

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 079**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2010 PCT/GB2010/001169**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010 WO10146349**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2010 E 10725825 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2443253**

54 Título: **Tecnología de amplificación de ácido nucleico acelerado isotérmicamente**

30 Prioridad:

15.06.2009 GB 0910302

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

10.11.2016

73 Titular/es:

**LUMORA LTD (100.0%)
Staffords Chartered Accounts CPC1 Capital Park
Fulbourne
Cambridge CB21 5XE, GB**

72 Inventor/es:

**TISI, LAURENCE CARLO;
GANDELMANN, OLGA;
KIDDLE, GUY y
MCELGUNN, CATHAL, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 589 079 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).

Tecnología de amplificación de ácido nucleico acelerado isotérmicamente

Descripción

5 **ÁREA DEL INVENTO**

[0001] Este invento se refiere al campo de la amplificación de ácidos nucleicos. En particular, se refiere a un método que mejora la amplificación rápida y específica y la detección de una muestra de prueba.

10 **ANTECEDENTES**

[0002] La tecnología de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT - nucleic acid amplification technology) es una herramienta invaluable y poderosa en muchas áreas de investigación y de diagnóstico. Las técnicas NAAT permiten la detección y cuantificación de un ácido nucleico en una muestra con una alta sensibilidad y especificidad, así como un análisis cuantitativo de ácidos nucleicos en una muestra.

[0003] La amplificación de ácidos nucleicos podría utilizarse para determinar la presencia de un ácido nucleico tipo plantilla específico en una muestra, tal como es indicado por la presencia de un producto de amplificación después de la implementación de una NAAT específica. Por otro lado, la ausencia de cualquier producto de amplificación indica la ausencia del ácido nucleico tipo plantilla en la muestra. Aquellas técnicas son de gran importancia en las aplicaciones de diagnóstico, por ejemplo, para determinar si un patógeno está presente en una muestra.

[0004] Inventos previos en la industria han descrito una variedad de técnicas de termociclado y técnicas isotérmicas para la amplificación de ácidos nucleicos. Las técnicas de termociclado, tales como la reacción en cadena de polimerasas (PCR - polymerase chain reaction), utiliza reciclado de temperaturas para controlar los ciclos repetidos de la síntesis de ADN que conllevan a montos grandes de ADN nuevo que se está siendo sintetizado proporcionalmente al monto original del ADN plantilla. Varias técnicas isotérmicas también han sido desarrolladas las cuales no se basan en termociclados para controlar la reacción de amplificación. Las técnicas isotérmicas que utilizan a polimerasas de ADN con actividades de desplazamiento de hebras han sido desarrolladas para reacciones de amplificación que no involucran a un paso de síntesis de ARN. Asimismo, para reacciones de amplificación que no involucran a un paso de síntesis de ARN, se han desarrollado técnicas isotérmicas que podrían usar transcriptasas en reversa, RNasas H y/o polimerasas de ARN que dependen de ADN (refiérase, por ejemplo, a Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies - A Review. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (Tecnologías de Amplificación Isotérmicas de Ácidos Nucleicos - Una Revisión: Nucleósidos, Nucleótidos y Ácidos Nucleicos), volumen 27, ejemplar 3, marzo de 2008, páginas 224 - 243).

[0005] El ácido polinucleico producido por la tecnología de amplificación utilizada es denominado generalmente como un amplicón. La naturaleza del amplicón producido varía significativamente dependiendo de la NAAT que se está practicando. Por ejemplo, NAATs tales como la PCR podrían producir a un amplicón que es sustancialmente de tamaño idéntico y de secuencia idéntica. Otras NAATs producen amplicones de tamaños muy variados donde el amplicón se compone de números diferentes de secuencias repetidas de tal forma que el amplicón es una colección de concatémeros de longitud diferente. La secuencia repetitiva proveniente de aquellos concatémeros reflejará la secuencia del ácido polinucleico que es sujeto al ensayo que se está realizando.

[0006] Puesto que las NAATs son de una importancia vital en muchas áreas, por ejemplo, en aplicaciones de diagnóstico, existe una necesidad continua en la industria de suministrar NAATs que tengan una velocidad, una sensibilidad y una especificidad mejoradas. Este invento suministra métodos sencillos y ahorradores para lograr esta meta. Además, este invento tiene la ventaja de que los incrementos logrados por el método de este invento pueden contrarrestar las reducciones de la tasa de amplificación causadas por problemas que dependen de secuencias que causan que los diseños de cebadores para una NAAT específica no sean óptimos. Aquellos incrementos de tasas pueden reducir aún más el costo de un ensayo basándose en una NAAT específica puesto que sistemas costosos alternos para incrementar la tasa de amplificación pueden evitarse.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS SECCIONES PREFERIDAS

[0007] Este invento suministra un método mejorado de amplificación de ácidos polinucleicos. Por lo tanto, en una sección, este invento suministra un método para sintetizar a un ácido polinucleico donde dicho método comprende los pasos de:

- 60 a) suministrar una plantilla objetivo que comprende a por lo menos una primera y 2ª región de enlace de cebadores recíprocos;
- b) suministrar un primer cebador que comprende a un primer y 2º segmentos, donde el primer segmento es sustancialmente complementario a la primera región de enlace de cebadores recíprocos en la plantilla y el 2º segmento comprende a una secuencia que es sustancialmente complementaria a otra región en el primer cebador o a una región en el amplicón generado a partir del primer segmento del primer cebador de tal forma que el 2º segmento pueda formar a un bucle,

donde, cuando el primer cebador comprende a un 2º segmento que es sustancialmente complementario a una región en el amplicón generado a partir del primer segmento del primer cebador, la primera región de enlace de cebadores recíprocos también abarca a la región en la

- 5 c) suministrar a un 2º cebador que comprende a un primer, y opcionalmente, un 2º segmento, donde el primer segmento es sustancialmente complementario a la 2ª región de enlace cebadores recíprocos en la plantilla y el 2º segmento opcional comprende a una secuencia que es sustancialmente complementaria a otra región en el 2º cebador o a una región en el amplicón generado a partir del primer segmento en el 2º cebador de tal forma que la 2ª región es capaz de formar un bucle, donde, cuando el 2º cebador comprende a un 2º segmento que es sustancialmente complementario a la región en el amplicón generado a partir del primer segmento del 2º cebador, la 2ª región de enlace de cebadores recíprocos también abarca a la región en la plantilla que es sustancialmente idéntica al 2º segmento del 2º cebador;
- 10 d) suministrar por lo menos un cebador que es capaz de enlazarse a la región entre la primera y la 2ª regiones de enlaces de cebadores recíprocos, donde por lo menos un cebador madre es
- 15 (i) un cebador sencillo, que es complementario a un lugar de enlace de cebadores en un ácido polinucleico y que contiene menos de 5 nucleótidos 3' o 5' de la región de cebado que es sustancialmente complementaria al lugar de enlace de cebadores;
- 20 (ii) un cebador que forma bucles, que es un cebador que comprende a un primero y 2º segmentos, donde el primer segmento es sustancialmente complementario a una región de enlace de cebadores en la plantilla y el 2º segmento comprende a una secuencia que es sustancialmente complementaria a una región en el amplicón generado a partir del primer segmento del primer cebador de tal forma que el 2º segmento es capaz de formar a un bucle;
- 25 (iii) un cebador tipo horquilla, que comprende a un primero y 2º segmentos, donde el primer segmento es sustancialmente complementario a la región de enlaces de cebadores en una plantilla y el 2º segmento comprende a una secuencia que es sustancialmente complementaria a otra región en el cebador;
- 30 (iv) un cebador que suministra bucles; que es un cebador tipo horquilla en el cual las repeticiones invertidas son separadas por una región enlazadora; o
- (v) un cebador quimérico;
- 35 e) suministrar los reactivos y condiciones necesarias para realizar la síntesis del ácido polinucleico;
- f) realizar la síntesis del ácido polinucleico.

40 **[0008]** El principio subyacente de este invento es que se ha descubierto sorpresivamente que la provisión de uno o más "cebadores madre", es decir, cebadores que se enlazan a la región entre las regiones de enlace de cebadores recíprocos en reversa, mejora significativamente la velocidad y la sensibilidad de ciertas NAATs.

45 **[0009]** Los términos "lugar de enlaces de cebadores recíprocos hacia adelante" y "lugar de enlaces de cebadores recíprocos en reversa" se refiere a las regiones en el ADN plantilla y/o en el amplicón al cual se enlazan recíprocamente los cebadores hacia adelante y en reversa. El término "cebador recíproco" o "cebadores recíprocos" tal como se utiliza en este documento se refiere a 2 o más cebadores que actúan para delimitar la región del oligonucleótido plantilla original que es amplificado exponencialmente durante la amplificación (figura 1a y 1b). En algunas secciones, cebadores adicionales podrían enlazarse a la región 5' del cebador recíproco hacia delante y/o del cebador recíproco en reversa. En los casos en los cuales aquellos cebadores adicionales son utilizados, el lugar de enlaces de cebadores recíprocos hacia adelante y/o el lugar de enlaces de cebadores recíprocos en reversa podría abarcar a las regiones de enlace de estos cebadores adicionales, así como las regiones de enlace de los cebadores recíprocos en sí. Por ejemplo, en algunas secciones, el método podría utilizar a uno o más cebadores adicionales que se enlazan a la región que está a 5' de la región enlazadora de cebadores recíprocos hacia adelante y/o en reversa. Un método como este fue presentado, por ejemplo, en WO0028082 que divulga el uso de "cebadores de desplazamiento" o "cebadores externos".

55 **[0010]** WO0028082 describe el uso de cebadores que forman bucles (LFPs - loop-forming primers), donde se comprende que un LFP comprende a un primer y 2º segmentos, donde el primer segmento es sustancialmente complementario a una región de enlaces de cebadores en la plantilla y el 2º segmento comprende a una secuencia que es sustancialmente complementaria a una región en el amplicón generado a partir del primer segmento del primer cebador para que el 2º segmento pueda formar un bucle, y se menciona que la NAAT usa dos "cebadores externos" adicionalmente a los LFPs. Estos cebadores se caracterizan en que el "primer cebador externo" se enlaza a 3' del lugar "F2" en la plantilla (es decir, el primer cebador externo se enlaza en el lugar "F3", figura 14b) y el "2º cebador externo" se enlaza a 3' de la región de enlaces del 2º LFP, el lugar "R2c" (es decir, el 2º cebador externo se enlaza en el lugar "R3c", figura 14b). Por lo tanto, estos cebadores no se enlazan en la región madre del amplicón, que está a 5' de los lugares enlazadores de cebadores de los LFPs.

[0011] La región entre las regiones de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa representa a una región que garantiza formar parte del amplicón, pero no suministra convencionalmente en sí a ningún lugar de enlace de cebadores. Esta región es denominada en este documento como la “región madre” del amplicón. Cebadores que se enlazan a la región madre son denominados en este documento como “cebadores madre” (figura 1c; figuras 2a-2e). Los cebadores madre pueden ser definidos como cebadores que se enlazan a la región madre. Ellos podrían ser definidos además como cebadores que se enlazan a la región 3' de la región de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante en la hebra hacia adelante y a 3' del lugar de enlace de cebadores recíprocos en reversa en la hebra en reversa. Se entiende que los lugares de enlaces de cebadores recíprocos y los lugares de enlace de los cebadores madre no se superponen significativamente. Se prefiere que los lugares de enlaces de cebadores recíprocos y los lugares de enlaces de los cebadores madre no se superpongan en lo absoluto.

[0012] El término “significativamente” en el contexto de regiones superpuestas de enlace de cebadores significa que los lugares de enlace de cebadores se superponen menos de 10 nucleótidos, menos de 9 nucleótidos, menos de 8 nucleótidos, menos de 7 nucleótidos, menos de 6 nucleótidos, menos de 5 nucleótidos, menos de 4 nucleótidos, menos de 3 nucleótidos, menos de 2 nucleótidos o menos de un nucleótido. Se prefiere que no se superpongan en lo absoluto. Los cebadores madre podrían ser definidos además como cebadores que se enlazan a la región 3' de la región enlazadora de cebadores recíprocos hacia adelante en la hebra hacia adelante y la región 3' del lugar de enlace de cebadores recíprocos en reversa en la hebra en reversa pero donde las regiones enlazadoras de cebadores no se superponen sustancialmente con ninguna estructura secundaria intra - molecular generada como una consecuencia directa de los cebadores utilizados por una NAAT específica, especialmente un LFP (figura 1d).

[0013] Se ha descubierto sorpresivamente que el uso de cebadores madre incrementa significativamente la tasa de amplificación. Esto tiene la ventaja distintiva que las pruebas de diagnóstico, por ejemplo, pueden entregar resultados de pruebas en un período más corto de tiempo, algo de valor común entre los usuarios de pruebas de diagnóstico. Un beneficio adicional de la amplificación más rápida es que puede reducir la posibilidad de falsos resultados positivos y por lo tanto incrementa la especificidad de una prueba. La experiencia de los inventores indica que NAATs que utilizan polimerasas de desplazamiento de hebras se vuelven cada vez más propensas a amplificaciones que no son específicas puesto que la duración de tiempo requerida para la amplificación se incrementa. Como tal, una amplificación más rápida también puede conllevar a resultados más precisos.

[0014] Los cebadores madre no solamente suministran una amplificación más rápida pero también suministran por lo menos 2 beneficios clave adicionales. Primero, el uso de cebadores madre para incrementar la tasa de amplificación de las NAATs tales como la Amplificación Exotérmica Regulada por Bucles (LAMP - Loop-mediated Isothermal Amplification), la Amplificación de Re-cebado por medio de Plantillas (TRA - Template Re-priming Amplification), la Amplificación Auto - Extensible (SEA - Self Extending Amplification) y el Proceso de Amplificación Inteligente (SMAP - Smart Amplification Process), que serán cubiertos en mayor detalle más adelante, evitan alternativas costosas para lograr una amplificación más rápida, tal como el uso de más polimerasas o más dNTPs. Por ejemplo, a precios de 2009, doblar el monto de la polimerasa de ADN de Bst en una reacción LAMP incrementa el costo de un ensayo por un 60%, doblar dNTPs incrementa el costo de un ensayo por un 20% pero el agregar 2 cebadores madre incrementa el costo de un ensayo por únicamente un 4%, puesto que los cebadores generalmente no son muy caros.

[0015] Segundo, los cebadores madre suministran una mayor flexibilidad en la selección de cebadores para una plantilla objetivo específica. Por ejemplo, para detectar a una familia particular de patógenos que tienen variaciones significativas en sus secuencias de ácidos nucleicos, los cebadores serán diseñados para regiones del genoma de la familia de patógenos que muestra la menor variación secuencial. Sin embargo, esto podría requerir que uno o más cebadores estén ubicados en un lugar que no sea óptimo. Esto puede ser un problema particular con NAATs tales como LAMP, lo cual será mencionado más adelante, en los casos en los que las posiciones de hasta 6 diferentes cebadores necesitan ser organizados de cierta forma. Puesto que los cebadores madre pueden ser colocados en formas muy diferentes a otros cebadores usados en las NAATs, una persona puede utilizar a los lugares de enlaces de cebadores madre en una plantilla objetivo específica que de otra forma sería difícil de utilizar.

[0016] De hecho, generalmente, la utilización de cebadores madre podría permitir la omisión de otros cebadores utilizados en el método LAMP (o SMAP). Por ejemplo, para una plantilla objetivo específica, podría ser difícil encontrar lugares óptimos de enlaces para uno de los denominados ‘cebadores de desplazamiento’ (es decir, los cebadores que ocupan las posiciones R3 y F3 en la figura 14b, c y e) lo cual hace que el rendimiento de las pruebas sea afectado adversamente. Sin embargo, si se dispusiese de lugares enlazadores de cebadores madre adecuados en la plantilla objetivo, la adición de cebadores madre puede actuar para rescatar la pérdida de rendimiento producto de la pérdida del cebador de desplazamiento (figura 19) este principio puede ser aplicado similarmente a otros cebadores específicos utilizados en LAMP o SMAP.

[0017] El método del invento puede ser practicado en cualquier NAAT siempre y cuando dicho NAAT resulte en la formación de concatémeros. El término “concatémeros” tal con se utiliza en este documento se refiere a un ácido polinucleico que tiene sustancialmente secuencias similares de nucleótidos enlazadas alternativamente en una cadena de una sola hebra. Estas secuencias organizadas podrían ser repeticiones simples entre sí, repeticiones invertidas entre sí o sus combinaciones.

[0018] Las MAATs que son adecuadas para la generación de concatémeros son conocidas en la industria y generalmente incluyen a técnicas "isotérmicas" de amplificación. Esto significa que la amplificación del ácido polinucleico no requiere un cambio en la temperatura de incubación, lo cual es contrario a técnicas conocidas de termociclado, tales como la reacción en cadena de polimerasas.

5
[0019] Algunas técnicas de amplificación isotérmica dependen de transcripciones como parte del proceso de amplificación, por ejemplo, la Amplificación que se Basa en Secuencias de Ácidos Nucleicos (NASBA - Nucleic Acid Sequence Based Amplification; US5409818) y la Amplificación Mediada por Transcripciones (TMA - Transcription Mediated Amplification) mientras que otras dependen de la acción de una helicasa o recombinasa por ejemplo la Amplificación de que Depende de Helicasas (HDA - Helicase Dependent Amplification; WO2004027025) y la Amplificación de Polimerasas de Recombinasas (RPA - Recombinase polymerase amplification; WO03072805) respectivamente, otros métodos todavía dependen de la actividad de desplazamiento de hebras de ciertas polimerasas de ADN, por ejemplo, la Amplificación de Desplazamiento de Hebras (SDA - Strand Displacement Amplification; US5455166), la Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles (LAMP - Loop-mediated Isothermal Amplification; WO0028082, WO0134790, WO0224902), la Reacción de Desplazamiento de Quimeras (RDC; WO9794126), la Amplificación de Círculos Rodantes (RCA - Rolling Circle Amplification; Lizardi, P. M. et al. Nature Genetics (Genética Natural), (1998) 19.225-231), la Amplificación Quimérica Exotérmica de Ácidos Nucleicos (ICAN - Isothermal Chimeric Amplification of Nucleic Acids; WO0216639, el Proceso de Amplificación Inteligente (SMAP - SMart Amplification Process; WO2005063977), la Amplificación de Multimerización Isotérmica Lineal (LIMA - Linear Isothermal Multimerization Amplification; Isothermal amplification and multimerization of DNA by Bst DNA polymerase (Amplificación y Multimerización Isotérmica de ADN Mediante Polimerasas de ADN de Bst) , Hafner G. J., Yang I. C., Wolter L. C., Stafford M. R., Giffard P. M, BioTechniques (Técnicas Biológicas), 2001, vol. 30, no4, pp. 852-867) también los métodos tal como son descritos en US6743605 (denominado en este documento como 'Amplificación de Re-cebado de Plantillas' o TRA - Template Re-priming Amplification) y WO9601327 (denominada en este documento como 'Amplificación Auto - Extensible' o SEA - Self Extending Amplification).

[0020] Una característica de estas NAATs es que suministran indicaciones para la copia de un ácido polinucleico mediante la acción de un cebador o un conjunto de cebadores y para la réplica de dicha copia mediante un cebador recíproco o un conjunto de cebadores recíprocos. Esto permite la generación de copias del ácido polinucleico original a una tasa exponencial.

[0021] En referencia a las NAATs, en general, es útil el diferenciar entre la pieza física de ácido nucleico, que está siendo detectado por el método, de su primera copia hecha a partir de este ácido nucleico original, de la primera copia de la copia hecha a partir de este ácido nucleico original, de copias adicionales de esta copia de una copia. Para propósitos de claridad, las siguientes definiciones serán adheridas a este documento: el ácido nucleico cuyo origen es de la muestra que está siendo analizada en sí será denominado la 'Plantilla Objetivo' (figura 3a); la primera copia de la plantilla objetivo que depende del cebador mediante la NAAT que está siendo practicada será denominada como un 'Amplicón Principal' (figura 3a); la primera copia del Amplicón Principal mediante la NAAT que se está practicando será denominada como 'Amplicón de Primera Generación' (figura 3b); copias adicionales del Amplicón de Primera Generación (y copias de estas copias) serán denominadas colectivamente como 'Amplicón de la Siguiete Generación' (figura 3c). El Amplicón Principal, el Amplicón de Primera Generación y el Amplicón de la Siguiete Generación son todos subconjuntos del amplicón. Es posible para amplicones de doble hebra el conformarse de combinaciones de los subconjuntos ya mencionados o con la plantilla objetivo en sí. Además, es posible que el Amplicón de la Siguiete Generación sea idéntico al Amplicón de la Primera Generación. Además, es posible generar a moléculas de ácidos polinucleicos que sean idénticas al Amplicón de Primera Generación a partir del Amplicón de la Siguiete Generación.

[0022] El sujeto de este invento tiene una referencia particular al Amplicón de la Siguiete Generación, en que suministra mecanismos adicionales por los cuales se puede propagar en una forma que suministre re-copias adicionales de la copia resultante.

[0023] Los subconjuntos de amplicones ya descritos comúnmente tienen características diferentes. El Amplicón principal podría ser de una longitud muy variable puesto que la plantilla objetivo puede ser copiada del primer lugar de cebado más allá de la región delineada de ácidos nucleicos por los cebadores utilizados en una NAAT específica. En general, una característica clave de la NAAT será el suministrar un método por el cual este Amplicón Principal puede ser facilitado a otro cebador recíproco utilizado por la NAAT en relación a la generación del Amplicón de Primera Generación. El Amplicón de Primera Generación que resulta del cebado que depende de cebadores del Amplicón Principal será de una longitud discreta delineada por los cebadores utilizados. Nuevamente, una característica clave de la NAAT será el suministrar un método por el cual este Amplicón de Primera Generación puede ser facilitado para cebados adicionales mediante un cebador recíproco para generar al Amplicón de la Siguiete Generación. Nuevamente, una característica clave del NAAT en cuestión será el suministrar un método para la re-copia adicional del Amplicón de la Siguiete Generación. Para algunas NAATs, el Amplicón de la Siguiete Generación podría ser sustancialmente diferente al Amplicón de Primera Generación, en particular, el Amplicón de la Siguiete Generación podría ser un concatémero del Amplicón de Primera Generación.

[0024] Métodos que producen a amplicones en la forma de concatémeros directamente a partir de plantillas objetivo lineales incluyen a LAMP, TRA, SEA y SMAP (SMAP es un híbrido de LAMP y SEA). En cada caso, los concatémeros surgen de procesos que involucran al amplicón de primera generación (figura 3b). Por lo tanto, se prefiere que la síntesis del ácido polinucleico sea realizada utilizando una NAAT seleccionada de un grupo que consiste de LAMP, TRA, SEA y SMAP. En cada caso, por lo tanto, el invento está asociado con una NAAT que suministra uno o más cebadores con la capacidad de producir a concatémeros directamente a partir de una plantilla objetivo lineal.

[0025] RCA también produce concatémeros. Sin embargo, en este caso, se requiere la ligación específica de la plantilla objetivo de una sonda para formar a una molécula de ADN circular covalentemente cerrada. Puesto que aquel amplicón será de una naturaleza concatémica sin la ayuda de ningún cebador recíproco o sin el requerimiento de cualquier cebador que comprende a un primer y a un 2º segmentos, donde el primer segmento es sustancialmente complementario a la primera región de enlace de cebadores recíprocos en la plantilla y el 2º segmento comprende a una secuencia que es sustancialmente complementaria a otra región en el primer cebador o una región en el amplicón generado a partir del primer segmento del primer cebador de tal forma que el 2º segmento es capaz de formar un bucle. Como tal, la RCA per se, no es un sujeto de este invento.

[0026] Una característica común de LAMP, TRA, SMAP y SEA, es, por lo tanto, que del cebado que depende del amplicón de primera generación, es decir, en los casos en que el amplicón de primera generación actúa como un cebador en sí, ya sea mediante un evento intra-molecular o un evento inter-molecular, que conlleva al amplicón de la siguiente generación (este término es utilizado en este documento para referirse a copias adicionales del amplicón de primera generación ((y copias de estas copias); figura 3c) que es de un tamaño más grande que el amplicón de primera generación y que es de una naturaleza concatémica. De hecho, es una característica de estas NAATs que un amplicón cada vez más largo es generado de un amplicón más corto de tal forma que el número de lugares de enlaces para los cebadores madre se incrementa exponencialmente durante el proceso de amplificación y, por lo tanto, los cebadores madre tienen la capacidad de acelerar la amplificación. Una apreciación de los mecanismos de acción de los cebadores que generan a los concatémeros en estas NAATs es útil para entender como los cebadores madre tienen su efecto. Además, una persona con conocimiento en la industria que esté consciente de los mecanismos que conllevan a la generación de un concatémico será capaz de identificar fácilmente otras NAATs adecuadas que pueden ser utilizadas en los métodos de este invento.

[0027] Los detalles del proceso por el cual LAMP forma estructuras concatémicas se muestra en la figura 4. Se anticipa que el método TRA forma a un amplicón concatémico mediante un mecanismo idéntico. Las figuras 4b y 4c muestran que, en efecto, existen por lo menos 2 mecanismos por los cuales se pueden formar a concatémeros, siendo uno mediante un mecanismo intra-molecular (figura 4b) y otro es mediante un mecanismo inter-molecular (figura 4c). De hecho, tal como se muestra en este documento, cualquier mecanismo genera resultados idénticos en términos de la estructura del amplicón de primera generación y de la siguiente generación (compare la figura 4b(iv) y la figura 4c (iv)). Se debe entender que el proceso señalado en la figura 4, que únicamente hace referencia a la región de enlaces de cebadores recíprocos, aplica por igual a la región enlazadora de cebadores recíprocos en reversa. Además, se entiende que el proceso debe ser repetido por los amplicones de la siguiente generación para que concatémeros cada vez más largos puedan formarse. La generación de concatémeros por medio de SEA es esencialmente idéntico a aquel de LAMP y de TRA excepto en que la repetición invertida necesaria es inherente inmediatamente en el cebador y en vez de requerir una extensión del cebador en un polinucleótido para formar a la repetición invertida tal como en LAMP y TRA. La figura 5a-c muestra un mecanismo correspondiente para SEA así como para LAMP/TRA.

[0028] Muchas NAATs utilizan lo que se domina en este documento como "cebadores simples" (figura 6a). El término "cebador simple" tal como se utilizan este documento se refiere a un cebador que es sustancialmente complementario a un lugar de enlaces de cebadores en un ácido polinucleico y donde el cebador no contiene un número sustancial de nucleótidos adicionales, es decir, nucleótidos 3' o 5' de la región de cebadores que es sustancialmente complementaria a la región enlazadora de cebadores. El término "sustancial" en este contexto significa que el cebador simple contiene menos que alrededor de 20, menos que alrededor de 15, menos que alrededor de 10, menos que alrededor de 5 nucleótidos adicionales.

[0029] Un cebador utilizado en LAMP y en TRA (y por referencia en SMAP) genera bucles aislados sencillos en el amplicón y, por lo tanto, es denominado en este documento como "cebador que forma bucles" (LFP - loop forming primer). Los LFPs, tal como se utilizan este documento, se refieren a cebadores que comprenden a un primer y 2º segmentos, donde el primer segmento es sustancialmente complementario a la región enlazadora de cebadores en la plantilla y el 2º segmento comprende a una secuencia que es sustancialmente complementaria a una región en el amplicón generado a partir del primer segmento del primer cebador de tal forma que 2º segmento es capaz de formar un bucle. La estructura general de los LFPs se muestra en la figura 6b. El amplicón de primera (y de la siguiente) generación que resulta del cebado de la plantilla objetivo mediante un LFP contiene a un bucle de un sólo polinucleótido aislado flanqueado por un polinucleótido de doble hebra formado a partir del emparejamiento de bases de Watson-Crick de la secuencia de repetición invertida. Se entiende que el bucle de una sola hebra del polinucleótido está disponible para enlaces por un cebador adicional utilizado por la NAAT en cuestión, pero no específicamente por un cebador madre.

[0030] Los cebadores utilizados en SEA (y por referencia SMAP, puesto que es un híbrido entre SEA y LAMP) se muestran en la figura 6c. Puede observarse que estos cebadores contienen una repetición invertida arbitraria en su extremo 5'. Como consecuencia, el amplicón de primera generación resultante del cebado de una plantilla objetivo por dichos cebadores formará a un bucle tipo horquilla ajustado que causará al amplicón de primera generación el auto-cebarse potencialmente (observar a un amplicón similar). Aquellos cebadores son denominados en este documento como "cebadores tipo horquillas". El término "cebador tipo horquilla" tal como es utilizado en este documento se refiere a un cebador que comprende a un primer y a un 2º segmentos, donde el primer segmento es sustancialmente complementario a la región de enlace de cebadores en la plantilla y el 2º segmento comprende a una secuencia que es sustancialmente complementaria a otra región en el primer cebador. Los cebadores tipo horquilla no suministran usualmente a bucles de una sola hebra de oligonucleótidos en el amplicón de primera o de la siguiente generación que estén disponibles para enlaces mediante un polinucleótido adicional utilizado por la NAAT en cuestión. Sin embargo, los inventores han reconocido que es posible suministrar a cebadores tipo horquilla en casos en que las repeticiones invertidas en el 2º segmento del cebador estén separadas por una región enlazadora. El enlazador podría ser de por lo menos 10 nucleótidos, de por lo menos 15 nucleótidos, de por lo menos 20 nucleótidos o de por lo menos 30, de por lo menos 40 nucleótidos, de por lo menos 50 nucleótidos o de por lo menos 60 nucleótidos de largo. Un cebador como estos puede formar a un bucle de una sola hebra y permitir enlaces de cebadores adicionales durante la amplificación (refiérase también a la figura 6d y también a la figura 8c). Los cebadores tipo horquilla que contienen a secuencias enlazadoras como estas entre las repeticiones invertidas son denominados en este documento como "cebadores que suministran bucles" (LPPs - loop-providing primers). Aquellos cebadores no han sido descritos previamente en la industria y forman un aspecto preferido de este invento.

[0031] Los métodos LAMP, SMAP y SEA son explícitos acerca del uso de cebadores que generan a una repetición invertida en el amplicón de primera generación que permite un cebado intra-molecular del amplicón de primera generación. Como resultado, el amplicón de primera generación copia una sección de sí mismo y de esa forma genera a un concatémero. El mecanismo descrito para TRA no es explícito acerca del mecanismo ya mencionado. Sin embargo, TRA produce concatémeros y posiblemente lo hace mediante el mismo mecanismo que el método LAMP (refiérase al ejemplo 1 y a la figura 7 correspondiente). El cebado intra-molecular ya mencionado no es el único mecanismo disponible para que los cebadores utilizados en estos métodos generen concatémeros, pero sin importar el mecanismo preciso, una explicación lógica es aparente para el efecto beneficioso de los cebadores madres.

[0032] Tal como fue explicado para los LFPs utilizados en LAMP, TRA y SMAP para auto-cebados intra- (figura 8a) o inter-(figura 8b) moleculares del amplicón de primera generación, el amplicón resultante de la siguiente generación facilita a regiones de una sola hebra capaces de enlazarse a los cebadores originales utilizados para generar al amplicón a partir de la plantilla objetivo. Debe tomarse en cuenta que la hebra recíproca de los bucles formados de una sola hebra es capaz de enlazarse a los "cebadores tipo bucles" mencionados más adelante. Cebadores tipo horquillas tal como son descritos en los métodos SEA y SMAP no generan aquellos bucles de una sola hebra en el amplicón. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, los inventores se han dado cuenta que al utilizar una variación del cebador del método SEA que contiene a una región enlazadora entre las repeticiones invertidas (los LPPs mostrados en la figura 6d), el cebador tipo horquilla podría generar bucles de una sola hebra, tal como fue presentado en la figura 8c.

[0033] La capacidad de los LFPs y de los LPPs para generar regiones estables de una sola hebra de amplicones es crítico para propagar rápidamente a amplicones adicionales y representa un aspecto clave de las tecnologías que utilizan a estos cebadores. Esto significa que un amplicón concatémérico puede contener muchos lugares nuevos de cebado para los cebadores utilizados por la NAAT en cuestión. En los métodos LAMP y TRA (y por lo tanto en el método SMAP), los LFPs que generan repeticiones invertidas en el amplicón también facilitan a regiones de una sola hebra del amplicón que pueden enlazarse y de esa forma pueden iniciar réplicas adicionales del amplicón, y, por lo tanto, pueden propagar aún más a la amplificación. En los métodos LAMP y SMAP, cebadores adicionales podrían ser utilizados adicionalmente a los LFPs, los cuales también se enlazarían a estas regiones de una sola hebra del amplicón para ayudar a propagar a la amplificación (conocidos como cebadores tipo bucles). Una faceta de este invento es que los cebadores madre no se enlazan a dichos bucles estables de una sola hebra generados por los LFPs y/o por los LPPs, pero aceleran la amplificación por medio de un mecanismo distinto.

[0034] Para los métodos LAMP, TRA y SEA (y por referencia para el método SMAP), puede demostrarse que el proceso de copiado de los amplicones de la siguiente generación, ya sea por medio de auto- (sin importar si esto se logra intra- o inter-molecularmente), enlaces y extensiones de un cebador adicional a partir de una región de una sola hebra de amplicones o las acciones de otros cebadores que se enlazan a regiones enlazadoras de cebadores recíprocos hacia adelante o en reversa, hacia la región madre del amplicón de la siguiente generación que transitoriamente es de una sola hebra. Se anticipa que en relación a los mecanismos sugeridos de LAMP, TRA y SEA (y SMAP) que dicha región madre de una sola hebra se convertirá rápidamente a un polinucleótido de doble hebra ya sea por la acción de auto-cebado y re-copia de amplicones, o por la acción de cebadores que se enlazan a lugares expuestos de enlace para cebadores dirigidos a las regiones de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante o en reversa. Se espera que la región madre sea transitoriamente de una sola hebra y que no sea de una sola hebra en una forma estable. Por lo tanto, no se espera que la región madre suministre lugares útiles de enlace de cebadores para la amplificación. Sin embargo, se ha demostrado ahora, sorprendentemente, que los cebadores dirigidos a la

región madre en efecto incrementan inmensamente la tasa de amplificación. El mecanismo a través del cual los cebadores madre pueden enlazarse al amplicón se ilustra en las figuras 9 y 10.

5 **[0035]** Mientras que se anticipa que la acción de los cebadores madre será expuesta transitoriamente en polinucleótidos expuestos de una sola hebra que resultan de la re-copia de amplicones, es posible que otro mecanismo también pueda ser responsable de la tasa incrementada de amplificación vista en los cebadores madre. Por ejemplo, es posible que en una estructura concatémica como una hebra de polinucleótidos pueda 'salirse del bucle' tal como en un deslizamiento de replicación, lo cual es especialmente posible puesto que las estructuras concatémicas de polinucleótidos, debido a su naturaleza, sean capaces de formar estructuras secundarias entre secuencias repetidas. Los bucles generados de polinucleótidos de una sola hebra, podrían facilitar, por ejemplo, lugares de enlace para los cebadores madre. Otros mecanismos también podrían explicar potencialmente el efecto de los cebadores madre, pero se anticipa que el principio de los cebadores madre es el factor común que actúa en secuencias concatémicas de polinucleótidos.

15 **[0036]** Tal como fue mencionado antes, cebadores recíprocos adecuados podrían comprender a un primer y un 2º segmento donde el primer segmento es sustancialmente complementario a las regiones de enlace de cebadores recíprocos en la plantilla, tal como fue definido en las reivindicaciones. Mientras que éste aspecto del invento es explicado aquí en mayor detalle en relación al primer cebador, debe entenderse que el mismo principio aplica mutatis mutandis al 2º cebador.

20 **[0037]** El término "sustancialmente complementarios" se refiere a que el primer segmento tiene una suficiente complementariedad para enlazarse a la región de enlaces de cebadores recíprocos en la plantilla y/o en el amplicón bajo condiciones que son utilizadas comúnmente durante las NAATs. Esto requiere que el primer segmento del cebador recíproco tenga por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 99% o por lo menos un 100% de complementariedad en relación a la región de enlaces de cebadores recíprocos en la plantilla. El primer segmento del cebador recíproco podría ser de por lo menos 5 nucleótidos, de por lo menos 10 nucleótidos, de por lo menos 20 nucleótidos, de por lo menos 30 nucleótidos, de por lo menos 40 nucleótidos, de por lo menos 50 nucleótidos, de por lo menos 60 nucleótidos, o incluso de por lo menos 70 nucleótidos de largo.

30 **[0038]** En los casos en que cebadores recíprocos contienen además a un 2º segmento, el 2º segmento comprende a una secuencia que es sustancialmente complementaria en relación a otros segmentos en el primer cebador o en una región en el amplicón generado a partir del primer segmento del primer cebador de tal forma que la región es capaz de formar un bucle. El término "un amplicón generado a partir del primer segmento del primer cebador" se refiere a la primera copia de la plantilla que es generada cuando el primer cebador se extiende por medio de una polimerasa. Dicho amplicón incluye la secuencia del primer cebador en su extremo 5'.

