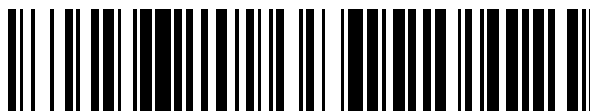


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 690**

51 Int. Cl.:

C12P 19/34 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2008 PCT/AU2008/000120**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2008 WO08092213**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2008 E 08700416 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.01.2018 EP 2118297**

54 Título: **Generación de moléculas de ácido nucleico**

30 Prioridad:

02.02.2007 AU 2007900508 P
17.08.2007 AU 2007904458 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2018

73 Titular/es:

GENERA BIOSYSTEMS LIMITED (100.0%)
1 DALMORE DRIVE
SCORESBY, VICTORIA 3179, AU

72 Inventor/es:

PARK, DANIEL, JONATHAN;
POETTER, KARL, FREDERICK y
KHAN, ZAHEER

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 665 690 T3

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

DESCRIPCIÓN

Generación de moléculas de ácido nucleico

Campo

5 La presente invención se refiere en general a métodos para generar moléculas de ácido nucleico monocatenarias después de amplificación polinucleotídica en fase sólida potenciada. Se divulgan métodos para marcar matrices sólidas con moléculas de ácido nucleico monocatenarias y bicatenarias. Se describen también en la presente memoria kits para generar moléculas de ácido nucleico monocatenarias y para realizar reacciones de amplificación. Se describen también sistemas de amplificación para la generación de moléculas de ácido nucleico monocatenarias opcionalmente marcadas con una molécula indicadora y su uso, entre otras cosas, como marcajes, cebadores y sondas.

Antecedentes

La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es y no debería tomarse como el reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esta técnica anterior forma parte del conocimiento general común en ningún país.

15 El ADN bicatenario (ADNbc) puede convertirse en ADN monocatenario (ADNmc) separando las hebras o retirando una hebra del dúplex. Las hebras del dúplex pueden separarse por medios térmicos o químicos de desestabilización de enlaces entre hebras. La retirada de una hebra permite la recuperación de la hebra deseada y la eliminación de su complemento, p.ej., Nikiforov *et al.* (patente de EE.UU. nº 5.518.900), que describe la modificación de uno de los dos cebadores usados para amplificación mediante la incorporación de derivados de nucleótidos de fosforotioato en el extremo 5' del cebador modificado, volviéndolo resistente a la digestión por exonucleasa. Después de amplificar las secuencias diana usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se somete en ADNbc a digestión con exonucleasa. La hebra no protegida se digiere preferentemente por una exonucleasa 5' a 3', dejando un producto monocatenario consistente en la otra hebra. Estrategias similares han usado cebadores ramificados resistentes a exonucleasa (Shchepinov *et al.*, *Nuc. Acids. Res.* 25: 4447-4454 1997) o la preferencia por sustrato portador de 5'-fosfato de la exonucleasa Lambda (Higuchi *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 25: 5685, 1989).

20 La PCR asimétrica (Gyllensten y Erlich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7652-7656, 1998; patente de EE.UU. nº 5.066.584) genera ADNmc durante el termociclado empleando una concentración de par cebador no equilibrada tal que un cebador esté a una concentración limitante. Esto favorece cebar el producto de ADNmc por el cebador en exceso. Este enfoque tiene el problema de estar limitado inherentemente en procesividad, puesto que, por necesidad, se usa un cebador a una concentración relativamente baja.

30 La PCR asimétrica de cebador competidor (Gillespie, 1997; sol. de patente de EE.UU. nº 08/628.417) emplea la adición separada de cebador competidor después de termociclado de PCR y antes de termociclado adicional para generar ADNmc. Como tal, este método requiere un manejo excesivo que es indeseable, particularmente en un contexto de diagnóstico, debido al riesgo aumentado de contaminación, errores de usuario y tiempo y costes de procesamiento.

35 Kaltenboeck *et al.*, *Biotechniques* 12: 164-171, 1992 describía un método de producción de ADNmc mediante la práctica inicial de una PCR para generar ADNbc, seguida de una reacción separada usando el producto de la primera PCR como molde para una segunda amplificación lineal que emplea un cebador. De nuevo, este método requiere un manejo excesivo.

40 Las matrices en fase sólida se han marcado con productos de PCR usando PCR simétrica o PCR asimétrica, donde un cebador se conjuga con una superficie sólida, o a través de una PCR "de puente", donde los cebadores directo e inverso se conjugan directamente con una superficie sólida. Cada uno de estos enfoques es relativamente ineficaz debido a limitaciones cinéticas (bajas concentraciones eficaces de sustrato con o sin efectos inhibidores competitivos). Si se requiere, los productos de ADNbc conjugados con una fase sólida pueden convertirse de forma relativamente sencilla en productos de ADNmc conjugados con la fase sólida mediante desnaturalización química o térmica.

La patente de EE.UU. nº 6.277.604 describe el uso de un cebador inmovilizado y dos en fase acuosa en PCR asimétrica. Al menos uno de los cebadores acuosos está proporcionado a concentración limitante para facilitar el cebado por el cebador inmovilizado de un evento de extensión. Sin embargo, esto puede conducir a ineficacias.

50 Existe una clara necesidad de desarrollar métodos más eficaces para generar moléculas de ácido nucleico monocatenarias específicas y para marcar soportes sólidos.

Compendio

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones siguientes, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprender" y variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo" se entenderá que implican la

inclusión de un entero o grupo de enteros o de etapas declarados, pero no la exclusión de cualquier otro entero o grupo de enteros.

La presente invención define un proceso para generar polinucleótidos monocatenarios (mc) y, en particular, moléculas de ADNmc específicas y la potenciación de la amplificación polinucleotídica en fase sólida, como se define en las reivindicaciones adjuntas. Aún más particularmente, la presente invención emplea una reacción de amplificación que usa cebadores con propiedades de cebado diferenciales en condiciones de reasociación particulares, como se definen en las reivindicaciones adjuntas. Después de un periodo de amplificación exponencial en presencia de condiciones de reasociación permisivas, se alteran las condiciones de reasociación para facilitar el cebado diferencial, dando como resultado una generación eficaz de un ADNmc o análogo nucleotídico que contiene formas del mismo. Las propiedades de reasociación de cebador diferenciales pueden aparecer también por un diseño de cebador particular que ofrece ventajas cinéticas o tanto por reasociación permisiva/no permisiva como diseño de cebador. Por ello, mediante el diseño de cebador, se potencia la participación del cebador de soporte sólido en el cebado respecto a los cebadores en fase acuosa. Por lo tanto, no es necesaria la amplificación asimétrica con sensibilidad comprometida para conseguir altas cargas de amplicón sobre el soporte sólido. La presente invención facilita una amplificación en fase sólida no comprometida y más sensible. Se consigue una alta carga de señal asociada a amplicón sobre el soporte sólido. Los métodos de la presente invención pueden practicarse en el recipiente de reacción de amplificación sin necesidad de manejo o procesamiento de muestra adicional. Convenientemente, aunque no necesariamente, se marca al menos uno de los cebadores con una molécula indicadora capaz de proporcionar una señal identificada.

Se hace referencia al método de la presente memoria como PCR en fase sólida potenciada ("ESP-PCR").

La presente invención contempla, por lo tanto, un método para generar un polinucleótido monocatenario en un recipiente de reacción, comprendiendo dicho método someter un polinucleótido bicatenario diana o su derivado monocatenario a amplificación exponencial mediante la puesta en contacto de una matriz sólida en forma de microesferas o perlas que tienen un cebador inmovilizado en dicha matriz sólida a través de un medio ligador y dos cebadores en fase acuosa con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado es un cebador anidado entre dichos dos cebadores en fase acuosa y tiene una mayor temperatura de fusión respecto a los cebadores acuosos debido a la extensión del desapareamiento entre el cebador inmovilizado y el polinucleótido complementario diana y/o a la presencia de secuencias ajenas o del sitio de complementariedad en el polinucleótido diana;

en el que cada uno de dichos cebadores ceba reacciones de extensión durante dicha amplificación en condiciones de reacción que efectúan la elongación de dicho cebador inmovilizado para facilitar la generación de polinucleótido bicatenario inmovilizado en la matriz sólida, y someter entonces el polinucleótido inmovilizado a condiciones de desnaturalización para generar polinucleótidos monocatenarios inmovilizados y un polinucleótido monocatenario en fase líquida.

Una realización adicional de la invención comprende un método para amplificación en fase sólida de moléculas de ácido nucleico que comprende poner en contacto una matriz sólida en forma de microesferas o perlas que tienen un cebador inmovilizado en dicha matriz sólida a través de un medio ligador y dos cebadores en fase acuosa con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado es un cebador anidado entre dichos dos cebadores en fase acuosa y

tiene una mayor temperatura de fusión respecto a los cebadores acuosos debido a la extensión del desapareamiento entre el cebador inmovilizado y el polinucleótido complementario y/o a la presencia de secuencias ajenas o del sitio de complementariedad en el polinucleótido diana;

en el que cada uno de dichos cebadores ceba reacciones de extensión durante dicha amplificación en condiciones de reacción que efectúan la elongación de dicho cebador inmovilizado.

Se divulga también un método para amplificación en fase sólida de ácidos nucleicos que comprende poner en contacto un soporte sólido que tiene un cebador unido al soporte sólido a través de un medio ligador con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado se selecciona de la lista consistente en:

(i) un cebador que comparte identidad de secuencia con un cebador en fase acuosa, pero que tiene una temperatura de fusión diferente respecto al cebador acuoso; y

(ii) un cebador anidado entre dos cebadores en fase acuosa;

en condiciones de reacción que efectúan la elongación de dicho cebador inmovilizado.

La referencia a "anidado" en el contexto de cebadores incluye cebadores total y parcialmente anidados. El ácido nucleico inmovilizado resultante puede ser mc o bc. La molécula de ácido nucleico bc inmovilizado puede experimentar entonces desnaturalización, generando cualquiera o ambas de una molécula de ácido nucleico mc inmovilizada o una molécula de ácido nucleico mc en fase acuosa.

Otro aspecto descrito en la presente memoria se refiere a un método para generar un polinucleótido monocatenario en un recipiente de reacción, comprendiendo dicho método someter un polinucleótido bicatenario diana o su derivado monocatenario a amplificación exponencial mediante la puesta en contacto de una matriz sólida que tiene un cebador unido a dicha matriz sólida a través de un medio ligador con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado se selecciona de la lista consistente en:

- (i) un cebador que comparte identidad de secuencia con un cebador en fase acuosa, pero que tiene una temperatura de fusión diferente respecto al cebador acuoso; y
- (ii) un cebador anidado entre dos cebadores en fase acuosa;

en condiciones de reacción que efectúan la elongación de dicho cebador inmovilizado para facilitar la generación de polinucleótidos bicatenarios inmovilizados en la matriz sólida, y someter entonces el polinucleótido inmovilizado a condiciones desnaturalizantes para generar polinucleótidos monocatenarios inmovilizados y un polinucleótido monocatenario en fase líquida.

La reacción de amplificación puede ser una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) simétrica o asimétrica, amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), reacción en cadena de la ligasa, endonucleasa de restricción de mellado (RE de mellado), amplificación por SDS o genoma completo, entre otras. Convenientemente, se marca al menos uno de los cebadores en fase acuosa con una molécula indicadora capaz de proporcionar una señal identificable.

El método de la invención es una forma de reacción de amplificación por etapas a las que se hace referencia en la presente memoria como ESP-PCR. En el esquema por etapas pueden "aumentarse las etapas" o "reducirse las etapas" dependiendo de la primera y segunda condiciones de reasociación o el diseño de cebador. Los ejemplos de condiciones de reasociación diferenciales incluyen diferentes temperaturas de reasociación, la extensión del desapareamiento entre el cebador y el polinucleótido complementario diana, la presencia de secuencias ajenas o suplementarias y el diseño de cebador dentro de diferentes sitios de complementariedad en una secuencia nucleotídica diana. En una realización, uno o ambos de los cebadores portan una secuencia nucleotídica "de cola" o "de cabeza" que puede estar relacionada o no por homología con la secuencia polinucleotídica diana, proporcionando una temperatura de fusión diferente en comparación con el otro cebador.

La presente invención puede realizarse también, por lo tanto, usando cebadores portadores de una o más secuencias ajenas o suplementarias para ayudar a reducir el sesgo de amplificación de ácido nucleico.

El proceso de la presente invención tiene un intervalo de aplicaciones subyacentes a la generación de sondas para reacciones de hibridación (tales como transferencias Northern, transferencias Southern, cribado de colección de clones, hibridación *in situ*, hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH) y micromatriz (p.ej., análisis basados en chips, perlas u otras matrices sólidas). El presente método puede usarse también junto con otro proceso de amplificación modificado donde se somete una diana de ADNbc a digestión con exonucleasa 5' a 3' para generar un molde de ADNmc para uso en el presente proceso.

Los métodos divulgados en la presente memoria pueden usarse para marcaje polinucleotídico directo de matrices de fase sólida tales como en la generación de rasgos de micromatrices, el marcaje de placas de microvaloración para análisis de ácido nucleico no basado en gel electroforético, el marcaje de perlas para análisis genéricos no basados en gel electroforético (p.ej., análisis genéricos basados en FACS) y PCR en emulsión antes de regímenes de secuenciación de alto rendimiento o aplicaciones de micromatrices de perlas. Se describen también kits que comprenden un recipiente de reacción y reactivos. El "marcaje" incluye marcar con una molécula indicadora tal como una molécula de quimioluminiscencia o molécula de bioluminiscencia y/o marcar con una molécula de ácido nucleico.

Por ello, se divulgan también sistemas de amplificación que comprenden un componente de reactivo, un componente de ácido nucleico, un componente de soporte físico y un componente de instrucciones. Los componentes del sistema interactúan entre sí generando un producto polinucleotídico monocatenario.

Los métodos divulgados en la presente memoria son también útiles en el marcaje polinucleotídico directo de matrices de fase sólida tales como en un marcaje de placa de microvaloración de generación de rasgos de micromatriz o matriz sólida para análisis de ácido nucleico no basados en gel (p.ej., análisis genéticos basados en FACS) y en amplificación por emulsión antes de regímenes de secuenciación de alto rendimiento o aplicaciones de micromatriz de perlas. La presente invención puede usarse también para generar moléculas de ácido nucleico mc inmovilizadas en un soporte sólido o bien en fase acuosa después de desnaturalizar moléculas de ácido nucleico bc inmovilizadas.

