

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 595**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

B01J 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2009 E 09711952 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.09.2015 EP 2245184**

54 Título: **Métodos de amplificación dependiente de helicasa y detección de polinucleótidos**

30 Prioridad:

22.02.2008 US 36048

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

19.01.2016

73 Titular/es:

**GREAT BASIN SCIENTIFIC (100.0%)
375 West 200 South, Suite 300
Salt Lake City UT 84101, US**

72 Inventor/es:

JENISON, ROBERT DELMAR

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 556 595 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de amplificación dependiente de helicasa y detección de polinucleótidos

5 **Antecedentes**

La incidencia de bacterias resistentes a antibióticos ha aumentado de manera importante en la última década. Si no se diagnostica y trata de manera adecuada, estos patógenos humanos pueden ocasionar una gama de enfermedades que suponen una amenaza para la vida, incluidos la septicemia y el síndrome de choque tóxico. El tratamiento temprano de estas infecciones está asociado con una mejora del resultado en pacientes. Los estudios de resultados clínicos muestran que la reducción en el tiempo de diagnóstico disminuye la duración de la estancia del paciente, así como la mortalidad y la morbilidad, lo que conduce a un ahorro de costes significativo para el hospital. Los métodos microbiológicos convencionales utilizados requieren de 24 a 72 horas para identificar el patógeno causante de la infección. Por tanto, existe creciente necesidad de una prueba rápida, fácil de realizar para identificar patógenos resistentes a antibióticos.

US-A-2003/105320 describe un método para detectar ácidos nucleicos en el que se prepara una placa de microvaloración que contiene sondas de baliza molecular. El ARN de la muestra se amplifica. La señal producida por el ARN unido se detecta mediante una señal fluorescente. Las sondas de baliza biotiniladas se unen a placas de microtitulación revestidas con estreptavidina, que pueden estar fabricadas de vidrio. Además, se describe la posibilidad de inmovilizar las balizas moleculares en un soporte sólido que sea compatible con un proceso de amplificación, por ejemplo, con reacciones de amplificación con isotermas diferentes.

GILL ET AL.; DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES, vol. 59(3), 2007, páginas 243-249 describe una amplificación de ADN isoterma dependiente de helicasa para la detección del ADN de ureC procedente de *H. pylori*. Los amplicones de ADN se detectan mediante un proceso enzimático después de su unión a una sonda biotinilada inmovilizada en una placa de microtitulación revestida con estreptavidina.

Sumario

La presente invención proporciona métodos, tal como se definen en las reivindicaciones, para amplificar y detectar dianas de polinucleótidos en solución en un único dispositivo. En un aspecto, un método para detectar una diana de polinucleótido en una muestra incluye aplicar la muestra y un medio de reacción a un soporte sólido revestido que comprende un sustrato sólido, una capa catiónica, y una pluralidad de sondas específicas de diana unidas al soporte sólido revestido. Las dianas de polinucleótidos de la muestra se amplifican a continuación mediante un proceso de amplificación dependiente de helicasa. Alternativamente, las dianas de polinucleótidos se hibridan en primer lugar con las sondas, se eluyen del soporte, y a continuación se amplifican en el mismo dispositivo, o se aplican a un segundo soporte sólido revestido para amplificación mediante un proceso de amplificación isotermo. El proceso de amplificación se lleva a cabo en condiciones adecuadas para amplificación/hibridación acoplada en condiciones de baja concentración salina. Se puede incluir una etapa de hibridación adicional con alta concentración salina para mejorar la hibridación y aumentar la sensibilidad de detección.

En la reacción de amplificación se pueden utilizar cebadores biotinilados para facilitar la detección de las dianas de polinucleótidos unidos capturados por las sondas en el soporte sólido revestido. A modo de ejemplo, los conjugados dirigidos contra biotina/peroxidasa de rábano picante se pueden unir a los productos de amplificación biotinilados inmovilizados sobre la superficie del soporte sólido revestido. La conversión catalizada por enzima de un sustrato cromógeno, tal como la tetrametilbencidina, puede dar como resultado la producción de una materia precipitable sobre la superficie del soporte sólido revestido, ocasionando una señal que se puede detectar visualmente a simple vista en condiciones de luz visible.

En otro aspecto, tal como se define en las reivindicaciones, un método para detectar dianas de polinucleótidos en una muestra incluye aplicar la muestra y un medio de reacción a un soporte sólido revestido que comprende un sustrato de silicio, una capa catiónica, y una pluralidad de sondas específicas de diana unidas a la capa catiónica. Las dianas de polinucleótidos de la muestra se amplifican a continuación mediante un proceso de amplificación dependiente de helicasa. El proceso de amplificación se lleva a cabo en condiciones adecuadas para amplificación/hibridación acoplada en condiciones de baja concentración salina. Se puede incluir una etapa de hibridación adicional con alta concentración salina para mejorar la sensibilidad. Mediante el uso de reactivos de detección adecuados, las dianas de polinucleótidos capturados por las sondas se pueden detectar visualmente como se describe a continuación.

La invención del solicitante se basa en el descubrimiento inesperado de que un soporte sólido configurado de forma catiónica que contiene sondas de captura específicas de diana inmovilizadas puede reducir los efectos negativos del desenrollado catalizado por helicasa y liberar los dupletes unidos a la superficie del soporte sólido revestido durante un proceso de amplificación/hibridación isotermo acoplado.

En una realización particular, el soporte sólido revestido incluye un sustrato de silicio y una capa catiónica unida a la misma. El soporte de silicio revestido no comprende una capa de recubrimiento (tal como una capa antirreflectante) que pueda mediar la detección visible a simple vista de las dianas de polinucleótidos mediante interferencia

destruictiva. Las sondas específicas de diana unidas a la capa catiónica se hibridan a continuación a las dianas de polinucleótidos de la muestra, que a continuación se detectan usando reactivos de detección adecuados.

Se describe un biosensor de silicio revestido para una detección visual directa de las dianas de polinucleótidos depositados en un soporte de silicio revestido que comprende un sustrato de silicio, una capa catiónica, y una pluralidad de sondas específicas de diana unidas al soporte de silicio revestido. El soporte de silicio revestido puede estar configurado para posibilitar la detección visual de las dianas de polinucleótidos de la muestra mediante un proceso que no está basado en los principios de interferencia destructiva, sino en su lugar, una combinación entre la dispersión de luz y la colorimetría. En particular, el solicitante ha descubierto inesperadamente un tipo de soporte de silicio que puede facilitar la detección visual rápida de las dianas de polinucleótidos unidos en condiciones de luz visible sin el uso de una capa antirreflectante que suele facilitar la detección de los analitos, incluidos los ácidos nucleicos, basándose en los principios de la interferencia destructiva.

La presente invención utiliza un sistema de amplificación dependiente de helicasa (HDA)/hibridación isoterma acoplado que se puede llevar a cabo en condiciones de baja concentración salina. Las reacciones de amplificación se llevan a cabo con cebadores de amplificación en fase solución en presencia del soporte de silicio o microchip que contiene la sonda en condiciones que proporcionan cinéticas de reacción de amplificación/hibridación en fase solución. La helicasa desnatura de forma continua los productos de amplificación. A medida que su concentración o concentraciones aumentan, los polinucleótidos desnaturados se pueden hibridar con los cebadores de oligonucleótidos, volverse a hibridar con las hebras complementarias o hibridarse a las sondas inmovilizadas sobre la superficie de un soporte sólido, como un microchip. Al finalizar la reacción, el soporte o chip se puede lavar, y se puede detectar la presencia de la diana de polinucleótido. Cuando se usa junto con un soporte basado en silicio, o microchip, tal como se describe en la presente memoria, el sistema de amplificación/hibridación acoplado puede soportar la detección visual directa de las dianas de polinucleótidos en condiciones de luz visible.

A partir de una muestra de 10 µl de sangre o un frotis nasal que contiene una cantidad tan baja como 10 copias de la secuencia diana, se pueden amplificar rápidamente elevadas concentraciones de material (de 10⁵ a 10¹⁰ copias de ADN producido dependiendo del enfoque). Ventajosamente, todas las etapas de generación de la señal se pueden llevar a cabo rápidamente en condiciones isotermas y de bajo contenido salino, generando señales muy sensibles visibles a simple vista sin ayuda. Dependiendo de la cantidad de dianas de polinucleótidos en la muestra, el proceso completo desde la extracción hasta la detección se puede completar en 1 hora, con solo 10 minutos de manipulación con un bajo coste mediante el uso de un soporte sólido revestido simple sin necesidad de instrumentación costosa o sofisticada.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa gráficamente la desnaturación mediada por helicasa e hibridación de dianas de polinucleótidos monocatenarios procedentes de alícuotas de productos amplificados mediante HDA diluidos 1/5000 en tampón de hibridación 1X (muy salino) o tampón HDA 1X (poco salino).

La Fig. 2 representa gráficamente la unión más estable de las dianas de polinucleótidos amplificados al soporte sólido revestido en condiciones de baja salinidad (IsoAmp II 1X) que en condiciones de alta salinidad (Hyb 1X).

La Fig. 3 representa gráficamente los tiempos de duplicación (Fig. 3A) y las tasas de duplicación (Fig. 3B) para los amplicones HDA producidos con conjuntos de cebadores seleccionados (J, L, Q, y P) dirigidos al gen *meCA* que especifica la resistencia a metilicina en *Staphylococcus*.

La Fig. 4 representa gráficamente un cálculo del tiempo previsto hasta el resultado (TTR) sobre obleas de silicio basado en el límite de detección inferior (LLOD) y los tiempos de duplicación de los amplicones.

La Fig. 5 representa gráficamente un análisis dosis-respuesta para calcular el límite de detección inferior (LLOD) del ADN de MRSA amplificado mediante HDA e hibridado en obleas de silicio revestido.

La Fig. 6 representa gráficamente un análisis del tiempo hasta el resultado (TTR) del ADN de MRSA amplificado mediante HDA e hibridado en obleas de silicio revestido.

La Fig. 7 representa gráficamente un análisis de la detección directa de HDA en chip en una oblea provista de un biosensor de película fina (En chip).

La Fig. 8 representa gráficamente la detección de amplicones de HDA procedentes de un aislado de hemocultivo en (izquierda a derecha): un chip envejecido (Envejecido), un chip no bloqueado (no bloqueado), un chip bloqueado con acetato de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) (bloqueado con NHS-Ac) y un chip bloqueado con anhídrido acético (bloqueado con AcAn).

La Fig. 9 representa gráficamente secuencias de oligonucleótidos y/o modificaciones estructurales utilizadas en los cebadores o sondas descritas en los Ejemplos siguientes.

Descripción detallada

Para proporcionar una comprensión clara y consistente de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones, se proporcionan las siguientes definiciones.

5 Las unidades, los prefijos y los símbolos se pueden denotar en su forma aceptada en el sistema internacional. Salvo que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha, en orientación de 5' a 3'. Los intervalos numéricos citados en la presente memoria incluyen todos los números que definen el intervalo e incluyen y son compatibles con todos los números enteros incluidos en el intervalo definido. Los aminoácidos se pueden citar en la presente memoria bien por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura de la IUPAC-IUBMB. Análogamente, los nucleótidos se pueden citar por sus códigos de una letra comúnmente aceptados. Salvo que se indique lo contrario, los términos “un” o “uno” deben tomarse para significar “al menos uno de”. Los encabezados de sección usados en la presente memoria tienen fines meramente organizativos, y no deben considerarse como limitantes de la materia sujeto descrita. En el caso de cualquier discrepancia de secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos en la memoria descriptiva, las figuras tienen veracidad.

20 En la presente memoria, la expresión “soporte sólido revestido” se refiere a una configuración de ensayo que incluye un sustrato sólido; una o más capas de revestimiento y una pluralidad de sondas específicas de diana unidas al soporte sólido revestido. Capas de revestimiento ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, capas catiónicas, capas de silano, capas de siloxano, capas antirreflectantes, materiales potenciadores de la densidad de la sonda, capas de unión, y similares.

25 En la presente memoria, el término “superficie” se refiere de forma general a un dominio covalente geoméricamente contiguo o a una región de un dominio geométrico que puede entrar en contacto directamente con el medio circundante y que puede tener grupos funcionales que pueden respaldar interacciones químicas entre polinucleótidos, sondas específicas de diana, y/o estructuras de superficie modificada químicamente mediante interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, interacciones de London, interacciones hidrófobas, o combinaciones de los mismos. Se puede utilizar una superficie de ion híbrido para soportar la adsorción de las biomoléculas. Una superficie del soporte sólido revestido puede fabricarse en el soporte sólido o puede ser una propiedad intrínseca del soporte sólido. Un ejemplo no limitante de fabricación de la superficie es la aminosilanización en donde grupos funcionales catiónicos se unen covalentemente al soporte sólido.

35 El término “sustrato sólido” se refiere a cualquier material que intrínsecamente tiene una superficie o a cualquier material que se puede modificar para crear una superficie que se pueda configurar para inmovilizar sondas de ácido nucleico. El sustrato sólido proporciona una superficie que se puede transferir de solución a solución para la detección de dianas de polinucleótidos, e incluye, aunque no de forma limitativa, portaobjetos, láminas, tiras, tiras reactivas, membranas, películas, filtros, cuentas, nanopartículas, partículas magnéticas, pozos de microtitulación, tubos, cadenas o cualquier superficie que se pueda configurar para inmovilización de sondas de ácido nucleico. Se puede formar un sustrato sólido a partir de silicio, vidrio, fibra de vidrio, plásticos tales como policarbonato, poliestireno o policloruro de vinilo, hidratos de carbono complejos, tales como agarosa y Sepharose™, resinas poliméricas incluidas las formadas a partir de acrílicos, tales como poliacrilamida, filtros de nitrocelulosa u otras membranas, materiales cerámicos, cuentas de látex, metales tales como oro, compuestos orgánicos e inorgánicos, o combinaciones de los mismos.

45 La expresión “capa catiónica” se refiere a una capa catiónica del soporte sólido revestido, comprendiendo la capa catiónica una pluralidad de grupos funcionales catiónicos a los que se unen sondas específicas de diana o agentes secundarios a los que se pueden unir sondas específicas de diana.

50 La expresión “capa antirreflectante” se refiere a un revestimiento de película fina que es antirreflectante para longitudes de onda específicas de luz, de manera que se creen cambios de color característicos de la superficie que sean resultado de la interferencia destructiva. Más particularmente, cuando la luz reflejada en la interfase de la superficie de película fina esté fuera de fase con la luz reflejada desde la interfase aire-película fina, se eliminan las longitudes de onda específicas de la luz reflejada por la interferencia destructiva de forma que se creen cambios de color característicos de la superficie de película fina.

55 El término “grupo funcional” se refiere al átomo o átomos responsables de las reacciones características de un compuesto. Por ejemplo, el grupo funcional de los alcoholes es -OH, el grupo funcional de los aldehídos es -CHO, el grupo funcional de los ácidos carboxílicos es -COOH. Un grupo funcional dado se comporta aproximadamente de la misma forma en todas las moléculas de las que forma parte. Una sola molécula puede tener una pluralidad de grupos funcionales. Los grupos funcionales pueden mediar, por ejemplo, en una interacción no covalente entre una superficie y un polinucleótido. Los grupos funcionales ilustrativos pueden incluir, aunque no de forma limitativa, a biotina, N-hidroxisuccinimida, vinilsulfona, quelatos de ion metálico (por ejemplo, Ni²⁺-NTA), grupo de unión a glutatión, amino, aldehído, epoxi, mercapto, maleimida, heparina, metoxi, sulfonato, silano, azida, acrilato, aldehído, isocianato, fosfonato, y epoxi.

65 El término “ácido nucleico” se refiere a un polidesoxirribonucleótido (ADN o análogo del mismo) o polirribonucleótido (ARN o análogo del mismo) fabricado de al menos dos, y preferiblemente diez o más bases unidas mediante una

estructura principal. En el ADN, las bases comunes son adenina (A), guanina (G), timina (T) y citosina (C), mientras que en el ARN, las bases comunes son A, G, C y uracilo (U, en lugar de T), aunque los ácidos nucleicos pueden incluir bases análogas (por ejemplo, inosina) y posiciones abásicas (es decir, una estructura principal de fosfodiéster que carece de un nucleótido en una o más posiciones, US-5.585.481. Los ácidos nucleicos ilustrativos incluyen polinucleótidos monocatenarios (ss), bicatenarios (ds), o tricatenarios, u oligonucleótidos de ADN y ARN.

El término “polinucleótido” se refiere a ácidos nucleicos que contienen más de 10 nucleótidos.

En la presente memoria, el término “oligonucleótido” se refiere a un ácido nucleico monocatenario que contiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 100 nucleótidos.

La expresión “estructura principal de ácido nucleico” se refiere a grupos o enlaces de ácidos nucleicos, incluidos, aunque no de forma limitativa, uniones azúcar-fosfodiéster, enlaces 2'-O-metilo, enlaces de guanidina en ADN (“GDN”), enlaces de S-metilurea, enlaces de metilfosfonato, enlaces de fosforoamidato, modificaciones de la estructura principal de amida como en poliamida o ácidos nucleicos peptídicos (APN), enlaces de fosfortioato, enlaces de ácido de éster fosfónico, enlaces de oligonucleótido de piranolilo, enlaces de ácido biclonucleico y triclonucleico, enlaces de formacetal y enlaces de 3'-tioformacetal, enlaces de morfolino, u otras modificaciones del enlace natural fosfodiéster internucleósido, o combinaciones de dichos enlaces en una única estructura principal. Una estructura principal de ácido nucleico puede incluir una mezcla de enlaces en el propio ácido nucleico (por ejemplo, enlaces de azúcar-fosfodiéster y enlaces 2'-O-metilo) o pueden ser todos el mismo tipo de enlace (todos 2'-O-metilo o todos con modificaciones de amida).

El término “muestra” se refiere a cualquier fuente de muestra biológica que contiene o se sospecha que contiene un diana de polinucleótido o secuencia de diana de polinucleótido. La muestra de ensayo se puede derivar de cualquier fuente biológica, tal como, por ejemplo, sangre, lavado alveolar, saliva, frotis de garganta, fluido de lentes oculares, líquido cefalorraquídeo, sudor, esputo, orina, leche, fluido ascítico, mucosa, líquido sinovial, fluido peritoneal, fluido amniótico, tejidos, caldos de fermentación, cultivos celulares, mezclas de reacción química, y similares. La muestra de ensayo se puede usar (i) tal como se obtiene directamente a partir de una muestra fuente o (ii) después de un pretratamiento para modificar el carácter de la muestra. Así, la muestra de ensayo se puede pretratar antes del uso mediante, por ejemplo, la preparación de plasma a partir de sangre, células rotas, preparación de líquidos a partir de materiales sólidos, diluir fluidos viscosos, filtración de líquidos, destilación de líquidos, concentración de líquidos, inactivación de componentes interferentes, adición de reactivos, purificación de ácidos nucleicos, y similares.