35 **[0039]** En algunas secciones, el 2º segmento es sustancialmente idéntico a una región en la plantilla objetivo y/o al amplicón al cual el cebador se enlaza. Aquellos cebadores son denominados LFPs. El término "sustancialmente idéntico" significa que el 2º segmento tiene por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 99% o por lo menos un 100% de identidad en relación a la región en la plantilla objetivo y/o al amplicón. También se cree que solamente una parte de la 2ª región muestra una identidad sustancial con una región en la plantilla objetivo. Sin importar si todo o solamente una parte del 2º segmento del cebador recíproco muestra una identidad sustancial en relación a la región en la plantilla objetivo, la región del 2º segmento que es sustancialmente idéntica a una región en la plantilla objetivo y/o al amplicón es de por lo menos 5 nucleótidos, de por lo menos 10 nucleótidos, de por lo menos 20 nucleótidos, de por lo menos 30 nucleótidos, de por lo menos 40 nucleótidos, de por lo menos 50 nucleótidos, de por lo menos 60 nucleótidos, o incluso de por lo menos 70 nucleótidos de largo. En este aspecto del invento, una vez que el primer segmento del cebador recíproco ha sido extendido para formar a un primer amplicón, el 2º segmento es capaz de enlazarse a una región complementaria dentro de la misma hebra y, por lo tanto, puede formar un bucle.

40 **[0040]** El 2º segmento también podría comprender a una región que es sustancialmente complementaria a otra región en el 2º segmento. Aquellos cebadores fueron denominados anteriormente como cebadores tipo horquilla o cebadores que suministran bucles. El término "sustancialmente complementarios" significa que las 2 regiones en el 2º segmento tienen por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 99% o por lo menos un 100% de complementariedad entre sí. Preferiblemente, la región de complementariedad será de por lo menos 5 nucleótidos, de por lo menos 10 nucleótidos, de por lo menos 20 nucleótidos, de por lo menos 30 nucleótidos, de por lo menos 40 nucleótidos, de por lo menos 50 nucleótidos, de por lo menos 60 nucleótidos, o de por lo menos 70 nucleótidos de largo. En los casos en que el cebador es un cebador tipo horquilla, se prefiere que las 2 regiones de complementariedad en el 2º segmento estén separadas por una región enlazadora corta (es decir, menos de 10 nucleótidos) para facilitar el enlace de las 2 regiones entre sí. La longitud de la región enlazadora permite que una persona con conocimiento en la industria distinga entre los LFPs con una región enlazadora que tiene por lo menos 10 nucleótidos de largo, y cebadores tipo horquilla cuyas regiones enlazadoras son menores a los 10 nucleótidos de largo. El primer y 2º segmentos del cebador podrían conectarse por medio de una región enlazadora. En algunas secciones, la región enlazadora es sustancialmente idéntica al primer segmento de dichos cebadores para permitir el enlace de cebadores adicionales al complemento de la región

enlazadora una vez que haya sido copiada (figura 6d). El término “sustancialmente idéntico” significa que el primer segmento tiene por lo menos un 70%, por lo menos un 80%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, por lo menos un 99% o por lo menos un 100% de identidad en relación a la región enlazadora que conecta al primer y 2º segmentos del cebador.

5 **[0041]** Los métodos del invento pueden ser practicados utilizando cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa del mismo tipo, por ejemplo, LFPs o cebadores tipo horquilla. Cuando se menciona al término “el mismo tipo de cebadores”, significa que todos los cebadores son sencillos, LFPs, LPPs o cebadores tipo horquilla. El término “diferente tipo de cebadores” en esa misma forma, se refiere a una combinación de 2 o más cebadores donde por lo
10 menos uno de los cebadores no es del mismo tipo que los otros cebadores. Por ejemplo, cuando el método utiliza 4 cebadores recíprocos de los cuales 3 son LFPs y uno es un LPP, los cebadores serían considerados como de tipos diferentes. Por lo tanto, se cree que se debe usar cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa que no son del mismo tipo. Por ejemplo, un cebador recíproco hacia adelante podría ser utilizado, es decir, una combinación en un
15 LFP con un cebador recíproco en reversa que es un LPP o un cebador tipo horquilla. También es posible combinar a LFPs o a cebadores tipo horquilla con cebadores simples siempre y cuando la combinación de cebadores resulte en la formación de un concatémero. En los casos en los que la NAAT utilizada para la amplificación usa más de un (es decir, 2 o más) cebador recíproco hacia adelante y/o en reversa, también es posible combinar el mismo tipo o diferentes tipos de cebadores en el mismo lugar de enlace de cebadores recíprocos. En un aspecto de este invento, los 2 o más cebadores recíprocos hacia adelante y/o en reversa son todos LFPs. Combinaciones adecuadas de
20 cebadores serán evidentes para aquellas personas con conocimiento en la industria. Por ejemplo, será evidente para una persona con conocimiento en la industria que la combinación de cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa los cuales son cebadores sencillos no suministraría un mecanismo para facilitar la formación de un concatémero y, por lo tanto, aquella combinación no es adecuada para su uso en este invento.

25 **[0042]** Debe entenderse que, en general, los cebadores recíprocos, o los conjuntos de cebadores, actúan en diferentes hebras de la plantilla objetivo. Además, los cebadores recíprocos (o uno de cada conjunto de cebadores recíprocos) actuará para delimitar la región del polinucleótido original copiado y re-copiado. Por lo tanto, una amplificación exponencial requiere el acoplamiento de las actividades entre por lo menos 2 regiones enlazadoras de
30 cebadores, una región enlazadora de cebadores recíprocos hacia adelante y una región enlazadora de cebadores recíprocos en reversa (figura 1a). Las regiones enlazadoras de cebadores hacia adelante y en reversa podrían comprender cada una a un solo lugar de enlaces para un cebador por el cual los lugares recíprocos están en hebras sentido opuestas, es decir, un lugar de enlace de cebadores está en la “hebra hacia adelante”, y la otra en la “hebra en reversa” (tal como se muestra en la figura 1a). Las regiones de cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa también podrían comprender lugares de enlaces para 2 o más cebadores cada una, donde más de 2 cebadores son
35 utilizados por una NAAT particular. En este caso, es posible que 2 o más lugares enlazadores de cebadores en las regiones enlazadoras de cebadores recíprocos hacia adelante y/o en reversa estén todas ubicadas en la misma hebra de la plantilla objetivo y/o del amplicón o en diferentes hebras de la plantilla objetivo y/o del amplicón ((o sus copias), figura 1b).

40 **[0043]** Los cebadores madre del invento podrían colocarse en cualquier lugar entre las regiones de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa siempre y cuando los lugares de enlace de los cebadores madres no se superpongan significativamente con el lugar de enlace recíproco hacia adelante o en reversa. Debe entenderse que en los casos en los cuales un LFP es utilizado, en los casos en los que el LFP es un cebador hacia adelante, la
45 región enlazadora de cebadores recíprocos hacia adelante abarca no solamente al lugar F2 (es decir, la región enlazadora de cebadores recíprocos hacia adelante) pero también abarca al lugar F1 (es decir, la región en la hebra hacia adelante que es sustancialmente idéntica al 2º segmento del LFP), y cuando el LFP es un cebador en reversa, la región enlazadora de cebadores recíprocos en reversa abarca no solamente al lugar R2c (es decir, la región enlazadora de cebadores recíprocos en reversa) pero también al lugar R1c, es decir, la región en la hebra en reversa que es sustancialmente idéntica al 2º segmento del LFP (figura 1e y figura 14). De esta forma, los cebadores madre
50 podría ser ubicados en cualquier lugar entre los lugares R1(c) y F1(c) en los casos en los que 2 LFPs son utilizados (tal como en los métodos LAMP y TRA); en los casos en que solamente un LFP es utilizado en una NAAT específica, los cebadores madre podrían enlazarse entre un lugar R1(c) o F1(c) y otra región de enlace de cebadores recíprocos que no sea ocupada por LFPs.

55 **[0044]** Es posible utilizar únicamente un cebador madre que se enlace a la hebra de polinucleótidos hacia adelante o en reversa tal como se muestra en la figura 2a. Alternamente, 2 o más cebadores madre pueden ser utilizados, los cuales pueden enlazarse a hebras recíprocas del amplicón (figura 2b) o a la misma hebra (figura 2d). Los métodos de este invento podrían ser practicados con 1, 2, 3, 4 o más cebadores madre que podrían ser utilizados en cualquier
60 combinación espacial en la cual se puedan enlazar a la hebra en reversa o hacia adelante siempre y cuando los lugares de enlaces para los cebadores madre no se superpongan significativamente con las regiones de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante o en reversa o no se superpongan en lo absoluto (figura 2e). Los cebadores madre podrían enlazarse adicionalmente a cualquier parte dentro de la región madre. Por lo tanto, los cebadores madre podrían tener un lugar de enlace que está en una proximidad cercana a la región de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante o en reversa (figura 2c). El término “proximidad cercana” significa que la región de enlace del cebador madre y de la región de enlace de cebadores recíprocos no tendrá más de 10bp, 50bp, 100bp, 200bp,
65 300bp, 400bp, 500bp, 600bp, 700bp, 800bp, 900bp o 1000bp de separación.

[0045] Los cebadores madre de acuerdo a este invento pueden ser de por lo menos 5 nucleótidos, de por lo menos 10 nucleótidos, de por lo menos 20 nucleótidos, de por lo menos 30 nucleótidos, de por lo menos 40 nucleótidos, de por lo menos 50 nucleótidos, de por lo menos 60 nucleótidos, de por lo menos 70 nucleótidos, de por lo menos 80 nucleótidos o de por lo menos 90 nucleótidos de largo.

[0046] Los cebadores madre podrían ser cebadores sencillos. Sin embargo, se planifica usar cebadores madre que sean LFPs, cebadores tipo horquilla, LPPs, o cebadores quiméricos. En los casos en los que más de un cebador es utilizado, los cebadores madre podrían ser del mismo tipo o podrían ser una combinación de diferentes tipos de cebadores. Cuando se usa el término “el mismo tipo de cebadores”, esto significa que los cebadores son todos cebadores simples, LFPs, LPPs o cebadores tipo horquilla. El término “diferentes tipos de cebadores” en ese mismo sentido se refiere a una combinación de 2 o más cebadores donde por lo menos uno de los cebadores no es del mismo tipo que los otros cebadores. Por ejemplo, los cebadores madres utilizados podrían ser todos simples o podrían ser una combinación de cebadores simples, LFPs y/o cebadores tipo horquilla. De hecho, se cree que los cebadores madre podrían ser utilizados en una forma útil en derivados de los métodos LAMP, TRA, SMAP o SEA que podrían utilizar una variedad de variaciones de cebadores a aquellas utilizadas actualmente, tal como se muestra en el ejemplo de la figura 20.

[0047] Tal como se indica en la literatura asociada con los métodos TRA y SMAP, así como en otras fuentes, existe una gran variedad de combinaciones posibles de “cebadores simples”, LFPs, cebadores tipo horquilla, cebadores que contienen ARN, cebadores que contienen lugares de nickasa y otros cebadores nuevos que podrían ser utilizados en combinaciones nuevas para generar derivados de los métodos NAAT señalados. En los casos en que dichas combinaciones resultan en métodos que generan a amplicones concatémicos capaces de auto-replicarse para generar concatémicos más largos, se anticipa que los cebadores madre serán aplicables.

[0048] Por ejemplo, los inventores notaron que una debilidad principal de los cebadores de desplazamiento utilizados en el método LAMP (los cuales son diseñados para que operen en la plantilla objetivo y en el amplicón principal pero no en un amplicón de primera generación o en un amplicón de la siguiente generación) es que, si un cebador de desplazamiento se enlaza o se extiende desde su lugar antes de que el LFP asociado se haya vinculado y extendido en la plantilla objetivo, el amplicón principal generado a partir del cebador de desplazamiento obstruiría y bloquearía a los enlaces del LFP que son esenciales para la amplificación exponencial y, por lo tanto, esto inhibiría la amplificación. Los inventores han demostrado que este efecto puede ser, hasta cierto punto, mitigado si en vez de usar a una estructura de ‘cebador simple’ para el cebador de desplazamiento, se utiliza a un LFP como el cebador de desplazamiento (ejemplo 5, figura 15a y b). Se cree que esto sucede porque los LFPs pueden permitir, hasta cierto punto, el re-cebado del lugar de cebadores (tal como se describió en la patente asociada con la tecnología TRA) pero principalmente porque un LFP puede ser capaz de actuar en amplicones de primera y de la siguiente generación, así como en la plantilla objetivo y en el amplicón principal, mientras que se espera que los cebadores ‘simples’ de desplazamiento actúen principalmente en la plantilla objetivo y en el amplicón principal únicamente. Un método como este, tal como se describe en el ejemplo 5, es, por lo tanto, completamente consistente con el uso de cebadores madre. Asimismo, un cebador quimérico tal como se describe en ICAN y RDC podría ser utilizado como un cebador de desplazamiento (en vez de un cebador simple) para permitir el re-cebado del lugar de cebadores de desplazamiento reduciendo, de esa forma, la posibilidad de obstruir al lugar de enlaces de los LFPs.

[0049] Además, puesto que los cebadores madre actúan para incrementar la tasa de amplificación de los métodos utilizando LFPs mediante el acoplamiento de procesos que ocurren en las regiones de enlace recíprocas hacia adelante y en reversa y puesto que se ha enseñado en la literatura que el método LAMP tiene un límite superior que corresponde al número de nucleótidos que separan a los lugares de enlace recíprocos hacia adelante y reversa para los LFPs utilizados (Notomi et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA (Amplificación isotérmica de ADN mediada por bucles), Nucleic Acids Research (Investigación de Ácidos Nucleicos), (2000) Vol 28., No. 12, e63), el uso de cebadores madre puede permitir claramente a los lugares de enlaces recíprocos hacia adelante y en reversa que se ubiquen más lejos en la secuencia que lo que se consideraba práctico previamente (especialmente si algunos cebadores madre son utilizados). Esto puede crear un gran beneficio cuando se desea demostrar que 2 regiones de secuencias ocurren en conjunto en un polinucleótido excepto en los casos en los cuales la distancia entre las 2 regiones es muy lejana para permitir que cada región respectiva pueda ser utilizada efectivamente como una región de enlaces recíprocos hacia adelante y reversa en las NAATs aquí descritas.

[0050] Puesto que el uso de cebadores madre puede permitir que las regiones de enlaces recíprocos hacia adelante y en reversa estén mucho más alejadas que en su ausencia permitiendo aun a una amplificación efectiva, puede establecerse la presencia de 2 lugares distintos en un polinucleótido. Por lo tanto, el invento suministra un método para la amplificación de un ácido polinucleico en donde las regiones enlazadoras de cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa están ubicadas a una distancia tal que la síntesis de un ácido polinucleico podría ocurrir únicamente en la presencia de los cebadores madre. Esta distancia puede definirse experimentalmente al realizar 2 NAATs separadas en paralelo donde las NAATs, los reactivos y las condiciones de amplificación utilizadas son idénticas excepto en que se agregan cebadores madre a una reacción, pero no a la otra. En los casos en los que la síntesis del ácido polinucleico ocurre únicamente en la presencia de los cebadores madre, se considera que los lugares de enlaces de cebadores recíprocos están ubicados a una distancia tal que la síntesis de un ácido polinucleico puede ocurrir únicamente en la presencia de los cebadores madre.

[0051] Por ejemplo, el gen *mecA* presente en el *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) podría ubicarse a una distancia significativa de la secuencia *orfX* conservada que es asociada con el lugar de inserción para el elemento móvil genético SCCMec el cual es asociado con el MRSA (refiérase a WO02/099034). El uso de cebadores madre puede ayudar a detectar a MRSA al permitir que el gen *mecA* y que la secuencia *orfX* actúen como lugares de enlaces recíprocos para amplificaciones, incluso si están muy distantes en la secuencia para utilizar métodos tales como LAMP. Por lo tanto, en un aspecto, este invento suministra un método para la detección de MRSA en una muestra.

[0052] Los cebadores madre podrían contener exclusivamente a ácidos nucleicos que ocurren naturalmente. Sin embargo, se planea utilizar cebadores que contengan a bases modificadas. Ejemplos de aquellas bases modificadas incluyen, pero no se limitan a, N4-metilcitosina, inosina, ribonucleótidos, bases fluorescentes, bases que pueden fotolisarse o bases universales. También se planea usar ácidos nucleicos que han sido marcados con una partícula que le permita detectar al cebador madre y/o al amplicón al cual el cebador madre marcado se enlaza. Por ejemplo, el ácido nucleico podría ser marcado en una forma fluorescente. Los cebadores madre podrían ser marcados en una forma alterna con partículas de captación (por ejemplo, la biotina).

[0053] En una forma importante, los cebadores madre no son directamente responsables de amplificaciones exponenciales del amplicón, lo cual es regulado por los cebadores que se enlazan a los lugares de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante y reversa, pero simplemente incrementan la tasa de amplificación. Esto se da debido a que se cree que los cebadores madre funcionan en los productos de amplificación de otros cebadores utilizados por una NAAT específica. Por lo tanto, los cebadores madre funcionan al incrementar la tasa de amplificación de la reacción mediada por los cebadores recíprocos hacia adelante y reversa. Esto se muestra en la figura 1c, donde puede observarse que en los casos en los que el cebador madre ceba y se extiende desde la plantilla objetivo, la copia parcial de la plantilla objetivo contendría únicamente a la región enlazadora de cebadores recíprocos hacia adelante o a la región de cebadores recíprocos en reversa, pero no a ambos. Por lo tanto, el amplicón principal generado a partir de un cebador madre no permitiría una réplica recíproca y por lo tanto no contribuiría a la amplificación exponencial de la plantilla objetivo (esto se muestra en mayor detalle en la figura 21). El mismo argumento aplica para cebadores madre que copian a un amplicón principal generado por otros cebadores utilizados por la NAAT específica y similarmente para amplicones de primera generación.

[0054] Se anticipa que los cebadores madre incrementan significativamente la tasa de amplificación de una plantilla objetivo si el amplicón de la siguiente generación (es decir, copias adicionales del amplicón de primera generación (y copias de estas copias)) es de una naturaleza concatémica. El requerimiento de cebadores madre para que estos trabajen en concatémicos viene del requerimiento que para qué un ácido nucleico específico contribuya a la amplificación exponencial, debe contener regiones capaces de actuar como regiones de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante y reversa. Puede verse claramente a partir de la figura 21, que copias de una estructura concatémica por medio de un cebador madre, pueden producir a una copia de polinucleótidos que, tiene lugares de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa, mientras que la copia de una estructura no concatémica no. Por lo tanto, los inventores esperan que el uso de cebadores madre sean beneficiosos para los métodos de amplificación que tienen como resultado la formación de concatémicos.

[0055] Se ha descubierto que los cebadores madre funcionan en una forma acoplada con los otros cebadores utilizados en la NAAT en esta interacción, lo cual es crítico para obtener los grandes incrementos observados en la tasa de amplificación. Las tasas incrementadas de amplificación que fueron observadas utilizando a los cebadores madre no pueden ser explicadas debido a que los cebadores madre participan en un proceso de amplificación adicional pero distinto por el cual el amplicón que es producido por medio de un cebador madre no actúa como una plantilla para todos los otros cebadores que están siendo utilizados en la NAAT específica para re-copiar al amplicón. Los inventores han demostrado experimentalmente y teóricamente que las tasas incrementadas observadas de amplificación deben resultar de un solo proceso de amplificación acoplado y no de 2 o más procesos distintos de amplificación debido a que el amplicón producido de un proceso no puede actuar como una plantilla para el amplicón producido de otro proceso. Ejemplos de los tipos de tasas sustancialmente muy incrementadas de amplificación para la tecnología de amplificación TRA son demostradas en el ejemplo 2 para una variedad de conjuntos de cebadores con diferente cinética de amplificación. En cada caso, los cebadores madre incrementan significativamente la tasa de amplificación y, al hacerlo, se incrementa la sensibilidad de la prueba dentro del período de tiempo en el cual las pruebas son realizadas (figura 11). Por lo tanto, los cebadores madre podrían reducir el tiempo requerido para detectar a un tipo y monto específico de la plantilla objetivo en por lo menos un minuto, en por lo menos 2 minutos, en por lo menos 3 minutos, en por lo menos 5 minutos, en por lo menos 10 minutos, en por lo menos 20 minutos, en por lo menos 30 minutos o en por lo menos 60 minutos en comparación a la reacción de control en la cual no se ha agregado ningún cebador madre.

[0056] Una manifestación de TRA ha sido descrita, por ejemplo, la cual utiliza a un cebador simple en conjunto con un LFP donde se entiende que cada cebador, se enlaza, recíprocamente, ya sea a las regiones enlazadoras de cebadores recíprocos hacia adelante o en reversa (US6743605). La combinación es referida en este documento como TRA asimétrica o ATRA (Asymmetric TRA). Como tal, cuando los cebadores madre son agregados a la TRA, una persona podría argumentar que ahora existen 3 procesos separados de amplificación combinados en el ensayo, uno siendo la TRA y 2 amplificaciones ATRA separadas (figura 12a). Podría entonces ser tentador el sugerir que los

cebadores madre no incrementan la tasa de amplificación de la TRA per se, pero que simplemente agregan 2 amplificaciones ATRA al mismo ensayo. Sin embargo, si este fuese el caso, entonces la tasa general observada de amplificación sería la suma de la tasa de amplificación de sistema TRA mas aquella de ambos sistemas ATRA. Sin embargo, los inventores han demostrado que el uso de cebadores madre causa un incremento en la tasa de amplificación que es mayor que la que se esperaría de la suma de sistemas de amplificación sustancialmente independientes. En el ejemplo 3, la tasa de amplificación es medida con diferentes combinaciones de cebadores madre y LFPs. Las manifestaciones que utilizan a un solo cebador madre y a un solo LFP son equivalentes a ATRA. Puede observarse que la tasa de amplificación utilizando 2 posibles combinaciones de cebadores madre y de LFPs (es decir, las 2 manifestaciones de ATRA) producen elementos cinéticos extremadamente lentos (figura 12b (i e ii)). Los elementos cinéticos cuando los 2 LFPs son utilizados en conjunto (es decir, un sistema TRA) son más rápidos que los 2 sistemas ATRA (figura 12b (iii)). Cuando los cebadores madre y los LFPs son combinados entre sí, la tasa de amplificación es sustancialmente más rápida que cualquiera de las manifestaciones anteriores de TRA o de ATRA (figura 12b (iv)). Dada la lentitud que han demostrado los resultados cinéticos de ATRA (y recordando la naturaleza exponencial de la amplificación), no es razonable el suponer que la tasa incrementada de amplificación mostrada en la figura 12b (iv) es simplemente la suma de las tasas de las reacciones de los 2 sistemas ATRA y TRA combinadas. Esto resalta el hecho que los cebadores madre están actuando en una forma acoplada con los otros cebadores involucrados en la amplificación exponencial y, nuevamente, esto puede explicarse por la acción de los cebadores madre en los concatémoros lo cual produce copias de amplicones que retienen a una región enlazadora de cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa.

[0057] El ejemplo empírico ya mencionado puede ser modelado. En el ejemplo 4, 3 procesos separados de amplificación son modelados con tasas de amplificación definidas matemáticamente. El modelo genera los resultados de acuerdo a la curva BART (refiérase a secciones posteriores de este documento). Los parámetros utilizados reflejaron el rango de resultados que obtuvieron los inventores para las diferentes manifestaciones tasas de las diferentes NAATs isotérmicas. Puede observarse que si, por ejemplo, 2 procesos muy lentos de amplificación son sumados a un proceso de amplificación mucho más rápido, no se observa el tipo de amplificación significativamente más rápido que se observa cuando los cebadores madre son agregados a los métodos LAMP, LAMP + cebadores tipo bucle o TRA (compare los resultados del modelo en la figura 13a con los resultados empíricos que se muestran las figuras 11, 12b, 15, 16 y 17 de los ejemplos 2, 3, 5, 6 y 7 respectivamente). Además, la figura 13b, que muestra el resultado de sumar a un proceso de amplificación rápido con 2 procesos de amplificación moderadamente rápidos, demuestra que aún bajo aquellas condiciones, el tipo de tasas sustancialmente incrementadas de amplificación general observadas al utilizar a cebadores madre no se observan en el modelo. En efecto, tal como es evidente en la figura 13c, incluso cuando 3 procesos de amplificación rápida son sumados, la tasa de amplificación general es únicamente ligeramente más rápida que cualquiera de los procesos individuales: esto refleja la naturaleza exponencial de la amplificación (compare a las figuras 11, 12b, 15, 16 y 17 de los ejemplos 2, 3, 5, 6 y 7 respectivamente).

[0058] La tasa incrementada de amplificación que los cebadores madre pueden suministrar se ha demostrado con, o se anticipa que funcionen con, algunas NAATs isotérmicas. Ejemplos de casos en los cuales se pueden implementar a los cebadores madre en relación a los otros cebadores utilizados en una NAAT específica se muestran en la figura 14a-g. Los ejemplos 5, 6 y 7 muestran datos empíricos para algunas de las manifestaciones de NAATs que se muestra en la figura 14. En cada caso, pueden observarse incrementos significativos en la tasa de amplificación (figuras 15-17).

[0059] Una utilidad adicional de los cebadores madre en las NAATs que forman concatémoros podrían ser su uso como sondas para su implementación en sistemas fluorescentes, quimioluminiscentes, electro - químicos o de otro tipo como un método para dar seguimiento al grado de amplificación en 'tiempo real'. Los cebadores madre podrían tener beneficios como cebadores que contienen sondas por sobre, por ejemplo, LFPs o cebadores tipo horquillas puesto que no requieren generar repeticiones invertidas en los amplicones lo cual afectaría a ciertos tipos de sondas.

[0060] La plantilla objetivo utilizada en este invento podría ser cualquier ácido polinucleico que comprende a regiones enlazadoras adecuadas de cebadores recíprocos que permitan la amplificación de un ácido polinucleico de interés. Una persona con conocimiento en la industria entenderá que los lugares de enlaces de cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa necesitan estar ubicados en una forma tal que la plantilla objetivo permita que la región enlazadora de cebadores recíprocos hacia adelante y la región enlazadora de cebadores recíprocos en reversa estén ubicadas a 5' de la secuencia que debe ser amplificada en la hebra sentido y antisentido, respectivamente.

[0061] La plantilla objetivo podría ser de una sola hebra o de doble hebra. En los casos en que la plantilla objetivo es un ácido polinucleico de una sola hebra, una persona con conocimiento en la industria entenderá que la plantilla objetivo comprenderá inicialmente únicamente a una región de enlace de cebadores recíprocos. Sin embargo, el enlace del primer cebador resultará en la síntesis de una hebra complementaria que contendrá entonces a la 2ª región enlazadora de cebadores recíprocos.

[0062] La plantilla objetivo podría derivarse de una molécula de ARN, en cuyo caso la ARN necesita ser transcrita al ADN antes de practicar el método del invento. Reactivos adecuados para la transcripción del ARN son bien conocidos en la industria e incluyen, pero no se limitan a, transcriptasas en reversa.

- 5 **[0063]** Adicionalmente a las regiones de enlaces de cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa, la plantilla objetivo necesita tener a una región madre que necesita tener una longitud suficiente para permitir los enlaces de uno o más cebadores madre del invento. Por lo tanto, se prefiere que la región madre tenga una longitud de por lo menos 5 nucleótidos, de por lo menos 10 nucleótidos, de por lo menos 15 nucleótidos, de por lo menos 20 nucleótidos, de por lo menos 30 nucleótidos, de por lo menos 50 nucleótidos, de por lo menos 100 nucleótidos, de por lo menos 200 nucleótidos, de por lo menos 300 nucleótidos, o de por lo menos 500 nucleótidos.
- 10 **[0064]** Una persona con conocimiento en la industria estará consciente que, adicionalmente a los cebadores necesarios para la amplificación, las NAATs requerirán reactivos adicionales para poder sintetizar a un ácido polinucleico. Los reactivos requeridos serán evidentes para una persona con conocimiento en la industria, pero generalmente incluirán a amortiguadores adecuados, dNTPs adecuados, una polimerasa adecuada, etcétera.
- 15 **[0065]** Una persona con conocimiento en la industria apreciará, que después de la adición de todos los componentes necesarios para realizar la NAAT en cuestión, es necesario suministrar condiciones adecuadas para la síntesis del ácido polinucleico. Esto puede lograrse al suministrar una temperatura adecuada de incubación, por ejemplo. Se prefiere que la amplificación ocurra bajo condiciones isotérmicas. Esto significa que durante la amplificación las temperaturas deben mantenerse a un nivel constante. El término "constante" significa que la temperatura no variará por más de ± 10 °C. Sin embargo, métodos que abarcan a un solo cambio de temperatura de más de 10 °C, a 2 cambios de temperatura de más de 10 °C, a 3 cambios de temperatura de más de 10 °C, a 4 cambios de temperatura de más de 10 °C o a 5 cambios de temperatura de más de 10 °C durante el proceso de amplificación también están dentro del enfoque de este invento.
- 20 **[0066]** La amplificación del ácido polinucleico de acuerdo al invento podría detectarse por métodos conocidos para aquellas personas con conocimiento en la industria. Métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a, el uso de colorantes fluorescentes de intercalación, sondas o cebadores fluorescentes, la medición de turbiedades, sondas electro - químicas, señales bioluminiscentes y sondas quimioluminiscentes.
- 25 **[0067]** La amplificación del ácido polinucleico podría detectarse utilizando métodos en tiempo real, es decir, métodos que pueden detectar al ácido polinucleico en la medida en que está siendo amplificado. Ejemplos de aquellos sistemas de detección incluyen, pero no se limitan a, sondas de fluorescencia (por ejemplo, sondas fluorescentes que son agregadas durante la amplificación), sondas de señales bioluminiscentes y sondas electro - químicas. En un aspecto, los cebadores madre en si son marcados con una partícula detectable, por ejemplo, una marcación fluorescente, una marcación quimioluminiscencia o una marcación electroquímica, que permite la detección del amplicón al cual los cebadores madres se enlazan. Por lo tanto, una utilidad adicional de los cebadores madre en NAATs que forman concatémoros podría ser como sondas para su uso en un sistema reportador fluorescente, de quimioluminiscencia o electroquímico como un medio para hacer seguimiento de la magnitud de amplificación en 'tiempo real'. Otros sistemas reportadores adecuados serán evidentes para aquellas personas con conocimiento en la industria. Los cebadores madre podrían tener beneficios como cebadores que contienen sondas por sobre, por ejemplo, LFPs o cebadores tipo horquilla puesto que los cebadores madre no necesitan generar a repeticiones invertidas en el amplicón lo cual podría afectar a ciertos tipos de sondas. Alternamente, el producto de amplificación podría detectarse utilizando mediciones al final del proceso, es decir, mediciones que ocurren después de que la amplificación del ácido polinucleico haya sido completada.
- 30 **[0068]** La amplificación del ácido polinucleico también puede detectarse mediante otros métodos de detección utilizados en la detección de NAATs. Ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, detecciones mediante formaciones genéticas, tiras de flujos laterales, electroforesis, espectroscopía de masa y detección acústica.
- 35 **[0069]** En una sección, el sistema reportador de Formaciones Bioluminiscentes en Tiempo Real (BART - Bioluminescent Assay in Real-Time) es utilizado para detectar la síntesis del ácido polinucleico. Este sistema ha sido explicado en detalle en WO2004/062338 y WO2006/010948. BART es un ejemplo de un sistema reportador diseñado para NAATs isotérmicas que genera un tipo simple de señales de una muestra: una señal bioluminiscente. BART utiliza la detección que depende de la luciferasa de la luciérnaga de pirofosfato inorgánico: esto es producido en grandes cantidades cuando las secuencias 'objetivo' son amplificadas utilizando una NAAT. Como tal, el diagnóstico molecular puede lograrse con BART simplemente al medir a la luz emitida de los tubos cerrados, en un ensayo de fase homogénea. BART ha demostrado con diferentes NAATs, el operar entre 50-63 °C. El reportador BART es un método particularmente efectivo para hacer seguimiento de la tasa de amplificación de una NAAT puesto que la emisión de luz representa a una medida de la tasa instantánea de amplificación (mientras que, por ejemplo, las emisiones fluorescentes muestran la acumulación de una señal y, por lo tanto, las mediciones deben diferenciarse para obtener las tasas de amplificación). En forma de ejemplo, la figura 22 muestra que BART está siendo utilizada en conjunto con el método LAMP para detectar una serie de diluciones de una molécula objetivo de ADN. Debe tomarse en cuenta que en la medida en que el monto de ADN objetivo en la muestra se reduce, la fase de latencia para alcanzar el tiempo de incremento máximo de luz (el cual es proporcional a la fase de latencia para alcanzar la amplificación máxima) se incrementa. Puesto de otra forma, el tiempo necesario para alcanzar al pico característico de luz asociado con muestras positivas en BART se incrementa en una forma inversamente proporcional al monto del ácido polinucleico objetivo en la muestra. Se enfatiza que mientras que los ejemplos utilizan al sistema reportador BART, este invento no se limita al uso de BART y es igualmente aplicable a métodos tales como métodos de
- 40
45
50
55
60
65

medición a través de fluorescencia, turbidez, u otras técnicas espectroscópicas o electro - químicas sin importar si estos métodos son utilizados para mediciones en tiempo real de la amplificación o como mediciones al final del proceso.

5 **[0070]** Preferiblemente, el método del invento es realizado en contenedores vacíos. Esto es de gran utilidad puesto que reduce o incluso previene la posibilidad de que la muestra se contamine. Además, reduce o incluso previene la posibilidad de que el laboratorio se contamine. Esto es particularmente importante puesto que incluso si sólo una copia del ácido polinucleico plantilla o del amplicón en el laboratorio escapase, esto podría contaminar potencialmente a otras muestras que estén siendo probadas y podría generar resultados de falsos positivos. Por lo tanto, la capacidad de prevenir la contaminación es de una importancia particular en los casos en que un método del invento es utilizado en una aplicación de diagnóstico.

15 **[0071]** Una aplicación adicional de un método de acuerdo al invento es para determinar si una secuencia particular de ácidos polinucleicos está presente en un código genético de un organismo. Por ejemplo, podría usarse para determinar si el ácido nucleico del cual se origina el ácido nucleico plantilla ha sido modificado genéticamente, para detección de ADN asociado con una variedad específica, modificada en una forma no genética, de plantas o de una planta modificada genéticamente, para la detección de ADN asociado con razas pedigrí de animales o para aplicaciones diagnósticas médicas o veterinarias tales como pruebas genéticas o para aplicaciones forenses. Los métodos de este invento también son adecuados para la detección de polimorfismos de nucleótidos individuales (SNPs - single-nucleotide polymorphisms).

25 **[0072]** Un método de acuerdo al invento podría ser utilizado en aplicaciones de diagnóstico. En particular, el método permite la identificación y cuantificación de organismos en un paciente y en otras muestras. El organismo podría ser cualquier microorganismo, tal como virus, bacterias, micoplasmas y hongos. El microorganismo puede ser patogénico, pero también podría ser un microorganismo no patogénico. El microorganismo podría ser un organismo modificado genéticamente (GMO - genetically modified organism) además, los métodos de este invento pueden ser utilizados para identificar a vegetales y animales modificados genéticamente, para la detección de un estado de enfermedad; para la predicción de una reacción adversa de un producto de una terapia y también para la predicción de una susceptibilidad para un estado de enfermedad.

30 **[0073]** El término "muestra del paciente" se refiere a cualquier muestra tomada de un paciente y puede incluir a sangre, deposiciones, hisopos, esputo, lavado broncoalveolar, muestras de tejidos, orina y fluidos espinales. Otras muestras adecuadas de pacientes y métodos para extraerlos son conocidos para aquellas personas con conocimiento en la industria. Un "paciente" o "sujeto" del cual se toma la muestra podría ser un animal humano o no humano. Cuando una muestra no es referida específicamente como una muestra de pacientes, el término también podría comprender muestras tomadas de otras fuentes. Ejemplos incluyen hisopos de superficies, muestras de agua (por ejemplo, aguas residuales, aguamarina, agua de lago, agua para beber), muestras de comidas, productos cosméticos, productos farmacéuticos, productos fermentados, cultivos celulares y de microorganismos y otras muestras en las cuales la detección de un microorganismo es deseable.

40 **[0074]** En un aspecto adicional, se facilita el uso de un botiquín para realizar un método de acuerdo al invento.

45 **[0075]** Preferiblemente dicho botiquín comprende a todos los componentes necesarios para practicar el método del invento, excepto el ácido polinucleico objetivo que debe ser probado, a menos que el ácido polinucleico objetivo forme parte de un control positivo suministrado.

50 **[0076]** Un botiquín para su uso en un método de acuerdo al invento comprende preferiblemente a una polimerasa de ácidos polinucleicos, el sustrato para la polimerasa del ácido nucleico y cebadores adecuados para amplificaciones isotérmicas del ácido polinucleico objetivo, tal como fue descrito anteriormente. Más preferiblemente, el botiquín comprende además reactivos amortiguadores, tales como una fuente de iones de magnesio, o aditivos conocidos en la industria por mejorar el rendimiento de una NAAT tal como la betaína o aditivos conocidos por mejorar la vida útil de reactivos del botiquín tales como la trehalosa o aditivos conocidos por ayudar a preservar a reactivos tales como la azida de sodio. Alternamente, un botiquín para su uso en un método de acuerdo al invento podría comprender únicamente algunos de estos componentes y/o componentes adicionales. La muestra y cualquier otro componente que haya sido omitido del botiquín podría ser agregado entonces al botiquín durante su uso.

