

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 337**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6844** (2008.01)

**C12Q 1/682** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2015 PCT/IB2015/002145**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16059474**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2015 E 15850183 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3207159**

54 Título: **ADN de conversión de secuencia y ADN amplificador de señal que tiene secuencias espaciadoras de poli-ADN y métodos de detección que los utilizan**

30 Prioridad:

**14.10.2014 US 201462063666 P**

**30.12.2014 US 201462098066 P**

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

**08.05.2020**

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (50.0%)**

**100 Abbott Park Road**

**Abbott Park, IL 60064, US y**

**TOKYO INSTITUTE OF TECHNOLOGY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KOMIYA, KEN;**

**KOMORI, MAKOTO y**

**YOSHIMURA, TORU**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 759 337 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

ADN de conversión de secuencia y ADN amplificador de señal que tiene secuencias espaciadoras de poli-ADN y métodos de detección que los utilizan

5

**Antecedentes**

La detección de un ácido nucleico diana en muestras de ensayo es importante en varios campos, incluyendo la medicina y la biología. Se dispone de muchas composiciones, plataformas de ensayo y procedimientos para la detección de moléculas específicas de ácido nucleico. Para que la detección sea efectiva en un entorno clínico, estos procedimientos no sólo deben ser reproducibles y precisos, sino también fiables y rápidos.

10

Un método común utilizado para la amplificación de secuencias específicas de una población de secuencias mixtas de ácido nucleico es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dado que una PCR estándar se lleva a cabo a tres temperaturas diferentes, la reacción puede estar asociada a desafíos tales como la dificultad para mantener temperaturas exactas y que la pérdida de tiempo aumenta en proporción al número de ciclos de amplificación. La desnaturalización de un molde de ADN bicatenario en cadenas sencillas (si bien depende en cierta medida de la secuencia determinada) requiere a menudo el uso de altas temperaturas de "fusión", lo que limita la clase de polimerasas de ADN que pueden utilizarse a aquellas que son altamente termoestables. En consecuencia, se han desarrollado tecnologías de plataformas de amplificación isotérmica para detectar ácidos nucleicos en condiciones de reacción menos estrictas que las utilizadas en la PCR. El documento WO2012077819 divulga el método de detección isotérmica en el que se basa la presente solicitud. No obstante, estas tecnologías de amplificación isotérmica no han abordado los desafíos asociados con conseguir tiempos de reacción más rápidos.

15

20

25

La siguiente divulgación proporciona métodos y composiciones alternativas para detectar una secuencia de ácido nucleico (tales como el ADN o el ARN) en condiciones de reacción menos estrictas que las utilizadas en la PCR. Los métodos y composiciones mantienen una selectividad y sensibilidad de secuencia que permite la detección de moléculas de ácido nucleico que pueden estar en una muestra en bajas concentraciones y/o moléculas de ácido nucleico de corta longitud. Los métodos y composiciones también reducen los tiempos de reacción. Entre otros aspectos, la divulgación proporciona nuevos métodos y moléculas de ácido nucleico que pueden mejorar el umbral de detección de ácidos nucleicos diana en una muestra a baja temperatura, en condiciones isotérmicas, y pueden simplificar o mejorar la preparación de la muestra y los métodos automatizados de detección, al tiempo que se reducen los tiempos de reacción.

30

**Sumario de la invención**

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con: un oligonucleótido (ADN de conversión de secuencia o ADN SC) que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (A), un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. En realizaciones de este aspecto, el método también comprende la determinación de la presencia o ausencia de un ADN señal, en donde la presencia del ADN señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

40

45

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con: un primer oligonucleótido (ADN de conversión de secuencia o ADN SC) que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (A), un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana; un segundo oligonucleótido (ADN amplificador de señal o ADN SA) que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (D) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) del primer oligonucleótido, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (E) (que puede ser el mismo o diferente del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) en el ADN SC), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS) (que puede ser igual o diferente de la PDS en el ADN SC) y una secuencia (F) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) del primer oligonucleótido; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. En realizaciones de este aspecto, el método también comprende la determinación de la presencia o ausencia de un ADN señal, en donde la presencia del ADN señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra. También, en algunas realizaciones de este aspecto, el ADN amplificador de señal (ADN SA) no tiene una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS).