Los términos “diana de polinucleótido”, “secuencia diana”, y “ácido nucleico diana” se utilizan de forma indistinta, y se refieren a un ácido nucleico en una muestra de ensayo que tiene una secuencia de bases de nucleótidos a la que otra secuencia, tal como una sonda específica de diana, se une mediante emparejamiento de bases complementarias convencional. El diana de polinucleótido se dirige a una secuencia de ácido nucleico que se puede detectar, amplificar o tanto amplificarse como detectarse. El diana de polinucleótido se proporciona generalmente en estado disuelto, que a continuación se hibrida con una sonda específica de diana. Las dianas de polinucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, y pueden comprender ADN, ARN, así como combinaciones o derivados de los mismos. La secuencia diana puede ser una parte relativamente pequeña de un ácido nucleico, un ácido nucleico más grande, tal como una subsecuencia específica incluida en un ADN genómico o en un ARN mensajero (ARNm). Los expertos en la materia apreciarán que un ácido nucleico diana puede existir en diferentes formas, es decir, monocatenario, bicatenario, tricatenario, o mezclas de los mismos, tal como en una estructura en horquilla parcialmente bicatenaria o una estructura en duplete parcialmente bicatenaria, y apreciarán adicionalmente que una secuencia diana pueda estar presente en cualquier hebra (+ o -) de la estructura. Por simplicidad, un ácido nucleico diana se puede describir como todo o parte de una sola hebra, pero esto no significa limitar el significado de una diana a una hebra de ácido nucleico individual o particular. Es bien conocido en la técnica que un ácido nucleico multicatenario se convierte fácilmente en sus componentes monocatenarios usando los métodos convencionales, tales como por calentamiento de un ácido nucleico por encima de su temperatura de fusión (Tm) y/o mediante el uso de desnaturalizantes químicos.

La expresión “sonda específica de diana” se refiere a un polinucleótido unido a una superficie que se une específicamente a una secuencia diana de polinucleótido y cuya unión puede producir, de forma directa o indirecta, una señal detectable que indica la presencia de la secuencia de diana de polinucleótido. Preferiblemente, la sonda específica de diana es un oligonucleótido monocatenario que tiene una longitud comprendida entre aproximadamente 12 nucleótidos y aproximadamente 60 nucleótidos. La sonda específica de diana se puede unir a una marca durante la etapa de detección posterior a la hibridación. Las sondas específicas de diana marcadas incluyen conectores y/o marcas en los mismos (véanse, por ejemplo, US-5.185.439, US-5.283.174, US-5.585.481 y Us-5.639.604).

El término “bloqueado” se refiere a un grupo funcional (de un polinucleótido, polipéptido o agente no polimérico) que está modificado o derivatizado químicamente para volver el grupo funcional químicamente inerte, o para reducir o eliminar el reconocimiento enzimático como resultado de la modificación o derivatización. A modo de ejemplo, un extremo de una sonda específica de diana puede quedar bloqueada (por ejemplo, mediante un “grupo bloqueante”) mediante la reacción o la inclusión de un grupo químico y/o elemento estructural que convierte la sonda en menos adecuada para reconocimiento (o reacción) mediante una enzima, tal como una helicasa o ADN polimerasa, evitando o reduciendo sustancialmente de esta forma, por ejemplo, que la enzima se una al extremo bloqueado, o cerca del extremo bloqueado, o catalice una reacción enzimática en o cerca del extremo bloqueado. Una “sonda bloqueada” o “sonda de oligonucleótido bloqueada”

se puede crear mediante la modificación estructural de un oligonucleótido ya existente, o diseñando previamente mediante ingeniería genética una modificación o elemento estructural adecuado en el diseño original de, por ejemplo, una sonda de oligonucleótido comercial. Los grupos amino libres de las capas catiónicas se pueden “bloquear” de forma análoga para proporcionar un nivel deseable de densidad de carga/reactividad en una superficie revestida del soporte sólido.

La expresión “sonda modificada”, “sonda específica de diana modificada”, y “oligonucleótido modificado” se refiere a un ácido nucleico monocatenario que tiene una estructura no convencional, que incluye al menos un elemento estructural de ácido nucleico que no aparece en el ADN genómico humano. Por lo general, esto se refiere a una variante intencionada de los clásicos restos de ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos adenina, timina, guanina, citosina o uracilo, unidos mediante enlaces fosfodiéster. El elemento no estructural se puede añadir a un oligonucleótido convencional, o se puede incluir en el diseño del oligonucleótido durante su síntesis. Cuando se usa en el contexto de la presente memoria, significará por lo general: (1) una variante de los nucleótidos clásicos que conduce a una mayor eficacia de unión cuando una sonda específica de diana se hibrida a una diana de polinucleótido cuando se compara con otra sonda específica de diana por otra parte idéntica que contiene los nucleótidos clásicos; y/o (2) una variante de los nucleótidos clásicos que produce un sustrato con rasgos estructurales que le proporciona una reducción o eliminación del reconocimiento mediante una enzima de amplificación isoterma de la sonda específica de diana unida a la diana de polinucleótido o le proporciona una reducción o eliminación en la desnaturalización enzimática de la sonda unida a la diana de polinucleótido (en comparación con una sonda específica de diana por otra parte idéntica que contiene los nucleótidos clásicos).

El término “cebador” se refiere a un ácido nucleico monocatenario que puede unirse a una región monocatenaria de un diana de polinucleótido para facilitar la replicación y/o amplificación dependiente de la polimerasa de la diana de polinucleótido.

El término “polímero” se refiere a una cadena de moléculas compuesta por unidades estructurales y unidades repetitivas conectadas mediante un enlace covalente químico.

El término “silano” o “reactivo silanizante” se refiere a un compuesto o reactivo que contiene un átomo de silicio con o sin una cadena polimérica de unidades repetitivas. Los silanos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, organosilanos, aminosilanos, vinilsilanos, epoxisilanos, metacrisilanos, sulfursilanos, alquilsilanos, polialquilsilanos, (alquil)alcoxisilanos, aminoalquilsilanos, (aminoalquil)alcoxisilanos (tales como (3-aminopropil)trietoxisilano), y similares.

El término “siloxano” se refiere a un compuesto polimérico que contiene una unidad molecular silicio-oxígeno-silicio (Si-O-Si).

Cuando se aplica a polinucleótidos, el término “amplificación” se refiere a cualquier procedimiento in vitro conocido para producir múltiples copias de un fragmento de diana de polinucleótido (es decir, “amplicones”) de una forma lineal o exponencial con la ciclación de temperatura (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa, PCR) o sin ciclación de temperatura (por ejemplo, amplificación isoterma).

La expresión “amplificación isoterma” se refiere a un proceso de amplificación que no requiere ciclación de temperatura entre las etapas de polimerización y desnaturalización del ácido nucleico. Por tanto, las etapas de polimerización y amplificación en un proceso de amplificación isoterma se pueden llevar a cabo en condiciones de temperatura sustancialmente constantes. Las temperaturas isotermas de las reacciones de amplificación isoterma suelen estar por lo general por debajo de la temperatura de fusión (T_m , la temperatura a la cual la mitad de las posibles moléculas bicatenarias de una mezcla se encuentran en el estado desnaturalizado monocatenario) del producto de reacción predominante, por lo general 90 °C, o inferior, y normalmente entre 37 °C a aproximadamente 75 °C.

Aunque la reacción de polimerización se puede producir en condiciones isotermas, un proceso isoterma puede incluir opcionalmente una etapa de preamplificación con desnaturalización térmica para generar un ácido nucleico diana monocatenario a utilizar en la etapa de amplificación isoterma.

La expresión “enzima de amplificación isoterma” se refiere a una enzima asociada con un proceso de amplificación, incluidos, aunque no de forma limitativa, polimerasas, enzimas de desnaturalización enzimática, tales como helicasas, y enzimas de desnaturalización auxiliares, incluidas proteínas de unión monocatenarias y similares. Una enzima de amplificación isoterma puede ser termófila o mesófila.

Las expresiones “amplificación dependiente de helicasa” y “HDA” se utilizan indistintamente para describir un proceso de reacción in vitro para amplificar ácidos nucleicos que utilizan una preparación de helicasa para desenrollar un ácido nucleico bicatenario para generar plantillas para hibridación de cebadores y posterior extensión del cebador mediante una o más enzima(s) polimerasa(s). HDA utiliza dos cebadores oligonucleótidos, un primer cebador que se hibrida con una secuencia complementaria en el sentido de la hebra de una secuencia de diana de polinucleótido y un segundo cebador que se hibrida con una secuencia complementaria en el sentido contrario a la hebra de una secuencia de diana de polinucleótido, en donde los dos cebadores definen los límites exteriores de la diana de polinucleótido amplificado. La reacción HDA conforma un método general para amplificar ácidos nucleicos dependiente de helicasa.

Los términos “hibridación” e “hibridar” se utilizan indistintamente para referirse a la unión de un cebador o sonda específica de diana a una región monocatenaria de la diana de polinucleótido en condiciones en las que el cebador o la sonda se une específicamente con su secuencia complementaria de la diana de polinucleótido, pero no a otras regiones del polinucleótido. La especificidad de la hibridación se puede ver afectada por la longitud del cebador de oligonucleótido, la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción de hibridación, la fuerza iónica, y el pH.

Los términos “complementario” o “complementariedad de” se utilizan en el contexto de ácidos nucleicos para denotar que una secuencia de nucleótidos de una hebra de ácido nucleico se puede unir mediante enlace de hidrógeno a otra secuencia de una hebra de ácido nucleico opuesta debido a la orientación de los grupos funcionales. Las bases complementarias son típicamente, en el ADN, A con T y C con G, y, en el ARN, C con G, y U con A. “Sustancialmente complementario” significa que una secuencia de una hebra no es totalmente y/o perfectamente complementaria con una secuencia de la hebra opuesta, pero que se produce una unión suficiente entre las bases de las dos hebras para formar un complejo híbrido estable en las condiciones de hibridación (por ejemplo, concentración de sal y temperatura). Dichas condiciones se pueden predecir mediante el uso de las secuencias y métodos de cálculo matemático conocidos por el experto en la técnica para predecir la T_m de las hebras hibridadas, o mediante determinación empírica de la T_m por métodos rutinarios. T_m se refiere a la temperatura a la que una población de complejos hibridados formados entre dos hebras de ácido nucleico están desnaturalizadas en un 50%. A una temperatura por debajo de la T_m , se favorece la formación de un complejo de hibridación, mientras que a una temperatura por encima de la T_m , se favorece la fusión o separación de las hebras del complejo de hibridación. La T_m se puede estimar para un ácido nucleico que tiene un contenido G+C conocido en una solución acuosa de NaCl 1 M usando, por ejemplo, $T_m = 81,5 + 0,41(\% \text{ G+C})$, aunque son conocidos en la técnica otros cálculos de la T_m que tienen en consideración otras características estructurales del ácido nucleico.

La expresión “condiciones adecuadas para hibridación” se refiere a condiciones ambientales acumuladas suficientes para facilitar la unión específica de una primera hebra de ácido nucleico a una segunda hebra de ácido nucleico mediante interacciones entre hebras complementarias y enlaces de hidrógeno de forma que dé como resultado un complejo de hibridación estable, o híbrido. Dichas condiciones incluyen los componentes químicos y sus concentraciones (por ejemplo, sales, agentes quelantes, formamida) de una solución acuosa u orgánica que contiene los ácidos nucleicos, y la temperatura de la mezcla. Como conocen los expertos en la materia, otros factores bien conocidos, tales como la duración del tiempo de incubación o las dimensiones de la cámara de reacción pueden contribuir al entorno.

Las expresiones “alto contenido en sal” o “condiciones de alta salinidad” se utilizan en la presente memoria con referencia a las condiciones de hibridación que tienen una concentración de cationes monovalentes superior a aproximadamente 0,5 M.

Las expresiones “bajo contenido en sal” o “condiciones de baja salinidad” se utilizan en la presente memoria con referencia a condiciones en las que la concentración de cationes monovalentes está entre aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, preferentemente entre aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM.

Los términos “fusión”, “desenrollado” o “desnaturalización” se refieren a separar todo o parte de dos hebras complementarias de un duplete de ácido nucleico.

El término “helicasa” se refiere a una enzima necesaria para desenrollar o desnaturalizar un ácido nucleico solo o combinado con al menos una proteína auxiliar de helicasa.

La expresión “proteína auxiliar de helicasa” se refiere a una proteína adicional que puede ser necesaria para la actividad helicasa o para estimular la actividad helicasa. Las proteínas auxiliares de helicasa incluyen proteínas de unión a ADN monocatenario (SSB), que pueden ser necesarias para desenrollar ácidos nucleicos cuando se utilizan helicasas mesófilas. La proteína MutL de *E. coli* es una proteína auxiliar ilustrativa para potenciar la actividad UvrD de fusión de la helicasa.

La expresión “preparación de helicasa” se refiere a una mezcla de helicasa(s) y/o proteínas auxiliares de helicasa necesaria y suficiente para desenrollar o desnaturalizar enzimáticamente un ácido nucleico. Cuando se utiliza una helicasa termoestable en una preparación de helicasa, la presencia de una proteína de unión monocatenaria puede ser opcional. Una preparación de helicasa, cuando se combina con una ADN polimerasa, un molde de ácido nucleico, tripolifosfatos de desoxinucleótido, y cebadores es capaz, de forma general, de conseguir una amplificación isoterma del ácido nucleico in vitro.

Los términos “unido” y “enlazado” se utilizan indistintamente para referirse a cualquier conexión química entre dos componentes o compuestos, incluidas conexiones químicas tanto directas como indirectas. La conexión puede ser de tipo covalente o no covalente. Los ejemplos de uniones no covalentes incluyen, aunque no de forma limitativa, interacciones electrostáticas, interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno, interacciones de Van Der Waals, interacciones dipolo-dipolo, e interacciones hidrófobas.

El término “marca” se refiere a un resto molecular, compuesto o conjugado que está unido directa o indirectamente a una sonda específica de diana o diana de polinucleótido para detección (por ejemplo, un polinucleótido amplificado),

conteniendo las marcas características, físicas o químicas que pueden desencadenar una señal detectable y/o mensurable indicativa de la formación del duplete entre una sonda específica de diana y una diana de polinucleótido complementario, incluidas, aunque no de forma limitativa, señales catalizadas por enzimas, y similares. El marcado directo se puede producir mediante enlaces o interacciones que unen la marca al polinucleótido (por ejemplo, enlaces covalentes o interacciones no covalentes), mientras que el marcado indirecto se puede producir mediante el uso de un “conector” o “resto de unión con puente”, tal como un oligonucleótido o anticuerpo, que puede estar marcado adicionalmente directa o indirectamente. Las marcas ilustrativas pueden incluir aunque no de forma limitativa cromóforos; tintes ópticamente detectables, partículas o compuestos entre los que se incluyen compuestos colorimétricos, luminiscentes, fluorescentes, bioluminiscentes, quimioluminiscentes, y fosfoluminiscentes; anticuerpos; compuestos hapténicos o antigénicos utilizados junto con un anticuerpo marcado adecuadamente; ligandos específicos o miembros de moléculas asociadas que contienen un sitio de reconocimiento de ligando, tales como biotina o avidina; enzimas; cofactores o sustratos de enzimas; secuencias de nucleótidos complementarios; enzimas, cofactores o sustratos de enzimas; radioisótopos; y similares. Los restos de unión con puente pueden incluirse adicionalmente para amplificar una señal detectable. Además, la marca puede incluir una variedad de diferentes grupos reactivos o funcionalidades químicas adecuadas para unión a una variedad de agentes de biomolécula.

Se entenderá que las marcas directamente detectables pueden requerir componentes adicionales tales como, por ejemplo, sustratos, reactivos disparadores, luz, y similares, para permitir la detección de la marca. Cuando se usan marcadores detectables indirectamente, se suelen utilizar junto con un “conjugado”. Un conjugado es, de forma típica, un elemento de unión específica que se ha unido o acoplado a una marca detectable directamente. Las químicas de acoplamiento para sintetizar un conjugado son bien conocidas en la técnica y pueden incluir, por ejemplo, cualquier medio químico y/o físico que no destruya la propiedad de unión específica del elemento de unión específica o la propiedad detectable de la marca.

El término “señal” se refiere a una propiedad o característica de una marca detectable que permite que se detecte y/o se distinga visualmente o instrumentalmente. Las señales ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa, señales cromógenas, señales fluorescentes, señales quimioluminiscentes, señales radiactivas, y similares.

La expresión “límite inferior de detección” (o “LLOD”) se refiere a la menor concentración de la diana que se puede detectar visualmente en un ensayo que utiliza equipo de laboratorio convencional.

La presente invención proporciona métodos, tal como se definen en las reivindicaciones, para amplificar y detectar dianas de polinucleótidos en solución. El método emplea una amplificación/hibridación/detección combinadas de diana(s) de polinucleótido(s) acoplada en una muestra e incluye aplicar la muestra y un medio de reacción a un soporte sólido revestido que comprende un soporte sólido, una capa catiónica, y una pluralidad de sondas específicas de diana unidas al soporte sólido revestido. Las dianas de polinucleótidos de la muestra se amplifican mediante un proceso de amplificación dependiente de helicasa isoterma y al mismo tiempo se hibridan con sondas específicas de diana en condiciones de baja salinidad.