55 **[0077]** Cuando BART es utilizado para la detección de ácidos polinucleicos, una luciferasa termoestable, luciferina y una enzima que convierte a pirofosfato inorgánico (PPi) a ATP, tal como la sulfuirilasa de ATP, y cualquier otro sustrato o cofactor requerido de la enzima que convierta al PPi a ATP, tal como el fosfosulfato 5' de adenosina, podría ser incluido en el botiquín. Por lo tanto, en una sección, un botiquín para su uso con BART comprende a polimerasas de ácidos nucleicos, b) por lo menos un cebador madre, c) por lo menos 2 cebadores recíprocos adecuados para amplificaciones isotérmicas de la muestra de prueba, d) una luciferasa termoestable, e) luciferina, f) sulfuirilasa de ATP, y g) fosfosulfato 5' de adenosina.

65 **[0078]** Preferiblemente, por lo menos uno de los componentes del botiquín es liofilizado o está en otra forma que sea adecuada para el almacenamiento del botiquín. Más preferiblemente, todos los componentes de botiquín están

liofilizados o en una o más formas adicionales adecuadas para su almacenamiento. Aquellas otras formas incluyen a componentes a los cuales se han agregado factores estabilizadores agregados y/o una mezcla maestra refrigerada o congelada que contiene a los componentes del botiquín.

5 **General**

[0079] El término “aproximadamente” en relación al valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

10 [0080] El término “comprende” abarca a “incluyendo” así como “que consiste de”, por ejemplo, una composición “que comprende a” X podría consistir exclusivamente de X o podría incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

15 [0081] BART se refiere a un método para determinar el monto del ácido polinucleico plantilla presente en una muestra donde la presencia de fosfato inorgánico que se deriva de la reacción de amplificación es detectada e indica el monto del ácido polinucleico plantilla en la muestra.

[0082] Varios aspectos y secciones de este invento serán descritos ahora en mayor detalle en forma de ejemplos. Se apreciará que modificaciones del detalle podrían realizarse sin apartarse de la cobertura de las reivindicaciones.

20 **DESCRIPCIÓN DE FIGURAS**

[0083]

25 La **figura 1** muestra las 2 regiones, en un polinucleótido, requeridas generalmente para la amplificación exponencial ya sea usando sólo 2 cebadores (figura 1a) o algunos cebadores (figura 1b). En relación a estas regiones, la región madre del polinucleótido, el sujeto de este invento, es definido en la figura 1c. La figura 1d muestra explícitamente la región madre para las NAATs referidas en este documento como LAMP y TRA en amplicones esperados de primera generación formados por estos métodos; esto muestra que la región madre está entre las regiones del amplicón involucrado en la formación de bucles intra-moleculares. Debe tomarse en cuenta que, en efecto, mientras que los métodos LAMP y TRA representan a su primera generación en una forma diferente (en sus aplicaciones asociadas de patentes) las estructuras son de hecho idénticas. La figura 1e muestra explícitamente la región madre para las NAATs referidas en este documento como LAMP y TRA en la plantilla objetivo.

30 La **figura 2** muestra varias formas por las cuales 1, 2 o más cebadores madre pueden ser colocados en la región madre.

35 La **figura 3** muestra la generación de varios tipos de amplicones tal como se refieren en este documento, incluyendo la generación de amplicones principales (figura 3a), amplicones de primera generación (figura 3b) y amplicones de la siguiente generación (figura 3c).

40 La **figura 4** muestra el proceso por el cual LFPs pueden formar estructuras concatémicas. En la primera ocasión, se forma a un amplicón principal que tiene una repetición invertida en su extremo 5' (figura 4a), por lo tanto, la inspección de la figura 4a (ii) muestra que a partir del extremo 5' del amplicón principal, existe una región F1, y más allá en el amplicón existe ahora, en la misma hebra, un complemento a esta región, F1c (la pequeña c en ésta y las siguientes figuras denotará al complemento de una región enlazadora de cebadores). Los mecanismos suministrados por una NAAT específica para elaborar al amplicón principal de una sola hebra y que está disponible para ser copiado por otro cebador no son hechas explícitamente en la figura 4a pero están representadas por las 2 flechas negras que conllevan a la figura 4a (iii) donde se muestra al amplicón resultante de primera generación. El amplicón de primera generación formado por LFPs puede actuar, en sí, como un cebador para generar amplicones adicionales. Al hacerlo de esa forma, se pueden formar estructuras concatémicas. Estos son 2 mecanismos generales por los cuales se pueden formar a los concatémicos, uno mediante un evento intra-molecular, tal como se mostró en la figura 4b, y, el otro, por un evento intra-molecular, tal como se muestra en la figura 4c. Debe tomarse en cuenta que, en ambos casos, el proceso genera regiones de una sola hebra de amplicones dentro del concatémico, refiérase a la región F2 en las figuras 4b (ii) y (iii) y 4c (ii) y (iii). Estas pueden enlazarse a LFPs adicionales. Refiérase a la figura 8 para los pasos subsiguientes.

55 La **figura 5** muestra un proceso idéntico que en la figura 4 excepto que la repetición invertida necesaria para la formación de concatémicos ya es inherente en los cebadores tipo horquilla y no se requiere a una extensión de hebras para la formación tal como lo requería los LFPs.

60 La **Figura 6** muestra la naturaleza de varios cebadores mencionados en este documento. En la figura 6a se muestra a un “cebador simple” en el cual una mayoría sustancial o todo el cebador está involucrado en el emparejamiento de bases de Watson-Crick con la plantilla de polinucleótidos. En la figura 6b se muestra como los LFPs difieren de los cebadores simples y que tienen una región 5' adicional que es sustancialmente idéntica a la región 3' en el lugar de enlaces para el extremo 3' de dicho cebador. Una consecuencia de esto es que la extensión de este cebador genera a una repetición invertida entre la región 5' del cebador y el producto de extensión (refiérase además a la figura 4a (ii)). En la figura 6c se muestran los cebadores tipo horquilla utilizados en el método SEA. La región 5' de estos cebadores contiene a una repetición invertida de tal forma que se espera que la región 5' se pliegue en una estructura tipo horquilla. Se espera que la horquilla sea ajustada y que contenga muy pocos nucleótidos de una sola hebra y por lo tanto

esta región de una sola hebra posiblemente no esté disponible para enlazar a otro cebador. Sin embargo, si la horquilla es alargada para formar a un bucle sustancial tal como en la figura 6d, entonces el enlace de un cebador a este bucle sería posible.

La **figura 7** muestra a un gel de agarosa coloreado con bromuro de etidio donde los resultados de 2 tecnologías diferentes de amplificación se muestran al ejecutarse lado a lado, siendo una la tecnología LAMP y la otra la tecnología TRA. Para el método LAMP la aplicación usa cebadores de desplazamiento y LFPs (pero no cebadores tipo bucle). En el método TRA la aplicación usa a los mismos LFPs tal con el método LAMP, pero sin ningún otro cebador presente.

Puede observarse fácilmente que ambos métodos LAMP y TRA generan a amplicones concatémicos. Además, los tamaños de los amplicones son aparentemente idénticos. Esto sugiere que los métodos TRA y LAMP comparten a un mecanismo en común para la concatemerización.

Figura 8. El efecto de enlazar LFPs adicionales a los bucles que estos generaron previamente se muestra en la figura 8. La figura 8a muestra a LFPs que se enlazan a bucles formados a partir de auto-enlaces intramoleculares del Amplicón de Primera Generación (o para amplicones de la siguiente generación), la figura 8b muestra a lo mismo para bucles formados inter-molecularmente. En ambos casos, la extensión de los LFPs enlazados recientemente causa que la hebra opuesta se vuelva de una sola hebra (figura 8a (ii) y figura 8b (ii)). La figura 9 muestra como los cebadores madre pueden enlazarse a estas regiones. La figura 8c enfatiza que si una modificación de un cebador tipo horquilla (figura 8c (i)) es hecha para suministrar a un bucle intrínseco de una sola hebra que contiene a la misma secuencia que el extremo 3' del cebador (tal como se muestra en la figura 8c (ii)), entonces el Amplicón resultante de la Siguiente Generación suministrará a un bucle de una sola hebra para enlazarse a un cebador tipo horquilla adicional (figura 8c (iii)).

Figura 9. Ya sea para la formación intra- (figura 9a (i)) o inter- figura 9a (ii)) molecular de Amplicones de la Siguiente Generación, una región del vástago del amplicón es expuesta como de una sola hebra y está disponible para enlaces de cebadores madre. Este también es el caso para el bucle recíproco que es formado por LFPs (es decir, la hebra recíproca del bucle mostrado en la figura 8a el cual también es generado), este bucle no puede enlazarse a un LFP puesto que está en el mismo sentido que los LFPs, pero puede enlazarse a uno de los denominados 'cebadores tipo bucle' (figura 9b (i)) si fuese utilizado. La extensión del cebador tipo bucle también vuelve a una región del vástago del amplicón en de una sola hebra y por lo tanto está disponible para enlazarse a un cebador madre (figura 9b (ii)).

La **figura 10** muestra como para el método SEA, la re-copia de Amplicones de la Siguiente Generación por medio de la auto-extensión de Amplicones, también facilita a una región del vástago de amplicones para enlazarse a un cebador madre.

La **figura 11** muestra el incremento de tasa usando cebadores madre en el método TRA seguido por BART para 3 conjuntos diferentes de cebadores en un sistema de listeria monocytogenes. La ubicación esquemática de LFPs y de cebadores madre es presentada en la figura 11 (i). Las figuras 11 (ii)-11 (iv) muestran a la comparación BART de las tasas en la ausencia de cebadores madre (paneles izquierdos) con aquellos en la presencia de cebadores madre (paneles derechos) para conjuntos lentos, medios y rápidos de LFPs, correspondientemente. En cada gráfico el primer pico representa un número de copias más alto (10^8) y el pico posterior, si es que existiese, representa 10^4 copias del objetivo. Ningún control de plantilla se muestra en un color gris claro.

La **figura 12** resalta como el uso de cebadores madre en el método TRA en el sistema de listeria monocytogenes (figura 12a (i)) podría ser separado en 3 procesos y permite la amplificación, siendo uno de dichos métodos a TRA y los otros 2 ATRA (figura 12a (ii)). La comparación BART de tasas para ambos métodos ATRA, TRA y una combinación completa de los cebadores se muestra en la figura 12b (i)-(iv), respectivamente. En cada gráfico el primer pico representa a un número de copias más alto (10^8) y el pico posterior, si existiese, representa a 10^4 copias del objetivo. Ningún control de plantilla se muestra en un color gris claro.

La **figura 13** muestra modelos cinéticos de BART en los casos en los que 3 reacciones diferentes de amplificación son combinados. En la figura 13a, una NAAT rápida es combinada con 2 NAATs muy lentas. Puede observarse que la tasa general de amplificación (es decir, la suma de las 3 tasas de reacciones de amplificación) genera a un pico BART idéntico en tiempo al más rápido de los 3 NAATs; la figura 13b es lo mismo que para la figura 13a excepto que una NAAT rápida es combinada con 2 NAATs ligeramente más rápidas. En este caso la tasa general de amplificación es afectada muy ligeramente y el pico BART ocurre únicamente unos pocos minutos antes; la figura 13c es tal como para las figuras 13a y b excepto que las NAATs denominadas más lentas ahora son tan rápidas como la NAAT más rápida: la tasa general combinada de amplificaciones es afectada aún, solamente en una forma ligera, y el pico BART ocurre solamente unos pocos minutos antes. La figura 13 refleja que cuando un número de procesos exponenciales diferentes ocurren simultáneamente, no se observa un pico BART significativamente más temprano, tal como se observa con la utilización de cebadores madre. Esto resalta el hecho que los cebadores madre actúan para incrementar fundamentalmente y significativamente la tasa intrínseca de amplificación cuando se los implementa con una NAAT específica en vez de agregar procesos separados más lentos o de velocidad similar.

Figura 14. Para cada parte (a) a la (g) de la figura 14, la parte (i) de cada figura muestra, para plantillas de doble hebra, la posición de los lugares enlazadores de cebadores para los cebadores utilizados por una variedad de NAATs. Los cebadores asociados con la región enlazadora recíproca hacia delante son

denotados con una F y aquellos con la región enlazadora recíproca en reversa son denotados con R. La parte (ii) de cada figura muestra donde los varios cebadores utilizados por una NAAT específica se enlazan con las hebras respectivas; una ubicación potencial para el enlace de cebadores madre también se muestra, pero la posición exacta del cebador madre y el número de cebadores madre utilizados puede variar significativamente tal como se detalla en la figura 2. La figura 14a muestra a cebadores madre que actúan en el método TRA; la figura 14b muestra a cebadores madre que actúan en el método LAMP; la figura 14c muestra a cebadores madre que actúan en una manifestación mejorada del método LAMP que también usa a cebadores tipo bucle; la figura 14d muestra a cebadores madre que actúan en el método SEA; la figura 14e muestra a cebadores madre que actúan en el método SMAP, la figura 14f muestra a cebadores madre que actúan en el método ATRA y la figura 14g muestra a cebadores madre que actúan en una versión del método TRA con LFPs anidados.

La **figura 15** muestra el efecto de anidar LFPs en la presencia y en la ausencia de cebadores madre en el método TRA en el sistema de Salmonella enteritidis.

La figura 15a suministra una comparación del método TRA acelerado con cebadores madre (figura 15a (i)) con el método LAMP acelerado con cebadores madre (figura 15a (ii)) y el método TRA anidado acelerado con cebadores madre (figura 15a (iii)). En cada gráfico el primer pico representa un número más alto de copias (10^8) y el pico posterior, si existiese, representa a 10^4 copias del objetivo. Ningún control de plantilla se muestra en color gris claro.

La figura 15b (i-iv) muestra una comparación de las tasas BART para el método TRA con LFPs internos, LFPs externos, ambos LFPs internos y externos en la ausencia de cebadores madre y en la presencia de cebadores madre, respectivamente. En cada gráfico, el primer pico representa un número más alto de copias (10^8) y el pico posterior, si existiese, representa a 10^4 copias del objetivo. Ningún control de plantilla se muestra en color gris claro.

La **figura 16** muestra el incremento de tasa utilizando cebadores madre en el método LAMP seguido por BART en un sistema de listeria monocytogenes. Se presenta una ubicación esquemática de todos los cebadores en la figura 16 (iii) y una comparación BART de las tasas en la ausencia y en la presencia de cebadores madre tal como se muestra en la figura 16 (i) y en la figura 16 (ii), respectivamente. En cada gráfico el primer pico representa un número más alto de copias (10^8) y el pico posterior representa a 10^4 copias del objetivo. Ningún control de plantilla se muestra en color gris claro.

La **figura 17** muestra el incremento de tasa utilizando a los cebadores madre en el método TRA seguido por BART en un sistema de listeria monocytogenes donde los cebadores madre están ubicados en regiones diferentes del vástago en comparación de los ejemplos ya mencionados. La ubicación esquemática de todos los cebadores es presentada en la figura 17 (iii) y una comparación BART de las tasas en la ausencia y en la presencia de cebadores madre se muestra en la figura 17 (i) y en la figura 17 (ii), respectivamente. En cada gráfico el primer pico representa un número de copia más alto (10^8) y el pico posterior representa a 10^4 copias del objetivo. Ningún control de plantilla se muestra en color gris claro.

La **figura 18** muestra los niveles más altos de libertad para el posicionamiento de un cebador madre en comparación a un cebador tipo bucle en el método LAMP, por ejemplo. Los cebadores tipo bucle son limitados estrictamente a estar entre los lugares F1 y F2 o entre los lugares R1 y R2. Si la secuencia no le permitiese ubicar a uno o ambos cebadores tipo bucle eficientemente debido a que el bucle no es lo suficientemente largo o a que el cebador tipo bucle causará posiblemente amplificaciones no específicas a través de dímeros cebadores, no quedaría otra alternativa que un diseño alterno de cebadores bucle. Los cebadores madre pueden ser ubicados en cualquier lugar en el vástago y pueden tener una orientación que les permita una amplia selección de diseños y optimizaciones posibles con la eficiencia más alta mientras se evita cualquier dimerización no específica de cebadores.

La **figura 19** muestra (i) una secuencia hipotética de polinucleótidos en la cual lugares adecuados de enlace de cebadores se muestran como regiones con cuadros. Sin embargo, las regiones de color gris son lugares de enlace sustancialmente más preferidos que las regiones de color blanco, tal vez debido a una mejor conservación secuencial en esta parte del genoma de un organismo (lo cual tiene importancia cuando se diseñan nuevas diagnósticos para, por ejemplo, un patógeno que tiene una variación secuencial significativa entre diferentes variedades). En la figura 19 (ii), y en relación al método LAMP tal como se utiliza con cebadores tipo bucle, las regiones diferentes son asignadas a los cebadores utilizados en esta manifestación del método LAMP. Debe tomarse en cuenta que 4 de los cebadores deben estar ubicados en lugares de enlace no óptimos y un lugar de enlace óptimo no se utiliza en absoluto. Esto claramente no es ideal. Una alternativa sería ubicar a los cebadores tal como se muestra la figura 19 (iii), donde todos los lugares óptimos ahora son utilizados. Sin embargo, en esta manifestación los lugares R2 y R1 están muy cerca entre sí lo que significa que se pierde totalmente un lugar para el cebador R tipo bucle; los inventores también han observado que cuando los lugares R1 y R2 están muy cerca entre sí (o los lugares recíprocos F1 y F2) podría ocurrir una amplificación que no es óptima, tal vez debido a un obstáculo estérico en el bucle formado. Los inventores han observado además que cebadores tipo bucle en general incrementan la tasa de amplificación más que los cebadores de desplazamiento. Consecuentemente, se espera la asignación de cebadores en la figura 19 (iii) no sea particularmente ideal. Sin embargo, en la figura 19 (iv), al aplicar el uso de un cebador madre, todos los lugares óptimos de enlace pueden ser utilizados y los sitios de los cebadores tipo bucle y de desplazamiento pueden ser utilizados. Por lo tanto, los cebadores madre incrementaron la flexibilidad del diseño de cebado.

La **figura 20** muestra que, para los cebadores de desplazamiento, los cebadores tipo bucle y los cebadores

madre, es posible utilizar varios tipos de cebadores aparte de los 'cebadores simples'. 3 de muchas combinaciones posibles se muestran en la figura 20 (i) a (iii) donde únicamente se muestran la región de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante y la región madre. En (i) se utiliza una combinación de LFPs, un cebador tipo horquilla y un cebador simple; en (ii) el cebador tipo bucle es representado por un cebador simple modificado que contiene una región de ARN o un lugar de división para una nickasa; en (iii) se muestra una combinación adicional posible de LFP, cebador tipo horquilla y cebadores simples divisibles. Muchas otras posibles combinaciones son claramente evidentes.

La **figura 21** muestra que la acción de los cebadores madre genera únicamente a amplicones exponencialmente aplicables si actúan en un concatémero. A la izquierda de la figura 21, se muestra la acción del cebador madre en el Amplicón de Primera Generación: puede observarse que el amplicón resultante contiene únicamente a las regiones de enlace de cebadores recíprocos hacia atrás y no en reversa que se requiere para una amplificación exponencial. A la derecha de la figura 21, en contraste, una persona observa que cuando el cebador madre puede extenderse a través de un concatémero, tal como es verdad para el cebador madre 2 mostrado, pero no es de esa forma para el cebador madre 1, el amplicón resultante tiene regiones de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa y por lo tanto es un sustrato para una amplificación exponencial.

La **figura 22** es un ejemplo de BART-NAAT tal como se muestra resaltando a la naturaleza cualitativa de la técnica. La tecnología BART representa un método efectivo para hacer seguimiento de la tasa de amplificación en una NAAT puesto que los resultados bioluminiscentes reflejan la tasa instantánea de amplificación.

La **figura 23** muestra (i) una representación de parte de la cinta SCCmec asociada con MRSA. El elemento genético móvil SCCmec se integra a una región conservada en el gen OrfX del *Staphylococcus aureus* que transmite resistencia a la Meticilina antibiótica a través del gen MecA. El gen MecA y el gen OrfX pueden variar altamente entre diferentes versiones de SCCmec (y por lo tanto diferentes variedades de MRSA). Consecuentemente, ha sido técnicamente difícil utilizar a los genes MecA y OrfX como regiones enlazadoras de cebadores recíprocos para una NAAT específica en un ensayo de diagnóstico para MRSA. Por ejemplo, si los genes MecA y OrfX tienen una separación de más de 500 parejas base, es difícil que el método LAMP sea capaz de amplificar a ningún producto, si los genes MecA y OrfX, fuesen usados como lugares de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa (ii). Sin embargo, puesto que los cebadores madre mejoran dramáticamente la capacidad de las NAATs, tales como el método LAMP, para amplificar a objetivos y, puesto que el 'vástago' de un amplicón usando MecA y OrfX como lugares de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa podrían ser usados como objetivos por algunos cebadores madre, y puesto que los cebadores madre han demostrado funcionar en una forma acoplada con los cebadores recíprocos hacia adelante y en reversa, los cebadores madre pueden, por lo tanto, permitir una orientación directa del MRSA usando una NAAT apropiada, tal como el método LAMP (iii). Una variedad de cebadores madre puede utilizarse para abordar las variaciones en la región entre los genes MecA y OrfX.

El uso de cebadores madres, tal como se ha descrito anteriormente, tiene el beneficio, en comparación de técnicas existentes que se basan únicamente en OrfX y las regiones del SCCmec aparte de MecA, para indicar la presencia de MRSA. Esto se debe a que algunos *Staphylococcus aureus* contienen una inserción SCCmec que no contiene al gen MecA y, por lo tanto, no son, realmente, MRSA. Puesto que este método requiere que ambos OrfX y MecA estén en la misma hebra de ADN, no existe la posibilidad de obtener un positivo falso a partir de las hebras que contienen a SCCmec pero que no contienen a el gen MecA.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Comparación de los métodos LAMP y TRA que muestra que los amplicones resultantes son, en ambos casos, concatémoros aparentemente idénticos.

[0084] Un fragmento de 2-kb del gen de invasión A de *Salmonella enteritidis* (un número de copias que varía entre 10^8 y 10^2 por reacción) fue amplificado en LAMP-BART y TRA-BART a 60 °C en un sistema de equipos de toma de imágenes personalizado Lucy (Lumora) bajo condiciones idénticas a aquellas en el ejemplo 2 con la excepción de que se usaron 0.32 unidades/microlitro de polimerasa de ADN de Bst (NEB) y 11.2 microgramos/mililitro de luciferasa de luciérnaga. La mezcla de la reacción contenía a los cebadores R-LFP(6) y F-LFP(6) con 0.8 μ M cada uno y cebadores de desplazamiento RD(2) y FD(2) con 0.2 μ M. El volumen total de cada reacción fue de 20 μ l. Las regiones fueron ejecutadas durante 100 minutos.

Conjunto 6 de cebadores LFP (R-LFP se enlaza a R2c y F-LFP se enlaza a F2 en la secuencia objetivo).

[0085]

R-LFP(6)	5'-aac ctt gta gag cat att cgt ggt ttt ccg cca ttg gcg aat tta tg
F-LFP(6)	5'-tct ctt ggc gcc cac aat gtt ttt aag cga acg tgt ttc cg

Conjunto 2 de cebadores de desplazamiento (Rd se enlaza a R3c y FD se enlaza a F3 en la secuencia objetivo)

[0086]

RD(2) 5'- cat tac tgc tgc taa ttc
 FD(2) 5'- ata tct gaa gtt ttg cag c

5

[0087] El patrón en el gel no depende de la presencia/ausencia de los cebadores de desplazamiento RD y FD y se define únicamente por LFPs (figura 7). Ambas aplicaciones LAMP y TRA resultan en escaleras de exactamente el mismo patrón indicando significativamente que ocurren a través de un mecanismo similar. Los cebadores de desplazamiento podrían tener una participación significativa en la etapa de iniciación de la amplificación LAMP, pero no muestran ningún efecto en la etapa subsiguiente de propagación del amplicón.

10

Ejemplo 2

Efecto de cebadores madre en el método TRA con listeria monocytogenes conservadores del método LAMP con eficacias diferentes

15

[0088] El plásmido pLS que contiene a un fragmento del gen de internalina A de listeria monocytogenes fue purificado utilizando un botiquín QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) y fue amplificado utilizando a TRA-BART a 55 °C en un sistema de equipos de toma de imágenes personalizados Lucy (Lumora). La mezcla de la reacción contenía: 1, 2 o 3 cebadores R-LFP y 1, 2 o 3 cebadores F-LFP a 0.8 μM cada uno (lento, medio o rápido), 0.8 μM de cebadores madre R y 0.8 μM de cebadores madre F (Eurofins MWG), 0.8 mM de dNTPs (total) (Invitrogen), 0.16 U/ml de polimerasas de ADN de Bst (NEB), 0.1 mg/ml de luciferina (Europa Bioproducts), 0.25 mM de 5'-fosfosulfato de adenosina (Biolog), 5.6 mg/ml de luciferasa de luciérnaga (UltraGlow, Promega), 0.375 U/ml de ATP-sulfurilasa (NEB) en 1x de amortiguador de Thermopool (NEB) con algunos estabilizadores y aditivos y un monto alto o bajo de plásmidos: 10⁸ o 10⁴. El volumen total de cada reacción fue de 20 μl. Se ejecutaron pruebas durante 100 minutos. La orientación relativa de los cebadores en la plantilla objetivo se muestra en la figura 11 (i). Sin embargo, tal como puede observarse a partir de la secuencia a continuación, los cebadores usados realmente difieren significativamente en la secuencia de las regiones de enlace B2c y F2.

20

25

30

(Los R-LFPs se enlazan a R2c y los F-LFPs se enlazan a F2 en la secuencia objetivo)

[0089]

35

Conjunto 1 de LFPs lentos
 R-LFP(1) 5'-cct tct ttt aca ggc tta gct ggt ttt tca aag aaa caa cca aag aag tgg
 F-LFP(1) 5'-gga att tca gta cgg ata aaa tgc cgt ttt att atc aaa cgt tgc tgt gta gc

40

Conjunto 2 de LFPs medios
 R-LFP(2) 5'-cct tct ttt aca ggc tta gct ggt ttt atg cta agt ttc atg tgg acg
 F-LFP(2) 5'-gga att tca gta cgg ata aaa tgc cgt ttt gtt tga gat gtt gtt aca ccg tc

45

Conjunto 3 de LFPs rápidos
 R-LFP(3) 5'-cct tct ttt aca ggc tta gct ggt ttt gga agc tgg gaa ttt att gag tg
 F-LFP(3) 5'-gga att tca gta cgg ata aaa tgc cgt ttt gcg cat ata aat cga tgt cat ttg
 Conjunto 1 de cebadores madre
 Madre(1) 5'-tca aac cac cca aca aat g
 MadreR(1) 5'-aac cgg cgg aac taa at

[0090] En la presencia de cebadores madre la aplicación ocurrió mucho más rápido para cualquier conjunto de cebadores LFP o para cualquier monto objetivo presente. Para los conjuntos de cebadores LFPs lentos y medios (figura 11 (ii) y (iii) respectivamente) solo 10⁸ copias del objetivo fueron detectables en la ausencia de cebadores madre teniendo picos a los 92 y 73 minutos respectivamente, mientras que en su presencia 10⁸ copias tuvieron un pico a los 39 y 40 minutos y 10⁴ fueron detectables también dentro del tiempo del ensayo con picos a los 55 y a los 62 minutos. En el caso del conjunto 3 de cebadores rápidos (figura 11 (iv)) ambos números altos y bajos de copias tuvieron picos a los 39 y a los 60 minutos, mientras que en la presencia de los cebadores madre estos fueron detectados mucho más rápido con picos a los 22 y a los 24 minutos. El ejemplo demuestra que una aceleración esencial de la amplificación puede lograrse al agregar a cebadores madre a los conjuntos de cebadores LFP de diferentes eficiencias, longitudes, ubicaciones, Tms, riqueza de GC, tamaño del bucle que se está formando y otros parámetros.

50

55

Ejemplo 3

60

Comparación del método TRA simétrico, asimétrico y simétrico acelerado por medio de cebadores madre con listeria monocytogenes.

[0091] Los pLS-plásmidos que contienen a un fragmento de gen de internalina A de listeria monocytogenes (IlnA) fue amplificado a 55 °C en un sistema de equipos de toma de imágenes personalizados Lucy (Lumora) bajo condiciones idénticas a aquellas del ejemplo 2 con un monto alto o bajo de plásmidos: 10⁸ o 10⁴ usando diferentes combinaciones

65

de cebadores R-LFP(3), F-LFP(3), MadreB(1) y MadreF(1) con 0.8 μ M cada uno.

Conjunto 3 de cebadores LFP (los R-LFPs se enlazan a R2c y los F-LFPs se enlazan a F2 en la secuencia objetivo)

R-LFP(3) 5'-cct tct ttt aca ggc tta gct ggt ttt gga agc tgg gaa ttt att gag tg
F-LFP(3) 5'-gga att tca gta cgg ata aaa tgc cgt ttt gcg cat ata aat cga tgt cat ttg

5

Conjunto 1 de cebadores madre

MadreF(1) 5'-tca aac cac cca aca aat g
MadreR(1) 5'-aac cgg cgg aac taa at

10 **[0092]** Ambas aplicaciones asimétricas fueron muy lentas y se detectó únicamente un número alto de copias del objetivo InIA de listeria con picos a los 84 y a los 75 minutos, respectivamente. El método TRA simétrico el cual involucra al mismo conjunto de LFPs mostró tasas más altas de amplificación con picos a los 38 minutos para 10^8 copias y 56 minutos para 10^4 copias. Cuando los cebadores madre fueron agregados a la manifestación simétrica del método TRA, el número alto de copias tuvo un pico a los 23 minutos y el número bajo de copias tuvo un pico a los 34 minutos, demostrando, de esa forma, un incremento significativo en comparación con las tasas observadas en su ausencia (figura 12b). La adición simple de 3 tasas más lentas no sería suficiente para explicar un incremento tan significativo en la tasa de amplificación tal como se ha demostrado también mediante modelos matemáticos (ejemplo 4).

15

20 **Ejemplo 4**

[0093] Curvas cinéticas simuladas de BART fueron generadas en Microsoft Excel utilizando las fórmulas estándar de la curva de Richard para modelar procesos exponenciales (figura 13). Los elementos genéticos de amplificación fueron modelados para procesos separados de amplificación con diferentes elementos cinéticos. El efecto de combinar a procesos separados de amplificación de elementos cinéticos diferentes, similares o idénticos, también se muestra en la figura 13. Puede observarse a partir de una comparación de las figuras 13a, b y c, que el efecto general de combinar a procesos separados y distintos de amplificación en la tasa general de amplificación es sorprendentemente pequeño, aun cuando 3 procesos rápidos de amplificación son combinados (figura 13c). Esto enfatiza que el efecto de los cebadores madre incrementa fundamentalmente la tasa de amplificación en vez de simplemente sumar los procesos adicionales de amplificación.

25

30

Ejemplo 5

(A) Comparación del efecto de cebadores de desplazamiento y de cebadores externos que forman bucles en el método TRA acelerado con células madre de listeria monocytogenes

35 **[0094]** pLS-plásmidos que contienen un fragmento del gen InIA de listeria monocytogenes fue amplificado en LAMP-BART a 55 °C en un sistema de equipos de toma de imágenes personalizado Lucy (Lumora) bajo condiciones idénticas a aquellas en el ejemplo 2 con un monto alto o bajo de plásmidos: 10^8 o 10^4 . El volumen total de cada reacción fue de 20 μ l. Pruebas fueron ejecutadas durante 100 minutos. Se realizó una comparación entre las reacciones que contenían a R-LFP(3), F-LFP(3), MadreF(1) y MadreR(1) a 0.8 μ M cada uno y agregándose a ExternoR(1) y ExternoF(1) o R-LFP(7) externo y F-LFP(7) externo a 0.8 μ M cada uno.

40

Conjunto 3 de cebadores LFP

R-LFP(3) 5'-cct tct ttt aca ggc tta gct ggt ttt gga agc tgg gaa ttt att gag tg
F-LFP(3) 5'-gga att tca gta cgg ata aaa tgc cgt ttt gcg cat ata aat cga tgt cat ttg

45

Conjunto 1 de cebadores madre

MadreF(1) 5'-tca aac cac cca aca aat g
MadreR(1) 5'-aac cgg cgg aac taa at

Conjunto 1 de cebadores desplazamiento

RD(1) 5'-taa tgc taa gtt tca tgt g

FD(1) 5'-ata atc tac tgt ttg aga tg

50

conjunto 7 de cebadores LFP externos

R-LFP(7) 5'-ctt ctt tgg ttg ttt ctt tgc ctt ttt gct aag ttt cat gtg gac
F-LFP(7) 5'-gta tta aca gct aca cag caa cgt ttt gag atg ttg tta cac cgt c

55 **[0095]** El método TRA acelerado con cebadores madre en este ejemplo resulta en una amplificación rápida del gen InIA con 10^8 y 10^4 número de copias con picos a los 23 y a los 35 minutos, respectivamente. La adición de 2 conjuntos diferentes de cebadores de externos redujo los tiempos de los picos para los números alto y bajo de copias a 18 y 31 minutos, respectivamente (figura 15a). Cuando los cebadores desplazamiento son reemplazados por LFPs, la reacción de amplificación sucede más rápido (figura 15a (iii)).

60

(B) El método de TRA anidado de *Salmonella enteritidis* acelerado con cebadores madre

[0096] pLS-plásmidos que contenían un fragmento del gen de invasión A (InvA) de *Salmonella enteritidis* fueron

purificados utilizando un botiquín QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) y fueron amplificados en TRA-BART a 55 °C utilizando el sistema de equipos de toma de imágenes personalizado Lucy (Lumora). La mezcla de la reacción contenía: LFPs en reversa y hacia adelante internos y/o externos tal como se indica más adelante con 0.8 µM cada uno, 0.8 µM de cebadores MadreB y 0.8 µM de cebadores MadreF (Eurofins MWG), 1.6 mM de dNTPs (total) (Invitrogen), 0.16 U/ml de polimerasas de ADN de Bst (NEB), 0.1 mg/ml de luciferina (Europa Bioproducts), 0.25 mM de 5'-fosfosulfato de adenosina (Biolog), 5.6 microgramos/microlitro de luciferasa de luciérnaga (Ultra Glow, Promega), 0.375 U/ml de ATP-sulfurilsa (NEB) en 1x de amortiguador de Thermopol (NEB) con algunos estabilizadores y aditivos y un monto alto o bajo de plásmidos: 10⁸ o 10⁴. El volumen total de cada reacción fue de 20 µl. Se ejecutaron pruebas durante 100 minutos.

Conjunto 4 de cebadores LFP internos
 R-LFP(4) 5'-gga gca atg gcg cgt tat att tgt ttt cgc cat tgg cga att tat g
 F-LFP(4) 5'-cac aat gcg agc gct tcc ttt tta agc gaa cgt gtt tcc g
 Conjunto 5 de cebadores LFP externos
 R-LFP(5) 5'-cga att acg agc agt aat ggt ttt tca tcc tca act tca gca g
 F-LFP(5) 5'-caa acg ctg caa aac ttc agt ttt tta aag aag tgc tca gac atg
 Conjunto 2 de cebadores madre
 MadreF(2) 5'-cct tgt gga gca tat tgc
 MadreB(2) 5'-gac atc ttt ttc tct tgg cg

[0097] En este Sistema TRA de InvA de *Salmonella enteritidis* ambos conjuntos de LFPs utilizados individualmente fueron tan lentos que no pudieron detectar ni siquiera el número más alto de copias objetivo 10⁸ en los 100 minutos del ensayo. En el método TRA anidado en la ausencia de cebadores madre, la amplificación fue lo suficientemente rápida como para detectar únicamente el número alto de copias objetivo que tuvo un pico a los 68 minutos. Cuando los cebadores madre fueron agregados hubo un incremento en la velocidad y las copias objetivo altas y bajas se volvieron detectables con picos a los 34 y 61 minutos respectivamente (figura 15). Este ejemplo demuestra que se observó una aceleración de amplificación con los cebadores madre para objetivos diferentes y para manifestaciones diferentes de LFPs.

Ejemplo 6

Método LAMP de listeria monocytogenes acelerado con cebadores madre

[0098] pLS-plásmidos que contenían un fragmento del gen de Internalina A de listeria monocytogenes se amplificó en LAMP-BART a 55 °C en un sistema de equipos de toma imágenes personalizado Lucy (Lumora) bajo condiciones idénticas a aquellas del ejemplo 2 con un monto alto o bajo de plásmidos: 10⁸ o 10⁴. El volumen total de cada reacción fue de 20 µl. Las pruebas fueron ejecutadas durante 100 minutos. Se realizó una comparación entre las reacciones que contienen a cebadores de LAMP completos (0.8 µM de cada LFP, 0.4 µM de cada cebador tipo bucle, 0.2 µM de cada cebador de desplazamiento y una adición de 0.8 µM de cada cebador MadreR y 0.8 µM de cada cebador madre).

