

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 401**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6848 (2008.01)

C12Q 1/6853 (2008.01)

C12Q 1/689 (2008.01)

C12Q 1/6823 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2014 PCT/GB2014/052213**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15008091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2014 E 14748264 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 3022318**

54 Título: **Cebadores modificados para amplificación y detección de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

19.07.2013 GB 201312995

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2019

73 Titular/es:

**ATLAS GENETICS LIMITED (100.0%)
Derby Court Epsom Square, White Horse
Business Park
Trowbridge, Wiltshire BA14 0XG, GB**

72 Inventor/es:

**ADLERSTEIN, DANIEL;
PEARCE, DAVID M.;
DIXON, ANNA y
FAKANYA, WELLINGTON**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 697 401 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).

DESCRIPCION

Cebadores modificados para amplificación y detección de ácidos nucleicos

5 CAMPO TÉCNICO

La invención se refiere a métodos para detectar la presencia de ácidos nucleicos particulares en una muestra.

10 ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Los métodos para amplificar ácidos nucleicos son bien conocidos en la técnica.

15 La detección de productos de ácidos nucleicos amplificados se puede llevar a cabo de una manera no específica que simplemente detecta la presencia de ácido nucleico de cadena doble (por ejemplo, mediante el uso de un colorante intercalante de ADN de cadena doble como el bromuro de etidio o SYBR-verde) . Alternativamente, se puede llevar a cabo una detección semi-específica del producto resolviendo el peso molecular aproximado del producto, por ejemplo, realizando una electroforesis de los productos de la reacción antes de la detección. Alternativamente, hay una serie de métodos de detección específicos de secuencias que típicamente implican la
20 hibridación de una sonda de ácido nucleico específica de secuencia a la región amplificada o que miden la degradación de la sonda concomitante con la amplificación de la secuencia objetivo y hacen uso de la actividad de exonucleasa de ácido nucleico de la polimerasa de ácido nucleico.

25 Un problema asociado con la detección de productos de PCR amplificados usando sondas específicas de secuencia se debe al hecho de que la PCR produce productos amplificados de cadena doble. Por lo tanto, para que una sonda específica de secuencia sea capaz de hibridar con la cadena del producto amplificado con la que es complementaria, las cadenas del producto amplificado de cadena doble deben separarse antes de que pueda tener lugar la hibridación. Para que la sonda específica de secuencia sea capaz de desplazar la cadena complementaria del producto amplificado, es posible aumentar la concentración de la sonda en la mezcla de detección. Sin embargo, usando concentraciones altas de sonda en la mezcla de detección aumenta el ruido y como resultado disminuye la
30 relación de señal a ruido.

Una manera de evitar los problemas asociados con la producción de un producto de la amplificación de cadena doble es usar el método conocido en la técnica como amplificación de ácidos nucleicos asimétrica, como la
35 PCR asimétrica. La PCR asimétrica implica el uso de concentraciones de cebador desiguales, es decir, uno de los cebadores está presente en exceso, y el otro cebador de la pareja de cebadores no está presente en exceso. Por lo tanto, el producto de la amplificación comprende predominantemente la cadena del producto de la amplificación que se relaciona con una versión extendida del cebador que está presente en exceso.

40 La PCR asimétrica se emplea, por ejemplo, en la WO 2011/073675 en un ensayo microbiano. Sin embargo, en la técnica se sabe que la PCR asimétrica es menos eficiente que la PCR simétrica o equilibrada en la que la concentración de los cebadores directo e inverso es igual. Esto se debe al hecho de que una vez que el cebador que no está presente en exceso se agota, el cebador que está en exceso forma un producto de cadena sencilla con una cinética de reacción lineal en lugar de exponencial.

45 La WO 94/16090 divulga un método para generar moléculas de ADN de cadena sencilla usando una exonucleasa de 5' a 3'.

50 Un objeto de la invención es proporcionar un método para amplificar un ácido nucleico que proporcione una relación de señal a ruido aumentada sin comprometer la eficiencia del método de detección.

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas 1 a 14.

55 DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han proporcionado un nuevo método de amplificación como se muestra en la Fig. 1. En el método de amplificación, uno de los dos cebadores comprende por lo menos un nucleótido modificado (ver Fig. 1a). La amplificación del ácido nucleico objetivo procede entre los dos cebadores, para proporcionar un producto de la amplificación de ácido nucleico de cadena doble. El primer cebador que tiene por lo menos un nucleótido modificado (también denominado "un cebador modificado") se extiende para producir una primera cadena que incluye el
60 nucleótido modificado. El segundo cebador se extiende para producir una segunda cadena (ver Fig. 1b). Luego se proporciona una exonucleasa de 5' a 3' que es específica para ácidos nucleicos de cadena doble y que es capaz de hidrolizar la segunda cadena pero es incapaz de hidrolizar la primera cadena en la región de por lo menos un nucleótido modificado. Por lo tanto, la región amplificada de la primera cadena no se hidroliza por la exonucleasa. Por lo tanto, se proporciona un ácido nucleico de cadena sencilla que comprende por lo menos la región amplificada
65

de la primera cadena (ver Fig. 1c). Este ácido nucleico de cadena sencilla está protegido de la degradación por exonucleasa en virtud de los nucleótidos modificados incluidos en el.

5 El ácido nucleico de cadena sencilla se puede detectar realizando pasos adicionales que proporcionan una relación de señal a ruido aumentada. Una sonda marcada que hibrida específicamente con el ácido nucleico de cadena sencilla de la Fig. 1c se añade a la mezcla. Esta sonda se une al ácido nucleico de cadena sencilla para formar un ácido nucleico de cadena doble (ver Fig. 1d). Luego se usa la misma exonucleasa de 5' a 3' (aunque se podría usar una diferente) para hidrolizar la sonda. La hidrólisis de la sonda libera el marcador, lo que provoca que
10 que tenga lugar un cambio detectable en el marcador que puede detectarse posteriormente (ver Fig. 1e). El hecho de que la exonucleasa hidrolice la sonda pero no el ácido nucleico de cadena sencilla (que está protegido de la degradación por exonucleasa) permite que moléculas de la sonda adicionales hibriden con el ácido nucleico de cadena sencilla, proporcionando posteriormente un cambio detectable en la señal del marcador. Por lo tanto, cada ácido nucleico de cadena sencilla producido puede proporcionar múltiples señales, aumentando de este modo la relación señal a ruido en comparación con el uso de un método de amplificación que utiliza dos cebadores no
15 modificados.

La invención, por lo tanto, proporciona un método de amplificación de ácidos nucleicos que comprende los pasos de:

- 20 a) realizar amplificación de ácido nucleico en una muestra, utilizando un primer cebador que incluye por lo menos un nucleótido modificado que no es susceptible de hidrólisis por una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3' ('cebador modificado') y un segundo cebador, en donde la amplificación proporciona un ácido nucleico de cadena doble que comprende una primera cadena que comprende el cebador modificado y una región amplificada cadena abajo; y una segunda cadena;
- 25 b) incubar el ácido nucleico de cadena doble de a) con una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble 5' a 3' que hidroliza la segunda cadena pero no hidroliza la región amplificada de la primera cadena, para proporcionar un ácido nucleico de cadena sencilla que comprende la región amplificada de la primera cadena;
- 30 c) incubar el producto de b) con una sonda que incluye un marcador, en donde la sonda hibrida específicamente con el ácido nucleico de cadena sencilla;
- 35 d) incubar el producto de c) con una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3' que hidroliza la sonda pero no hidroliza la región amplificada de la primera cadena, en donde la hidrólisis de la sonda lleva a un cambio detectable en la señal del marcador; y
- e) detectar el cambio.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que el método de la invención es capaz de producir un producto de la amplificación de cadena sencilla, lo que permite una detección fácil. El método de la invención no adolece de desventajas como la ineficiencia que están asociadas con otros métodos de amplificación que dan como resultado un producto de ácido nucleico de cadena sencilla, por ejemplo, PCR asimétrica. Habitualmente, el paso a) se realiza varias veces (por ejemplo, múltiples ciclos de PCR) antes de realizar el paso b). Por tanto, la hidrólisis del paso b) se retrasa hasta que haya tenido lugar una amplificación significativa, por ejemplo, una amplificación de por lo menos 1000 veces.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que el método de la invención puede usarse para
45 detectar la presencia del ácido nucleico de cadena sencilla y simultáneamente lograr un aumento de la relación de señal a ruido. El hecho de que la exonucleasa hidrolice la sonda pero no el ácido nucleico de cadena sencilla permite que las moléculas de la sonda hibriden con el ácido nucleico de cadena sencilla una tras otra proporcionando una señal aumentada. Cada ácido nucleico de cadena sencilla que se produce durante el paso de amplificación puede, por lo tanto, proporcionar múltiples señales y, por lo tanto, puede detectarse varias veces. La hidrólisis de la sonda puede hacer que cambie el entorno del marcador. El marcador ya no está unido a la sonda de longitud completa, y en su lugar está libre, o unido a un solo nucleótido o parte corta de la sonda. Este cambio en el entorno del marcador lleva a un cambio en la señal del marcador. El cambio en la señal del marcador puede detectarse para detectar la presencia del ácido nucleico de interés.

55 La invención también proporciona un kit que comprende un cebador modificado que tiene por lo menos un nucleótido modificado que no es susceptible de hidrólisis por una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3'; una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3' y una sonda que incluye un marcador en el que la sonda es susceptible de hidrólisis por una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3'.

60 Cuando se usa dUTP en la PCR en lugar de dTTP, el uracilo se incorpora en la primera cadena y a la segunda cadena durante la amplificación. Cuando se realizan una serie de reacciones de amplificación, puede añadirse uracil-N-glicosilasa (UNG) antes de la amplificación para asegurarse que cualquier contaminación remanente que tenga lugar después de una amplificación previa se elimine aunque no se deje ninguna muestra de ADN afectada (ya que éstas contienen timina en lugar de uracilo), reduciendo la aparición de resultados falsos
65

positivos. Los inventores han demostrado que se pueden usar cebadores modificados para producir un ácido nucleico de cadena sencilla sin interferir con la actividad de UNG antes de la amplificación.

5 La divulgación también proporciona por lo tanto un método de amplificación de ácidos nucleicos que comprende los pasos de:

10 i. incubar una muestra con uracil-N-glicosilasa; y
 ii. realizar amplificación de ácidos nucleicos en el producto de i. usando un primer cebador que incluye por lo menos un nucleótido modificado ("cebador modificado"), un segundo cebador, y dUTP en ausencia de dTTP, en donde la amplificación proporciona un ácido nucleico de cadena doble que comprende una primera cadena que comprende el cebador modificado y una región amplificada cadena abajo; y una segunda cadena.

