustancialmente idénticos a la secuencia objetivo, que tiene un extremo 5' definido por el punto de iniciación de la transcripción, y un extremo 3' definido por el extremo 5' del primer producto de prolongación de cebador de ADN. Se produce un número suficiente de primeros productos de ARN para recircularse automáticamente en el sistema sin manipulación adicional. El oligonucleótido de cebado hibrida al extremo 3' de los primeros productos de ARN, y se prolonga mediante una ADN polimerasa para formar un segundo producto de prolongación de cebador de ADN. A diferencia del primer producto de prolongación de cebador de ADN formado sin el uso de un oligonucleótido de terminación u otra molécula de unión, el segundo producto de prolongación de cebador de ADN tiene un extremo 3' definido que es complementario a los extremos 5' de los primeros productos de ARN. El segundo producto de prolongación de cebador de ADN se separa (al menos parcialmente) del molde de ARN mediante el uso de una enzima que degrada de manera selectiva del molde de ARN. El segundo producto de prolongación de cebador de ADN monocatenario se trata después con un oligonucleótido promotor como se describió anteriormente, y la segunda región del oligonucleótido promotor actúa como un molde, lo que permite que el segundo producto de prolongación de cebador de ADN se prolongue adicionalmente para añadir una región de bases complementaria a la segunda región del oligonucleótido promotor, es decir, la región que comprende la secuencia promotora, lo que hace que el promotor sea bicatenario. Una ARN polimerasa que reconoce el promotor se une a la secuencia promotora, e inicia la transcripción de múltiples "segundos" productos de ARN complementarios al segundo producto de prolongación de cebador de ADN, y sustancialmente idénticos a la secuencia objetivo. Los segundos transcritos de ARN así producidos se recirculan automáticamente en el sistema anterior sin manipulación adicional. Así, esta reacción es autocatalítica.

En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, una vez que se identifica una región deseada para la secuencia objetivo, esa región se puede analizar para determinar dónde la degradación mediante ARNasa selectiva provocará de manera óptima cortes o eliminación de secciones de ARN de la molécula bicatenaria ARN:ADN. Se pueden llevar a cabo análisis para determinar el efecto de la degradación mediante ARNasa de la secuencia objetivo mediante la actividad de ARNasa H presente en la transcriptasa inversa AMV o transcriptasa inversa MMLV, mediante una enzima selectiva añadida de manera exógena con una actividad de ARNasa, p.ej., ARNasa H de *E. coli*, o enzimas selectivas con una actividad de ARNasa de otras fuentes, y mediante las combinaciones de las mismas. Tras tales análisis, se puede seleccionar el oligonucleótido de cebado de manera que hibride a una sección de ARN que no se degrada sustancialmente por la ARNasa selectiva presente en la mezcla de reacción, porque la degradación sustancial en el sitio de unión para el oligonucleótido de cebado podría inhibir la iniciación de la síntesis de ADN e impedir la prolongación óptima del cebador. En otras palabras, un oligonucleótido de cebado se selecciona generalmente para hibridar a una región del ácido nucleico objetivo de ARN o el complemento del ácido nucleico objetivo de ADN, localizado de manera que cuando el ARN se somete a degradación mediante ARNasa selectiva, no haya una degradación sustancial que podría impedir la formación del producto de prolongación de cebador.

A la inversa, el sitio de hibridación del oligonucleótido promotor se puede elegir de manera que se dé una degradación suficiente de la cadena de ADN para permitir la hibridación eficaz del oligonucleótido promotor a la cadena de ADN. Generalmente, solamente se eliminan porciones de ARN de la molécula bicatenaria ARN:ADN por medio de la degradación mediante ARNasa selectiva y, así, algunas partes de la cadena de ARN permanecerán en la molécula bicatenaria. La degradación mediante ARNasa selectiva en la cadena de ARN de un híbrido ARN:ADN da como resultado la disociación de trozos pequeños de ARN del híbrido. Las posiciones en las que se degrada de manera selectiva el ARN se pueden determinar por medio de análisis de hibridación habituales. Así, se puede seleccionar un oligonucleótido promotor que se unirá de manera más eficaz al ADN tras la degradación mediante

ARNasa selectiva, es decir, se unirá a áreas en las que se eliminan de manera selectiva fragmentos de ARN.

5 Los promotores o las secuencias promotoras adecuadas para la incorporación en los oligonucleótidos promotores usados en los métodos de la presente invención son secuencias de ácidos nucleicos (naturales, producidas de manera sintética o un producto de una digestión de restricción) que son reconocidas específicamente por una ARN polimerasa que reconoce y se une a esa secuencia e inicia el proceso de la transcripción, por la que se producen transcritos de ARN. Los promotores típicos, conocidos y útiles incluyen aquellos que son reconocidos por ciertas polimerasas de bacteriófagos, tales como los de bacteriófagos T3, T7, y SP6, y un promotor de *E. coli*. La secuencia puede incluir opcionalmente bases de nucleótidos que se prolongan más allá del sitio de reconocimiento concreto de la ARN polimerasa que pueden conferir una estabilidad o susceptibilidad añadida a los procesos de degradación o una eficacia de transcripción incrementada. Son especialmente adecuadas para su empleo las secuencias promotoras para las que hay una polimerasa conocida y disponible que es capaz de reconocer la secuencia de iniciación.

15 Las ADN polimerasas adecuadas para el uso de acuerdo con los métodos de la descripción incluyen las transcriptasas inversas. Las ADN polimerasas especialmente adecuadas incluyen la transcriptasa inversa AMV y transcriptasa inversa MMLV. Algunas de las transcriptasas inversas adecuadas para el uso en los métodos de la presente invención, tales como transcriptasas inversas AMV y MMLV, tienen una actividad de ARNasa H. De hecho, según ciertas realizaciones de la presente invención, la única actividad de ARNasa selectiva en la reacción de amplificación se proporciona mediante la transcriptasa inversa -- no se añade ninguna ARNasa selectiva adicional. Sin embargo, en ciertas situaciones puede ser útil también añadir una ARNasa exógena selectiva, tal como ARNasa H de *E. coli*. Aunque no es necesaria la adición de una ARNasa selectiva exógena, en ciertas condiciones, la actividad de ARNasa H presente, p.ej., en la transcriptasa inversa AMV se puede inhibir o inactivar mediante otros componentes presentes en la mezcla de reacción. En tales situaciones, puede ser deseable la adición de una ARNasa selectiva exógena. Por ejemplo, cuando hay presentes cantidades relativamente grandes de ADN heterólogo en la mezcla de reacción, se puede inhibir en cierta medida la actividad de ARNasa H nativa de la transcriptasa inversa AMV, y así se reduce el número de copias de la secuencia objetivo producida. En situaciones en las que el ácido nucleico objetivo comprende solamente una pequeña parte del ácido nucleico presente (p.ej., cuando la muestra contiene cantidades significativas de ADN y/o ARN heterólogo), es especialmente útil añadir una ARNasa exógena selectiva. Véase, p.ej., Kacian *et al*, pat. de EE.UU. nº 5.399.491.

35 Los productos de amplificación de ARN producidos mediante los métodos descritos anteriormente pueden servir como moldes para producir productos de amplificación adicionales relacionados con la secuencia objetivo por medio de los mecanismos anteriormente descritos. El sistema es autocatalítico, y la amplificación se da sin la necesidad de modificar o cambiar repetidamente las condiciones de reacción, tales como la temperatura, el pH, la fuerza iónica, y similares. Estos métodos no requieren un aparato termociclador caro, ni requieren varias adiciones de enzimas u otros reactivos durante el transcurso de una reacción de amplificación.

40 Como se indicó anteriormente, los métodos de la presente descripción son útiles en ensayos para detectar y/o cuantificar secuencias objetivo específicas de ácidos nucleicos en muestras clínicas, de agua, ambientales, industriales, de bebidas, alimentos, reservas de semillas y de otro tipo, o para producir un gran número de productos de amplificación de ARN a partir de una secuencia objetivo específica para una diversidad de usos. Por ejemplo, la presente invención es útil para cribar muestras clínicas (p.ej., sangre, orina, heces, saliva, semen, o líquido cefalorraquídeo), alimentos, agua, muestras de laboratorio y/o industriales, en busca de la presencia de ácidos nucleicos específicos, organismos específicos (p.ej., mediante el uso de oligonucleótidos específicos de especies) y/o clases específicas de organismos en aplicaciones tales como análisis de esterilidad (p.ej., mediante el uso de oligonucleótidos universales). La presente descripción se puede usar para detectar la presencia, por ejemplo, de virus, bacterias, hongos, o parásitos.

55 El producto de amplificación se puede detectar mediante cualquier medio convencional. Por ejemplo, el producto de amplificación se puede detectar mediante la hibridación con una sonda marcada de forma detectable y mediante la medida de los híbridos resultantes. Los criterios de diseño al seleccionar sondas para la detección de secuencias objetivo particulares se conocen bien en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Hogan *et al.*, "Methods for Making Oligonucleotide Probes for the Detection and/or Quantitation of Non-Viral Organisms", pat. de EE.UU. nº 6.150.517. Hogan enseña que las sondas deberían diseñarse para maximizar la homología hacia la(s) secuencia(s) objetivo y para minimizar la homología hacia posibles secuencias no objetivo. Para minimizar la estabilidad con secuencias no objetivo, Hogan indica que se deberían evitar las regiones ricas en guanina y citosina, que la sonda debería abarcar tantos emparejamientos incorrectos desestabilizantes como sea posible, y que se debería minimizar la longitud de la complementariedad perfecta a una secuencia no objetivo. Al contrario, se debería maximizar la estabilidad de la sonda con la(s) secuencia(s) objetivo, se deberían evitar las regiones ricas en adenina y timina, los híbridos sonda:objetivo se hacen terminar preferiblemente con

pares de bases de guanina y citosina, se debe evitar en general la auto-complementariedad extensa, y la temperatura de fusión de los híbridos sonda:objetivo debería ser alrededor de 2-10 °C mayor que la temperatura del ensayo.

5 En una realización particular, el producto de amplificación se puede ensayar mediante el ensayo de protección mediante hibridación ("HPA"), que implica hibridar una sonda oligonucleotídica quimioluminiscente a la secuencia objetivo, p.ej., una sonda marcada con éster de acridinio ("AE"), hidrolizar de manera selectiva el marcador quimioluminiscente presente en la sonda sin hibridar, y medir la quimioluminiscencia producida desde la sonda restante en un luminómetro. Véase, p.ej., Arnold *et al.*, "Homogenous Protection Assay", pat. de EE.UU. n° 5.283.174 y NORMAN C. NELSON ET AL.,
10 NONISOTOPIC PROBING, BLOTTING, AND SEQUENCING, cap. 17 (Larry J. Kricka ed., 2ª ed. 1995).

En las realizaciones adicionales, la presente descripción proporciona un estudio cuantitativo del proceso de amplificación en tiempo real mediante los métodos descritos en la presente memoria. El estudio de un proceso de amplificación en "tiempo real" implica determinar la cantidad de amplicón en la mezcla de reacción de manera continua o periódica durante la reacción de amplificación, y los valores
15 determinados se usan para calcular la cantidad de secuencia objetivo presente inicialmente en la muestra. Existe una diversidad de métodos para determinar la cantidad de secuencia objetivo presente en una muestra basándose en la amplificación en tiempo real. Éstos incluyen los descritos por Wittwer *et al.*, "Method for Quantification of an Analyte", pat. de EE.UU. n° 6.303.305, y Yokoyama *et al.*, "Method for Assaying Nucleic Acid", pat. de EE.UU. n° 6.541.205. Otro método para determinar la cantidad de secuencia objetivo presente inicialmente en una muestra, pero que no se basa en una amplificación en tiempo real, se describe en Ryder *et al.*, "Method for Determining Pre-Amplification Levels of a Nucleic Acid Target Sequence from Post-Amplification Levels of Product", pat. de EE.UU. n° 5.710.029. Los productos de amplificación se pueden detectar en tiempo real por medio del uso de diversas sondas auto-hibridantes, la mayoría de las cuales tienen una estructura tallo-bucle. Tales sondas auto-hibridantes se marcan de manera que emiten señales detectables de forma diferencial, dependiendo de si las sondas
20 están en un estado auto-hibridado o en un estado alterado por medio de la hibridación a una secuencia objetivo. A modo de ejemplo, las "antorchas moleculares" son un tipo de sonda auto-hibridante que incluyen diferentes regiones de auto-complementariedad (denominadas "dominio de unión al objetivo" y "dominio de cierre del objetivo") que están conectadas por una región de unión (p.ej., un espaciador no nucleotídico) y que hibridan entre sí en condiciones de ensayo de hibridación predeterminadas. En una realización preferida, las antorchas moleculares contienen regiones de bases monocatenarias en el dominio de unión al objetivo que tienen una longitud de 1 a alrededor de 20 bases y son accesibles para la hibridación a una secuencia objetivo presente en un producto de amplificación en condiciones de desplazamiento de la cadena. En condiciones de desplazamiento de la cadena, está favorecida la hibridación de las dos regiones complementarias (que pueden ser completamente o parcialmente complementarias) de la antorcha molecular, excepto por la presencia de la secuencia objetivo, que se unirá a la región monocatenaria presente en el dominio de unión al objetivo y desplazará todo o una parte del dominio de cierre del objetivo. El dominio de unión al objetivo y el dominio de cierre del objetivo de una antorcha molecular incluyen un marcador detectable o un par de marcadores interaccionantes (p.ej., agente luminescente/apagador) colocados de manera que se produce una señal diferente cuando la antorcha molecular está auto-hibridada y cuando la antorcha molecular se hibrida a la secuencia objetivo, por lo que se permite la detección de moléculas bicatenarias sonda:objetivo en una muestra de ensayo en presencia de antorchas moleculares sin hibridar. Las antorchas moleculares y una diversidad de tipos de pares de marcadores interaccionantes se describen en Becker *et al.*, "Molecular Torches", pat. de EE.UU. n° 6.534.274.
45

Otro ejemplo de sonda de detección que tiene auto-complementariedad es un "faro molecular". Los faros moleculares incluyen moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia complementaria al objetivo, un par de afinidad (o brazos de ácidos nucleicos) que mantienen la sonda en una conformación cerrada en ausencia de una secuencia objetivo presente en un producto de amplificación, y un par
50 marcador que interacciona cuando la sonda está en una conformación cerrada. La hibridación de la secuencia objetivo y la secuencia complementaria al objetivo separa los miembros del par de afinidad, por lo que se desplaza la sonda hasta una conformación abierta. El desplazamiento hasta la conformación abierta es detectable debido a la interacción reducida del par marcador, que puede ser, por ejemplo, un fluoróforo y un apagador (p.ej., DABCYL y EDANS). Los faros moleculares se describen en Tyagi *et al.*, "Detectably Labeled Dual Confirmation Oligonucleotide Probes, Assays and Kits", patente de EE.UU. n° 5.925.517, y Tyagi *et al.*, "Nucleic Acid Detection Probes Having Non-FRET Fluorescence Quenching and Kits and Assays Including Such Probes", patente de EE.UU. n° 6.150.097.
55

Las personas de experiencia habitual en la técnica conocen otras sondas auto-hibridantes. A modo de ejemplo, se podrían adaptar pares de unión a la sonda que tengan marcadores interaccionantes, tales como los descritos en Morrison, "Competitive Homogenous Assay", patente de EE.UU. n° 5.928.862 y Gelfand *et al.*, pat. de EE.UU. n° 5.804.375 para las reacciones de PCR, para el uso en la presente descripción. Los sistemas de detección adicionales incluyen "interruptores moleculares", como los descritos por Arnold *et al.*, "Oligonucleotides Comprising a Molecular Switch", pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° US 2005-0042638 A1. Y otras sondas, tales como las que comprenden colorantes intercalantes
60

y/o fluorocromos, podrían ser útiles para la detección de productos de amplificación en la presente descripción. Véase, p.ej., Ishiguro *et al.*, "Method of Detecting Specific Nucleic Acid Sequences", patente de EE.UU. n° 5.814.447.

5 En los métodos en los que la secuencia objetivo inicial y el producto de transcripción de ARN comparten el mismo sentido, puede ser deseable iniciar la amplificación antes de añadir la sonda para la detección en tiempo real. El añadir la sonda antes de iniciar una reacción de amplificación puede ralentizar la velocidad de amplificación, ya que la sonda que se une a la secuencia objetivo inicial se tiene que desplazar o eliminar de otra manera durante la etapa de prolongación de cebador para completar un producto de prolongación de cebador que tenga el complemento de la secuencia objetivo. La iniciación de la amplificación se determina mediante la adición de enzimas de amplificación (p.ej., una transcriptasa inversa y una ARN polimerasa).

15 Además de los métodos descritos en la presente memoria, la presente descripción se dirige a equipos que comprenden uno o más de los reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos de la presente descripción. Los equipos que comprenden diversos componentes usados para llevar a cabo la presente descripción se pueden configurar para el uso en cualquier procedimiento que requiera la amplificación de moléculas objetivo de ácidos nucleicos, y tales equipos se pueden adaptar para diversos usuarios finales. Los equipos adecuados se pueden preparar, por ejemplo, para el análisis microbiológico, el cribado de sangre, el diagnóstico de enfermedades, el análisis de agua, la comercialización de productos o el análisis de la esterilidad, el análisis ambiental o industrial, el análisis de alimentos o bebidas, o para el uso en laboratorios en general. Los equipos proporcionan uno o más de los componentes necesarios para llevar a cabo las amplificaciones de ácidos nucleicos según la invención. Los equipos pueden incluir reactivos adecuados para amplificar ácidos nucleicos a partir de un objetivo particular, o pueden incluir reactivos adecuados para amplificar múltiples objetivos. Los equipos pueden proporcionar además reactivos para la detección en tiempo real de uno o más objetivos de ácido nucleico en una única muestra, por ejemplo, una o más sondas auto-hibridantes como las descritas anteriormente. Los equipos pueden comprender un envase que puede estar compartimentado para recibir en un espacio reducido uno o más recipientes tales como viales, tubos de ensayo, pocillos, y similares. Preferiblemente, al menos uno de tales recipientes contiene uno o más componentes o una mezcla de componentes necesarios para llevar a cabo los métodos de amplificación de la presente invención.