Conjunto 1 de cebadores LFP
 R-LFP(1) 5'-cct tct ttt aca ggc tta gct ggt ttt tca aag aaa caa cca aag aag tgg
 F-LFP(1) 5'-gga att tca gta cgg ata aaa tgc cgt ttt att atc aaa cgt tgc tgt gta gc
 Cebadores tipo bucle
 BucleRc 5'-cag tca ata aat tcc cag c
 BucleF 5'-cat cga ttt ata tgc gca at
 Conjunto 1 de cebadores de desplazamiento
 RD(1) 5'-taa tgc taa gtt tca tgt g
 FD(1) 5'-ata atc tac tgt ttg aga tg
 Conjunto 1 de cebadores madre
 MadreR(1) 5'-tca aac cac cca aca aat g
 MadreR(1) 5'-aac cgg cgg aac taa at

[0099] Este es un ejemplo de la amplificación LAMP la cual detectó muy rápidamente un número alto y bajo de copias del objetivo InIA de listeria monocytogenes. En la ausencia de cebadores madre, 10⁸ copias tuvieron un pico a los 17 minutos y 10⁴ copias tuvieron un pico a los 26 minutos. La adición de cebadores madre aceleró la reacción aún más y redujo el tiempo de los picos a 13 minutos para las 10⁸ copias y 19 minutos para las 10⁴ copias (figura 16). En este caso la aceleración se logró en el método LAMP, que es uno de los sistemas de amplificación isotérmicos más eficientes desarrollados hasta ahora. La reducción del tiempo de detección es de una importancia enorme para aplicaciones en el punto de uso, en general, y en particular, para pruebas en el punto de cuidado de diagnóstico médico.

Ejemplo 7

Método TRA acelerado de listeria monocytogenes con una orientación diferente de los cebadores madre

[0100] pLS-plásmidos que contenían a un fragmento del gen de internalina A de listeria monocytogenes fue amplificado en TRA-BART a 55 °C en un sistema de equipos de toma de imágenes personalizado Lucy (Lumora) bajo condiciones idénticas a aquellas en el ejemplo 2 con un monto alto o bajo de plásmidos: 10⁸ o 10⁴. La comparación fue hecha entre las reacciones ejecutadas con los cebadores R-LFP(3) y F-LFP(3) únicamente en la ausencia y presencia de los cebadores MadreR(3) y MadreF(3) agregados a 0.8 µM cada uno.

5
10
15
20

		Conjunto 3 de cebadores LFP
R-LFP(3)	5'-cct tct ttt aca ggc tta gct ggt ttt gga agc tgg gaa ttt att gag tg	
F-LFP(3)	5'-gga att tca gta cgg ata aaa tgc cgt ttt gcg cat ata aat cga tgt cat ttg	
		Conjunto 3 de cebadores madre
	MadreF(3)	5'-agt tcc gcc ggt ttg
	MadreR(3)	5'-aca ttt gtt ggg tgg ttt g

[0101] En este ejemplo se demostró el efecto acelerador de los cebadores madre de ubicación diferente en el vástago del amplicón en comparación a aquella mostrada en el ejemplo 2. TRA-BART detectó a las copias objetivo altas y bajas incluso en la ausencia de los cebadores madre con tiempos de pico a los 39 y 69 minutos respectivamente. La adición de cebadores madre aceleró significativamente la reacción y redujo el tiempo de los picos a 22 y a 79 minutos. En contraste con los cebadores tipo bucle, cuando la ubicación es dictada estrictamente por los bucles que se forman por los LFPs y la orientación es fijada, los cebadores madre pueden ser ubicados en cualquier lugar entre las regiones internas F1-B1 y pueden estar orientadas en cualquier dirección. El efecto de aceleración es observado independientemente de la posición u orientación de los cebadores madre (figura 17).

SECUENCIAS

25 Fragmento del gen IlnA de listeria (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 1)

[0102]

30
35
40

```

GGCAATTTTTAATGCTAAGTTTCATGTGGACGGCAAAGAAACAACCAAAGA
AGTGGAAGCTGGGAATTTATTGACTGAACCAGCTAAGCCTGTAAGAAGG
TTATACATTTGTTGGGTGGTTTGATGCCCAAACCGCGGAACTAAATGGAAT
TTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATCGATTTATATGCGCAATTTA
GTATTAACAGCTACACAGCAACGTTTGATAATGACGGTGTAACAACATCTCA
AACAGTAGATTATCA
    
```

40 Fragmento genético de InvA de la salmonella (IDENTIFICACIÓN SECUENCIAL NÚMERO: 2)

[0103]

45
50
55

```

TTTGCGAATAACATCCTCAACTTCAGCAGATACCATTACTGCTCGTAATTCGC
CGCCATTGGCGAATTTATGACAAATATAACGCGCCATTGCTCCACGAATATG
CTCCACAAGGTTAATGACATCTTTTTCTTTGGCGCCACAATGCGAGCGCTT
CCATAATTAACCTTCATATTACGCACGGAAACACGTTTCGCTTAACAAACGCTG
CAAACTTCAGATATACGTTGTACCGTGGCATGTCTGAGCACTTCTTTAAGT
AAATCAGGAAATTTTCGCTTCCAGTTGGTCCAGCATATGTTTTGTTTCCTGAAT
ACC
    
```

55 LISTAS DE SECUENCIAS

[0104]

60
65

```

<110> LUMORA LTD
TISI, Laurence Carlo
GANDELMANN, Olga
KIDDLE, Guy
MCELGUNN, Cathal Joseph
<120> AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS
<130> P053146WO
<140> PCT/GB2010/.....
    
```

<141> 2010-06-15
 <150> GB0910302.9
 <151> 2009-06-15
 <160> 44
 5 <170> Seqwin99, versión 1.02
 <210> 1
 <211> 273
 <212> ADN
 <213> Listeria monocytogenes
 10 <400> 1
 ggcaatttt aatgctaagt ttcattgtga cggcaaagaa acaaccaaaag aagtggaagc 60
 tgggaattta ttgactgaac cagctaagcc tgtaaaagaa ggttatacat ttgttgggtg 120
 gtttgatgcc caaacggcg gaaactaaatg gaatttcagt acggataaaa tgccgacaaa 180
 tgacatgat ttatattgagc aatttagtat taacagctac acagcaacgt ttgataatga 240
 cggtgtaaca acatctcaaa cagtagatta tca 273
 15
 <210> 2
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Salmonella enteritidis
 20 <400> 2
 ttgCGaata acatcctcaa cttcagcaga taccattact gctcgttaatt cgccgccatt 60
 ggCGaattta tgacaaatat aacgcgccat tgctccacga atatgctcca caaggttaat 120
 gacatctttt tctctggcg cccacaatgc gagcgctcc ataattaact tcatattacg 180
 cagGaaaca cgttcgtta acaaacgctg caaaacttca gatatacgtt gtaccgtgag 240
 atgctcgagc acttctttaa gtaaatcagg aaatttcgct tccagttggt ccagcatatg 300
 25 ttttgtttcc tgaatacc 318
 <210> 3
 <211> 47
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 3
 aacctgtag agcatattcg tggtttccg ccattggcga atttatg 47
 35 <210> 4
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 40 <400> 4
 tctctggcg cccacaatgt tttaagcga acgtgttcc g 41
 <210> 5
 <211> 18
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 5
 50 cattactgct cgtaattc 18
 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 6
 atatctgaag tttgcagc 19
 <210> 7
 60 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 65 <400> 7
 ccttcttta caggcttagc tggttttca aagaacaac caaagaagtg g 51

<210> 8
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 8
 ggaatttcag tacggataaa atgccgtttt attatcaaac gttgctgtgt agc 53
 10 <210> 9
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 15 <400> 9
 ccttcttta caggcttagc tggtttatg ctaagttca tgtggacg 48
 <210> 10
 <211> 53
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 10
 ggaatttcag tacggataaa atgccgtttt gttgagatg ttgttacacc gtc 53
 25 <210> 11
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 11
 ccttcttta caggcttagc tggtttga agctgggaat ttattgagtg 50
 <210> 12
 <211> 54
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 12
 40 ggaatttcag tacggataaa atgccgtttt gcgcatataa atcgatgtca ttg 54
 <210> 13
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 13
 tcaaaccacc caacaaatg 19
 <210> 14
 50 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 55 <400> 14
 aaccggcggg actaaat 17
 <210> 15
 <211> 50
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 15
 65 ccttcttta caggcttagc tggtttga agctgggaat ttattgagtg 50
 <210> 16
 <211> 54

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 5 <400> 16
 ggaatttcag tacggataaa atgccgtttt gcgcatataa atcgatgtca ttg 54
 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 17
 tcaaaccacc caacaaatg 19
 15 <210> 18
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 18
 aaccggcgga actaaat 17
 <210> 19
 <211> 50
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 19
 30 ccttcttta caggcttagc tggtttggga agctgggaat ttattgagtg 50
 <210> 20
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 20
 ggaatttcag tacggataaa atgccgtttt gcgcatataa atcgatgtca ttg 54
 40 <210> 21
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 45 <400> 21
 tcaaaccacc caacaaatg 19
 <210> 22
 <211> 17
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia de cebadores
 <400> 22
 aaccggcgga actaaat 17
 <210> 23
 <211> 19
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 23
 60 taatgctaag tttcatgtg 19
 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Secuencia de cebadores

<400> 24
 ataactact gtttgatg 20
 <210> 25
 <211> 45
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 25
 10 cttcttggt tgttcttg ccttttgct aagttcatg tggac 45
 <210> 26
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 26
 gtattaacag ctacacagca acgtttgag atgtgttac accgtc 46
 <210> 27
 20 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 25 <400> 27
 ggagcaatgg gcggttat tgtttcgc cattggcgaa ttatg 46
 <210> 28
 <211> 40
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 28
 cacaatgcga gcgctcct ttaagcgaa cgtgttccg 40
 35 <210> 29
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 29
 cgaattacga gcagtaatg ttttcatcc tcaactcag cag 43
 <210> 30
 <211> 45
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 30
 50 caaacgctgc aaaactcag tttttaaag aagtgtcag acatg 45
 <210> 31
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 31
 ccttgaggag catattcg 18
 <210> 32
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 65 <400> 32
 gacatcttt tctctggcg 20

<210> 33
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 33
 ccttcttta caggcttagc tggttttca aagaacaac caaagaagtg g 51
 <210> 34
 10 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 15 <400> 34
 ggaatttcag tacggataaa atgccgtttt attatcaaac gttgctgtgt agc 53
 <210> 35
 <211> 19
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 35
 cagtcaataa attcccagc 19
 25 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 36
 catcgattta tatcgcaat 20
 <210> 37
 <211> 19
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 37
 40 taatgctaag ttcattgtg 19
 <210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 38
 ataactact gtttgagatg 20
 <210> 39
 50 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 55 <400> 39
 tcaaaccacc caacaaatg 19
 <210> 40
 <211> 17
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de cebadores
 <400> 40
 aaccggcggg actaaat 17
 65 <210> 41
 <211> 50

ES 2 589 079 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia de cebadores
5 <400> 41
ccttcttta caggcttagc tggtttgga agctgggaat ttattgagtg 50
<210> 42
<211> 54
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia de cebadores
<400> 42
ggaatttcag tacggataaa atgccgtttt gcgcatataa atcgaagtca ttg 54
15 <210> 43
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
20 <223> Secuencia de cebadores
<400> 43
agttccgccg gtttg 15
<210> 44
<211> 19
25 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Secuencia de cebadores
<400> 44
30 acatttggtg ggtgggttg 19

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un método para sintetizar a un ácido polinucleico donde dicho método comprende los pasos de
 - a) Suministrar a una plantilla objetivo que comprende de por lo menos una primera y una 2ª regiones de enlace de cebadores recíprocos;
 - b) Suministrar a un primer cebador que tiene a un primer y 2º segmentos, donde el primer segmento es sustancialmente complementario a la primera región de enlace de cebadores recíprocos en la plantilla y el 2º segmento tiene una secuencia que es sustancialmente complementaria a otra región en el primer cebador o a una región en el amplicón generado a partir del primer segmento del primer cebador de tal forma que el 2º segmento es capaz de formar un bucle, donde, cuando el primer cebador comprende a un 2º segmento que es sustancialmente complementario a una región en el amplicón generado a partir del primer segmento del primer cebador, la primera región de enlace de cebadores recíprocos también abarca a la región en la plantilla que es sustancialmente idéntica al 2º segmento del primer cebador;
 - c) Suministrar un 2º cebador que comprende a un primer y opcionalmente a un 2º segmentos, donde el primer segmento es sustancialmente complementario a la 2ª región de enlace de cebadores recíprocos en la plantilla y el 2º segmento opcional comprende a una secuencia que es sustancialmente complementaria a otra región en el 2º cebador o a una región en el amplicón generado a partir del primer segmento del 2º cebador de tal forma que la 2ª región está disponible para formar a un bucle, donde, cuando el 2º cebador comprende a un 2º segmento que es sustancialmente complementario a una región en el amplicón generado a partir del primer segmento del 2º cebador, la 2ª región de enlace de cebadores recíprocos también abarca a la región en la plantilla que es sustancialmente idéntica al 2º segmento del 2º cebador;
 - d) Suministrar por lo menos un cebador madre que sea capaz de enlazarse a la región entre la primera y la 2ª regiones de enlace de cebadores recíprocos, donde dichas cebador es
 - (i) Un cebador simple, que es complementario a un lugar de enlace de cebadores en un ácido polinucleico y que contiene menos de 5 nucleótidos 3' o 5' de la región de cebadores que es sustancialmente complementario al lugar de enlaces de cebadores;
 - (ii) Un cebador que forma bucles, que comprende a un primer y a un 2º segmentos, donde el primer segmento es sustancialmente complementario a una región de enlace de cebadores en la plantilla y el 2º segmento comprende a una secuencia que es sustancialmente complementaria a una región en el amplicón generado a partir del primer segmento del primer cebador de tal forma que el 2º segmento puede formar a un bucle;
 - (iii) Un cebador tipo horquilla, que es un cebador que comprende a un primer y a un 2º segmentos, donde el primer segmento es sustancialmente complementario a una región de enlace de cebadores en una plantilla y el 2º segmento comprende a una secuencia que es sustancialmente complementaria a otra región en el cebador;
 - (iv) Un cebador suministrador de bucles, que es un cebador tipo horquilla en el cual las repeticiones invertidas son separadas por una región enlazadora; o
 - (v) Un cebador quimérico;
 - e) Suministrar los reactivos y condiciones necesarias para realizar la síntesis del ácido polinucleico;
 - f) Realizar la síntesis del ácido polinucleico.
2. El método de la reivindicación 1, donde la síntesis es realizada utilizando a una técnica de amplificación de ácidos nucleicos seleccionada de un grupo que consiste de la Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles (LAMP - Loop-mediated Isothermal Amplification), la Amplificación de Re-cebado de Plantillas (TRA - Template Re-priming Amplification), la Amplificación de Auto Extensiones (SEA - Self Extending Amplification) y el Proceso de Amplificación Inteligente (SMAP - SMart Amplification Process).

- 5
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde las regiones de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante y/o en reversa comprende a lugares de enlace para 2 o más cebadores, y opcionalmente, por el cual los 2 o más lugares de enlace están situados en la misma hebra de la plantilla objetivo y/o del amplicón, o están situados en diferentes hebras de la plantilla objetivo y/o del amplicón.
- 10
4. El método de la reivindicación 3 donde los 2 o más cebadores que se enlazan a las regiones de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante y/o en reversa son:
- (a) Del mismo tipo, donde opcionalmente los 2 o más cebadores son cebadores que forman bucles; o
- (b) De diferente tipo.
- 15
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde:
- (a) Los cebadores que se enlazan a las regiones de enlace de cebadores recíprocos hacia adelante y/o en reversa son cebadores que suministran bucles (LPPs - loop-providing primers); y/o
- 20
- (b) Los lugares de enlace de cebadores hacia adelante y en reversa están ubicados a una distancia tal que la síntesis de un ácido polinucleico puede ocurrir únicamente en la presencia de los cebadores madre.
- 25
6. El método de la reivindicación 5 (b), donde el método es utilizado para detectar *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina (MRSA - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) en una muestra, por ejemplo, donde el MRSA es detectado utilizando a un gen *mecA* y a la secuencia *orfX*.
- 30
7. El método de las reivindicaciones 1-6, donde en el paso (d):
- (i) Un sólo cebador madre es utilizado, o
- (ii) 2 o más cebadores madre son utilizados los cuales opcionalmente son del mismo tipo o son de diferente tipo.
- 35
8. El método de la reivindicación 7 (ii) donde los 2 o más cebadores madre son utilizados en el paso (d) y se enlazan con hebras recíprocas del amplicón o a la misma hebra del amplicón.
- 40
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde los cebadores madre:
- (a) Contienen bases modificadas, por ejemplo, bases modificadas que son seleccionados de un grupo que consiste de N4-metilcitosina, inosina, ribonucleótidos, bases fluorescentes, bases que pueden foto-lisarse y bases universales; y/o
- 45
- (b) Contienen ácidos nucleicos que han sido marcados con una partícula detectable, por ejemplo, una marcación fluorescente, una marcación quimioluminiscente o una marcación electroquímica; y/o
- 50
- (c) Contienen ácidos nucleicos que han sido marcados con una partícula de captura, por ejemplo, biotina; y/o
- (d) Son cebadores que contienen un lugar de nickasa.
- 55
10. El método de la reivindicación 9 (b), donde los cebadores madre marcados son utilizados como sondas en un sistema reportador fluorescente, quimioluminiscente o electroquímico.
- 60
11. El método de las reivindicaciones 1-10 donde:
- (a) La amplificación del ácido polinucleico es detectada mediante un método seleccionado de un grupo que consiste de formaciones genéticas, tiras de flujos laterales, electroforesis, espectroscopías de masa y detección acústica; o
- (b) La síntesis del ácido nucleico es detectada utilizando mediciones en tiempo real o mediciones al final del proceso.
- 65
12. El método de la reivindicación 11 (b) donde la amplificación del ácido polinucleico es detectada con un

sistema de detección seleccionado de un grupo que consiste de mediciones de fluorescencia, bioluminiscencia, turbidez o mediciones electroquímicas, por ejemplo, cuando la síntesis del ácido nucleico es detectada utilizando un sistema reportador de Ensayos Bioluminiscentes en Tiempo Real (BART - Bioluminescent Assay in Real-Time).

5

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores:

(a) Donde el método es realizado en un contenedor sellado; o

10

(b) Para determinar la presencia de una secuencia de ácidos polinucleicos específica en el código genético de un organismo; o

15

(c) Para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs - single-nucleotide polymorphisms);

(d) Para su uso en aplicaciones de diagnóstico; o

20

(e) Para su uso en la detección o cuantificación de un organismo en una muestra; o

(f) Para identificar vegetales modificados genéticamente, para identificar animales modificados genéticamente, para detectar a un estado de enfermedad, para predecir una reacción adversa causada por terapias o para predecir una susceptibilidad a un estado de enfermedad.

25

14. El método de la reivindicación 13 (d), donde el organismo es:

(a) Un microorganismo; y/o

30

(b) Un microorganismo seleccionado de un grupo que consiste de virus, bacterias, micoplasmas y hongos; y/o

(c) Donde el microorganismo es opcionalmente un organismo modificado genéticamente (GMO - genetically modified organism).

35

15. El uso de un botiquín realizando el método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el botiquín comprende a por lo menos un cebador madre y donde el botiquín comprende opcionalmente además a una luciferasa termoestable, luciferina y una enzima que convierte al pirofosfato inorgánico (PPi - inorganic pyrophosphate) a ATP y cualquier otro sustrato o cofactor requerido de la enzima que convierte al pirofosfato inorgánico (PPi - inorganic pyrophosphate) a ATP.

40

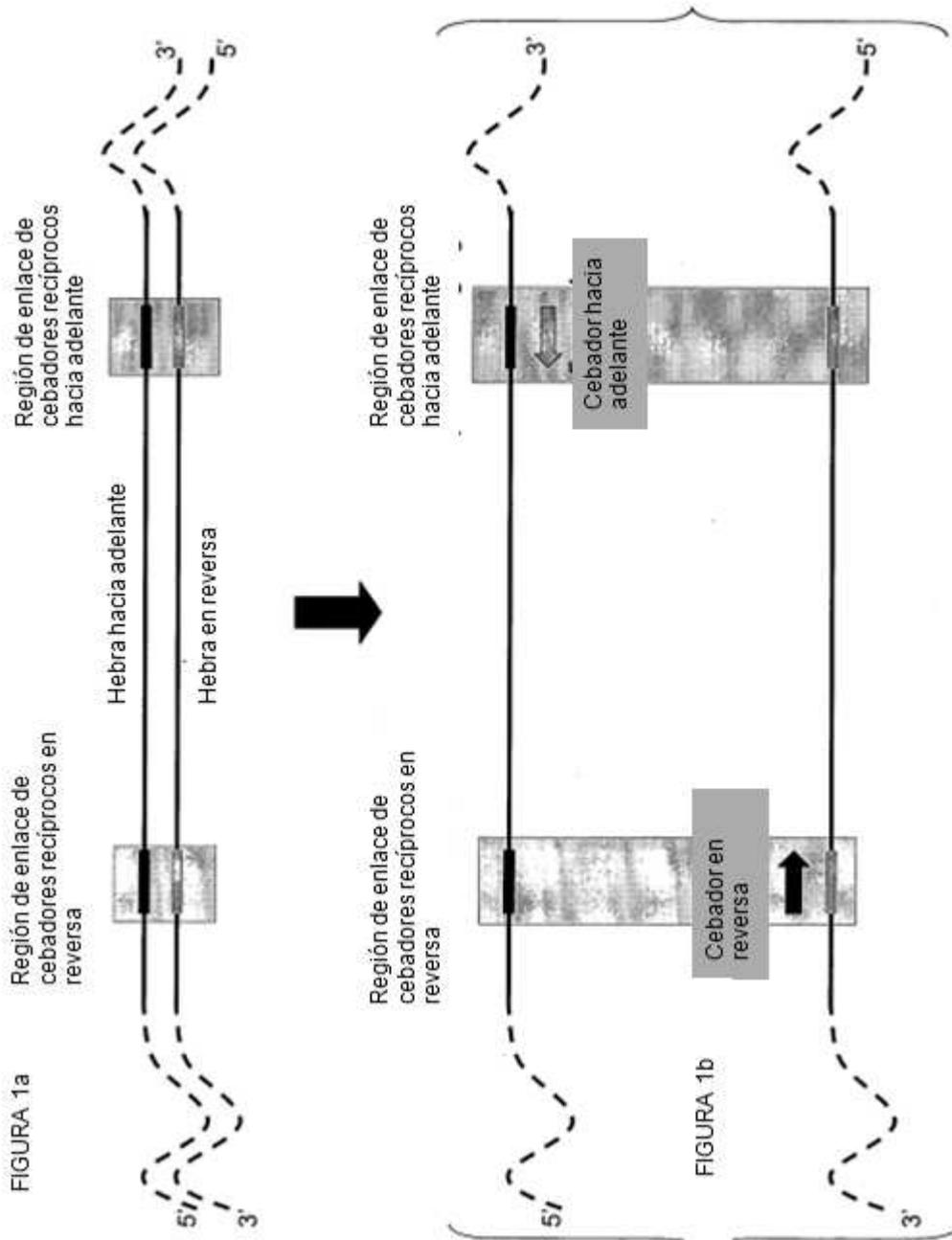
45

50

55

60

65



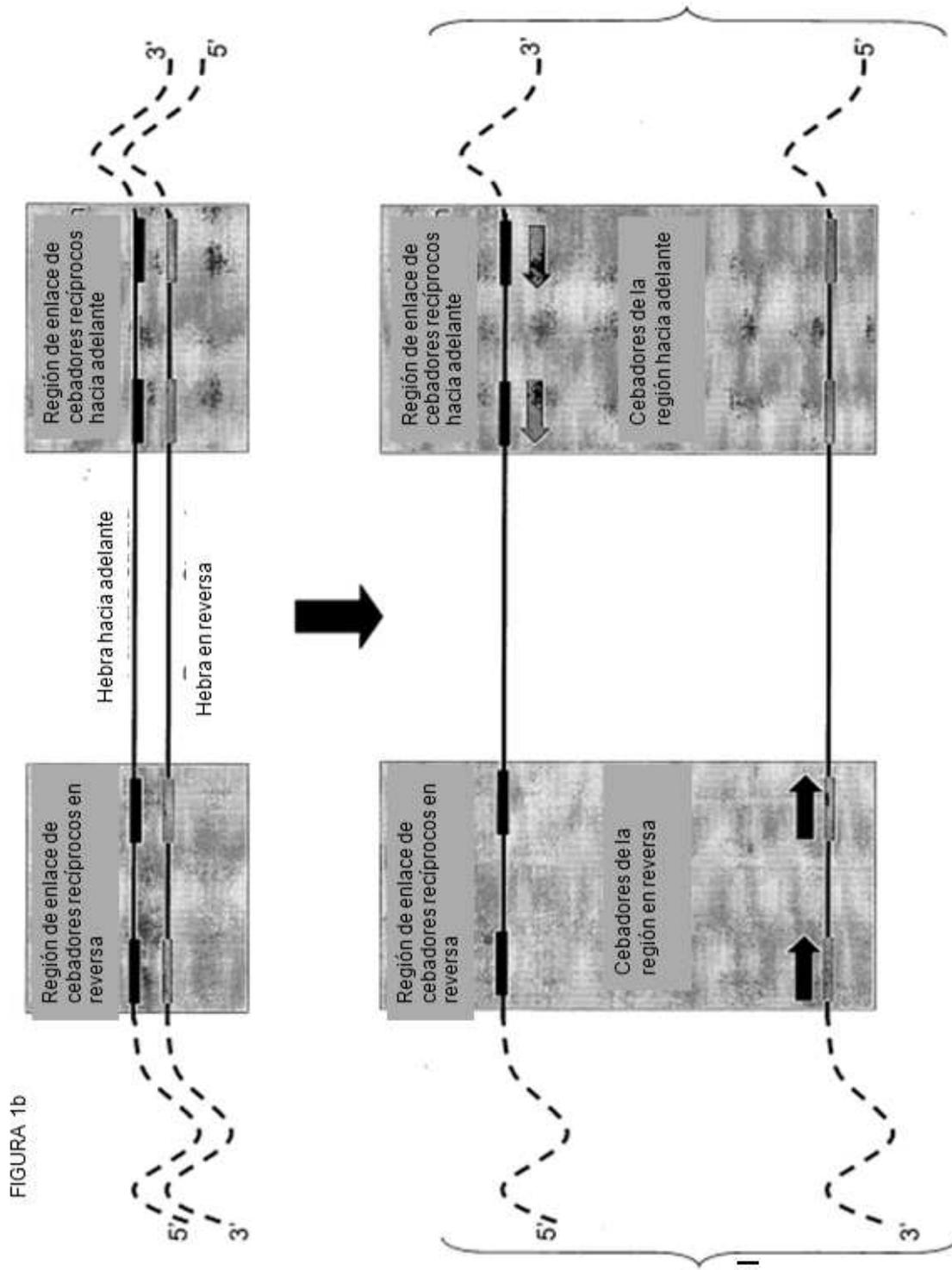


FIGURA 1c

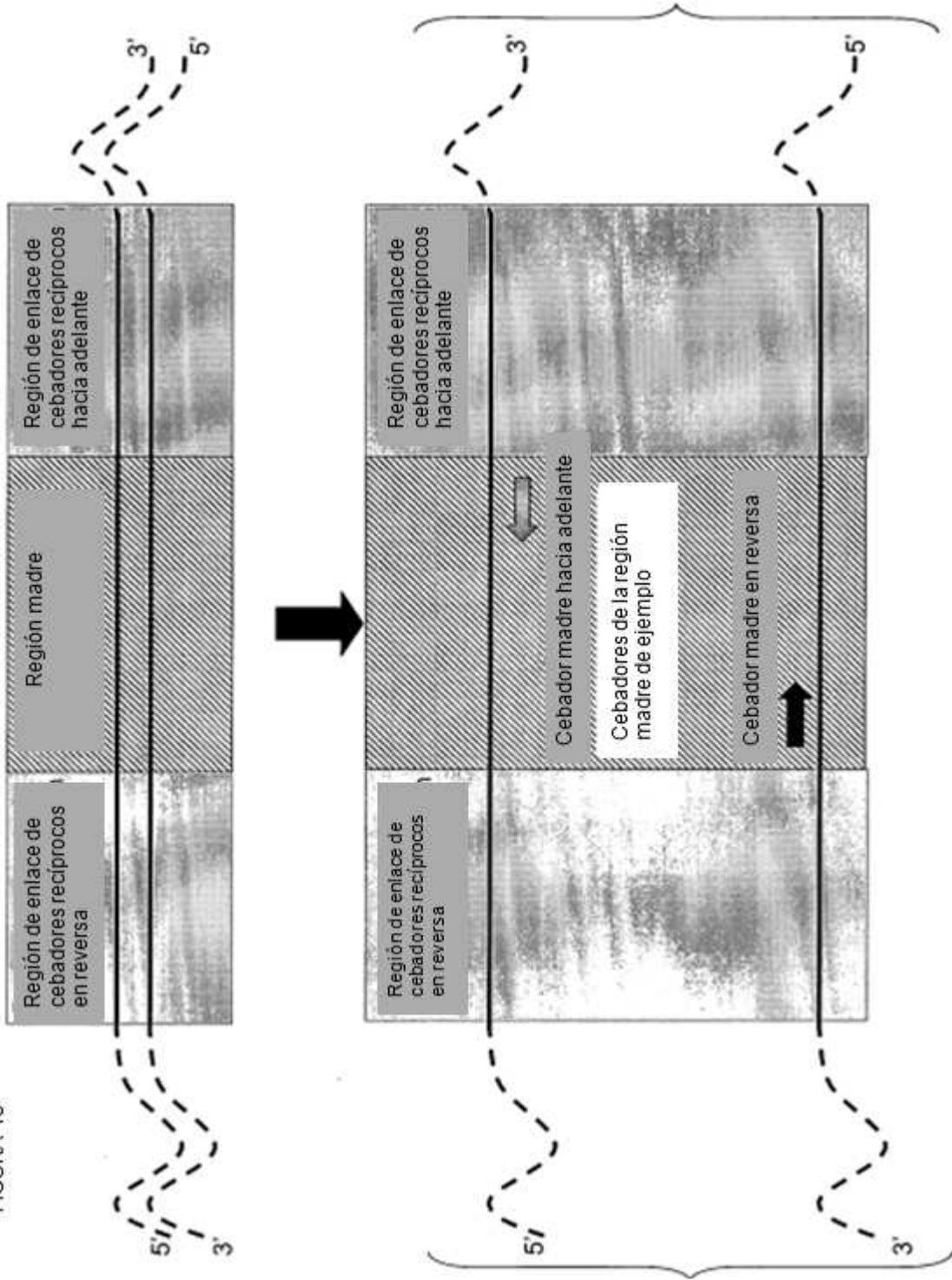
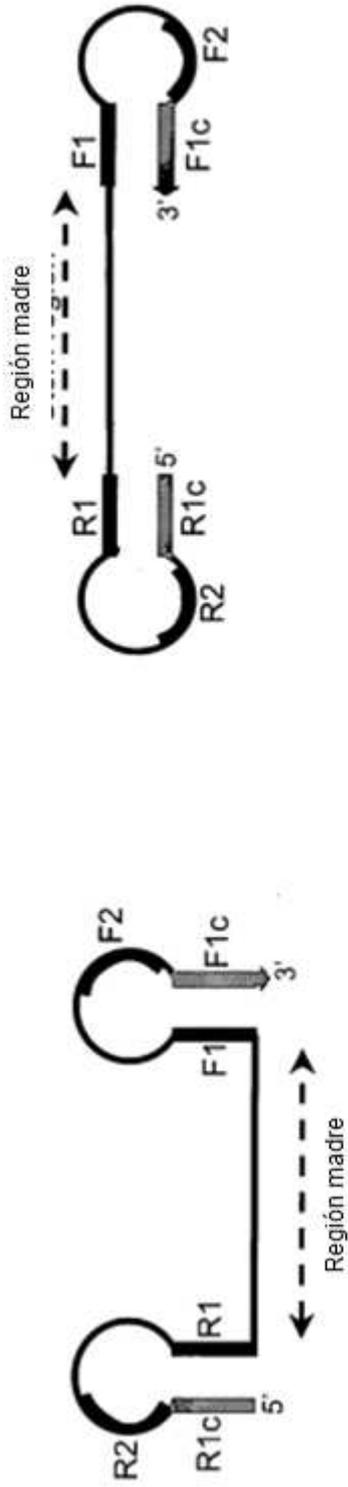


FIGURA 1d



(i) TRA

(ii) LAMP

FIGURA 1e

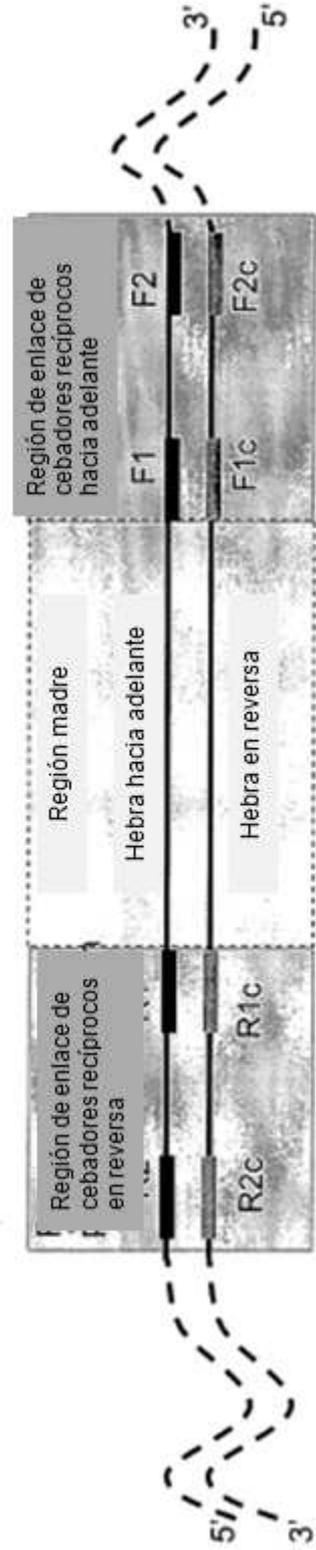
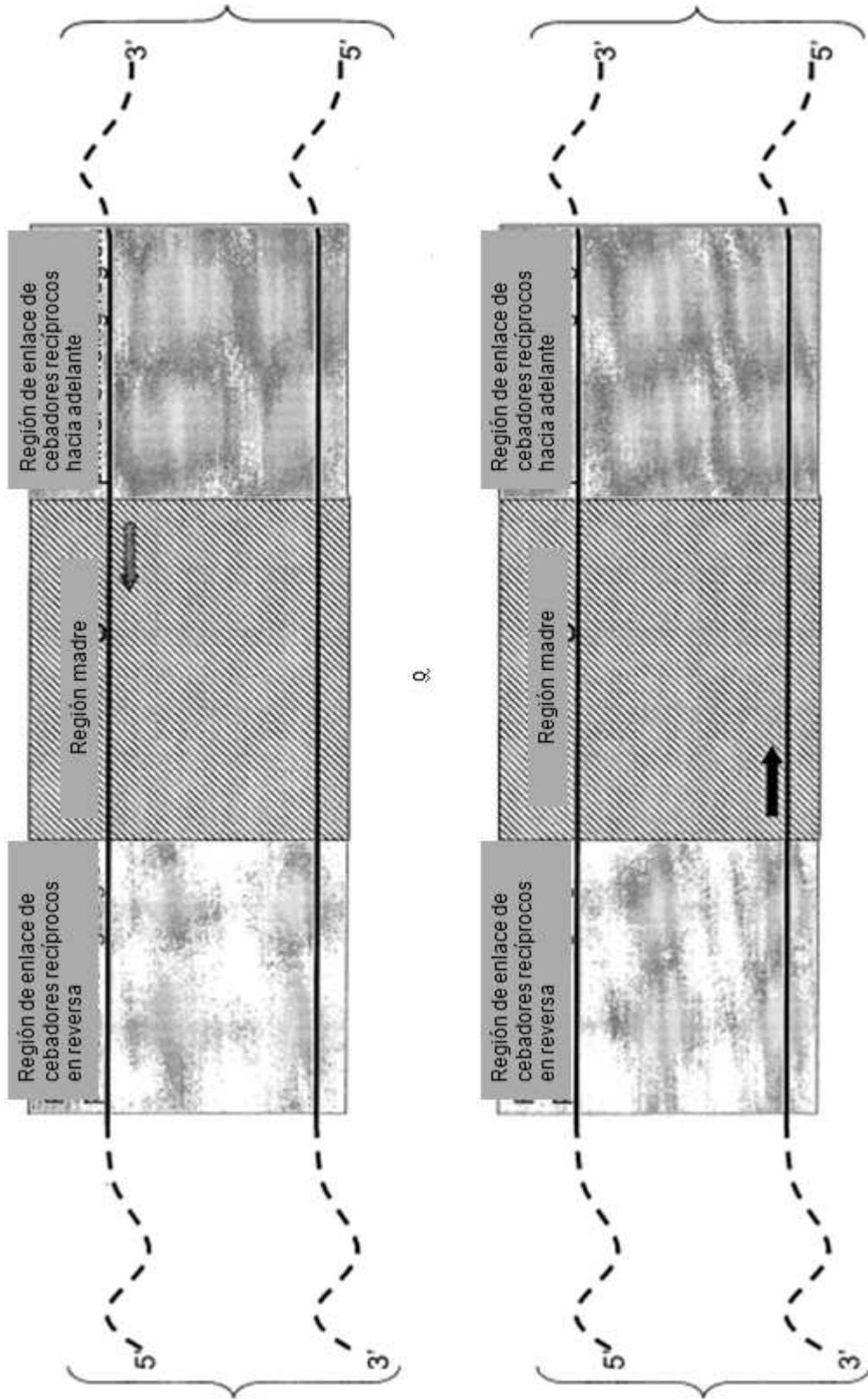