15 El método puede comprender además un paso de:

iii. incubando el ácido nucleico de cadena doble de ii. con una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3' que hidroliza la segunda cadena pero no hidroliza la región amplificada de la primera cadena, para proporcionar un ácido nucleico de cadena sencilla que comprende la región amplificada de la primera cadena.

20 El método puede comprender además los pasos de:

25 iv. incubar el producto de iii. con una sonda que incluye un marcador, en donde la sonda hibrida específicamente con el ácido nucleico de cadena sencilla;
 v. incubar el producto de iv. con una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3' que hidroliza la sonda pero no hidroliza la región amplificada de la primera cadena, en donde la hidrólisis de la sonda lleva a un cambio detectable en la señal del marcador; y
 vi. detectar el cambio.

30 La divulgación también proporciona un kit que comprende un cebador modificado que tiene por lo menos un nucleótido modificado, dUTP y UNG. El kit también puede incluir una exonucleasa, en donde la exonucleasa es una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3'.

35 Los kits de la invención pueden usarse para realizar los métodos de la invención.

Amplificación de ácidos nucleicos

40 La amplificación de ácidos nucleicos puede realizarse usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR)¹, la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA)², la amplificación mediada por transcripción³, la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA)⁴, la amplificación dependiente de helicasa⁵ y amplificación isotérmica mediada por bucle⁶.

45 Una mezcla de amplificación estándar para PCR comprende: un primer cebador y un segundo cebador en donde los dos cebadores son complementarios a los extremos 3' de cada una de las cadenas sentido y antisentido del ácido nucleico objetivo, una ADN polimerasa termoestable, por ejemplo, polimerasa Taq aislada de la bacteria termófila, *Thermus aquaticus*, desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP), solución tampón, cationes divalentes, por ejemplo, iones de magnesio o manganeso, y cationes monovalentes, por ejemplo, iones de potasio.

50 Las ADN polimerasas termoestables alternativas son, Pfu polimerasa aislada de *Pyrococcus furiosus* que tiene una actividad de lectura de prueba ausente de la Taq polimerasa y es por lo tanto una enzima de mayor fidelidad.

55 Como se ha mencionado anteriormente, puede usarse dUTP en lugar de dTTP. Cuando se usan dUTP, se puede añadir UNG a la muestra antes de la amplificación para eliminar cualquier contaminación remanente (por ejemplo, que esté presente en el entorno debido a una fuga de un experimento previo) sin afectar los ácidos nucleicos presentes en la muestra.

60 La uracil-N-glicosilasa (UNG) también se abrevia en la técnica como UDG. Se puede usar cualquier UNG en los métodos de la invención que sea capaz de hidrolizar ADN que incluya uracilo. Por ejemplo, la UNG usada en los métodos y kits de la invención pueden ser UNG humana o UNG de *E. coli*.

65 Cuando se realizan una serie de reacciones de amplificación usando dUTP, el uso de UNG permite que se reduzca la contaminación remanente entre reacciones separadas. Cualquier producto amplificado filtrado que se presente en la muestra puede eliminarse usando UNG antes de la amplificación. La amplificación de ácidos

nucleicos de la presente invención usa un primer cebador que tiene por lo menos un nucleótido modificado y un segundo cebador. El por lo menos un nucleótido modificado se incorpora en la primera cadena del producto de la amplificación del ácido nucleico de cadena doble. Como se describe a continuación, la modificación de nucleótidos puede ser cualquier modificación que no sea susceptible de hidrólisis por la exonucleasa usada en el método de la invención.

El primer cebador que tiene por lo menos un nucleótido modificado puede ser o el cebador directo o el cebador inverso. Esta primera cadena que incluye el cebador modificado es también la cadena en la que puede hibridar específicamente la sonda usada en la presente invención. El segundo cebador se incorpora en la segunda cadena del producto de la amplificación de ácido nucleico de cadena doble.

El segundo cebador puede hidrolizarse mediante la exonucleasa. Como consecuencia, la segunda cadena que se produce como resultado de la amplificación del segundo cebador puede hidrolizarse mediante exonucleasa.

La amplificación de ácidos nucleicos usada en la invención puede ser una amplificación de ácidos nucleicos simétrica, por ejemplo, PCR simétrica, es decir, los cebadores directos e inversos pueden estar presentes en sustancialmente la misma concentración. Alternativamente, la amplificación de ácidos nucleicos usada en la invención puede ser una amplificación de ácidos nucleicos asimétrica, por ejemplo, PCR asimétrica, es decir, uno de los cebadores está presente en exceso, y el otro cebador no está presente en exceso. Los métodos de la invención proporcionan una alta relación de señal a ruido incluso cuando se usa una amplificación de ácidos nucleicos simétrica como una PCR simétrica en favor de una amplificación de ácidos nucleicos asimétrica como una PCR asimétrica.

Productos de la amplificación

Los productos de la amplificación son los ácidos nucleicos formados a partir del paso de amplificación de ácidos nucleicos de la presente invención. La amplificación de ácidos nucleicos de la invención proporciona ácidos nucleicos de cadena doble como productos de la amplificación. Preferiblemente, la amplificación de ácidos nucleicos proporciona predominantemente productos de la amplificación de cadena doble. Los ácidos nucleicos de cadena doble como productos de la amplificación son generalmente el resultado de la amplificación de ácidos nucleicos simétrica, como la PCR simétrica. Alternativamente, la amplificación de ácidos nucleicos puede proporcionar una cantidad menor de productos de la amplificación de cadena doble entre ácidos nucleicos predominantemente de cadena sencilla como productos de la amplificación. Los ácidos nucleicos de cadena sencilla como productos de la amplificación son generalmente el resultado de la amplificación asimétrica de los ácidos nucleicos, como PCR asimétrica.

Los productos de la amplificación de cadena doble que se forman en el paso de amplificación de ácidos nucleicos de la presente invención comprenden una primera cadena y una segunda cadena. La primera cadena se forma por extensión del primer cebador y la segunda cadena se forma por extensión del segundo cebador. El por lo menos un nucleótido modificado del primer cebador se retiene por lo tanto en la primera cadena. La región cadena abajo del primer cebador en la primera cadena es la región amplificada cadena abajo. Debido a la presencia de por lo menos un nucleótido modificado en el primer cebador, la exonucleasa no puede hidrolizar la región amplificada cadena abajo.

La segunda cadena preferiblemente no incluye ningún nucleótido modificado que no pueda ser hidrolizado por la exonucleasa. El segundo cebador se extiende durante la amplificación de ácidos nucleicos para formar la segunda cadena.

Tanto la primera cadena como la segunda cadena pueden comprender modificaciones que no afectan a la hidrólisis de la cadena por las exonucleasas usadas en la presente invención.

Nucleótido modificado

El primer cebador comprende por lo menos un nucleótido modificado. Un nucleótido modificado puede ser cualquier nucleótido que comprenda por lo menos una fracción de azúcar modificado, por lo menos un enlace internucleósido modificado y/o por lo menos una nucleobase modificada, en donde la modificación evita que el nucleótido sea hidrolizado por la exonucleasa de la presente invención. Un nucleótido modificado comprende por lo menos una modificación en comparación con el nucleótido de ARN o ADN de origen natural.

El por lo menos un nucleótido modificado puede comprender por lo menos una fracción de azúcar modificado. La fracción de azúcar modificado puede ser una fracción de azúcar 2'-O-metilo. La fracción de azúcar modificado puede ser una fracción de azúcar 2'-O-metoxietilo. El azúcar modificado puede ser un azúcar modificado 2'fluoro. Como alternativa, la fracción de azúcar modificado puede ser un azúcar modificado bicíclico. Los azúcares bicíclicos incluyen puentes 4'-(CH₂)_n-O-2', en donde n es 1 o 2; y puentes 4'-CH(CH₃)-O-2'.

El por lo menos un nucleótido modificado puede comprender por lo menos un enlace internucleósido modificado. El por lo menos un enlace internucleósido modificado puede ser por lo menos un enlace fosforamidita. El por lo menos un enlace internucleósido modificado puede ser por lo menos un enlace de fosforotioato.

5 El por lo menos un nucleótido modificado puede comprender por lo menos una nucleobase modificada.

El por lo menos un nucleótido modificado puede comprender más de una modificación, por ejemplo, un nucleótido modificado puede comprender una fracción de azúcar modificado y un enlace internucleósido modificado. Alternativamente, el nucleótido modificado puede comprender una fracción de azúcar modificado y una nucleobase modificada, o un enlace internucleósido modificado y una nucleobase modificada. El nucleótido modificado puede comprender una fracción de azúcar modificado, un enlace internucleósido modificado y una nucleobase modificada.

10 El por lo menos un nucleótido modificado puede estar presente en cualquier posición en el primer cebador. Por ejemplo, por lo menos un nucleótido modificado puede estar presente en el extremo 5' del primer cebador, o puede estar presente en el extremo 3' del primer cebador, o puede estar presente en la sección central del primer cebador, o puede intercalarse a lo largo del primer cebador. Habitualmente, el por lo menos un nucleótido modificado está presente en el extremo 5' del cebador. Cuando un nucleótido modificado comprende un enlace internucleósido modificado en el extremo 5' del cebador, se modifica el enlace internucleósido entre el primer y segundo nucleótido.

15 El cebador modificado puede comprender múltiples nucleótidos modificados. Por ejemplo, el cebador modificado puede comprender por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9 o por lo menos 10 nucleótidos modificados. Específicamente, el cebador modificado puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más de 20 nucleótidos modificados. Cada uno de los nucleótidos del cebador modificado puede ser un nucleótido modificado.

20 Cuando el cebador modificado comprende múltiples nucleótidos modificados, los nucleótidos modificados pueden ser nucleótidos contiguos en el cebador. Como alternativa, los nucleótidos modificados se pueden espaciar a lo largo del cebador, es decir, uno o más nucleótidos no modificados pueden estar presentes entre los nucleótidos modificados. Los espacios de nucleótidos no modificados pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más nucleótidos no modificados. Preferiblemente, los nucleótidos modificados son nucleótidos contiguos.