Por ello, se describe un método para marcar una matriz sólida con un polinucleótido monocatenario, comprendiendo el método someter un polinucleótido bicatenario diana o su derivado monocatenario a amplificación exponencial usando cebadores directo e inverso que tienen propiedades de reasociación similares en un primer conjunto de condiciones de reasociación, pero propiedades de reasociación diferenciales en un segundo conjunto de condiciones de reasociación, poner en contacto el producto de amplificación de la amplificación con una matriz

sólida o composición de matrices sólidas que tienen inmovilizado sobre las mismas al menos uno de los cebadores que es capaz de reasociación con una hebra del producto de amplificación en el segundo conjunto de condiciones de reasociación, y alterar las condiciones de reasociación al segundo conjunto de condiciones, facilitando así la amplificación basada en un solo cebador para generar un polinucleótido monocatenario inmovilizado en la matriz sólida.

En otro método para marcar una matriz sólida con un polinucleótido monocatenario divulgado en la presente memoria, el método comprende someter un polinucleótido bicatenario diana o su derivado monocatenario a amplificación exponencial usando cebadores directo e inverso que tienen propiedades de reasociación similares en un primer conjunto de condiciones de reasociación, pero propiedades de reasociación diferenciales en el segundo conjunto de condiciones de reasociación, poner en contacto el producto de amplificación de la amplificación con una matriz sólida o composición de matrices sólidas que tienen inmovilizado sobre las mismas al menos uno de los cebadores que es capaz de reasociarse con una hebra del producto de amplificación en el segundo conjunto de condiciones de reasociación, generando un polinucleótido bicatenario, y desnaturar entonces el polinucleótido bicatenario para generar un polinucleótido monocatenario inmovilizado en la matriz sólida.

Se describe también un método para marcar una matriz sólida que comprende poner en contacto una matriz sólida que tiene un cebador unido a la matriz sólida a través de un medio ligador con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado se selecciona de la lista consistente en:

(i) un cebador que comparte identidad de secuencia con un cebador en fase acuosa, pero que tiene una temperatura de fusión diferente respecto al cebador acuoso; y

(ii) un cebador anidado entre dos cebadores en fase acuosa;

en condiciones de reacción que efectúan la elongación del cebador inmovilizado.

La referencia a una "matriz sólida" incluye una fase sólida, soporte u otra superficie o perla en el que pueda inmovilizarse una molécula de ácido nucleico.

Los métodos anteriormente divulgados incluyen la opción de alterar las condiciones de reasociación al primer conjunto de condiciones, posibilitando "rellenar" el polinucleótido monocatenario para generar polinucleótidos bicatenarios inmovilizados en la matriz sólida.

Por tanto, se describe también un método para generar una matriz sólida o composición de matrices sólidas marcadas con polinucleótidos bicatenarios, comprendiendo dicho método someter un polinucleótido bicatenario diana o su derivado monocatenario a amplificación exponencial usando cebadores directo e inverso que tienen propiedades de reasociación similares en un primer conjunto de condiciones de reasociación, pero propiedades de reasociación diferenciales en un segundo conjunto de condiciones de reasociación, poner en contacto el producto de la amplificación con una matriz sólida o composición de matrices sólidas que tienen inmovilizado en las mismas al menos uno de los cebadores que es capaz de reasociarse con una hebra del producto de amplificación en el segundo conjunto de condiciones de reasociación y alterar las condiciones de reasociación al segundo conjunto para facilitar así la amplificación basada en un solo cebador, generando un polinucleótido monocatenario inmovilizado en dicha matriz sólida; y alterar al primer conjunto de condiciones de reasociación con lo que, en presencia del otro cebador, el polinucleótido inmovilizado monocatenario genera una hebra complementaria y la matriz sólida comprende un polinucleótido dúplex inmovilizado.

En un aspecto adicional del presente método, se desnatura el polinucleótido dúplex tal como por medios químicos o térmicos, generando polinucleótido monocatenario en fase acuosa o polinucleótido monocatenario inmovilizado.

Se divulga también un método para generar una matriz sólida o composición de matrices sólida marcadas con polinucleótidos bicatenarios, comprendiendo el método someter un polinucleótido bicatenario diana o su derivado monocatenario a amplificación exponencial poniendo en contacto una matriz sólida que tiene un cebador unido a dicha matriz sólida a través de un medio ligador con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado se selecciona de la lista consistente en:

(i) un cebador que comparte identidad de secuencia con un cebador en fase acuosa, pero que tiene una temperatura de fusión diferente respecto al cebador acuoso; y

(ii) un cebador anidado entre dos cebadores en fase acuosa;

en condiciones de reacción que efectúan la elongación del cebador inmovilizado.

Pueden emplearse también cebadores anidados junto con condiciones permisivas y no permisivas.

Las abreviaturas usadas en esta memoria descriptiva se definen en la Tabla 1.

Tabla 1

Abreviaturas

| Abreviatura | Definición |
|-------------|--|
| ADNbc | ADN bicatenario |
| FACS | Clasificación celular activada por fluorescencia |
| FISH | Hibridación por fluorescencia <i>in situ</i> |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| SDA | Amplificación por desplazamiento de hebra |
| ADNmc | ADN monocatenario |

Se muestra en la Tabla 2 un compendio de los identificadores de secuencia usados en la presente memoria.

Tabla 2

Identificadores de secuencia

5

| Identificador de secuencia | Secuencia |
|----------------------------|---|
| SEQ ID NO: 1 | Oligonucleótido (Transprobe) |
| SEQ ID NO: 2 | Cebador directo de generación de molde de Cto3 |
| SEQ ID NO: 3 | Cebador inverso de generación de molde de Cto3 |
| SEQ ID NO: 4 | Cebador directo de generación de molde de Ngo |
| SEQ ID NO: 5 | Cebador inverso de generación de molde de Ngo |
| SEQ ID NO: 6 | Cebador directo de generación de molde de Ngps |
| SEQ ID NO: 7 | Cebador inverso de generación de molde de Ngps |
| SEQ ID NO: 8 | Cebador directo "acuoso" de Cto3 |
| SEQ ID NO: 9 | Cebador inverso "acuoso" de Cto3 |
| SEQ ID NO: 10 | Cebador de soporte sólido de SP-PCR de Cto3 |
| SEQ ID NO: 11 | Cebador de soporte sólido de ESP-PCR de Cto3 |
| SEQ ID NO: 12 | Cebador directo "acuoso" de Ngo |
| SEQ ID NO: 13 | Cebador inverso "acuoso" de Ngo |
| SEQ ID NO: 14 | Cebador de soporte sólido de SP-PCR de Ngo |
| SEQ ID NO: 15 | Cebador de soporte sólido de ESP-PCR de Ngo |
| SEQ ID NO: 16 | Cebador directo "acuoso" de Ngps |
| SEQ ID NO: 17 | Cebador inverso "acuoso" de Ngps |
| SEQ ID NO: 18 | Cebador de soporte sólido de SP-PCR de Ngps |
| SEQ ID NO: 19 | Cebador de soporte sólido de ESP-PCR de Ngps |
| SEQ ID NO: 20 | Cebador de <i>opa</i> de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> |
| SEQ ID NO: 21 | Cebador inverso de <i>opa</i> de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> |
| SEQ ID NO: 22 | Cebador de <i>orf3</i> de plásmido críptico de <i>Chlamydia trachomatis</i> |
| SEQ ID NO: 23 | Cebador inverso de <i>Chlamydia trachomatis</i> |

Breve descripción de las figuras

Algunas figuras contienen representaciones o entidades en color. Las fotografías en color están disponibles en el

titular de la patente tras solicitud o en una Oficina de Patentes apropiada. Puede imponerse una tarifa si se obtienen en una Oficina de Patentes.

Las **Figuras 1(i) y (ii)** son representaciones esquemáticas de (i) el esquema de PCR en fase sólida potenciada (ESP-PCR) para la carga de amplicones monocatenarios o bicatenarios sobre un soporte sólido con (ii) diseños de cebador de soporte sólido (1 a 4). Se hace referencia al Ejemplo 1 para una descripción detallada. **(i)**: a- representa el cebador de PCR "directo"; b- representa el cebador "inverso"; c- amplificación exponencial usando, p.ej., los cebadores directo e inverso (p.ej. de PCR); d- cebador de soporte sólido [véase (ii)]; e- muchas copias de bc/soporte sólido; f- muchas copias de mc/soporte sólido; g- (opcional) ciclos con condiciones de reasociación "por etapas" no permisivas de los cebadores a y b; h- (opcional) "relleno"; **(ii)**: a- representa el cebador de PCR "directo"; b- representa el cebador "inverso"; c- diseño de cebador de soporte sólido de PCR en fase sólida de la técnica anterior; d- p.ej. extensión 3', mayor Tm; e- diseños de cebador de soporte sólido de PCR en fase sólida potenciada; f- p.ej., anidado o parcialmente anidado; g- p.ej., anidado o parcialmente anidado, mayor Tm.

La **Figura 2** es una representación esquemática de un mecanismo para cebado de soporte sólido aumentado usando **(B)** ESP-PCR frente a **(A)** SP-PCR estándar. Se incluyen los cebadores "acuosos" directo (flecha) e inverso en cada mezcla de reacción a concentraciones no limitantes, junto con cebador de soporte sólido (esfera ligada a una flecha). Los cebadores "acuosos" toman parte en la PCR convencional generando amplicones (líneas discontinuas). Los cebadores de soporte sólido ceban también reacciones de extensión durante estos ciclos, dando como resultado la carga de producto sobre la superficie de soporte sólido. Sin embargo, en SP-PCR estándar, la implicación del cebador de soporte sólido está inhibida por la competición con un cebador "acuoso" de secuencia coincidente (A), dando como resultado una carga de amplicón relativamente baja. La línea vertical en (A) indica extensión inhibida. La ESP-PCR **(B)** evita tal inhibición al emplear un cebador de soporte sólido anidado de Tm relativamente alta. Las líneas discontinuas representan eventos de extensión.

(A) El cebado de soporte sólido en la secuencia de cebador de soporte sólido de SP-PCR estándar coincide con su contrapartida de cebador "acuoso"; (a)- el cebado del cebador de soporte sólido es superado por su contrapartida de cebador "acuoso"; (b)- amplicón monocatenario; **(B)** el cebado de soporte sólido en cebadores de ESP-PCR está anidado para reducir la competencia entre él y el cebador "acuoso" por unión a amplicón, aprovechando un sitio de unión diferente y el retardo entre la unión del cebador "acuoso" y la unión de polimerasa. Existe también una mayor Tm para elevar su concentración eficaz (a)- el cebado de cebador de soporte sólido es competitivo; (b)- amplicón monocatenario.

30 Descripción detallada

La presente invención está dirigida a una reacción de amplificación modificada que facilita la generación de polinucleótidos monocatenarios (mc) y, en particular, ADNmc inmovilizado en un soporte sólido o en forma inmovilizada o acuosa generada a partir de polinucleótidos (bc) inmovilizados, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención declara en parte el uso de cebadores en una reacción de amplificación que tienen características de reasociación similares en un conjunto de condiciones de reasociación (en las que los cebadores se consideran "equilibrados" y las condiciones de reasociación se consideran "mutuamente permisivas") y características de reasociación diferentes o diferenciales o distintas en otro conjunto de condiciones de reasociación (en las que los cebadores se consideran "no equilibrados" y las condiciones de reasociación se consideran "diferencialmente permisivas"). Las diferentes condiciones de reasociación surgen del diseño de cebador, que posibilita diferentes ventajas cinéticas para el cebado de soporte sólido frente al cebado de oligonucleótido en fase acuosa.

Por ello, un aspecto de la presente invención contempla un método para generar un polinucleótido monocatenario en un recipiente de reacción, comprendiendo dicho método someter un polinucleótido bicatenario diana o su derivado monocatenario a amplificación exponencial mediante la puesta en contacto de una matriz sólida en forma de microsferas o perlas que tienen un cebador inmovilizado en dicha matriz sólida a través de un medio ligador y dos cebadores en fase acuosa con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado es un cebador anidado entre dichos dos cebadores en fase acuosa y tiene una mayor temperatura de fusión respecto a los cebadores acuosos debido a la extensión del desapareamiento entre el cebador inmovilizado y el polinucleótido complementario diana y/o a la presencia de secuencias ajenas o del sitio de complementariedad en el polinucleótido diana;

en el que cada uno de dichos cebadores ceba reacciones de extensión durante dicha amplificación en condiciones de reacción que efectúan la elongación de dicho cebador inmovilizado para facilitar la generación de polinucleótidos bicatenarios inmovilizados en la matriz sólida; y someter entonces el polinucleótido inmovilizado a condiciones desnaturalizantes para generar polinucleótidos monocatenarios inmovilizados y un polinucleótido monocatenario en fase líquida.