FIGURA 2a



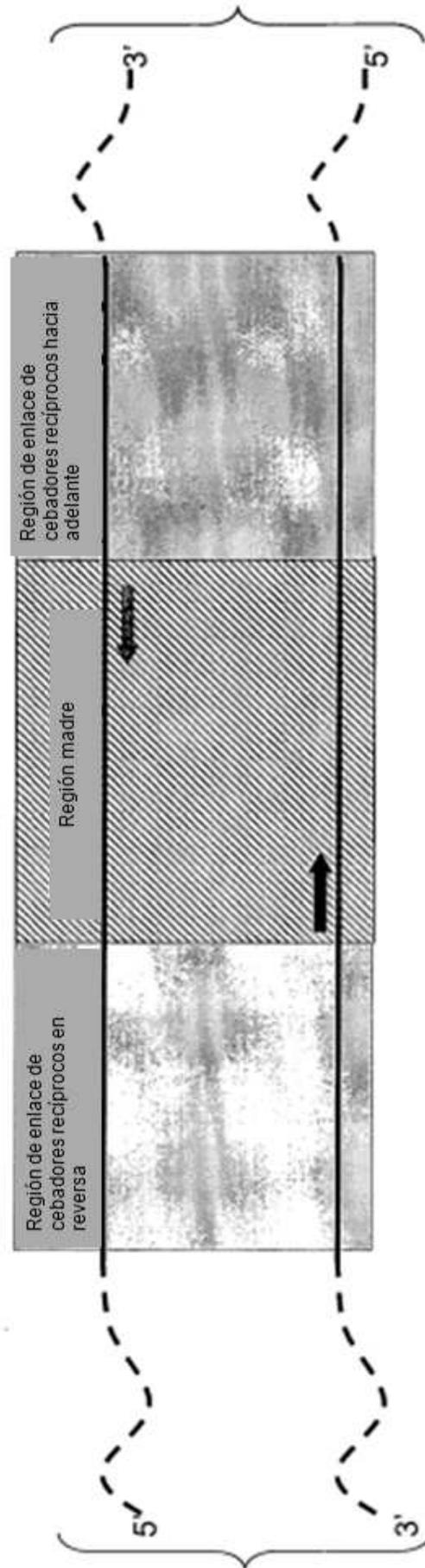


FIGURA 2b

FIGURA 2c

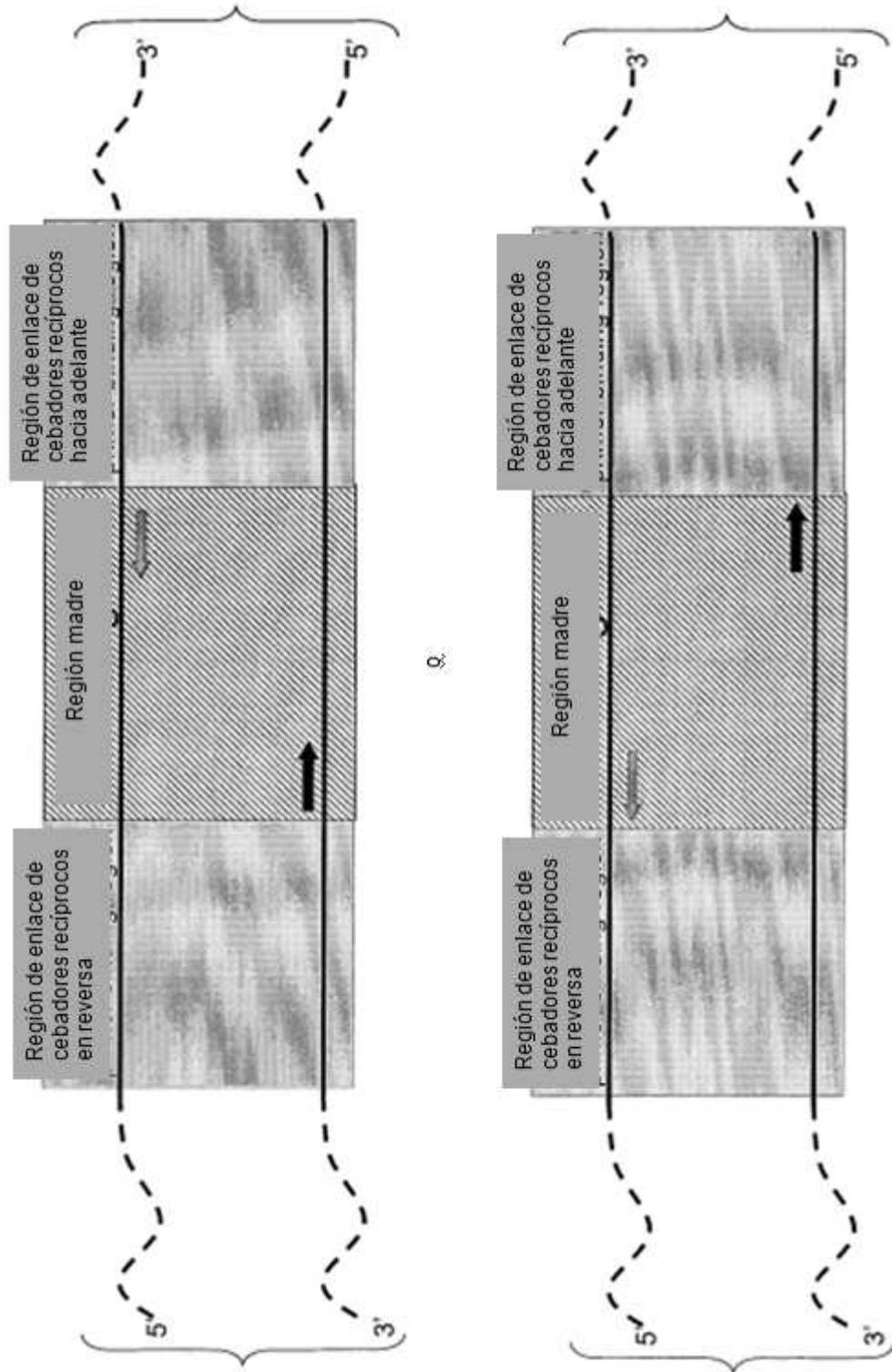


FIGURA 2d

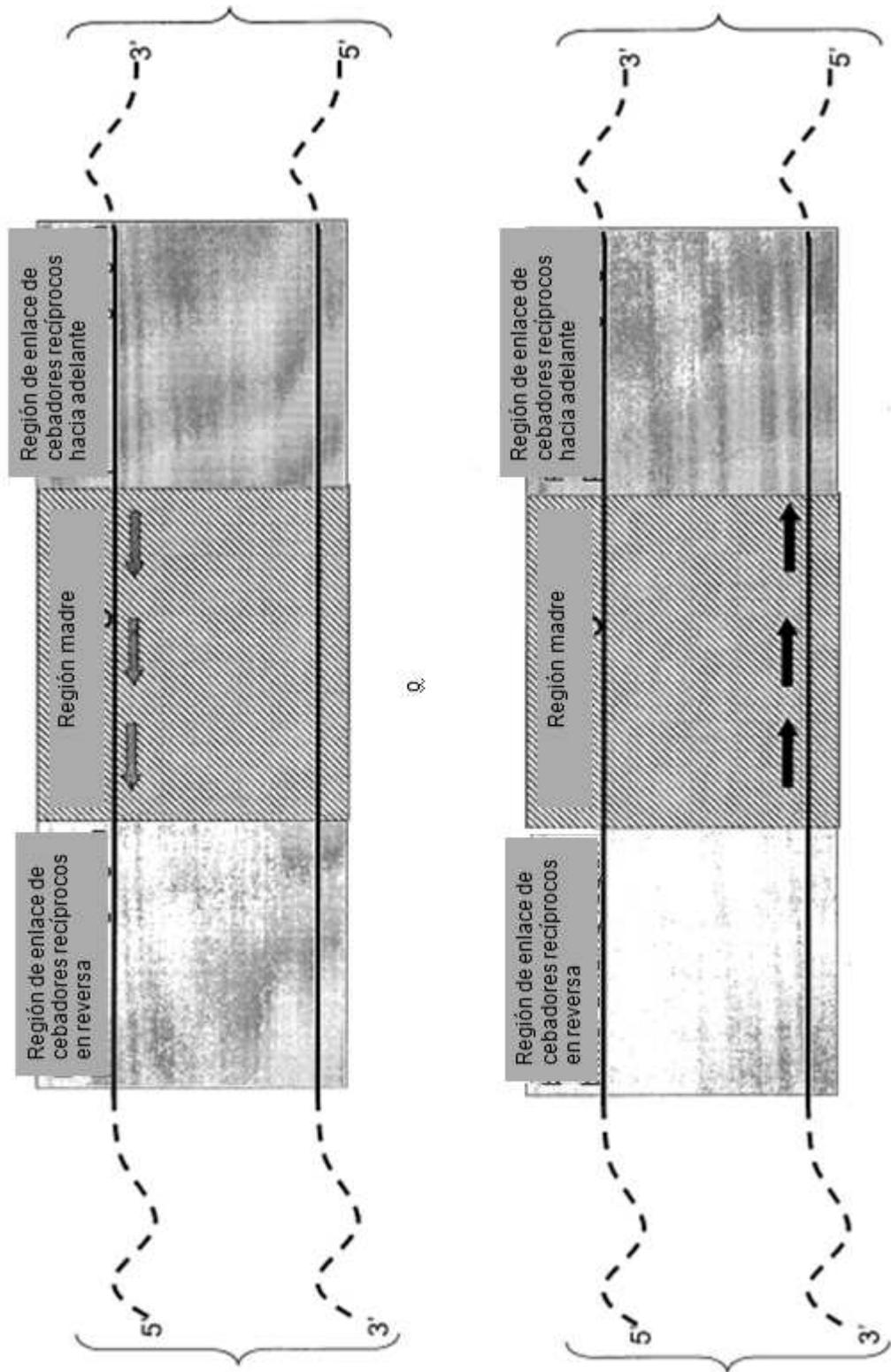


FIGURA 2e

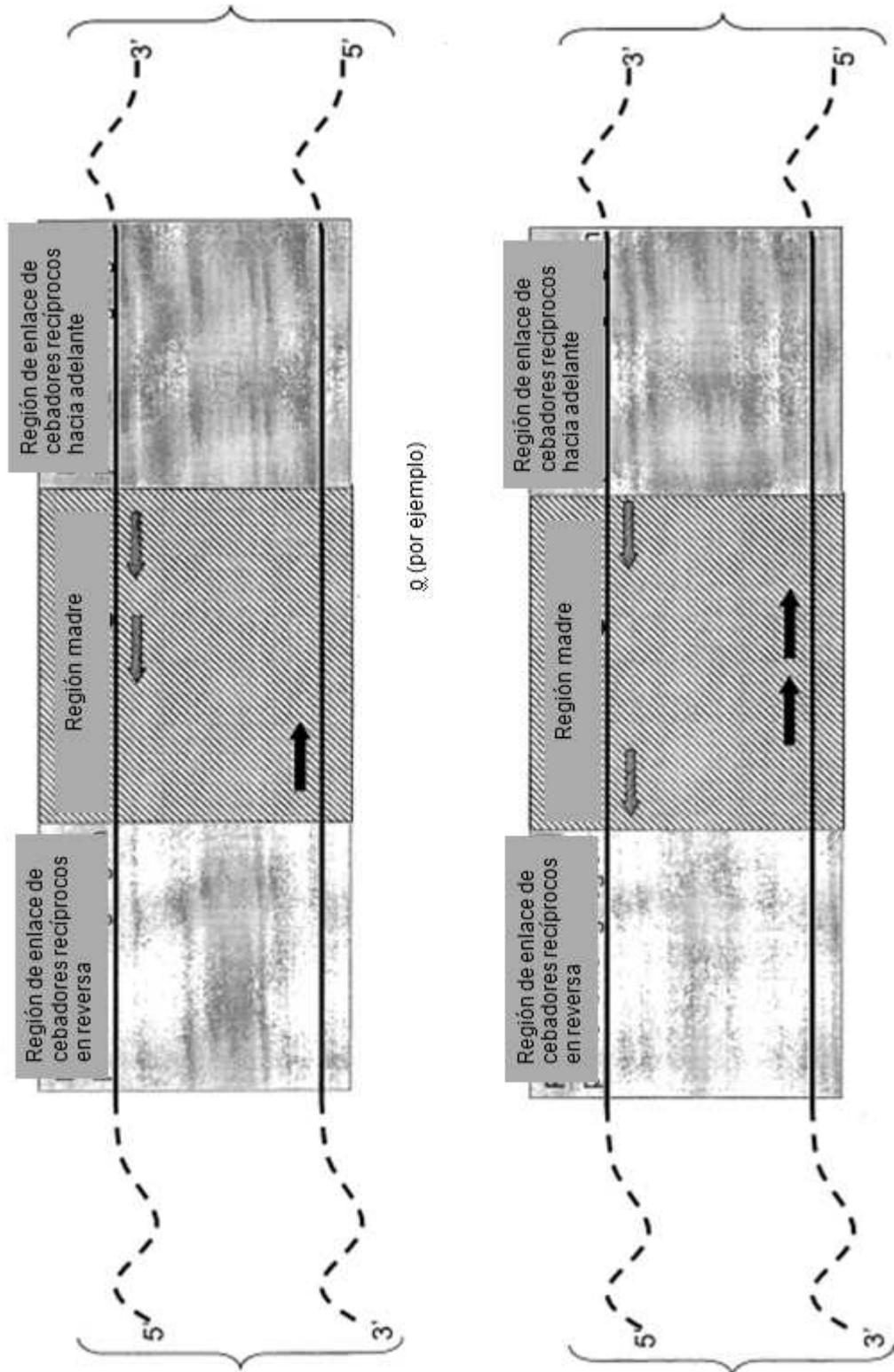


FIGURA 3a

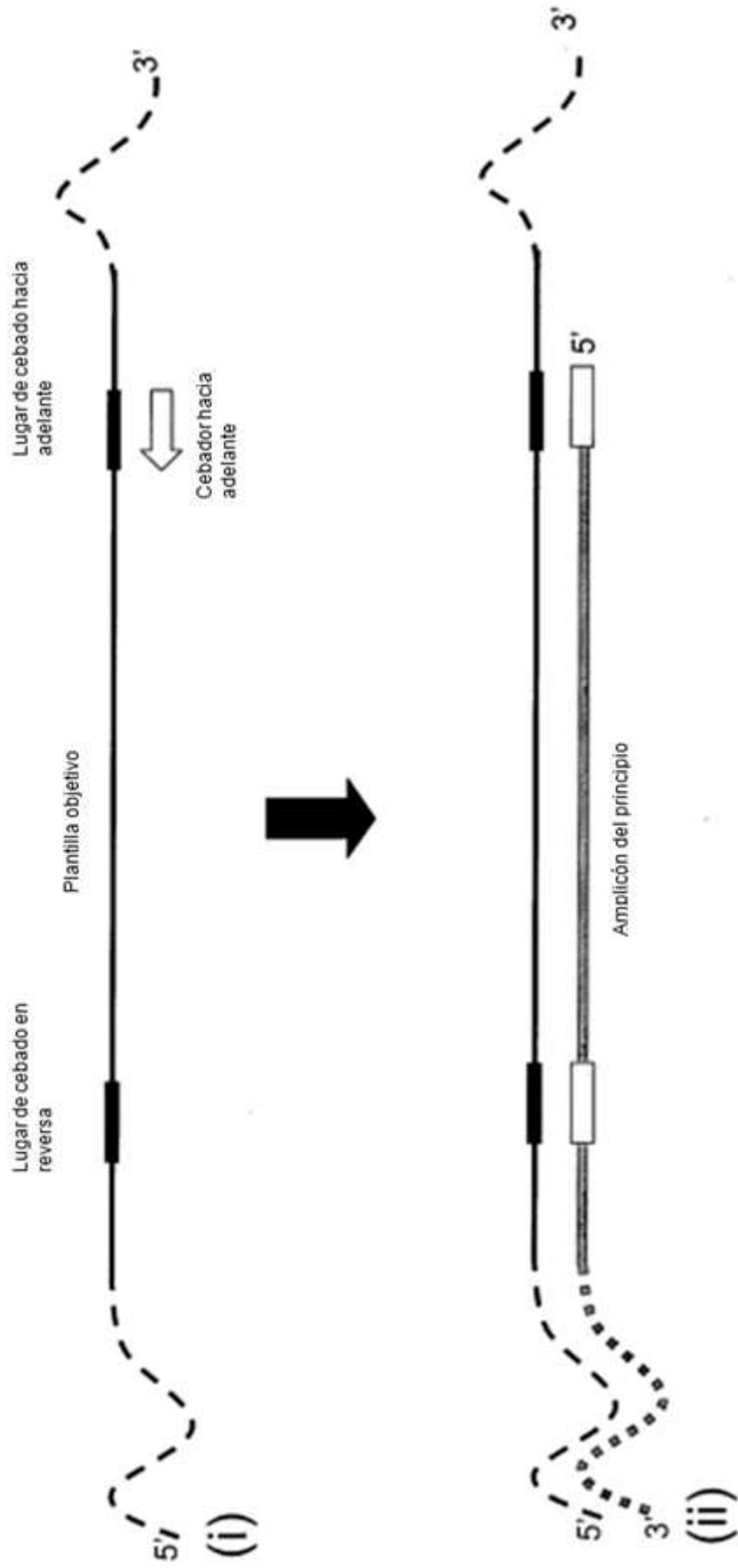


FIGURA 3b

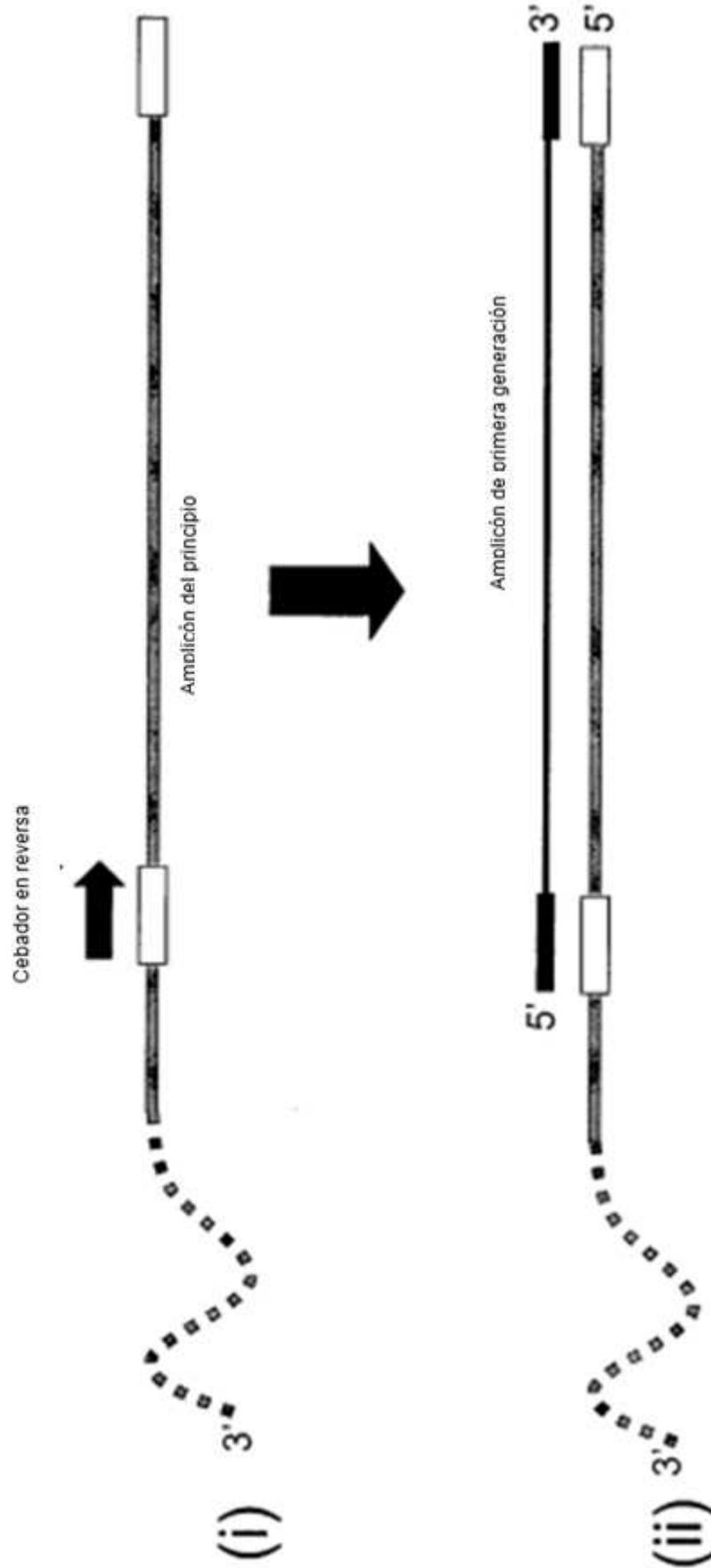


FIGURA 3c

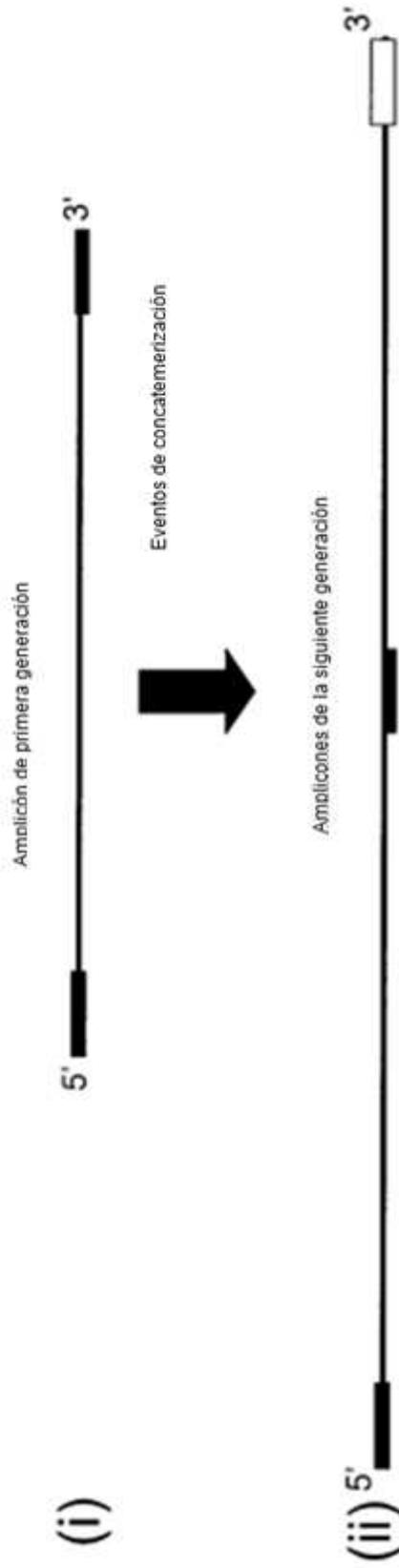


FIGURA 4a

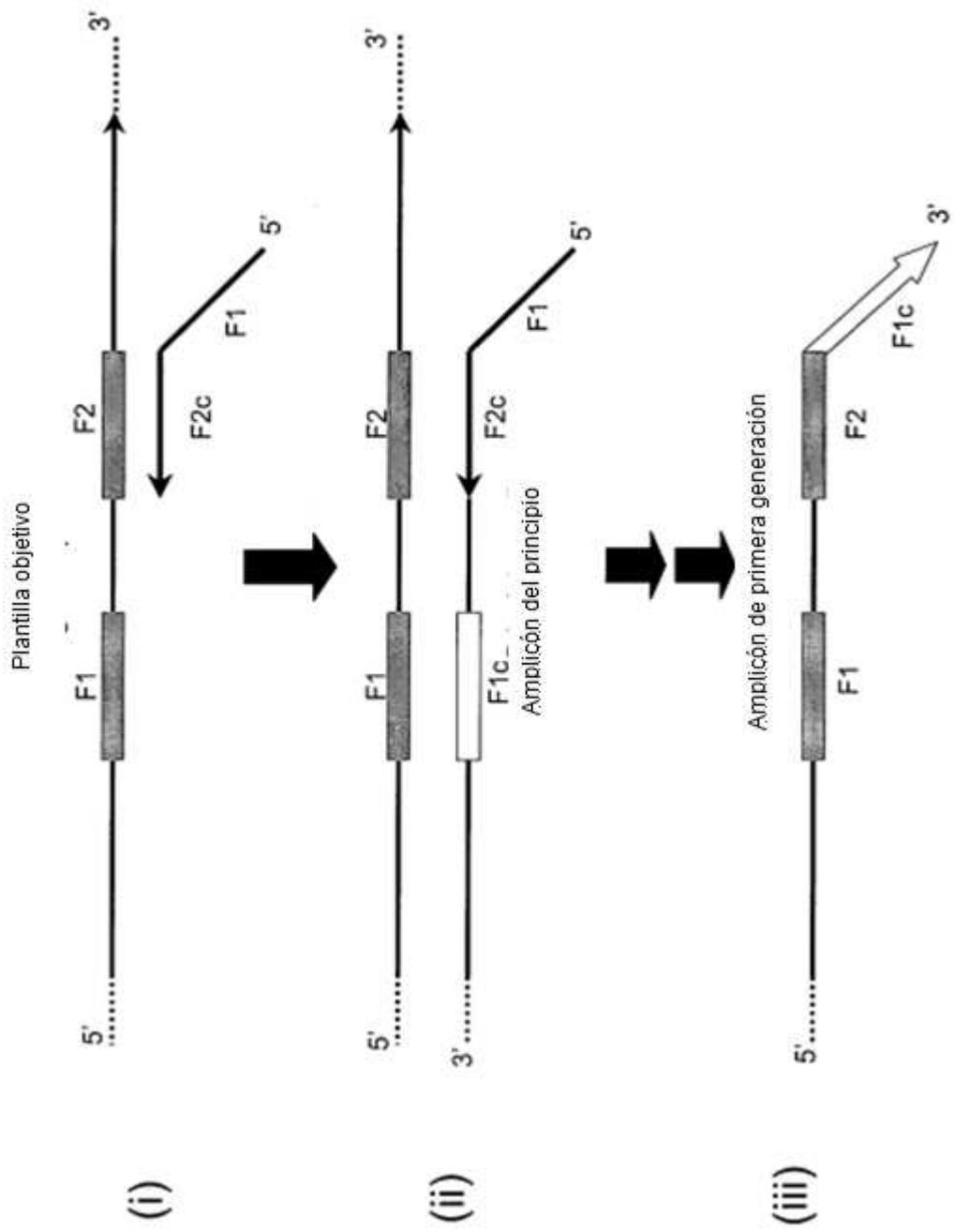


FIGURA 4b

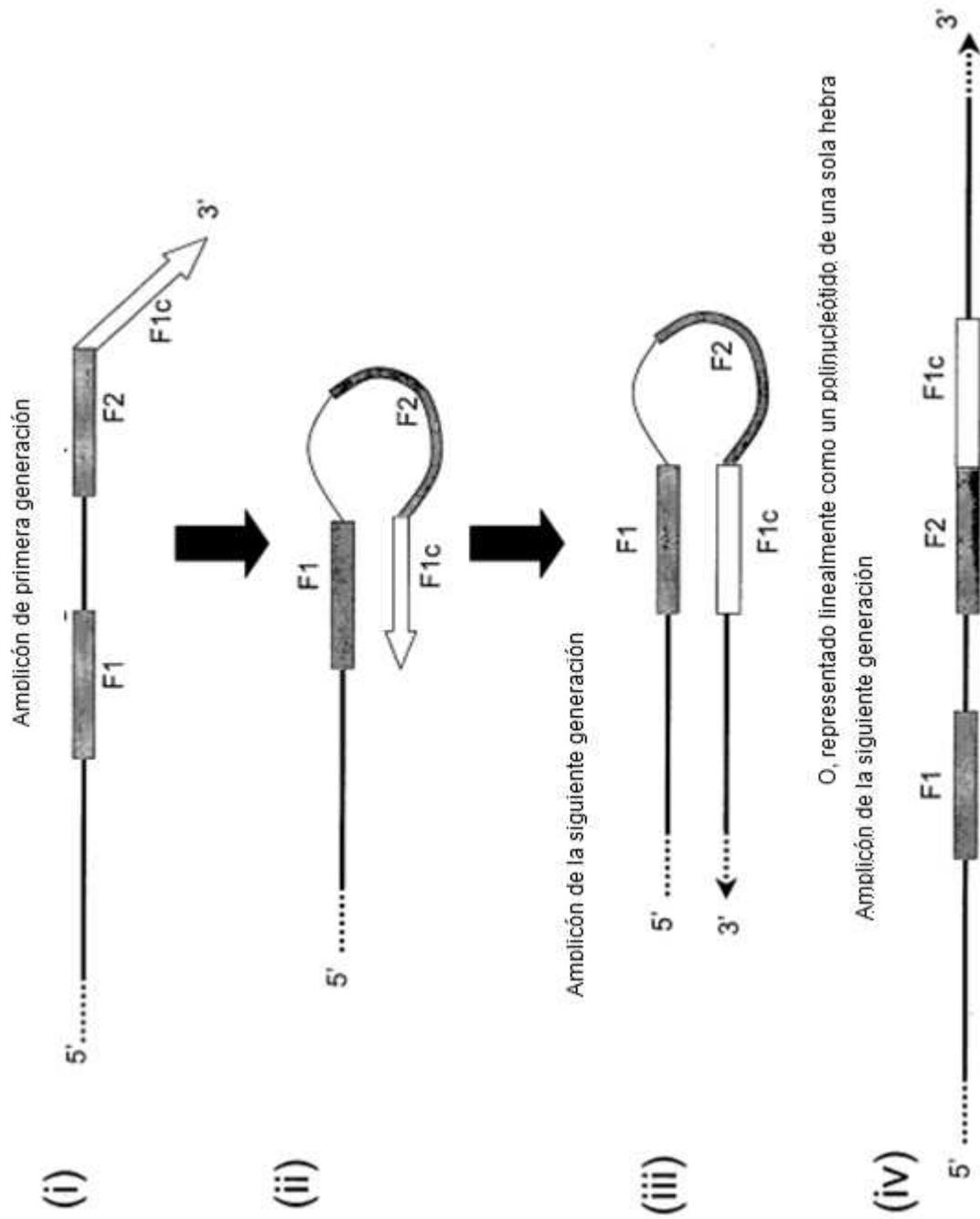


FIGURA 4c

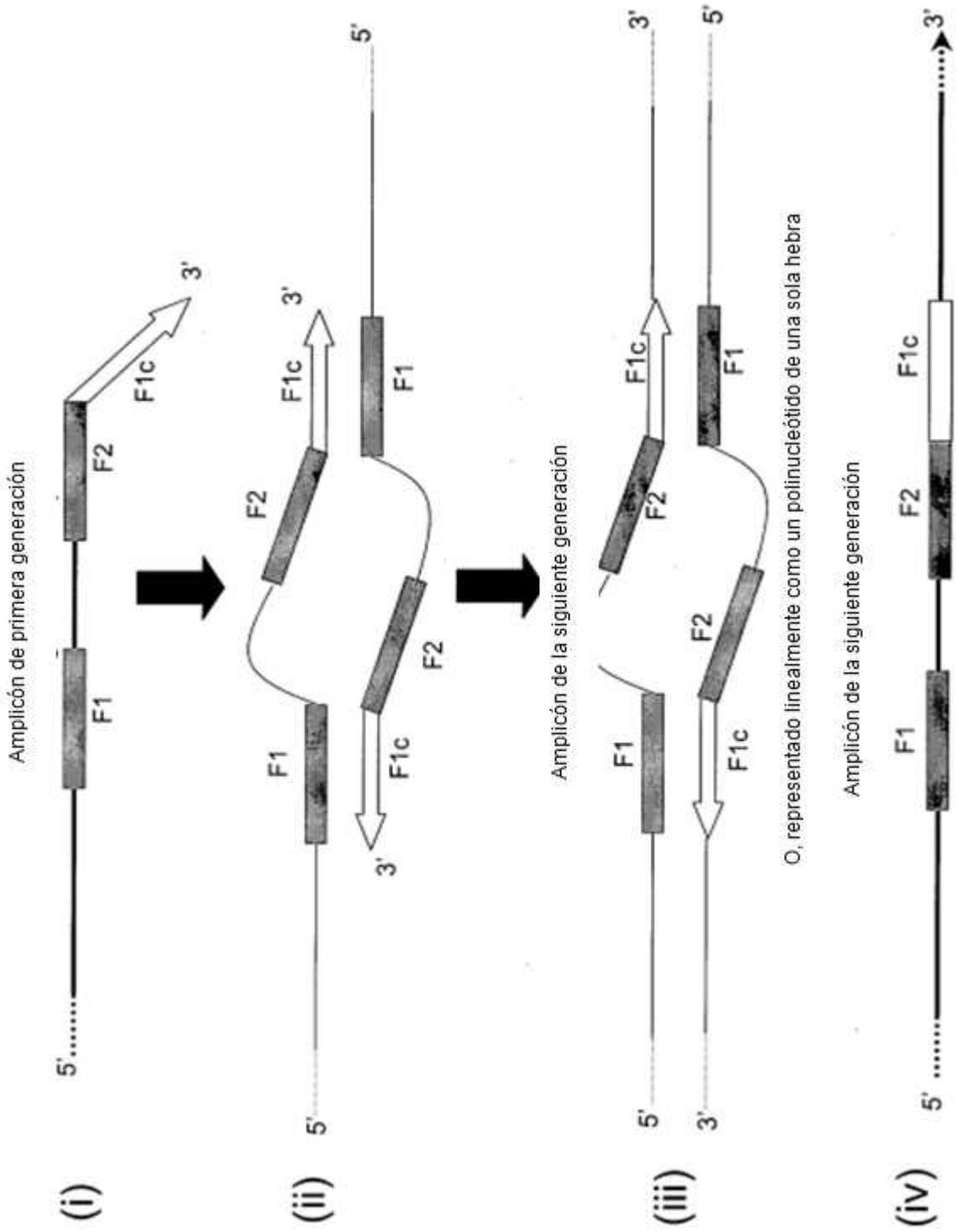


FIGURA 5a

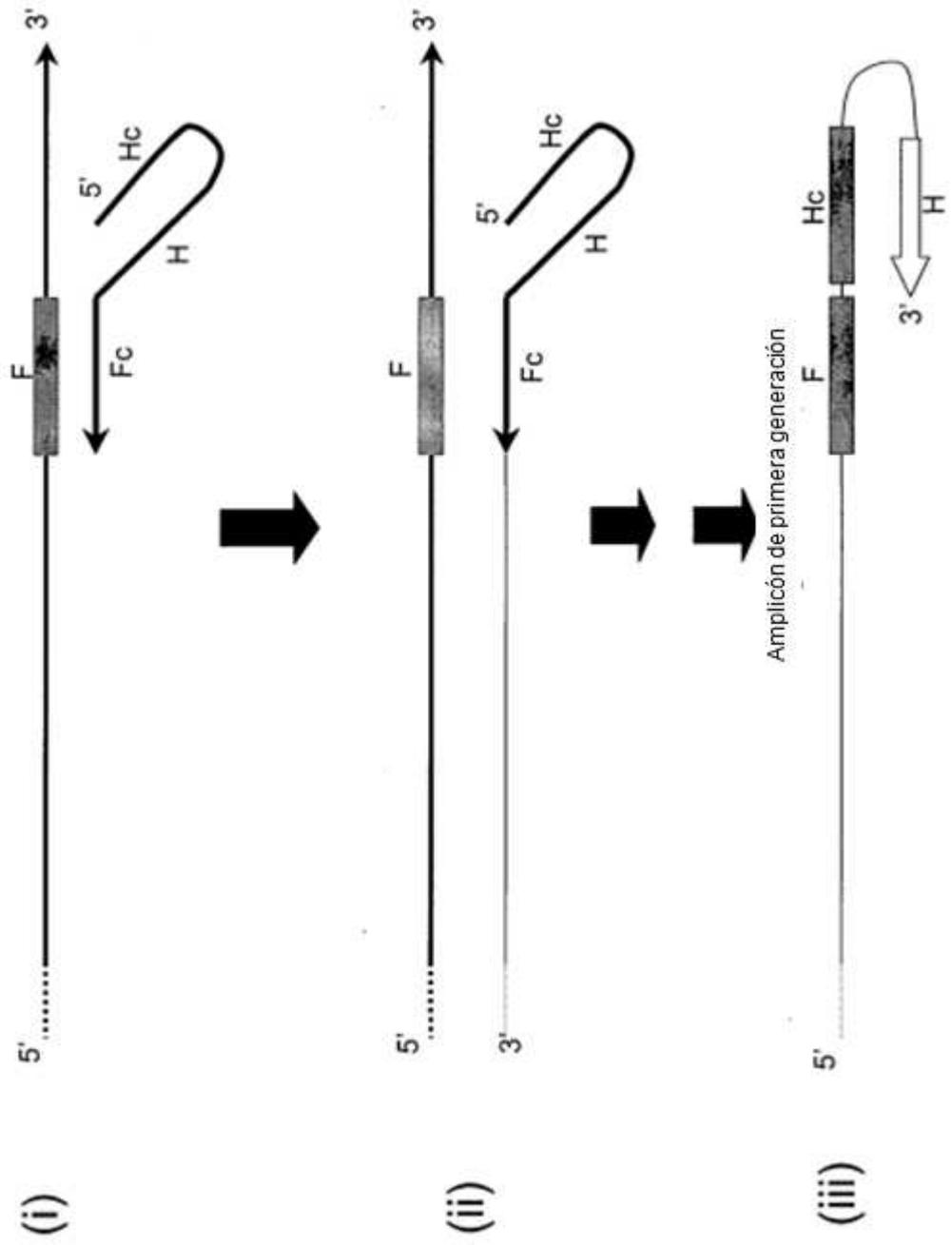


FIGURA 5b

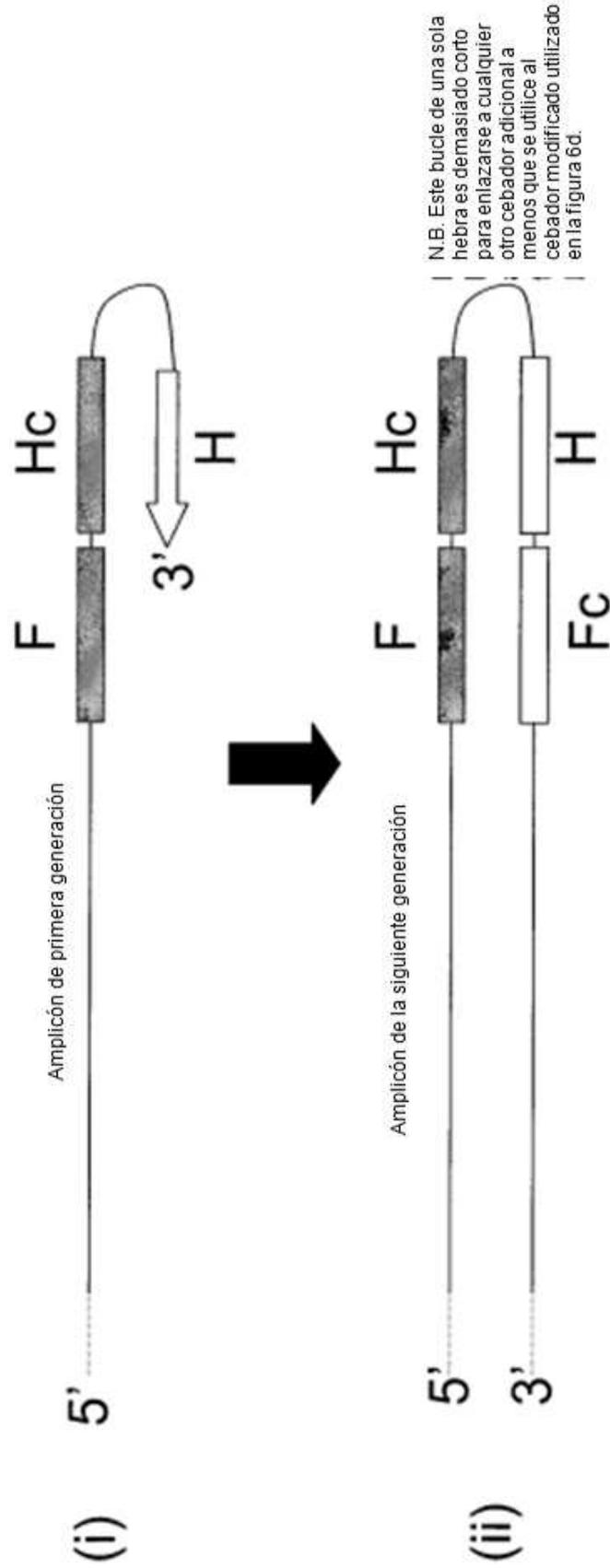