25 Preferiblemente, el primer cebador comprende 3 o 4 nucleótidos modificados. Preferiblemente, el primer cebador comprende 3 o 4 nucleótidos modificados contiguos. Preferiblemente, los 3 o 4 nucleótidos modificados comprenden enlaces de fosforotioato. En algunas realizaciones, el primer cebador comprende tres enlaces de fosforotioato contiguos en el extremo 5', es decir, los enlaces entre el primer y segundo, segundo y tercero, y tercero y cuarto nucleótidos son enlaces de fosforotioato. En algunas realizaciones, el primer cebador comprende cuatro enlaces de fosforotioato contiguos en el extremo 5', es decir los enlaces entre el primer y segundo, segundo y tercero, tercero y cuarto, y cuarto y quinto nucleótidos son enlaces de fosforotioato.

30 Cebador

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos de la invención usan un primer cebador y un segundo cebador. El primer cebador puede ser el cebador directo y el segundo cebador puede ser el cebador inverso. Alternativamente, el segundo cebador puede ser el cebador directo y el primer cebador puede ser el cebador inverso. El primer cebador comprende por lo menos un nucleótido modificado. El paso de amplificación de ácidos nucleicos de la invención hace que el cebador modificado se extienda para formar la primera cadena en el producto de la amplificación de ácido nucleico de cadena doble. La invención también proporciona cebadores modificados específicos y parejas de cebadores, como se describe a continuación.

35 Un cebador usado en los métodos y kits de la invención será generalmente de 10 nucleótidos de longitud de, por ejemplo, el cebador puede ser de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud. El cebador puede ser completamente complementario a su objetivo, pero en algunas realizaciones (por ejemplo, en TMA), un cebador puede incluir una primera región que es complementaria a su objetivo y una segunda región que no lo es. Las longitudes de sonda más cortas se favorecen si el contenido de GC de la sonda es alto. La longitud del primer cebador incluye por lo menos un nucleótido modificado.

40 En una realización, el primer cebador y el segundo cebador son capaces de amplificar una secuencia de ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis*. El primer cebador puede comprender la secuencia de nucleótidos de A*G*A*T*TCCAGAGGCAATGCCAAAGAAA (SEQ ID NO: 1) o A*G*A*TTCCAGAGGCAATGCCAAAGAAA.

45 N* indica que el nucleótido en la posición especificada es un nucleótido modificado. Cuando el nucleótido modificado N* comprende un enlace internucleósido modificado, el enlace internucleósido modificado se encuentra entre el nucleótido especificado y el siguiente nucleótido en la dirección 3'.

Por lo tanto, el primer cebador puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, en la que los nucleótidos 1-3 o 1-4 son nucleótidos modificados. Los nucleótidos del cebador se numeran desde el extremo 5'. Por lo tanto, los nucleótidos 1-3 o 1-4 son los 3 o 4 nucleótidos en el extremo 5' del cebador. Los nucleótidos modificados pueden comprender enlaces de fosforotioato.

Como alternativa, el primer cebador puede comprender la secuencia de nucleótidos de G*T*T*T*GGACACTAGTCAGCATCAAGCTAGG o G*T*T*T*GGACACTAGTCAGCATCAAGCTAGG, es decir, el primer cebador puede comprender la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2, donde los nucleótidos 1-3 o 1-4 son nucleótidos modificados. Los nucleótidos modificados pueden comprender enlaces de fosforotioato. La divulgación también proporciona parejas de cebadores que comprenden un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 1, en donde los nucleótidos 1-3 o 1-4 son nucleótidos modificados que comprenden opcionalmente enlaces de fosforotioato, y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 2, en donde la SEQ ID NO: 2 no está modificada, es decir, no comprende nucleótidos modificados.

La divulgación también proporciona parejas de cebadores que comprenden un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 2, en donde los nucleótidos 1-3 o 1-4 son nucleótidos modificados que comprenden opcionalmente enlaces de fosforotioato, y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 1, en donde la SEQ ID NO : 1 no está modificada, es decir, no comprende nucleótidos modificados.

Muestra

La muestra es una composición en la que se realiza el método de la invención para determinar si hay un ácido nucleico de interés. La muestra puede ser una composición en la que se sospecha que está presente el ácido nucleico, o puede ser una composición en la que el ácido nucleico a detectar está potencialmente presente. El ácido nucleico de interés puede ser amplificado por el primer cebador y el segundo cebador.

La muestra puede ser material obtenido de un animal o planta. La muestra puede ser una muestra celular. La muestra puede obtenerse con una invasividad mínima o sin invasividad, por ejemplo, la muestra puede obtenerse de un animal usando un hisopo o puede ser un fluido corporal. Como alternativa, la muestra puede ser material obtenido de alimentos o agua. Un experto en la técnica apreciará que las muestras pueden diluirse antes del análisis de los niveles de los compuestos. Preferiblemente, la muestra se obtiene a partir de un hisopo genital, por ejemplo, un hisopo vaginal.

La muestra puede haber sido tratada desde que se obtuvo del sujeto. Por ejemplo, un experto en la técnica apreciará que las muestras se pueden purificar, por ejemplo, para purificar ácidos nucleicos, diluir, concentrar, centrifugar, congelar, etc. antes de la detección del objetivo.

Un animal puede ser un animal vertebrado o no vertebrado. Los animales vertebrados pueden ser mamíferos. Los mamíferos de vertebrados pueden ser humanos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero no están limitados a, ratón, rata, cerdo, perro, gato, conejo, primate o similares. El sujeto puede ser un primate. Preferiblemente el sujeto es humano.

Ácido nucleico de interés

El ácido nucleico de interés es el ácido nucleico del que método de la invención pretende detectar la presencia o ausencia. El ácido nucleico de interés comprende el amplicón que se amplifica por la amplificación del ácido nucleico. Los cebadores usados en la reacción de amplificación del ácido nucleico se hibridan con el ácido nucleico de interés.

El ácido nucleico de interés puede ser un ácido nucleico que es específico de un patógeno particular, por ejemplo, para un virus, una bacteria o un hongo. Por lo tanto, el ácido nucleico puede detectarse en una muestra de un animal para diagnosticar una enfermedad particular en un animal.

El ácido nucleico puede ser específico para uno de los siguientes patógenos: *Trichomonas vaginalis* , *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium* o *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina.

Como alternativa, el ácido nucleico puede ser una secuencia endógena del sujeto del que se obtiene la muestra. El ácido nucleico puede ser un marcador para una característica particular o una predisposición particular. En esta situación, el método de la invención puede detectar la predisposición de un sujeto del cual se toma una muestra para desarrollar una enfermedad particular. Como una alternativa adicional, el método de la invención puede usarse para determinar la presencia o ausencia de un polimorfismo particular en un sujeto, por ejemplo en comparación con otro sujeto, con el fin de determinar similitudes y diferencias entre los sujetos.

Exonucleasa

La exonucleasa usada en la presente invención es capaz de hidrolizar la segunda cadena del producto de la amplificación de ácido nucleico de cadena doble. La exonucleasa no es capaz de hidrolizar la región amplificada de la primera cadena del producto de la amplificación de cadena doble. La exonucleasa puede ser capaz de hidrolizar parte de la primera cadena, por ejemplo, el extremo 5' del primer cebador si el por lo menos un nucleótido modificado no está localizado en el nucleótido 5' terminal. En realizaciones en las que está presente una sonda, una exonucleasa puede ser capaz de hidrolizar la sonda.

La exonucleasa usada en el método de la invención es una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3'.

Las exonucleasas específicas de ácido nucleico de cadena doble se usan de tal manera que una cadena de los ácidos nucleicos de cadena dobles que se producen como productos de la amplificación de la amplificación del ácido nucleico se descompone por hidrólisis desde el extremo 5' al extremo 3' mediante una exonucleasa. Cuando se usa una sonda, también se puede usar una exonucleasa para descomponer la sonda por hidrólisis desde un extremo después de su hibridación con la primera cadena. En este paso, la exonucleasa realiza la función de provocar un cambio detectable en el marcador después de la hidrólisis de la sonda, por ejemplo, cambiando el entorno en el que se encuentra, de tal manera que se pueda detectar para determinar la presencia o ausencia del ácido nucleico de interés.

Preferiblemente, la exonucleasa que se usa para hidrolizar la sonda es la misma que la exonucleasa usada para hidrolizar la segunda cadena.

La exonucleasa puede ser cualquier exonucleasa específica de doble cadena de 5' a 3'. La exonucleasa puede seleccionarse del grupo que consiste de una exonucleasa 5' a 3' de *Thermus aquaticus*, una exonucleasa T7, una exonucleasa lambda, una exonucleasa V y una exonucleasa T5. Preferiblemente, la exonucleasa es una exonucleasa T7.

Sonda

La sonda es capaz de hibridar específicamente con la primera cadena. La sonda puede hibridar con la longitud completa o una parte de la primera cadena. La sonda incluye un marcador. La hidrólisis de la sonda lleva a un cambio detectable en la señal del marcador. La detección del cambio permite medir la presencia o ausencia del ácido nucleico de interés. La sonda completa puede ser capaz de hibridar específicamente con la primera cadena. Como alternativa, la sonda puede incluir un ácido nucleico que sea capaz de hibridar específicamente con la primera cadena.

Las sondas usadas en la invención tienen típicamente de 15 a 45 nucleótidos de longitud, es decir, la sonda puede ser de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 nucleótidos de longitud.

La sonda puede ser completamente complementaria a su objetivo, pero en algunas realizaciones, la sonda puede incluir una primera región que es complementaria a su objetivo y una segunda región que no lo es.

La sonda puede incluir una o más fracciones adicionales distintos de la región capaces de hibridar con la secuencia objetivo. Las fracciones adicionales pueden ser secuencias de ácido nucleico adicionales o ser fracciones no de ácido nucleico. Por ejemplo, la sonda puede incluir una región conectora que la une a una matriz. La fracción adicional puede ser una fracción de marcador. Los tipos particulares de marcadores que pueden usarse se describen con más detalle a continuación.

Marcador

La sonda y/o los cebadores descritos anteriormente pueden enlazarse con un marcador para ayudar a su detección. El marcador puede ser cualquier marcador que proporcione una señal. El marcador puede ser radioactivo, enzimáticamente activo, fluorescentemente activo, luminiscentemente activo o electroquímicamente activo. La hidrólisis de la sonda lleva a un cambio detectable en la señal de la sonda. Este cambio en la señal del marcador puede deberse a un cambio en el entorno del marcador después de la hidrólisis de la sonda.