30 Un equipo según una realización de la presente descripción puede incluir, por ejemplo, en uno o más recipientes, un oligonucleótido marcado, sólo o en combinación con un oligonucleótido de cierre del marcador o unido a una secuencia de cierre del marcador, una molécula de unión u otro medio para terminar una reacción de prolongación de cebador, y, opcionalmente, un oligonucleótido prolongador y/o un oligonucleótido protector. Si se usa la detección en tiempo real, el o los recipientes pueden incluir uno o más reactivos para la detección en tiempo real de al menos una secuencia objetivo de ácido nucleico en una única muestra, por ejemplo, una o más sondas auto-hibridantes como las descritas anteriormente. Otro recipiente puede contener un reactivo enzimático, tal como una ADN polimerasa termoestable para llevar a cabo una reacción de PCR o RT-PCR, o una mezcla de una transcriptasa inversa (con o sin actividad de ARNasa H), una ARN polimerasa, y opcionalmente una enzima ARNasa selectiva adicional para una reacción de amplificación basada en la transcripción. Estas enzimas se pueden proporcionar en forma concentrada o a la concentración de trabajo, normalmente en una forma que favorece la estabilidad enzimática. El reactivo enzimático se puede proporcionar también en forma liofilizada. Véase Shen *et al.*, "Stabilized Enzyme Compositions for Nucleic Acid Amplification", patente de EE.UU. n° 5.834.254. Otro u otros recipientes pueden contener un reactivo de amplificación en forma concentrada, p.ej., 10X, 50X, o 100X, o a la concentración de trabajo. Un reactivo de amplificación contendrá uno o más de los componentes necesarios para llevar a cabo la reacción de amplificación, p.ej., un tampón, MgCl₂, KCl, dNTPs, rNTPs, EDTA, agentes estabilizantes, etc. Ciertos componentes, p.ej., MgCl₂ y rNTPs, se pueden proporcionar por separado respecto de los componentes restantes, lo que permite al usuario final titular estos reactivos para conseguir reacciones de amplificación más optimizadas. Se pueden incluir otro u otros recipientes para la detección de los productos de amplificación, que incluyen una o más sondas oligonucleotídicas marcadas. Las sondas se pueden marcar de varias maneras alternativas, p.ej., con isótopos radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores nucleares, marcadores bioluminiscentes, colorantes intercalantes, o marcadores enzimáticos. En ciertas realizaciones, un equipo incluirá también uno o más recipientes que contienen uno o más ácidos nucleicos objetivo de control positivos y negativos, que se pueden utilizar en experimentos de amplificación para validar las amplificaciones de los ensayos llevados a cabo por el usuario final. En ciertos casos, uno o más de los reactivos enumerados anteriormente se pueden combinar con un control interno. Por supuesto, también es posible combinar uno o más de estos reactivos en un único tubo u otros recipientes. Los soportes adecuados para el uso con la descripción, p.ej., tubos de ensayo, unidades multi-tubo, placas multi-pocillo, etc., también se pueden suministrar con los equipos. Finalmente, un equipo de la presente invención puede incluir uno o más manuales de instrucción.

Los equipos pueden contener prácticamente cualquier combinación de los componentes expuestos anteriormente o descritos en otra parte en la presente memoria. Como reconocería un experto en la técnica, los componentes suministrados con los equipos de la invención variarán con el uso al que

se destinan los equipos, y el usuario final. Así, los equipos se pueden diseñar específicamente para llevar a cabo diversas funciones expuestas en esta solicitud, y los componentes de tales equipos variarán en consecuencia.

5 La presente descripción se dirige además a diversos oligonucleótidos que incluyen, por ejemplo, los oligonucleótidos específicos del objetivo ejemplificados más adelante. Se debe entender que los oligonucleótidos de la presente descripción pueden ser ADN, ARN, moléculas quiméricas ADN:ARN y los análogos de los mismos, y, en cualquier caso, se incluyen los equivalentes de ARN de los oligonucleótidos de ADN y los equivalentes de ADN de los oligonucleótidos de ARN.

10 Las sondas de detección pueden incluir, por ejemplo, un marcador de éster de acridinio, o regiones marcadas, auto-hibridantes que flanquean la secuencia que hibrida a la secuencia objetivo. En diversas realizaciones, estas sondas oligonucleotídicas marcadas se sintetizan opcionalmente o preferiblemente para que incluyan al menos un nucleótido modificado, p.ej., un 2'-O-ME ribonucleótido; o estas sondas oligonucleotídicas marcadas se sintetizan opcionalmente o preferiblemente completamente de nucleótidos modificados, p.ej., 2'-O-ME ribonucleótidos.

15 EJEMPLOS

A continuación se proporcionan ejemplos que ilustran ciertos aspectos y realizaciones de la invención.

20 A menos que se indique de otra manera, los oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados de los siguientes ejemplos se sintetizaron mediante el uso de la química de fosforamidita estándar, diversos métodos de los cuales se conocen bien en la técnica. Véase, p.ej., Carruthers *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.* 154, 287. A menos que se indique de otra manera en la presente memoria, los nucleótidos modificados fueron 2'-O-ME ribonucleótidos, que se usaron en la síntesis en forma de sus análogos de fosforamidita.

EJEMPLO 1

25 **AMPLIFICACIÓN SELECTIVA DE HCV MEDIANTE EL USO DE OLIGONUCLEÓTIDOS MARCADOS EN UNA REACCIÓN TMA EN TIEMPO REAL**

30 La serie de experimentos siguientes se llevaron a cabo para determinar si el uso de un oligonucleótido marcado para modificar una secuencia de ácido nucleico objetivo en una muestra de ácido nucleico de interés antes de una reacción de amplificación mediada por la transcripción permitiría la amplificación selectiva de la secuencia de ácido nucleico objetivo aportada por la muestra de ácido nucleico de interés, a la vez que no se amplificaría la secuencia de ácido nucleico objetivo aportada por fuentes distintas de la muestra de ácido nucleico de interés.

35 A continuación se exponen los reactivos y las condiciones del protocolo usadas en los experimentos llevados a cabo, así como una discusión de los resultados y las conclusiones de los experimentos.

I. OLIGONUCLEÓTIDOS

40 A menos que se indique de otra manera, los oligonucleótidos se sintetizaron mediante el uso de un sintetizador de ADN Expedite™ 8909 (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA) mediante el uso de la química de fosforamidita estándar. Véase, p.ej., Carruthers *et al.* (1987) *Meth. Enzymol.* 154, 287. Las secuencias son de 5'-a-3'. El resto bloqueante, si está presente, está en el extremo 3'.

1. Oligonucleótido de cebado marcado:

GTTTGTATGTCTGTTGCTATTATGTCTACAGGCATTGAGCGGGTTGATCCAAGAAAGGAC
(SEQ ID NO: 1); 12 pmol/reacción

2. Oligonucleótido de Cebado:

45 GTTTGTATGTCTGTTGCTATTAT (SEQ ID NO: 2); 12 pmol/reacción

3. Oligonucleótido Promotor:

ATTTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTTCTAGCCATGGCG
TTAGTATGAG (SEQ ID NO: 3); 12 pmol/reacción

50 Resto Bloqueante: Una unión 3'-a-3' preparada mediante el uso de 3'-dimetiltritol-N-benzoil-2'-desoxicitidina, 5'-succinil-alquilamino de cadena larga-CPG (Glen Research Corporation, Sterling, VA; n° de cat. 20-0102-01)

4. Oligonucleótido de Terminación:

AmUmGmGmCmUmAmGmAmCmGmCmUmUmUmCmUmGmCmGmUmGmA

mAmGmAm (SEQ ID NO: 4); 0,8 pmol/reacción

Resto Bloqueante: El mismo que el oligonucleótido promotor

5. Oligonucleótido Prolongador:

TGTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCG GGAGAGCCATA (SEQ ID NO: 5); 12 pmol/reacción

Resto Bloqueante: El mismo que el oligonucleótido promotor

6. Primera Sonda de Captura:

GmGmGmCmAmCmUmCmGmCmAmAmGmCmAmCmCmUmTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 6); 3 pmol/reacción

7. Segunda Sonda de Captura:

CmAmUmGmGmUmGmCmAmCmGmGmUmCmUmAmCmGmTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 7); 3 pmol/reacción

8. Sonda de Detección:

CmGmUmUmCmCmGmCmAmGmAmCmCmAmCmUmAmUm(Espaciador)GmAmAmCmGm
(SEQ ID NO: 8); 4 pmol/reacción

Tipo de Sonda: Antorcha molecular

Espaciador: 9-O-Dimetoxitritil-trietilén glicol, 1-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (Glen Research Corporation, Sterling, VA; n° de cat. 10-1909-90)

Marcador de 5': 6-Carboxifluoresceína (FAM) (BioGenex, San Ramon, CA; n° de cat. BGX-3008-01)

Marcador de 3': ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL) (Prime Synthesis, Inc., Aston, PA)

II. REACTIVOS Y OTRA INFORMACIÓN DEL PROTOCOLO

1. Reactivo de Amplificación. El "Reactivo de Amplificación" o "Reactivo AMP" consistió en tampón de base Trizma® 11,6 mM, tampón de hidrocloreto Trizma® 15 mM, MgCl₂ 25 mM, KCl₂ 23,3 mM, 3,33% (v/v) de glicerol, acetato de zinc 0,05 mM, dATP 0,76 mM, dCTP 0,76 mM, dGTP 0,76 mM, dTTP 0,76 mM, 0,02% (v/v) de conservante ProClin 300 (Supelco, Bellefonte, PA; n° de cat. 48126), ATP 6,0 mM, CTP 6,0 mM, GTP 6,0 mM, y UTP 6,0 mM, pH 7,81 a 8,0 a 22 °C.

2. Reactivo de Enzima. El "Reactivo de Enzima" consistió en N-acetil-L-cisteína 70 mM, 10% (v/v) de detergente TRITON® X-102, HEPES 16 mM, EDTA 3 mM, 0,05% (p/v) de azida sódica, tampón de base Trizma® 20 mM, KCl₂ 50 mM, 20% (v/v) de glicerol, trehalosa 165,6 mM, pH 7, y contenía 224 RTU/μL de transcriptasa inversa de virus de leucemia murina de Moloney ("MMLV") y 140 U/μL de ARN polimerasa de T7, en donde una unidad (es decir, RTU o U) de actividad se define como la síntesis y la liberación de 5,75 fmol de cADN en 15 minutos a 37 °C para la transcriptasa inversa de MMLV, y la producción de 5,0 fmol de transcrito de ARN en 20 minutos a 37 °C para la ARN polimerasa de T7.

3. Disolución de Lavado. La "Disolución de Lavado" consistió en HEPES 10 mM, NaOH 6,5 mM, EDTA 1 mM, 0,3% (v/v) de etanol, 0,02% (p/v) de metil parabeno, 0,01% (p/v) de propil parabeno, NaCl 150 mM, y 0,1% (p/v) de dodecil sulfato sódico, pH 7,5.

4. Medio de Transporte. El "Medio de Transporte" consistió en HEPES 150 mM, 8% (p/v) de lauril sulfato de litio, y sulfato amónico 100 mM, pH 7,5.

5. Reactivo de Captura del Objetivo. El "Reactivo de Captura del Objetivo" o "TCR" consistió en los componentes enumerados más adelante. Más adelante se describe información adicional sobre la formulación de esta mezcla en el Procedimiento del Reactivo de Captura del Objetivo (IIIA). Las concentraciones enumeradas representan las concentraciones finales de los componentes después de haber sido combinados con la disolución de partículas magnéticas. Las partículas magnéticas fueron partículas super-paramagnéticas Sera-MagTM MG-CM, modificadas con carboxilato (Seradyn, Inc.,

Indianapolis, IN; nº de cat. 24152105-050250), de 1 micra, unidas de manera covalente a oligo(dT)₁₄ modificado con amino en 5'. Los componentes de HEPES, hidróxido de litio, cloruro de litio, EDTA, lauril sulfato de litio y sulfato de amonio se introdujeron con el disolvente de TCR y el medio de transporte.

- Primera Sonda de Captura; 15,0 nM
- 5 Segunda Sonda de Captura; 15,0 nM
- Oligonucleótido de Cebado Marcado; 60,0 nM
- Oligonucleótido de Terminación; 4,0 nM
- HEPES, Ácido Libre, Dihidrato; 118,7 mM
- Hidróxido de Litio, Monohidrato; 98,9 mM
- 10 Cloruro de Litio, Pureza Elevada; 470,6 mM
- EDTA, Ácido Libre; 25,0 mM
- Lauril Sulfato de Litio; 110,2 mM
- Sulfato de Amonio; 37,5 mM
- Partículas Magnéticas Seradyn Poly dT14; 0,075 ug/uL
- 15 **6. Tampón de Transcripción.** El "Tampón de Transcripción" consistió en un 0,2% de lauril sulfato de litio.
- 7. Transcrito utilizado.** Transcrito de HCV.
- 8. Números de Producto de Ciertos Materiales o Equipos Utilizados.**
- Placa KingFisher™ (Thermo Labsystems, Franklin, MA; nº de cat. 97002540)
- 20 Placa de microtitulación MJ Research (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA; nº de cat. HSP-9665)
- Incubador Solo HT (Thermo Labsystems, Franklin, MA; nº de cat. 5161580)
- Peine KingFisher™ (Thermo Labsystems, Franklin, MA; nº de cat. 97002510)
- 25 Termomezclador R de Eppendorf® (Eppendorf North America; Westbury, NY; nº de cat. 022670107 ó 022670158)
- Sistema de Detección de PCR en Tiempo Real DNA Engine Opticon® 2 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA; nº de cat. CFB-3220)

9. Información Adicional del Protocolo.

- 30 Para los experimentos descritos, se añadieron 3,3 µL de tampón de transcripción que contenía el objetivo a cada microtubo de 2,0 ml en la etapa B6 siguiente. El oligonucleótido de cebado marcado y el oligonucleótido de terminación estaban en agua antes de añadirlos a los microtubos de 2,0 mL. Las muestras se agitaron en vórtex durante alrededor de 5 segundos. Se consideró que la incubación durante 10 minutos a 60 °C fue suficiente en general para capturar el transcrito. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 minutos tras la incubación de 10 minutos para permitir que las placas se enfriasen antes de las etapas de captura del objetivo. Fue en este punto también cuando las placas se transfirieron del incubador Solo HT al sistema KingFisher. La velocidad del termomezclador fue de 1400 rpm.

III. PROTOCOLO DE CAPTURA DEL OBJETIVO

A. Procedimiento para el Reactivo de Captura del Objetivo (TCR).

- 40 Las esferas magnéticas se mezclaron lentamente a temperatura ambiente (RT) durante 45 minutos, y se añadieron 150 µL de esferas magnéticas a 5 mL de disolvente de TCR (15 µg de esferas/reacción cuando se usaron 50 µL por muestra). La disolución se mezcló lentamente a temperatura ambiente durante 35 minutos, en cuyo momento se añadió la sonda de captura a 5 mL del diluyente de TCR (a una concentración final de 0,12 pmol/µL (6-pmol/50 µL reacción).

B. Preparación de la Muestra.

Se preparó el Reactivo de AMP que contenía el oligonucleótido promotor, el oligonucleótido prolongador y el oligonucleótido de cebado (volumen = 1.600 µL). La disolución se agitó en vórtex y se colocó a 2-8 °C hasta que se necesitó. La sonda de detección se preparó en Reactivo de Enzima y se colocó a 2-8 °C hasta que se necesitó. Se prepararon diluciones del objetivo en un 0,2% de LLS. Se transfirieron 50 µL de TCR a pocillos de 200 µL de una microplaca. Cada nivel de copias del objetivo, oligonucleótido de cebado marcado y oligonucleótido de terminación se añadieron a 1,2 mL de Medio de Transporte al 50%, 50% de H₂O en microtubos de 2,0 mL. Las muestras de objetivo se agitaron en vórtex y se transfirieron 150 µL a un pocillo de 200 µL de una microplaca (Placa 1) que contenía 50 µL de TCR (cada pocillo contenía cero o 1 millón de copias de transcrito de HCV más las cantidades apropiadas de oligonucleótidos de cebado marcados y oligonucleótidos de terminación).

C. Protocolo de Captura del Objeto.

La microplaca de 200 µL (Placa 1) se incubó a 60 °C durante 10 minutos mediante el uso del Incubador Labsystems Solo HT (Placa 1), y la microplaca se colocó después a RT durante 5 minutos (Placa 1). Se prepararon microplacas de 200 µL (Placas 2 y 3) con 200 µL de Reactivo de Lavado. Se preparó una placa de amplificación (placa de microtitulación de 96 pocillos de investigación 4-MJ) con 30 µL de Reactivo de AMP por pocillo. Se colocó el peine de 96 pocillos en la Placa 1. Las cuatro placas se cargaron en la unidad KingFisher 96 y se inició el protocolo de captura del objetivo como sigue.