FIGURA 5c

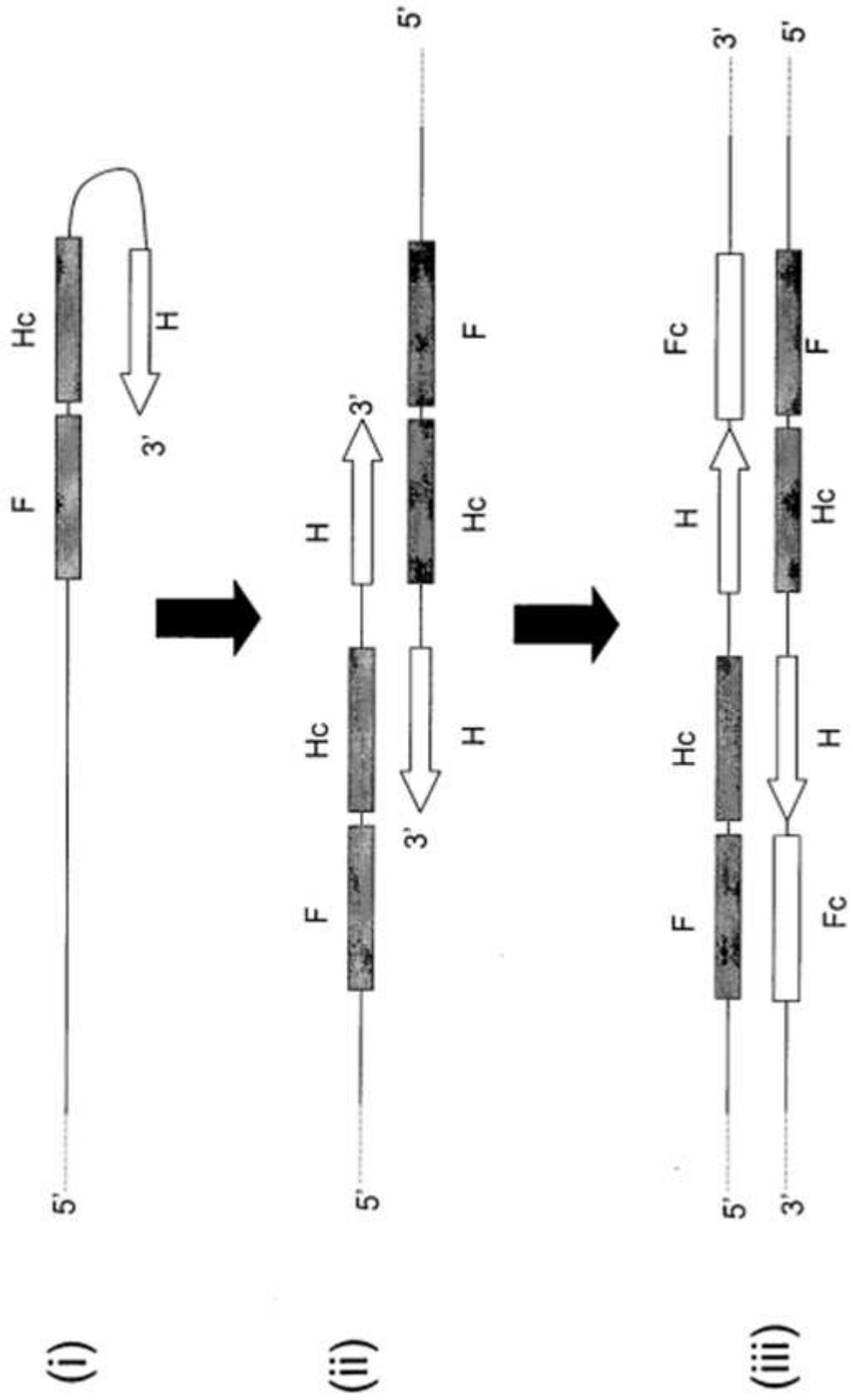


FIGURA 6

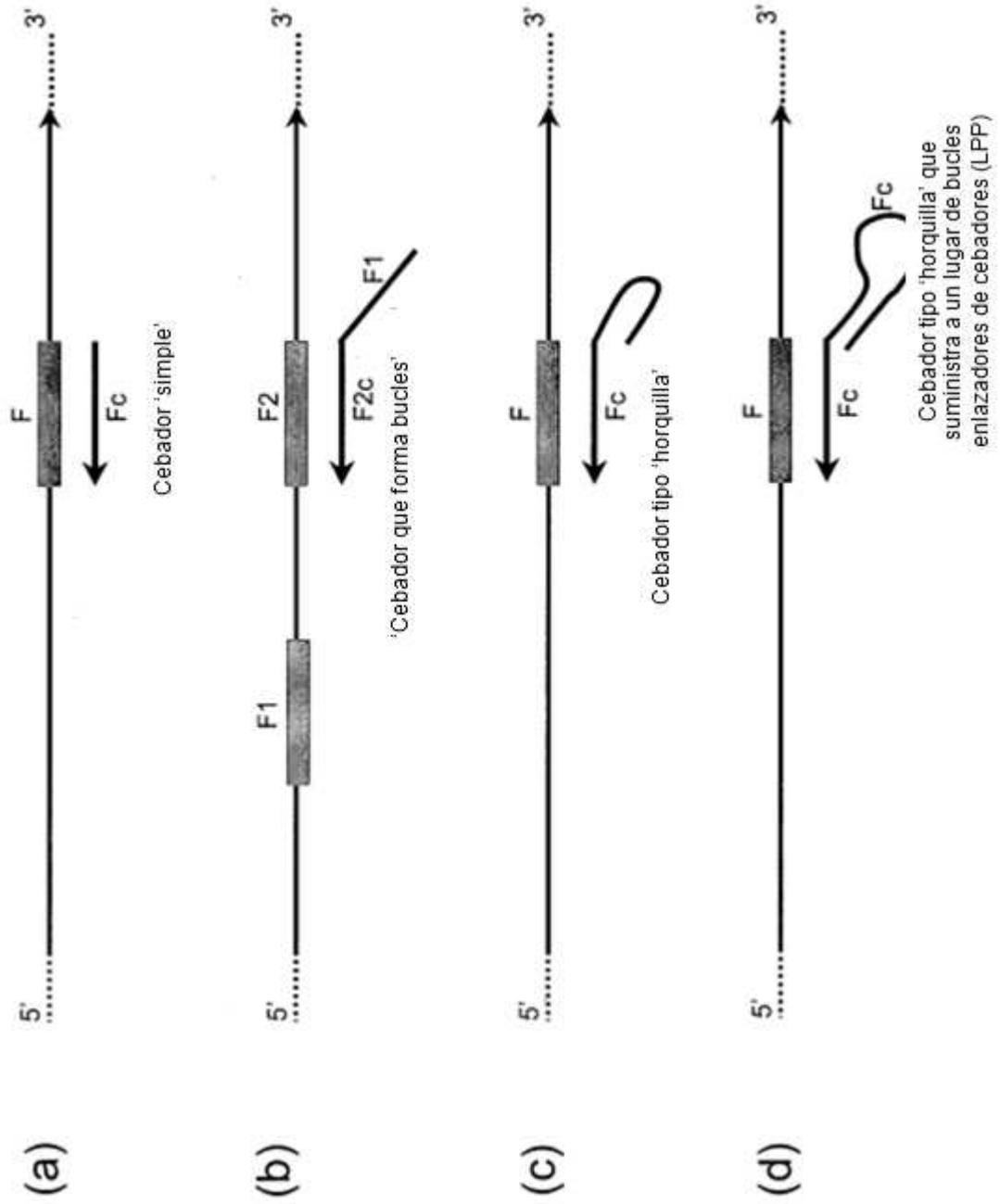


FIGURA 7

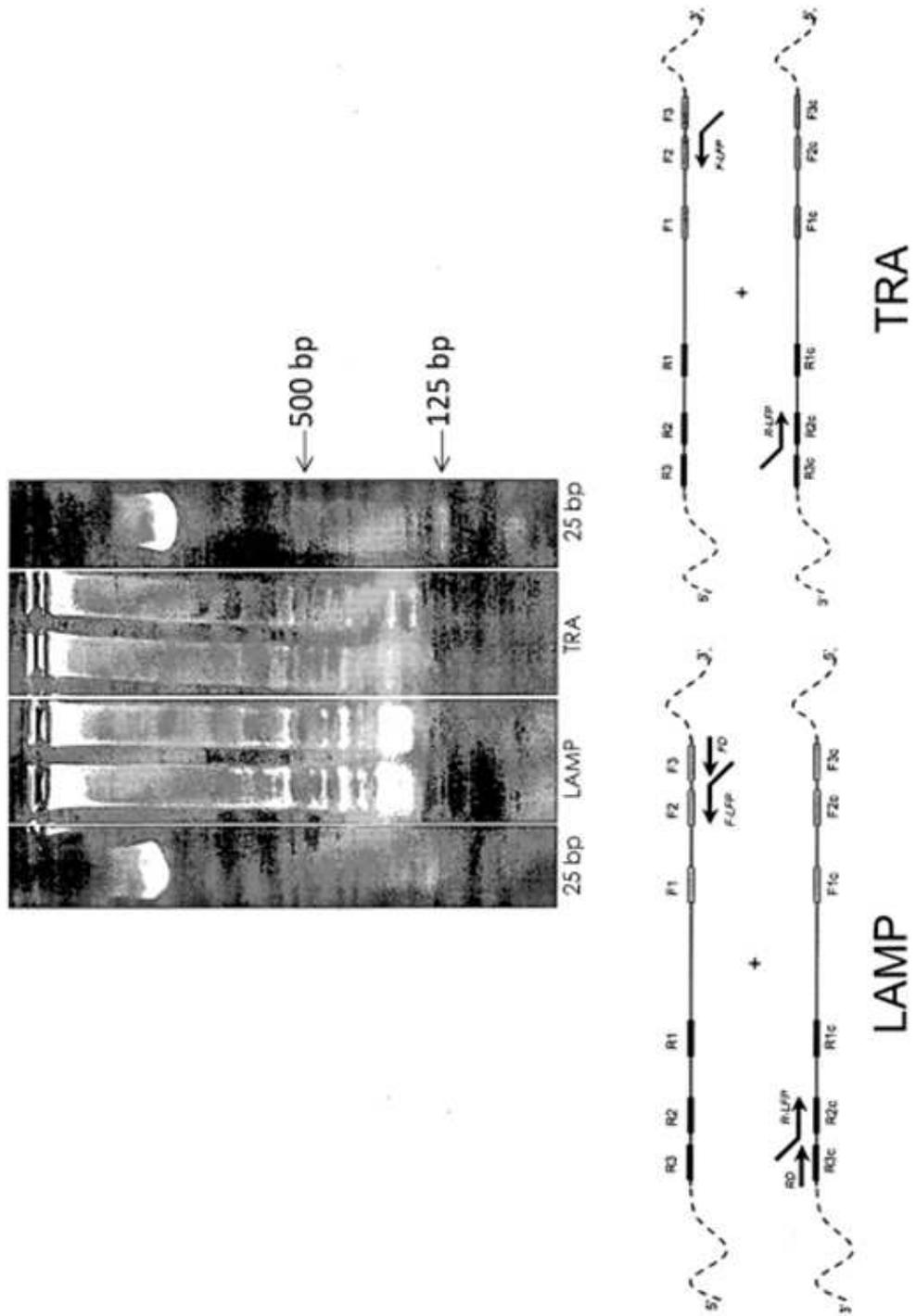
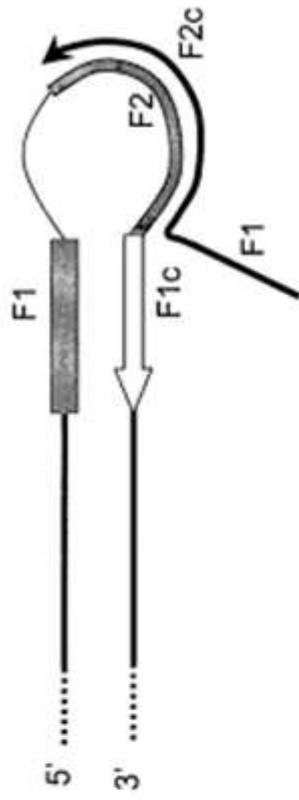
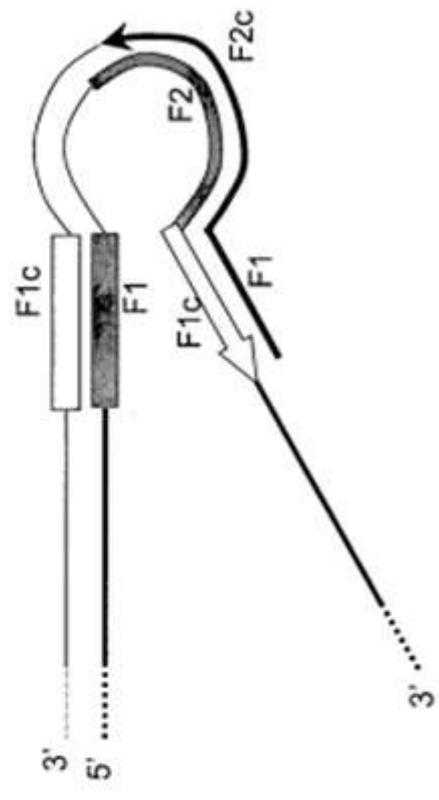


FIGURA 8a



(i)



(ii)

FIGURA 8b

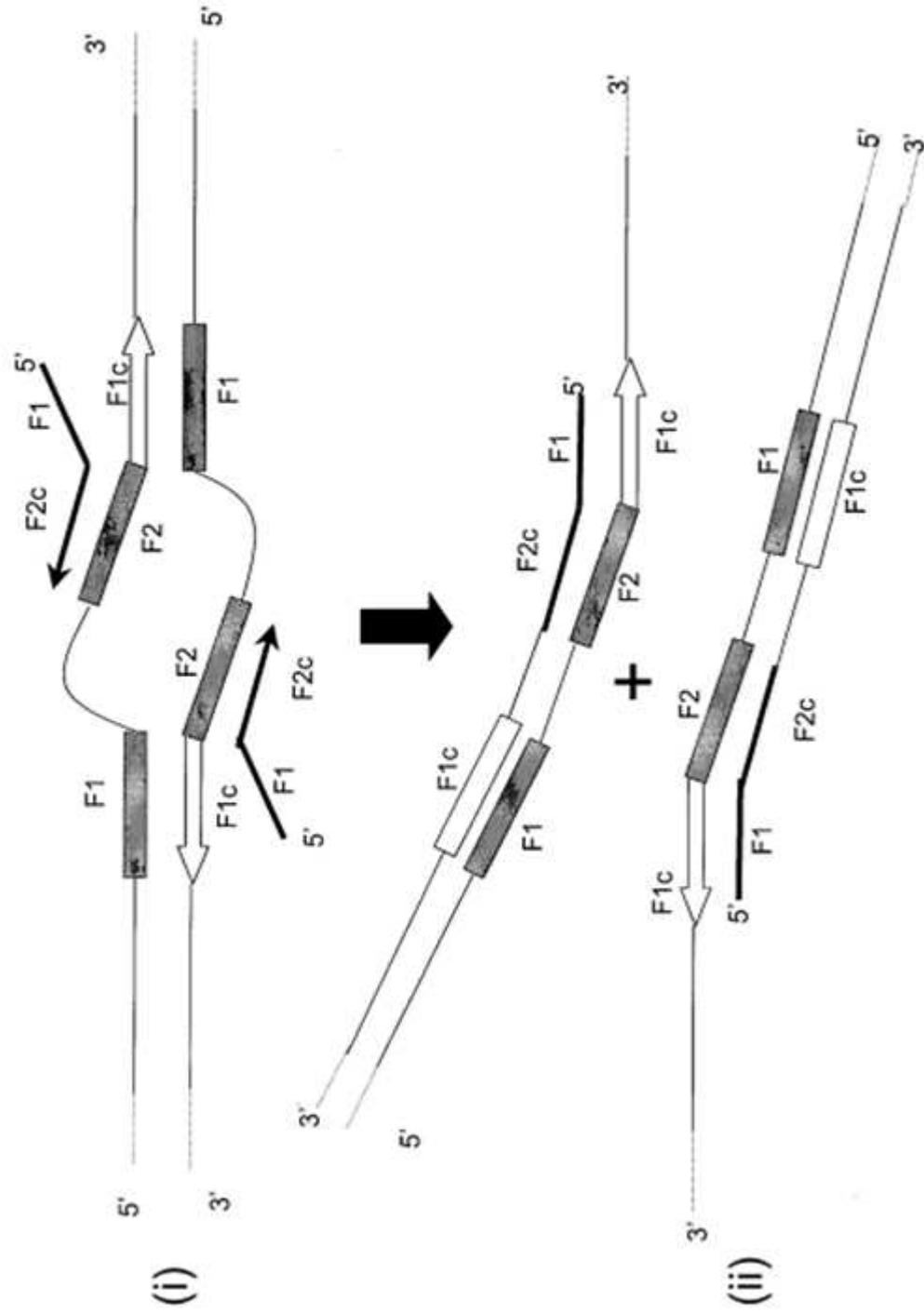


FIGURA 8c

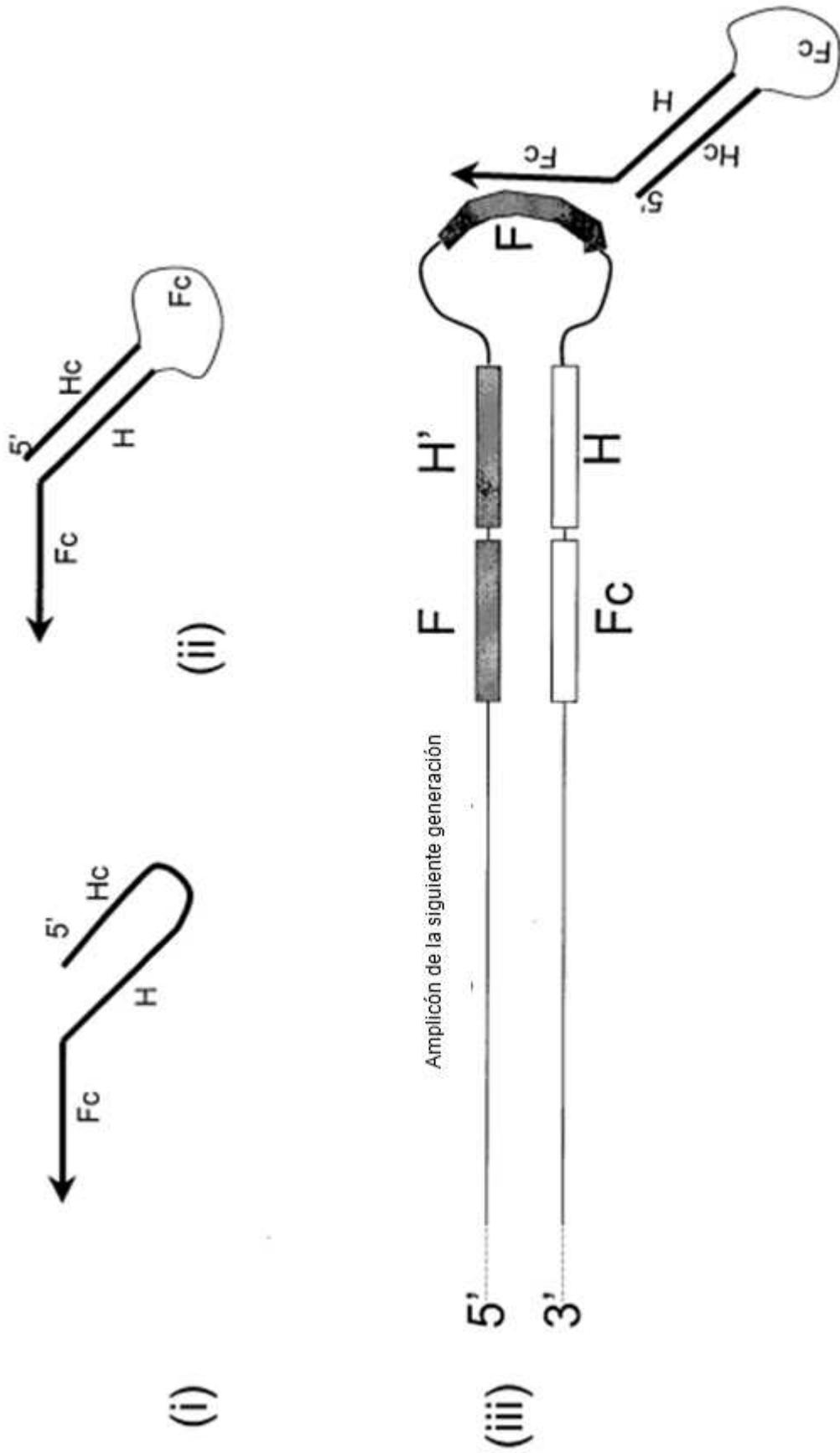
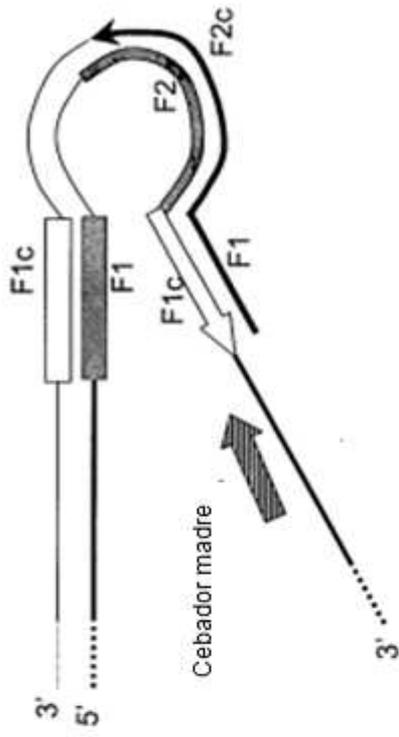
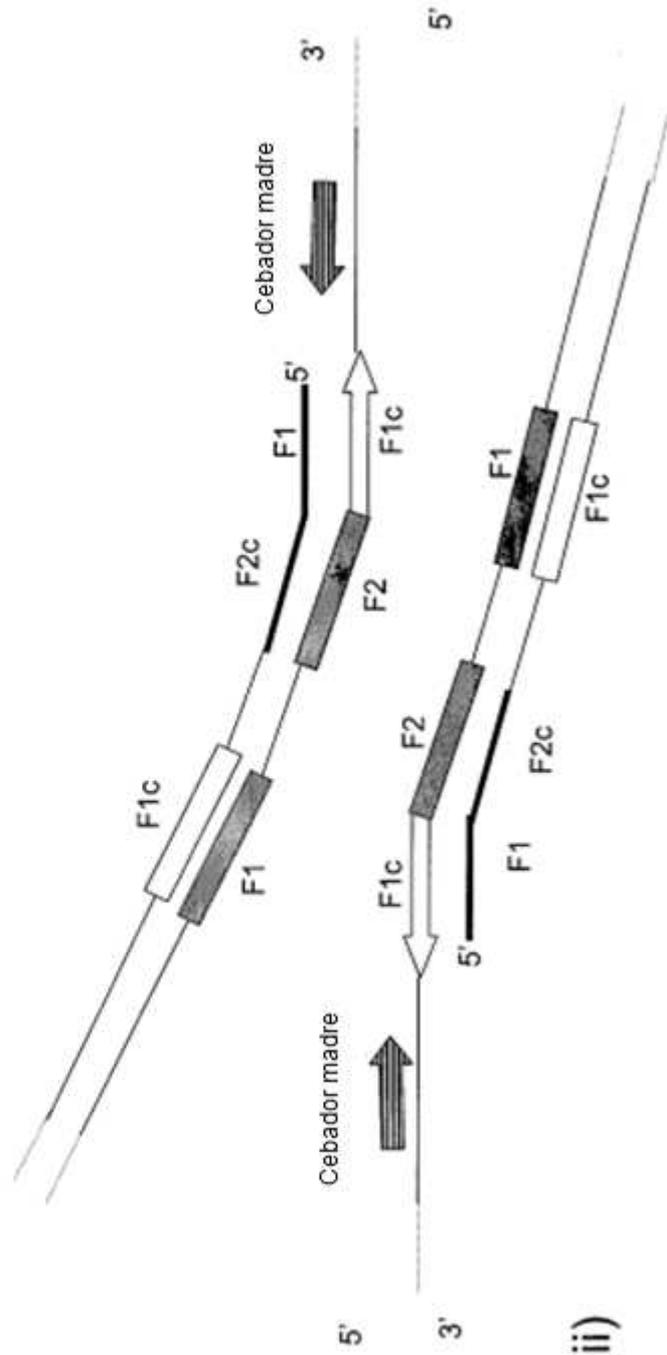


FIGURA 9a

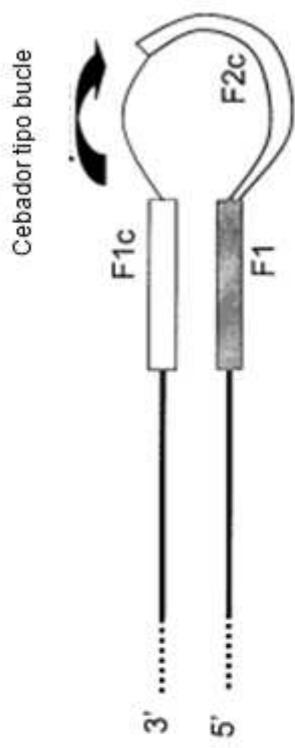


(i)

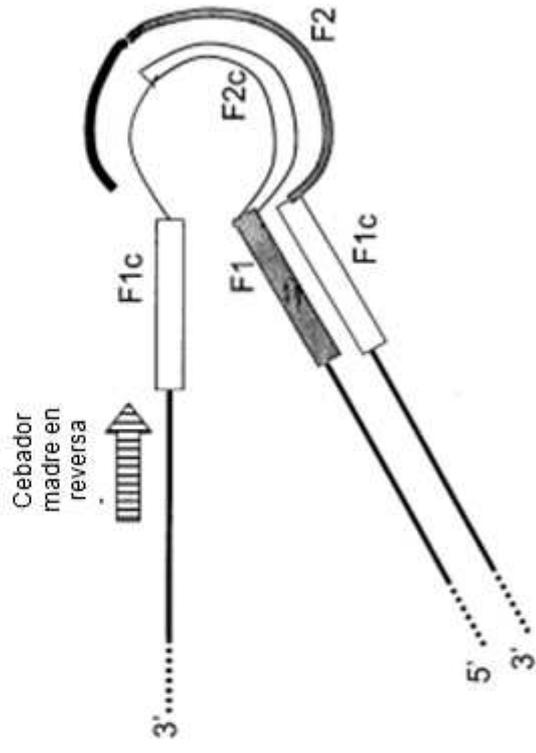


(ii)

FIGURA 9b

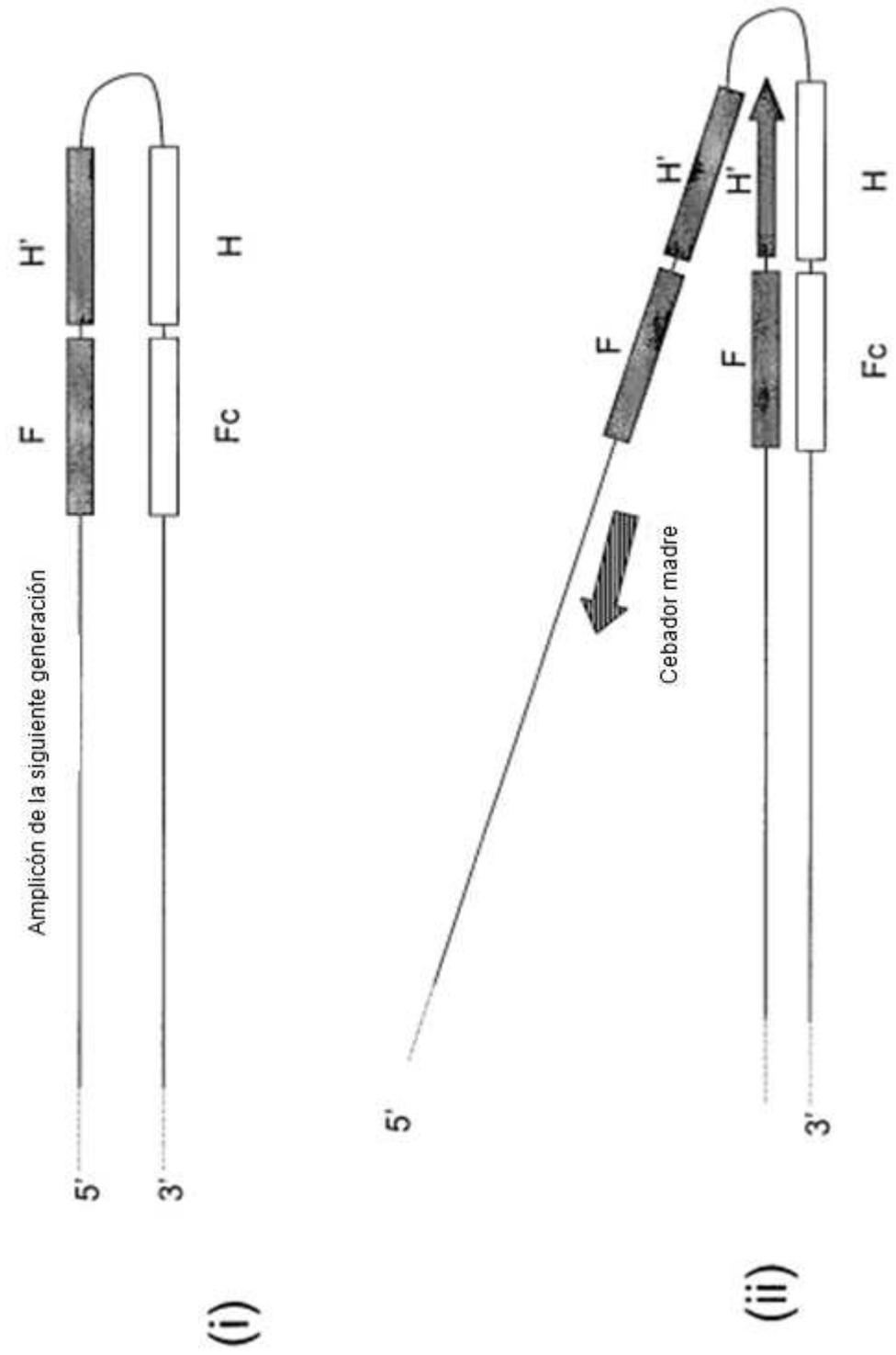


(i)



(ii)