Un aspecto adicional de la invención incluye un método para la amplificación en fase sólida de moléculas de ácido nucleico que comprende poner en contacto una matriz sólida en forma de microsferas o perlas que tienen un

- 5 cebador inmovilizado en dicha matriz sólida a través de medios ligadores y dos cebadores en fase acuosa con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado es un cebador anidado entre dichos dos cebadores en fase acuosa y tiene una mayor temperatura de fusión respecto a los cebadores acuosos debido a la extensión del desapareamiento entre el cebador inmovilizado y el polinucleótido complementario diana y/o a la presencia de secuencias ajenas o del sitio de complementariedad en el polinucleótido diana;
- en el que cada uno de dichos cebadores ceba reacciones de extensión durante dicha amplificación en condiciones de reacción que efectúan la elongación de dicho cebador inmovilizado.
- 10 Se divulga también un método para amplificación en fase sólida como se describe anteriormente en la presente memoria.
- La referencia a “anidado” en el contexto de cebadores incluye cebadores total y parcialmente anidados.
- La referencia a “compartir identidad de secuencia” incluye una identidad sustancial así como al menos un 80 % de identidad de secuencia, tal como al menos un 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad.
- 15 Como se indica anteriormente, los cebadores directo e inverso pueden describirse como “equilibrados” o “no equilibrados” con respecto a las propiedades de reasociación, y las condiciones de reasociación se consideran como mutuamente permisivas o diferencialmente permisivas con respecto al efecto sobre los cebadores. De forma similar, el diseño de cebador puede facilitar cebadores diferencialmente permisivos.
- 20 Por ello, cebadores equilibrados o no equilibrados significa que, en un conjunto dado de condiciones o conjunto de cebadores, concretamente condiciones de reasociación mutuamente permisivas o cebadores mutuamente permisivos, ambos cebadores se unen o hibridan de otro modo formando un dúplex con eficacia similar.
- Mientras tanto, en condiciones de reasociación diferencialmente permisivas (concretamente, en un conjunto alternativo de condiciones), los cebadores no están equilibrados puesto que las condiciones pueden favorecer la formación de dúplex y el cebado.
- 25 Por consiguiente, se describe un método para generar un polinucleótido monocatenario inmovilizado en un soporte sólido en un recipiente de reacción, comprendiendo el método realizar una reacción de amplificación de un polinucleótido diana inmovilizado en un soporte sólido en el recipiente usando un par de cebadores directo e inverso equilibrados en condiciones mutuamente permisivas y alterar entonces las condiciones de reasociación a condiciones diferencialmente permisivas, con lo que los cebadores se vuelven no equilibrados, y continuar la
- 30 reacción para generar el producto polinucleotídico monocatenario e inactivar entonces la actividad polimerasa para prevenir sustancialmente la formación de polinucleótidos bicatenarios.
- En el método divulgado anteriormente, puede generarse un polinucleótido bc sobre el soporte sólido, que se somete entonces a condiciones desnaturalizantes (p.ej., por medios químicos o térmicos), generando un polinucleótido mc o polinucleótido en fase acuosa.
- 35 Se divulga un método para marcar una matriz sólida con un polinucleótido monocatenario como se describe anteriormente en la presente memoria.
- La desnaturalización puede ser mediante cualquier medio, incluyendo medios químicos o medios térmicos.
- Se describe otro método para generar un polinucleótido monocatenario en un recipiente de reacción, comprendiendo dicho método someter un polinucleótido bicatenario diana o su derivado monocatenario a amplificación exponencial mediante la puesta en contacto de una matriz sólida que tiene un cebador unido a dicha matriz sólida a través de un
- 40 medio ligador con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado se selecciona de la lista consistente en:
- (i) un cebador que comparte identidad de secuencia con un cebador en fase acuosa pero que tiene una temperatura de fusión diferente respecto al cebador acuoso; y
- 45 (ii) un cebador anidado entre dos cebadores en fase acuosa;
- en condiciones de reacción que efectúan la elongación de dicho cebador inmovilizado para facilitar la generación de un polinucleótido bicatenario inmovilizado en la matriz sólida; y someter entonces el polinucleótido inmovilizado a condiciones desnaturalizantes, generando polinucleótidos monocatenarios inmovilizados y un polinucleótido monocatenario en fase líquida.
- 50 Puede ocurrir entonces también una etapa adicional de someter la mezcla de reacción a un medio de separación de fases.
- En otro procedimiento para generar un polinucleótido monocatenario en un recipiente de reacción que se describe,

el método comprende poner en contacto una matriz sólida que tiene un cebador unido a dicha matriz sólida a través de un medio ligador con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado se selecciona de la lista consistente en:

- 5 (i) un cebador que comparte identidad de secuencia con un cebador de fase acuosa, pero que tiene una temperatura de fusión diferente respecto al cebador acuoso; y
- (ii) un cebador anidado entre dos cebadores en fase acuosa;

en condiciones de reacción que efectúan la elongación del cebador inmovilizado.

10 Preferiblemente, los polinucleótidos son ADN, por ello la presente invención está particularmente dirigida a la generación de ADN_{mc}. Sin embargo, aunque el material de partida sea preferiblemente ADN_{bc}, la presente invención puede usar también ARN_m que se convierte en ADN_{bc} o _{mc} o usar ADN_{mc}. El ADN_{bc} se genera sobre el soporte sólido y se somete entonces a condiciones desnaturalizantes para generar ADN_{mc} inmovilizado o en fase acuosa.

15 Se divulga en la presente memoria otro método de generar ADN_{mc} en un recipiente de reacción, comprendiendo dicho método realizar una reacción de amplificación de un molde de ADN_{mc} diana inmovilizado a partir de una diana de ADN_{bc} o ARN_m en el recipiente de reacción, usando un par de cebadores directo e inverso que tienen cebadores de reasociación similares (equilibrados) en el primer conjunto de condiciones de reasociación (condiciones mutuamente permisivas), pero propiedades de reasociación diferenciales en un segundo conjunto de condiciones de reasociación (condiciones diferencialmente permisivas), en el que se permite proseguir la amplificación en las condiciones de reasociación mutuamente permisivas; alterar las condiciones a condiciones diferencialmente

20 permisivas para desequilibrar los cebadores, facilitando así la amplificación lineal sustancialmente en presencia de solo un único cebador generando producto de ADN_{mc}; e inactivar cualquier actividad polimerasa para reducir o prevenir sustancialmente la formación de ADN_{bc}.

25 Aún otro método de generar ADN_{mc} en un recipiente de reacción descrito en la presente memoria comprende poner en contacto una matriz sólida que tiene un cebador unido a dicha matriz sólida a través de un medio ligador con una muestra en un recipiente de reacción que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado se selecciona de la lista consistente en:

- (i) un cebador que comparte identidad de secuencia con un cebador en fase acuosa pero que tiene una temperatura de fusión diferente respecto al cebador acuoso; y
- (ii) un cebador anidado entre dos cebadores en fase acuosa;
- 30 en condiciones de reacción que efectúan la elongación del cebador inmovilizado.

Las condiciones de reasociación o cebadores permisivos diferenciales frente a mutuamente permisivos se refieren, por ejemplo, a la extensión del desapareamiento, la presencia de secuencias nucleotídicas ajenas "de cabeza" o "de cola" en los cebadores, al sitio de hibridación en el molde diana para formar dúplex o a la presencia de otras características para posibilitar un aumento de etapas o una reducción de etapas para generar condiciones de cebador no equilibrado.

35

El método de la presente invención puede considerarse una modificación de una reacción de amplificación para generar un producto particular. La modificación es el uso de cebadores que están diferencial o mutuamente equilibrados dependiendo del nivel de permisividad de las condiciones de reasociación.

40 Por ello, se describe en la presente memoria una reacción de amplificación modificada en que se emplean cebadores directos e inversos para amplificar exponencialmente un polinucleótido monocatenario de molde tal como ADN_{mc} generado a partir de un polinucleótido bicatenario tal como ADN_{bc} o generado a partir de ARN_m directamente o a través de ADN_c, en la que la modificación comprende seleccionar cebadores que tienen características de reasociación similares en un primer conjunto de condiciones de reasociación y características de reasociación diferenciales en un segundo conjunto de condiciones de reasociación, de tal modo que alterar las condiciones de reasociación al segundo conjunto facilita la amplificación en presencia de un solo cebador, dando

45 como resultado la producción de un polinucleótido sustancialmente monocatenario tal como ADN_{mc}.

Como alternativa, o además, se usa el diseño de cebador para anidar el cebador inmovilizado entre dos cebadores en fase acuosa.

50 Se describe un método para generar un polinucleótido monocatenario en un recipiente de reacción en el que dicho método comprende someter un polinucleótido bicatenario diana o su derivado monocatenario a amplificación exponencial mediante la puesta en contacto de una matriz sólida que tiene un cebador unido a dicha matriz sólida a través de un medio ligador con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado se selecciona de la lista consistente en:

(i) un cebador que comparte identidad de secuencia con un cebador en fase acuosa, pero que tiene una temperatura de fusión diferente respecto al cebador acuoso; y

(ii) un cebador anidado entre dos cebadores en fase acuosa;

5 en condiciones de reacción que efectúan la elongación de dicho cebador inmovilizado para facilitar la generación de un polinucleótido bicatenario inmovilizado en la matriz sólida; y someter entonces el polinucleótido inmovilizado a condiciones desnaturalizantes, generando polinucleótidos monocatenarios inmovilizados y un polinucleótido monocatenario en fase líquida.

10 Este aborda el problema del sesgo de amplificación potencial mediante la incorporación de una secuencia nucleotídica ajena en 5' de la región no de unión a cebador conjugada con una región de unión al molde en 3'. Tales uno o ambos cebadores incorporan la secuencia ajena en 5' (secuencia de cola) que actúa como abrazadera para nivelar la eficacia de amplificación entre homólogos de amplificación. La secuencia de cola puede estar relacionada o no por homología con la secuencia diana.

15 Un método adicional más para generar un polinucleótido monocatenario en un recipiente de reacción descrito en la presente memoria comprende poner en contacto una matriz sólida que tiene un cebador unido a la matriz sólida a través de un medio ligador con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado se selecciona de la lista consistente en:

(i) un polímero que comparte identidad de secuencia con un cebador en fase acuosa, pero que tiene una temperatura de fusión diferente respecto al cebador acuoso; y

(ii) un cebador anidado entre dos cebadores en fase acuosa;

20 en condiciones de reacción que efectúan la elongación del cebador inmovilizado.

Las variaciones de los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen el uso de cebadores anidados y condiciones de fusión diferenciales.

25 La presente invención tiene muchas aplicaciones, incluyendo la generación de sondas nucleotídicas monocatenarias para uso en reacciones de hibridación tales como transferencias Northern, transferencias Southern, cribado de colecciones de clones, hibridación *in situ*, hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH) y análisis de micromatriz tal como usando chips, perlas u otras matrices sólidas. Los cebadores pueden marcarse también con una molécula indicadora capaz de proporcionar una señal identificable. Por ejemplo, puede incorporarse a un cebador un marcaje fluorescente, fosforescente, quimioluminiscente o radiactivo. Los marcajes alternativos incluyen, pero sin limitación, biotina-dUTP, ficoeritrina-dUTP, fluoresceína-dUTP y [α -³²P]-dUTP, incluyendo todos los posibles isómeros de los mismos. Pueden emplearse también ensayos de detección basados en enzimas y químicos.

30 El método de la presente invención puede usarse también en combinación con otras modificaciones de amplificación. Por ejemplo, un sistema de amplificación que emplea una exonucleasa y, en particular, una exonucleasa 5' a 3', para generar un molde de ADNmc a partir de una diana de ADNbc.

35 Por consiguiente, otro método para generar ADNbc en un recipiente de reacción descrito en la presente memoria comprende obtener una diana de ADNbc o una región de una diana de ADNbc para amplificar, en el que dicho ADNbc comprende un extremo 5' recortado o bien un extremo romo, incubar el ADNbc con una exonucleasa 5' a 3' junto con los reactivos requeridos para la amplificación isotérmica de ADN, en el que la exonucleasa 5' a 3' crea un molde de ADNmc que comprende un fragmento de ADNmc 3' a 5' de cada hebra del ADNbc que se usa como molde para amplificación; realizar una reacción de amplificación en el ADNmc usando un par de cebadores directo e inverso que tienen cebadores de reasociación similares (equilibrados) en un primer conjunto de condiciones de reasociación (condiciones mutuamente permisivas), pero propiedades de reasociación diferenciales en un segundo conjunto de condiciones de reasociación (condiciones diferencialmente permisivas), en el que se permite proseguir la amplificación en las condiciones de reasociación mutuamente permisivas; alterar las condiciones a condiciones diferencialmente permisivas para desequilibrar los cebadores, facilitando así la amplificación lineal sustancialmente en presencia de solo un único cebador para generar el producto de ADNmc; e inactivar cualquier actividad polimerasa para reducir sustancialmente o prevenir la formación de ADNbc.

45 Aún otro método para generar ADNmc en un recipiente reactor descrito en la presente memoria comprende obtener una diana de ADNbc o una región de una diana de ADNbc para amplificar, en el que dicho ADNbc comprende un extremo 5' recortado o bien un extremo romo, incubar el ADNbc con una exonucleasa 5' a 3', junto con los reactivos requeridos para la amplificación isotérmica de ADN, en el que la exonucleasa 5' a 3' crea un molde de ADNmc que comprende un fragmento de ADNmc 3' a 5' de cada hebra del ADNbc que se usa como molde para amplificación; y realizar una reacción de amplificación en el ADNmc mediante la puesta en contacto de una matriz sólida que tiene un cebador unido a dicha matriz sólida a través de un medio ligador con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado se selecciona de la lista consistente en:

55 (i) un cebador que comparte secuencia con un cebador en fase acuosa, pero que tiene una temperatura de

fusión diferente respecto al cebador acuoso; y

(ii) un cebador anidado entre dos cebadores en fase acuosa;

en condiciones de reacción que efectúan la elongación del cebador inmovilizado.

5 Es más, el método descrito en la presente memoria puede usarse junto con métodos para reducir el sesgo de amplificación.

10 Por consiguiente, se divulga otro método para generar un polinucleótido monocatenario en un recipiente de reacción, comprendiendo el método realizar una reacción de amplificación de un polinucleótido diana en el recipiente usando un par de cebadores directo e inverso que tienen propiedades de reasociación similares en un primer conjunto de condiciones de reasociación, pero propiedades de reasociación diferenciales en un segundo conjunto de condiciones de reasociación, en el que se permite proseguir la amplificación en dicho primer conjunto de condiciones de reasociación; alterar las condiciones de reasociación al segundo conjunto de condiciones de reasociación para facilitar una aplicación lineal sustancialmente en presencia de solo uno de los cebadores, en el par, e inactivar entonces la actividad polimerasa en la reacción de amplificación para prevenir sustancialmente la formación de polinucleótidos bicatenarios, en el que la etapa de amplificación comprende someter un molde de ácido nucleico de 15 dicha diana polinucleotídica a amplificación usando cebadores directo e inverso, en el que al menos un cebador contiene una secuencia nucleotídica ajena en 5' conjugada con una región cebadora de unión de molde en 3', en el que la secuencia nucleotídica ajena se incorpora a un producto de amplificación después del cebado inicial.

Esta etapa reduce el sesgo de amplificación. Como se indica anteriormente, la secuencia ajena en 5' puede estar relacionada o no con la secuencia diana.