La Placa 1 se mezcló durante 5 minutos a una velocidad muy lenta, y se recogieron las esferas durante 12 cuentas y después se liberaron en la Placa 2 durante 10 segundos mediante el uso de una velocidad lenta. La Placa 1 se mezcló después durante 1 segundo mediante el uso de una velocidad muy lenta, las esferas se recogieron durante 12 cuentas, y las esferas se liberaron en la Placa 2 durante 10 segundos mediante el uso de una velocidad lenta.

La Placa 2 se mezcló durante 30 segundos a velocidad media, y las esferas se recogieron durante 12 cuentas y después se liberaron en la Placa 3 durante 10 segundos mediante el uso de una velocidad muy lenta. La Placa 2 se mezcló después durante 1 segundo a una velocidad muy lenta, y las esferas se recogieron durante 12 cuentas y se liberaron en la Placa 3 durante 10 segundos mediante el uso de una velocidad muy lenta.

La Placa 3 se mezcló durante 30 segundos a velocidad media, las esferas se recogieron durante 12 cuentas, y las esferas se liberaron en la Placa 4 durante 10 segundos mediante el uso de una velocidad media. La Placa 3 se mezcló después durante 1 segundo a una velocidad muy lenta, las esferas se recogieron durante 12 cuentas y se liberaron en la placa 4 durante 10 segundos mediante el uso de una velocidad media.

La placa de microtitulación de 96 pocillos (Placa 4) se extrajo y se transfirió a la mesa, se cubrió con una placa de cierre, y se colocó en el sistema de detección de PCR en tiempo real DNA Engine Opticon® 2 (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA) ("instrumento de tiempo real").

D. TMA en Tiempo Real.

La TMA en tiempo real se llevó a cabo como sigue. La placa se incubó durante 5 minutos a 42 °C y después se extrajo y se colocó en un termomezclador a 42 °C. Cada pocillo de reacción recibió una alícuota de 10 µL del Reactivo de Enzima. La placa de microtitulación se cubrió con un cierre de cinta adhesiva, se agitó suavemente durante 30 segundos en el termomezclador, y después se colocó en el instrumento de tiempo real a 42 °C, en el que comenzó la monitorización del ensayo en tiempo real. Los valores de Ttiempo, que sirvieron como indicadores de la cantidad de amplicón sintetizado, se determinaron a partir de las señales de fluorescencia monitorizadas. Véase Light *et al.*, pub. de sol. de pat. de EE.UU. n° US 2006-0276972, párrafos 506-549.

IV. RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

Se llevaron a cabo experimentos según los procedimientos descritos anteriormente para la detección de un transcrito de HCV (8 replicados). La TCR en cada ensayo contuvo el mismo oligonucleótido de cebado marcado. Se llevó a cabo una etapa de captura del objetivo para unir el transcrito de HCV y eliminar el oligonucleótido de cebado marcado sin hibridar y el oligonucleótido de terminación sin hibridar. Después de la etapa de captura del objetivo, se puso en contacto un Reactivo de AMP con las esferas de la TCR, y el Reactivo de AMP contenía un oligonucleótido de cebado específico para el complemento de la secuencia marcadora. No se incluyó ningún oligonucleótido de cebado marcado en esta etapa.

Se ensayaron ocho replicados para cada condición. La sonda de detección se añadió por medio del Reactivo de Enzima a 4 pmol por reacción. El Reactivo de AMP de HCV contuvo 12 pmol de

oligonucleótido promotor, 12 pmol de oligonucleótido prolongador y 12 pmol de oligonucleótido de cebado por reacción.

5 El primer grupo de experimentos comparó los resultados de las reacciones en las que no se añadieron copias del transcrito de HCV en la TCR o en el Reactivo de AMP con los resultados de las reacciones en las que se añadieron 1×10^6 copias del transcrito de HCV en la TCR. La Figura 17 muestra las curvas en bruto para las amplificaciones de HCV, en las que no se añadió ninguna cantidad de objetivo en el Reactivo de AMP. No hubo una amplificación detectable cuando el transcrito de HCV no se añadió en la TCR o en el Reactivo de AMP, mientras el TTIempo para las reacciones que contenían 1×10^6 copias del transcrito de HCV en la TCR fue de 6,3 minutos. Los valores de "TTiempo" se refieren al tiempo de aparición (tiempo en el que surge una señal por encima del fondo), y se expone un resumen de estos valores para los experimentos llevados a cabo en la Tabla 1 más adelante.

10 Un segundo grupo de experimentos comparó los resultados de las reacciones en las que se añadieron 1×10^6 copias del transcrito de HCV en el Reactivo de AMP solamente con las reacciones en las que se añadieron 1×10^6 copias del transcrito de HCV en la TCR solamente. La Figura 18 muestra las curvas en bruto para las amplificaciones de HCV, en las que el objetivo se añadió en el Reactivo de AMP. No hubo una amplificación detectable cuando el transcrito de HCV se añadió en el Reactivo de AMP, mientras el TTIempo medio para las reacciones que contenían 1×10^6 copias del transcrito de HCV en la TCR fue de 6,3 minutos (Tabla 1). El objetivo cero en las muestras de TC no se amplificó, incluso con 1 millón de copias de transcrito de HCV añadidas en el Reactivo de AMP.

15 Un tercer grupo de experimentos comparó los resultados de las reacciones en las que se proporcionaron 1×10^6 copias del transcrito de HCV y el oligonucleótido de cebado marcado en el Reactivo de AMP (sin copias del transcrito de HCV en la TCR) con los resultados de las reacciones en las que se proporcionaron 1×10^6 copias del transcrito de HCV en la TCR y el oligonucleótido de cebado marcado en el Reactivo de AMP. La Figura 19 muestra que el TTIempo medio para 1 millón de copias de transcrito de HCV presentes solamente en la etapa de captura del objetivo con oligonucleótidos de cebado marcados y oligonucleótidos de terminación añadidos en el Reactivo de AMP fue de 7,2 minutos. Las muestras cero con objetivo, oligonucleótido de terminación y oligonucleótido de cebado marcado añadidos en el Reactivo de AMP también produjeron una amplificación sólida con un TTIempo medio = 8,6 minutos (Tabla 1).

20 **Tabla 1. Resumen de TTIempo (TTiempos medios y TTIempos DE)**

ID de muestra	Nombre del Objetivo	Cant. del Objetivo	Total	RN1	TN1	TTiempo medio	TTiempo DE
1 millón de objetivo en TC-x6,0	HCV	1E6	8	7	8	6,3	0,11
1 millón de objetivo en TC, cebador que no es de T7 marcado y oligonucleótido de terminación en amp-x6,0	HCV	1E6	8	8	8	7,2	0,20
1 millón de objetivo en TC-x6,0	HCV	1E6	8	8	7	6,3	0,05
Cero de objetivo en TC, 1 millón de objetivo en amp-x0,0	HCV	0,00	8	8	0	N/A	N/A
Cero de objetivo en TC, 1 millón de objetivo, cebador que no es de T7 marcado y oligonucleótido de terminación en amp-x0,0	HCV	0,00	8	8	8	8,6	0,21
Cero de objetivo en TC-x0,0	HCV	0,00	8	8	0	N/A	N/A

25 Los resultados de estos experimentos demuestran que solamente cuando el oligonucleótido de cebado marcado estaba presente en el Reactivo de AMP junto con el oligonucleótido de cebado las muestras cero de TCR amplificaron cuando se añadió 1 millón de copias de transcrito de HCV en el Reactivo de AMP. Así, el transcrito de HCV que entra en el sistema a través del Reactivo de AMP no se amplifica a menos que el oligonucleótido de cebado marcado se proporcione también con el Reactivo de AMP.

El Ejemplo precedente demostró cómo un oligonucleótido de cebado marcado que hibridó a un molde de HCV se pudo usar para detectar de manera selectiva los ácidos nucleicos de HCV en una muestra de interés sin la interferencia del ácido nucleico contaminante introducido posteriormente en una etapa de captura del objetivo. El siguiente Ejemplo ilustra cómo se usó una aproximación similar para detectar ácidos nucleicos bacterianos en una muestra de interés a pesar de la presencia de moldes contaminantes en los reactivos usados para llevar a cabo la reacción de amplificación. De manera ventajosa, el oligonucleótido de cebado marcado sin complejar fue sustancialmente inexistente en la mezcla de reacción en el momento en el que el complejo que comprendía el oligonucleótido de cebado marcado y el molde entró en contacto con la ADN polimerasa usada en la reacción de amplificación.

El Ejemplo 2 a continuación describe dos procedimientos para amplificar ácidos nucleicos de rARN de *E. coli*, en los que los procedimientos difirieron por el uso de un oligonucleótido de cebado marcado y la captura del objetivo. El primer procedimiento empleó un oligonucleótido de cebado sin marcar específico de *E. coli* en combinación con un oligonucleótido de terminación, un oligonucleótido promotor y una sonda de detección. El segundo procedimiento empleó un oligonucleótido de cebado marcado que tenía una secuencia complementaria al objetivo idéntica a la contenida en el oligonucleótido de cebado sin marcar específico de *E. coli* del primer procedimiento, un oligonucleótido de cebado específico de marcador, así como un oligonucleótido de terminación, un oligonucleótido promotor y una sonda de detección. El oligonucleótido de cebado específico de marcador, que tenía una secuencia de nucleótidos que correspondía a un segmento de HIV-1, hibridó al complemento de la secuencia marcadora contenida en el oligonucleótido de cebado marcado, pero no hibridó al ácido nucleico molde de rARN de *E. coli* o al complemento del mismo. En el caso del segundo procedimiento, el oligonucleótido de terminación, el oligonucleótido promotor y la sonda de detección fueron idénticos a los usados en el primer procedimiento. Como se demuestra más adelante, las reacciones de amplificación que omitieron el oligonucleótido de cebado marcado no fueron capaces de distinguir entre las muestras que contenían 0 y 10^9 copias de un objetivo de rARN de *E. coli* sintético. A la inversa, la aproximación que incluyó el uso de un oligonucleótido de cebado marcado y captura del objetivo distinguió claramente las muestras que contenían 0 y 10^3 copias del objetivo de rARN de *E. coli* sintético.

Ejemplo 2

EL USO DE UN OLIGONUCLEÓTIDO DE CEBADO MARCADO PERMITE LA DISTINCIÓN ENTRE MOLDES PROCEDENTES DE MUESTRAS Y MOLDES EXÓGENOS

A. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE EL USO DE UN OLIGONUCLEÓTIDO DE CEBADO SIN MARCAR SIN CAPTURA DEL OBJETIVO

En un primer procedimiento, se llevaron a cabo reacciones de amplificación que empleaban un molde de rARN de *E. coli* sintético mediante el uso de un oligonucleótido de cebado sin marcar que hibridaba al molde, un oligonucleótido promotor, un oligonucleótido de terminación y una sonda de detección de antorcha molecular. Las reacciones se cebaron mediante el uso del molde sintético añadido directamente a las mezclas de reacción (es decir, sin llevar a cabo una purificación mediante captura del objetivo) a 0 ó 10^6 copias/reacción. Se usó una sonda de detección de antorcha molecular para monitorizar la producción de amplicones en función del tiempo. En las secuencias nucleotídicas presentadas más adelante, las modificaciones de 2'-O-metil ribosa (2'-O-Me) del esqueleto del polinucleótido se indican en minúsculas, "m". Los restos bloqueantes en los extremos 3' del oligonucleótido promotor y oligonucleótido de terminación consistieron en una unión 3'-a-3 que se preparó mediante el uso de 3'-dimetiltritol-N-benzoil-2'-desoxicidina, 5'-succinoil-alkilamino de cadena larga-CPG (Glen Research Corporation, Sterling, VA; n° de cat. 20-0102-01). Los oligonucleótidos, reactivos y métodos esenciales usados en el procedimiento fueron los siguientes.

I. OLIGONUCLEÓTIDOS:

1. Oligonucleótido de Cebado sin Marcar:

CmUmGmCmTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTC (SEQ ID NO: 9)

2. Oligonucleótido Promotor:

ATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG - bloqueo (SEQ ID NO:

10)

3. Oligonucleótido de Terminación:

GmCmCmUmUmCmUmUmCmAmUmAmCmAmCmGmCmGm - bloqueo (SEQ ID NO: 11)

4. Sonda de Detección:

¹CmUmGmCmGmGmGmUmAmAmCmGmUmCmAmAmUmGmAmGmCmAmAmAm²CGCAG³
(SEQ ID NO: 12)

¹ fluoresceína

² espaciador C9

³ DABCYL

5. Molde de rARN de *E. coli* sintético:

AAATTGAAGAGTTTGCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCC
 TAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGACGA
 GTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAAC
 TACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGA
 CCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGG
 GGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGC
 CACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
 ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAA
 GGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT
 ACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCA
 GCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTA
 AAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCT
 GGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATT
 CCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAG
 GCGGCCCTTGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
 CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTGACTTGGAGGTT
 GTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGG
 AGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
 GGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTG
 5 ACATCCACGGAAGTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACA

GGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCG
 CAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAA
 GGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCA
 TGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGA
 AGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGGTTCGTAGTCCGGATT
 GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAG
 AATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCAT
 GGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTAC
 CACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAA
 CCTGCGGTTGGATCACCTCCTTA (SEQ ID NO:13)

II. REACTIVOS Y OTRA INFORMACIÓN DEL PROTOCOLO:

10 Los reactivos de amplificación y de enzima fueron esencialmente como se describieron en el Ejemplo 1. Los procedimientos que usaron el oligonucleótido de cebado sin marcar que hibridó al molde de *E. coli* no emplearon reactivos u oligonucleótidos de captura del objetivo, no emplearon medio de transporte o disolución de lavado, y no emplearon un oligonucleótido prolongador.

A. Protocolo de Amplificación en Tiempo Real.

15 Se prepararon disoluciones de muestra mediante el uso de un reactivo de amplificación sin cebador, oligonucleótido de cebado sin marcar, oligonucleótido promotor, oligonucleótido de terminación, sonda de detección y ácido nucleico molde sintético. Cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos recibió una alícuota de 30 µL de la disolución de muestra preparada. La placa de microtitulación se cubrió con un cierre de cinta adhesiva, se incubó primero durante 10 minutos a 60 °C en el instrumento de tiempo real con temperatura controlada DNA ENGINE OPTICON® 2 (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA), y después se ajustó la temperatura a 42 °C durante 5 minutos. Después, la placa se extrajo del
 20 instrumento de tiempo real y se colocó en un termomezclador a 42 °C. Cada pocillo de reacción recibió una alícuota de 10 µL del reactivo de enzima. La placa de microtitulación se cubrió con un cierre de cinta adhesiva, se agitó suavemente durante 30 segundos en el termomezclador, y después se colocó en el instrumento de tiempo real a 42 °C, en el que comenzó la monitorización del ensayo en tiempo real. Se
 25 determinaron los valores de T_{Tiempo}, que sirvieron como indicadores de la cantidad de amplicón sintetizado, a partir de las señales de fluorescencia monitorizadas.

III. RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

Como se indicó en la Figura 20, se observaron resultados sustancialmente idénticos en las reacciones que incluyeron 0 ó 10^6 copias del ácido nucleico molde, y así el ensayo no mostró distinción entre estas dos condiciones. Más específicamente, las señales fluorescentes que indicaban la formación de productos de amplificación de ácido nucleico de *E. coli* surgieron de los niveles de fondo en momentos sustancialmente similares (es decir, T_{Tiempo} = 31,74 minutos en el nivel de 0 copias, y 31,19 minutos en el nivel de 10^6 copias) en ambas reacciones. Así, se obtuvo un perfil de amplificación en tiempo real característico de niveles elevados del molde de ácido nucleico incluso en ausencia de molde de rARN de *E. coli* añadido. Esto fue coherente con la presencia de moldes de ácido nucleico bacterianos contaminantes en uno o más de los reactivos usados para llevar a cabo las reacciones de amplificación tras el procedimiento de captura del objetivo.

B. AMPLIFICACIÓN MEDIANTE EL USO DE UN OLIGONUCLEÓTIDO DE CEBADO MARCADO Y CAPTURA DEL OBJETIVO

En un segundo procedimiento, se empleó un oligonucleótido de cebado marcado y una etapa de captura del objetivo para llevar a cabo las reacciones de amplificación mediante el uso de las muestras de ensayo que contenían 0, 10^3 ó 10^5 copias del transcrito de *E. coli* sintético. Los oligonucleótidos usados en el procedimiento se indican más adelante. La sonda de detección de antorcha molecular se añadió como un componente del reactivo de enzima. Tras la captura del objetivo, el oligonucleótido de cebado marcado que no estaba hibridado al ácido nucleico molde se eliminó del sistema mediante etapas de captura del objetivo y lavado estándar. El complejo que incluyó el molde de rARN y el oligonucleótido de cebado marcado permaneció capturado en las partículas super-paramagnéticas. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo mediante el uso de reactivos esencialmente como se describieron anteriormente, excepto por la sustitución de una sonda de captura del objetivo inespecífica por las sondas de captura específicas de secuencia empleadas en el Ejemplo 1. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en replicados de seis y se monitorizaron mediante el uso de una sonda de detección de antorcha molecular esencialmente como se describió en el Ejemplo 1, excepto porque se omitió el oligonucleótido prolongador. Como anteriormente, las modificaciones de 2'-O-metil ribosa (2'-O-Me) del esqueleto polinucleotídico en las secuencias presentadas más adelante se indican mediante la letra minúscula "m". Los restos bloqueantes en los extremos 3' del oligonucleótido promotor y oligonucleótido de terminación consistieron en un enlace 3'-a-3' que se preparó mediante el uso de 3'-dimetiltritol-N-benzoil-2'-desoxicitidina, 5'-succinil-alquilamino de cadena larga-CPG (Glen Research Corporation, Sterling, VA; n° de cat. 20-0102-01). Los oligonucleótidos, reactivos y métodos esenciales usados en el procedimiento fueron los siguientes.