Se describen soportes sólidos revestidos y su uso en métodos para una amplificación rápida con detección en el punto de asistencia sanitaria de dianas de polinucleótidos unidos a los soportes sólidos revestidos. El solicitante ha descubierto inesperadamente un método para amplificar y detectar rápidamente un diana de polinucleótido en un proceso isoterma de amplificación/hibridación/detección acoplado. El solicitante ha determinado que un soporte sólido configurado catiónicamente que contiene sondas de captura específicas de diana inmovilizadas puede reducir los efectos negativos del desenrollado y liberación de los dupletes unidos a la superficie desde el soporte sólido revestido durante un proceso de amplificación/hibridación dependiente de helicasa isoterma acoplado, que por otra parte podría reducir la detección de dupletes capturados, especialmente en condiciones de baja salinidad. Los efectos negativos del desenrollado y liberación de los dupletes durante el proceso de amplificación/hibridación isoterma acoplado también se pueden reducir usando sondas de captura específicas de diana modificadas o provistas de un elemento estructural para reducir o eliminar el reconocimiento mediante una enzima de amplificación isoterma (tal como la helicasa) cuando está unida a un diana de polinucleótido.

Además, el sistema de amplificación/hibridación/detectado acoplado de la presente invención se puede llevar a la práctica sin necesitar etapas independientes o adicionales dirigidas a la desnaturalización o a la hibridación de los materiales del amplificación a sondas de captura de ADN monocatenario inmovilizadas en una superficie.

Los soportes revestidos que contienen la sonda proporcionan una cinética de la reacción de amplificación/hibridación isoterma más óptima. La reacción de amplificación isoterma se lleva a cabo en fase solución en el soporte sólido revestido que contiene la sonda usando una helicasa adecuada, productos auxiliares, y cebadores específicos de la diana. A medida que la concentración o concentraciones de la diana de polinucleótido amplificado aumentan, las dianas de polinucleótidos se pueden hibridar con los cebadores de oligonucleótidos, volverse a hibridar con las hebras complementarias o hibridarse a las sondas inmovilizadas sobre la superficie de un soporte sólido, como un microchip. Las sondas específicas de diana se pueden modificar adicionalmente, o proveerse de un elemento estructural para reducir o eliminar el reconocimiento mediante una enzima de amplificación isoterma (como una helicasa) cuando está unida a un diana de polinucleótido. Los productos de amplificación se desnaturalizan de manera continua por la helicasa en una reacción de amplificación dependiente de helicasa en condiciones compatibles con la hibridación de productos de reacción monocatenarios a un

soporte sólido revestido en la forma de un chip biosensor. Al finalizar las reacciones de amplificación/hibridación, el soporte o chip se puede lavar, y se puede detectar la presencia de la diana de polinucleótido.

I. Componentes materiales de la presente invención

1. Muestra y procesamiento de la muestra

Una muestra para usar en el presente método incluye cualquier fuente de ácido nucleico que contiene o potencialmente contiene un diana de polinucleótido para detección. De esta forma, una muestra puede incluir una preparación o extracto de polinucleótido procedente de cualquier fuente que contiene ácido nucleico, incluidas células animales, células microbianas, tales como bacterias y hongos, virus, o combinaciones a partir de las mismas. Los ácidos nucleicos se pueden extraer de cualquier material fuente de polinucleótido usando metodologías de extracción convencionales conocidas de los expertos en la técnica, incluidas muestras clínicas de sangre (por ejemplo, 10 μ l) o frotis nasales. Un extracto de ácido nucleico se puede diluir en un tampón de reacción para amplificación directa. En otras realizaciones, la muestra puede incluir productos de reacción de un proceso de amplificación de ácido nucleico isoterma o procesos de amplificación del ácido nucleico convencionales, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2. Soporte sólido revestido

El soporte sólido revestido para la detección de dianas de polinucleótidos incluye un sustrato sólido, una capa catiónica, y una pluralidad de sondas específicas de diana unidas al soporte sólido revestido.

Un soporte sólido revestido para la detección de una diana de polinucleótido incluye un biosensor basado en silicio para la detección visual de un diana de polinucleótido en una muestra. El biosensor basado en silicio incluye un soporte de silicio revestido que comprende un sustrato de silicio, una capa catiónica y una pluralidad de sondas específicas de diana unidas al soporte de silicio revestido, mediante lo cual el soporte de silicio revestido está configurado para posibilitar la detección visual de las dianas de polinucleótidos en la muestra y no comprende una capa de revestimiento que pueda mediar en la detección visual directa de las dianas de polinucleótidos mediante interferencia destructiva. En un aspecto particular, el soporte de silicio revestido no comprende una capa antirreflectante usada en los sensores de película fina.

2.1. Sustrato sólido

Un sustrato sólido puede ser cualquier material que intrínsecamente tiene una superficie o cualquier material que se puede modificar para crear una superficie a la que se puede unir un ácido nucleico monocatenario, tanto de forma covalente como de forma no covalente. Se puede formar un sustrato sólido a partir de silicio, vidrio, plástico, polipropileno, materiales cerámicos, materiales metálicos, materiales orgánicos, materiales inorgánicos, o combinaciones de los mismos. Un soporte sólido puede tener la forma de un portaobjetos, microchip, micromatriz, placa de microvaloración, tira reactiva, lámina, filtro de membrana, película, cuenta, o cualquier otra forma de soporte adecuada conocidas en la técnica.

El sustrato sólido puede ser poroso o no poroso. Los sustratos no porosos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, materiales habitualmente utilizados en la construcción de micromatrices de ácido nucleico, tales como portaobjetos de vidrio, portas de vidrio con la superficie derivatizada, obleas de silicio, o cualquiera de una variedad de plásticos de calidad laboratorio. Los materiales de sustratos plásticos pueden ser poli(ácido metacrílico), polietileno, polipropileno, poliacrilato, polimetilmetacrilato, policloruro de vinilo, politetrafluoroetileno, poliestireno, policarbonato, poliacetato, polisulfona, acetato de celulosa, nitrato de celulosa, nitrocelulosa, y mezclas de los mismos.

Los sustratos porosos ilustrativos incluyen filtros de membrana absorbentes y no absorbentes. Los filtros para unión y detección de ácido nucleico son bien conocidos en biología molecular e incluyen, por ejemplo, filtros hechos de nitrocelulosa, nylon o nylon derivatizado cargado positivamente.

El sustrato sólido puede tener la forma de una oblea de silicio, o chip. La oblea de silicio para uso en la presente invención puede incluir una superficie no pulida "del lado rugoso" usada para la aplicación de capas catiónicas y/o sondas. Una superficie de silicio con un lado rugoso se puede proporcionar mediante el uso de una oblea de silicio que tiene un lado pulido y un lado rugoso no pulido. La superficie del lado rugoso no pulido puede tener una rugosidad caracterizada por un intervalo de pico a valle comprendido de aproximadamente 1 μ m a aproximadamente 10 μ m, de aproximadamente 1 μ m a aproximadamente 5 μ m, o de aproximadamente 0,5 μ m a aproximadamente 2 μ m. La rugosidad de la superficie se puede controlar o modular mediante el tiempo de exposición a un baño cáustico (por ejemplo, NaOH concentrado, 90 °C). En una realización particular, la superficie de silicio rugosa no pulida se somete al baño cáustico durante aproximadamente 15 segundos.

Los solicitantes han descubierto inesperadamente que la superficie del lado rugoso de la oblea de silicio se puede emplear sin pulido adicional para proporcionar un medio de detección visual sin necesidad de pulido adicional o revestimientos de película fina para conseguir un sistema de detección visual basado en interferencia. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que el lado rugoso de la superficie de silicio puede posibilitar la

detección visual de las dianas de polinucleótidos mediante un proceso que no está basado en los principios de la interferencia destructiva, sino en su lugar, una combinación entre la dispersión de luz y la colorimetría.

Se puede utilizar un soporte sólido revestido (o biosensor) revestido de película en el que un lado pulido de una oblea de silicio se reviste con una capa antirreflectante para proporcionar un medio de detección visual de las dianas de polinucleótidos mediante la interferencia destructiva. La capa antirreflectante se puede formar como revestimiento de nitruro de silicio como se ha descrito anteriormente (Jenison y col., Expert Rev. Molec. Diagn., 2006). Una capa de unión adicional que comprende polidimetilsiloxano de estructura T se puede formar sobre lo anterior para facilitar la conjugación con las sondas específicas de diana. Los biosensores ilustrativos de película fina, que incluyen capas de unión para uso en un biosensor de película fina para usar en los métodos de la presente invención se han descrito en US-5.955.377 y en la solicitud de patente US-A-2008/003693.

Los sustratos sólidos para usar en la presente invención se pueden moldear en cualquiera de una variedad de formas y conformaciones. Los ejemplos de dichas formas y conformaciones incluyen, aunque no de forma limitativa, láminas, películas, portaobjetos, geles, espumas, filamentos, hebras, membranas, cuentas, placas y similares. Los sustratos se pueden fabricar en la forma de un dispositivo plano que tiene áreas discretas aisladas en forma de pocillos, depresiones, pedestales, parches hidrófobos o hidrófilos, depósitos de adhesivo cortados a troquel u otras barreras físicas al flujo de fluidos. Los ejemplos de dichos sustratos incluyen, aunque no de forma limitativa, portaobjetos, microplacas, láminas, películas, tiras reactivas, y similares. Como los dispositivos son especialmente útiles en la preparación de matrices de polinucleótido para la detección de dianas de polinucleótidos, una capa catiónica se fabrica preferiblemente sobre un dispositivo que tiene al menos una superficie plana, tal como un portaobjetos.

El tamaño del soporte sólido revestido puede variar, dependiendo del uso final de las dianas de polinucleótidos inmovilizados. Los expertos en la técnica apreciarán que las matrices de polinucleótidos inmovilizados sobre sustratos sólidos miniaturizados han estado en desarrollo durante varios años. Estos sustratos sólidos se pueden medir en términos de mm^2 de área de la superficie plana, y pueden tener numerosos dianas de polinucleótidos inmovilizados diferentes, cada uno unido a una ubicación diferente específica del sitio en el soporte sólido miniaturizado. También se pueden utilizar sustratos sólidos en forma de portaobjetos o tiras reactivas. Como es conocido en la técnica, las tiras reactivas tienen forma rectangular, midiendo cada lado unos pocos centímetros.

El sustrato sólido puede incluir un material que potencia la densidad de la sonda en forma de una cuenta o aglomerado que contiene una superficie catiónica revestida. Las cuentas pueden proporcionar un medio para aumentar la densidad de la sonda sobre el soporte sólido revestido. Una cuenta puede constituir un sustrato sólido tal como se ha definido en la presente invención o puede constituir adicionalmente un material potenciador de la densidad de la sonda para unión a otros sustratos sólidos o revestimiento de sustratos sólidos. Las cuentas pueden proporcionar una variedad de químicas o funcionalidades en la superficie (por ejemplo, amina, carboxilo, hidroxilo, etc.) adecuado para convertir la cuenta en catiónica, por ejemplo, mediante aminación, o mediante unión directa o indirecta al polímero catiónico.

Las composiciones adecuadas de las cuentas incluyen las utilizadas en síntesis de péptidos, ácidos nucleicos y restos orgánicos, e incluyen, por ejemplo, plásticos tales como poliestireno, metilestireno, polímeros acrílicos, materiales cerámicos, vidrio, materiales poliméricos, tales como dextranos reticulados, celulosa, nylon, y látex, materiales paramagnéticos, dióxido de titanio, látex. Las cuentas pueden abarcar cualquier tipo de esfera sólida o hueca, bola, rodamiento, cilindro, u otra configuración de sólidos, que puede ser de tipo poroso o no poroso. El uso de cuentas porosas puede aumentar el área superficial de la cuenta disponible para detección del ácido nucleico. Los tamaños de la cuenta están comprendidos de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 5 mm, preferiblemente de aproximadamente 0,2 μm a aproximadamente 200 μm , más preferiblemente de aproximadamente 0,5 μm a aproximadamente 5 μm . Los métodos para unir sondas específicas de diana a las superficies de las cuentas se describen, por ejemplo, en US-5.514.785.

Una superficie o capa en el soporte sólido se puede bloquear o envejecer para reducir la pasivación (o unión no específica) de la superficie de los componentes de reacción de forma que interfiera con la amplificación y/o la detección de los polinucleótidos unidos a las sondas. Por ejemplo, las aminas fácilmente accesibles de la superficie se pueden bloquear mediante tratamiento con NHS-acetato o anhídrido acético. Además, los soportes sólidos, incluidos los sustratos de silicio, se pueden envejecer (por ejemplo, 3-12 meses) para reducir la pasivación superficial de los componentes de reacción de la misma.

2.2. Capa catiónica.

Los solicitantes han descubierto inesperadamente que se puede usar una capa catiónica junto con sondas inmovilizadas sobre un soporte sólido revestido para reducir la liberación y/o el aumento de la detección de las secuencias diana capturadas sobre la superficie de soporte revestido, reduciendo de esta forma los efectos potencialmente negativos del desenrollado catalizado mediante helicasa y la liberación de dupletes unidos desde la superficie del soporte revestido. Adicionalmente, al contrario de las expectativas convencionales, los solicitantes han descubierto adicionalmente que el uso de una capa de revestimiento catiónico puede realmente estabilizar la unión y la detección resultante de los dupletes de polinucleótido unidos sobre la superficie del soporte sólido revestido en condiciones de baja salinidad en mayor medida que en condiciones de alta salinidad usadas normalmente para facilitar la hibridación.

5 La capa catiónica se puede configurar de forma que una proporción de los grupos funcionales catiónicos de la capa catiónica retenga su funcionalidad catiónica tras la unión a sondas específicas de diana o agentes secundarios que estimulan la unión a las sondas específicas de diana. En un aspecto, entre aproximadamente 0,1% y aproximadamente 10% de los grupos funcionales catiónicos quedan retenidos en el soporte sólido revestido tras la unión de las sondas específicas de diana al mismo. En otro aspecto, entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 3% de los grupos funcionales catiónicos quedan retenidos en el soporte sólido revestido tras la unión de las sondas específicas de diana al mismo.

10 En una realización, la capa catiónica se forma a partir de un polímero catiónico. Los polímeros catiónico ilustrativos incluyen polilisina, poli(lys-phe), poli(lys-tyr), poli(lys-trp), poli(arg-trp), y poli(arg-pro-tyr). Preferiblemente, el polímero catiónico recubre sustancialmente al menos una parte del soporte sólido.

15 La formación y/o la incorporación de capas catiónicas sobre la superficies de silicio se pueden facilitar específicamente usando metodologías basadas en química de silanos y compuestos bien conocidos de los expertos en la técnica, incluido el uso de polímeros modificados con silano, polisilanos, silazanos, polisilazanos, resinas T, y polialcosiloxano-polisilicatos.

20 En una realización, la capa catiónica se puede formar a partir de sustancias poliméricas o no poliméricas derivatizadas para formar una capa catiónica. En una realización, la capa catiónica se puede crear introduciendo grupos amina sobre la superficie del soporte sólido. Los grupos amina se pueden introducir mediante silanos catiónicos, siloxanos catiónicos, derivados catiónicos de los mismos, o bien se pueden añadir mediante un polímero catiónico, por ejemplo, sobre una capa de revestimiento compuesta de varios silanos, siloxanos, o derivados de los mismos. A modo de ejemplo, una capa de revestimiento puede comprender revestimientos no aminados, incluidos revestimientos hidrófobos de polipéptidos, polipéptidos, silanos, o siloxanos. A continuación se pueden crear capas aminadas mediante el uso de varios policonjugados, como poli(lys-phe). Dicho enfoque puede servir para aumentar la densidad de las aminas y crear revestimientos estables multicapa.

25 Los silanos ilustrativos incluyen aminopropiltrimetoxisilano, glicidoxipropiltrimetoxisilano, y aminopropiltriethoxisilano. Los siloxanos ilustrativos incluyen organopolisiloxanos funcionalizados con amino, y alcoxilatos de siloxanos funcionalizados con amino. US-6.013.789 describe métodos para introducir grupos amina en la superficie de un polipropileno.

30 Un polímero catiónico, material potenciador de la densidad de la sonda o superficie aminada del soporte revestido pueden estar derivatizados químicamente para facilitar la unión a un soporte sólido a una sonda de captura específica de diana. Por ejemplo, los grupos amino se pueden modificar con aldehído, modificar con hidrazida, o modificar con sulfhidrilo para facilitar la conjugación química con una sonda de captura modificada adecuadamente. Se puede utilizar cualquier agente de reticulación adecuado para unir o conjugar químicamente grupos funcionales, especialmente grupos amino, en la capa catiónica bien al soporte sólido y/o a la sonda de captura específica de diana, incluidos, aunque no de forma limitativa, los ésteres de NHS heterobifuncionales tales como SFB, SHNH, SIAB, y NHS.

35 Un soporte sólido se puede modificar químicamente para formar una capa catiónica sobre el anterior. En particular, los soportes sólidos se pueden modificar mediante la introducción de una funcionalidad seleccionada de un grupo que consiste de: amino, carboxilo, tiol, y sus derivados. Los grupos amino se pueden introducir sobre la superficie de un soporte sólido mediante cualquier método convencional conocido de los expertos en la técnica, incluido el uso de descarga de plasma en un gas que contiene amoníaco o una amina orgánica. El "plasma" es, lo más preferentemente, un gas ionizado, que obtiene suficiente energía de ionización de un campo electromagnético. Preferiblemente, la energía de ionización se aplica mediante una descarga de plasma de radiofrecuencia, una descarga de plasma de frecuencia de microondas, o una descarga de tipo corona. La amina se puede derivar de un amoníaco gaseoso, y el estado energético elevado se consigue mediante una descarga de plasma de radiofrecuencia.

40 2.3. Capas de revestimiento adicionales.

45 Se pueden añadir capas de revestimiento adicionales sobre la capa catiónica, el soporte sólido, o entre la capa catiónica y el soporte sólido. La capa o capas adicionales se pueden añadir además de una capa catiónica. A modo de ejemplo, el revestimiento o revestimientos adicionales se pueden añadir directamente a un soporte sólido. La capa catiónica se puede crear a continuación sobre la capa de revestimiento adicional. Los revestimientos adicionales pueden incluir polipéptidos, polisacáridos, y/o revestimientos de compuestos basados en la química de silanos, incluidos polímeros modificados con silano, polisilanos, silazanos, polisilazanos, resinas T, y polialquilsiloxano-polisilicatos.

50 Las capas de revestimiento adicionales que se pueden incluir en el soporte sólido revestido de la presente invención incluyen capas antirreflectantes de película fina, capas de unión, y materiales potenciadores de la densidad de la sonda.