20 Los métodos divulgados en la presente memoria son también útiles en el marcaje polinucleotídico directo de matrices en fase sólida tales como en la generación de rasgos de micromatriz o matriz sólida, el marcaje de placa de microvaloración para análisis de ácido nucleico no basados en gel, el marcaje de perlas para análisis genéticos no basados en gel (p.ej., análisis genéticos basados en FACS) y la amplificación en emulsión antes de regímenes de secuenciación de alto rendimiento o aplicaciones de micromatriz de perlas.

25 Por ello, se describe un método para marcar una matriz sólida con un polinucleótido monocatenario, comprendiendo el método someter el polinucleótido bicatenario diana o sus derivados monocatenarios a amplificación exponencial usando cebadores directo e inverso que tienen propiedades de reasociación similares en un primer conjunto de condiciones de reasociación, pero propiedades de reasociación diferenciales en un segundo conjunto de condiciones de reasociación; poner en contacto el producto amplicón de la amplificación con una matriz sólida o 30 composición de matrices sólidas que tienen inmovilizado sobre las mismas al menos uno de los cebadores que es capaz de reasociarse con una hebra del producto amplicón en el segundo conjunto de condiciones de reasociación; y alterar las condiciones de reasociación al segundo conjunto, facilitando así la amplificación basada en un único cebador para generar un polinucleótido monocatenario inmovilizado en dicha matriz sólida.

35 El método anterior puede comprender opcionalmente además alterar las condiciones de reasociación al primer conjunto de condiciones para posibilitar el "relleno" de los polinucleótidos mc para generar polinucleótido bc inmovilizado en la matriz sólida. En otras palabras, las condiciones se cambian a condiciones permisivas. El polinucleótido bicatenario puede desnaturalizarse entonces generando polinucleótido mc inmovilizado y en fase acuosa.

40 Por ello, se describe un método para generar una matriz sólida o composición de matrices sólidas marcadas con polinucleótido bicatenario, comprendiendo el método someter un polinucleótido bicatenario diana o sus derivados monocatenarios a amplificación exponencial usando cebadores directo e inverso que tienen propiedades de reasociación similares en un primer conjunto de condiciones de reasociación, pero propiedades de reasociación diferenciales en un segundo conjunto de condiciones de reasociación; poner en contacto el producto amplicón de la 45 amplificación con la matriz sólida o composiciones de matrices sólidas que tienen inmovilizado sobre las mismas al menos uno de los cebadores que es capaz de reasociarse con una hebra del producto amplicón en el segundo conjunto de condiciones de reasociación y alterar las condiciones de reasociación al segundo conjunto, facilitando así la amplificación basada en un único cebador para generar un polinucleótido monocatenario inmovilizado en dicha matriz sólida; alterar las condiciones de reasociación al primer conjunto de condiciones con lo que, en presencia del 50 otro cebador, el polinucleótido monocatenario inmovilizado genera una hebra completa o una hebra que hibrida con la hebra inmovilizada, generando una matriz sólida marcada con polinucleótido dúplex.

Se describe un método adicional para generar una matriz sólida o composición de matrices sólidas marcadas con polinucleótidos bicatenarios, comprendiendo dicho método poner en contacto una matriz sólida que tiene un cebador unido a dicha matriz sólida a través de un medio ligador con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado se selecciona de la lista consistente en:

55 (i) un cebador que comparte identidad de secuencia con un cebador en fase acuosa, pero que tiene una temperatura de fusión diferente respecto al cebador inmovilizado; y

(ii) un cebador anidado entre dos cebadores en fase acuosa;

en condiciones de reacción que efectúan la elongación de dicho cebador inmovilizado.

En la descripción de la presente invención, se definen o aclaran los siguientes términos y contenidos.

Se entiende, a menos que se indique otra cosa, la invención en cuestión no está limitada a reactivos, etapas de proceso o aplicaciones o similares específicos, ya que estos pueden variar. Ha de entenderse también que la terminología usada en la presente memoria es con fines de describir realizaciones particulares solo y no pretende ser limitante.

Como se usa en la memoria descriptiva en cuestión, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen aspectos plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una diana” incluye una única diana, así como dos o más dianas; la referencia a “una amplificación” incluye una única amplificación, así como múltiples etapas de amplificación; la referencia al “amplicón” incluye un único amplicón o múltiples o complejos, y demás.

Los términos y símbolos de química de ácidos nucleicos, bioquímica, genética y biología molecular usados en la presente memoria siguen aquellos de los tratados y textos estándares en el campo, p.ej. Kornberg y Baker, *DNA Replication*, Segunda Edición (W.H. Freeman, Nueva York, 1992); Lehninger, *Biochemistry*, Segunda Edición (Worth Publishers, Nueva York, 1975); Strachan y Read, *Human Molecular Genetics*, Segunda Edición (Wiley-Liss, Nueva York, 1999); Eckstein (Ed), *Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach* (Oxford University Press, Nueva York, 1991); Gait (Ed), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1984) y similares.

“Amplicón” significa el producto de una reacción de amplificación de polinucleótido. Es decir, es una población de polinucleótidos, habitual pero no necesariamente bicatenarios, que se replican a partir de una o más secuencias de partida. La una o más secuencias de partida pueden ser una o más copias de la misma secuencia, o pueden ser una mezcla de diferentes secuencias. Los amplicones pueden producirse mediante una variedad de reacciones de amplificación cuyos productos son múltiples duplicados de uno o más ácidos nucleicos diana. Generalmente, las reacciones de amplificación productoras de amplicones son “impulsadas por molde” en que el apareamiento de bases de los reactantes, nucleótidos o bien oligonucleótidos, tienen complementos en un polinucleótido molde que son requeridos para la creación de productos de reacción. En un aspecto, las reacciones impulsadas por molde son extensiones de cebador con una ácido nucleico polimerasa o ligamientos oligonucleotídicos con una ácido nucleico ligasa. Tales reacciones incluyen, pero sin limitación, PCR, reacciones de polimerasa lineal, NASBA, amplificaciones por círculo rodante y similares, divulgadas en las siguientes referencias: Mullis *et al*, patentes de EE.UU. nº 4.683.195, 4.965.188 4.683.202, 4.800.159 (PCR); Gelfand *et al*, patente de EE.UU. nº 5.210.015 (PCR instantánea con sondas “taqman”); Wittwer *et al*, patente de EE.UU. nº 6.174.670; Kacian *et al*, patente de EE.UU. nº 5.399.491 (“NASBA”); Lizardi, patente de EE.UU. nº 5.854.033; Aono *et al*, publicación de patente japonesa nº JP 4-262799 (amplificación por círculo rodante) y similares.

Una reacción de amplificación puede ser una amplificación “instantánea” en que la química de detección permite medir un producto de reacción a medida que avanza la reacción de amplificación. La amplificación puede ser una amplificación asimétrica o simétrica.

Como se usa en la presente memoria, el término “amplificar” significa practicar una reacción de amplificación. Una “mezcla de reacción” o “recipiente de reacción” significa una solución o compartimento que contiene todos los reactantes necesarios para practicar una reacción que pueden incluir, pero sin limitación, agentes de tamponación para mantener el pH a un nivel seleccionado durante una reacción, sales, cofactores, secuestrantes y similares.

“Complementario o sustancialmente complementario” hace referencia a la hibridación o apareamiento de bases o a la formación de un dúplex entre nucleótidos o ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, entre las dos hebras de una molécula de ADNbc o entre un cebador oligonucleotídico y un sitio de unión a cebador en un ácido nucleico monocatenario. Los nucleótidos complementarios son, generalmente, A y T (o A y U), o C y G. Se dice que dos moléculas de ARN o ADN monocatenarias son sustancialmente complementarias cuando los nucleótidos de una hebra, alineados y comparados óptimamente y con las inserciones o deleciones nucleotídicas apropiadas, se aparean con al menos un 80 % de los nucleótidos de la otra hebra, habitualmente al menos aproximadamente 90 a 95 %, y más preferiblemente de aproximadamente 98 a 100 %. Como alternativa, existe una complementariedad sustancial cuando, por ejemplo, una hebra de ADN hibrida en condiciones de hibridación selectivas con su complemento. Típicamente, aparece hibridación selectiva cuando hay al menos aproximadamente un 65 % de complementariedad en un tramo de al menos 14 a 25 nucleótidos, preferiblemente al menos aproximadamente un 75 %, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90 % de complementariedad. Véase Kanehisa *Nucleic Acids Res.* 12: 203, 1984.

“Dúplex” significa que al menos dos oligonucleótidos y/o polinucleótidos que son total o parcialmente complementarios experimentan apareamiento de bases de tipo Watson-Crick entre todos o la mayoría de sus nucleótidos de modo que se forma un complejo estable. Los términos “reasociación” e “hibridación” se usan intercambiamente para significar la formación de un dúplex estable. “Perfectamente coincidente” con referencia a un dúplex significa que las hebras de polinucleótido u oligonucleótido que constituyen el dúplex forman una

estructura bicatenaria entre sí de tal modo que cada nucleótido en cada hebra experimenta apareamiento de bases de Watson-Crick con un nucleótido en la otra hebra.

“Locus genético” o “locus”, con referencia a un genoma o polinucleótido diana, significa una subregión o segmento contiguo del genoma o polinucleótido diana. Como se usa en la presente memoria, locus genético, o locus, puede hacer referencia a la posición de un gen o porción de un gen en un genoma, o puede hacer referencia a cualquier porción contigua de secuencia genómica esté o no dentro de, o asociada con, un gen. Preferiblemente, un locus genético hace referencia a cualquier porción de secuencia genómica desde unas pocas decenas de nucleótidos, p.ej. 10-30 o 10-100, de longitud a unos pocos cientos de nucleótidos, p.ej. 100-1000 o 100-500 de longitud, a unos pocos miles de nucleótidos de longitud, p.ej. 1000-10.000 o 1000-3000 de longitud. En algunos contextos, los loci genéticos pueden hacer referencia a la localización de un nucleótido dentro de un genoma.

“Kit” hace referencia a cualquier sistema de suministro para suministrar materiales o reactivos para llevar a cabo un método de la presente invención. En el contexto de los ensayos de reacción, tales sistemas de suministro incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte o suministro de reactivos de reacción (p.ej., sondas, enzimas, etc. en los envases apropiados) y/o materiales de soporte (p.ej., tampones, instrucciones escritas para practicar el ensayo, etc.) de una localización a otra. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más recintos (p.ej. cajas) que contienen los reactivos de reacción y/o materiales de soporte relevantes. Tales contenidos pueden suministrarse al receptor pretendido conjunta o separadamente. Por ejemplo, un primer envase puede contener una enzima para uso en un ensayo, mientras que un segundo envase contiene sondas. Los kits pueden contener también compartimentos adaptados para contener los reactivos. En un ejemplo, un compartimento comprende una matriz sólida que tiene oligonucleótidos o cebadores o polinucleótidos inmovilizados sobre la misma que participan en la reacción de amplificación. Es un ejemplo de matriz sólida una micromatriz. Por lo tanto, un kit puede ser parte de un sistema de amplificación global que tiene un componente de reactivo, un componente de ácido nucleico, un componente de soporte físico y un componente de instrucciones. La referencia a una “matriz sólida” incluye cualquier forma de confinamiento estructural para la práctica de una reacción de amplificación. Por ello, la PCR en emulsión, por ejemplo, se considera como una forma de matriz sólida donde se realiza la PCR en las diversas fases de la emulsión.

“Micromatriz” hace referencia a un soporte en fase sólida que tiene una superficie plana que porta una matriz de ácidos nucleicos, comprendiendo cada miembro de la matriz copias idénticas de un oligonucleótido o polinucleótido inmovilizados en una región o sitio definido espacialmente, que no se superponen con aquellos de otros miembros de la matriz; es decir, las regiones o sitios son espacialmente discretos. Los sitios de hibridación definidos espacialmente pueden ser adicionalmente “direccionables” en que su localización y la identidad de su oligonucleótido inmovilizado son conocidos o predeterminados, por ejemplo antes de su uso. Típicamente, los oligonucleótidos o polinucleótidos son monocatenarios y están enlazados covalentemente con el soporte en fase sólida, habitualmente por un extremo 5' o extremo 3'. La densidad de regiones no superpuestas que contienen ácidos nucleicos en una micromatriz es típicamente mayor de 100 por cm^2 , y más preferiblemente mayor de 1000 por cm^2 . La tecnología de micromatrices se divulga en las siguientes referencias: Schena (Ed), *Microarrays: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 2000); Southern, *Current Opin. Chem. Biol.*, 2: 404-410, 1998.

Una “micromatriz aleatoria” hace referencia a una micromatriz cuyas regiones espacialmente discretas de oligonucleótidos o polinucleótidos no están espacialmente direccionadas. Es decir, la identidad de los oligonucleótidos o polinucleótidos enlazados no es observable, al menos inicialmente, por su localización. En un aspecto, las micromatrices aleatorias son matrices planas de microperlas en las que cada microperla tiene enlazada una única clase de complemento de marcaje de hibridación, tal como de un conjunto de oligonucleótidos de hibridación cruzada mínima. Igualmente, después de la formación, pueden identificarse las microperlas o los oligonucleótidos de las mismas en una matriz aleatoria de una variedad de modos, incluyendo por marcajes ópticos, p.ej. relaciones de tinte fluorescente o puntos cuánticos, forma, análisis de secuencia o similares.

“Nucleósido”, como se usa en la presente memoria, incluye los nucleósidos naturales, incluyendo la formas 2'-desoxi y T-hidroxilo, p.ej. como se describe en Kornberg y Baker, *DNA Replication*, 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992).