I. Oligonucleótidos:

1. Oligonucleótido de Cebado Marcado:

GTTTGTATGTCTGTTGCTATTATGTCTACCTGCTGGCACGGAGTTAGCCG GTGCTTC (SEQ ID NO: 14)

2. Oligonucleótido de Cebado Específico de Marcador:

GTTTGTATGTCTGTTGCTATTAT (SEQ ID NO: 15)

3. Oligonucleótido Promotor:

ATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG -bloqueo (SEQ ID NO: 10)

4. Oligonucleótido de Terminación:

GmCmCmUmUmCmUmUmCmAmUmAmCmAmCmGmCmGm - bloqueo (SEQ ID NO: 11)

5. Sonda de Captura Inespecífica:

KmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAA (SEQ ID NO: 16)

6. Sonda de Detección:

¹CmUmGmCmGmGmUmAmAmCmGmUmCmAmAmUmGmAmGmCmAmAmAm²CGCAG³
(SEQ ID NO: 12)

¹ fluoresceína

² espaciador C9

³ DABCYL

7. Molde de rARN de *E. coli* sintético

(Véase anteriormente)

II. REACTIVOS Y OTRA INFORMACIÓN DEL PROTOCOLO

5 Los reactivos y los protocolos experimentales fueron esencialmente como se describió en el Ejemplo 1, con la sustitución de un oligonucleótido de captura del objetivo inespecífico por el primer y el segundo oligonucleótidos de captura, la sustitución de los oligonucleótidos específicos de *E. coli* anteriormente presentados por los oligonucleótidos específicos de HCV, y la omisión de un oligonucleótido prolongador.

10 III. PROTOCOLO DE CAPTURA DEL OBJETIVO INESPECÍFICO

A. Preparación del Reactivo de Captura del Objetivo (TCR).

15 Se mezcló una suspensión de reserva de esferas magnéticas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió una alícuota de alrededor de 150 μL de la suspensión de esferas magnéticas a 5 mL de disolvente de TCR (15 μg de esferas/reacción al usar 50 μL /muestra), y después se mezcló lentamente a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se añadió el oligonucleótido de captura inespecífico a 5 mL de la mezcla de TCR para proporcionar una concentración final de 0,12 pmol/ μL . La TCR preparada se mezcló suavemente a temperatura ambiente hasta que se necesitó.

B. Preparación de la Muestra.

20 La disolución de amplificación se preparó mediante el uso de reactivo de amplificación sin cebador, oligonucleótido promotor y oligonucleótido de cebado específico de marcador. La disolución de amplificación preparada se mezcló agitando en vórtex y manteniéndola a 2-8 °C hasta que se necesitó. A continuación se preparó el reactivo de enzima que contenía la sonda de detección de antorcha molecular y se mantuvo a 2-8 °C hasta que se necesitó. Se prepararon diluciones del rARN molde en 0,2% de LLS (lauril sulfato de litio). Se transfirieron alícuotas (50 μL) de la disolución de captura del objetivo con esferas magnéticas a los pocillos de una placa de microtitulación para un procesador de partículas magnéticas KINGFISHER 96 (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Waltham, MA). Después se añadieron muestras de molde diluido, oligonucleótido de cebado marcado y oligonucleótido de terminación a 1,5 mL de medio de transporte diluido al 50% con agua. La mezcla de muestra que contenía el objetivo se agitó en vórtex, y se transfirieron alícuotas de 150 μL a los pocillos de la placa de microtitulación (Placa 1) que contenían 50 μL de disolución de captura del objetivo (cada pocillo contenía 0, 10^3 ó 10^5 copias del transcrito de *E. coli* y la cantidad adecuada de oligonucleótido de cebado marcado y oligonucleótido de terminación).

C. Protocolo de Captura del Objetivo.

35 Primero se preparó una placa de microtitulación que contenía 200 μL de reactivo de lavado (Placa 2). Se preparó otra placa de microtitulación (Placa 3) para llevar a cabo las reacciones de amplificación, y cada pocillo a usar para una reacción contenía 30 μL de reactivo de amplificación. Las tres placas (Placas 1-3) se cargaron en la unidad procesadora de partículas magnéticas. Las partículas magnéticas que albergaban complejos de ácidos nucleicos se aislaron de la Placa 1, se lavaron en la Placa 2, y después se transfirieron a la Placa 3 mediante el uso de procedimientos habituales familiares para las personas con un nivel de experiencia habitual en la técnica. La Placa 3 se extrajo de la unidad procesadora de partículas magnéticas, se cubrió con un cierre de cinta adhesiva, y después se colocó en el instrumento de tiempo real con temperatura controlada.

D. Protocolo de Amplificación en Tiempo Real.

45 La Placa 3 se incubó a 42 °C durante 5 minutos en el instrumento de tiempo real. La placa de microtitulación se extrajo del instrumento de tiempo real y se colocó en un termomezclador a 42 °C. Cada pocillo de reacción recibió una alícuota de 10 μL del reactivo de enzima que contenía la sonda de detección, y después se cubrió con un cierre de cinta adhesiva. La placa se agitó suavemente durante 60 segundos en el termomezclador, y después se volvió a colocar en el instrumento de tiempo real a 42 °C, en el que comenzó la monitorización del ensayo en tiempo real. Los valores de TTiempo, que sirvieron como indicadores de la cantidad de amplicón sintetizado, se determinaron a partir de las señales de fluorescencia monitorizadas.

IV. RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

55 La Figura 21 ilustra gráficamente los beneficios de la aproximación descrita para la amplificación de ácidos nucleicos. Los procedimientos que emplearon un oligonucleótido de cebado marcado complementario a un objetivo de interés, una etapa de captura del objetivo, y un oligonucleótido de cebado específico del marcador que no fue complementario al objetivo de interés (es decir, el rARN de *E.*

coli) produjeron niveles de amplificación de fondo muy reducidos, y así permitieron la distinción sencilla entre 0 y 10^3 copias del ácido nucleico molde bacteriano. De manera más específica, los valores de TTiempo medio determinados para las reacciones llevadas a cabo mediante el uso de 10^5 copias, 10^3 copias, y 0 copias del molde de *E. coli* fueron 24,7 minutos, 30,6 minutos y 37,5 minutos, respectivamente. Considerados junto con los resultados presentados en la Figura 4, estos hallazgos fueron coherentes con la presencia de ácidos nucleicos derivados de bacterias en reactivos habituales usados para llevar a cabo reacciones de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro*. A pesar de este hecho, el procedimiento que empleaba un oligonucleótido de cebado marcado fue útil para detectar ácidos nucleicos de *E. coli* contenidos en una muestra de ensayo sin la interferencia de ácidos nucleicos de moldes exógenos aportados por los reactivos de amplificación. Por ejemplo, un ensayo cualitativo para detectar ácidos nucleicos de *E. coli* a un nivel de 10^3 copias o más en una muestra de ensayo podría depender de alcanzar una señal de fluorescencia umbral, o un valor de TTiempo tras un tiempo de reacción predeterminado (p.ej., 35 minutos).

* * * * *

El siguiente Ejemplo presenta resultados comparativos que muestran cómo influyeron dos sondas de detección diferentes en los perfiles de curvas de amplificación en tiempo real. Los resultados demostraron además cómo se podría usar la aproximación del oligonucleótido de cebado marcado para distinguir entre 0 y 10^3 copias del ácido nucleico molde de *E. coli* sintético, un nivel que se aproxima al número de copias de rARN 16S presente en una única bacteria.

El Ejemplo 3 describe la detección de moldes de rARN de *E. coli* en reacciones de amplificación en tiempo real mediante el uso de tres sondas de detección diferentes.

Ejemplo 3

LOS DISEÑOS DE ANTORCHA ALTERNATIVOS PUEDEN MEJORAR LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

Se llevaron a cabo reacciones de amplificación y se monitorizaron en un formato de tiempo real mediante el uso de una a tres sondas de detección diferentes. El ácido nucleico molde sintético, el oligonucleótido de captura inespecífico, el oligonucleótido de cebado marcado, el oligonucleótido de terminación, el oligonucleótido promotor y el oligonucleótido de cebado específico de marcador usados para llevar a cabo las reacciones fueron idénticos a los usados en el segundo procedimiento del Ejemplo precedente. La porción de hibridación al objetivo de *E. coli* del oligonucleótido de cebado marcado correspondió a las posiciones de los nucleótidos 24-57 de SEQ ID NO:14 (es decir, la secuencia de hibridación al objetivo correspondió a SEQ ID NO:19). La porción de hibridación al objetivo de *E. coli* del oligonucleótido promotor correspondió a las posiciones de nucleótidos 27-47 de SEQ ID NO:10 (es decir, la secuencia de hibridación al objetivo correspondió a SEQ ID NO:20). Se utilizaron cuatro replicados para cada condición. Como anteriormente, la sonda de detección se añadió con el reactivo de enzima. Los reactivos y protocolos para la captura de objetivo inespecífica, la preparación de la muestra, y la amplificación en tiempo real fueron también esencialmente como se describió en el segundo procedimiento del Ejemplo precedente. De manera notable, las reacciones se llevaron a cabo mediante el uso de 0, 10^3 ó 10^5 copias del molde de *E. coli* sintético. Como anteriormente, las modificaciones de 2'-O-metil ribosa (OMe) del esqueleto del polinucleótido en las secuencias presentadas más adelante se indican mediante la letra minúscula "m". Los restos bloqueantes en los extremos 3' del oligonucleótido promotor y oligonucleótido de terminación consistieron en una unión 3'-a-3' que se preparó mediante el uso de 3'-dimetiltrilit-N-benzoil-2'-desoxicitidina, 5'-succinoil-alkilamino de cadena larga-CPG (Glen Research Corporation, Sterling, VA; n° de cat. 20-0102-01). Los oligonucleótidos, reactivos y métodos esenciales usados en el procedimiento fueron los siguientes.

I. OLIGONUCLEÓTIDOS:

1. Oligonucleótido de Cebado Marcado:

GTTTGTATGTCTGTTGCTATTATGTCTACCTGCTGGCACGGAGTTAGCCG GTGCTTC (SEQ ID NO: 14)

2. Oligonucleótido de Cebado Específico de Marcador:

GTTTGTATGTCTGTTGCTATTAT (SEQ ID NO: 15)

3. Oligonucleótido Promotor:

ATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG - bloqueo (SEQ ID NO: 10)

4. Oligonucleótido de Terminación:

GmCmCmUmUmCmUmUmCmAmUmAmCmAmCmGmCmGm - bloqueo (SEQ ID NO: 11)

5. Sonda de Captura Inespecífica:

KmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmKmTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAA (SEQ ID NO: 16)

5 6. Sonda de Detección:

¹CmGmAmGmCmAmAmAmGmGmUmAmUmUmAmAmCm²GmCmUmCmGm³
(SEQ ID NO: 17)

¹CmGmAmGmCmAmAmAmGmGmUmAmUmUmAmAmCmUmUmUmAmCmUmCm²GmCmUmC
mGm³ (SEQ ID NO: 18)

10 ¹ fluoresceína

² espaciador C9

³ DABCYL

7. Molde de rARN de *E. coli* Sintético

(Véase anteriormente)

15 II. REACTIVOS Y OTRA INFORMACIÓN DEL PROTOCOLO

Los reactivos y los protocolos experimentales fueron esencialmente como se describieron en el Ejemplo 2, con un ligero cambio de las condiciones usadas para la captura del objetivo.

III. PROTOCOLO DE CAPTURA DEL OBJETIVO INESPECÍFICO:

A. Preparación del Reactivo de Captura del Objetivo (TCR).

20 Se mezcló una suspensión de reserva de esferas magnéticas a temperatura ambiente durante 25 minutos. Se añadió una alícuota de 150 μ L de la suspensión de esferas magnéticas a 5 mL de disolvente de TCR (15 μ g de esferas/reacción al usar 50 μ L/muestra), y después se mezcló lentamente a temperatura ambiente durante 25 minutos. A continuación, se añadió el oligonucleótido de captura inespecífico a 5 mL de la mezcla de TCR para proporcionar una concentración final de 0,12 pmol/ μ L. La TCR preparada se mezcló suavemente a temperatura ambiente hasta que se necesitó.

B. Preparación de la Muestra.

30 Se prepararon disoluciones de amplificación mediante el uso de Reactivo de AMP sin cebador, oligonucleótido promotor y oligonucleótido de cebado específico del marcador. Las disoluciones de amplificación preparadas se mezclaron agitando en vórtex y después se mantuvieron a 2-8 °C hasta que se necesitaron. A continuación se prepararon Reactivos de Enzima que contenían sondas de detección de antorcha molecular y se mantuvieron a 2-8 °C hasta que se necesitaron. Se prepararon diluciones del rARN molde en LLS al 0,2%, como se describió anteriormente. Se transfirieron alícuotas (50 μ L) de la disolución de captura del objetivo con esferas magnéticas a los pocillos de una placa de microtitulación para un procesador de partículas magnéticas KINGFISHER 96 (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Waltham, MA). Después se añadieron muestras de molde diluido, oligonucleótido de cebado marcado y oligonucleótido de terminación a 1,5 mL de Medio de Transporte diluido al 50% con agua. La mezcla de muestra que contenía objetivo se agitó en vórtex, y se transfirieron alícuotas de 150 μ L a los pocillos de la placa de microtitulación (Placa 1) que contenían 50 μ L de disolución de captura del objetivo (cada pocillo contenía 0, 10³ ó 10⁵ copias de transcrito de *E. coli* y la cantidad adecuada de oligonucleótido de cebado marcado y oligonucleótido de terminación).

C. Protocolo de Captura del Objetivo.

45 La placa de microtitulación (Placa 1) se incubó a 60 °C durante 15 minutos mediante el uso de un incubador SOLO HT (Thermo LabSystems; Franklin, MA). Después la placa de microtitulación se colocó sobre la mesa a temperatura ambiente y se dejó equilibrar durante 5 minutos (Placa 1). A continuación, se preparó una segunda placa de microtitulación que contenía 200 μ L de Reactivo de Lavado (Placa 2). Se preparó una tercera placa de microtitulación (Placa 3) para llevar a cabo las reacciones de amplificación, y cada pocillo a usar para una reacción contenía 30 μ L de reactivo de amplificación. Las tres placas se colocaron en la unidad procesadora de partículas magnéticas. Las esferas magnéticas que albergaban complejos de ácidos nucleicos se aislaron de la Placa 1, se lavaron en la Placa 2, y después se transfirieron a la Placa 3 mediante el uso de procedimientos habituales familiares para las personas de experiencia habitual en la técnica. La Placa 3 se extrajo de la unidad procesadora de partículas

magnéticas, se cubrió con un cierre de cinta adhesiva, y después se colocó en el instrumento de tiempo real con control de temperatura.

D. Protocolo de Amplificación en Tiempo Real.

5 La Placa 3 se incubó en el instrumento de tiempo real a 42 °C durante 5 minutos. La placa de microtitulación se extrajo del instrumento de tiempo real y se colocó en el termomezclador a 42 °C. Cada pocillo de reacción recibió una alícuota de 10 µL de Reactivo de Enzima que contenía la sonda de detección, y después se cubrió con un cierre de cinta adhesiva. La placa se agitó suavemente durante 60 segundos en el termomezclador, y después se volvió a colocar en el instrumento de tiempo real a 42 °C, en el que comenzó la monitorización del ensayo en tiempo real. Se determinaron los valores de TTiempo, que sirvieron como indicadores de la cantidad de amplicón sintetizada, a partir de las señales de fluorescencia monitorizadas.

IV. RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

15 Los resultados presentados en la Tabla 2 resumen los valores de TTiempo medio (columna 3), y las desviaciones estándar de los valores de TTiempo medio (columna 4) para las reacciones llevadas a cabo mediante el uso de las diferentes sondas de detección. El resumen tabular confirmó que todas las sondas de detección ensayadas proporcionaron muy buenos resultados en los ensayos en tiempo real. Cada sonda proporcionó de manera ventajosa una señal muy baja en el nivel de 0 copias de objetivo inicial. De manera más específica, el amplicón detectado en las reacciones llevadas a cabo mediante el uso de 0 copias de molde sintético inicial fue esencialmente indetectable cuando las reacciones incluyeron la sondas de detección de SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:18. Así, las reacciones que incluyeron una de las sondas de detección identificadas por SEQ ID NO:17 y SEQ ID NO:18 proporcionaron resultados extraordinarios que permitieron fácilmente la detección de ácidos nucleicos molde que correspondían aproximadamente a la cantidad contenida en una única bacteria.