FIGURA 10



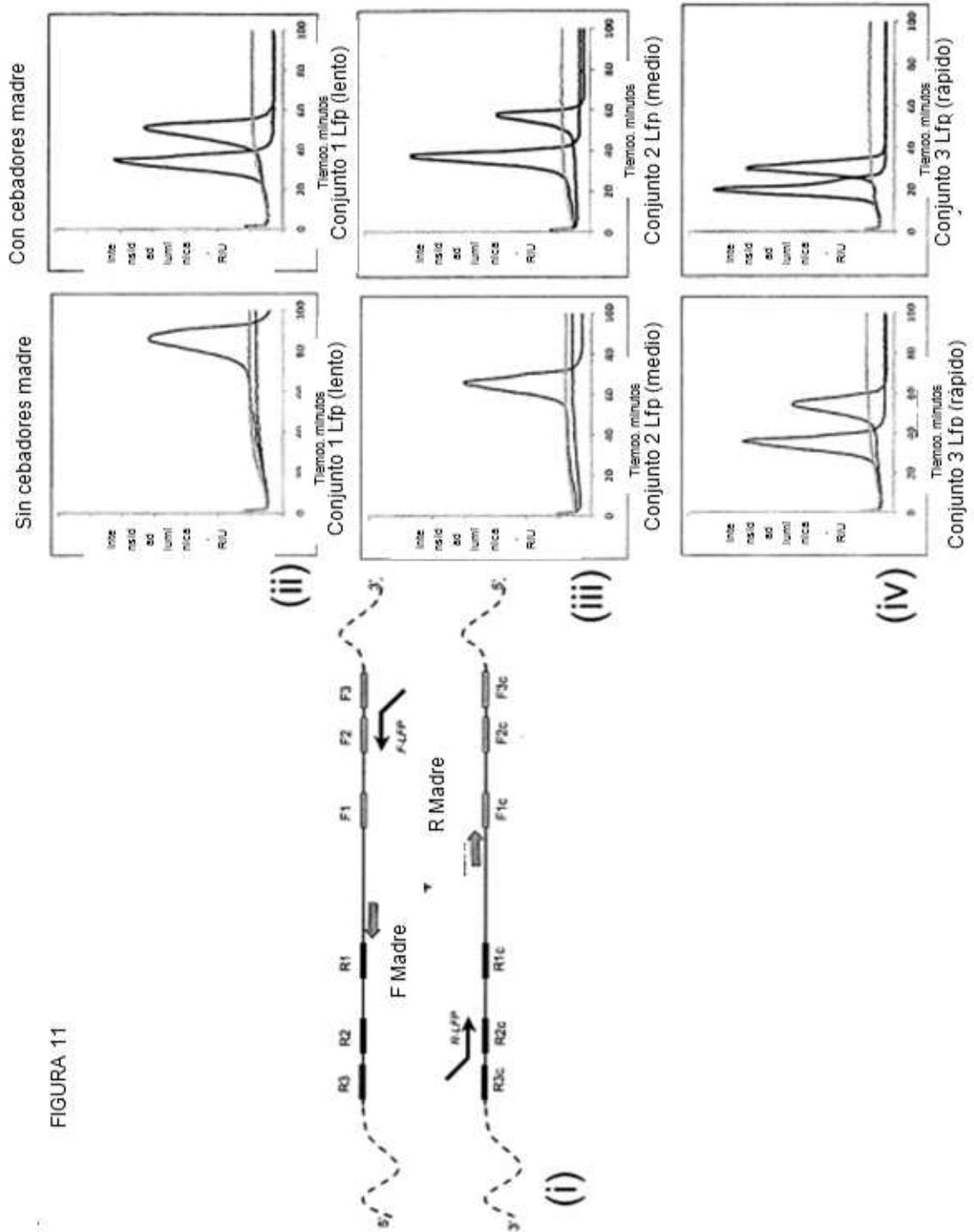


FIGURA 11

FIGURA 12a

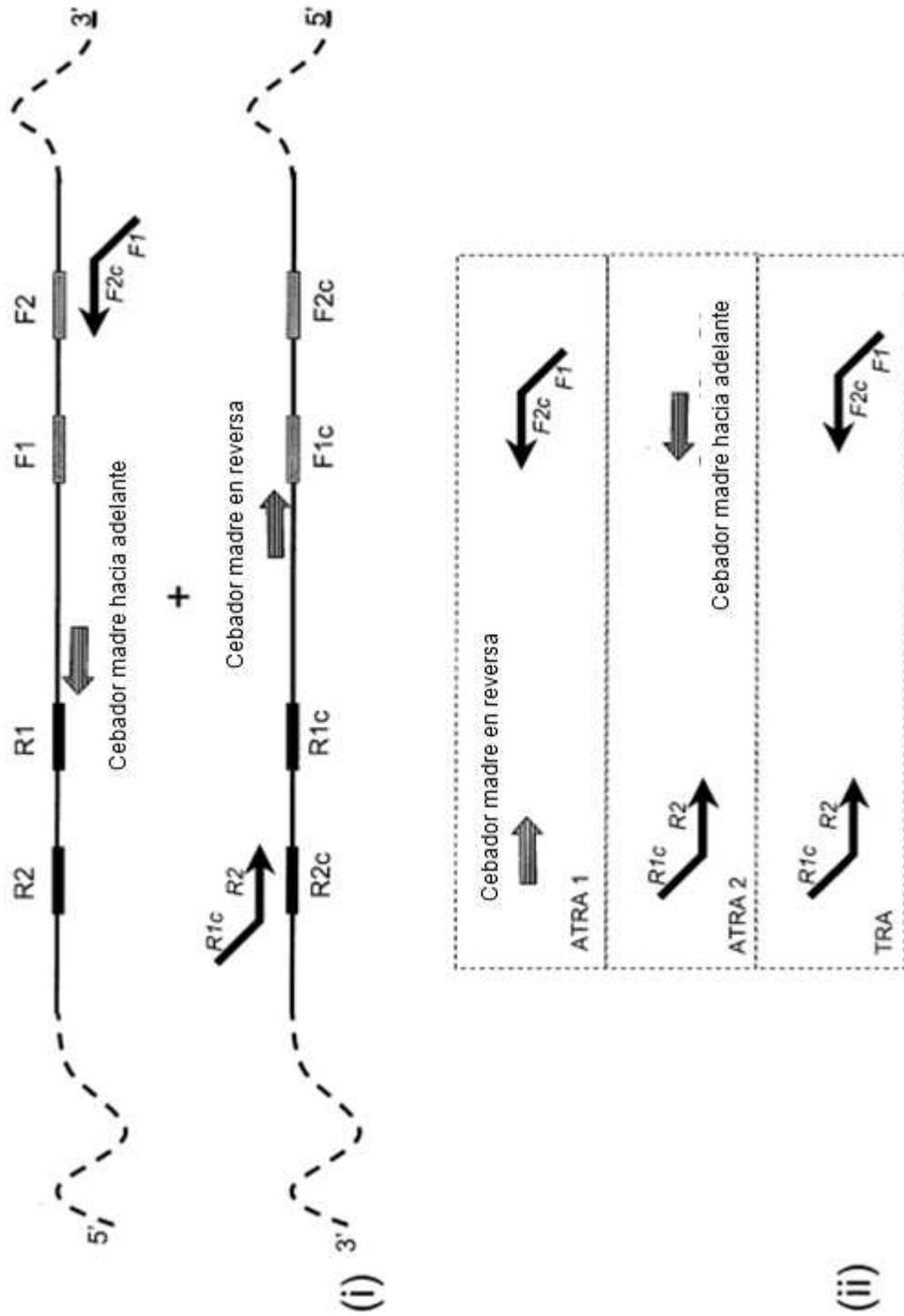


FIGURA 12b

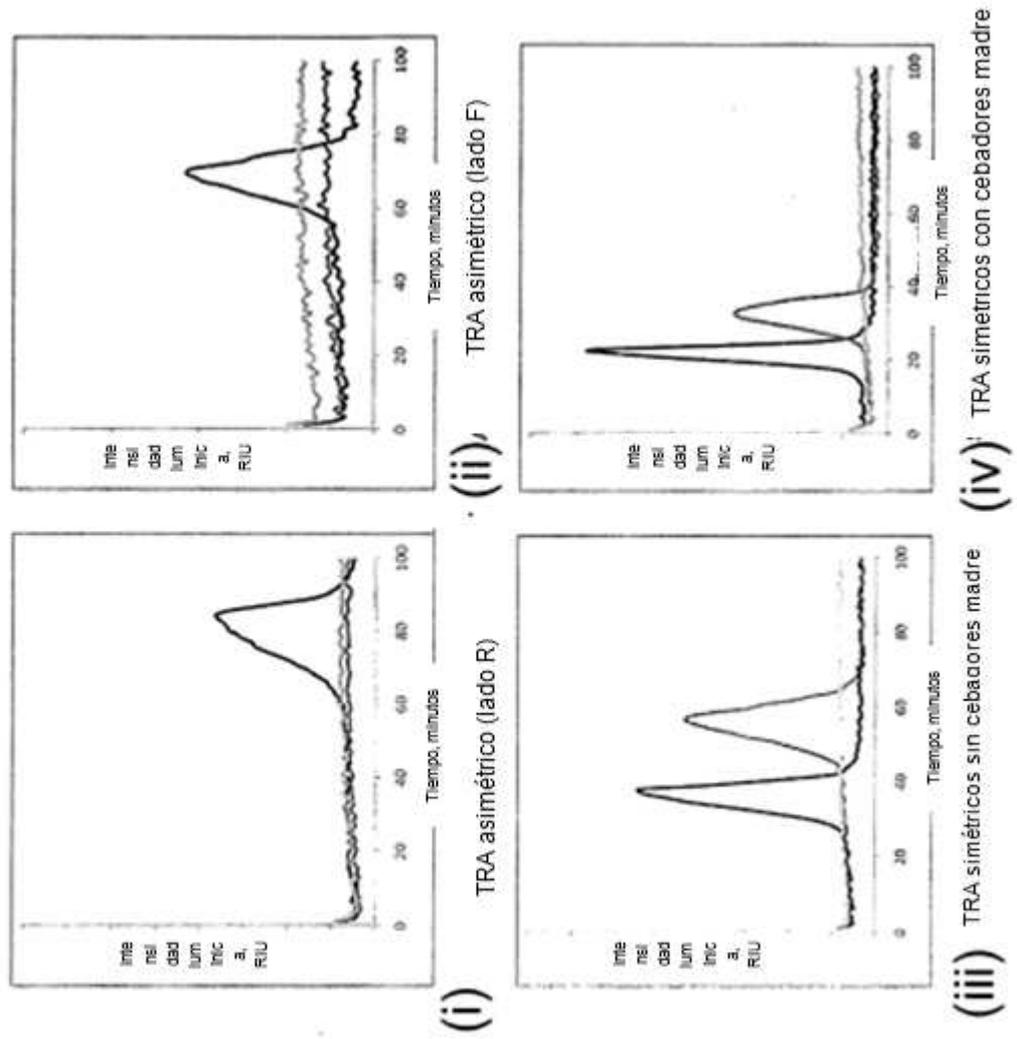


FIGURA 13

Curva de la ecuación de Richards:
$$Y = A + \frac{C}{(1 + T e^{-B(X-M)})^n}$$

Y = ácido nucleico sintetizado durante la amplificación

X = tiempo

A: Asintota inferior

M: tiempo para la tasa máxima de síntesis de ácidos nucleicos

B: tasa de amplificación T: Afecta cerca de la asintota en la cual ocurre la tasa máxima de síntesis de ácido nucleico.