“Reacción en cadena de la polimerasa” o “PCR” significa una reacción para la amplificación *in vitro* de secuencias de ADN específicas mediante la extensión de cebador simultánea de hebras complementarias de ADN. En otras palabras, la PCR es una reacción para elaborar múltiples copias o duplicados de un ácido nucleico diana flanqueado por sitios de unión a cebador, comprendiendo dicha reacción una o más repeticiones de las siguientes etapas: (i) desnaturalizar el ácido nucleico diana; (ii) reasociar cebadores con los sitios de unión a cebador y (iii) extender los cebadores por una ácido nucleico polimerasa. Habitualmente, la reacción se cicla a diferentes temperaturas en presencia de trifosfatos de nucleósido. Habitualmente, la reacción se cicla a diferentes temperaturas optimizadas para cada etapa en un instrumento ciclador térmico. Las temperaturas, duraciones de cada etapa y tasas de cambio entre etapas particulares dependen de muchos factores bien conocidos por los especialistas en la materia, p.ej. ejemplificados por las referencias: McPherson *et al.* (Eds), *PCR: A Practical Approach* y *PCR2: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991 y 1995, respectivamente). Por ejemplo, en una PCR convencional que usa ADN polimerasa Taq, puede desnaturalizarse un ácido nucleico diana bicatenario a una temperatura >90 °C, reasociándose los cebadores a una temperatura en el intervalo de 35-90 °C. El término “PCR” engloba las formas derivadas de la reacción incluyendo, pero sin limitación, RT-PCR, PCR instantánea, PCR anidada, PCR cuantitativa, PCR

multiplexada y similares. Los volúmenes de reacción oscilan de unos picos cientos de nanolitros, p.ej. 200 nl, a unos pocos cientos de microlitros, p.ej. 200 µl. "PCR de transcripción inversa" o "RT-PCR" significa una PCR que está precedida por una reacción de transcripción inversa que convierte un ARN diana en un ADN monocatenario complementario, que se amplifica entonces, p.ej. Tecott *et al*, patente de EE.UU. n° 5.168.038. "PCR instantánea" significa una PCR para la que la cantidad de producto de reacción, concretamente amplicón, se monitoriza a medida que prosigue la reacción. Hay muchas formas de PCR instantánea que difieren principalmente en las químicas de detección usadas para monitorizar el producto de reacción, p.ej. Gelfand *et al*, patente de EE.UU. n° 5.210.015 ("taqman"); Wittwer *et al*, patentes de EE.UU. n° 6.174.670 y 6.569.627 (tintes intercalantes); Tyagi *et al*, patente de EE.UU. n° 5.925.517 (balizas moleculares). Las químicas de detección para PCR instantánea se revisan en Mackay *et al*, *Nucleic Acids Research*, 30: 1292-1305, 2002. "PCR anidada" significa una PCR en dos pasos en la que el amplicón de la primera PCR se convierte en la muestra para una segunda PCR usando un nuevo conjunto de cebadores, al menos uno de los cuales se une a una localización interior del primer amplicón.

"Polinucleótido" u "oligonucleótido" se usan intercambiamente y cada uno significa un polímero lineal de monómeros nucleotídicos. Los monómeros constituyentes de polinucleótidos y oligonucleótidos son capaces de unirse específicamente a un polinucleótido natural mediante un patrón regular de interacciones de monómero a monómero, tales como el apareamiento de bases de tipo Watson-Crick, apilamiento de bases, apareamiento de bases de tipo Hoogsteen o Hoogsteen inverso o similares.

Siempre que un polinucleótido u oligonucleótido se represente por una secuencia de letras (mayúsculas o minúsculas) tal como "ATGCCCTG", se entenderá que los nucleótidos están en el orden 5' a 3' de izquierda a derecha y que "A" denota desoxiadenosina, "C" denota desoxicitidina, "G" denota desoxiguanosina y "T" denota timidina, "I" denota desoxinosina y "U" denota uridina, a menos que se indique otra cosa o resulte obvio por el contexto.

"Cebador" significa un oligonucleótido, natural o bien sintético, que es capaz, tras formar un dúplex con un molde polinucleotídico, de actuar como punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico y de extenderse desde su extremo 3' a lo largo del molde de forma que se forme un dúplex extendido.

La extensión de un cebador se lleva a cabo habitualmente con una ácido nucleico polimerasa tal como una ADN o ARN polimerasa. La secuencia de nucleótidos añadidos en el proceso de extensión se determina por la secuencia del polinucleótido de molde. Habitualmente, los cebadores se extienden por una ADN polimerasa. Los cebadores tienen habitualmente una longitud en el intervalo de 14 a 40 nucleótidos, o en el intervalo de 18 a 36 nucleótidos. Los cebadores se emplean en una variedad de reacciones de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo reacciones de amplificación lineal que usan un único cebador, o PCR que emplean dos o más cebadores. Las directrices para seleccionar las longitudes y secuencias de cebadores para aplicaciones particulares son bien conocidas por los especialistas en la materia, como se evidencia por las siguientes referencias: Dieffenbach (Ed), *PCR Primer: A Laboratory Manual*, 2ª edición (Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 2003).

"Muestra" significa una cantidad de material de una fuente biológica, ambiental, médica o de paciente en que se busca la detección o medida de ácidos nucleicos diana. Por un lado, pretende incluir un espécimen o cultivo (p.ej., cultivos microbiológicos). Por otro lado, pretende incluir muestras tanto biológicas como ambientales. Una muestra puede incluir un espécimen de origen sintético. Las muestras biológicas pueden ser animales, incluyendo humanas, de fluido, sólido (p.ej. heces) o tejido, así como de alimentos líquidos y sólidos y productos e ingredientes alimentarios tales como artículos lácteos, verduras, carne y subproductos cárnicos y desechos. Las muestras biológicas pueden incluir materiales tomados de un paciente incluyendo, pero sin limitación, cultivos, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, semen, aspirados de aguja y similares. Las muestras biológicas pueden obtenerse de todas las diversas familias de animales domésticos, así como de animales salvajes o silvestres incluyendo, pero sin limitación, animales tales como ungulados, osos, peces, roedores, etc. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia de superficie, suelo, agua y muestras industriales, así como muestras obtenidas de instrumentos, aparatos, equipos, utensilios, artículos desechables y no desechables del procesamiento de alimentos y lácteo. Estos ejemplos no han de considerarse como limitantes de los tipos de muestra aplicables a la presente invención.

"Soporte sólido", "soporte", "soporte en fase sólida" y "matrices sólidas" se usan intercambiamente y hacen referencia a un material o grupo de materiales que tienen una superficie o superficies rígidas o semirrígidas. Según los métodos de la invención, el soporte o soportes sólidos tomarán la forma de perlas o microesferas. Los soportes pueden ser también de múltiples tamaños para permitir la clasificación.

La molécula de ácido nucleico/cebador sobre el soporte sólido puede inmovilizarse directamente o a través de un puente químico o nucleotídico. Todas tales químicas de acoplamiento están englobadas por el término "medio ligador".

55 Ejemplo 1

Esquema de PCR asimétrica por etapas

La Figura 1(i) proporciona una representación esquemática de una PCR en fase sólida potenciada para la carga de un amplicón monocatenario o bicatenario sobre el soporte sólido. Se representan la región de ADN para amplificar y

los amplicones derivados de esta por líneas continuas. Las líneas discontinuas representan la secuencia fuera de la región diana. El cebador **a** (señalado por una flecha) representa el cebador de PCR “directo” y **b** representa el cebador “inverso”. En este ejemplo, el soporte sólido se representa por un círculo. Obsérvese que el soporte sólido está conjugado con muchas copias de cebador de soporte sólido, aunque por simplicidad esquemática se representa solo un cebador de soporte sólido. Las líneas onduladas representan la secuencia ligadora no específica de diana. Las flechas más largas y gruesas ilustran los cebadores de mayor T_m específicos de diana. El cebador **b** tiene la inclusión opcional de una molécula de marcaje, p.ej. flúor, para uso en sistemas de detección directa (señalada por una estrella). Las moléculas de marcaje podrían incluirse opcionalmente como sustratos de reacción, p.ej. dNTP marcados con flúor. El cebador **b** se diseña opcionalmente de tal modo que, en un intervalo de temperatura dado, la unión del cebador **b** a la secuencia diana y el cebado de la extensión de polimerasa a partir del cebador sea más eficaz que el cebador **a**. Un ejemplo de un método de diseño para conseguir este fin incluye un cebador **b** que tiene una mayor temperatura de fusión específica de diana que el cebador **a** de tal modo que, a una temperatura de reasociación aumentada, el cebador **b** se une y ceba, mientras que el cebador **a** no lo hace. Otro ejemplo es cuando el cebador **a** exhibe una “supresión de franja” por debajo de una cierta temperatura, de tal modo que por debajo de esta temperatura el cebador **b** se une y ceba mientras que el cebador **a** no lo hace.

El cebador **a** y el cebador **b** se emplean como parte de un régimen de PCR convencional o asimétrica con la inclusión del cebador de soporte sólido.

Se practica una PCR convencional con la inclusión del cebador **a**, el cebador **b** y el cebador conjugado con soporte sólido en condiciones de termociclado permisivas para todos los cebadores. El cebador de soporte sólido se diseña de tal modo que, en un intervalo de temperatura dado, el cebado de extensión de polimerasa del cebador sea más competitivo que el cebador **a**. Los diseños de cebador de soporte sólido señalados en la Figura 1: (ii)2, (ii)3 e (ii)4 ofrecen una participación del cebador de soporte sólido mejorada frente a la técnica anterior ((ii)1) en virtud, p.ej., de una mayor T_m y/o de estar anidado o parcialmente anidado. (ii)1 de la técnica anterior usa una secuencia específica de diana que coincide idénticamente con el correspondiente cebador “acuoso”, junto con una secuencia ligadora en 5'. En los ejemplos ilustrados aquí, (ii)2 incluye una extensión de secuencia 3' para elevar la T_m frente a (ii)1, (ii)3 incluye una secuencia específica de diana que esta anidada o parcialmente anidada con respecto a (ii)1, aunque la T_m específica de diana es similar a (ii)1, e (ii)4 incluye una secuencia específica de diana que está anidada o parcialmente anidada con respecto a (ii)1 y tiene una mayor T_m específica de diana que (ii)1. Estas diferencias de diseño ofrecen beneficios cinéticos a la participación por el cebador de soporte sólido frente a la técnica anterior, de tal modo que se facilita la carga en soporte sólido del amplicón.

Durante los ciclos térmicos tardíos, opcionalmente, las etapas de reasociación pueden tener una temperatura elevada o rebajada frente a los ciclos tempranos, de tal modo que el cebador de soporte sólido siga reasociándose con la diana eficazmente pero el cebador “acuoso” **a** competidor no lo haga. Por ejemplo, cuando un cebador de soporte sólido exhibe una mayor T_m específica de diana que el cebador **a**, a temperaturas elevadas el cebador de soporte sólido ceba pero el cebador **a** no lo hace. Otro ejemplo es cuando el cebador **a** exhibe “supresión de franja” por debajo de una cierta temperatura, de tal modo que por debajo de esta temperatura el cebador de soporte sólido se une y ceba, mientras que el cebador **a** no lo hace. El cebador **b** puede diseñarse para tener características de cebado similares al cebador al cebador **a** o al cebador de soporte sólido. El empleo de muchos de tales ciclos tardíos en que el cebador **b** no se une a la diana eficazmente posibilita la generación de un amplicón de soporte sólido monocatenario. El empleo de tales ciclos tardíos en que el cebador **b** se une a la diana eficazmente posibilita la generación de un amplicón de soporte sólido bicatenario. El empleo de tales ciclos tardíos en que el cebador **b** no se une a la diana eficazmente, seguido de condiciones permisivas para la unión del cebador **b**, posibilita la generación de un amplicón de soporte sólido bicatenario.

Opcionalmente, el amplicón de soporte sólido bicatenario puede convertirse posteriormente en un amplicón de soporte sólido monocatenario, p.ej. mediante desnaturalización térmica o química y lavado de la fase en solución o, p.ej., procesamiento con exonucleasa.

Ejemplo 2

Esquema de PCR asimétrica por etapas en fase sólida

La PCR en fase sólida potenciada (ESP-PCR) es un mecanismo diseñado en la presente memoria para combinar la alta sensibilidad de la PCR “acuosa” simétrica no comprometida con una carga de soporte sólido eficaz. La ESP-PCR altera el mecanismo mediante el que se carga el amplicón sobre el soporte sólido al retirar la competición entre el cebador “acuoso” y el cebador de soporte sólido para aumentar el cebado del cebador de soporte sólido (Figura 2). El cebador “acuoso” no tiene que estar limitado, posibilitando por tanto un sistema más sensible. Además, el diseño de cebador inherente a la ESP-PCR ofrece el potencial opcional de aplicar ciclos térmicos tardíos a temperaturas de reasociación permisivas exclusivamente a la unión de cebador de soporte sólido.

Este ejemplo detalla una ESP-PCR practicada usando un material de soporte sólido, densidad superficial de cebador y secuencia “ligadora” constantes con el objetivo e intención de diseccionar los beneficios mecánicos de ESP-PCR frente a SP-PCR.

Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos se adquirieron en Integrated DNA Technologies (Coralville, EE.UU.). Los oligonucleótidos de generación de molde y oligonucleótidos de ESP-PCR y SP-PCR se enumeran a continuación. La secuencia del oligonucleótido de medida de la eficacia de conjugación (Transprobe) era:

5' /5AmMC6/GTCCATAGCTGTCCTCCCT (SEQ ID NO: 1). Todas las secuencias oligonucleotídicas se enumeran en la dirección 5' a 3'. /5Phos/, /5AmMC6/, /5Acryd/ e /iAmMC6T/ indican fosfato 5', modificador amina 5', acridita 5' y grupos modificadores de amina internos, respectivamente. Ngo, Ngps y Ct03 hacen referencia a *opa* de *Neisseria gonorrhoea*, *pitS* de *Neisseria gonorrhoea* y *orf3* de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis*, respectivamente. Las regiones subrayadas indican secuencia "ligadora" no diana incluida en la porción 5' del cebador de soporte sólido para facilitar la presentación de la porción específica de diana durante la "carga de amplicón". Esta secuencia "ligadora", compartida por los cebadores de soporte sólido de SP-PCR y ESP-PCR, se usaba también como diana de hibridación de Transprobe para la valoración de la carga de cebador sobre soporte sólido después de conjugación.

Conjugación de oligonucleótido con microesferas de sílice

15 Se funcionalizaron microesferas de sílice de 6,8 µm de diámetro (Bangs Laboratories, Fishers, EE.UU.) con grupos sulfhidrilo antes de conjugar con oligonucleótidos. La bibliografía de producto de Integrated DNA Technologies detalla la reacción entre un tiol de soporte sólido y oligonucleótidos modificados con un grupo 5' acridita (disponible en línea en el sitio web:

20 <http://scitools.idtdna.com/support/technical/TechnicalBulletinPDF/StrategiesforAttachingOligonucleotidestoSolidSupports.pdf>). Después de la conjugación, se procesaron las microesferas mediante una serie de 5 etapas de centrifugación/lavado para retirar cualquier oligonucleótido no unido antes de suspensión en tampón a 1 mg/ml. Se valoraron los niveles de conjugación de oligonucleótidos con microesferas mezclando 1 µl de suspensión homogénea de microesferas con 5 µl de tampón que contiene cloruro de sodio 50 mM y 0,5 µl de Transprobe marcada con Alexafluor647 10 µM (a una relación 2:1 de Transprobe total:Transprobe marcada con Alexafluor647).