Tabla 2. Uso de Sondas de Detección Alternativas para una Distinción de Ensayos Mejorada

Cantidad de Molde (copias)	Sonda de Detección	TTiempo medio (minutos)	TTiempo DE (minutos)
0		N/A	N/A
10 ³	SEQ ID NO: 17	38,2	2,81
10 ⁵		26,4	0,32
0		N/A	N/A
10 ³	SEQ ID NO: 18	35,9	2,33
10 ⁵		28,8	0,45

25 A la vista de los resultados presentados en los Ejemplos 2 y 3, cada una de SEQ ID NOs:12, y 17-18 representan antorchas moleculares preferidas para la detección de *E. coli* mediante el uso de los métodos descritos en la presente memoria. Las sondas más preferidas útiles para la detección de ácidos nucleicos de *E. coli* tendrán secuencias complementarias al objetivo que corresponden a las posiciones de los nucleótidos 2-24 contenidos en la sonda de SEQ ID NO:12 (es decir, la secuencia de hibridación al objetivo que corresponde a SEQ ID NO:21), o las posiciones de los nucleótidos 2-17 contenidos en la sonda de SEQ ID NO:17 (es decir, la secuencia de hibridación al objetivo que corresponde a SEQ ID NO:22), o las posiciones de los nucleótidos 2-24 contenidos en la sonda de SEQ ID NO:18 (es decir, la secuencia de hibridación al objetivo que corresponde a SEQ ID NO:23). En general, las sondas útiles para la detección de ácidos nucleicos de *E. coli* tendrán secuencias de hibridación al objetivo de al menos 16 nucleótidos contiguos contenidas dentro de la secuencia de TGCGGGTAACGTCAATGAGCAAAGGTATTAACCTTTACTC (SEQ ID NO:24). Las longitudes preferidas en conjunto de las sondas deseables será de hasta 39 nucleótidos, más preferiblemente hasta 29 nucleótidos, más preferiblemente hasta 23 nucleótidos, o aún más preferiblemente hasta 16 nucleótidos. Por supuesto, las sondas útiles pueden incluir ARN y las bases equivalentes de ADN, e incluyen los complementos de las sondas anteriormente descritas.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> GEN-PROBE INCORPORATED
 BECKER, Michael M.
 LIVEZEY, Kristin W.
- 5 LAM, Wai-Chung W.
- <120> OLIGONUCLEÓTIDOS MARCADOS Y USO DE LOS MISMOS EN MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS
- <130> GP193-PCT
- <140> Se asignará
- 10 <141> 2007-06-06
- <150> 60/871,442
- <151> 2006-12-21
- <150> 60/811,581
- <151> 2006-06-06
- 15 <160> 24
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 60
- <212> DNA
- 20 <213> Artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido de cebado marcado, específico de HCV
- <400> 1
- 25 gtttgatgt ctgttgctat tatgtctaca ggcattgagc gggttgatcc aagaaaggac 60
- <210> 2
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial
- 30 <220>
- <223> Oligonucleótido de cebado específico de marcador
- <400> 2
- gtttgatgt ctgttgctat tat 23
- <210> 3
- 35 <211> 60
- <212> DNA
- <213> Artificial
- <220>

	<223> Oligonucleótido promotor específico de HCV	
	<400> 3	
	atttaatacgc actcactata gggagaccac aacggttct agccatggcg ttagtatgag	60
	<210> 4	
5	<211> 26	
	<212> RNA	
	<213> virus de la Hepatitis C	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
10	<222> (1)..(26)	
	<223> análogos de 2' metoxi	
	<400> 4	
	auggcuagac gcuuucugcg ugaaga	26
	<210> 5	
15	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido prolongador	
20	<400> 5	
	tgtcgtgcag cctccaggac cccccctccc gggagagcca ta	42
	<210> 6	
	<211> 52	
	<212> DNA	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda de captura específica de HCV	
	<400> 6	
	gggcacucgc aagcaccctt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa	52
30	<210> 7	
	<211> 51	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> sonda de captura específica de HCV	
	<400> 7	
	cauggugcac ggucuacggt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a	51

- <210> 8
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Artificial
- 5 <220>
 <223> sonda de hibridación antorcha molecular específica de HCV
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1) .. (23)
- 10 <223> análogos de 2' metoxi
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (18)..(19)
 <223> enlace no nucleotídico
- 15 <400> 8
 cguuccgcag accacuauga acg 23
 <210> 9
 <211> 28
 <212> DNA
- 20 <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(4)
 <223> análogos de 2' metoxi
- 25 <400> 9
 cugctggcac ggagtagcc ggtgctc 28
 <210> 10
 <211> 47
 <212> DNA
- 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido promotor específico de E. coli
 <400> 10
 attaatacg actcactata gggagagaag gccttcgggt tgtaaag 47
- 35 <210> 11
 <211> 18
 <212> RNA

- <213> Escherichia coli
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(18)
- 5 <223> análogos de 2' metoxi
 <400> 11
 gccuucuca uacacgcg 18
 <210> 12
 <211> 29
- 10 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sonda de hibridación antorcha molecular específica de E. coli
 <220>
- 15 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(24)
 <223> análogos de 2' metoxi
 <220>
 <221> característica miscelánea
- 20 <222> (24) .. (25)
 <223> enlace no nucleotídico
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (25)..(29)
- 25 <223> DNA
 <400> 12
 cugcggguaa cgucaaugag caaacgcag 29
 <210> 13
 <211> 1542
- 30 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> molde de rRNA de E. coli sintético
 <400> 13

ES 2 358 296 T3

aaattgaaga gtttgatcat ggctcagatt gaacgctggc ggcaggccta acacatgcaa 60
 gtcgaacggt aacaggaaga agcttgcttc tttgctgacg agtggcggac gggtagta 120
 tgtctgggaa actgcctgat ggagggggat aactactgga aacggtagct aataccgcat 180
 aacgtcgcaa gaccaaagag ggggaccttc gggcctcttg ccatcggatg tgcccagatg 240
 ggattagcta gtaggtgggg taacggctca cctagggcag gatccctagc tggctcgaga 300
 ggatgaccag ccacactgga actgagacac ggtccagact cctacgggag gcagcagtg 360
 ggaatattgc acaatgggcg caagcctgat gcagccatgc cgcgtgtatg aagaaggcct 420
 tcgggttgta aagtactttc agcggggagg aagggagtaa agttaatacc tttgctcatt 480
 gacgttacc gcagaagaag caccggctaa ctccgtgcca gcagccgagg taatacggag 540
 ggtgcaagcg ttaatcggaa ttactgggcg taaagcgac gcagggcggtt tgttaagtca 600
 gatgtgaaat cccgggctc aacctgggaa ctgcatctga tactggcaag cttgagtctc 660
 gtagaggggg gtagaattcc aggtgtagcg gtgaaatgcg tagagatctg gaggaatacc 720
 ggtggcgaag gcgccccct ggacgaagac tgacgctcag gtgcgaaagc gtggggagca 780
 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gtcgacttg aggttgtgcc 840
 cttgaggcgt ggcttccgga gctaacgcgt taagtcgacc gcctggggag tacggccgca 900
 aggttaaac tcaaatgaat tgacgggggc cgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat 960
 tcgatgcaac gcgaagaacc ttacctggtc ttgacatcca cggaagtttt cagagatgag 1020
 aatgtgcctt cgggaaccgt gagacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct cgtgttgtga 1080
 aatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca acccttatcc tttgttgcca gcggtccggc 1140
 cgggaactca aaggagactg ccagtgataa actggaggaa ggtggggatg acgtcaagtc 1200
 atcatggccc ttacgaccag ggctacacac gtgctacaat ggcgcataca aagagaagcg 1260

 acctcgcgag agcaagcggg cctcataaag tgcgtogtag tccggattgg agtctgcaac 1320
 tcgactccat gaagtcggaa tcgctagtaa tcgtggatca gaatgccacg gtgaatacgt 1380
 tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt gggttgcaaa agaagtaggt 1440
 agcttaacct tcgggagggc gcttaccact ttgtgattca tgactgggggt gaagtcgtaa 1500
 caaggtaac gtaggggaac ctgcggttgg atcacctcct ta 1542

<210> 14

<211> 57

5 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido de cebado marcado específico de E. coli

<400> 14

10 gttgtatgt ctgtgctat tatgtctacc tgctggcag gagttagccg gtgcttc 57

<210> 15

- <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
- 5 <223> oligonucleótido de cebado específico de marcador
 <400> 15
 gtttgatgt ctgtgctat tat 23
 <210> 16
 <211> 51
- 10 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sonda de captura no específica
 <220>
- 15 <221> característica miscelánea
 <222> (1)..(18)
 <223> análogos de 2' metoxi
 <220>
 <221> característica miscelánea
- 20 <222> (19)..(51)
 <223> DNA
 <400> 16
 kkkkkkkkkk kkkkkkkktt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 51
 <210> 17
- 25 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> sonda de hibridación antorcha molecular específica de E. coli
- 30 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (1) .. (22)
 <223> análogos de 2' metoxi
 <220>
- 35 <221> característica miscelánea
 <222> (17)..(18)
 <223> enlace no nucleotídico

	<400> 17	
	cgagcaaagg uauuaacgcu cg	22
	<210> 18	
	<211> 29	
5	<212> RNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> sonda de hibridación antorcha molecular específica de E. coli	
	<220>	
10	<221> característica miscelánea	
	<222> (1)..(29)	
	<223> análogos de 2' metoxi	
	<220>	
	<221> característica miscelánea	
15	<222> (24)..(25)	
	<223> enlace no nucleotídico	
	<400> 18	
	cgagcaaagg uauuaacuuu acucgcucg	29
	<210> 19	
20	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Escherichia coli	
	<400> 19	
	gtctacctgc tggcacggag ttagccggtg cttc	34
25	<210> 20	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Escherichia coli	
	<400> 20	
30	gaaggccttc gggttgtaa g	21
	<210> 21	
	<211> 23	
	<212> RNA	
	<213> Escherichia coli	
35	<400> 21	
	ugcggguaac gucaaugagc aaa	23
	<210> 22	

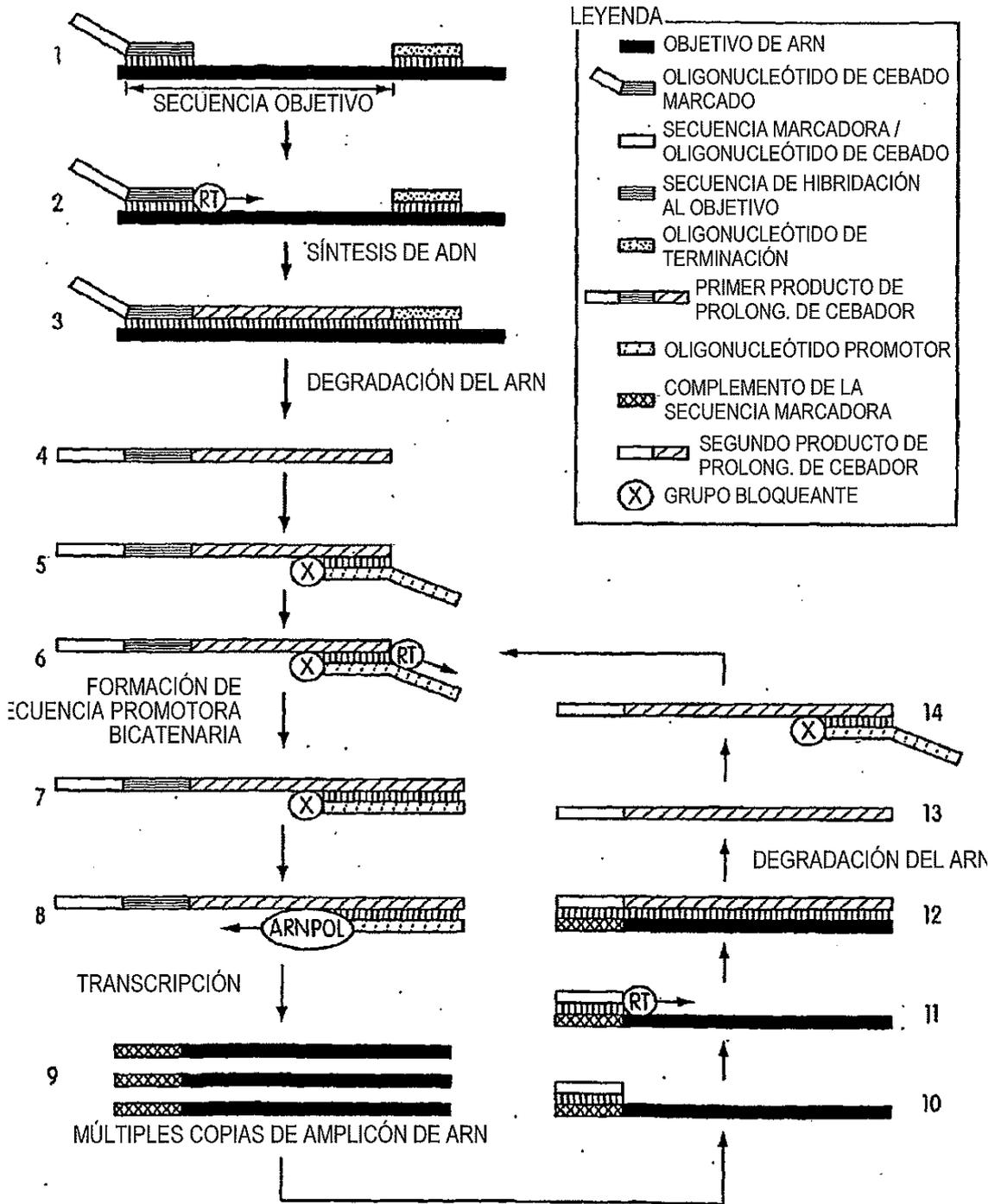
<211> 16
 <212> RNA
 <213> Escherichia coli
 <400> 22
 5 gagcaaaggu auuaac 16
 <210> 23
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Escherichia coli
 10 <400> 23
 gagcaaaggu auuaacuuua cuc 23
 <210> 24
 <211> 39
 <212> DNA
 15 <213> Escherichia coli
 <400> 24
 tgcgggtaac gtcaatgagc aaaggtatta acttactc 39

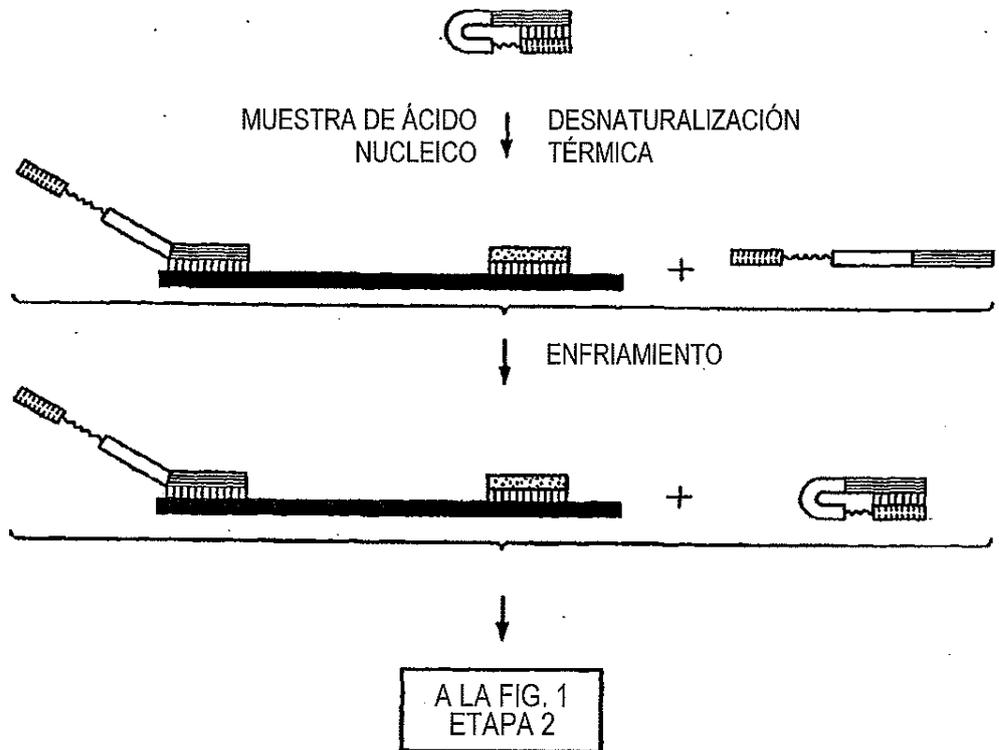
REIVINDICACIONES

1. Un método para la amplificación selectiva de al menos una secuencia de ácido nucleico objetivo a partir de una muestra de ácido nucleico, y dicho método comprende las etapas de:
- 5 (a) tratar una muestra de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico objetivo con un oligonucleótido marcado que comprende primeras y segundas regiones, y dicha primera región comprende una secuencia de hibridación al objetivo que hibrida a un extremo 3' de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo, y dicha segunda región comprende una secuencia marcadora situada en 5' respecto de dicha secuencia de hibridación al objetivo, en la que dicha segunda región no hibrida de manera estable a un ácido nucleico objetivo que contiene dicha secuencia de ácido nucleico objetivo;
- 10 (b) eliminar y/o inactivar en dicha muestra de ácido nucleico el oligonucleótido marcado sin hibridar que tiene una forma activa en la que una secuencia de hibridación al objetivo de dicho oligonucleótido marcado sin hibridar está disponible para la hibridación a dicha secuencia de ácido nucleico objetivo;
- 15 (c) tras la etapa (b), iniciar una reacción de prolongación desde el extremo 3' de dicho oligonucleótido marcado hibridado a dicha secuencia de ácido nucleico objetivo con una ADN polimerasa para producir un producto de prolongación de cebador que incluye la secuencia marcadora y una región complementaria a dicha secuencia de ácido nucleico objetivo;
- (d) separar dicho producto de prolongación de cebador de dicho ácido nucleico objetivo; y
- 20 (e) producir productos de amplificación en una reacción de amplificación de ácido nucleico mediante el uso de primeros y segundos oligonucleótidos, en los que dicho primer oligonucleótido comprende una secuencia de hibridación que hibrida a un extremo 3' del complemento de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo, y dicho segundo oligonucleótido comprende una secuencia de hibridación que hibrida al complemento de dicha secuencia marcadora, en el que dicho segundo oligonucleótido hibrida de manera estable a dicho ácido nucleico objetivo, y en el que cada uno de dichos productos de amplificación comprende una secuencia de bases que es sustancialmente idéntica o complementaria a la secuencia de bases de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo, y que comprende además una secuencia de bases que es sustancialmente idéntica o complementaria a toda o a una parte de dicha secuencia marcadora.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de ácido nucleico objetivo está inmovilizada en un soporte sólido durante la etapa (b).
- 30 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la etapa (b) comprende eliminar el oligonucleótido marcado sin hibridar de dicha muestra de ácido nucleico.
- 35 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las condiciones de dicha amplificación de ácido nucleico son isotérmicas.
5. El método de la reivindicación 4, en el que dicha reacción de amplificación de ácido nucleico es una reacción de amplificación basada en la transcripción.
- 40 6. El método de la reivindicación 5, en el que dicha reacción de amplificación basada en la transcripción es TMA.
7. El método de la reivindicación 5 o 6, en el que dicho primer oligonucleótido comprende un promotor para una ARN polimerasa que está situado en 5' respecto de dicha secuencia de hibridación.
- 45 8. El método de la reivindicación 7, en el que dicho primer oligonucleótido está modificado para impedir la iniciación de la síntesis de ADN a partir de él.
9. El método de la reivindicación 5 o 6, en el que dicho segundo oligonucleótido comprende un promotor para una ARN polimerasa que está situado en 5' respecto de dicha secuencia de hibridación, y en el que dicho oligonucleótido marcado comprende además un promotor para una ARN polimerasa que está situado en 5' respecto de dicha segunda región.
- 50 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha secuencia de ácido nucleico objetivo está contenida en el ácido nucleico de una única especie de microorganismo.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha secuencia de ácido nucleico objetivo está contenida en el ácido nucleico de múltiples especies de microorganismos.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho método es selectivo para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico objetivo contenida en cada una de una

diversidad de ácidos nucleicos objetivo, y en el que dicha secuencia de hibridación al objetivo hibrida a un extremo 3' de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo de cada uno de dicha diversidad de ácidos nucleicos objetivo presentes en dicha muestra de ácido nucleico en la etapa (a).