50

55

60

El espaciador es un espaciador de poli-"ácido nucleico" y, por ejemplo, puede ser un espaciador de poli-ADN (PDS), un espaciador de poli-ARN (PRS), o un derivado o análogo de los mismos (por ejemplo, un ácido nucleico artificial). En determinadas realizaciones, la secuencia del espaciador de poli-ADN (PDS) puede comprender G, A, T, C, o cualquier combinación de las mismas. La secuencia del espaciador de poli-ARN (PRS) puede comprender G, A, U, C, o cualquier combinación de las mismas. Además, La secuencia PDS puede ser de 1 a 20, de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 8, de 1 a 6 o de 1 a 5 bases de longitud.

65

Como se describe con mayor detalle a continuación, los métodos divulgados en el presente documento son especialmente útiles para la detección de ARN diana en una muestra. La colocación en un ADN SC de una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS) entre el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) y la secuencia complementaria (C) al extremo 3' de una diana mejora enormemente la velocidad a la que se genera el ADN señal.

5 En otro aspecto, la divulgación se refiere a la aceleración o mejora de la actividad de corte de la endonucleasa corriente abajo, corriente arriba y/o adyacente a dúplex híbridos de ARN-ADN.

10 En ciertas realizaciones, la polimerasa puede tener actividad de desplazamiento de cadena. En realizaciones adicionales, la polimerasa puede ser deficiente en actividad exonucleasa 3' a 5', deficiente en actividad endonucleasa 5' a 3' o deficiente en ambas actividades endonucleasa, de 3' a 5' y de 5' a 3'. En algunas realizaciones, la polimerasa comprende una ADN polimerasa.

15 En realizaciones, la endonucleasa puede comprender una endonucleasa de corte o una endonucleasa de restricción que puede utilizarse en una reacción que corta un oligonucleótido.

20 Si bien el método descrito en el presente documento puede realizarse en condiciones normales de amplificación de ADN (por ejemplo, temperaturas normales asociadas con la PCR estándar, concentraciones de reactivo, duración de los ciclos, etc.), en algunas realizaciones el método puede realizarse en condiciones isotérmicas o bajo temperaturas sustancialmente constantes. En realizaciones adicionales, el método puede realizarse a temperaturas inferiores a las utilizadas en los métodos estándar de PCR. A modo de ejemplo, algunas realizaciones del método pueden realizarse a una temperatura o por debajo de una temperatura de hibridación o anillado óptima, o a una temperatura de hibridación o anillado determinada experimentalmente, del ácido nucleico diana (T) y la secuencia (C) del ADN SC, o del ADN señal (S) y la secuencia (F) del ADN SA tal y como se describe a continuación. En realizaciones, el método puede realizarse a una temperatura inferior a la temperatura de fusión del ácido nucleico diana (T) unido a la secuencia (C) del ADN SC o del ADN señal (S) unido a la secuencia (F) del ADN SA. En otras realizaciones, el método puede realizarse a temperaturas que permitan la actividad de la polimerasa y/o endonucleasa. En realizaciones adicionales, el método puede realizarse a temperaturas iguales o similares a la temperatura de reacción óptima de la polimerasa y/o endonucleasa presente en la mezcla de reacción para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra.

30 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un oligonucleótido, que en el presente documento puede estar referenciado como "ADN de conversión de secuencia" (o "ADN SC") que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (A), un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana.

35 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un oligonucleótido, que en el presente documento puede estar referenciado como "ADN amplificador" (o "ADN SA") que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (D) homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) de una secuencia de conversión de ADN (ADN SC), un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (E), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS) y una secuencia (F) que es homóloga a una secuencia de generación de ADN señal (A) de una secuencia de conversión de ADN (ADN SC). En otro aspecto, la divulgación se refiere a un ADN amplificador de señal que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (D) homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) de una secuencia de conversión de ADN (ADN SC), un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (E) y una secuencia (F) que es homóloga a una secuencia de generación de ADN señal (A) de un ADN de conversión de secuencia (ADN SC).