Cuando la detección de múltiples secuencias de ácidos nucleicos se realiza simultáneamente, por ejemplo, cuando dos ácidos nucleicos de interés se amplifican y detectan simultáneamente o cuando la detección de un ácido nucleico de interés y la detección de una secuencia de ácido nucleico de control interno se realizan simultáneamente, los marcadores usados para ayudar en la detección de las múltiples secuencias de ácidos nucleicos, pueden preferiblemente distinguirse unas de otras, por ejemplo, pueden ser diferentes fluoróforos o

pueden ser diferentes agentes electroquímicamente activos o marcadores electroquímicamente activos que proporcionan actividad electroquímicamente distinguible. Como alternativa, los marcadores pueden ser los mismos y la detección de los ácidos nucleicos separados puede realizarse en cámaras de detección separadas.

5 La presente invención es especialmente adecuada para su uso con sondas y/o cebadores electroquímicamente marcados. En particular, el marcador electroquímico puede incluir aquellos que comprenden complejos pi metalo-carbocíclicos, es decir, complejos orgánicos con electrones pi parcial o totalmente deslocalizados. Los marcadores adecuados incluyen aquellos que comprenden compuestos de tipo sándwich en los que dos anillos carbocíclicos son paralelos, y también sándwiches doblados (compuestos angulares) y monociclopentadienilos. Preferiblemente, los marcadores electroquímicamente activos son marcadores de metaloceno. Más preferiblemente son marcadores de ferroceno. Cuando el marcador es un marcador electroquímico, el cambio detectable en la señal del marcador puede ser un cambio en la corriente que fluye a través del marcador tras la aplicación de la diferencia de potencial a través del marcador. El marcador puede ser un marcador de ferroceno. Ejemplos de marcadores que pueden usarse en los métodos de la invención pueden encontrarse en las WO03/074731, WO2012/085591 y WO 2013/190328. El marcador puede ser un marcador fluorescente. Por ejemplo, el marcador de ferroceno puede tener la estructura de fórmula I en la WO2012/085591. Como alternativa, el marcador de ferroceno puede tener la estructura de fórmula I en la WO 2013/190328.

20 **General**

El término "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

25 El término "hibrida específicamente" tiene su significado habitual de capaz de hibridar con la secuencia del objetivo deseado y no con secuencias que no están presentes en el objetivo deseado.

A menos que se especifique lo contrario, un proceso que comprende un paso de mezclar dos o más componentes, o incubar dos o más componentes juntos no requiere ningún orden específico de mezcla. Por tanto los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, entonces dos componentes pueden combinarse entre sí, y luego la combinación puede combinarse con el tercer componente, etc.

A menos que se especifique lo contrario, los pasos de los métodos de la invención pueden realizarse en cualquier orden.

35 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Figura 1. Visión general del método de amplificación de la invención.

40 **Figura 2.** Comparación de dos muestras de *C. trachomatis* cada una amplificada con cebador inverso estándar y modificado (3 y 4 bases modificadas).

Figura 3. Amplificación y detección de la secuencia objetivo de *C. trachomatis* usando cebadores inversos estándar, modificados en 3 bases y modificados en 4 bases, usando protocolos de PCR rápida y semi-rápida. Las barras de error son +/- 1 desviación estándar de la media.

45 **Figura 4.** Datos de exclusividad para cebador inverso estándar y modificado en 4 bases con 14 organismos usando PCR semi-rápida de la secuencia objetivo de *C. trachomatis*. Las barras de error son +/- 1 desviación estándar de la media.

50 **Figura 5.** Datos de inclusión que utilizan cebadores inversos estándar y modificados en 4 bases con 14 serovares usando PCR semi-rápida de la secuencia objetivo de *C. trachomatis*. Las barras de error son +/- 1 desviación estándar de la media.

55 **Figura 6.** Comparación de cebadores inversos estándar y modificados de 4 bases usando un intervalo de concentraciones de plantilla de *C. trachomatis* y una concentración consistente de ácido nucleico de control interno. Las barras de error son +/- 1 desviación estándar de la media.

60 **Figura 7.** Diagrama de caja de alturas de picos de *C. trachomatis* obtenidas con cebadores inversos estándar (ABR114) y modificados en 4 bases (ABR115) (n=10 para todas las detecciones) para la cámara exterior (CT1) y la cámara interna (CT2) de un cartucho.

Figura 8. Amplificación y detección de la secuencia objetivo de *N. gonorrhoeae* usando cebadores directos e inversos estándar y modificados en 4 bases mediante PCR semi-rápida.

65 **Figura 9.** Amplificación y detección de ácido nucleico de control interno usando cebadores directos e inversos

estándar y modificados en 4 bases mediante PCR semi-rápida.

Figura 10 . Amplificación y detección de la secuencia objetivo de *Mycoplasma genitalium* usando cebadores directos e inversos estándar y modificados en 4 bases mediante PCR semi-rápida.

5

MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Comparación de cebadores estándar y cebadores modificados en el ensayo de C. trachomatis

10 Los cebadores inversos (Rv) con 3 y 4 modificaciones de fosforotioato consecutivas en el extremo 5' se probaron en varios experimentos junto con un cebador directo (Fw) sin modificar y se compararon con las alturas de los picos obtenidos cuando se usan juntos los cebadores Rv y Fw normales. Los resultados se proporcionan en la Figura 2. En el ensayo de *C. trachomatis*, una sonda marcada electroquímicamente, se hibrida a la cadena extendida desde el cebador inverso. Por lo tanto, el cebador inverso, en lugar del cebador directo, se modifica para evitar la degradación, es decir, el primer cebador es el cebador inverso y el segundo cebador es el cebador directo.

15

Se observó un aumento sustancial en la señal electroquímica cuando se usaron los cebadores Rv modificados en comparación con los cebadores Rv estándar. Cuatro modificaciones proporcionaron un aumento mayor en la altura del pico que tres modificaciones. Este aumento se observó en una serie de experimentos con un intervalo de concentraciones de plantilla y protocolos de amplificación. También se llevaron a cabo experimentos para verificar el sistema de protección del cebador contra la degradación de las nucleasas, incluyendo el uso de un cebador Fw modificado.

20

Esto se debe al hecho de que se produce un producto de cadena sencilla que es más susceptible de hibridación con sonda y, por lo tanto, de detección. Además, el ensayo proporciona una señal aumentada al hidrolizar la sonda después de que hibride con la primera cadena, pero no permitiendo que la primera cadena se hidrolice porque está protegida por los nucleótidos modificados. De esta manera, múltiples moléculas de sonda pueden hibridar con una sola copia de la primera cadena proporcionando una señal aumentada.

25

Compatibilidad del cebador Rv modificado con amplificación rápida.

30

Se usaron cebadores Rv no modificados y los cebadores Rv modificados en 3 bases y modificados en 4 bases en las reacciones de amplificación con los cebadores Fw no modificados. Las amplificaciones de PCR se realizaron usando o un protocolo semi-rápido (Baseline) o un protocolo rápido (1-9 SLOW) para determinar si los cebadores modificados podrían usarse en el protocolo de PCR semi-rápida. Los resultados de estos experimentos se proporcionan en la Figura 3. Los tres conjuntos de cebadores tenían alturas de picos indetectables en los controles negativos. Se obtuvieron aumentos sustanciales en las alturas de los picos en relación con el control no modificado para ambos protocolos de amplificación (semi-rápido y rápido), con el cebador de Rv conteniendo cuatro modificaciones que proporcionan alturas de picos aumentadas en comparación con las tres modificaciones. Por lo tanto, se descubrió que los cebadores modificados son compatibles con la PCR rápida.

35

40

Efecto del cebador de Rv modificado en el ensayo de inclusividad y exclusividad de C. trachomatis.

Se sabe en la técnica que es posible que las modificaciones de fosforotioato afecten las propiedades de apareamiento de un cebador. Por lo tanto se realizó un experimento para evaluar los efectos potenciales del uso de un cebador Rv modificado con fosforotioato en el ensayo de inclusividad y exclusividad de *C. trachomatis*. Se seleccionaron una serie de organismos para contener especies que eran clínicamente relevantes, estrechamente relacionadas con *C. trachomatis* y aquellas que produjeron los valores atípicos de señal más altos en experimentos de exclusividad anteriores (usando cebadores estándar). Este panel se probó usando tanto el cebador Rv estándar no modificado como el cebador Rv modificado en 4 bases usando amplificación semi-rápida. Los resultados de estos experimentos se proporcionan en la Figura 4. Para establecer la inclusividad, 14 serovares de *C. trachomatis* se amplificaron usando amplificación semi-rápida en presencia del cebador Rv de *C. Trachomatis* estándar o el cebador Rv modificado en 4 bases. Los productos de la amplificación se detectaron electroquímicamente usando sondas electroquímicamente marcadas. Los resultados de estos experimentos se proporcionan en la Figura 6. Los datos muestran que el uso de cebadores Rv con 4 bases modificadas en el extremo 5' no afecta a la exclusividad o la inclusividad del ensayo.

45

50

55

Efecto de Rv modificado sobre la degradación del amplicón remanente por UNG

Puede usarse UNG (uracilo-N-glicosilasa) junto con dUTP en el ensayo de *C. trachomatis* para evitar resultados negativos falsos de la contaminación remanente por amplicón. Se probó si el uso de cebadores modificados afectaría el mecanismo o la capacidad de la UNG para degradar la contaminación remanente.

60

Se llevó a cabo la amplificación usando cebador Rv de *C. Trachomatis* estándar y modificado en 4 bases para generar el amplicón de prueba usando dNTP con dUTP en lugar de dTTP. Después de esto, se usó una

65

dilución de cada amplicón en dos PCR posteriores (usando un cebador Rv estándar o uno modificado en 4 bases) en presencia o ausencia de UNG. Después de la amplificación, los productos de la amplificación se detectaron electroquímicamente.

5 Los resultados demuestran que, aunque el uso del cebador Rv modificado produce una señal electroquímica mayor (como se ha demostrado anteriormente), los productos de la amplificación que contienen el cebador Rv modificado son susceptibles a degradación por UNG de la misma manera que los productos de la amplificación producidos usando el cebador estándar. Por lo tanto, usar un cebador Rv de *C. trachomatis* con 4 nucleósidos de fosforotioato en el extremo 5' no afecta la capacidad de UNG para degradar la contaminación remanente.

Compatibilidad del Rv modificado con el control interno.

15 El ensayo de *C. trachomatis* usa un control interno que monitoriza el ensayo en cada etapa y verifica un resultado negativo. Se realizaron experimentos para probar si el uso de un cebador Rv modificado afectó adversamente a la amplificación o detección del control interno.