55 Por ejemplo, un soporte sólido revestido puede incluir además una capa antirreflectante de película fina sobre el soporte sólido. Una capa antirreflectante de película fina es antirreflectante para longitudes de onda específicas de luz, de manera que se creen cambios de color característicos de la superficie que sean resultado de la interferencia destructiva. Más particularmente, cuando la luz reflejada en la interfase de la superficie de película fina esté fuera de fase con la luz reflejada desde la interfase aire-película fina, se eliminan las longitudes de onda específicas de la luz reflejada por la

interferencia destructiva de forma que se creen cambios de color característicos de la superficie de película fina. La capa antirreflectante de nitruro de silicio se deposita mediante deposición química potenciada mediante plasma. Las capas antirreflectantes se pueden depositar sobre una variedad de soportes diferentes. Los métodos y soportes para depositar capas antirreflectantes de película fina se describen en la solicitud de patente US-A-2008/003693.

Se puede incorporar una capa de unión a un soporte sólido revestido en forma de una capa que sirve como puente químico que conecta las sondas específicas de diana a cualquier capa. Preferiblemente, la capa de unión está físicamente adherida o bien unida químicamente de otra forma a una superficie de un soporte o capa de revestimiento de forma que se minimice la interferencia con los procesos bioquímicos que tienen lugar sobre los soportes revestidos (por ejemplo, amplificación, hibridación, detección y para proporcionar durabilidad suficiente para las siguientes etapas de procesamiento).

En una realización, la capa de unión constituye un revestimiento de agentes acopladores adecuados o reactivos de reticulación depositados sobre una capa de revestimiento o superficie del soporte sólido. La selección de un agente acoplador o reactivo de reticulación adecuado dependerá de la naturaleza de los grupos químicos reactivos y/o de la longitud de cadena del agente que minimice o evite la interferencia entre unidades en el interior, o entre, los polímeros. Véase "Reagents For Organic Synthesis", L. Fieser, M. Fieser, Vol. 1-8, Wiley & Son; "Cross Linking Reagents" (1980 Ed.), Pierce Biochemical Reagent Catalog, Pierce Chemical Co., Rockford Ill. y referencias citadas en el mismo, o "Advanced Organic Chemistry" J. March, McGraw Hill (1968).

Los materiales potenciadores de la densidad de la sonda se pueden incorporar a los soportes sólidos revestidos como capa de unión que proporciona químicas de superficie adicionales o alternativas para aumentar la densidad de la sonda en la superficie de la capa catiónica del soporte sólido. Así, los materiales potenciadores de la densidad de la sonda están diseñados para unirse directa o indirectamente (por ejemplo, mediante agentes de reticulación, etc.) a las sondas específicas de diana. Los materiales potenciadores de la densidad de la sonda ilustrativos incluyen partículas de látex, partículas de sílice, dextrano, sulfato de dextrano, dendrímeros, ácido acrílico, sulfato de dextrano, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, polisulfato de vinilo, poli(alcohol vinílico), poli(ácido acrílico), poli(acrilamida) copolímero de ácido acrílico, incluidos sus derivados químicos y poliméricos.

Tras unir los grupos funcionales de todos los componentes estructurales, los grupos funcionales sin reaccionar se pueden bloquear modificando o derivatizando químicamente el grupo funcional de forma que se vuelva químicamente inerte. A modo de ejemplo, un extremo de una sonda específica de diana se puede "bloquear" (mediante, por ejemplo, un "grupo bloqueante" o un "compuesto protector") por reacción con otro grupo químico que convierta el extremo de la sonda en un sustrato inadecuado para una enzima, tal como una helicasa o una ADN polimerasa, evitando o reduciendo sustancialmente de esta forma la unión de la enzima en, o cerca del extremo bloqueado, o catalizar una reacción enzimática en o cerca del extremo bloqueado. Los grupos amino libres de las capas catiónicas de la presente invención pueden quedar análogamente bloqueados para mejorar el comportamiento del dispositivo mediante la optimización de la densidad/reactividad de la carga superficial.

Los agentes de bloqueo ilustrativos incluyen, por ejemplo, compuestos reactivos con amina que pueden convertir los grupos amino libres en amidas o imidas. A modo de ejemplo, el agente bloqueante puede ser un reactivo de acetilación. Los compuestos reactivos con amida pueden incluir compuestos de una o más de las siguientes clases químicas: Los ésteres de N-hidroxisuccinimidilo (NHS), imidoésteres, haluros de arilo, haluros de acilo, isocianatos, isotiocianatos, ésteres de nitrofenilo, carbonilos, carboxilatos y anhídridos de ácido. Los compuestos reactivos con amina particulares pueden incluir, por ejemplo, uno o más compuestos seleccionados del grupo que consiste en acetato de NHS, suberato de disuccinimidilo (DSS), benzoato de succinimidil-3-(tri-N-butilestanoilo), N-succinimidiladipato de metilo (MSA), mono(succinimidil)suberato de mono(latosilamido), anhídrido acético, cloruros de arilo, cloruros de acilo, 2,4-dinitrofluorobenceno (DFNB), haluros de sulfonilo, aldehídos, químicas basadas en la activación de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodimida (EDC), anhídrido maleico, anhídrido succínico, cloruros de acetilo, cloruros de benzoilo, cloruros de propionilo, cloruros de butirilo, y cloruros de penileitanoilo.

Los agentes bloqueantes adecuados también se puede seleccionar de agentes no acetilantes tales como diazoacetatos, imidoésteres, carbodimidas, maleimididas, □-haloacetilos, haluros de arilo, compuestos de dicarbonilo, sulfhidrilos e hidrazidas. A modo de ejemplo, los compuestos no acetilantes específicos se pueden seleccionar del grupo que consiste en, por ejemplo, N-etilmaleimida, ácido N-β-maleimidopropiónico, ácido N-ε-maleimidocaproico, ácido yodoacético, N-[yodoetil](trifluoroacetamida), 3,4-difluoronitrobenzoceno (DFNB), haluro de sulfonilo, (4-cloro-7-sulfobenzofurazan)-cloruro de amonio (SBF-cloruro), glioxal, fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, 2-mercaptoetanol, ditiotreitolo (DTT) seguido por químicas de sulfhidrilo, ácido (2,4,6-trinitrobenzoceno sulfónico (TNBSA), y 2-mercaptoetanol. El agente bloqueante puede incluir o se puede modificar para incluir una marca detectable.

3. Sonda de captura específica de dianas.

Las sondas de captura específica de dianas pueden emplear una variedad de diferentes polinucleótidos u oligonucleótidos para la detección de diana(s) de polinucleótido(s). La sonda de captura específica de dianas incluye secuencias complementarias de las secuencias de las diana(s) de polinucleótido(s), incluido un primer extremo unido al soporte sólido revestido y un segundo extremo no unido.

La sonda de captura específica de dianas de la presente invención está configurada por lo general como un polinucleótido monocatenario unido al soporte sólido revestido, preferiblemente un oligonucleótido de entre aproximadamente 12 y 60 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de 15 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud.

Las sondas específicas de diana pueden utilizar estructuras de oligonucleótido convencionales. Alternativamente, las sondas específicas de diana incluyen un oligonucleótido modificado (que contiene una estructura de ácido nucleico no convencional) que puede formar una estructura de tipo duplete, mediante la cual el oligonucleótido modificado incluye un rasgo estructural que le confiere una reducción o eliminación en el reconocimiento del oligonucleótido mediante una enzima de amplificación isoterma cuando está unida a la diana de polinucleótido. En una realización particular, una sonda específica de diana incluye un oligonucleótido modificado que incorpora un rasgo estructural que le confiere una reducción o eliminación de la desnaturalización enzimática cuando está unido a la diana de polinucleótido.

Las estructuras de ácido nucleico no convencionales para usar en el método de la presente invención incluyen oligonucleótidos con adiciones o sustituciones químicas o estructurales no convencionales, incluidos, aunque no de forma limitativa, ácidos péptidonucleicos (APN), ácidos nucleicos bloqueados (ANB), ácidos nucleicos con estructura de morfolino, metilfosfonatos, protectores de estilbeno o pirenilo que estabilizan dupletes, fosforotioatos, fosforoamidatos, fosfotriésteres, y similares. A modo de ejemplo, los oligonucleótidos modificados pueden incorporar o sustituir uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo; modificaciones internas en el nucleótido que incorporan, por ejemplo, enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) o enlaces cargados (por ejemplos, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.); modificaciones que incorporan intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidativos, etc.), o alquilantes, y/o enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.) (US-2007/0166741).

En una realización, la sonda o sondas específicas de diana están modificadas internamente para incluir al menos una carga neutra en su estructura principal. Por ejemplo, la sonda de captura puede incluir una estructura principal de metilfosfonato o un ácido peptidonucleico (APN) complementario de la secuencia específica de diana. Se ha descubierto que estas modificaciones evitan o reducen el desenrollado mediado por helicasa. El uso de sondas no cargadas puede aumentar adicionalmente la tasa de hibridación con las dianas de polinucleótidos en una muestra, reduciendo la repulsión de las hebras de ácido nucleico con cargas negativas en la hibridación clásica (Nielsen y col., 1999, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 1:89-104).

Los oligonucleótidos de APN son análogos de ácidos nucleicos no cargados en los que la estructura principal fosfodiéster se ha sustituido por una poliamida, que convierte a los APN en un polímero de unidades de 2-aminoetil-glicina unidas entre sí por un enlace amida. Los APN se sintetizan usando la misma química de Boc o Fmoc utilizada en la síntesis de péptidos convencional. Las bases (adenina, guanina, citosina, y timina) se unen a la estructura principal mediante un enlace de carboxilmetileno. Así, estos APN son acíclicos, acirales y neutros. Otras propiedades de los PNA son un aumento de la especificidad y de la temperatura de fusión en comparación con los ácidos nucleicos, capacidad de formar triples hélices, estabilidad a pH ácido, no reconocimiento por enzimas nucleares tales como las nucleasas, las polimerasas, etc. (Rey y col., 2000, *FASEB J.*, 14:1041-1060; Nielsen y col., 1999, *Curr. Issues Mol. Biol.*, 1:89-104).

Los oligonucleótidos que contienen metilfosfonatos son análogos de ADN neutros que contienen un grupo metilo en lugar de uno de los oxígenos no enlazantes del fosforilo. Los oligonucleótidos con enlaces metilfosfonato se encuentran entre las moléculas de las que se informó primero que inhibían la síntesis de proteínas mediante un bloqueo de traducción de sentido contrario. Sin embargo, los procesos sintéticos proporcionan moléculas quirales que se deben separar para obtener monómeros quiralmente puros para la producción personalizada de oligonucleótidos (Reynolds y col., 1996, *Nucleic Acids Res.*, 24:4584-4591).

En una realización, las sondas de oligonucleótido específicas de diana utilizan una estructura principal de azúcares modificados unidos mediante enlaces fosfodiéster entre los nucleótidos. Los azúcares modificados pueden incluir análogos de furanosa, incluidos, aunque no de forma limitativa, 2-desoxirribofuranósidos, α -D-arabinofuranósidos, α -2'-desoxirribofuranósidos, y 2',3'-didesoxi-3'-aminorribofuranósidos. En realizaciones alternativas, los grupos 2-desoxi- β -D-ribofuranosa se pueden sustituir por otros azúcares, por ejemplo, la β -D-ribofuranosa. Además, la β -D-ribofuranosa puede estar presente cuando el 2-OH del resto ribosa se alquila con un grupo alquilo C_{1-6} (2-(O-alquilo C_{1-6} ribosa) o con un grupo alqueno C_{2-6} (2-(O-alqueno C_{2-6} ribosa), o está sustituido por un grupo flúor (2-fluororibosa).

Los azúcares relacionados formadores de oligómeros incluyen los usados en los "ácidos nucleicos bloqueados" (ANB) que son ácidos nucleicos bicíclicos en los que un ribonucleósido (incluido, por ejemplo, un anillo de furanosa) está unido entre los átomos 2'-oxígeno y 4'-carbono con una unidad metileno. Los ANB se describieron por primera vez por Wengel y colaboradores, como una clase de análogos de oligonucleótido de conformación restringida (Koshkin y col., *Tetrahedron*, 54:3607-3630 (1998); Singh y col., *Chem. Comm.*, 4:455-456 (1998). Los nucleótidos LNA ilustrativos incluyen unidades monoméricas bicíclicas modificadas con un puente 2'-O-4'-C metileno, tal como las descritas en US-6.268.490.

Los oligonucleótidos que contienen α -D-arabinofuranósidos se pueden preparar como se describe en US-5.177.196. Los oligonucleótidos que contienen 2',3'-didesoxi-3'-aminorribofuranósidos se describen en Chen y col. *Nucleic Acids Res.* 23:2661-2668 (1995). *Synthetic procedures for locked nucleic acids* (Singh y col., *Chem.*

Comm., 455-456 [1998]; Wengel J., Acc. Chem. Res., 32:301-310 [1998]) y los oligonucleótidos que contienen 2'-halógeno-2'-desoxirribofuranósidos (Palissa y col., Z. Chem. 27:216 [1987]) también se han descrito.

5 Los protectores de estilbeno o pirenilo que estabilizan dupletes incluyen protectores de trimetoxiestilbeno y pirenilmetilpirrolindol (Glen Research, Sterling, VA).

10 También se pueden usar otros restos azúcar compatibles con la hibridación del oligonucleótido, y son conocidos por el experto en la técnica, incluidos, aunque no de forma limitativa, α -D-arabinofuranósidos, α -2'-desoxirribofuranósidos o 2',3'-didesoxi-3'-aminoxirribofuranósidos. Los oligonucleótidos que contienen α -D-arabinofuranósidos se pueden preparar como se describe en US- 5.177.196. Los oligonucleótidos que contienen 2',3'-didesoxi-3'-aminoribofuranósidos se describen en Chen y col. Nucleic Acids Res. 23:2661-2668 (1995).

15 Los oligonucleótidos químicamente modificados también pueden incluir, en solitario o en cualquier combinación, modificaciones en la posición 2' del azúcar, modificaciones en la posición 5 de la pirimidina (por ejemplo, 5-(N-bencilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-isobutilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-[2-(1H-indol-3-il)etil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, cloruro de 5-(N-[1-(3-trimetilamonio) propil]carboxiamida)-2'-desoxiuridina, 5-(N-naftilcarboxiamida)-2'-desoxiuridina, y 5-(N-[1-(2,3-dihidroxipropil)]carboxiamida)-2'-desoxiuridina), modificaciones en la posición 8 de la purina, modificaciones en las aminas exocíclicas, sustitución de la 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo- o 5-yodo-uracilo, metilaciones, combinaciones con emparejamientos de bases inusuales, tales como las isobases isocitidina e isoguanidina, y similares.

20 La estructura principal de fosfato en la sonda o sondas específicas de diana pueden ampliar oligonucleótidos que contienen enlaces fosforotioatos o fosforoamidatos (Chen y col., Nucl. Acids Res., 23:2662-2668 [1995]). También se pueden usar combinaciones de dichos enlaces de oligonucleótidos.

25 En otra realización, el extremo 5' o 3' de la sonda en la sonda específica de diana se puede bloquear para reducir o eliminar el reconocimiento mediante una helicasa. En una realización, al menos uno de los extremos 5' o 3' de la sonda está modificado o bloqueado mediante un protector o por la incorporación de un modificador del extremo o modificador separador adecuado como se describe adicionalmente a continuación (Glen Research, Sterling, VA). A modo de ejemplo, el extremo 3'-OH no unido de una sonda se puede modificar o bloquear para prevenir la incorporación de la sonda a un producto de extensión del cebador mediante una polimerasa durante la amplificación. Esto se puede conseguir mediante: (i) eliminar el 3'-OH; (ii) incorporar un nucleótido que carece de 3'-OH, tal como un didesoxinucleótido; (iii) incorporar cordicepina (3'-desoxiadenosina) y otras 3'-bases sin un resto 3'-OH; (iv) incorporar un separador que carece de 3'-OH, tal como un separador de C3 propilo; (v) incorporar un grupo amina o fosfato; o (vi) cualquier otra modificación química que 35 vuelva la sonda inerte como cebador para la extensión del cebador, como es conocido por el experto en la técnica. Incorporar una marca de biotina en el 3' hidroxilo del último nucleótido puede servir a un doble fin, actuando también como marca para la posterior detección o captura del ácido nucleico unido a la marca.

40 En un aspecto adicional, la sonda se puede modificar o diseñar con otras funcionalidades que aumentan la utilidad del sistema de amplificación/detección. En una realización particular, la sonda incluye, o está químicamente unida, a un conector escindible que facilita la liberación de los dupletes híbridos del soporte sólido revestido para su amplificación y/o detección adicional. El diseño y uso de conectores escindibles en sondas de oligonucleótido se describe en US- 5.380.833, US-6.060.246, US-6.027.879, y US-7.291.471, y en la solicitud de patente US- 2005/0106576. Se comercializan modificadores de oligonucleótido fotoescindibles, incluidos modificadores separadores fotoescindibles (Glen Research, Sterling, VA).

45 En un aspecto adicional, la sonda puede incluir, o estar químicamente unida, a un modificador del extremo o separador modificador en el extremo 5', en el extremo 3', o en ambos. Se puede incorporar un modificador del extremo o separador modificador para aumentar la distancia entre las secuencias diana de la sonda de captura y la superficie del soporte sólido revestido y/o para reducir o eliminar el reconocimiento de una enzima de amplificación isoterma o desnaturalización enzimática mediante una enzima de amplificación isoterma cuando está unida a un diana de polinucleótido. Los modificadores del extremo y los modificadores separadores ilustrativos incluyen, por ejemplo, una variedad de modificadores comerciales 5'-amino, modificadores 3-amino, y modificadores químicamente derivatizados de los mismos, fosforoamidatos separadores para insertar brazos separadores de longitud variable; separadores para introducir sitios 50 abásicos dentro de un oligonucleótido; y modificadores separadores fotoescindibles (Glen Research, Sterling, VA).

55 La sonda de captura específica de diana se puede unir directa o indirectamente a cualquier componente del soporte sólido revestido, incluido el soporte sólido, la capa catiónica, un material potenciador de la densidad de la sonda, o una superficie del soporte sólido adecuadamente modificada. La sonda puede estar unida covalentemente o no covalentemente por su extremo 5' o 3' al soporte sólido revestido. La sonda puede estar covalentemente unida mediante grupos funcionales catiónicos directamente, o a través de grupos funcionales incorporados a los mismos con el fin de facilitar esta unión. Para facilitar la unión a cualquier parte del soporte sólido revestido, las sondas se pueden modificar o diseñar para incluir en sus extremos 5' o 3' una variedad de grupos funcionales para potenciar la conjugación con otros elementos basados en polímero o ácido nucleico. Los grupos funcionales ilustrativos incluyen los grupos amino, hidrazida, aldehído, y sulfhidrilo.