25 Se adquirió Alexafluor647 en Molecular Probes (Mount Waverley, Australia). Se sometieron las mezclas de hibridación al siguiente perfil térmico de "hibridación": 90 °C durante 30 segundos, seguido de enfriamiento a una tasa de 1 °C/10 segundos hasta 20 °C. Después de la hibridación, se añadieron 120 µl de tampón antes del análisis por FACSArray (Becton Dickinson, North Ryde, Australia). Los datos presentados en este estudio derivaban de este protocolo de ensayo simplificado. Las microesferas pueden someterse a un lavado más riguroso después de PCR con el efecto de rebajar la fluorescencia de fondo para los "controles sin molde", sin alterar la intensidad de señal para muestras de ESP-PCR o SP-PCR con molde. Se valoraron las microesferas por triplicado en paralelo en la misma tanda de instrumentación usando los parámetros de voltaje siguientes: FCS 550, SSC 400, Far Red 100, Yellow 650, NIR 200, Red 700, umbral de FCS 20000. Se analizaron los ficheros *.fcs usando FCS Express v.3 para determinar la fluorescencia roja mediana. Se aplicó la prueba de t de Student para demostrar la igual conjugación de

30 cebador de soporte sólido-microesfera entre los pares diana de ESP-PCR y SP-PCR.

Generación de molde

Se usó ADN de *Chlamydia trachomatis* serovar E como molde de una PCR usando los cebadores directo e inverso de generación de molde de Ct03 para procurar un amplicón que incluía la región diana de los oligonucleótidos de ESP-PCR/SP-PCR. Se purificó en gel de agarosa el amplicón usando un kit de extracción en gel Qiaquick (registrado) (Qiagen, Doncaster, Australia). Se aproximó el rendimiento por valoración por electroforesis en gel del producto frente al patrón de ADN Hyperladder IV (Bioline, Alexandria, Australia). De forma similar, se usó la cepa ATCC 43069 de *Neisseria gonorrhoea* como molde de PCR para generar dianas Ngo y Ngps usando sus cebadores de generación de diana respectivos.

ESP-PCR y SP-PCR

45 Se practicaron todas las ESP-PCR y SP-PCR en volúmenes de reacción de 20 µl usando 1 unidad de HotStarTaq [Registrado] (Qiagen, Doncaster, Australia). Se suplementó el tampón de reacción HotStarTaq (Registrado) con Mg²⁺ y dNTP (New England Biolabs, Genesearch, Arundel, Australia), procurando concentraciones de reacción de 2 mM y 200 µM, respectivamente. Se incluyeron en las reacciones 1 µl de cebador directo "acuoso" 5 µM, 1 µl de cebador inverso acuoso 5 µM (marcado con Alexafluor647 con una relación de 2:1 de oligonucleótido total-oligonucleótido marcado con flúor) y 1 µl de suspensión de microesferas conjugadas con cebador de soporte sólido 1 mg/ml. Se incluyeron microesferas conjugadas con cebador de soporte sólido de SP-PCR o ESP-PCR en reacciones SP-PCR o ESP-PCR, respectivamente. Se practicaron las ESP-PCR y SP-PCR por triplicado en paralelo usando las mismas mezclas maestras. En cada caso, se agruparon cebadores y microesferas según diana y molde. Las reacciones incluían 40000 copias de moldes de Ct03, 40000 copias de Ngo o 400000 copias de Ngps, respectivamente. El perfil térmico empleado era el siguiente: 94 °C 15 minutos, seguido de 30 ciclos de [90 °C 30 segundos, 44 °C 1 minuto, 72 °C 1 minuto], seguido de 5 ciclos de [90 °C, 44 °C 2 minutos, 72 °C 2 minutos].

Análisis de citometría de flujo de ESP-PCR y SP-PCR

Después de la PCR en fase sólida, se transfirieron los 5 µl inferiores a 120 µl de tampón en una placa de

ES 2 665 690 T3

microvaloración de 96 pocillos. Se generaron ficheros *.fcs por FACSArray con los mismos ajustes de instrumentación que se describen anteriormente. Se determinaron las cifras de fluorescencia roja mediana usando FCS Express v.3.

Electroforesis en gel

- 5 Después del muestreo de citometría de flujo, se analizaron 8 µl de productos de PCR residual usando geles de 3 % de agarosa/TAE frente a 1,5 µg de una escala de 100 pb de New England Biolabs (Genesearch Arundel, Australia).

Oligonucleótidos de generación de molde.

| | |
|--|---------------------------|
| Cebador directo de generación de molde de Cto3 | GATGCGGAAAAAGCTTACCAG |
| Cebador inverso de generación de molde de Cto3 | GGGCTTAGAATCACCTTCTCG |
| Cebador directo de generación de molde de Ngo | GCGGATTAACAAAAATCAGGACAA |
| Cebador inverso de generación de molde de Ngo | TAATCTGCCGCTATCCTCCAG |
| Cebador directo de generación de molde de Ngps | TTTTTTGCCGGCGTGGCATCC |
| Cebador inverso de generación de molde de Ngps | ATCGATATATTATTTCCACCGGAAC |

Oligonucleótidos de ESP-PCR y SP-PCR.

| | |
|--|--|
| Cebador directo "acuoso" de Cto3 | /5Phos/ACAGACCCTTCTCTAGGT |
| Cebador inverso "acuoso" de Cto3 | /5AmMC6/AATTCTAATACGACTCACTATAGGGC TTTTGGGTGTGACTGTG |
| Cebador de soporte sólido de SP-PCR de Cto3 | <u>/5Acryd/AAT/iAmMC6T/AAAGGGAGGACAGCTAT</u> <u>GGACACAGACCCTTCTCTAGGT</u> |
| Cebador de soporte sólido de ESP-PCR de Cto3 | <u>/5Acryd/AAT/iAmMC6T/AAAGGGAGGACAGCTAT</u> <u>GGACCACTAATAAAATTCAATGCAACGGGTTAT</u> TCACTC |
| Cebador directo "acuoso" de Ngo | /5Phos/GCCATATTGTGTTGAAACAC |
| Cebador inverso "acuoso" de Ngo | /5AmMC6/AATTCTAATACGACTCACTATAGGGG TTTGACCGGTTAAAAAAGA |
| Cebador de soporte sólido de SP-PCR de Ngo | <u>/5Acryd/AAT/iAmMC6T/AAAGGGAGGACAGCTAT</u> <u>GGACGCCATATTGTGTTGAAACAC</u> |
| Cebador de soporte sólido de ESP-PCR de Ngo | <u>/5Acryd/AAT/iAmMC6T/AAAGGGAGGACAGCTAT</u> <u>GGACCCCGATATAATCCGCCCTTCAACATCAGT</u> G |
| Cebador directo "acuoso" de Ngps | /5Phos/AATGAGGCAAATTAGGCCT |
| Cebador inverso "acuoso" de Ngps | /5AmMC6/AATTCTAATACGACTCACTATAGGGC TTGCAAACCCTTAAAAGAC |
| Cebador de soporte sólido de SP-PCR de Ngps | <u>/5Acryd/AAT/iAmMC6T/AAAGGGAGGACAGCTAT</u> <u>GGACAATGAGGCAAATTAGGCCT</u> |
| Cebador de soporte sólido de ESP-PCR de Ngps | <u>/5Acryd/AAT/iAmMC6T/AAAGGGAGGACAGCTAT</u> <u>GGACAAATCAAGCGGTAAGTGATTTCCACGGC</u> |

Ensayo multiplexado para la detección de *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* por ESP-PCR

Se conjugaron los cebadores de soporte sólido de ESP-PCR de Ngo y ESP-PCR de Cto3 enumerados anteriormente con microesferas de sílice (Bangs Laboratories) de 5,6 µm de diámetro y 6,81 µm de diámetro, respectivamente, se lavaron y se combinaron a 1 mg/ml por población de perlas. Se incluyó 1 microlitro de suspensión de perlas combinadas en reacciones de ESP-PCR que incluyen los cebadores de *opa* de *Neisseria gonorrhoeae*: 5'-GGCAACGMC GTACCGGTTT-3', (SEQ ID NO: 20) y el cebador 5' marcado con Alexafluor647 5'-ACGTCACAGTTTACGCGTTTGACCGGTTAAAAAAGATTTTCAC-3' (SEQ ID NO:21) y los cebadores de *orf3* de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis*: 5'-AGCTTTTAAACA ACTTTTCCAATCACTA-3' (SEQ ID 122) y 5' marcado con Alexafluor647 5'-ACGACTCACTATAGGGTCCCAGAGCTTTTGGGTGTG-3' (SEQ ID 123). Se usaron ADN genómico de la cepa ATCC 43069 de *Neisseria gonorrhoea* o plásmido portador de la región de amplicón que cubre *orf3* de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* enumerado anteriormente (véase Generación de molde), con la inclusión de 5 ng de ADN genómico humano de Jurkat como molde de PCR frente a ADN genómico solo humano o controles de agua. Se practicaron las reacciones en un volumen total de 20 µl usando dos unidades de PlatinumTaq [Trademark] (Invitrogen) usando los siguientes parámetros de ciclación: 94 °C 2 minutos, seguido de 50 ciclos de [90 °C 30 segundos, 55 °C 1 minuto, 72 °C 1 minuto], seguido de 72 °C 5 minutos. Se centrifugaron/lavaron microesferas de sílice dos veces con tampón, antes del análisis por FACSArray usando los ajustes de instrumentación enumerados anteriormente.

Después de la conjugación, se lavaron concienzudamente las microesferas antes de suspensión en tampón a 1 mg/ml. Se valoraron los niveles de conjugación de oligonucleótidos con microesferas hibridando "Transprobe" marcada con Alexafluor647 (Molecular Probes) con secuencia ligadora de cebador de soporte, seguido de análisis de citometría de flujo. Se valoraron las microesferas por triplicado en paralelo en la misma tanda de instrumentación usando los parámetros de voltaje siguientes: FCS 550, SSC 400, Far Red 100, Yellow 650, NIR 200, Red 700, umbral de FCS 20000. Se analizaron los ficheros *.fcs usando FCS Express v.3 para determinar la fluorescencia roja mediana. Se aplicó la prueba de t de Student para demostrar una igual conjugación de cebador de soporte sólido/microesferas entre pares de conjugación de ESP-PCR y SP-PCR (*opa* de *Ng*, P= 0,919; *pilS* de *Ng*, P= 0,759; *orf* de *CtCP*, P= 0,829). Como tal, cualquier aumento observado en la carga de amplicón después de la aplicación de ESP-PCR frente a SP-PCR sería debido a un cebador de soporte sólido mejorado en lugar de a niveles de conjugación de cebador de soporte sólido diferenciales.

Se practicaron experimentos comparativos entre ESP-PCR y SP-PCR en volúmenes de reacción de 20 µl usando 1 unidad de HotStarTaq [Registrado] (Qiagen). Se suplementó el tampón de reacción HotStarTaq (Registrado) con Mg²⁺ y dNTP (New England Biolabs), procurando concentraciones de reacción de 2 mM y 200 µM, respectivamente. Se incluyeron en las reacciones 1 µl de cebador directo "acuoso" 5 µM, 1 µl de cebador inverso "acuoso" 5 µM (marcado con Alexafluor647 con una relación de 2:1 de oligonucleótido total-oligonucleótido marcado con flúor) y 1 µl de suspensión de microesferas conjugadas con cebador de soporte sólido 1 mg/ml. Se incluyeron las microesferas conjugadas con cebador de soporte sólido de ESP-PCR o SP-PCR en reacciones ESP-PCR o SP-PCR, respectivamente. Se practicaron ESP-PCR y SP-PCR por triplicado en paralelo usando las mismas mezclas maestras. En cada caso, se agruparon cebadores y microesferas según diana y molde (ADNbc lineal que incluye regiones de unión a cebador). Las reacciones incluían 40000 copias de *orf3* de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis*, 40000 copias de moldes de *opa* de *Neisseria gonorrhoea* o 400000 copias de *pilS* de *Neisseria gonorrhoea*, respectivamente, o controles sin molde (para demostrar los niveles de fluorescencia de fondo) y empleaban el siguiente perfil térmico: 94 °C 15 min, seguido de 30 ciclos de [90 °C 30 s, 44 °C 1 min, 72 °C 1 min], seguido de 5 ciclos de [90 °C, 44 °C 2 min, 72 °C 2 min]. Después de la PCR en fase sólida, se transfirieron los 5 µl inferiores a 120 µl de tampón en una placa de microvaloración. Se generaron los ficheros *.fcs por FACSArray con los mismos ajustes de instrumentación que se describen anteriormente. Se determinaron las cifras de fluorescencia roja mediana usando FCS Express v.3.

La ESP-PCR daba como resultado una carga de amplicón en soporte sólido notablemente aumentada frente a SP-PCR en las tres dianas valoradas (Tabla 3), con una fuerte significación estadística: *opa* de *Ng* (9,89 veces, P= 0,0000661), *pilS* de *Ng* (2,14 veces, P= 0,001095) y *orf3* de *CtCP* (1,41 veces, P= 0,000935). Los valores de P se refieren a la hipótesis nula de que no hay diferencia en la carga de amplicón entre ESP-PCR y SP-PCR. Los aumentos en veces hacen referencia a la variación de UFR de ESP-PCR/UFR de SP-PCR. La variación en el aumento en veces entre dianas no era inesperada a causa de las variaciones inherentes en las eficacias de hibridación entre oligonucleótidos y el hecho de que están implicados eventos de hibridación competitiva complejos. A pesar de esta variación, la ESP-PCR era universalmente beneficiosa entre las dianas estudiadas. Los amplicones "acuosos" no unidos a microesferas de los mismos recipientes de reacción usados para medidas de citometría de flujo eran de igual rendimiento entre todas las dianas después de ESP-PCR frente a SP-PCR como se valora por electroforesis en gel de agarosa. Los rendimientos de producto "acuoso" eran también idénticos con o sin microesferas en la mezcla de reacción, indicando que las microesferas de sílice conjugadas con cebadores de soporte sólido no comprometían la eficacia de amplificación. Después de la ESP-PCR, se lavó el soporte sólido concienzudamente mediante etapas de centrifugación e intercambio de tampón múltiples y se usó como molde de reacciones de "reamplificación" de ciclo limitado que incluyen cebadores "acuosos" usados anteriormente y una

versión “acuosa” del cebador de soporte sólido. Se observaron productos de banda única de tamaños correspondientes a aquellos esperados de los productos derivados de cebador de soporte sólido y cebado de cebador inverso “acuoso” tras electroforesis en gel, indicando que los productos de soporte sólido de ESP-PCR eran específicos. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que la ESP-PCR era exitosa para conseguir los objetos duales de no comprometer la amplificación “en fase acuosa” y aumentar la carga de superficie de soporte sólido con amplicón respecto a la SP-PCR estándar de manera específica.