20 Se llevó a cabo un experimento que amplifica una dilución en serie de una plantilla de *C. trachomatis* con una cantidad constante de control interno usando cebadores inversos no modificados estándar y cebadores inversos modificados en 4 bases. Los dos ácidos nucleicos amplificados fueron detectados electroquímicamente. Los resultados de estos experimentos se proporcionan en la Figura 7. La Figura 7 muestra que el control interno es capaz de ser amplificado y detectado usando un ensayo que implica cebador Rv no modificado estándar o cebador Rv modificado en presencia de un intervalo de plantillas de *C. trachomatis*. Por lo tanto, usar un cebador Rv de *C. trachomatis* con 4 nucleósidos fosforotioato en el extremo 5' no afecta a la amplificación o detección del control interno en un intervalo de concentraciones de la plantilla de *C. Trachomatis*.

Compatibilidad del Rv modificado con el cartucho integrado.

30 Se produjeron cartuchos en los que se usaron cebadores Rv estándar no modificados (ABR114) o cebadores Rv modificados en 4 bases (ABR115) para permitir que se evaluase el rendimiento de los diferentes cebadores en cartuchos integrados. Diez réplicas de cada una de las muestras 500UIF y 0UIF por tipo de cartucho se amplificaron en el cartucho y se detectaron en el cartucho usando un lector de cartuchos. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 8 siguiente. La Figura 8 demuestra que usar el cebador Rv de *C. trachomatis* modificado aumenta la altura de pico media por ~2,2 veces en la cámara exterior del cartucho y por ~1,6 veces para la cámara interior del cartucho para muestras positivas de *C. trachomatis* en comparación con el uso de cebadores no modificados estándar. Las muestras 0IFU no se vieron afectadas por el cebador modificado aumentando de este modo la relación señal-ruido.

Comparación de cebadores estándar y cebadores modificados en el ensayo de *N. gonorrhoeae*

40 Para determinar los diferentes efectos de usar diferentes combinaciones de cebadores modificados y no modificados, se realizaron experimentos en los que se amplificaron 1000 copias de *N. gonorrhoeae* y se detectaron electroquímicamente. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 9.

45 En el ensayo de *N. gonorrhoeae*, la sonda se hibrida a la cadena extendida desde el cebador directo. Por lo tanto, se modifica el cebador directo, en lugar del cebador inverso, para evitar la degradación, es decir, el primer cebador es el cebador directo y el segundo cebador es el cebador inverso. Cuando tanto los cebadores directos como los inversos se modifican para incluir 4 nucleósidos de fosforotioato, ambas cadenas están protegidas de la degradación por exonucleasa. Esto evita que la sonda hibride con el ácido nucleico objetivo amplificado, dando como resultado una gran disminución de la señal.

50 Modificar el cebador inverso en lugar del cebador directo significa que la cadena a la que se une la sonda no está protegida contra la degradación por exonucleasa, pero la otra cadena está protegida de la degradación. Por lo tanto, la mayoría de las copias de la cadena a la que se une la sonda se degradarán por la exonucleasa evitando la hibridación de la sonda.

El uso de cebadores directos e inversos no modificados proporciona un nivel de control de amplificación en presencia de la secuencia objetivo de *N. gonorrhoeae*.

60 Modificar el cebador directo, pero no el cebador inverso en el extremo 5' proporciona protección de la degradación por exonucleasa para la primera cadena a la que se une la sonda, lo que significa que solo se degrada la otra cadena. La sonda es capaz de unirse a la primera cadena, y la sonda se degrada para proporcionar una señal. La degradación de la sonda permite que otras moléculas de sonda se unan a la primera cadena y proporcionen una señal aumentada. Esto provoca un aumento sustancial en la altura del pico media en comparación con la altura del pico cuando se usan cebadores no modificados.

65

Comparación de cebadores estándar y cebadores modificados en el ensayo para control interno

5 Para determinar los diferentes efectos del uso de diferentes combinaciones de cebadores modificados y no modificados, se realizaron experimentos en los que se amplificaron y detectaron electroquímicamente 100 pg de ácido nucleico de control interno. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 10.

10 En la reacción de amplificación de control interno, la sonda hibrida con la cadena extendida desde el cebador inverso. Por lo tanto, se modifica el cebador inverso, en lugar del cebador directo, para evitar la degradación, es decir, el primer cebador es el cebador inverso y el segundo cebador es el cebador directo. Cuando tanto los cebadores directos como los inversos se modifican para incluir 4 nucleósidos de fosfortioato, ambas cadenas están protegidas de la degradación por exonucleasa. Esto evita que la sonda hibride con el ácido nucleico objetivo amplificado, dando como resultado una gran disminución de la señal.

15 Modificar el cebador directo en lugar del cebador inverso significa que la cadena a la que se une la sonda no está protegida de la degradación por exonucleasa, pero la otra cadena está protegida de la degradación por exonucleasa, pero la otra cadena está protegida de la degradación. Por lo tanto, la mayoría de las copias de la cadena a la que se une la sonda se degradarán por exonucleasa, lo que evitará la hibridación de la sonda.

20 Usar cebadores directos e inversos no modificados proporciona un nivel de control de la amplificación en presencia del ácido nucleico de control interno.

25 Modificar el cebador inverso, pero no el cebador directo en el extremo 5' proporciona protección contra la degradación por exonucleasa para la primera cadena a la que se une la sonda, lo que significa que solo se degrada la otra cadena. La sonda es capaz de unirse a la primera cadena, y la sonda se degrada para proporcionar una señal. La degradación de la sonda permite que otras moléculas de sonda se unan a la primera cadena y proporcionen una señal aumentada. Esto provoca un aumento sustancial en la altura del pico media en comparación con la altura del pico cuando se usan cebadores no modificados.

30 Comparación de cebadores estándar y cebadores modificados en el ensayo de *M. genitalium*

35 Para determinar los diferentes efectos del uso de diferentes combinaciones de cebadores modificados y no modificados, se realizaron experimentos en los que se amplificaron y detectaron electroquímicamente números de copias variables de *M. genitalium*. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 11.

40 En el ensayo de *M. genitalium*, la sonda hibrida con la cadena extendida desde el cebador inverso. Por lo tanto, se modifica el cebador inverso, en lugar del cebador directo, para evitar la degradación, es decir, el primer cebador es el cebador inverso y el segundo cebador es el cebador directo. Cuando tanto los cebadores directos como los inversos se modifican para incluir 4 nucleósidos de fosfortioato, ambas cadenas están protegidas de la degradación por exonucleasa. Esto evita que la sonda hibride con el ácido nucleico objetivo amplificado, dando como resultado una disminución de la señal grande.

45 Usar cebadores directos e inversos no modificados proporciona un nivel de control de amplificación en presencia de la secuencia objetivo de *M. genitalium*.

50 Modificar el cebador inverso, pero no el cebador directo en el extremo 5' proporciona protección contra la degradación por exonucleasa para la cadena a la que se une la sonda, lo que significa que solo se degrada la otra cadena. La sonda es capaz de unirse a la primera cadena, y la sonda se degrada para proporcionar una señal. La degradación de la sonda permite que otras moléculas de sonda se unan a la primera cadena y proporcionen una señal aumentada. Esto provoca un aumento sustancial en la altura del pico media en comparación con la altura del pico cuando se usan cebadores no modificados.

REFERENCIAS

- 55 1 Wiedmann M. et al. PCR Methods and Applications 1994 3(4):S51-64
 2 Walker et al. Nucleic Acids Res. 1992. 20(7) 1691-1696
 3 Wroblewski J. et al. J. Clin. Microbiol. 2006:44(9):3306-3312
 4 Compton J. Nature 1991:350(6313):91-2
 5 Vincent M. et al. EMBO Rep. 2004 5(8) 795-800
 60 6 Notomi et al. Res. 2000 23 (12):E63.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 65 <110> ATLAS GENETICS LIMITED
 <120> CEBADORES MODIFICADOS PARA AMPLIFICACIÓN y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> P064244WO
5 <141> 2014-07-18
<160> 2
<170> SeqWin2010, versión 1.0
10 <210> 1
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
15 <220>
<223> Cebador
<400> 1
20 agattccaga ggcaatgccca aagaaa 26
<210> 2
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
25 <220>
<223> Cebador
<400> 2
30 gtttgacac tagtcagcat caagctagg 29
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Un método de amplificación de ácidos nucleicos que comprende los pasos de:

- 5 a) realizar una amplificación de ácidos nucleicos en una muestra, usando un primer cebador que incluye por lo menos un nucleótido modificado que no es susceptible de hidrólisis por una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3' ('cebador modificado') y un segundo cebador, en donde la amplificación proporciona un ácido nucleico de cadena doble que comprende una primera cadena que comprende el cebador modificado y una región amplificada cadena abajo; y una segunda cadena;
- 10 b) incubar el ácido nucleico de cadena doble de a) con una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3' que hidroliza la segunda cadena pero no hidroliza la región amplificada de la primera cadena, para proporcionar un ácido nucleico de cadena sencilla que comprende región amplificada de la primera cadena;
- 15 c) incubar el producto de b) con una sonda que incluye un marcador, en donde la sonda hibrida específicamente con el ácido nucleico de cadena sencilla;
- d) incubar el producto de c) con una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3' que hidroliza la sonda pero no hidroliza la región amplificada de la primera cadena, en donde la hidrólisis de la sonda lleva a un cambio detectable en la señal del marcador; y
- 20 e) detectar el cambio.

2. El método de la reivindicación 1, en el que las exonucleasas del paso b) y el paso d) son las mismas exonucleasas.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende además:

- 25 i. incubar la muestra con uracil-N-glicosilasa; y
ii. realizar el paso a) usando dUTP en ausencia de dTTP.

4. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que

- 30 a) la amplificación de ácidos nucleicos se logra usando PCR; y/o
b) la muestra es una muestra humana.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que

- 35 a) la muestra es una muestra celular; o
b) la muestra comprende ácidos nucleicos purificados.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el primer cebador comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, en el que los nucleótidos 1-3 o 1-4 son nucleótidos modificados que no son susceptibles de hidrólisis por una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3', en el que opcionalmente los nucleótidos modificados comprenden enlaces de fosforotioato.

7. Un kit que comprende un cebador modificado que tiene por lo menos un nucleótido modificado que no es susceptible de hidrólisis por una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3'; una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3' y una sonda que incluye un marcador en el que la sonda es susceptible de hidrólisis por una exonucleasa específica de ácido nucleico de cadena doble de 5' a 3'.

8. El método o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que

- 50 a) el por lo menos un nucleótido modificado comprende por lo menos una fracción de azúcar modificado, en el que opcionalmente la por lo menos una fracción de azúcar modificado es una fracción de azúcar 2'-O-metilo;
- 55 b) el por lo menos un nucleótido modificado comprende por lo menos un enlace internucleósido modificado, en el que opcionalmente el por lo menos un enlace internucleósido modificado es un enlace de fosforotioato; y/o
- c) el por lo menos un nucleótido modificado comprende por lo menos una nucleobase modificada.