60

65

Una pluralidad de las mismas o diferentes sondas específicas de diana se pueden unir directa o indirectamente a la capa catiónica o a un soporte sólido modificado catiónicamente. Cualquier extremo de la moléculas de ADN (extremo 5' o 3') de la sonda de captura específica de diana se puede unir al soporte sólido o a la capa catiónica. Además, como se ha descrito anteriormente, los extremos de la sonda de captura no unidos se pueden bloquear para reducir el reconocimiento por la helicasa o las extensiones del cebador a partir de los mismos.

En una realización, la sonda de captura está unida a un polímero policatiónico en la capa catiónica. En otra realización, la sonda de captura está unida a un silano catiónico, siloxano catiónico, o derivado catiónico de la capa catiónica. En una realización preferida, la sonda de captura está unida a un polímero catiónico (tal como phe-lys) derivatizado con una funcionalidad aldehído.

Un soporte sólido revestido puede incluir un tipo de sonda específica de diana de una especificidad simple, o una pluralidad de diferentes sondas específicas de diana con múltiples especificidades para detectar una pluralidad de diferentes secuencias diana de un organismo, una pluralidad de diferentes organismos, o combinaciones de los anteriores. La(s) sonda(s) se pueden unir a una zona discreta del soporte sólido como mancha, o a una pluralidad de zonas discretas en la forma de una matriz.

II. Métodos para amplificar y detectar dianas de polinucleótidos

1. Sistema de detección por amplificación/hibridación

Los soportes sólidos revestidos están configurados para permitir la amplificación isoterma, la hibridación y la detección en un único dispositivo de detección. Un proceso de amplificación isoterma está especialmente bien adecuado para usar con un dispositivo de ese tipo, ya que no requiere elevadas temperaturas para desnaturalización térmica para la amplificación del ADN, que puede ser incompatible con los materiales utilizados en un dispositivo de amplificación/hibridación/detección acoplada.

El método de la invención, como se define en las reivindicaciones, para la amplificación/hibridación/detección de polinucleótido(s) diana en una muestra incluye aplicar la muestra y un medio de reacción a un sustrato sólido revestido que comprende un soporte sólido, una capa catiónica, y una pluralidad de sondas específicas de diana unidas al soporte sólido revestido. Las dianas de polinucleótidos de la muestra se amplifican después mediante un proceso de amplificación isoterma y al mismo tiempo se hibrida con sondas específicas de diana. Tras la amplificación de los ácidos nucleicos de la muestra durante un periodo de tiempo suficiente para la detección, las dianas de polinucleótidos se pueden hibridar con las sondas específicas de diana que están unidas al soporte sólido revestido.

El sistema de amplificación/hibridación/detección acoplado incluye un proceso de amplificación isoterma que utiliza una helicasa, que puede desenrollar los productos de amplificación sintetizados. Los productos de amplificación monocatenarios desenrollados se pueden hibridar con los cebadores de amplificación, volverse a hibridar con las hebras complementarias, o hibridarse a sondas inmovilizadas sobre la superficie de un soporte sólido revestido. Los polinucleótidos se pueden amplificar e hibridar con el soporte sólido revestido en condiciones de baja salinidad o someterse a una etapa de hibridación con alta salinidad opcional (para mejorar la sensibilidad) seguido por lavados con baja salinidad y detección de los complejos unidos.

En un aspecto, las dianas de polinucleótidos de la muestra se purifican inicialmente mediante hibridación sobre un soporte sólido revestido y después transferirse a un segundo soporte sólido revestido para el proceso de amplificación/hibridación/detección acoplado. En este caso, las dianas de polinucleótidos unidos a las sondas específicas de diana escindibles se eluyen del primer soporte sólido revestido, y después se aplican a un segundo soporte sólido revestido para amplificación mediante HDA. Tras lavados convencionales para eliminar los polinucleótidos unidos no específicamente unidos y otros polinucleótidos o componentes de reacción, las sondas específicas de diana escindibles unidas al soporte revestido se escinden, mediante lo cual las sondas escindidas, incluidas las hibridadas con las dianas de polinucleótidos, se someten a amplificación isoterma sobre un segundo soporte sólido revestido. Los productos de amplificación hibridados en el segundo soporte sólido revestido se pueden detectar directamente en condiciones de baja salinidad o someterse opcionalmente a una corta etapa (por ejemplo, 15- 30 minutos) de hibridación en alta salinidad (para mejorar la sensibilidad), seguido por lavados de baja salinidad y detección de los complejos unidos. Alternativamente, los complejos unidos se pueden someter a ciclos adicionales de elución, amplificación, y/o hibridación antes de la detección.

2. Sistema de hibridación/detección

El método de la invención, como se define en las reivindicaciones, incluye aplicar una muestra y un medio de reacción a un soporte sólido, una capa catiónica, y una pluralidad de sondas específicas de diana unidas al soporte sólido revestido. El soporte sólido revestido incluye una capa catiónica como se ha descrito anteriormente. Se proporcionan las condiciones y los reactivos adecuados para desnaturalizar las dianas de polinucleótidos de la muestra mediante un proceso enzimático, seguido por la hibridación de las dianas de polinucleótidos desnaturalizados enzimáticamente de la muestra a las sondas específicas de diana. En una etapa final, se detecta la presencia o la ausencia de dianas de polinucleótidos unidos a las sondas.

Se describe un sistema de hibridación/detección, que incluye aplicar una muestra y un medio de reacción a un soporte revestido con silicio que comprende un soporte sólido, una capa catiónica, y una pluralidad de sondas específicas de diana unidas al soporte sólido revestido. El soporte de silicio revestido no comprende una capa de recubrimiento que pueda mediar la detección visual de las dianas de polinucleótidos mediante interferencia destructiva. En una realización particular, el lado rugoso de un soporte de silicio está revestido con la capa catiónica y la pluralidad de sondas específicas de diana. Se proporcionan las condiciones y los reactivos adecuados para hibridar las dianas de polinucleótidos de la muestra con las sondas específicas de diana. En una etapa final, se detecta la presencia o la ausencia de dianas de polinucleótidos unidos a las sondas. En una realización particular, las etapas de hibridación y detección se pueden llevar a cabo en condiciones de baja salinidad como se ha descrito anteriormente. Como se ha descrito anteriormente, cuando se utiliza junto con una capa catiónica, las etapas de hibridación y detección se pueden llevar a cabo en condiciones de baja salinidad, y opcionalmente también pueden incluir una etapa de 15-30 minutos de hibridación en condiciones de salinidad elevada.

3. Amplificación isoterma de dianas de polinucleótidos

La amplificación de las dianas de polinucleótidos requiere obligatoriamente una helicasa adecuada. En una realización, todas las etapas de desnaturalización y amplificación se llevan a cabo enzimáticamente en condiciones de temperatura isoterma. En otra realización, la muestra de polinucleótidos se desnaturaliza inicialmente mediante desnaturalización térmica antes de la etapa de hibridación del cebador, y después, se desnaturaliza enzimáticamente durante las etapas posteriores de amplificación/hibridación.

La amplificación dependiente de helicasa (HDA) para usar en el método de la invención se describe en US-7.282.328, la amplificación con desplazamiento de hebra (SDA) se describe en US-5.270.184, US-5.422.252, US-5.455.166, US-5.470.723, US-6.087.133, US-6.531.302); la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) se describe en US-6.977.148, la amplificación mediante polimerasa recombinasa (RPA) se describe en Piepenburg y col., PLoS Biology, 4(7):1115-1121, 2006, US-7.270.981 y en la solicitud de patente US-2005/0112631; la amplificación isoterma mediada por bucle (LAMP) se describe en US-6.410.278 y US-6.743.605, y en la solicitud de patente US-2007/0218464; la amplificación en círculo rodante (RCA) se describe en Fire y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:4641-4645 (2002), Dean y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:5261-5266 (2002), US-5.714.320, US-5.854.033, US-6.235.502 y US-6.344.329; la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) se describe en US- 5.130.238, la amplificación de ARN mediada por la transcripción (TMA); la amplificación isoterma del cebador único (SPIA™ y Ribo-SPIA™, NuGen Technologies, San Carlos, Calif.) se describe en las patentes US-6.251.639, US-6.692.918 y US-6.946.251; y otras metodologías de amplificación isoterma conocidos por el experto en la técnica, incluyen las descritas en US-6.929.915.

Un proceso HDA requiere una preparación de polimerasa para la síntesis de productos de amplificación y una preparación de helicasa para facilitar la desnaturalización enzimática y la hibridación de los cebadores de amplificación con las dianas de polinucleótidos amplificados. Una preparación de helicasa adecuada incluye al menos un tipo de helicasa, sola o combinada con un producto auxiliar de helicasa, tales como proteínas de unión monocatenarias (SSB). Preferiblemente, la helicasa es una helicasa termoestable, que puede mediar la HDA en ausencia de productos auxiliares adicionales.

El término "helicasa" se refiere a cualquier enzima que puede desenrollar o desnaturalizar un ácido nucleico solo o combinado con una proteína auxiliar de helicasa. Las helicasas pueden desenrollar ácidos nucleicos bicatenarios en las direcciones '5 o 3'. Las helicasas se encuentran en todos los organismos, y se utilizan en procesos enzimáticos que implican ácidos nucleicos, incluidos la replicación, recombinación, reparación, transcripción, traducción y el corte y empalme del ARN. Cualquier helicasa que transloca el ADN o el ARN en una dirección 5' a 3' o en la dirección opuesta 3' a 5' se puede usar en las presentes realizaciones de la invención. Esto incluye helicasas obtenidas de procariontes, virus, archaea, y eucariotes, o formas recombinantes de enzimas naturales, así como análogos o derivados que tengan la actividad especificada. Los ejemplos de helicasas de ADN naturales incluyen la helicasa I, II, III, y IV, de E. coli, la helicasa UvrD, la helicasa Rep, la helicasa RecQ, la helicasa PcrA, la helicasa RecBCD, la helicasa DnaB, la helicasa PriA, PcrA, T4 Gp41, la helicasa T4 Dda, la helicasa T7 Gp4 el antígeno T de SV40 grande, helicasas de herpesvirus, incluidas la helicasa VHS-1, levadura RAD, la helicasa Sgs1 de la levadura, las helicasas dependientes de DEAH_ATP, la helicasa RecQ, helicasas UvrD termoestables derivadas de T. tengcongensis y T. thermophilus, la helicasa termoestable DnaB derivada de T. aquaticus, la helicasa MCM, así como sus análogos, homólogos, helicasas termoestables, variantes de la helicasa genéticamente modificadas de las anteriores, o cualquiera de las helicasas descritas en US-7.282.328.

En determinadas circunstancias, las helicasas (especialmente las helicasas mesófilas) requieren o muestran una actividad mejorada en presencia de proteínas de unión monocatenarias (SSB), un cofactor de la helicasa conocido por estabilizar los ácidos nucleicos monocatenarios. En estas circunstancias, la selección de la SSB por lo general no está limitada a una proteína específica. Los ejemplos de proteínas de unión monocatenarias incluyen la proteína 32 del gen T4, la SSB de E. coli, T7 gp2.5 SSB, el fago phi29 SSB (Kornberg y Baker, supra [1992]) y formas truncadas de los anteriormente mencionados. Las composiciones y los métodos de la HDA se describen en US-7.282.328.

Se puede utilizar una variedad de diferentes polimerasas para amplificar dianas de polinucleótidos. El uso de estas polimerasas se puede seleccionar sobre la base de la procesabilidad y la actividad de desplazamiento de cadena. Después de la fusión y la hibridación con un cebador, el ácido nucleico se somete a una etapa de polimerización. Si el

ácido nucleico a amplificar es ADN, se selecciona una ADN polimerasa. Si la diana inicial es ARN, se utiliza en primer lugar una transcriptasa inversa para copiar el ARN diana en una molécula de ADNc, que a continuación se amplifica en HDA adicionalmente mediante una ADN polimerasa seleccionada. La ADN polimerasa actúa sobre el ácido nucleico diana para extender los cebadores hibridados con los moldes de ácido nucleico en la presencia de cuatro dNTP para formar los productos de extensión del cebador complementarios de la secuencia de nucleótidos del molde de ácido nucleico.

En una realización, la ADN polimerasa se selecciona de un grupo de polimerasas que carecen de actividad exonucleasa 5' a 3' y que adicionalmente puede carecer de actividad exonucleasa 3'-5'. Las ADN polimerasas ilustrativas incluyen una ADN polimerasa I que es un fragmento de Klenow deficiente en exonucleasa de *E. coli* (New England Biolabs, Inc. [Beverly, Mass.]), una ADN polimerasa de T7 deficiente en exonucleasa (Sequenase; USB, [Cleveland, Ohio]), una ADN polimerasa I que es un fragmento de Klenow de *E. coli* (New England Biolabs, Inc. [Beverly, Mass.]), fragmento grande de ADN polimerasa de Bst (New England Biolabs, Inc. [Beverly, Mass.]), ADN polimerasa KlenTaq (AB Peptides, [St Louis, Mo.]), ADN polimerasa de T5 (US-5.716.819) y ADN polimerasa Pol I (US-6.555.349).

Las ADN polimerasas que tienen actividad de desplazamiento de cadena, tal como la ADN polimerasa I que es un fragmento de Klenow deficiente en exonucleasa de *E. coli*, el fragmento grande de ADN polimerasa de Bs y Sequenase, son las preferidas para la amplificación dependiente de helicasa. La polimerasa T7 es una polimerasa de alta fidelidad que tiene una tasa de error de 3.5.times.10.sup.5, que es significativamente inferior a la polimerasa Taq (Keohavong y Thilly, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9253 9257 [1989]). Sin embargo, la polimerasa T7 no es termoestable y, por tanto, no es óptima para usar en sistemas de amplificación que requieran termociclado o que se potencien a temperaturas elevadas. La Sequenase T7 es una polimerasa preferida para la amplificación del ADN mediante procesos HDA isotermos.

4. Hibridación de las dianas de polinucleótidos

Las condiciones adecuadas para promover la formación de complejos de hibridación entre la sonda específica de diana y su hebra complementaria de la diana de polinucleótido para producir un complejo de hibridación son bien conocidas en la técnica. Como saben los expertos en la técnica, la especificidad de la hibridación se puede ver afectada por la longitud y la composición del cebador de oligonucleótido, la temperatura a la que se lleva a cabo la reacción de hibridación, la fuerza iónica, y el pH. Las condiciones adecuadas se pueden determinar empíricamente. Las condiciones de hibridación pueden incluir los componentes químicos y sus concentraciones (por ejemplo, sales, agentes quelantes, formamida) de una solución acuosa u orgánica que contiene los ácidos nucleicos, y la temperatura de la mezcla. Otros factores bien conocidos, como la longitud del tiempo de incubación y la naturaleza física y las dimensiones del soporte sólido pueden contribuir a un ambiente adecuado para la hibridación, y los expertos en la técnica pueden modificarlas también. Los complejos unidos se pueden lavar para eliminar los polinucleótidos no hibridados y el resto de componentes de la reacción para amplificación o detección adicional de las dianas de polinucleótidos.

5. Detección de las dianas de polinucleótidos

Las dianas de polinucleótidos unidos a las sondas específicas de diana complementarias de los soportes sólidos revestidos en los sistemas de amplificación/detección o hibridación/detección acoplados anteriormente descritos se pueden detectar utilizando cualquier metodología de detección conocida por el experto en la técnica. La detección se puede conseguir por características tales como cambio de color, luminiscencia, fluorescencia, o radioactividad. Típicamente, la detección de las dianas de polinucleótidos se facilita por la complejación con una marca o informador adecuado. Una marca adecuada puede incluir cualquier resto o grupo molecular que tenga una característica física o química que pueda producir una respuesta o señal que sea detectable y/o mensurable directa o indirectamente, por ejemplo, mediante la catálisis de una reacción que produzca una señal ópticamente detectable. La marca se puede incorporar a los materiales de partida antes o durante la realización de una cualquiera de las etapas de amplificación, hibridación y/o detección.

Las marcas ilustrativas pueden incluir aunque no de forma limitativa tintes cromóforos o sustratos que facilitan la detección colorimétrica; restos luminiscentes, incluidos compuestos fluorescentes, bioluminiscentes, fosforescentes o quimioluminiscentes; compuestos hapténicos o antigénicos utilizados junto con un anticuerpo marcado adecuadamente; miembros de una molécula asociada específica que contienen un sitio de reconocimiento de ligando (por ejemplo, biotina y avidina); enzimas; sustratos de enzimas; radioisótopos; complejos metálicos, partículas magnéticas, transmisores de radiofrecuencia, y similares. Además, la marca puede incluir una variedad de diferentes grupos reactivos o funcionalidades químicas adecuadas para unión a una variedad de agentes de biomolécula.

En una realización, la marca incluye una reacción catalizada por enzima de los sustratos para producir productos coloreados, fluorescentes, luminescentes, densos en electrones, o radioactivos. Más particularmente, la marca puede estar unida a las dianas de polinucleótidos unidos para formar un complejo de polinucleótido-marca cromogénico y precipitable, de un tamaño y composición tales que la luz dispersada desde el complejo cuando se ilumina con luz blanca se puede detectar por el ojo humano, preferiblemente sin ampliación.

Las marcas enzimáticas ilustrativas incluyen peroxidadas, tales como la peroxidasa de rábano picante (HRP), peroxidasa alcalina o ácida, galactosidasa, glucosa oxidasa, NADPasa, luciferasa, carboxipeptidasa, y similares. En algunas realizaciones, la detección visual directa se puede potenciar usando una enzima que cataliza la formación

de productos precipitables que contienen cromóforos que producen un cambio de color visible. Se puede realizar un seguimiento de los precipitados coloreados, por ejemplo, mediante espectrofotometría, un escáner plano, microscopía, o a simple vista. Las enzimas ilustrativas que catalizan la formación de productos precipitables que contienen cromóforos incluyen la peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, y glucosa oxidasa.