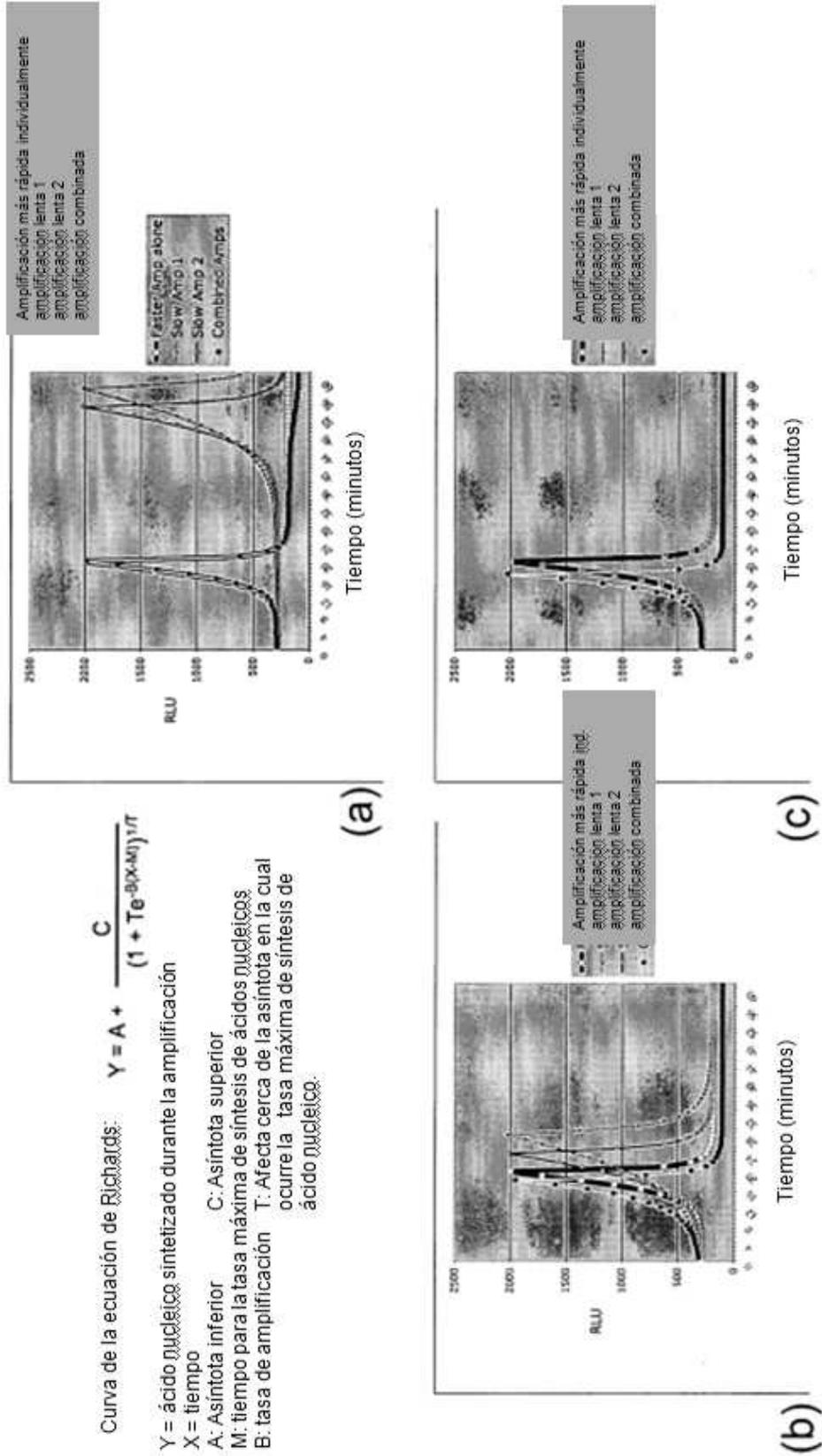


FIGURA 14a

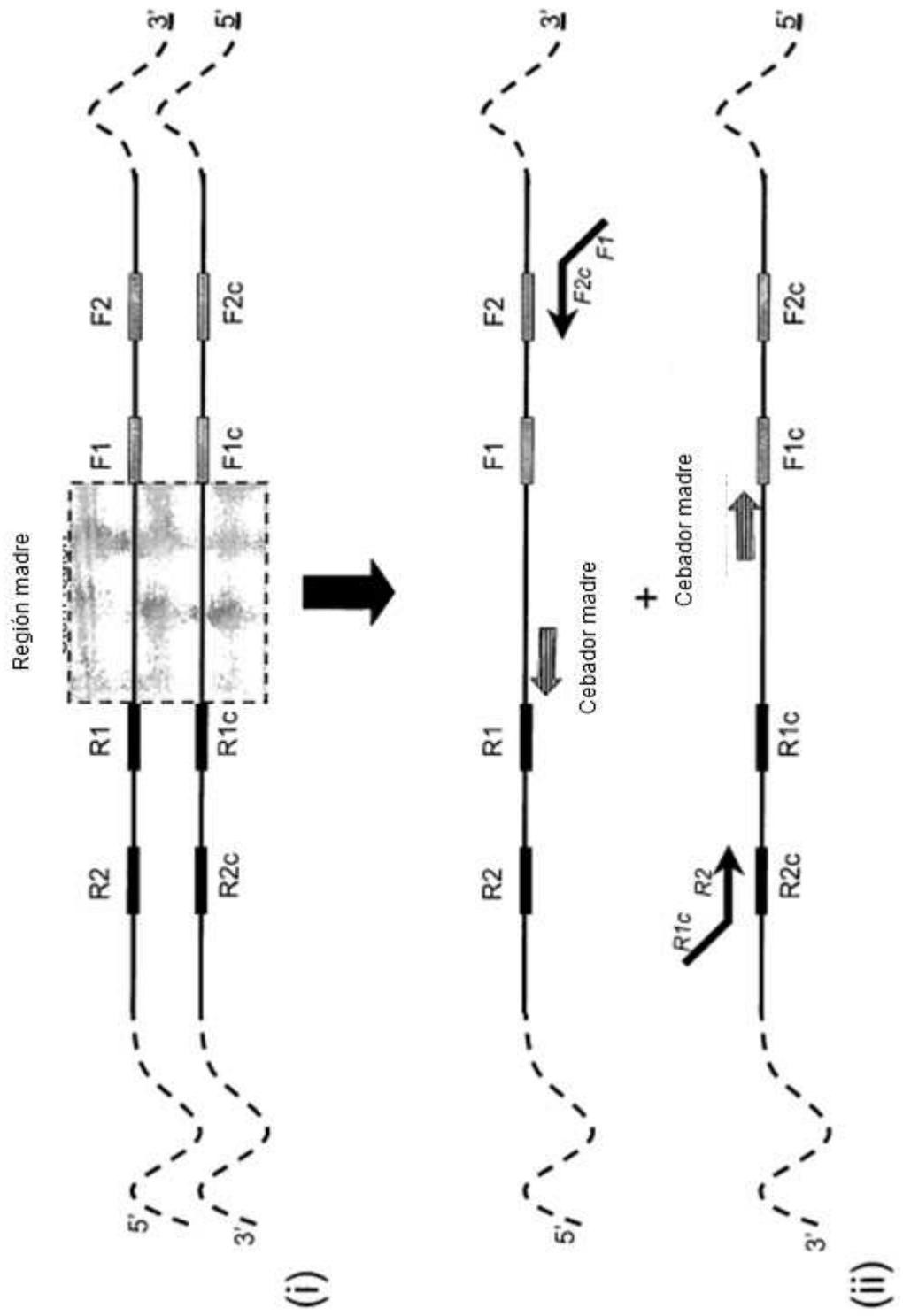


FIGURA 14b

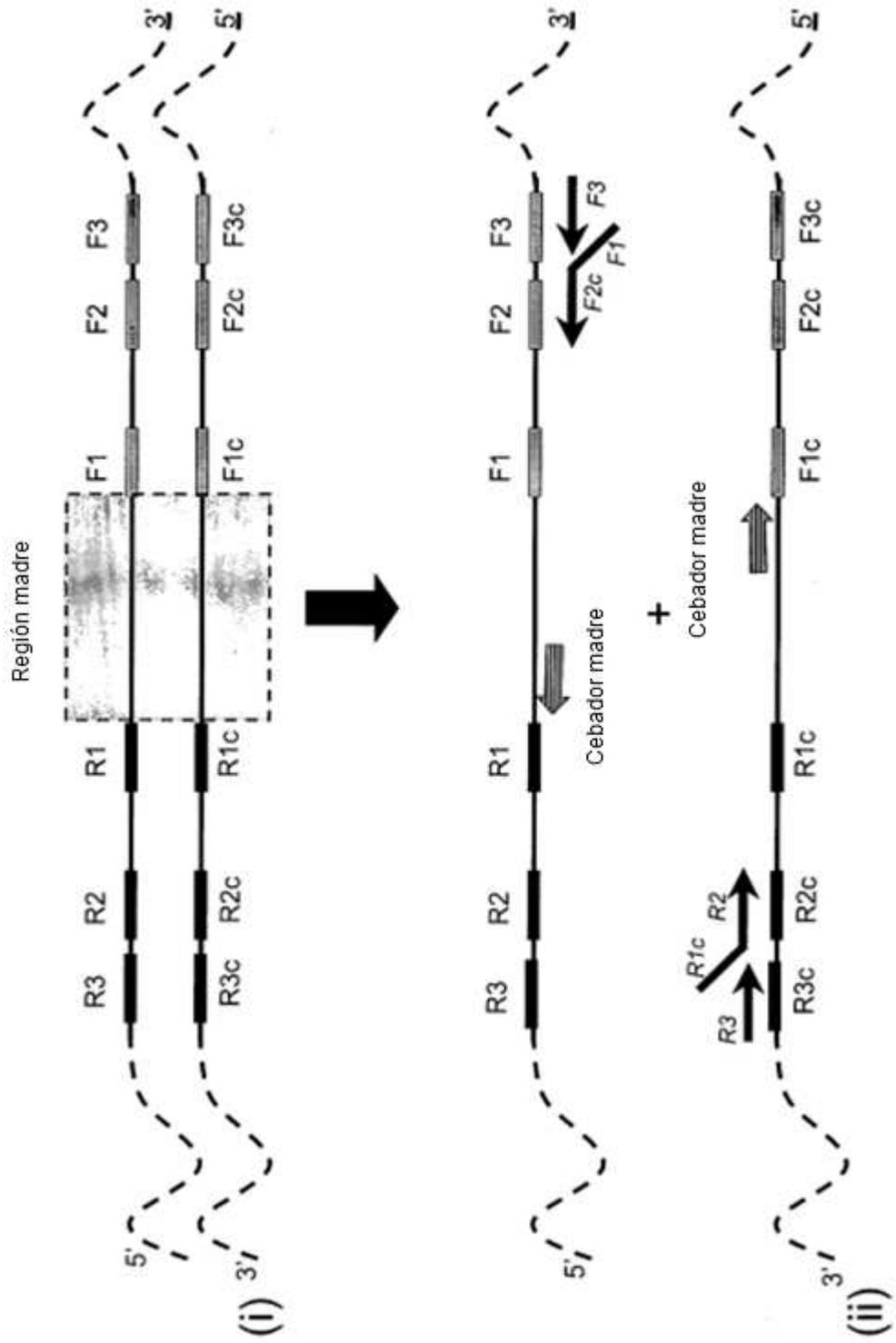


FIGURA 14c

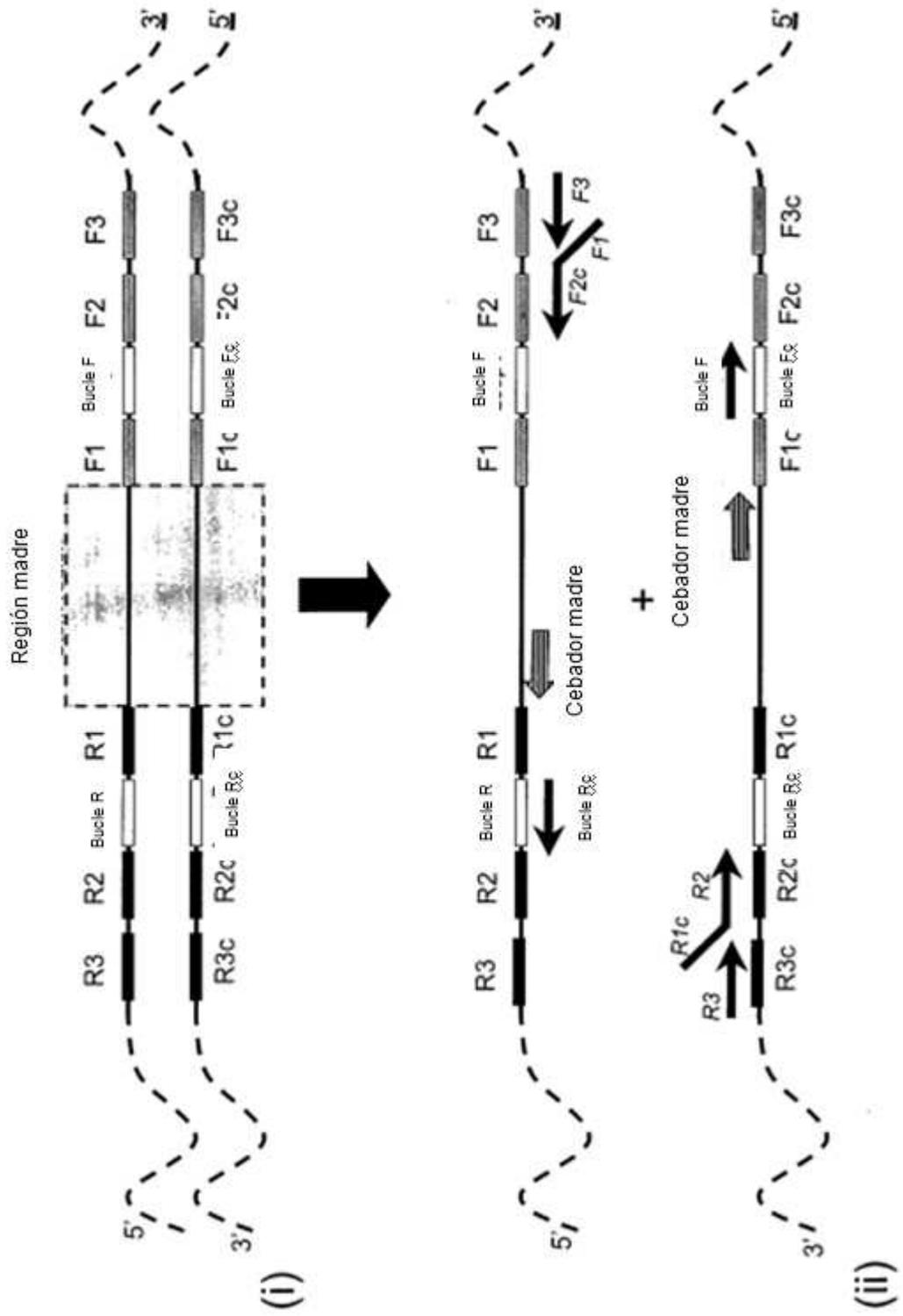


FIGURA 14d

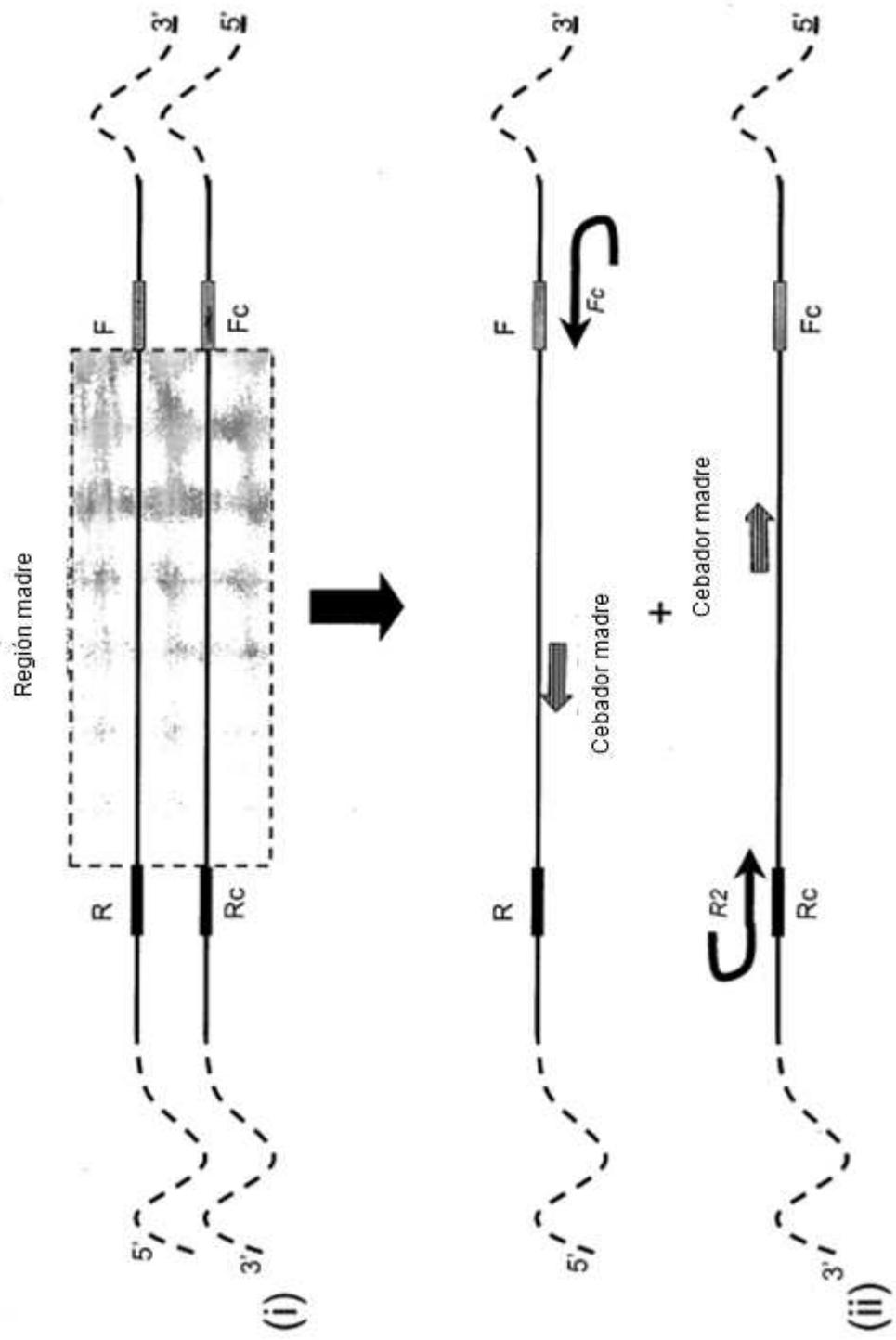


FIGURA 14e

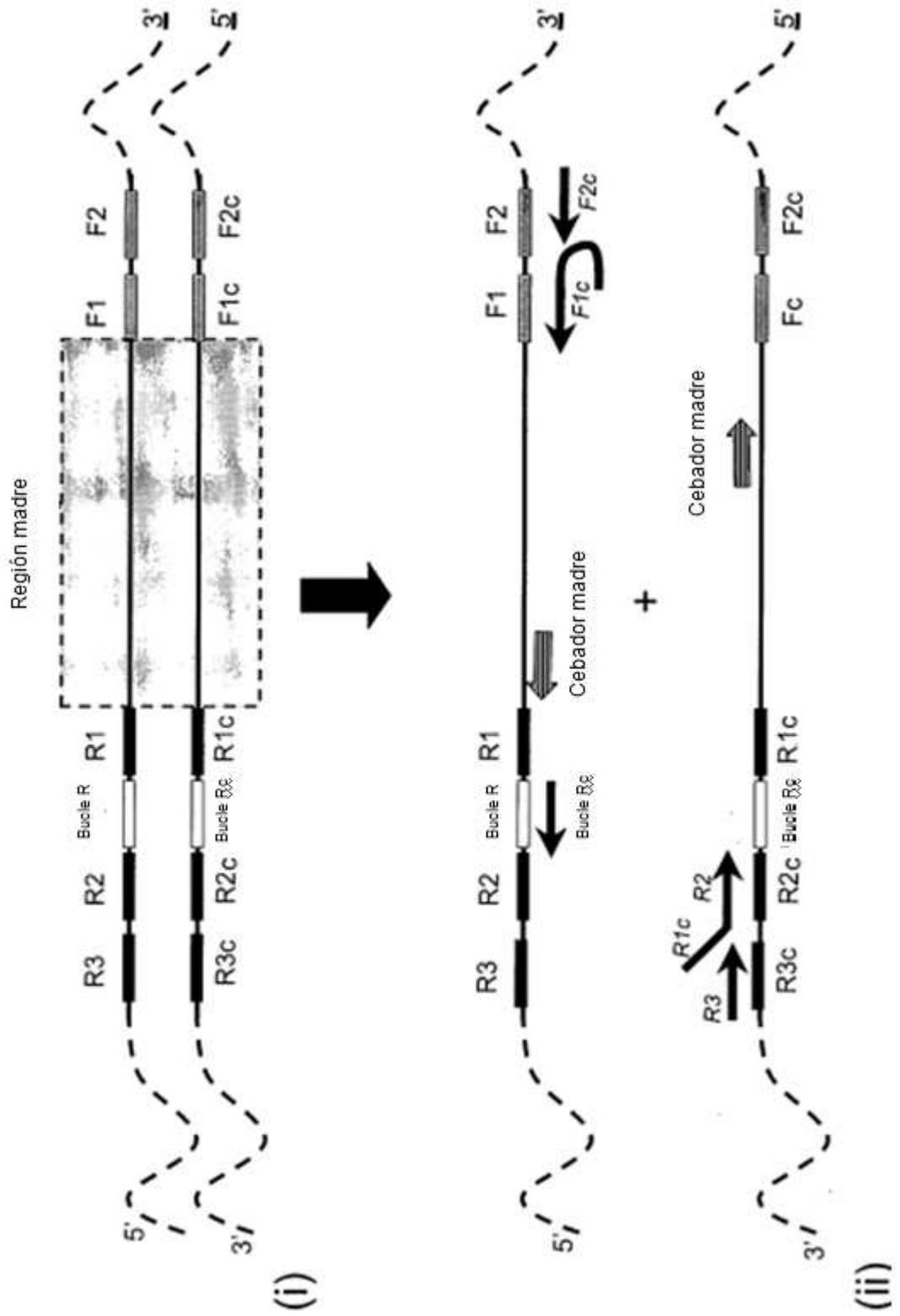


FIGURA 14f

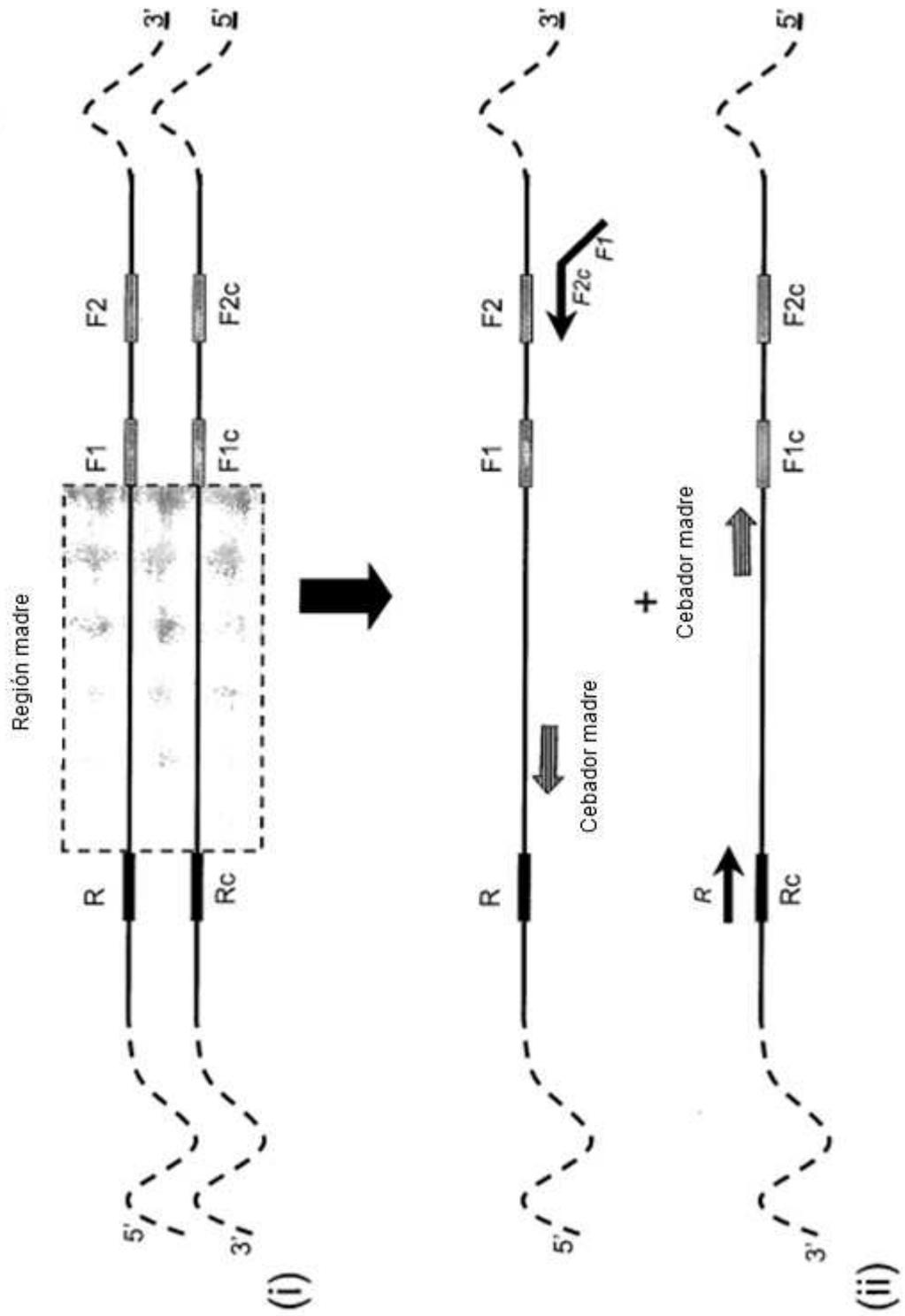


FIGURA 14g

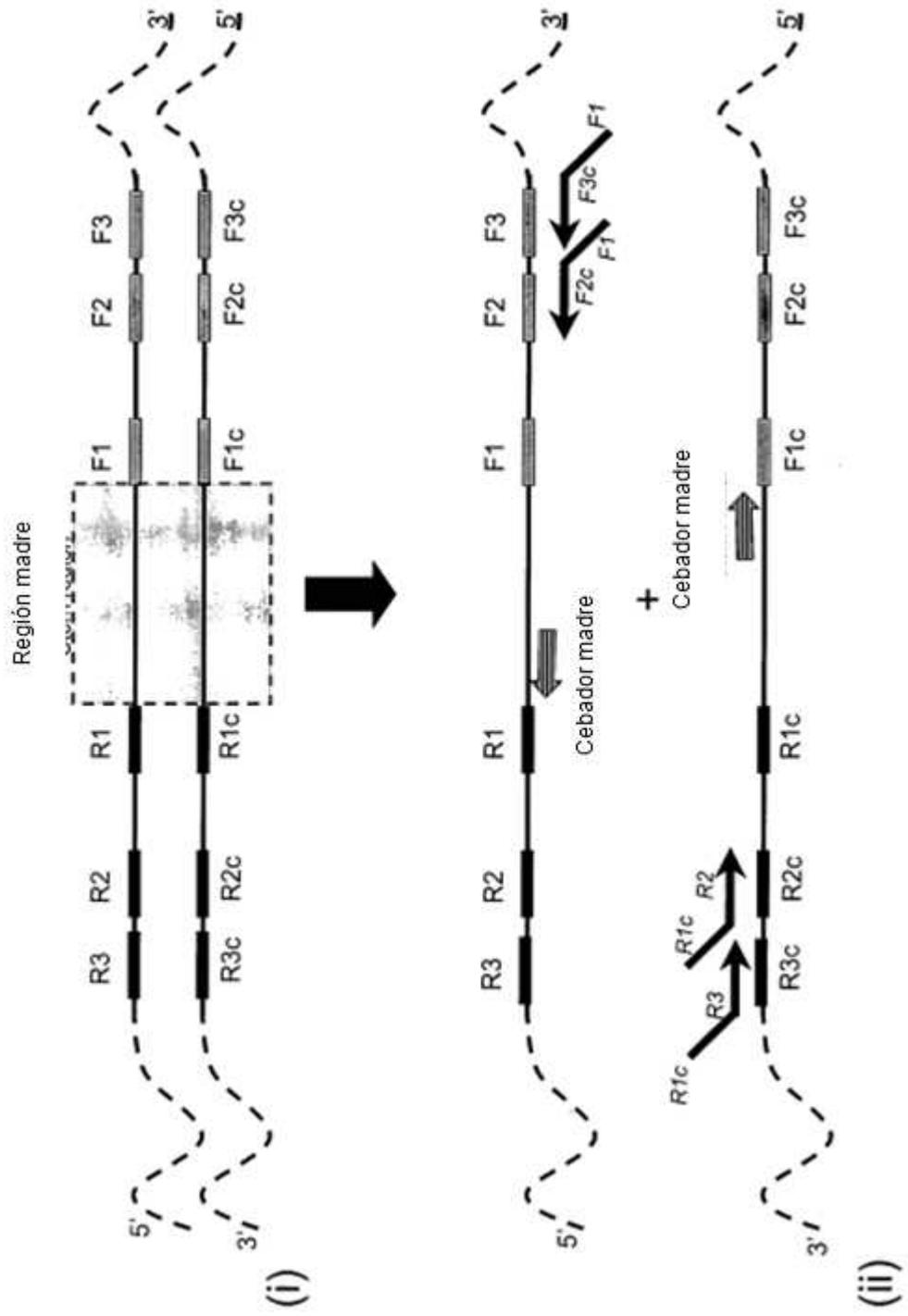


FIGURA 15a

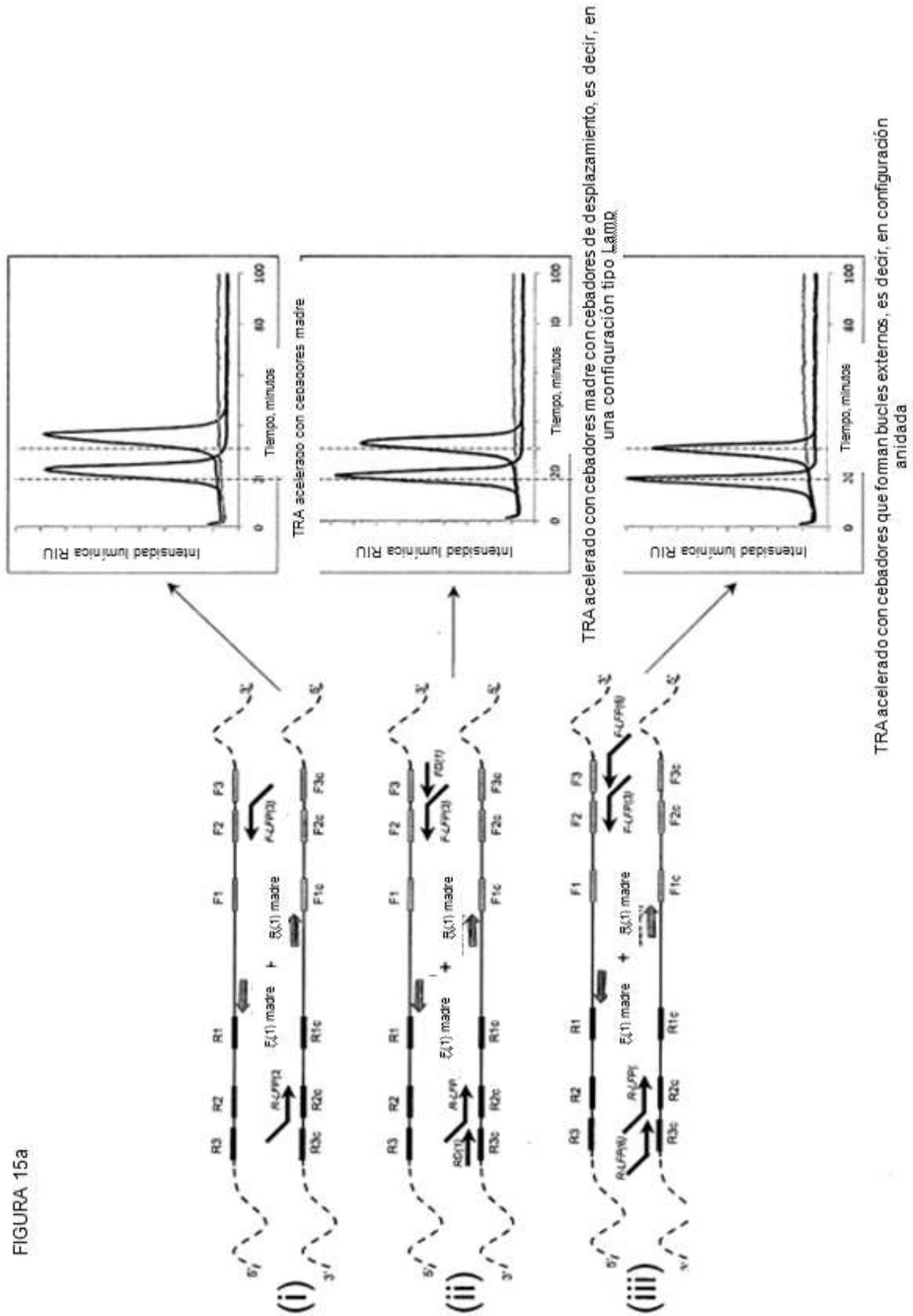


FIGURA 15b

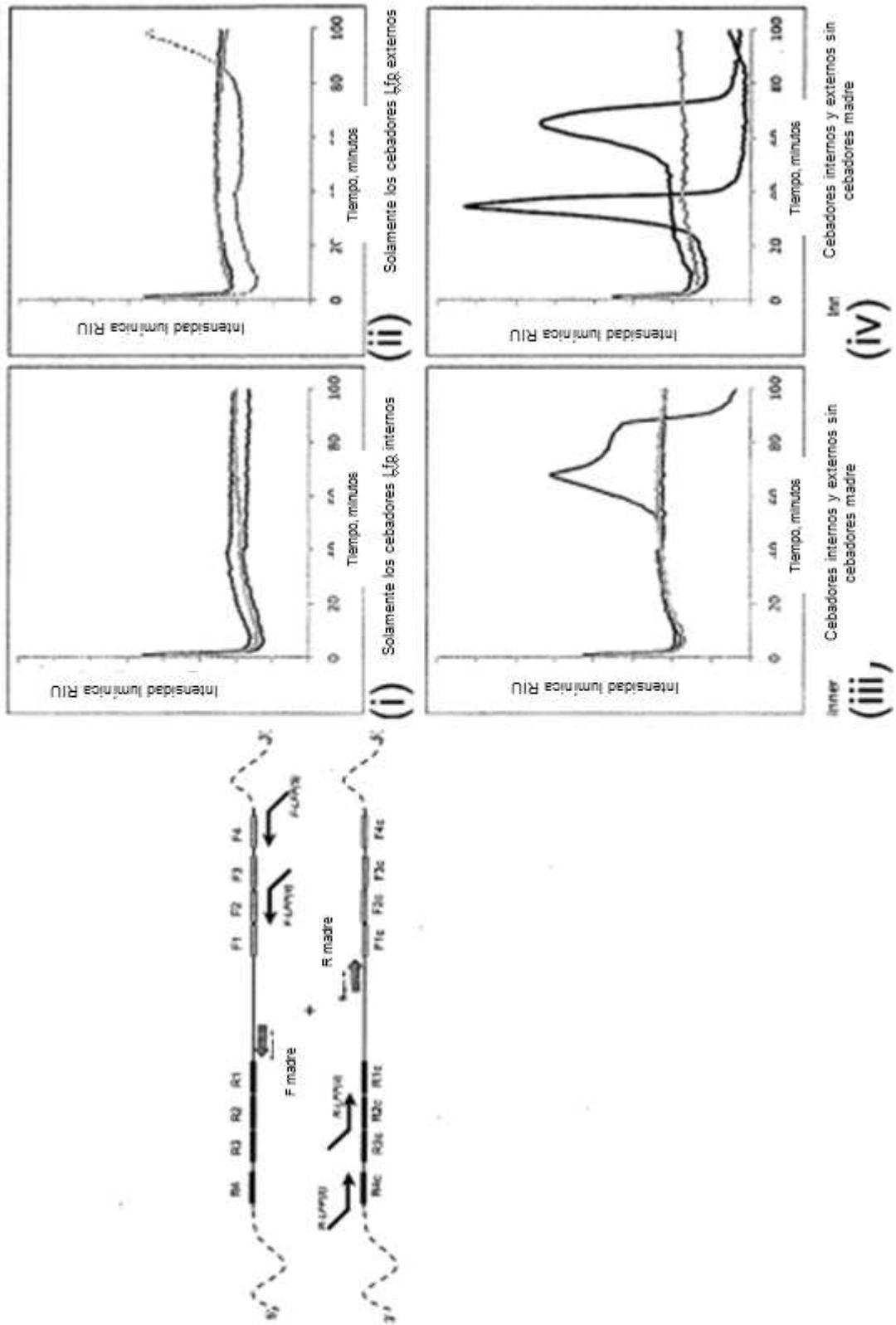


FIGURA 16

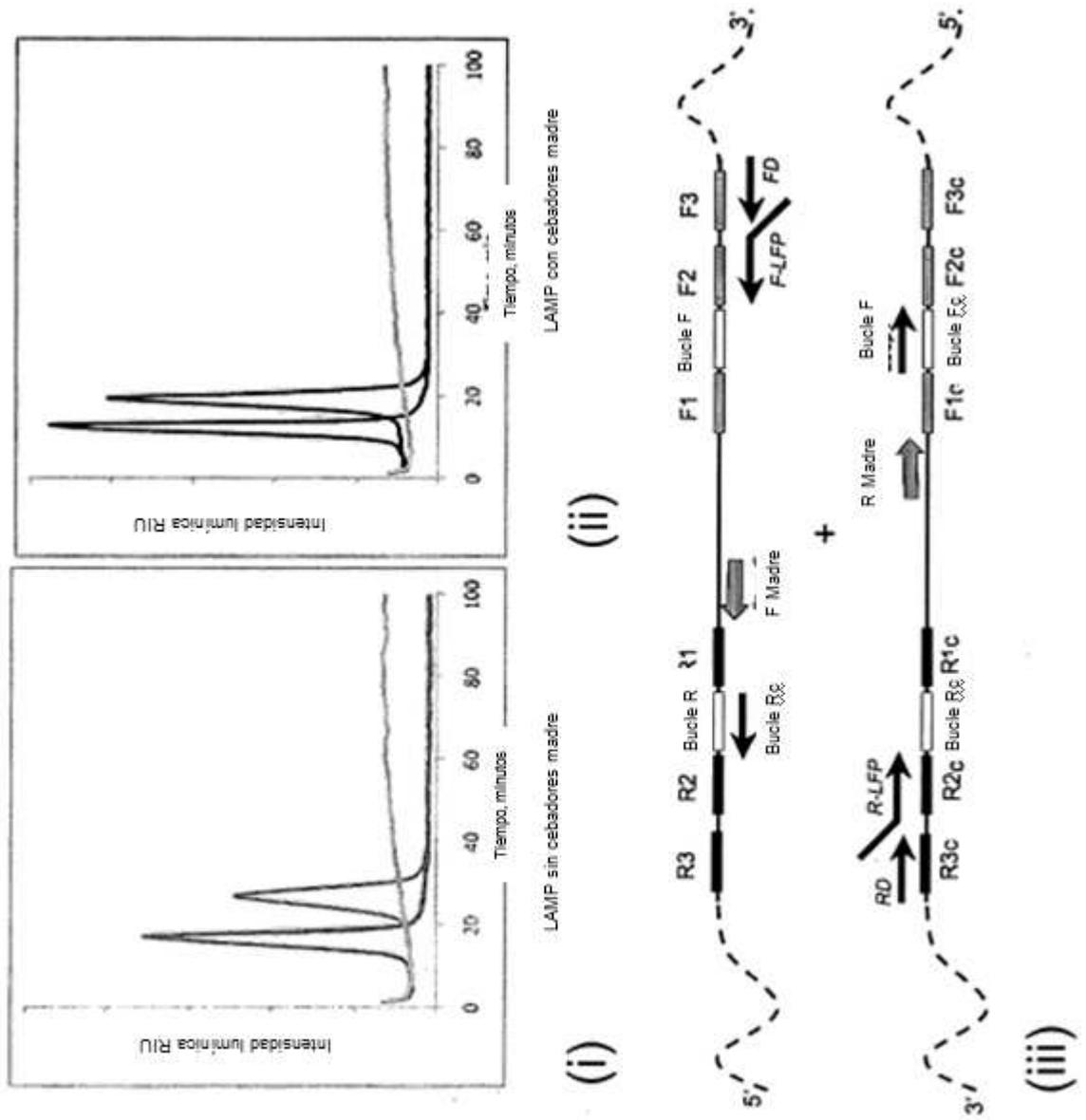


FIGURA 17

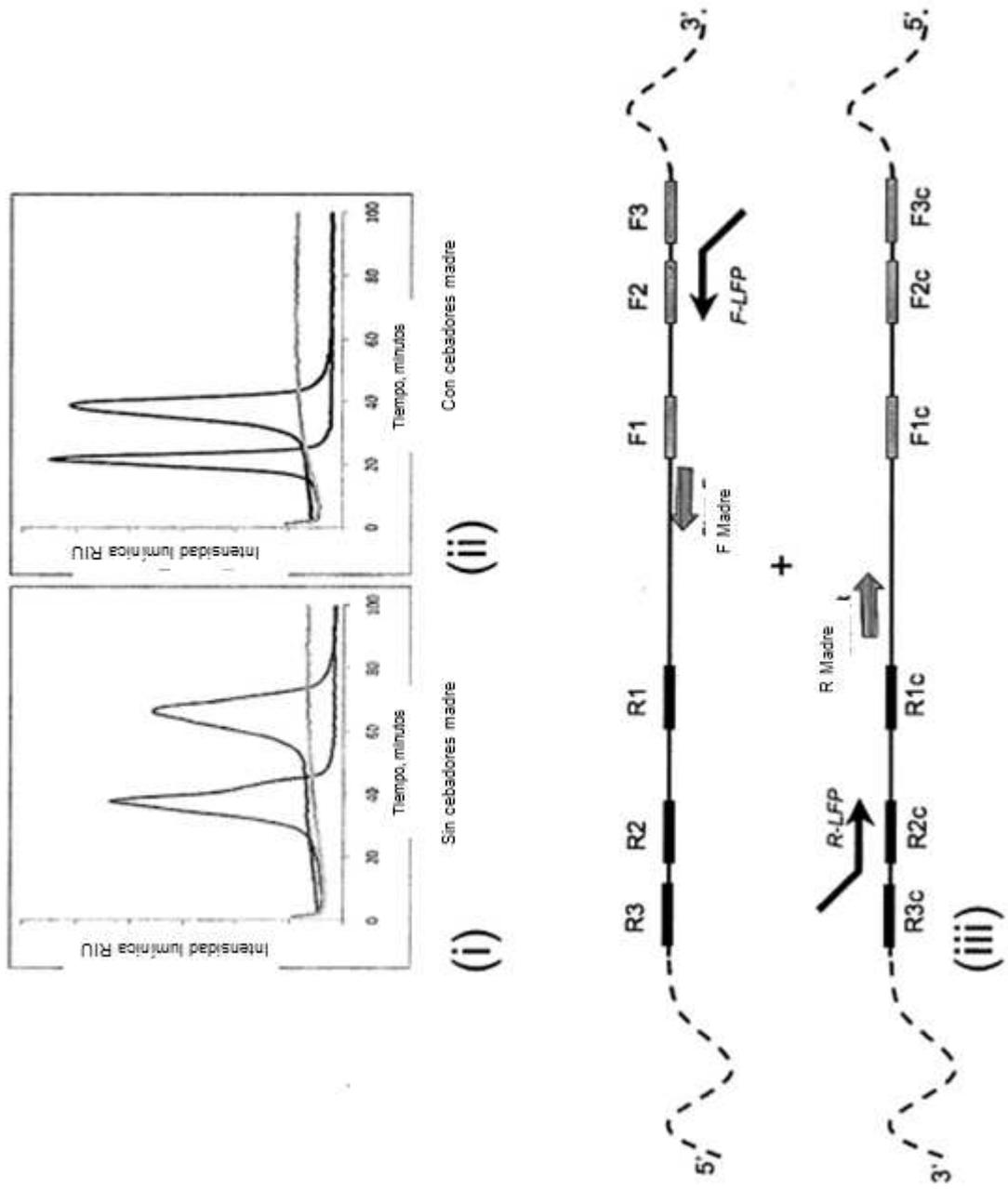


FIGURA 18

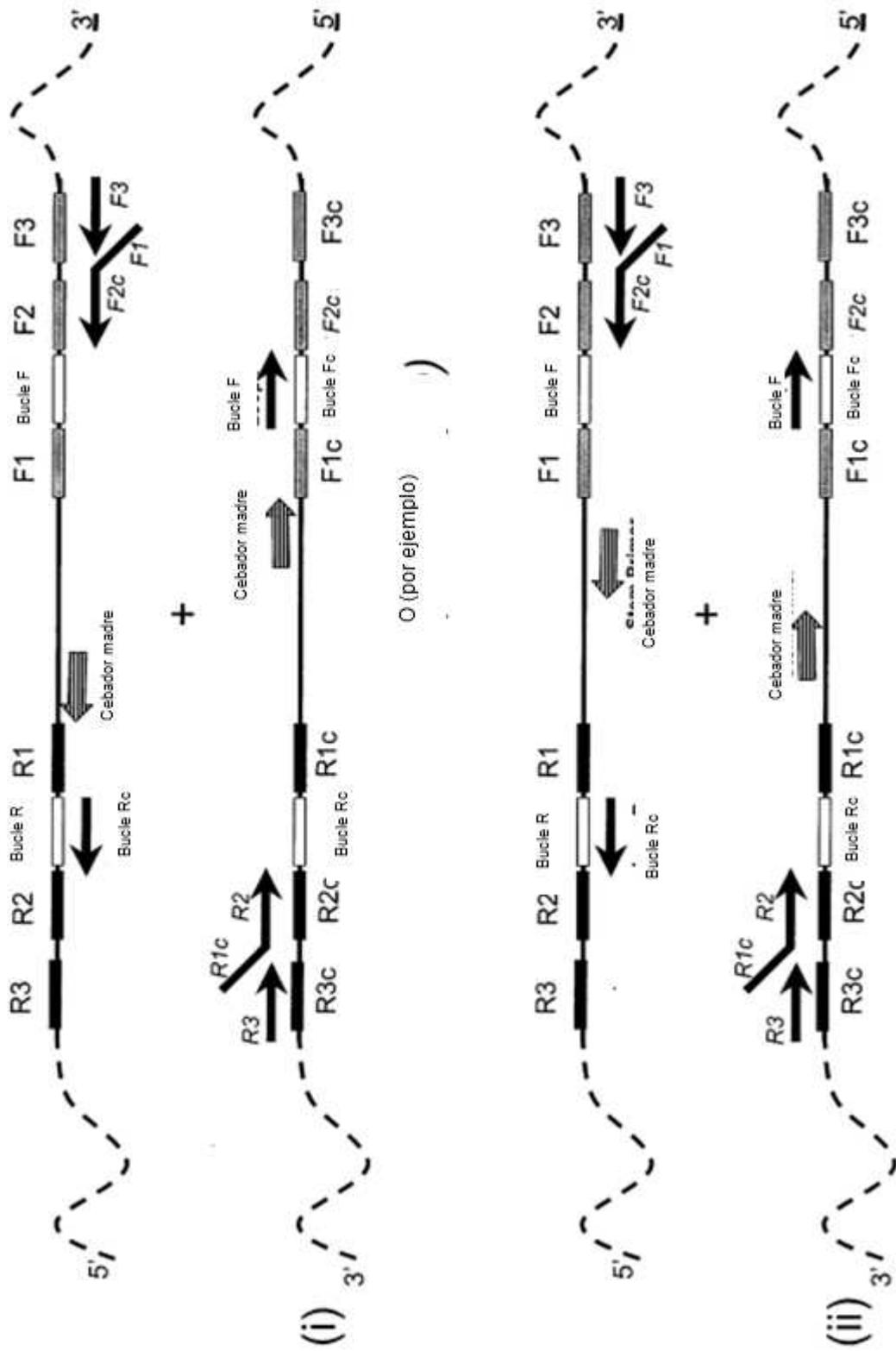


FIGURA 19

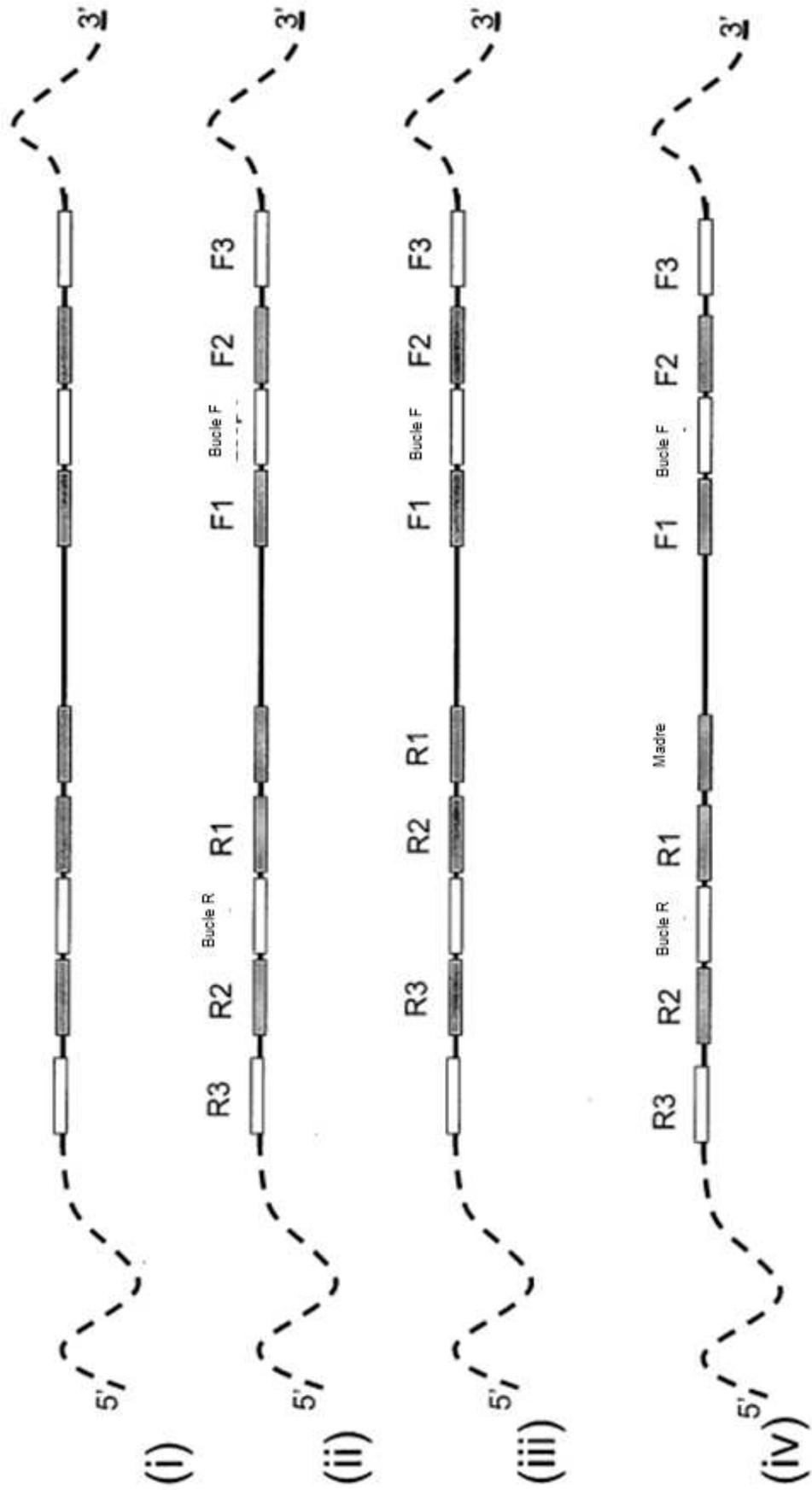


FIGURA 20

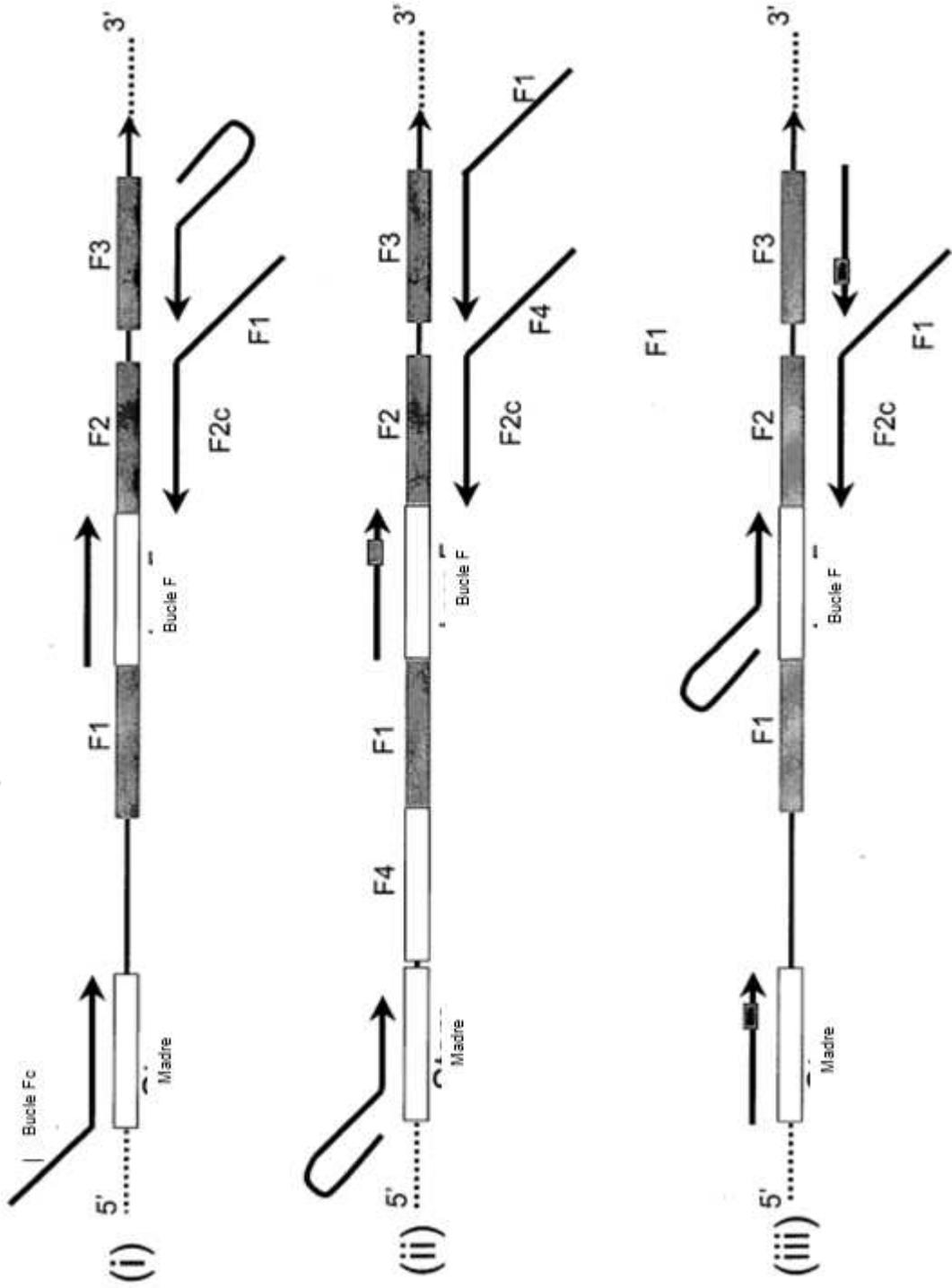
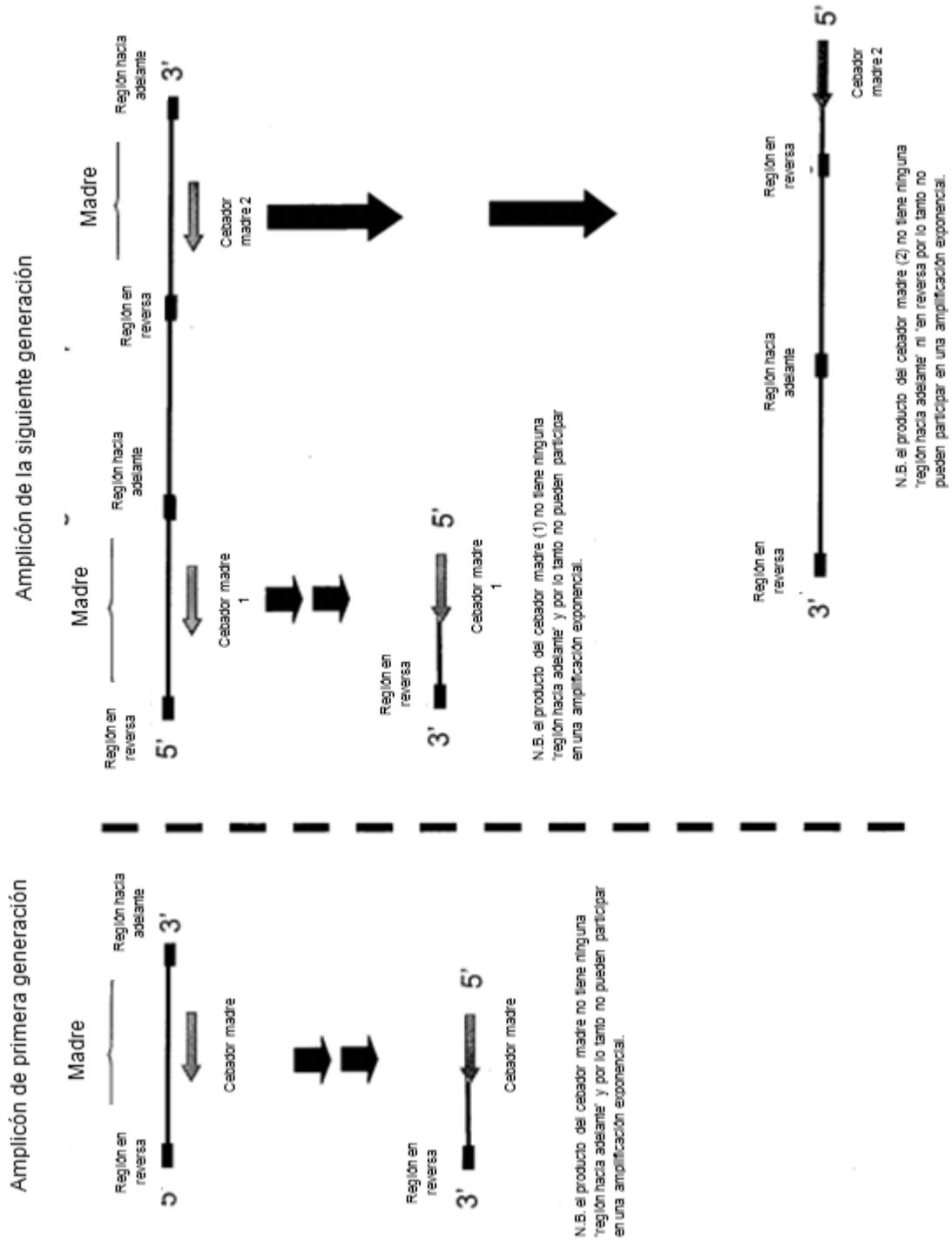


FIGURA 21



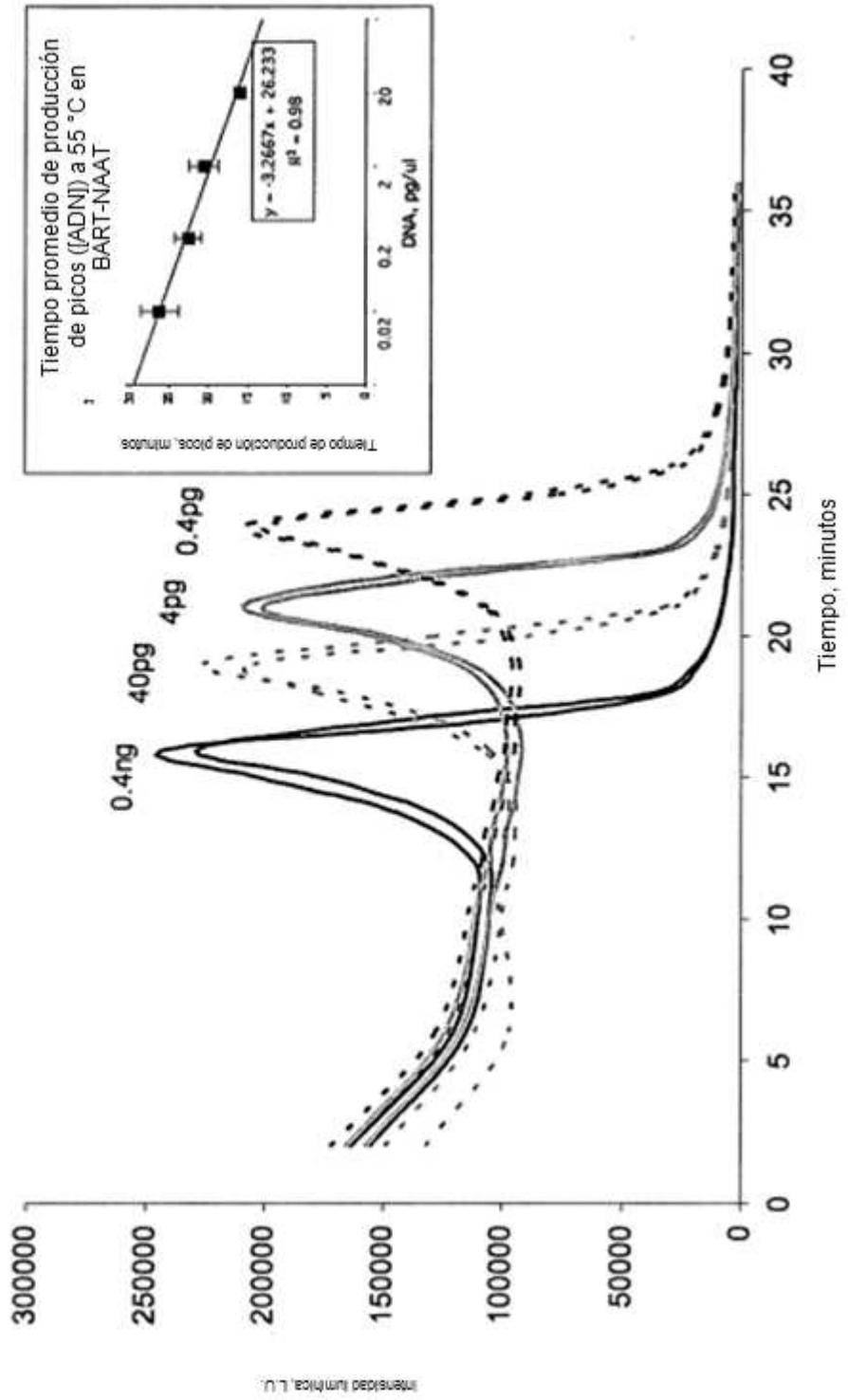


FIGURA 22

FIGURA 23