9. El método o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el cebador modificado comprende por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9 o por lo menos 10 nucleótidos modificados.

10. El método o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el cebador modificado comprende 3 o 4 enlaces de fosforotioato.

65

11. El método o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que

- a) los cebadores hibridan específicamente con ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium* o *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina;
- b) el cebador modificado es como se define en la reivindicación 6; y/o
- c) la exonucleasa es exonucleasa T7.

12. El método o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el marcador es un marcador electroquímica, en el que opcionalmente el marcador electroquímico es un marcador de ferroceno.

13. El método o kit de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la sonda marcada comprende un marcador fluorescente.

14. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 7-13, que además comprende dUTP y UNG.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

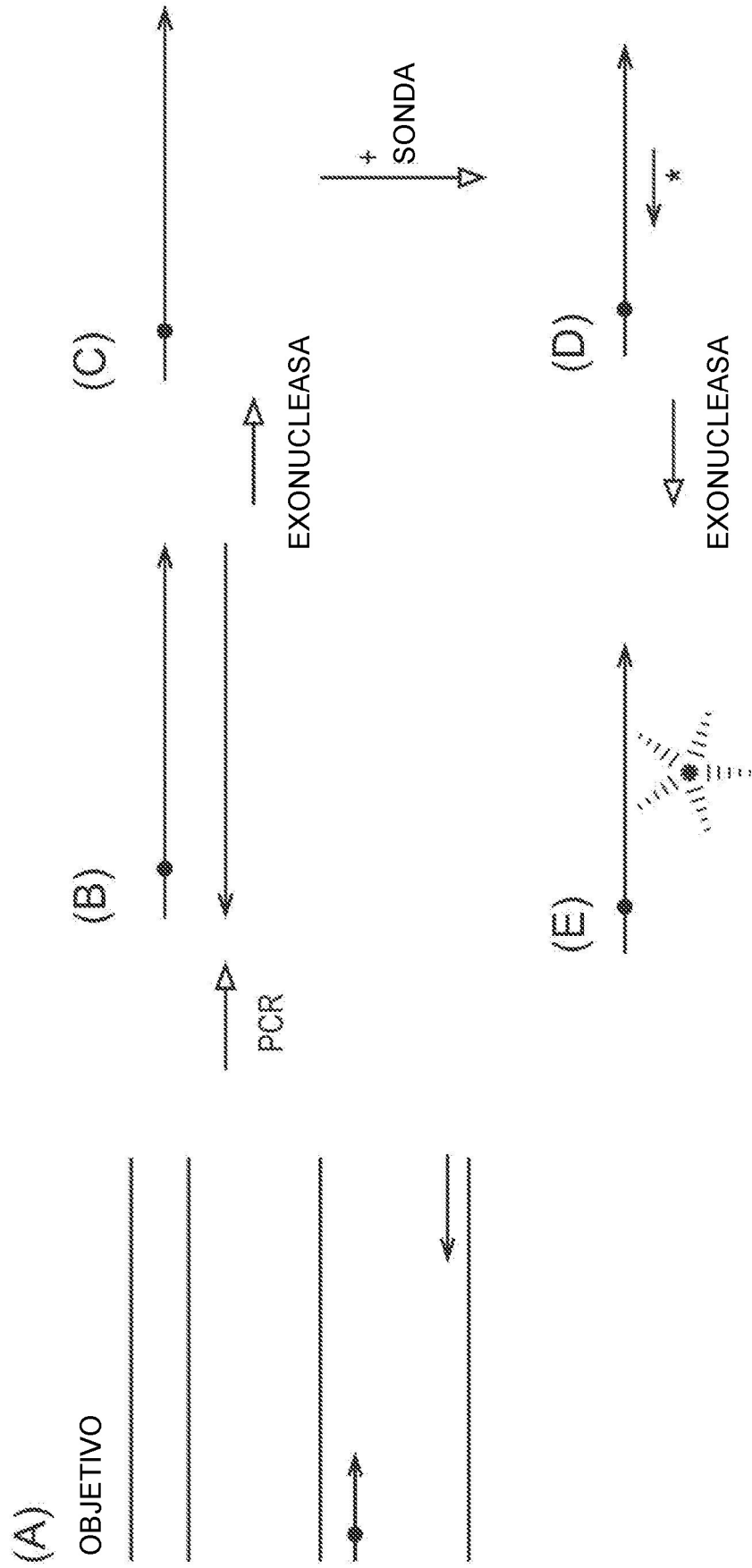
50

55

60

65

FIG. 1



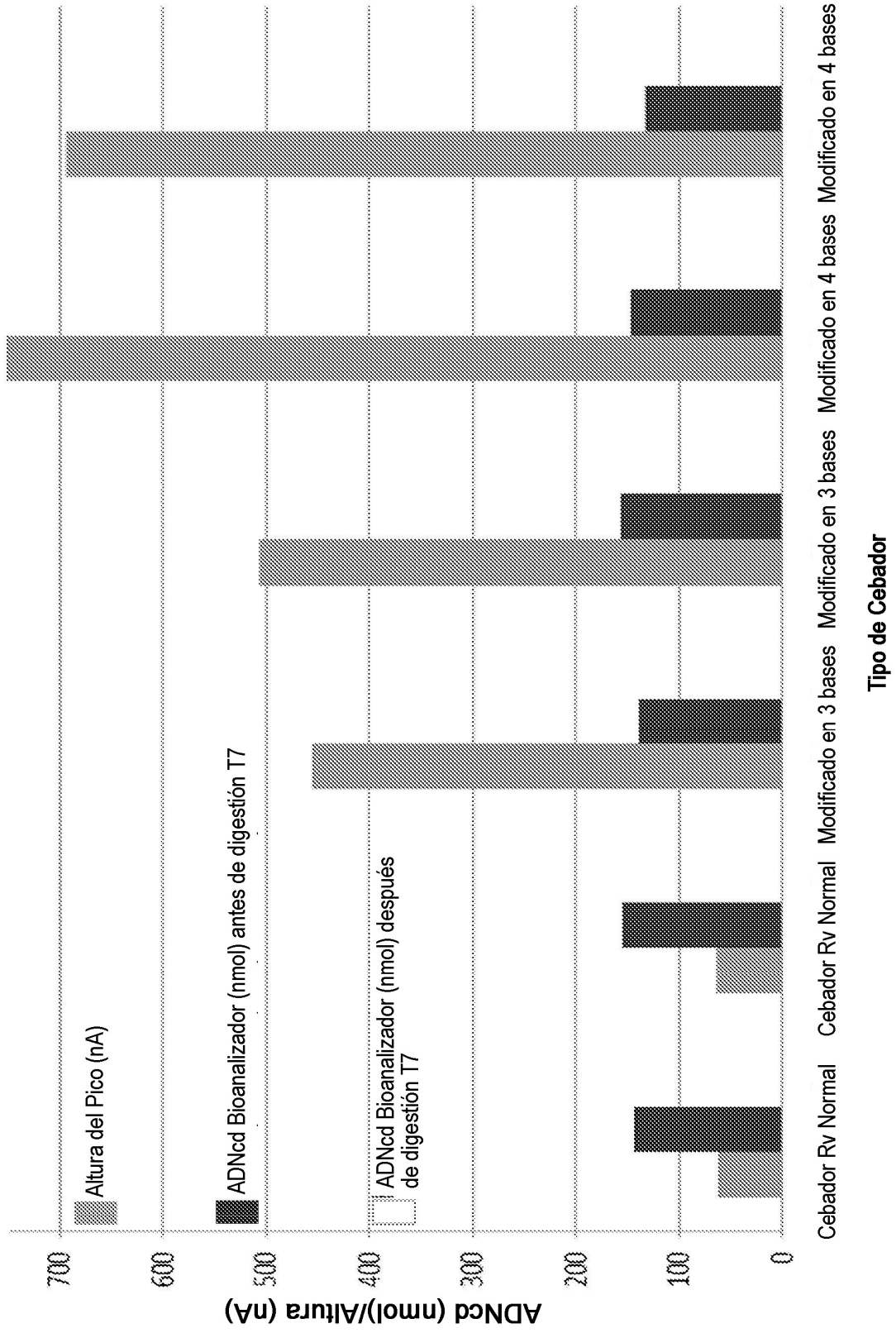


FIG. 2

FIG. 3

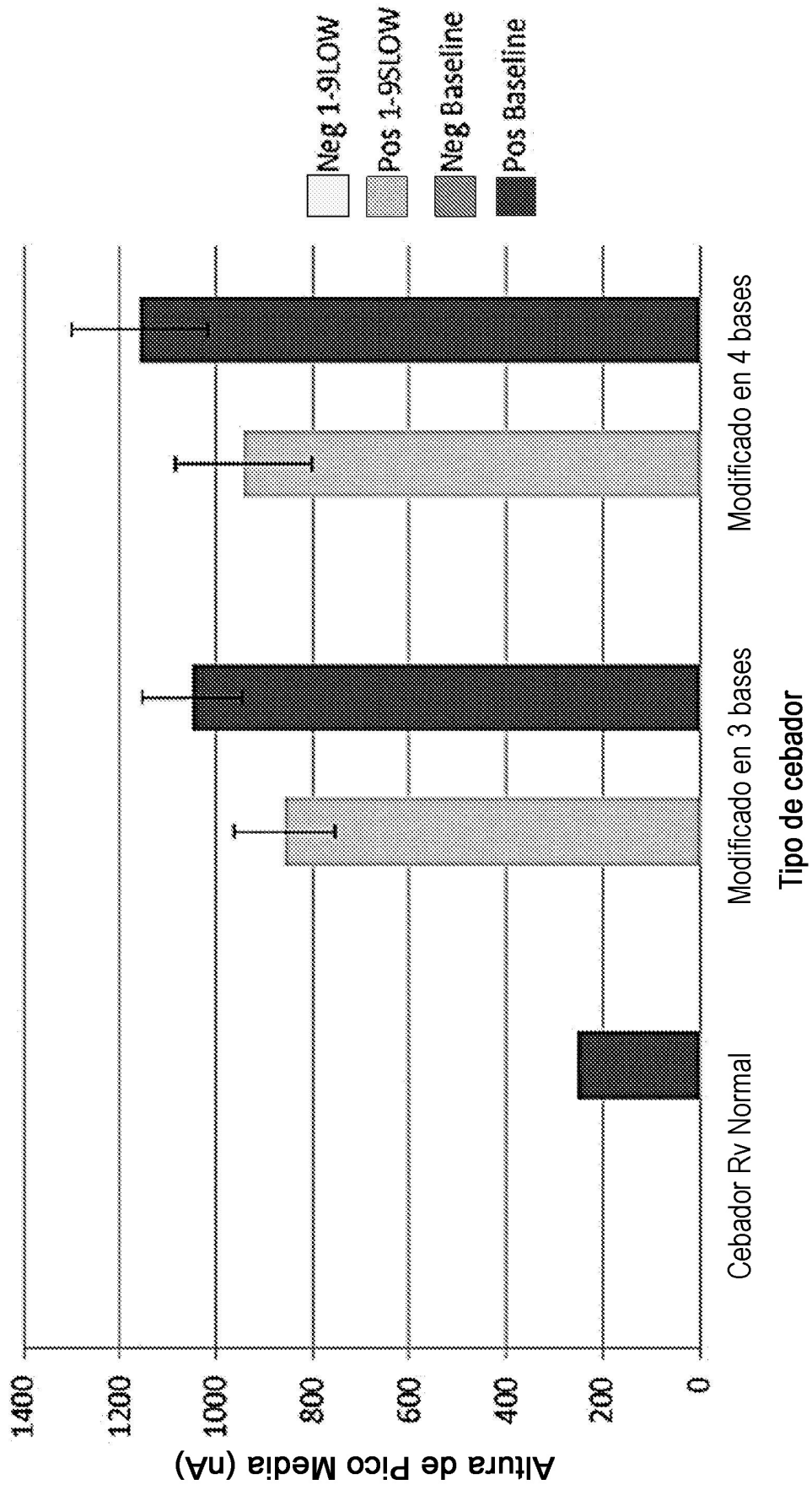
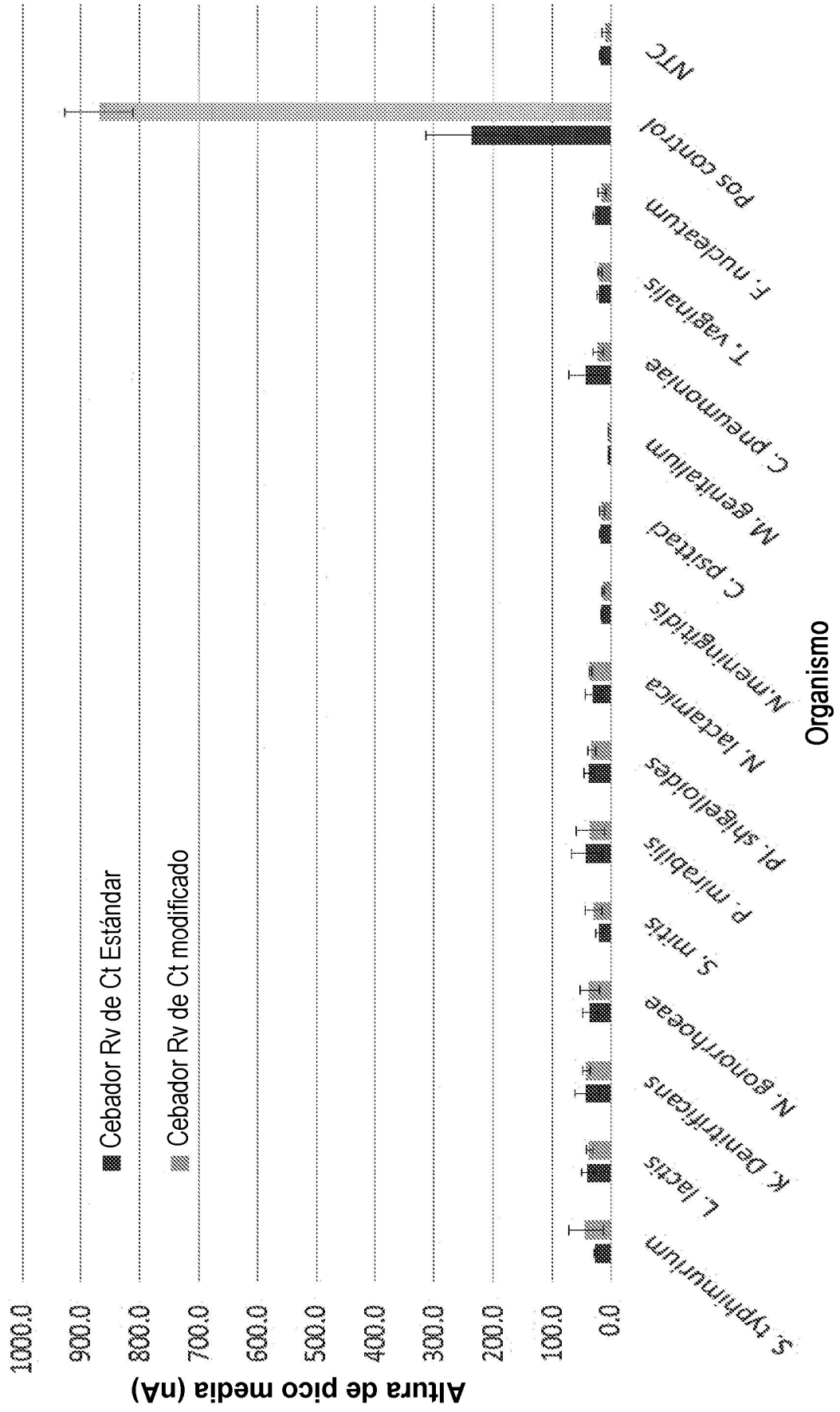