Las marcas enzimáticas se pueden suministrar en forma de conjugados de enzima/miembro de unión o de conjugados de anticuerpo-enzima. Los conjugados de enzima ilustrativos incluyen los conjugados estreptavidina/HRP- y anticuerpo contra biotina/HRP. Los sustratos cromogénicos ilustrativos para HRP incluyen 3,3',5,5' tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobenzidina (DAB), y 3-amino-9-etil carbazol (AEC). TMB es un sustrato no precipitante que actúa como donante de electrones para la conversión del peróxido de hidrógeno en agua. El TMP se convierte enzimáticamente a un complejo coloreado visualmente detectable mediante la HRP. Los sustratos cromogénicos ilustrativos de la fosfatasa alcalina incluyen BCIP/NBT, Fast Red y AP-Orange. Las enzimas unidas a avidina y los sustratos cromogénicos se comercializan por, por ejemplo, Pierce Chemical Company (Rockville, Ill.) y Sigma (St. Louis, Mo.). El marcado enzimático y la detección se describen, por ejemplo, en US-4.789.630.

Los miembros de una molécula asociada que incluyen un sitio de reconocimiento de ligando, tal como biotina y avidina, se pueden incorporar a cualquiera de los cebadores de amplificación, o a las sondas específicas de diana.

Los métodos de detección fluorométrica se basan en la emisión de fotones, o excitones, de menor energía o diferente longitud de onda a partir de algunas moléculas tras excitarlas con una longitud de onda adecuada, por ejemplo, de luz ultravioleta. Se trata de una variedad de moléculas fluorescentes conocidas por el experto en la técnica que pueden servir como indicadores que se pueden detectar y cuantificar, tras la excitación con una longitud de onda adecuada, con diferentes tipos de aparatos tales como fluorómetros, escáneres de fluorescencia confocal, microscopios, etc. La detección de las dianas de polinucleótidos se puede facilitar mediante la incorporación de marcas o tintes fluorescentes en los cebadores de amplificación, como conoce el experto en la técnica.

La detección quimioluminiscente se basa en enzimas, tales como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano picante, que pueden convertir un sustrato con la emisión simultánea de luz que se puede detectar mediante autorradiografía (fase sólida) o luminometría (fase líquida).

La detección electroquímica se lleva a cabo de forma general en la superficie de electrodos, donde las reacciones de oxidorreducción de las moléculas indicadoras generan electrones que se pueden seguir mediante un aparato adecuado, como un potencióstato.

En otra realización, se pueden utilizar polímeros catiónicos para la detección electrostática de dianas de polinucleótidos unidos a sondas de captura en los soportes sólidos revestidos de la presente invención. Las metodologías de detección de ácidos nucleicos basadas en polímeros catiónicos se basan típicamente en interacciones electrostáticas entre polímeros cargados positivamente y ácidos nucleicos cargados negativamente (solicitud de patente pendiente PCT/CA02/00485; Ho y col., 2002, Angew. Chem. Int. Ed., 41:1548-1551; Ho y col., 2002, Polymer Preprints, 43:133-134; Nilsson y col., 2003, Nat. Mater. 2:419-424). Estas hipótesis aprovechan una modificación de las propiedades ópticas o electroquímicas de los biosensores poliméricos tras la unión electrostática a una molécula de ácido nucleico monocatenaria o bicatenaria cargada negativamente. Estas interacciones macromoleculares están asociadas con cambios en la conformación y en la solubilidad que contribuyen a la generación de la señal (Ho y col., 2002, Angew. Chem. Int. Ed., 41:1548-1551). Estas tecnologías de detección basadas en polímeros no requieren ningún marcado químico de la sonda o de la diana, y pueden distinguir entre la hibridación específica y no específica de ácidos nucleicos que se diferencian en un único nucleótido ácido.

Los polímeros "indicadores" catiónicos ilustrativos incluyen varios derivados de politiofeno, incluidos derivados de politiofeno de ion híbrido fluorescentes solubles en agua (Nilsson y col., 2003, Nat. Mater. 2:419-424) y conjugados de polifluoreno solubles en agua (Gaylord y col., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 99:10954-10957), y poli(3,4-etilendioxitiofeno) (Krishnamoorthy y col., 2004, Chem. Commun., 2004:820-821). Metodologías de detección basadas en polímeros catiónicos y 78470.

La detección de marcas de polinucleótidos se puede ver facilitada por el uso de una "marca de amplificación", que es una molécula que puede amplificar el número de marcas detectables que pueden estar unidas a polinucleótido(s) diana. Una marca de amplificación, por ejemplo, puede comprender un polímero que se une específicamente a una diana de polinucleótido y que tiene una pluralidad de sitios de unión a los que se pueden unir las marcas para generar múltiples señales detectables relativas a uno o más agentes de polinucleótido unidos. A modo de ejemplo, la marca de amplificación puede ser un polímero que tenga una pluralidad de grupos amina que facilitan la unión covalente a una pluralidad de moléculas de biotina. Las moléculas de biotina pueden usarse a continuación para generar una señal detectable. Puesto que cada molécula de biotina genera una señal independiente, existen múltiples señales generadas relativas a un diana de polinucleótido unido al que se une el polímero, amplificando de esta forma la señal correspondiente al mismo.

III. Kits para la amplificación y/o la detección de dianas de polinucleótidos

Se describe un kit para la amplificación isoterma que incluye un soporte sólido revestido anteriormente descrito y una o más enzimas que en su conjunto son suficientes para un proceso de amplificación isoterma. El soporte sólido revestido

incluye una capa catiónica. El soporte sólido revestido está unido a al menos una sonda específica de diana formada por un oligonucleótido modificado o provisto de un elemento estructural que reduce o elimina el reconocimiento mediante una enzima de amplificación isoterma cuando está unida a un diana de polinucleótido, como se ha descrito anteriormente.

5 Cuando se suministra en forma de kit, cualquiera de los diferentes componentes o reactivos se puede envasar en recipientes separados y premezclarse antes del uso con los soportes sólidos de la presente invención. Dicho envasado separado de los componentes permite el almacenamiento a largo plazo. Así, por ejemplo, un kit puede suministrar enzimas de amplificación anhidras y/o sustratos de la enzima y tampones para reconstituir las enzimas y/o los sustratos de la enzima. Se contempla cualquier tampón diseñado para mantener un pH adecuado en las condiciones de reacción de la presente invención. Las preparaciones anhidras se pueden liofilizar, mediante lo cual se elimina el agua al vacío, se criodeseca, se cristaliza, o se prepara usando cualquier otro método para eliminar el agua de forma que se conserve la actividad de los reactivos anhidros. Se pueden añadir excipientes a estas preparaciones para estabilizar dichos reactivos, tales como albúminas séricas o Prionex. Los reactivos se pueden suspender en una composición acuosa que comprende, por ejemplo, glicerol u otros disolventes en los que las enzimas y/o el resto de reactivos sean estables.

15 El kit puede comprender además reactivos de lisis celular (incluidos detergentes no iónicos, [tales como la serie Triton], detergentes catiónicos, detergentes aniónicos, detergentes de ion híbrido, y similares); uno o más medios de reacción para hibridación de dianas de polinucleótidos con las sondas y para eliminar los componentes de la reacción no específicamente unidos; tampones de neutralización; tampones de lavado, y cualquier otro reactivo de detección anteriormente descrito o soluciones para la detección de las dianas de polinucleótidos unidos a las sondas.

20 Los kits pueden incluir los reactivos en recipientes separados para facilitar la realización de un ensayo específico, tal como lisis celular o amplificación en fase solución. Los polinucleótidos y las parejas de cebadores se pueden suministrar y utilizarse como cebadores internos o controles positivos con respecto a la hibridación y/o la amplificación. El kit puede suministrar un componente para recoger la muestra, tal como una membrana, filtro o hisopo.

25 Los reactivos incluidos en los kits se pueden suministrar en recipientes de cualquier tipo, siempre que se preserve la vida de los diferentes componentes, y no se adsorban ni se alteren por los materiales del recipiente. Por ejemplo, las ampollas de vidrio selladas pueden contener enzimas o tampones liofilizados que se han envasado bajo un gas neutro no reactivo, como nitrógeno. Las ampollas pueden estar compuestas de cualquier material adecuado, como vidrio, polímeros orgánicos, tales como policarbonato, poliestireno, etc., materiales cerámicos, metálicos, o cualquier otro material típicamente empleado para contener reactivos. Otros ejemplos de recipientes adecuados incluyen frascos sencillos que pueden estar fabricados de sustancias similares a las ampollas, y envolturas, que pueden consistir en interiores revestidos con una lámina, tal como de aluminio o una aleación. Otros recipientes incluyen tubos de ensayo, viales, matraces, frascos, jeringas, o similares. Los recipientes pueden tener un puerto de acceso estéril, tales como un frasco que tenga un tapón que se puede perforar mediante una aguja para inyección hipodérmica. Otros recipientes pueden tener dos compartimentos que están separados por una membrana fácilmente separable que, tras su retirada, permite que los componentes se mezclen entre sí. Las membranas separables pueden ser de vidrio, plástico, caucho, etc.

40 Los kits se pueden suministrar adicionalmente con un conjunto de instrucciones para usar el contenido de un kit dado. Las instrucciones se pueden imprimir sobre papel o cualquier otro sustrato, y/o se pueden suministrar como medio legible electrónicamente, tal como un disco flexible, CD-ROM, DVD-ROM, disco Zip, cinta de vídeo, cinta de audio, etc. Es posible que las instrucciones detalladas no estén físicamente asociadas al kit; en su lugar, el usuario puede dirigirse a un sitio web especificado por el fabricante o distribuidor del kit, o suministrarse en un correo electrónico. Las instrucciones pueden instruir al usuario del kit en cualquier aspecto de los métodos anteriormente descritos, etapas del método o metodologías relativas a la práctica de la presente invención.

50 Los siguientes Ejemplos se proporcionan para ayudar en la comprensión de la invención, y no deben tomarse como limitaciones de la misma.

Ejemplo 1

Preparación del soporte revestido específico de diana.

55 Los biosensores de silicio con un “lado rugoso” utilizaron una oblea de silicio que tenía un lado pulido y un lado sin pulir, en el que la superficie del lado “rugoso” sin pulir se utilizó para los revestimientos y los ensayos. Los biosensores de película fina (Inverness Medical-Biostar; Jenison y col., Expert Rev. Molec. Diagn., 2006) emplearon obleas de silicio revestidas por el lado pulido con ~475 angstroms de nitruro de silicio, seguido por revestimiento con ~135 angstroms de aminoalquilpolidimetilsiloxano de estructura en T (United Chemical Technologies) como capa de unión. Las superficies se revistieron con 5 µg/ml de poli (lys-phe) (Sigma) en 1X PBS pH 6, NaCl 2 M durante la noche a temperatura ambiente con rotación. Las superficies se lavaron con agua, y después se revistieron con SFB (succinimidil formil benzoato [Solulink] en borato 0,1 M pH 8,5) 10 µM para convertir los grupos amino libres en aldehídos libres para crear uniones hidrazona estables con sondas de captura modificadas con hidrazida. Tras revestimiento con SFB, las obleas se lavaron ampliamente con agua, se secaron con una corriente de nitrógeno, y se almacenaron en una caja seca purgada con nitrógeno. Las sondas de captura de ADN, modificadas en el extremo 5' con conectores de hidrazida, se diluyeron a 50, 150, y 500 nM en tampón de diseminación (fosfato 100 mM pH 8,

glicerol al 10%). 1 μ l de cada dilución se diseminó sobre una superficie modificada con SFB. La sonda se incubó en un ambiente húmedo durante 2-16 horas. A continuación, las superficies se lavaron con agua y se trataron con SDS al 0,1% a >37 °C durante 2-16 horas para eliminar la sonda de captura poco adsorbida. Las superficies se volvieron a lavar con agua, se secaron y se almacenaron en una caja seca purgada con nitrógeno protegida de la luz.

5

Ejemplo 2

Cebadores y sondas

10 Se diseñaron secuencias de oligonucleótidos de cebadores y sondas usando el programa informático Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) con secuencias de entrada descargadas del repositorio de secuencias genéticas de GenBank. Las secuencias utilizadas en estos estudios se muestran en la Fig. 9. Los cebadores inversos se modificaron en sus extremos 5' con biotinTEG (5''-BT) (Glen Research, Sterling VA) para facilitar la detección de las secuencias amplificadas. Las sondas de captura específicas de dianas (CP) se modificaron en sus extremos 5' con un 5'-I-conector (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) y un separador iS18 (Glen Research, Sterling VA) para facilitar la inmovilización a grupos aldehído superficiales con una separación optimizada para la hibridación del ADN. Los tamaños del amplicón en los Ejemplos siguientes fueron 82, 84, o 116 pares de bases para los amplicones L, J, y Q *mecA*, respectivamente, y de 95 pares de bases para el amplicón *ApoB*.

15

20

Ejemplo 3

Protocolo HDA en la superficie

25 Para una HDA en superficie, las superficies se aseguraron en pocillos de una placa de microtitulación usando una cinta adhesiva de doble cara. Se preparó una mezcla maestra usando los reactivos del kit HDA Universal II (BioHelix Corp., Beverly, MA) mediante la adición de lo siguiente (concentración 1X): tampón de hibridación 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, KCl 10 mM), NaCl 40 mM, MgSO₄ 4 mM, dNTP 400 μ M, dATP 3 mM, 0,1 μ M de cada pareja de cebadores, 1X de mezcla de la enzima helicasa, y agua estéril hasta completar el volumen. La mezcla maestra se repartió en alícuotas (74 μ l) sobre la superficie de cada pocillo. El ADN genómico purificado o extraído de MRSA (1 μ l) se añadió a cada reacción, y la superficie de la placa se cubrió con cinta de precinto (Roche) y se incubó a 65 °C (placa calefactora o incubadora) durante una cantidad de tiempo adecuada, normalmente 45 minutos. Tras la amplificación, el sobrenadante se eliminó, y la superficie o superficies se lavaron con lavado A (0,1X SSC, SDS al 0,1%) seguido por lavado B (0,1X SSC). A continuación, un anticuerpo monoclonal de ratón dirigido contra biotina conjugado con HRP diluido 1/1000 en tampón de hibridación 1X (5X SSC, SDS al 0,1%, StabilCoat al 0,5% [Surmodics]) se añadió a la superficie o superficies revestidas, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. La superficie o superficies se lavaron a continuación con lavado B y se incubaron con 125 μ l de TMB a temperatura ambiente durante 5 minutos. La superficie o superficies se lavaron a continuación con agua y metanol, y se dejaron secar.

30

35

Ejemplo 4

40

La hibridación de las dianas de ADN bicatenarias con sondas específicas de diana inmovilizadas en la superficie se hizo posible usando la helicasa para desenrollar la diana bicatenaria.

45 Para demostrar que la helicasa puede desnaturalizar lo suficiente las plantillas de ADN bicatenario para crear regiones monocatenarias adecuadas para la hibridación a las sondas específicas de diana, las dianas de polinucleótidos *mecA* procedentes de ADN de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina se amplificaron en un tubo de microtitulación (25 μ l) durante 60 minutos usando el conjunto de cebadores *mecA* L como se describe en el Ejemplo 3. Los productos amplificados mediante HDA (o amplicones) se diluyeron 1/500 en agua y se hibridó a un chip biosensor de película fina (Inverness Medical-Biostar, Inc.) adherido al fondo de una placa de microtitulación que contenía 90 μ l de tampón de hibridación 1X o tampón IsoAmp II 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, KCl 10 mM, NaCl 40 mM, MgSO₄ 4 mM). Para el control negativo (Chip A) se añadieron 10 μ l de agua a un chip que contenía tampón de hibridación 1X. Para un control de desnaturalización térmica (Chip B), una alícuota de 10 μ l del amplicón se calentó a 95 °C durante 5 minutos y a continuación se añadió a la superficie de un chip que contenía tampón de hibridación 1X. Para un control sin desnaturalización (Chip C), se añadieron 10 μ l de amplicón diluido directamente a un chip que contenía tampón HDA 1X junto con 5 μ l del tampón diluyente de helicasa (KCl 10 mM, Tris-HCl 1 mM, DTT 0,1 mM DTT, EDTA 0,01 mM, TX-100 al 0,01%, glicerol al 5%, concentración final pH 7,4). Para la muestra diana desnaturalizada con helicasa (Chip D), 5 μ l de helicasa (150 ng en tampón diluyente de helicasa) se añadió a los 10 μ l del amplicón diluido, y se colocó sobre el chip que contenía tampón HDA 1X. Todas las superficies se incubaron durante 15 minutos a 53 °C y a continuación se lavaron con lavado A seguido por el lavado B. Para cada chip, se añadieron 125 μ l de un anticuerpo contra biotina/conjugado con HRP diluido 1/1000 en tampón de hibridación 1X y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los chips se lavaron con lavado B y después se añadieron 125 μ l de TMB. Los chips se incubaron otros 5 minutos, se lavaron con agua y metanol y se dejaron secar.

50

55

60

65

Como muestra la Figura 1, la hibridación del ADN diana requiere su desnaturalización, como se esperaba. En particular, la adición de helicasa a la diana proporcionó una señal positiva, aunque no tan fuerte como el control de

desnaturalización térmica. Esto sugiere que la helicasa puede no ser tan eficaz como el calor para desnaturalizar la muestra. Deberá indicarse, sin embargo, que la helicasa no se incubó a su temperatura óptima (65 °C) para este estudio. Adicionalmente, la sensibilidad de la detección de la diana se bajó 2-4 veces en tampón HDA 1X comparado con tampón de hibridación 1X a 53 °C (no se muestran los datos). Sin embargo, este estudio ilustra que la helicasa es suficiente para desenrollar dianas bicatenarias para la hibridación a sondas inmovilizadas en la superficie.

Ejemplo 5

La disociación y la detección de dianas de polinucleótidos hibridadas a partir de la superficie catiónica se ven afectadas inesperadamente por la fuerza iónica.

Las secuencias del gen *mecA* en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina se amplificaron en un tubo de microtitulación (25 µl) durante 60 minutos usando el conjunto de cebadores *mecA* L como se ha descrito en el Ejemplo 3. Los amplicones de una reacción de HDA se diluyeron 1/5000 en tampón de hibridación 1X y se hibridaron con un chip biosensor de película fina durante 15 minutos a 53 °C. Las superficies se lavaron con lavado A y lavado B. A continuación, se añadieron 100 µl de tampón IsoAmp II 1X o bien tampón de hibridación 1X y se incubaron a diferentes temperaturas. Las reacciones se detuvieron a diferentes tiempos mediante lavado con lavado A seguido por el lavado B. Para cada chip, se añadieron 125 µl de un anticuerpo contra biotina/conjugado con HRP diluido 1/1000 en tampón de hibridación 1X y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los chips se lavaron con lavado B y después se añadieron 125 µl de TMB. Los chips se incubaron otros 5 minutos, se lavaron con agua y metanol y se dejaron secar.