- 5 13. El método de la reivindicación 12, en el que dicha secuencia de ácido nucleico objetivo de cada uno de dicha diversidad de ácidos nucleicos objetivo es la misma secuencia de ácido nucleico.
14. El método de la reivindicación 12, en el que dicho primer oligonucleótido hibrida a un extremo 3' del complemento de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo de cada uno de dicha diversidad de ácidos nucleicos objetivo presentes en dicha muestra de ácido nucleico en la etapa (e).
- 10 15. El método de la reivindicación 12, en el que dicho método comprende una diversidad de primeros oligonucleótidos, y cada uno de dicha diversidad de primeros oligonucleótidos hibrida a un extremo 3' del complemento de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo de al menos uno, pero menos de todos, de dicha diversidad de ácidos nucleicos objetivo presentes en dicha muestra de ácido nucleico en la etapa (e).
- 15 16. El método de la reivindicación 12, en el que dicho oligonucleótido marcado es un oligonucleótido bacteriano universal.
17. El método de la reivindicación 12, en el que dicho oligonucleótido marcado es un oligonucleótido fúngico universal.
18. El uso del método de la reivindicación 12 para analizar la esterilidad.
19. El uso del método de la reivindicación 12 para diagnosticar la sepsis.
- 20 20. El uso de la reivindicación 19, en el que dicha secuencia de hibridación al objetivo hibrida a un extremo 3' de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo de cada uno de dicha diversidad de ácidos nucleicos objetivo presentes en dicha muestra de ácido nucleico en la etapa (a), y dicha diversidad de ácidos nucleicos objetivo pertenece a una clase de microorganismos seleccionados del grupo que consiste en Eubacterias, bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas y hongos.
- 25 21. El uso de la reivindicación 20, en el que cada uno de dicha diversidad de ácidos nucleicos objetivo es un ácido nucleico ribosómico.
- 30 22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 21, en el que dicha muestra de ácido nucleico se expone a una fuente contaminante conocida de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo tras la etapa (b), y en el que la producción de dichos productos de amplificación se limita sustancialmente a la amplificación de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo aportada por dicha muestra de ácido nucleico, y no por dicha fuente contaminante de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo.
- 35 23. El método o el uso de la reivindicación 22, en el que uno o más componentes usados en dicho método es una fuente contaminante conocida de dicho ácido nucleico objetivo.
- 40 24. El método o el uso de la reivindicación 23, en el que uno o más reactivos usados en dicha reacción de amplificación de ácido nucleico se produce con un material que se sabe que es una fuente contaminante de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo.
25. El método o el uso de la reivindicación 24, en el que dichos uno o más reactivos se producen mediante el uso de un microorganismo que contiene dicha secuencia de ácido nucleico objetivo.
- 45 26. El método o el uso de la reivindicación 22, en el que las condiciones ambientales de dicho método incluyen una fuente contaminante conocida de dicha secuencia de ácido nucleico objetivo.
27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o 22 a 26 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 26, en el que al menos una parte de dicha muestra de ácido nucleico se obtiene a partir de una fuente clínica, de agua, industrial, ambiental, de semillas, de bebidas o de alimentos.
- 50 28. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o 22 a 27 o el uso de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 27, en el que el oligonucleótido marcado sin hibridar se inactiva bloqueando que la secuencia de hibridación al objetivo hibride a la secuencia de ácido nucleico objetivo, usando una enzima para digerir un componente o escindir un sitio de una molécula bicatenaria formada entre la secuencia de hibridación al objetivo y la secuencia de ácido nucleico objetivo, o alterando químicamente la secuencia de hibridación al objetivo, o alterando por otros medios la capacidad del oligonucleótido marcado de hibridar a la secuencia de ácido nucleico objetivo en una mezcla de reacción de amplificación.





LEYENDA

	MOLÉCULA MARCADORA EN HORQUILLA
	OLIGONUCLEÓTIDO DE CEBADO MARCADO
	SECUENCIA DE HIBRIDACIÓN AL OBJETIVO
	SECUENCIA MARCADORA
	ESPACIADOR
	SECUENCIA DE CIERRE DEL MARCADOR
	OBJETIVO DE ARN
	OLIGONUCLEÓTIDO DE TERMINACIÓN

FIG. 2

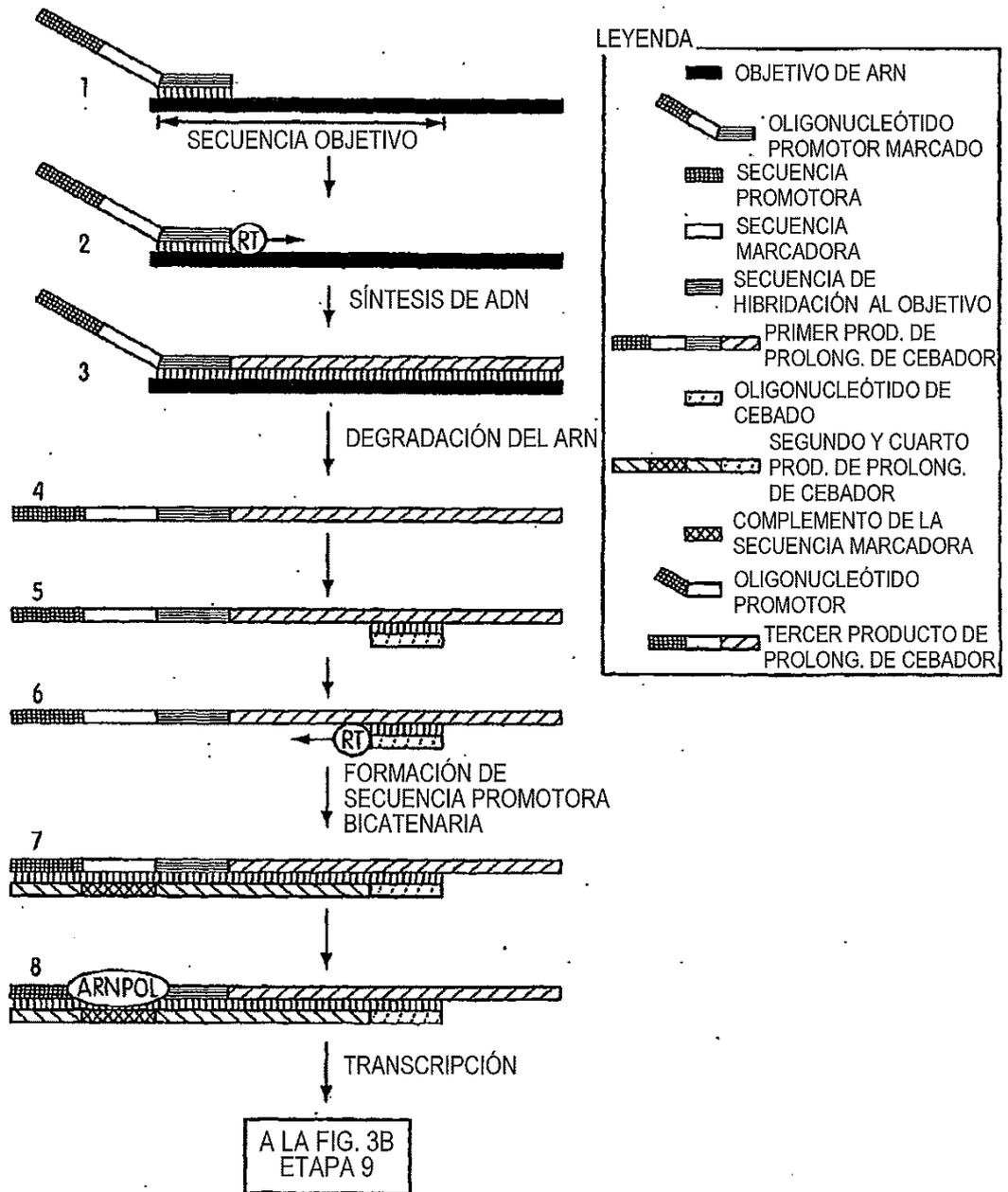


FIG. 3A

4/18

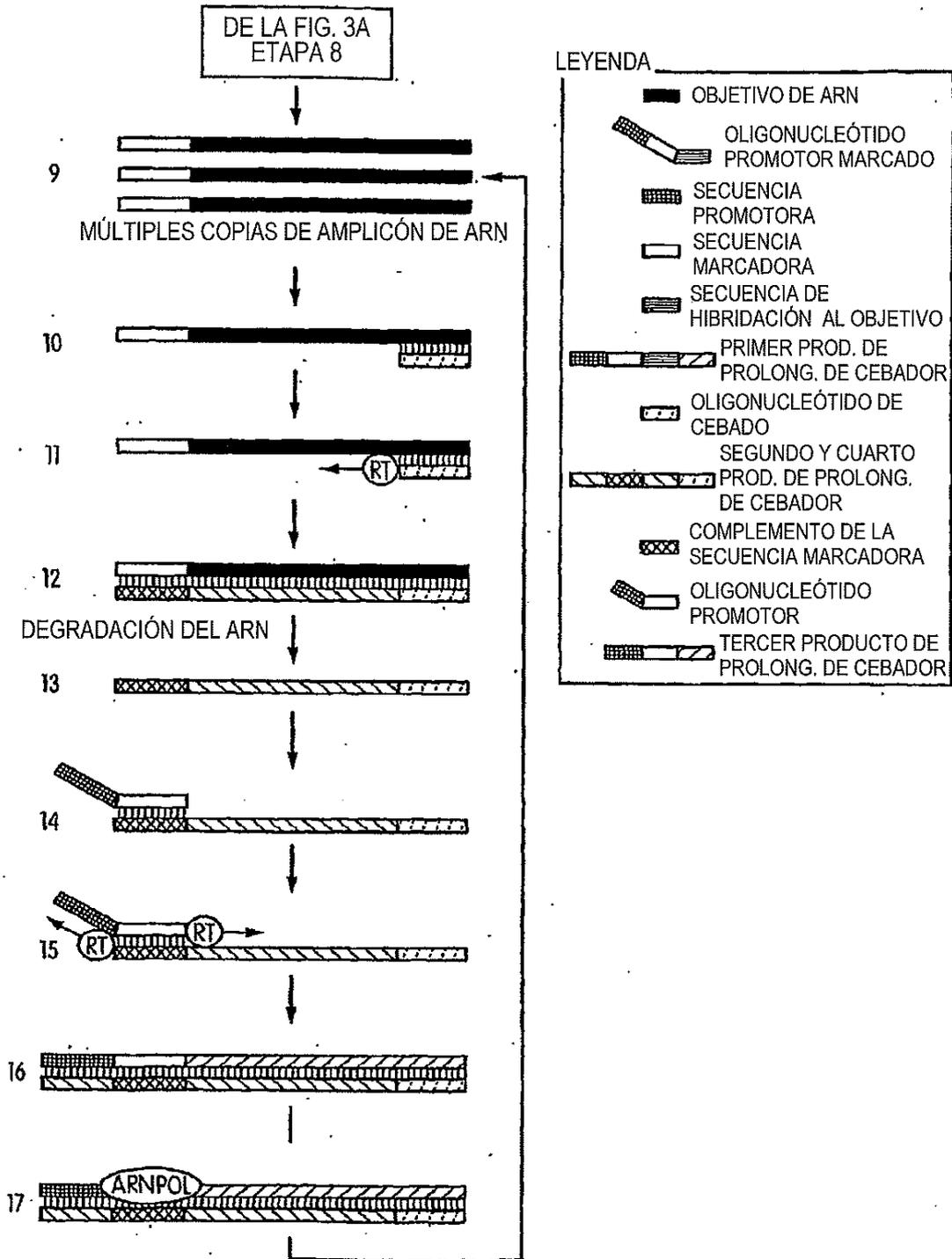
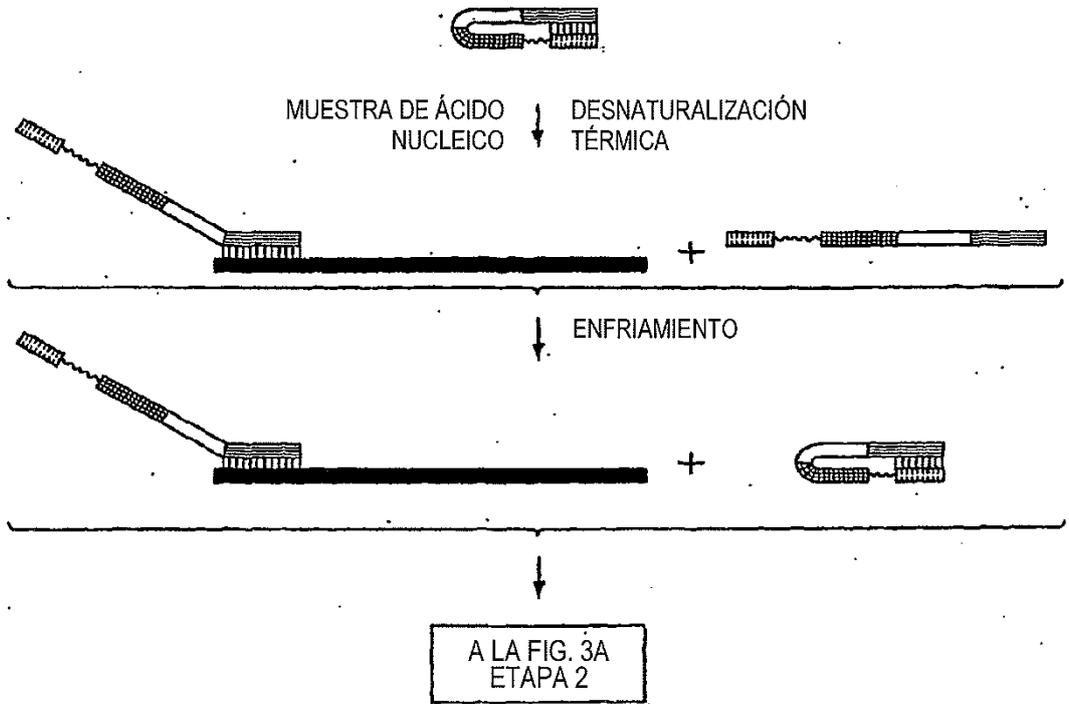