FIG. 4



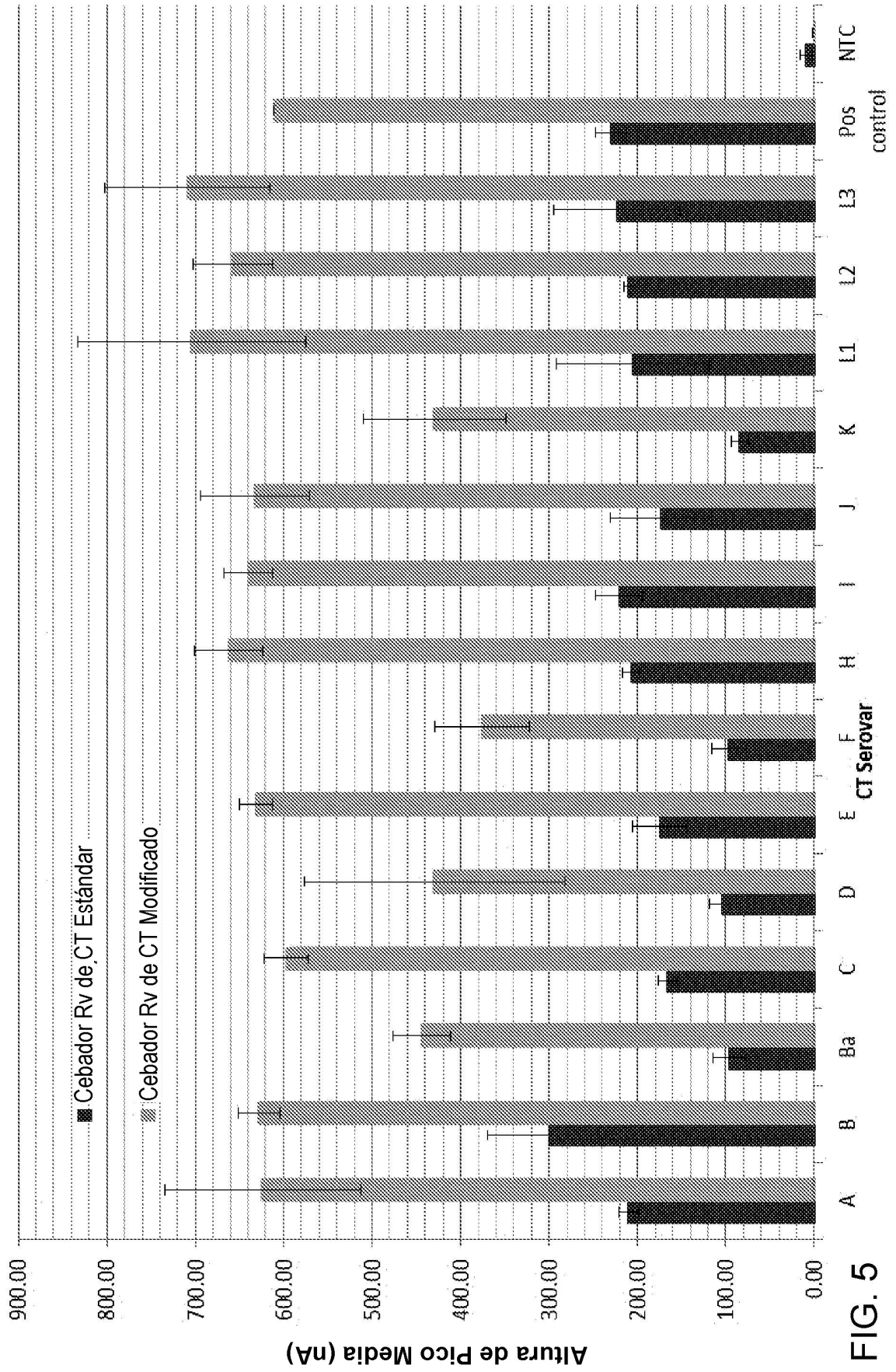


FIG. 5

FIG. 6

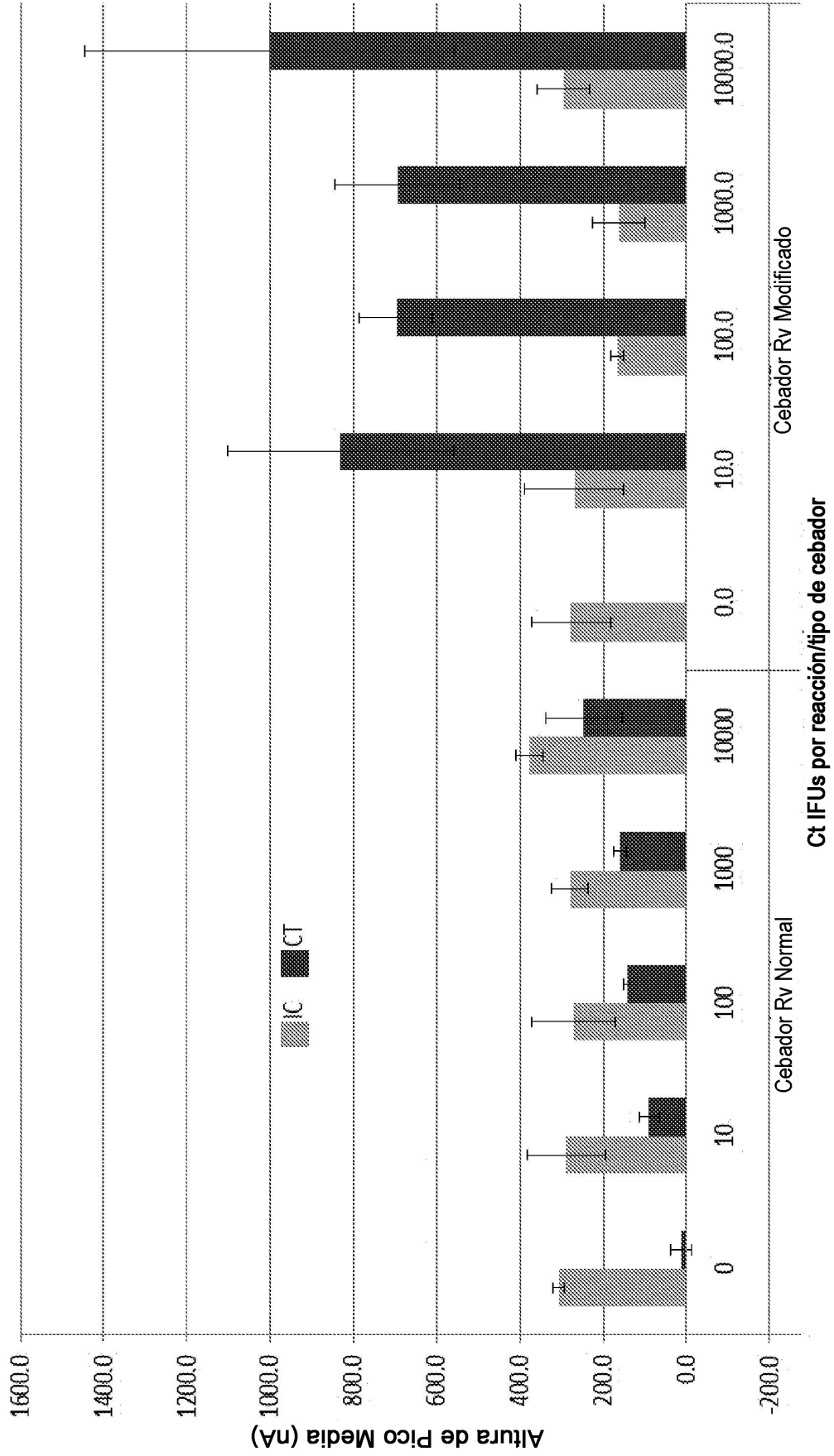


FIG. 7
ABR114 frente a 115 - Detecciones de CT

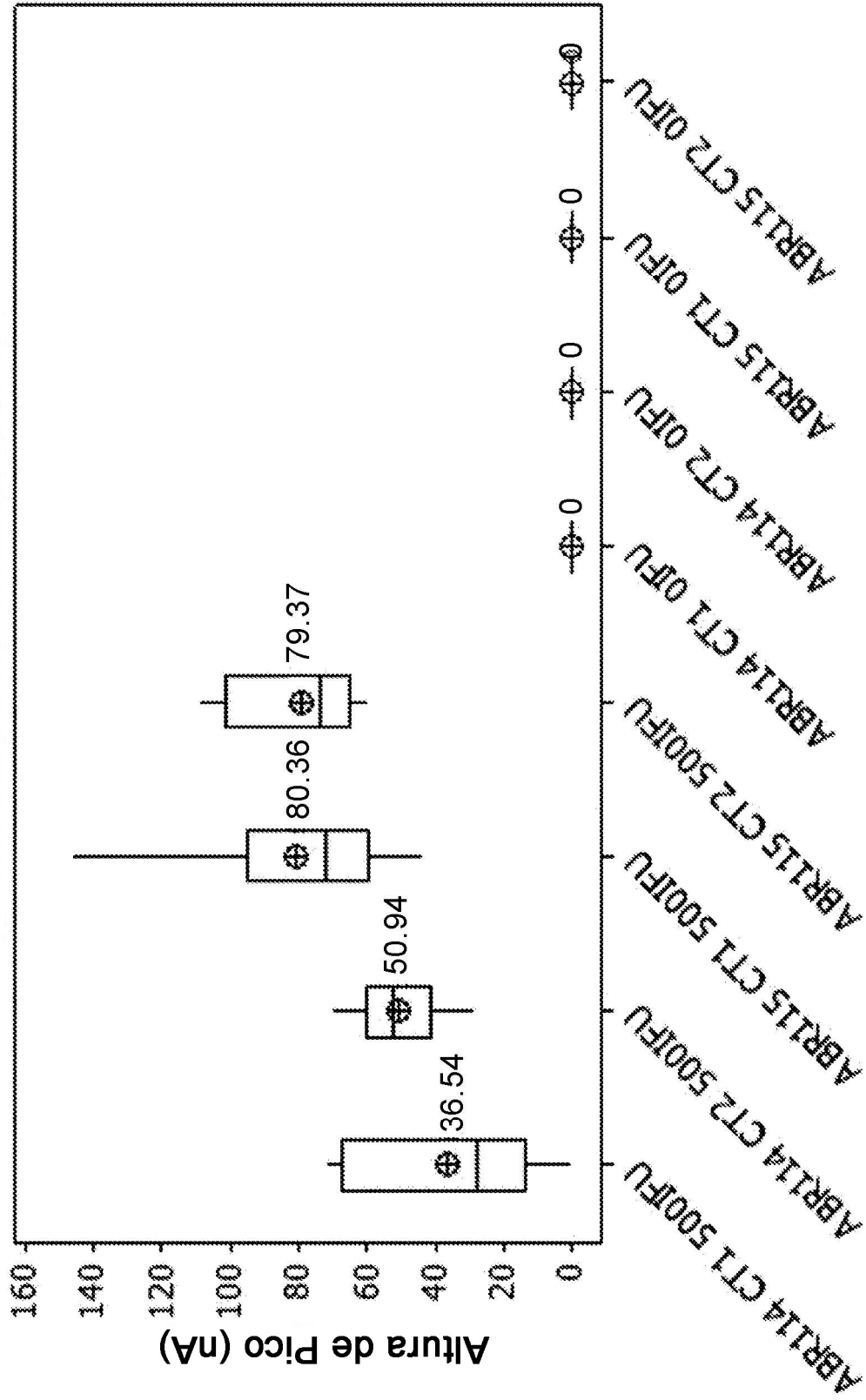


FIG. 8
Detección NG T1

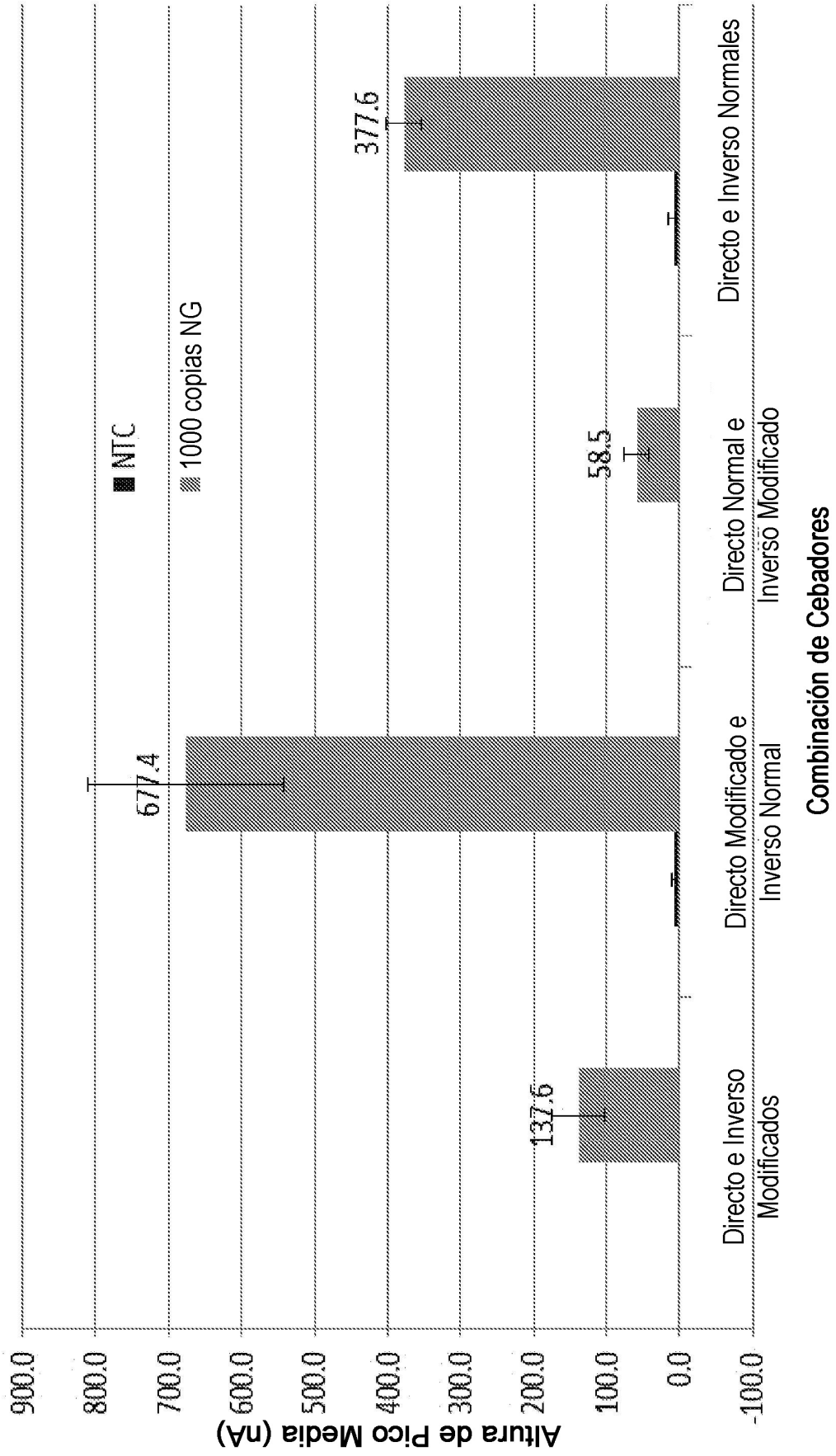


FIG. 9