Estos beneficios observados son debidos a mecanismos de carga en que: (i) se aumenta la concentración eficaz de soporte sólido en virtud de su Tm relativamente alta. La PCR lineal después de exponencial (LATE-PCR) mejora la generación de productos monocatenarios por PCR asimétrica (Sánchez *et al*, *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 101: 1933-1938,2004). En este enfoque, se empleó una concentración limitada “de unión más estrecha” de cebador para aumentar su “concentración eficaz” en la reacción, basándose en la relación entre la Tm del cebador y la concentración del cebador descrita por la fórmula de “vecino más cercano” (SantaLucia, *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 95: 1460-1465, 1998). En ESP-PCR, se aplica este principio al cebador de soporte sólido. Un cebador de soporte sólido “de unión más estrecha” tiene una “concentración eficaz” aumentada y una cinética de unión y cebado mejorada; (ii) se anida el cebador de soporte sólido con respecto a su contrapartida “acuosa”.

Puesto que el cebador de soporte sólido reconoce un sitio de unión diferente al cebador directo “acuoso”, se retira la competición directa para unión a amplicón. En ESP-PCR, al contrario que SP-PCR, para inhibir el cebado de soporte sólido por el “bloqueo” del sitio de unión a cebador de soporte sólido, es necesario que el cebador directo “acuoso” se una al molde de amplicón y que la polimerasa encuentre y se una posteriormente a este sustrato, y que siga la polimerización en un corto espacio de tiempo. Tanto en SP-PCR estándar como en SP-PCR asimétrica, la simple unión del cebador acuoso con su sitio de unión a cebador es suficiente para inhibir el cebado de soporte sólido. En el método de abrazadera de PCR, la amplificación se bloquea específicamente mediante la inclusión de sondas de ácido peptidonucleico interno (anidado) o ácido nucleico bloqueado (Domínguez y Kolodney, *Oncogene* 24: 6830-6834, 2005; Orum *et al*, *Nucleic Acids Res.* 21: 5332-5336, 1993). Análogamente al cebador de soporte sólido de ESP-PCR, las sondas de bloqueo del enfoque de abrazadera de PCR se unen al amplicón antes de que hayan tenido la ocasión de ocurrir la unión al cebador y la polimerización.

Aplicando aún los principios de ESP-PCR, usando cebadores “acuosos” y parámetros de termociclado, se detectaron 5 genomas de *Neisseria gonorrhoea* y 5 equivalentes genómicos de *Chlamydia trachomatis* por reacción de ESP-PCR multiplexada única mediante FACSArray. Este enfoque usaba cebadores de soporte sólido conjugados con microesferas de sílice de diferentes diámetros para facilitar la discriminación por citometría de flujo. Se hicieron moldes de las reacciones con ADN genómico de *Neisseria gonorrhoea* y plásmido que contiene la región diana de *Chlamydia trachomatis* con la inclusión de ADN genómico humano de Jurkat frente a solo ADN genómico humano de Jurkat o agua.

Tabla 3

Carga de amplicón en soporte sólido frente a SP-PCR

| Diana | SP-PCR de control sin molde | SP-PCR | ESP-PCR de control sin molde | ESP-PCR |
|---------------------|-----------------------------|-------------------|------------------------------|--------------------|
| <i>opa de Ng</i> | 37,18 UFR | 52,98 UFR (1,12) | 44,91 UFR | 523,74 UFR (15,24) |
| <i>pilS de Ng</i> | 40,68 UFR | 74,36 UFR (1,78) | 39,60 UFR | 159,09 UFR (9,92) |
| <i>orf3 de CtCP</i> | 41,79 UFR | 209,84 UFR (5,10) | 38,89 UFR | 295,39 UFR (8,33) |

Carga aumentada de microesferas de sílice con amplicón marcado con fluorescencia roja después de ESP-PCR frente a SP-PCR. UFR hace referencia a unidades de fluorescencia relativa. Los números entre paréntesis representan el error estándar de la media de series por triplicado.

Se compara ESP-PCR con SP-PCR, empleando microesferas de sílice como soporte sólido, entre un intervalo de dianas clínicamente relevantes: *opa* (*opa de Ng*) y *pilS* (*pilS de Ng*) de *Neisseria gonorrhoea* y *orf3* de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* (*orf3 de CtCP*) [McLeod *et al*, *Infection and Immunity* 67: 3469-3480, 1999; Comanducci *et al*, *J Gen Microbiol* 139: 1083-1092, 1993].

Brevemente, se prepararon cebadores de soporte sólido de ESP-PCR y SP-PCR como sigue: se funcionalizaron microesferas de sílice de 6,8 µm de diámetro (Bangs Laboratories) con grupos sulfhidrilo antes de conjugar con oligonucleótidos modificados con un grupo acridita.

Ejemplo 3**ESP-PCR y SP-PCR “por etapas térmicas” o “sin etapas”**

Se establecieron protocolos por etapas térmicas o sin etapas en paralelo para la diana *orf3* de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* como parte del experimento descrito en el Ejemplo 2. Para la PCR “sin etapas”, se empleó el perfil térmico 44-44: 94 °C 15 min seguido de [30 ciclos de 90 °C 30 segundos, 44 °C 1 minuto, 72 °C 1 minuto] seguido de [5 ciclos de 90 °C, 44 °C 2 minutos, 72 °C 2 minutos]. Para la PCR “por etapas”, se empleó el perfil térmico 44-60: 94 °C 15 min seguido de [30 ciclos de 90 °C 30 segundos, 44 °C 1 minuto, 72 °C 1 minuto] seguido de [5 ciclos de 90 °C, 60 °C 2 minutos, 72 °C 2 minutos]. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Después de la PCR en fase sólida, se transfirieron los 5 µl inferiores a 120 µl de tampón en una placa de microvaloración de 96 pocillos. Se generaron los ficheros *.fcs empleando BD FACSArray que usa los mismos ajustes instrumentales que se describen en el Ejemplo 2. Se determinaron las cifras de fluorescencia roja mediana usando FCS Express v.3.

Después del muestreo citométrico de flujo, se procesaron 8 µl de productos de PCR residual en geles de agarosa al 3 % p/v/TAE frente a 1,5 µg de escala de 100 pb de New England Biolabs (Genesearch, Arundel, Australia).

Se estudiaron los beneficios potenciales de una “etapa térmica” óptima como parte del protocolo de ESP-PCR (44-60). La mayor temperatura de reasociación durante los ciclos de PCR tardíos mejoraba la carga de superficie de amplicón de *orf3* de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* (aumento de 1,15 veces). (prueba de t de Student, probabilidad de que los resultados sean iguales: P= 0,0124) frente a un protocolo de ESP-PCR térmico “sin etapas” (44-44).

Se valoraron por citometría de flujo perfiles electroforéticos en gel de amplicones no unidos a microesferas de los mismos recipientes de reacción. En todos los casos, se observaron rendimientos comparables de productos de PCR “en fase acuosa”, sugiriendo que las diferencias en la carga de amplicón en microesferas no estaban influidas por el rendimiento del producto de PCR “en fase acuosa”. No había diferencias observables entre los rendimientos de producto acuoso con o sin microesferas incluidas en la mezcla de reacción.

Tabla 4**ESP-PCR y SP-PCR “por etapas térmicas” o “sin etapas”**

| Diana (protocolo térmico) | SP-PCR de control sin molde | SP-PCR | ESP-PCR de control sin molde | ESP-PCR |
|---|-----------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------------|
| <i>orf3</i> de Ct 44-44 (“sin etapas”) | 41,79 UFR | 209,84 UFR (5,10) | 38,89 UFR | 295,39 UFR (8,33) |
| <i>orf3</i> de Ct 44-60 (“por etapas”) | 42,17 UFR | 246,79 UFR (15,08) | 39,24 UFR | 339,93 UFR (6,06) |

Carga aumentada de microesferas de sílice con amplicón marcado con fluorescencia roja después de ESP-PCR “por etapas térmicas” frente a ESP-PCR “sin etapas”. *orf3* de Ct hace referencia al *orf3* de plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis*. UFR hace referencia a unidades de fluorescencia relativa. Los números entre paréntesis representan el error estándar de la media de series por triplicado.

Los especialistas en la materia apreciarán que la invención descrita en la presente memoria y definida en las reivindicaciones adjuntas es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Ha de entenderse que la invención incluye todas tales variaciones y modificaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. La invención incluye también todas las etapas, rasgos, composiciones y compuestos a los que se hace referencia o se indican en esta memoria descriptiva, individual o colectivamente, y a todas y cada una de las combinaciones de dos cualesquiera o más de dichas etapas o rasgos que entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Bibliografía

Aono *et al*, pub. de patente japonesa nº JP 4-262799

Comanducci *et al*, *J Gen Microbiol* 139: 1083-1092, 1993

Dieffenbach (Ed), *PCR Primer: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 2003

- Domínguez y Kolodney, *Oncogene* 24: 6830-6834, 2005
- Eckstein (Ed), *Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach*, Oxford University Press, Nueva York, 1991
- Gait (Ed), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1984
- Gyllensten y Erlich, *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 85: 7652-7656 1998
- 5 Higuchi *et al*, *Nucl. Acids Res.* 25: 5685, 1989
- Kaltenboeck *et al*, *Biotechniques.* 12: 164-171, 1992
- Kanehisa *Nucleic Acids Res.* 12: 203, 1984
- Kornberg y Baker, *DNA Replication*, Segunda edición, W.H. Freeman, Nueva York, 1992
- Lehninger, *Biochemistry*, Segunda edición, Worth Publishers, Nueva York, 1975
- 10 McLeod *et al*, *Infection and Immunity* 67: 3469-3480, 1999
- McPherson *et al.* (Eds), *PCR: A Practical Approach* and *PCR2: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1991
- McPherson *et al.* (Eds), *PCR: A Practical Approach* and *PCR2: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1995
- Mackay *et al*, *Nucleic Acids Research*, 30: 1292-1305, 2002
- Orum *et al*, *Nucleic Acids Res.* 21: 5332-5336, 1993
- 15 Sánchez *et al*, *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 101: 1933-1938, 2004
- SantaLucia, *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 95: 1460-1465, 1998
- Schena (Ed), *Microarrays: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 2000)
- Southern, *Current Opin. Chem. Biol.*, 2: 404-410, 1998
- Shchepinov *et al*, *Nuc. Acids. Res.* 25: 4447-4454 1997
- 20 Strachan y Read, *Human Molecular Genetics*, Segunda edición, Wiley-Liss, Nueva York, 1999
- Tecott *et al*, patente de EE.UU. nº 5.168.038

Listado de secuencias

- <110> PARK, Daniel Jonathan (En EE.UU. sólo)
- POETTER, Karl Frederick (En EE.UU. sólo)
- 25 KHAN, Zaheer (En EE.UU. sólo)
- <120> Generación de moléculas de ácido nucleico
- <130> 30468980/EJH
- <150> AU 2007900508
- <151> 2007-02-02
- 30 <150> AU 2007904458
- <151> 2007-08-17
- <160> 23
- <170> Patent In versión 3.4
- <210> 1
- 35 <211> 19
- <212> ADN
- <213> artificial
- <220>
- <223> Oligonucleótido (Transprobe)
- 40 <400> 1
- gtccatagct gtcttcct 19

<210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial

5 <220>
 <223> Cebador directo de generación de molde de Cto3

<400> 2
 gatgcggaag aagcttacca g 21

10 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de generación de molde de Cto3

15 <400> 3
 gggcttagaa tcaccttctc g 21

<210> 4
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Cebador directo de generación de molde de Ngo

<400> 4
 gcggattaac aaaaatcagg acaa 24

25 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Cebador inverso de generación de molde de Ngo

30 <400> 5
 taatctgccg ctatcctcca g 21

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Cebador directo de generación de molde de Ngps

40 <400> 6
 tttttgccc gcgtgcatc c 21

<210> 7
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> artificial

45 <220>
 <223> Cebador inverso de generación de molde de Ngps

<400> 7
 atcgatatat tattccacc ggaac 25

50 <210> 8
 <211> 18
 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Cebador directo 'acuoso' de Cto3

<400> 8

5 acagaccctt ctctaggt 18

<210> 9

<211> 43

<212> ADN

<213> artificial

10 <220>

<223> Cebador inverso 'acuoso' de Cto3

<400> 9

aattctaata cgactcacta tagggctttt ggggtgact gtg 43

<210> 10

<211> 43

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador de soporte sólido de SP-PCR de Cto3

20 <400> 10

aattaaaggg aggacagcta tggacacaga cccttctcta ggt 43

<210> 11

<211> 60

<212> ADN

25 <213> artificial

<220>

<223> cebador de soporte sólido de ESP-PCR de Cto3

<400> 11

aattaaaggg aggacagcta tggaccacta ataaaattca atgcaacggg ttattcactc 60

30 <210> 12

<211> 20

<212> ADN

<213> artificial

<220>

35 <223> Cebador directo 'acuoso' de Ngo

<400> 12

gccatattgt gttgaaacac 20

<210> 13

<211> 46

40 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Cebador inverso 'acuoso' de Ngo

<400> 13

45 aattctaata cgactcacta taggggttg accggtaaa aaaaga 46

<210> 14

<211> 45

<212> ADN

<213> artificial

50 <220>

<223> Cebador de soporte sólido de SP-PCR de Ngo

<400> 14
aattaaaggaggacagcta tggacgccat attgtgtga aacac 45

5 <210> 15
<211> 55
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de soporte sólido de ESP-PCR de Ngo