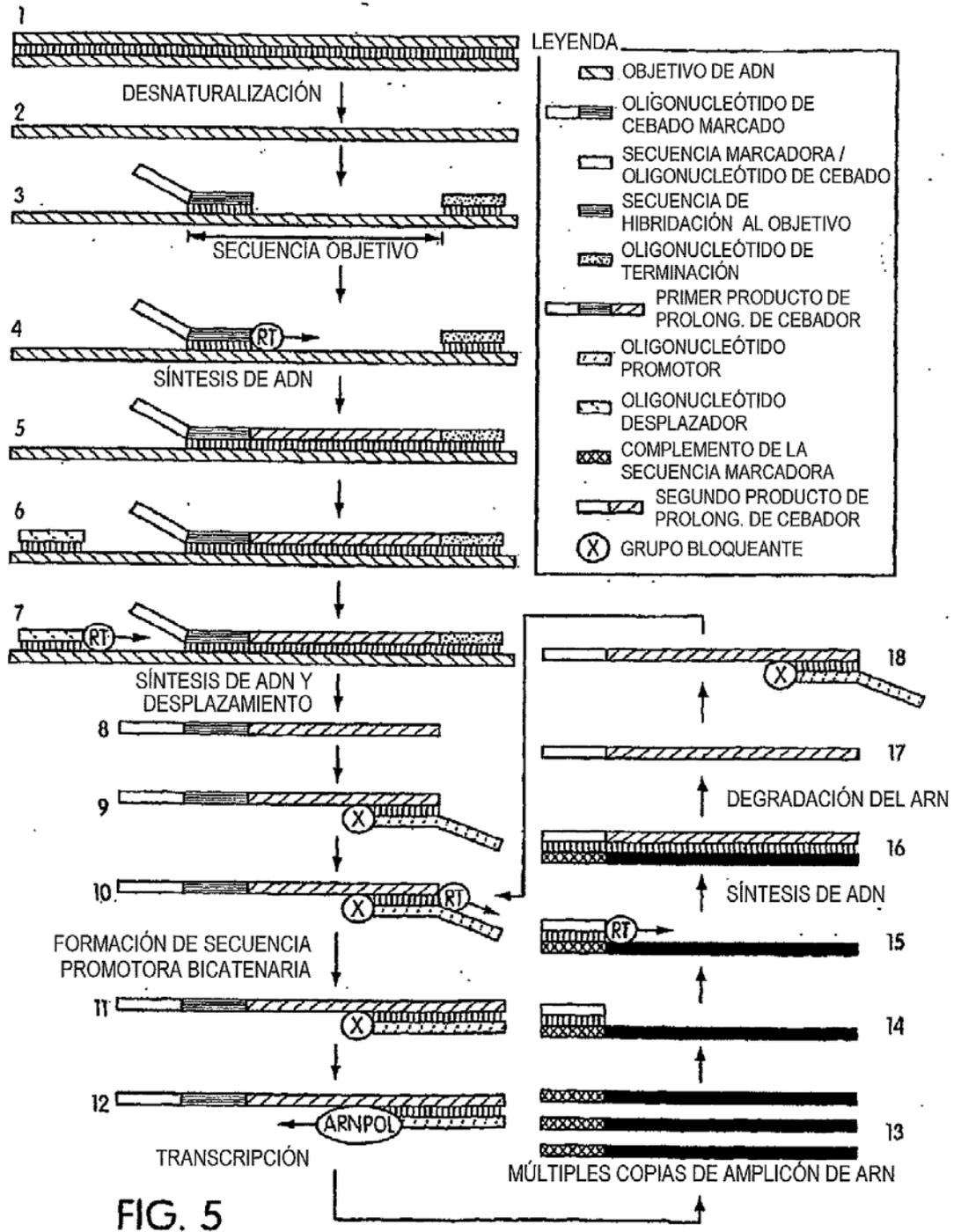
FIG. 3B

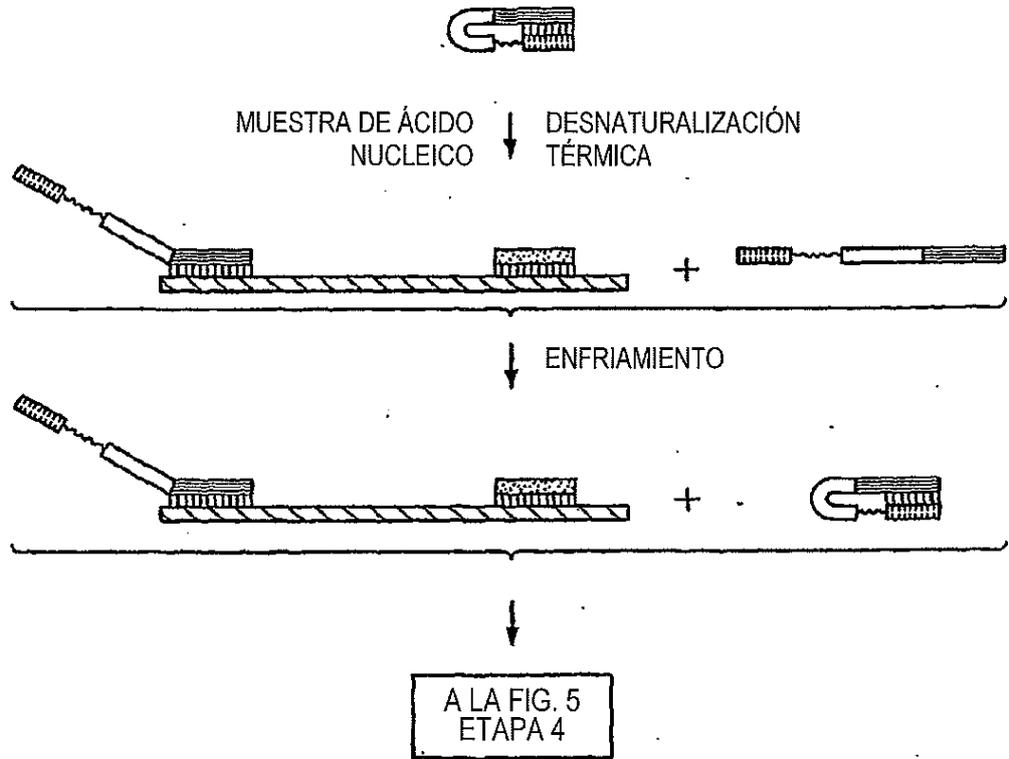


LEYENDA

	MOLÉCULA MARCADORA EN HORQUILLA
	OLIGONUCLEÓTIDO PROMOTOR MARCADO
	SECUENCIA DE HIBRIDACIÓN AL OBJETIVO
	SECUENCIA MARCADORA
	SECUENCIA PROMOTORA
	ESPACIADOR
	SECUENCIA DE CIERRE DEL MARCADOR
	OBJETIVO DE ARN

FIG. 4

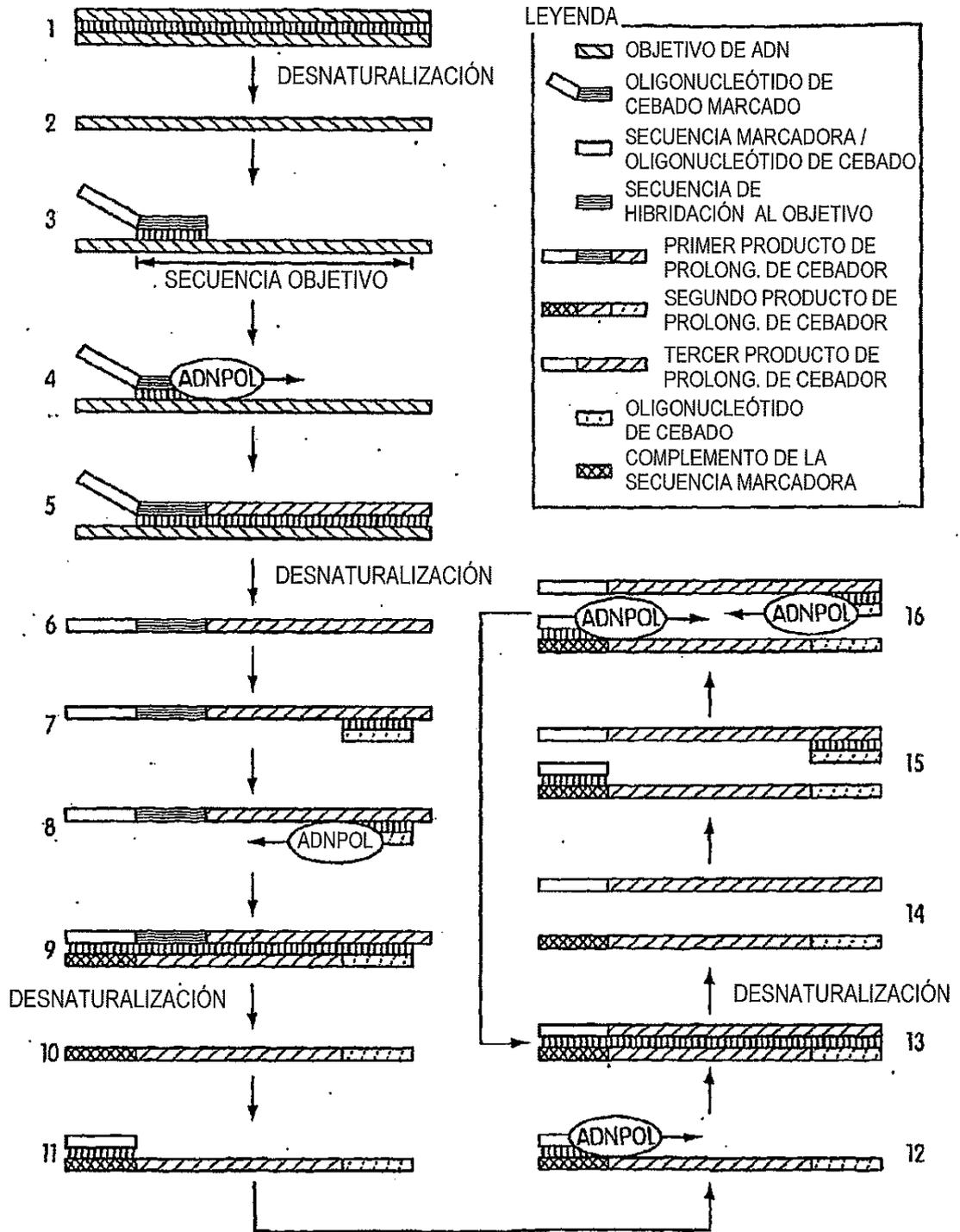


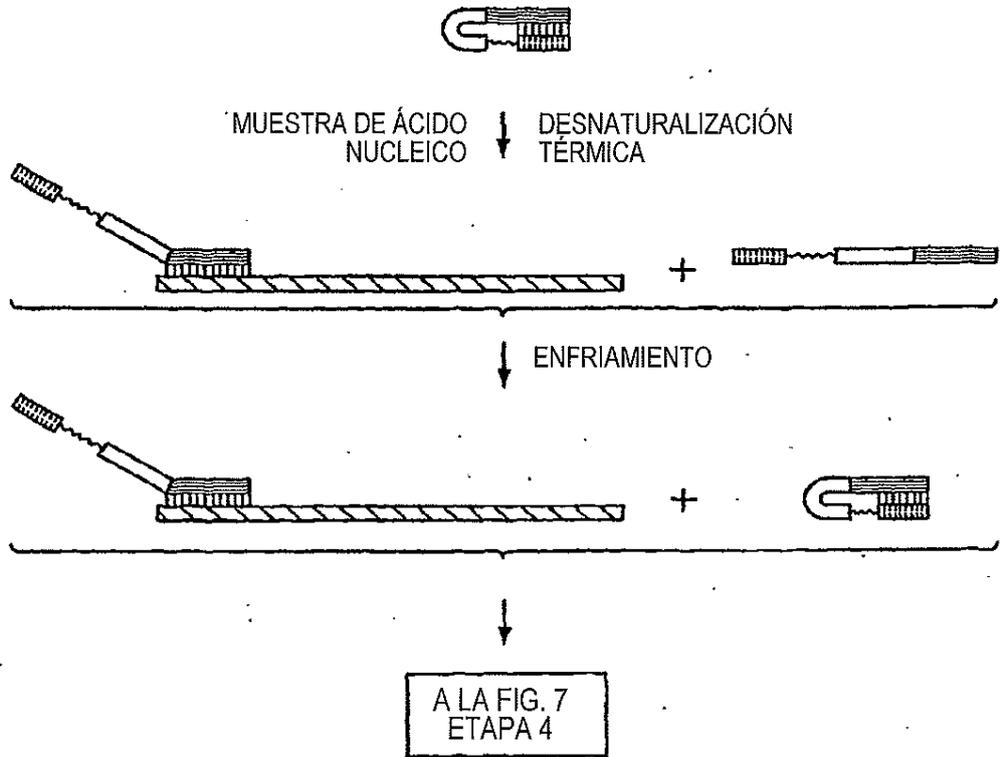


LEYENDA

	MOLÉCULA MARCADORA EN HORQUILLA
	OLIGONUCLEÓTIDO DE CEBADO MARCADO
	SECUENCIA DE HIBRIDACIÓN AL OBJETIVO
	SECUENCIA MARCADORA
	ESPACIADOR
	SECUENCIA DE CIERRE DEL MARCADOR
	OBJETIVO DE ADN
	OLIGONUCLEÓTIDO DE TERMINACIÓN

FIG. 6





LEYENDA

	MOLÉCULA MARCADORA EN HORQUILLA
	OLIGONUCLEÓTIDO DE CEBADO MARCADO
	SECUENCIA DE HIBRIDACIÓN AL OBJETIVO
	SECUENCIA MARCADORA
	ESPACIADOR
	SECUENCIA DE CIERRE DEL MARCADOR
	OBJETIVO DE ADN

FIG. 8

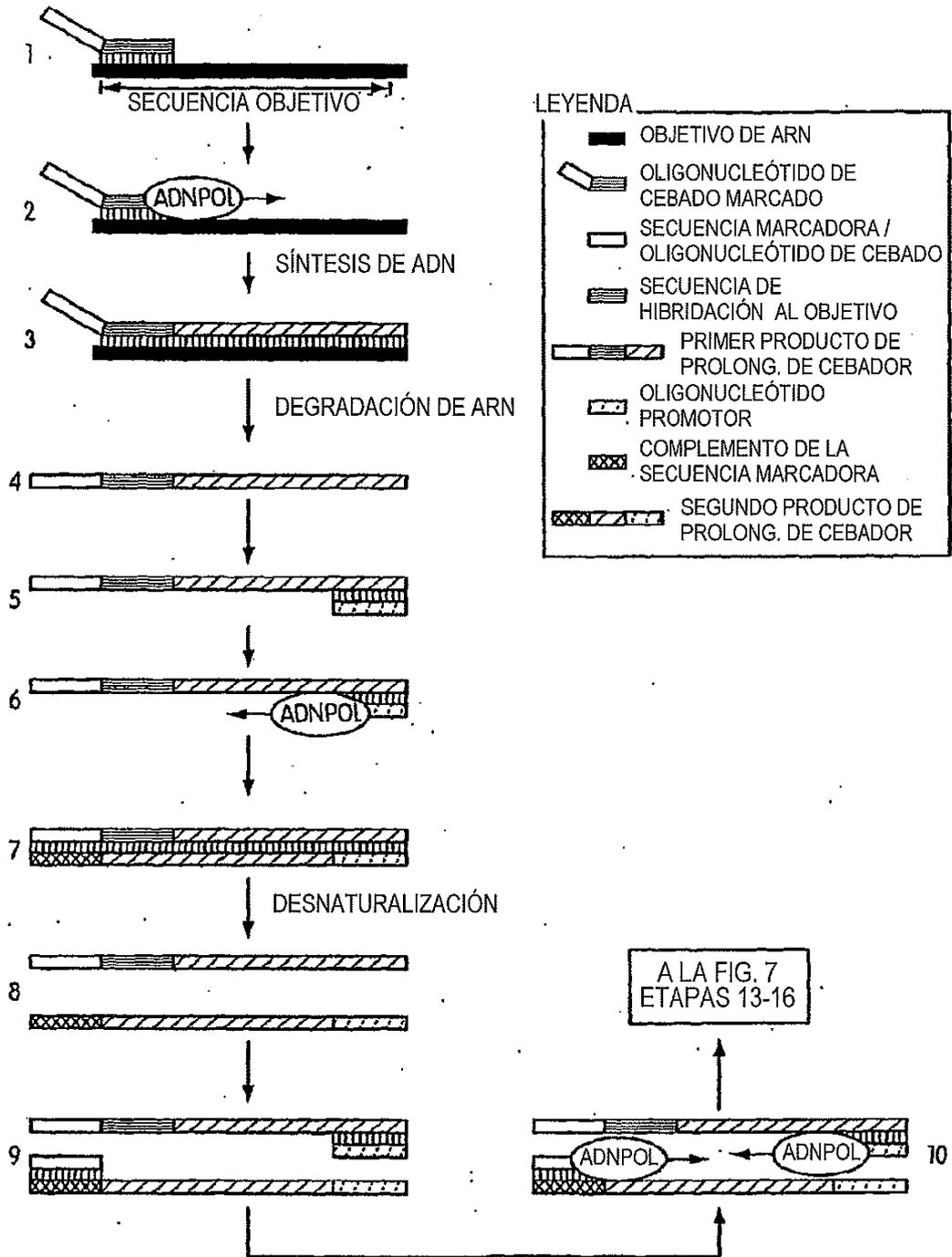
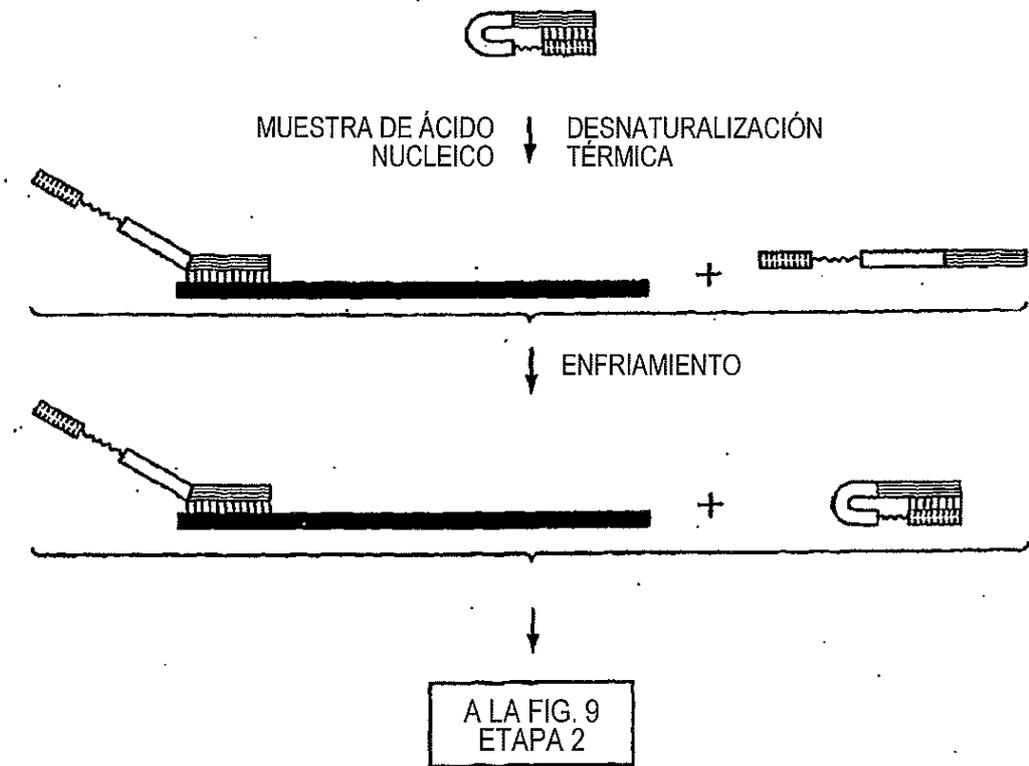