Como muestra la Figura 2 a 58,5 °C, el ADN unido a la superficie se disoció rápidamente de la superficie del chip ($t_{1/2}$ ~ 30 minutos) en presencia del tampón de hibridación 1X muy salino (que contenía catión monovalente 825 mM). Por el contrario, se mantuvo una fracción significativa de la diana en la presencia del tampón IsoAmpII 1X (que contiene catión monovalente 54 mM), incluso después de 4 horas a 58,5 °C. Experimentos adicionales realizados para un intervalo de temperaturas (53 °C a 64 °C) confirmó que la disociación del ADN diana de la superficie fue más rápida a temperaturas más altas en el tampón de hibridación 1X, como se esperaba para los dupletes de ADN ($t_{1/2}$ ~240 minutos a 53 °C y <<30 minutos a 64 °C, no se muestran los datos). Las tasas de disociación desde el soporte sólido revestido (como se refleja mediante la señal detectable), aunque no se determinaron cuantitativamente en la presente memoria, parecen similares a los valores notificados en la bibliografía. Por el contrario, la disociación del ADN diana de la superficie fue mucho más lenta con el tampón de baja fuerza iónica IsoAmp II en condiciones por otra parte iguales ($t_{1/2}$ >>360 minutos a 53 °C y >>240 minutos a 58,5 °C, no se muestran los datos).

Lo que se esperaría normalmente es que los dupletes de ADN se disociaran más rápido en tampones de baja fuerza iónica que tienen menor estabilización de la carga. Sin embargo, los datos anteriores sugieren que la superficie con carácter catiónico tiene un papel en la disociación del ADN diana desde la superficie. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que en condiciones de alta salinidad, los cationes de la superficie quedan apantallados de la interacción (y la estabilización) con las dianas de polinucleótidos hibridadas. De acuerdo con ello, las dianas de polinucleótidos pueden disociarse más libremente de la superficie. En condiciones de baja salinidad de la reacción de HDA, los cationes pueden retener su capacidad de interacción electrostática con la estructura principal del ADN de la diana de polinucleótido, ralentizando o evitando su disociación de la superficie, incluso aunque la diana ya no esté hibridada con la sonda inmovilizada en la superficie.

Ejemplo 6

Tiempo de duplicación para cebadores de MRSA en solución.

Se llevó a cabo una serie de reacciones HDA realizadas con una gama de ADN de entrada de MRSA genómico (ATCC) (100-1.000.000 copias) en una mezcla de reacción que contenía tampón de hibridación 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,8, KCl 10 mM) (BioHelix), NaCl 40 mM, MgSO₄ 4 mM, dNTP 400 µM, ATP 3 mM, 0,1 µM de cada cebador, mezcla de la enzima helicasa 1X (BioHelix), EvaGreen 0,2X (Biotium, Inc.). Las muestras se introdujeron en una placa óptica Roche LightCycler 480, cubierta con una cinta de precinto y se introdujo en el Roche LightCycler 480. Las placas se incubaron a 65 °C y los datos se recogieron cada 60 segundos. EvaGreen es un colorante bicatenario específico que aumenta la fluorescencia en función de la amplificación. Se realizó el análisis de la curva de fusión realizado tras la amplificación para verificar que se produjo un amplicón de longitud completa con la Tm esperada. La fidelidad de la amplificación se confirmó adicionalmente mediante la hibridación a sondas específicas de diana inmovilizadas sobre chips de silicio como se ha descrito anteriormente. La incorporación del tinte se evaluó representando gráficamente el tiempo hasta la señal detectable (CP) frente al número de copias del ADN genómico de entrada. La pendiente de las curvas produce tiempos de duplicación (tiempo hasta que el par de cebadores crea una copia) caracterizado por cada conjunto de cebadores. Este análisis proporciona una aproximación razonable de la cantidad esperada de amplicón presente para cada tiempo dado. Dado que existe probablemente una fase latente a superar en las primeras etapas de la reacción HAD, las tasas de duplicación reales pueden ser algo más rápidas que los tiempos de duplicación promedio determinados en la presente memoria.

Las Figs. 3A y 3B ilustran datos representativos de la amplificación de conjuntos de cebadores dirigidos al gen *mecA* en *Staphylococcus* resistente a meticilina. Se descubrió que los pares de cebadores sometidos a ensayo mostraban tiempos de duplicación en solución comprendidos en aproximadamente 1-3 minutos. Los que tienen

los tiempos de duplicación más cortos (y que se encontró que eran específicos de la amplificación de la diana) se seleccionaron para posterior desarrollo del ensayo.

Ejemplo 7

5 Determinación del efecto del chip sobre la eficiencia de la amplificación mediante HDA.

Las reacciones HDA se configuraron en tubos de microcentrífuga de 1,7 ml o sobre un chip con 2000 copias de ADN humano purificado (Promega) como entrada para la amplificación. Se dejó que las reacciones continuaran durante varios plazos de tiempo, y las reacciones se detuvieron. Las reacciones de ambos conjuntos de muestra se aplicaron a un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

15 Ambos conjuntos de reacciones muestran claramente bandas visibles del tamaño correcto en el gel después de un tiempo de amplificación de 30 minutos. Parece que no existe un efecto adverso sobre la eficiencia de amplificación derivado del chip. Los amplicones en chip revelaron una sola banda sobre el gel, y las bandas obtenidas para los mismos puntos temporales fueron más intensas.

Ejemplo 8

20 Cálculo de los TTR teóricos basados en los chips teóricos LLOD y cálculo de los tiempos de duplicación.

Los tiempos de duplicación del cebador calculados en solución (por ejemplo, 1,1 minutos para el conjunto de cebadores "L") se usaron para calcular un tiempo teórico hasta el resultado (TTR) para un chip que no interfiere con la amplificación/detección basada en chips LLOD medida para un ADN de partida 10-30 pM (amplicón) con temperaturas de HDA (65 °C) y condiciones tampón. En la Fig. 4 siguiente se muestra una representación gráfica de la cantidad de amplicón presente en función del tiempo de amplificación. Un recuadro en negrita bordea el límite de sensibilidad de una sonda específica de diana dada, y una línea discontinua muestra la cantidad que es 10 veces superior al LLOD (límite inferior de detección). Una línea vertical aproxima el tiempo hasta la señal detectable para 10 copias de la diana como entrada en la reacción de HDA. Los resultados muestran que desde un número tan pequeño como 10 copias de ADN de entrada, se pueden obtener en aproximadamente ~30 minutos, produciendo además niveles 10 veces superiores del umbral de detección en 38 minutos.

Ejemplo 9

35 Detección de los productos de amplificación mediante HDA sobre chips de silicio (LLOD).

Para determinar el límite inferior de detección (LLOD) correspondiente a la amplificación/detección mediante HDA en chip de ADN de MRSA, se llevó a cabo un análisis dosis-respuesta de la amplificación del ADN de MRSA usando el protocolo descrito en el Ejemplo 3. Las secuencias del gen *mecA* procedentes del ADN genómico purificado de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ATCC, cepa n.º 11632) se amplificaron usando el conjunto de cebadores "L" descrito en el Ejemplo 2 y se representaron gráficamente en la Fig. 9. Se sometió a ensayo la dosis respuesta del ADN genómico de partida comprendido entre 0 y 10.000 copias. Las reacciones de amplificación se incubaron durante 45 minutos a 64 °C sobre el "lado rugoso" de chips de silicio que contienen una sonda de captura específica de *mecA* (*mecA*1703 CP, Fig. 9). Los datos representativos de la Figura 5 incluyen los controles negativos NTC A y NTC B. Los resultados muestran que el LLOD es 10 copias de ADN diana en el chip. El resultado del LLOD se reprodujo adicionalmente en experimentos que amplificaban el gen *ApoB* humano y el gen *cfb* de *Streptococcus agalactiae*.

Ejemplo 10

50 Detección de los productos de amplificación mediante HDA sobre chips de silicio (TTR).

Para determinar el tiempo necesario para amplificar el ADN genómico de MRSA hasta niveles detectables (tiempo hasta el resultado, TTR), las reacciones HDA se llevaron a cabo con cebadores específicos de *mecA* en la presencia de cantidades variables (0-1000 copias de la secuencia) de ADN genómico purificado a partir de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina aplicado al "lado rugoso" de un chip de silicio revestido con sonda específica de captura específica de *mecA* 1703 como se ha descrito en el Ejemplo 3. Las señales del chip se midieron en diferentes puntos temporales lavando el chip para determinar la reacción antes de la adición de los reactivos de detección. Los datos representativos se muestran en la Figura 6. Con 100 copias de la secuencia del ADN diana de MRSA, el chip produjo una señal detectable a los 30 minutos; 10 copias de entrada produjeron una señal detectable a los 45 minutos. Estos resultados son consistentes de forma general con el modelo teórico del Ejemplo 8, que predice la detectabilidad de 100 copias en 27-30 minutos y de 10 copias mediante 30-33 minutos. (Para evaluar más precisamente el comportamiento de la HDA para 10 copias con respecto al modelo teórico, es posible que los puntos temporales requieran aproximadamente 30 minutos). Estos datos sugieren que la amplificación de HDA en chip se puede llevar a cabo cerca de sus límites previstos en condiciones en las que el chip no afecta negativamente la eficacia de amplificación. Estos datos también sugieren que HDA no parece extender la fase latente al inicio de la

amplificación, ralentizando el tiempo hasta obtener un resultado detectable. En la medida que pueda existir dicha fase latente, sin embargo, los cebadores se generarían más rápidamente que los tiempos de duplicación previstos.

Ejemplo 11

5

Detección de los productos de amplificación mediante HDA sobre chips biosensoras de película fina.

Para someter a ensayo la amplificación/detección mediante HDA en chip sobre otro medio de detección visual, los inventores utilizaron el chip biosensor de película fina que contiene las sondas *mecA* (1703) para la detección visual directa de acuerdo con el método descrito en los Ejemplos 3 y 10. Los tiempos de detección en chip fueron similares al lado rugoso del chip de silicio usado en el Ejemplo 10. Como muestra la Figura 7, la amplificación de las 100 copias de ADN genómico produjo señales detectables en 30 minutos, que es consistente con los resultados observados usando el lado rugoso de los chips. Los soportes de silicio revestidos pueden proporcionar por tanto una plataforma flexible para la amplificación y detección mediante HDA sobre chip.

15

Ejemplo 12

Detección de las secuencias génicas *mecA* procedentes de aislados de hemocultivo usando la detección con HDA sobre chip en relación con diferentes tratamientos superficiales.

20

Se extrajo sangre (~10 ml) y se introdujo en un frasco de cultivo BACTEC. A continuación, el frasco se sembró con ~1.000.000 UFC de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (ATCC cepa n.º 11632) sembrado sobre agar sangre y hecho crecer a 37 °C durante la noche. El frasco de hemocultivo se incubó en un instrumento BACTEC hasta que sonó la alarma, indicando que el frasco era positivo para el crecimiento bacteriano. La siembra en dilución reveló la presencia de aproximadamente 10^8 a 10^9 organismos por ml en el momento en que sonó la alarma. Se extrajeron alícuotas (10 µl) de frascos de hemocultivo MRSA+ BACTEC y se añadieron a 3 µl de NaOH 1 M para lisar los eritrocitos. A continuación, se añadieron 87 µl de una mezcla de extracción (Tris 10 mM, pH 7, 50 unidades de cromopeptidasa [ACP, Sigma]) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de hervir la muestra tratada para inactivar el ACP. De la muestra lisada, 1 µl se sometió a continuación a una reacción de HDA sobre chip en chips biosensores de película fina durante 40 minutos esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 3. Los controles negativos incluyeron lisis de 10 µL de hemocultivo exento de bacterias.

25

30

Se utilizaron cuatro chips biosensores de película fina diferentes: (1) un chip que se envejeció durante 6 meses tras la unión de la sonda no tratada posteriormente para bloquear los grupos reactivos restantes (Envejecida); (2) un chip recientemente fabricado no tratado posteriormente para bloquear los grupos reactivos restantes (No bloqueado); (3) un chip recientemente fabricado del mismo lote, tratado con 100 µm de NHS-acetato (Pierce) para bloquear las aminas superficiales fácilmente accesibles NHS-Ac block); y (4) un chip recientemente preparado a partir del mismo lote, tratado con 100 µm de anhídrico acético (Aldrich) para bloquear las aminas superficiales fácilmente accesibles (bloque AcAn).

35

Los resultados representativos se muestran en la Figura 8. Se observó una señal claramente detectable en todos los chips. Los controles negativos estuvieron desprovistos de señal, lo que indica que la matriz no estaba interfiriendo con la amplificación/detección, salvo en el caso del chip recientemente preparado no bloqueado, que mostró evidencias de pasivación superficial, o unión no específica, debida a los componentes del extracto del hemocultivo, incluidos una cromopeptidasa extraída de células bacterianas, componentes de la sangre y/o medio de cultivo. Estos datos muestran que el comportamiento sobre una superficie catiónica revestida se puede mejorar mediante el envejecimiento u otros tratamientos que sirven para bloquear al menos una proporción de las aminas libres.

40

45

Parece que las superficies pueden volverse más hidrófobas con el tiempo con revestimientos de poli-(lys, phe) sobre silicio o biosensores de película fina cuando se mide por el aumento del ángulo de contacto en un goniómetro (no se muestran los datos). Esto sugiere que se produce una difusión significativa con el tiempo, cambiando la accesibilidad de las aminas. Aunque esto no parece perjudicar la capacidad para inmovilizar las sondas de captura, es beneficioso controlar las interacciones no específicas que implican componentes de muestras de hemocultivo, por ejemplo. Como método de "acelerar" este proceso de difusión, las aminas libres accesibles se pueden modificar con NHS-acetato o anhídrico acético. Aunque estos métodos pueden bloquear cantidades significativas de aminas accesibles, el bloqueo de todas las aminas no es completo, dejando otras disponibles para interactuar localmente con secuencias diana inmovilizadas, de forma que ralenticen su difusión desde la superficie en condiciones de baja fuerza iónica (<50 mM Na⁺).

50

55

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Jenison, Robert Delmar
- 5 <120> SISTEMA Y MÉTODOS DE AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN DE POLINUCLEÓTIDOS EN EL PUNTO DE ATENCIÓN SANITARIA
- <130> 48900/16
- 10 <140> US-12/036.048
<141> 2008-02-22
- <160> 11
- 15 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
<211> 27
<212> ADN
20 <213> Artificial
- <220>
<223> cebador; mecA L FWD
- 25 <400> 1
tggatagacg tcatatgaag gtgtgct 27
- <210> 2
30 <211> 27
<212> ADN
<213> Artificial
- <220>
35 <223> cebador; mecA L REV
- <220>
40 <221> misc_feature
<222> (0)..(1)
<223> 5'-BT: biotinTEG Fosforamidita; modificación en 5'-biotina
- <400> 2
45 attatggctc aggtactgct atccacc 27
- <210> 3
<211> 27
<212> ADN
50 <213> Artificial
- <220>
<223> cebador; mecA J FWD
- 55 <400> 3
tggatagacg tcatatgaag gtgtgct 27
- <210> 4
60 <211> 26
<212> ADN
<213> Artificial
- <220>
65 <223> cebador; mecA J REV

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (0)..(1)
 5 <223> 5'-BT: biotinTEG Fosforamidita; modificación en 5'-biotina

 <400> 4
 tgattatggc tcaggctactg ctatcc 26

 10
 <210> 5
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15
 <220>
 <223> sonda; mecA1703 CP

 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (0)..(1)
 <223> 5'Link12: 5'-I-conector (química de unión covalente para oligonucleótidos)

 25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (0)..(1)
 <223> iS18: Int Spacer 18 (separador interno de oligonucleótidos)

 30
 <400> 5
 caagtgctaa taattcacct gtttg 25

 <210> 6
 35 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 40 <223> cebador; mecA Q FWD

 <400> 6
 caaactacgg taacattgat cgcaacg 27

 45
 <210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 50
 <220>
 <223> cebador; mecA Q REV

 55
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (0)..(1)
 <223> 5'-BT: biotinTEG Fosforamidita; modificación en 5'-biotina

 60
 <400> 7
 atgctttggt cttctgcat tctctg 25

 <210> 8
 65 <211> 22
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> sonda; mecA1653 CP
 5
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (0)..(1)
 10 <223> 5'ILink12: 5'-I-conector (química de unión covalente para oligonucleótidos)
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (0)..(1)
 15 <223> iSp18: Int Spacer 18 (separador interno de oligonucleótidos)
 <400> 8
 aaacaaacta cgtaacatt ga 22
 20
 <210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador; APOB4 rev
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (0)..(1)
 <223> 5'-BT: biotinTEG Fosforamidita; modificación en 5'-biotina
 35 <400> 9
 cagtgtatct gaaagccta caggacacca aaa 33
 40 <210> 10
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> cebador; APOB FWD 3
 <400> 10
 cttcatgtga gccaaagatg ctgaac 26
 50
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> sonda; APOB-CP1
 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (0)..(1)
 <223> 5'ILink12: 5'-I-conector (química de unión covalente para oligonucleótidos)
 65 <220>
 <221> misc_feature

ES 2 556 595 T3

<222> (0)..(1)

<223> iSp18: Int Spacer 18 (separador interno de oligonucleótidos)

<400> 11

5 aattggcct tcatgtgagc

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la presencia o ausencia de una diana de polinucleótido en una muestra, que comprende:
 - a. proporcionar un soporte sólido revestido que comprende un sustrato sólido, una capa catiónica, y una pluralidad de sondas específicas de diana unidas al soporte sólido revestido;
 - b. aplicar al soporte sólido revestido la muestra y un medio de reacción;
 - c. someter la muestra a un proceso de amplificación dependiente de helicasa isoterma que puede amplificar una diana de polinucleótido mientras que al mismo tiempo hibrida las dianas de polinucleótidos amplificados a las sondas específicas de diana;
 - d. detecta la presencia o la ausencia de dianas de polinucleótidos unidos a las sondas.
2. El método de la reivindicación 1, en donde las etapas de amplificación e hibridación isoterma se llevan a cabo a una concentración de catión monovalente entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 100 mM.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de someter la muestra a condiciones adecuadas para hibridar las dianas de polinucleótidos en la muestra a las sondas en el soporte sólido revestido a una concentración de catión monovalente mayor de aproximadamente 0,5 M antes del proceso de amplificación isoterma.
4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además la etapa de escindir químicamente las sondas hibridadas y las sondas no hibridadas del soporte sólido revestido y eluir las sondas escindidas en un segundo medio de reacción.
5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el sustrato sólido se bloquea o se envejece para reducir la pasivación de la superficie de los componentes de la reacción que interfieren con la detección de las dianas de polinucleótidos unidos a las sondas.
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa de detección comprende la unión de un anticuerpo contra biotina/conjugado con peroxidasa de rábano picante a una marca de biotina, seguido por la adición de un sustrato de tetrametilbencidina.
7. El método según la reivindicación 1, en donde la capa catiónica comprende al menos un polímero policatiónico que está opcionalmente seleccionado de uno o más del grupo que consiste en polilisina, poli(lys-phe), poli(lys-tyr), poli(lys-trp), poli(arg-trp), y poli(arg-pro-tyr).
8. El método según la reivindicación 7, en donde el polímero policatiónico está unido al sustrato sólido.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la capa catiónica comprende un compuesto seleccionado de uno o más del grupo que consiste en un silano catiónico, un siloxano catiónico, o uno de sus derivados catiónicos.
10. El método según la reivindicación 9, en donde la capa catiónica comprende un compuesto seleccionado de uno o más del grupo que consiste en aminopropiltrimetoxisilano, aminopropiltriethoxisilano, organopolisiloxanos aminofuncionalizados, y alcoxilatos de siloxano aminofuncionalizados.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde al menos una de la pluralidad de sondas específicas de diana comprende un oligonucleótido modificado que contiene un elemento estructural que reduce la desnaturalización enzimática del oligonucleótido unido a la diana de polinucleótido.
12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la pluralidad de sondas específicas de diana comprende al menos una sonda modificada o bloqueada para reducir el reconocimiento mediante una helicasa.
13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la pluralidad de sondas específicas de diana comprende al menos una sonda que comprende una estructura principal que tiene al menos una carga neutra.
14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la pluralidad de sondas específicas de diana comprende al menos una sonda que comprende una estructura principal de metilfosfonato.