10 <400> 15
aattaaaggaggacagcta tggaccccgataataatccgc ccttcaacat cagtg 55

<210> 16
<211> 19
<212> ADN
15 <213> artificial

<220>
<223> Cebador directo 'acuoso' de Ngps

<400> 16
aatgaggcaa attaggcct 19

20 <210> 17
<211> 45
<212> ADN
<213> artificial

<220>
25 <223> Cebador inverso 'acuoso' de Ngps

<400> 17
aattctaata cgactcacta tagggcttgc aaacccttaa aagac 45

30 <210> 18
<211> 44
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador de soporte sólido de SP-PCR de Ngps

35 <400> 18
aattaaaggaggacagcta tggacaatga ggcaaattag gcct 44

<210> 19
<211> 54
<212> ADN
<213> artificial

40 <220>
<223> Cebador de soporte sólido de ESP-PCR de Ngps

<400> 19
aattaaaggaggacagcta tggacaaatc aagcggtaag tgattccca cggc 54

45 <210> 20
<211> 19
<212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Cebador opa de Neisseria gonorrhoeae

50 <400> 20

ES 2 665 690 T3

ggcaacgmcg tacgggtt 19

<210> 21
<211> 44
<212> ADN
5 <213> artificial

<220>
<223> 5' marcado con Alexafluor647

<400> 21
acgtcacagt ttacgggtt gaccggtaa aaaaagatt tcac 44

10 <210> 22
<211> 26
<212> ADN
<213> artificial

<220>
15 <223> Cebador de orf3 de plásmido críptico de Chlamydia trachomatis

<400> 22
agctttaac aacttccaa tcacta 26

<210> 23
<211> 36
20 <212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> 5' marcado con Alexafluor647

<400> 23
25 acgactcact atagggtccc agagctttg ggtgtg 36

REIVINDICACIONES

1. Un método para generar un polinucleótido monocatenario en un recipiente de reacción, comprendiendo dicho método someter un polinucleótido bicatenario diana o su derivado monocatenario a amplificación exponencial mediante la puesta en contacto de una matriz sólida en forma de microesferas o perlas que tienen un cebador inmovilizado en dicha matriz sólida a través de un medio ligador y dos cebadores en fase acuosa con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado es un cebador anidado entre dichos dos cebadores en fase acuosa y tiene una mayor temperatura de fusión respecto a los cebadores acuosos debido a la extensión de desapareamiento entre el cebador inmovilizado y el polinucleótido complementario diana y/o a la presencia de secuencias ajenas o del sitio de complementariedad en el polinucleótido diana;
- 5 en el que cada uno de dichos cebadores ceba reacciones de extensión durante dicha amplificación en condiciones de reacción que efectúan la elongación de dicho cebador inmovilizado, facilitando la generación de polinucleótido bicatenario inmovilizado en la matriz sólida; y someter entonces el polinucleótido inmovilizado a condiciones desnaturizantes para generar polinucleótidos monocatenarios inmovilizados y un polinucleótido monocatenario en fase líquida.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, que comprende además una etapa de separación de fases para aislar polinucleótido monocatenario inmovilizado o en fase acuosa.
3. Un método para la amplificación en fase sólida de moléculas de ácido nucleico que comprende poner en contacto una matriz sólida en forma de microesferas o perlas que tienen un cebador inmovilizado en dicha matriz sólida a través de un medio ligador y dos cebadores en fase acuosa con una muestra que comprende al menos una molécula de ácido nucleico, en el que el cebador inmovilizado es un cebador anidado entre dichos dos cebadores en fase acuosa y tiene una mayor temperatura de fusión respecto a los cebadores acuosos debido a la extensión del desapareamiento entre el cebador inmovilizado y el polinucleótido complementario diana y/o a la presencia de secuencias ajenas o del sitio de complementariedad en el polinucleótido diana;
- 20 en el que cada uno de dichos cebadores ceba reacciones de extensión durante dicha amplificación en condiciones de reacción que efectúan la elongación de dicho cebador inmovilizado.
- 25 4. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho método comprende un primer y un segundo conjunto de condiciones de reacción en el que dicho primer conjunto de condiciones de reacción son mutuamente permisivas, permitiendo la elongación de todos dichos cebadores, y dicho segundo conjunto de condiciones de reacción son diferencialmente permisivas y efectúan la elongación de dicho cebador inmovilizado.
- 30 5. El método de la reivindicación 4, en el que dicha muestra se pone en contacto con dichos dos cebadores en fase acuosa en dicho primer conjunto de condiciones de reacción, y el producto de amplificación de los mismos se pone en contacto con dicha matriz sólida en dicho segundo conjunto de condiciones de reacción.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los cebadores acuosos se incluyen en la reacción a concentraciones no limitantes.
- 35 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el cebador inmovilizado comprende una secuencia nucleotídica de cabeza o de cola que está relacionada por homología con el polinucleótido complementario diana, proporcionando así una mayor temperatura de fusión para el cebador inmovilizado.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la diana para amplificar comprende un extremo 5' recortado o bien un extremo romo que se incuba con una exonucleasa 5' a 3', generando un molde polinucleotídico monocatenario.
- 40 9. El método de la reivindicación 8, en el que la exonucleasa se incuba junto con los reactivos requeridos para amplificación isotérmica.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que al menos uno de los cebadores está marcado con una molécula indicadora capaz de proporcionar una señal identificable.
- 45 11. El método de la reivindicación 10, en el que al menos uno de los cebadores en fase acuosa está marcado con una molécula indicadora capaz de proporcionar una señal identificable.
12. El método de la reivindicación 10 u 11, en el que dicha molécula indicadora es un marcaje fluorescente, fosforescente, quimioluminiscente, bioluminiscente o radiactivo.
- 50 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que dicha molécula indicadora es un nucleótido marcado fluorescentemente.
14. El método de la reivindicación 13, en el que dicho nucleótido marcado fluorescentemente es ficoeritrina-dUTP o fluoresceína-dUTP.

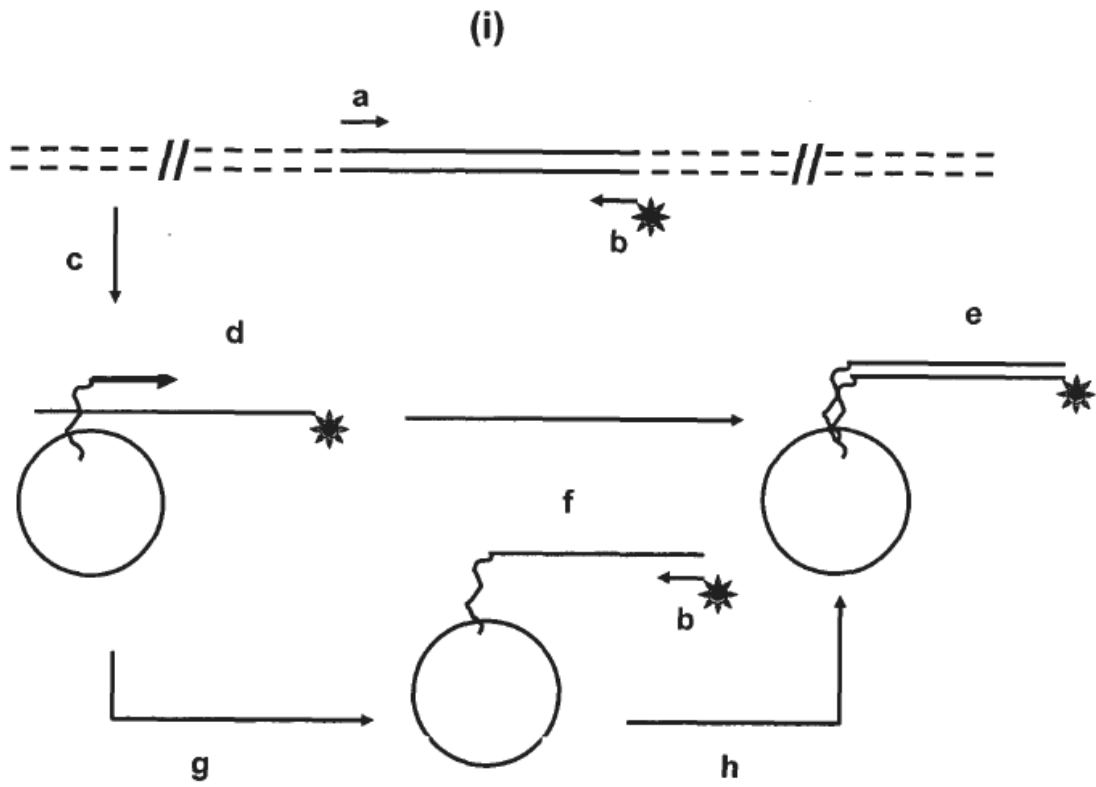


Figura 1(i)

(ii)

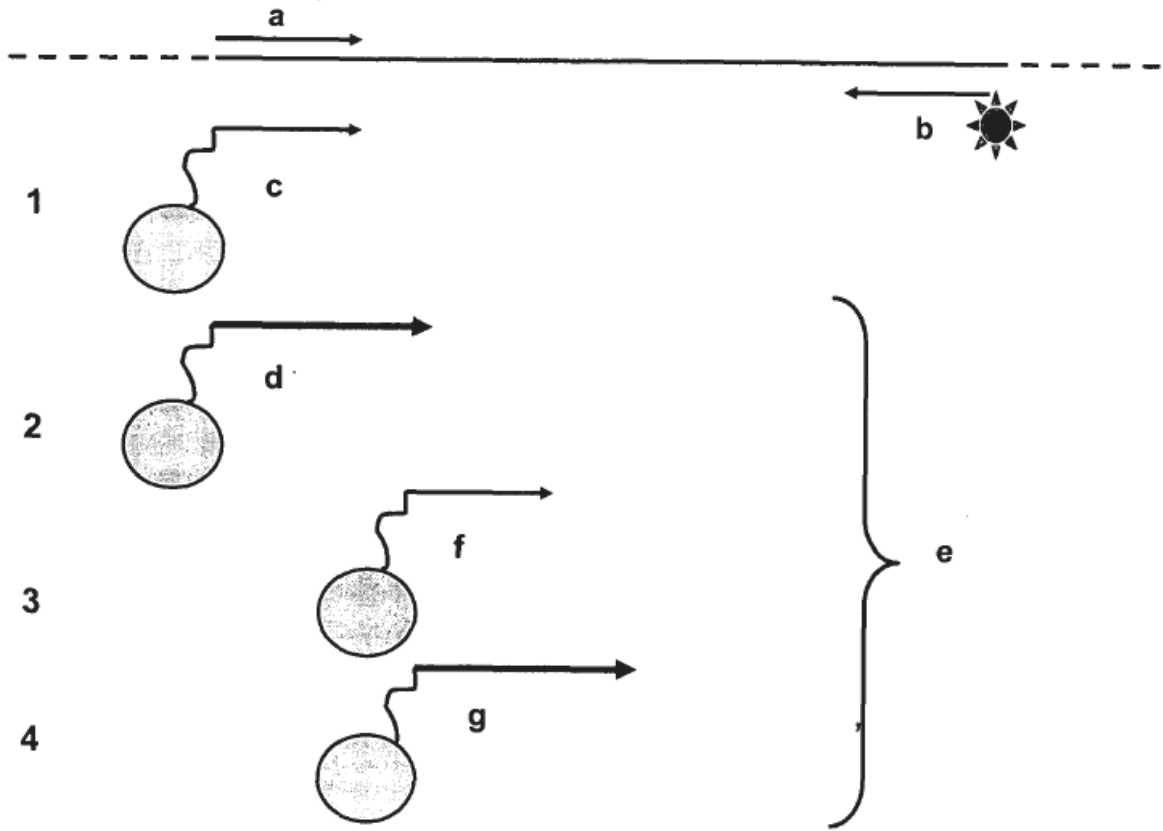


Figura 1(ii)

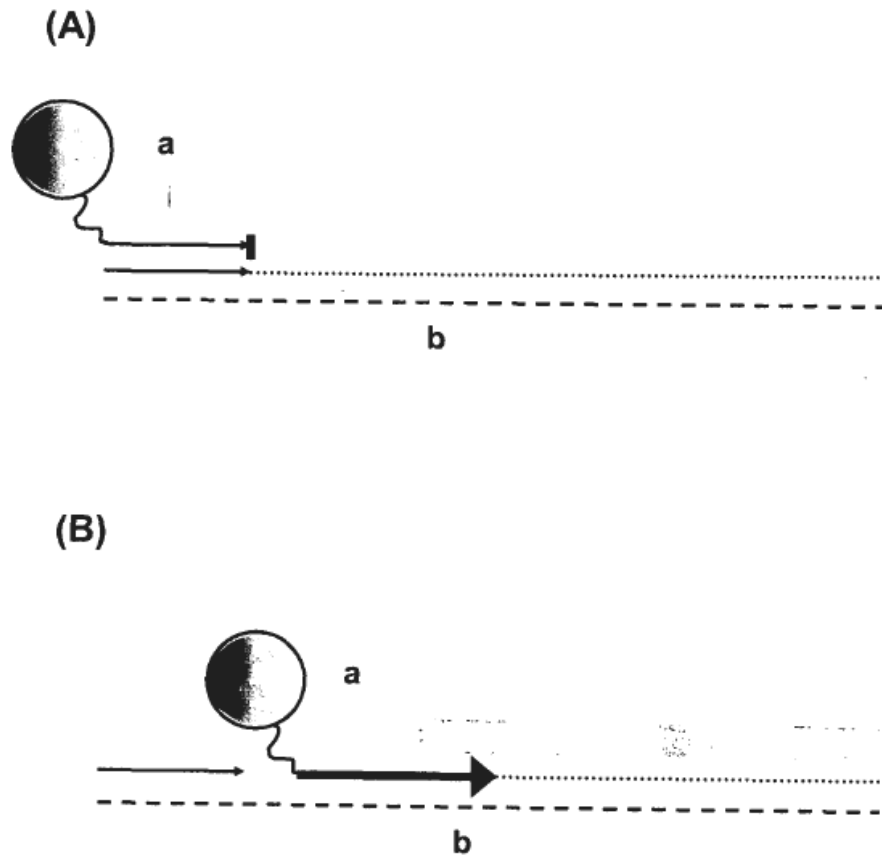


Figura 2