FIG. 9



LEYENDA

-  MOLÉCULA MARCADORA EN HORQUILLA
-  OLIGONUCLEÓTIDO DE CEBADO MARCADO
-  SECUENCIA DE HIBRIDACIÓN AL OBJETIVO
-  SECUENCIA MARCADORA
-  ESPACIADOR
-  SECUENCIA DE CIERRE DEL MARCADOR
-  OBJETIVO DE ARN

FIG. 10

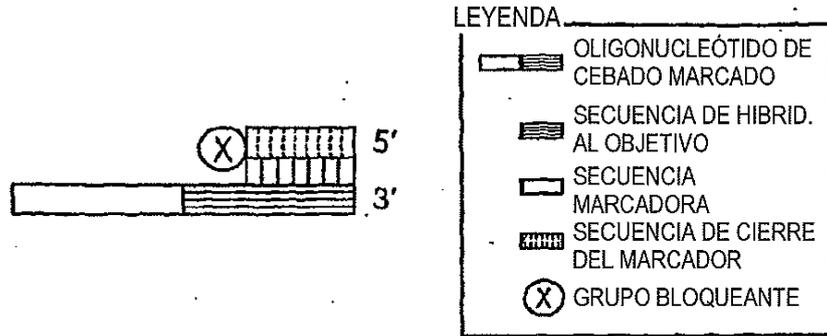


FIG. 11

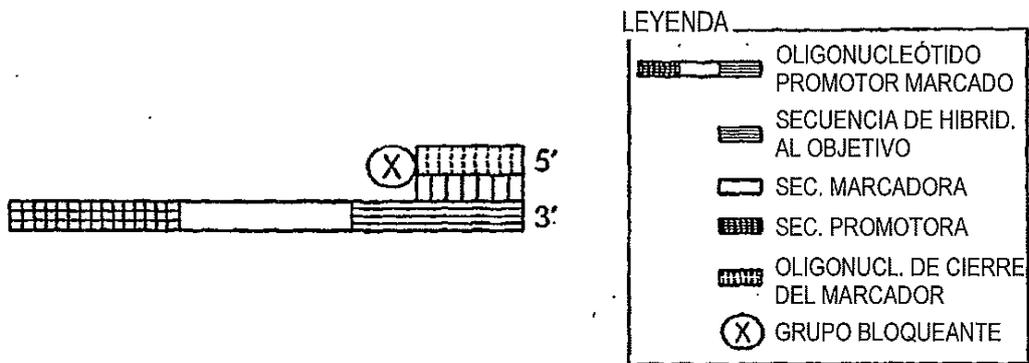


FIG. 12

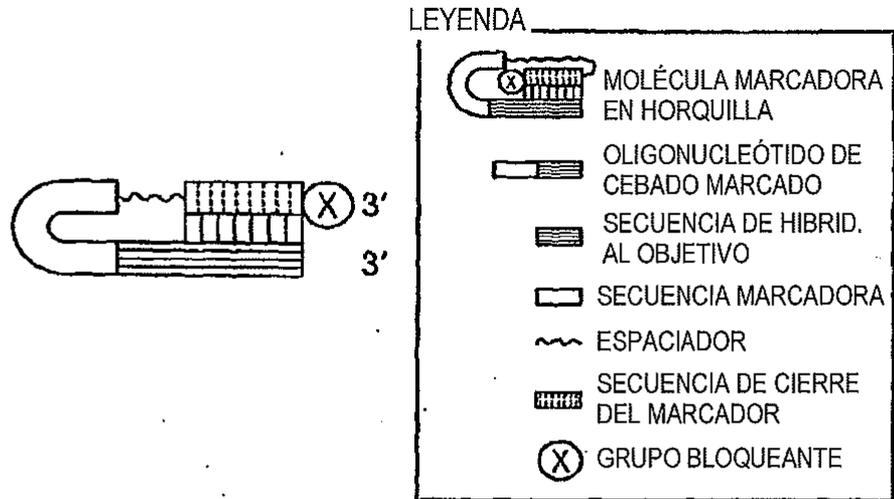


FIG. 13

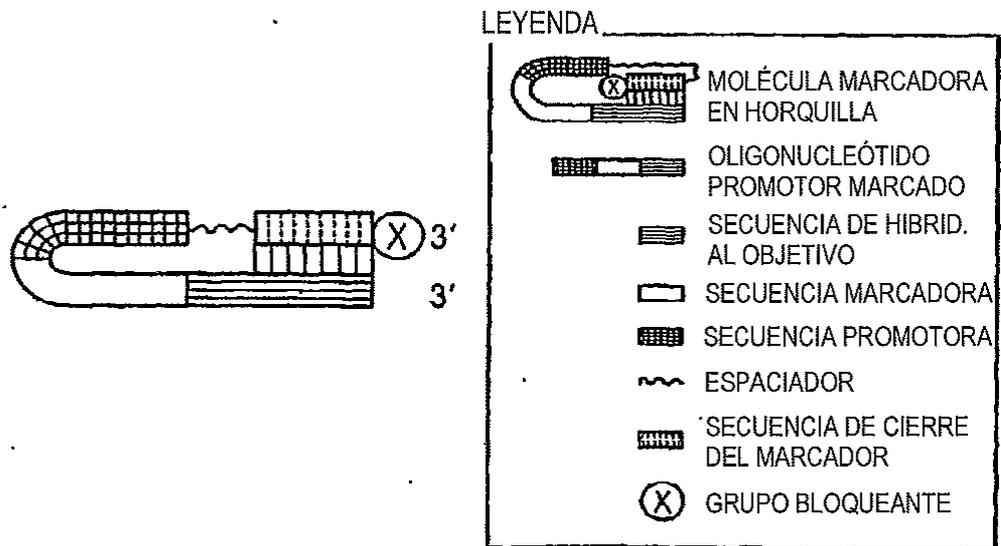
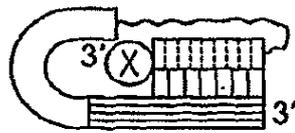


FIG. 14



LEYENDA:

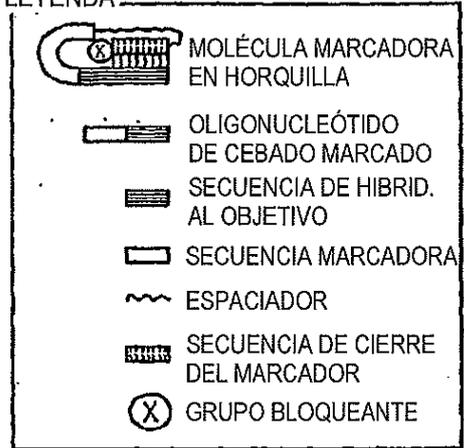
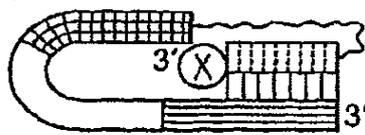


FIG. 15



LEYENDA:

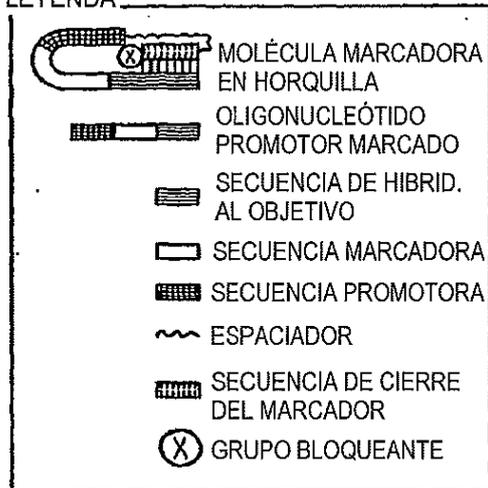


FIG. 16

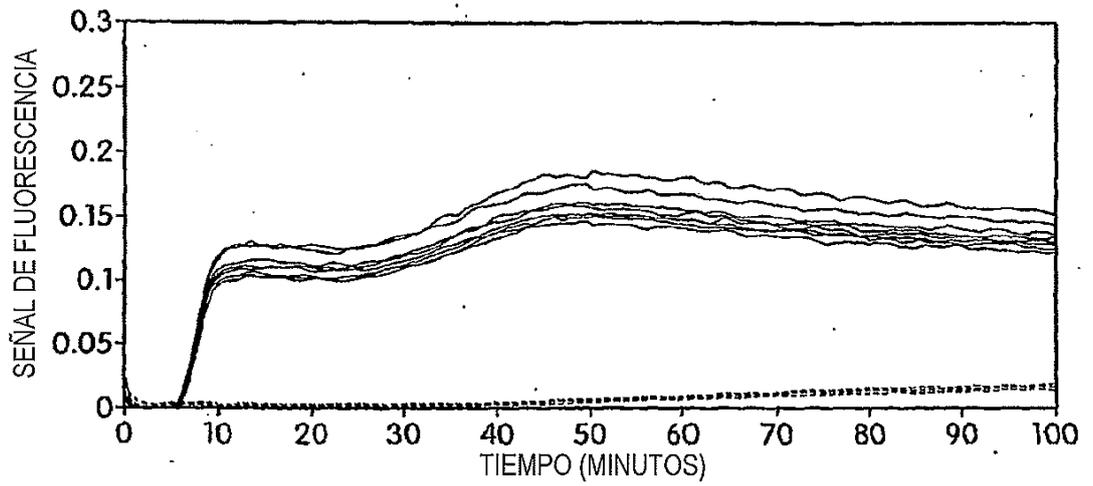


FIG. 17

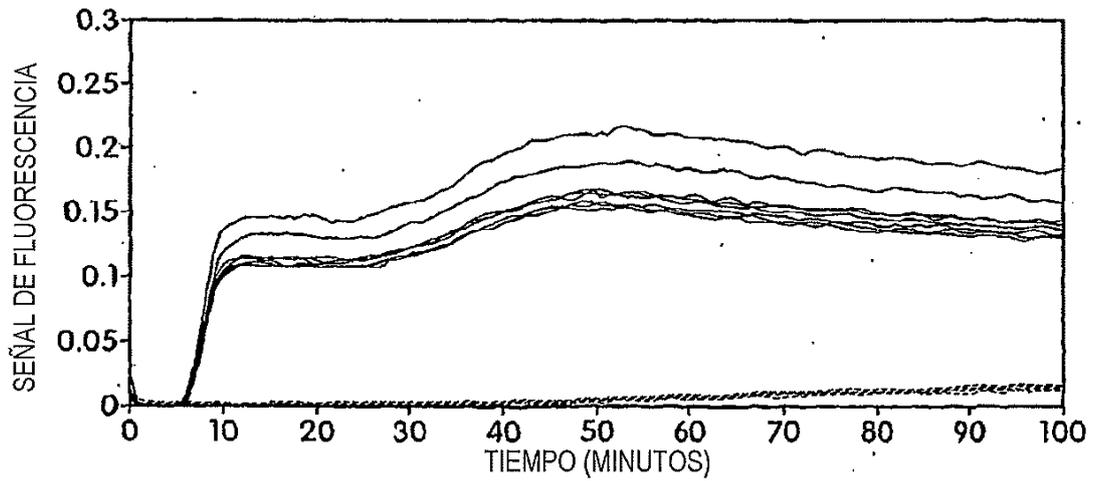


FIG. 18

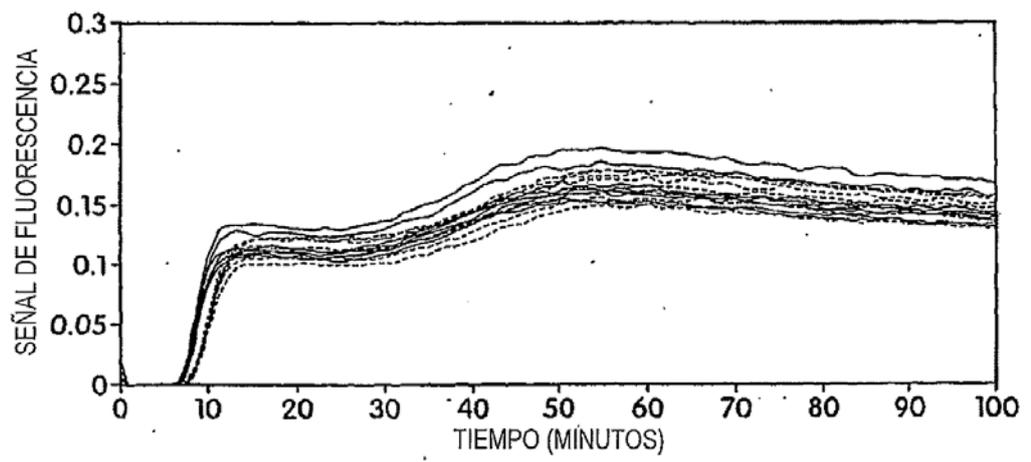


FIG. 19

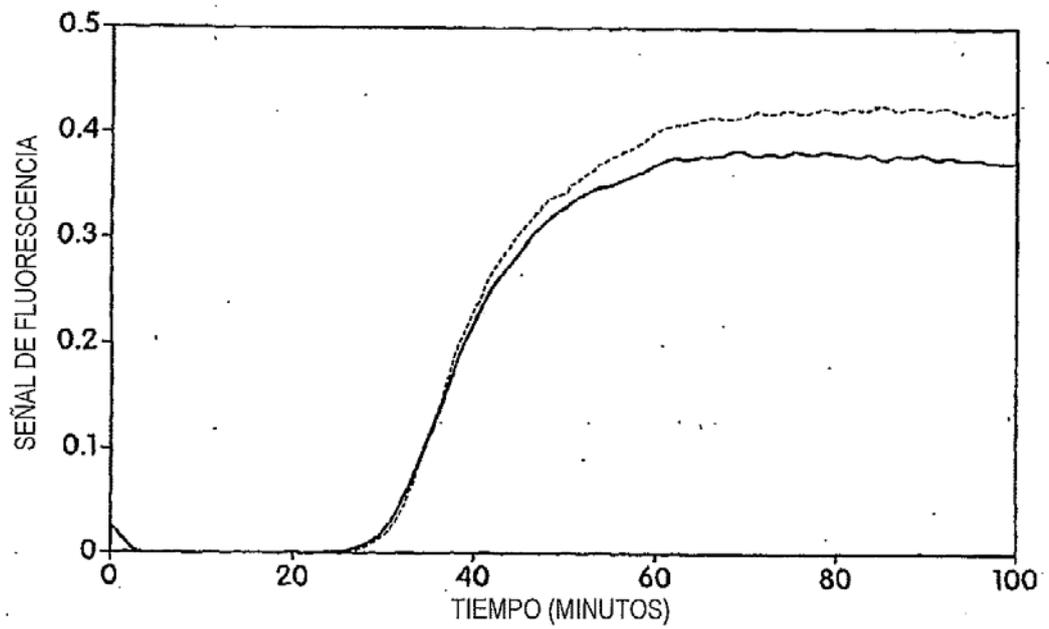


FIG. 20

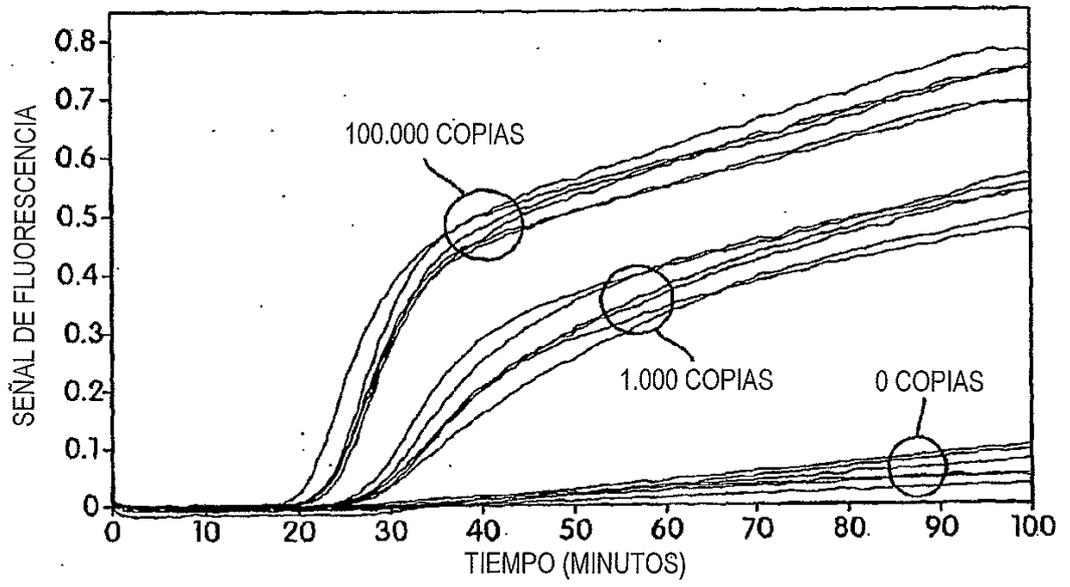


FIG. 21