15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la pluralidad de sondas específicas de diana comprende al menos una sonda que comprende un ácido peptidonucleico.
- 5 16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la pluralidad de sondas específicas de diana comprende al menos una sonda que comprende un ácido nucleico bloqueado.
17. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la pluralidad de sondas específicas de diana comprende al menos una sonda que comprende un enlace de 2'-O-metilo.
- 10 18. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde la pluralidad de sondas específicas de diana está unida al soporte sólido mediante una capa de unión que comprende un revestimiento de agentes acopladores depositados sobre la superficie del soporte sólido.

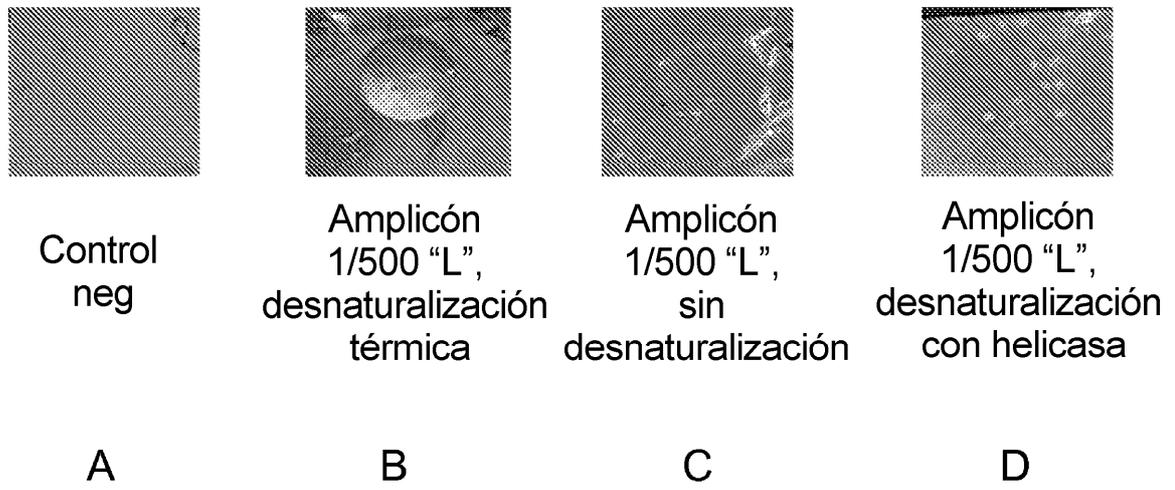
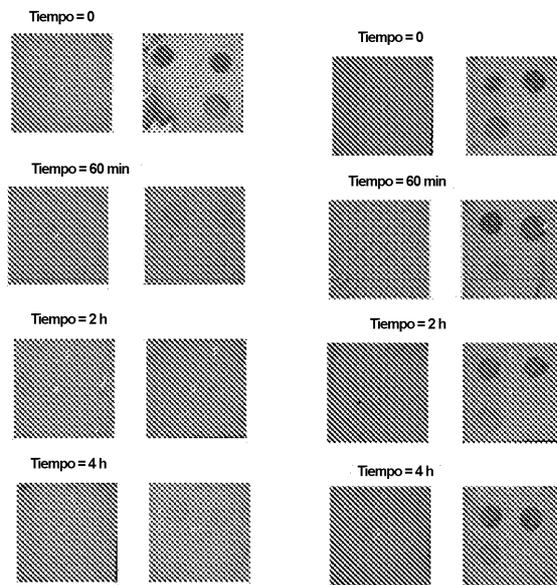


FIGURA 1

1X Hyb

1X IsoAmp II



Sonda de captura MecA 1703 - SA

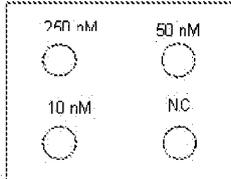


FIGURA 2

Conjunto de cebadores

Copias de entrada	J	L	Q	P
100	24,54	25,83	33,03	
1000	23	23,22	28,97	
10000	20,73	20,94	24,27	56,46
100000	17,9	18,01	21,74	52,93
1000000	14,63	15,56	18,16	41,01

tiempo de duplicación 1,1 min 1,1 min 1,6 min 3,4 min

FIGURA 3A:

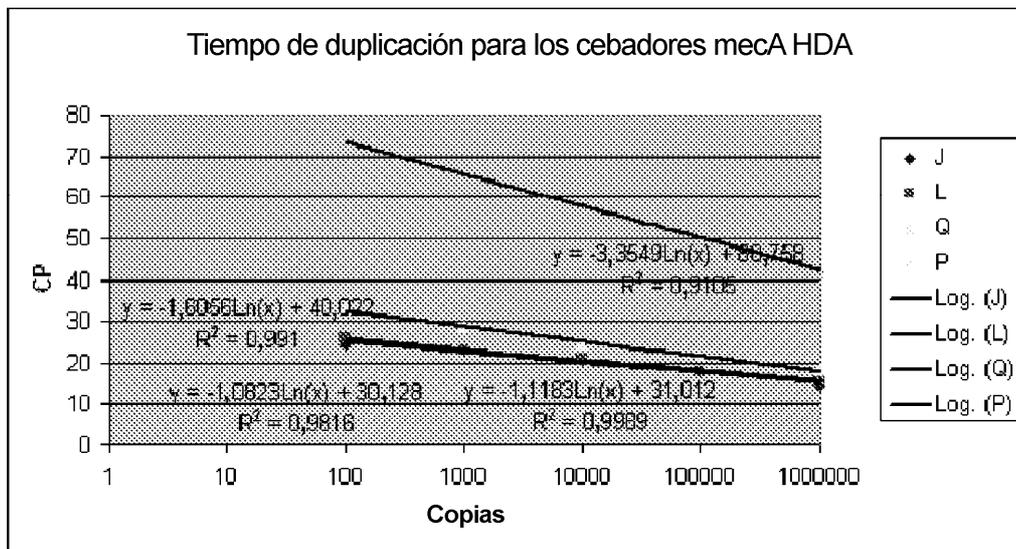


FIGURA 3B:

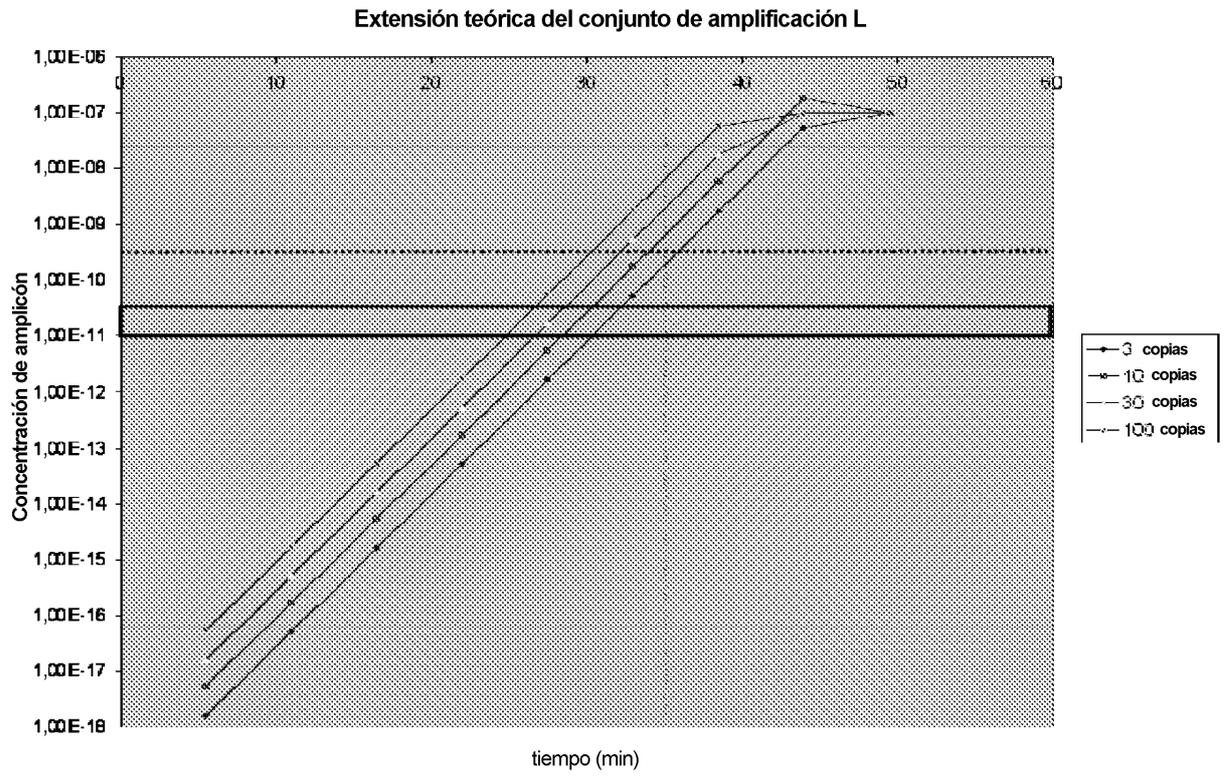


FIGURA 4

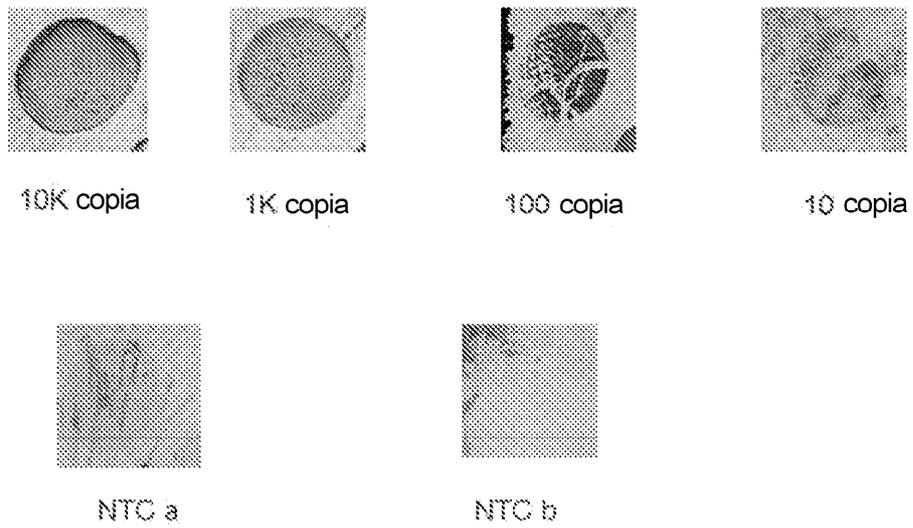


FIGURA 5

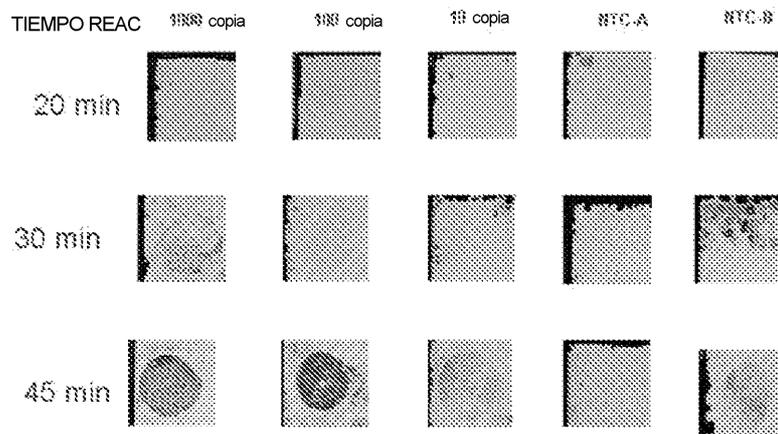


FIGURA 6

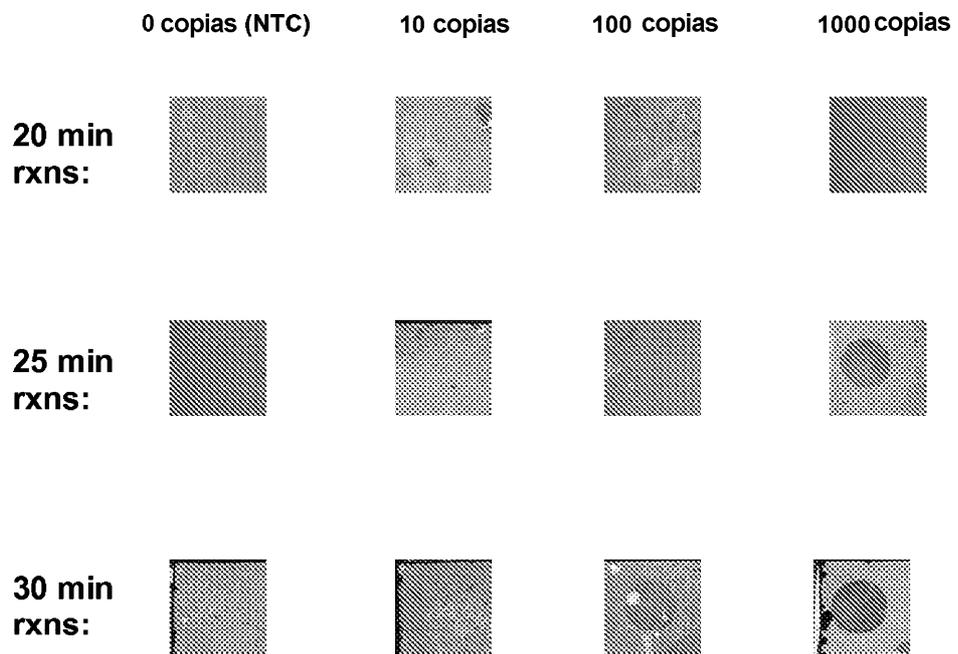


FIGURA 7

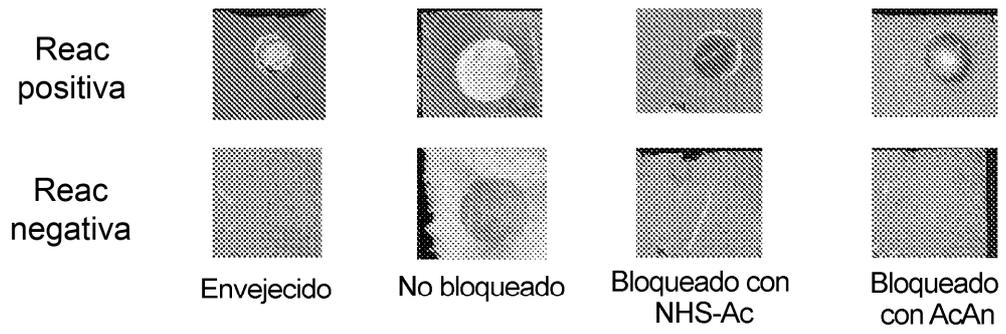


FIGURA 8

Cebador o sonda	Secuencia
mecA L FWD	TGGATAGACGTCATATGAAGGTGTGCT (SEQ ID NO. 1)
mecA L REV	5'-BT-ATTATGGCTCAGGTAAGTACTGCTATCCACC (SEQ ID NO. 2)
mecA J FWD	TGGATAGACGTCATATGAAGGTGTGCT (SEQ ID NO. 3)
mecA J REV	5'-BT-TGATTATGGCTCAGGTAAGTACTGCTATCC (SEQ ID NO. 4)
mecA1703 CP	5'ILink12/iSp18/CAAGTGCTAATAATTCACCTGTTTG (SEQ ID NO. 5)
mecA Q FWD	CAAACACTACGGTAACATTGATCGCAACG (SEQ ID NO. 6)
mecA Q REV	5'-BT-ATGCTTTGGTCTTTCTGCATTCCCTG (SEQ ID NO. 7)
mecA1653 CP	5'ILink12/iSp18/AAACAAACTACGGTAACATTGA (SEQ ID NO. 8)
APOB4 rev	5'-BT-CAGTGTATCTGGAAAGCCTACAGGACACCAAAA (SEQ ID NO. 9)
APOB FWD 3	CTTCATGTGAGCCAAAGATGCTGAAC (SEQ ID NO. 10)
APOB-CP1	5'ILink12/iSp18/AATTTGGCCTTCATGTGAGC (SEQ ID NO. 11)

FIGURA 9