50 Los ADN SC y/o SA de la presente divulgación son generalmente lineales, sin embargo, estos ADN también pueden ser circulares (es decir, ADN minicircular (mc)). En la amplificación por círculo rodante (ACR), el cebador puede añadirse tras la unión del extremo 3' de un ácido nucleico diana a un ADN SC minicircular, o tras la unión del extremo 3' de un ADN señal a un ADN SA minicircular. El producto resultante de la ACR es un fragmento largo de ADN monocatenario que contiene miles de copias del ADN SC o del ADN SA.

55 En un ejemplo, la secuencia de generación del ADN señal (A) de un ADN SC puede ser complementaria al extremo 5' de un ácido nucleico diana (T). En este aspecto, el ácido nucleico diana (T) se une tanto a la secuencia de generación del ADN señal (A) como a la secuencia (C) del ADN SC. La unión del ácido nucleico diana (T) al ADN SC (en presencia de una ADN ligasa) da lugar a la formación de un ADN SC minicircular (ADN SC mc) y posteriormente al cebado de la amplificación por círculo rodante (ACR). El producto resultante de la ACR es un fragmento largo de ADN monocatenario que contiene miles de copias del ADN SC. En una realización, el sitio de reconocimiento de la endonucleasa del ADN SC se encuentra dentro de una región de tallo-bucle bicatenaria de una estructura de horquilla y, por lo tanto, está sujeto a corte (en el extremo 3' de la estructura de tallo-bucle) en presencia de una endonucleasa de corte. En presencia de ambas, una endonucleasa de corte y una polimerasa, puede generarse un ADN señal a partir del producto de la ACR.

65 Los métodos y oligonucleótidos de la presente divulgación pueden utilizarse en combinación con otros sistemas de amplificación y/o detección. Por ejemplo, cualquiera de los ADN señal producidos de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento puede servir como cebador en una reacción de amplificación por círculo

rodante. En una realización, el extremo 3' de un ADN señal producido de acuerdo con los métodos de la presente divulgación puede ser complementario de un molde de ADN minicircular, y la amplificación por círculo rodante puede iniciarse tras la unión del ADN señal.

5 La secuencia de ácido nucleico diana puede ser cualquier secuencia de nucleótidos de interés y, en algunas realizaciones, puede comprender una secuencia que se origina a partir de un agente infeccioso o de un micro-ARN. En otras realizaciones, el ácido nucleico diana puede comprender una secuencia de un gen que puede estar asociado a una enfermedad o trastorno.

10 En otras realizaciones, el sitio de reconocimiento de la endonucleasa comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia cortada por una endonucleasa. En otras realizaciones, la secuencia cortada por la endonucleasa está adyacente (corriente abajo o corriente arriba) a la secuencia que es específicamente reconocida por la endonucleasa.

15 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un composición para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicha composición: un oligonucleótido (ADN de conversión de secuencia o ADN SC) que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (A), un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS), y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte.

20 En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a un composición para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicha composición: un primer oligonucleótido (ADN de conversión de secuencia o ADN SC) que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (A), un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS), y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico; un segundo oligonucleótido (ADN amplificador de señal o ADN SA) que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (D) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) del primer oligonucleótido, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (E) (que puede ser el mismo o diferente del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) en el ADN SA), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS) (que puede ser igual o diferente de la secuencia PDS del primer oligonucleótido), y una secuencia (F) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) del primer oligonucleótido; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. En algunas realizaciones de este aspecto, el segundo oligonucleótido o ADN amplificador de señal (ADN SA) no tiene una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS).

35 Las composiciones también pueden comprender una polimerasa y/o una endonucleasa capaz de cortar en el sitio de reconocimiento o adyacente al sitio de reconocimiento de la endonucleasa del primer y segundo oligonucleótido cuando el sitio de reconocimiento de la endonucleasa es bicatenario. Las composiciones también pueden incluir otros reactivos tales como tampones de reacción, desoxirribonucleótidos y moléculas marcadoras tales como, por ejemplo, sondas de ADN modificadas con un fluoróforo (por ejemplo, sondas de baliza molecular) para la detección fluorescente de ADN recién sintetizado. Se pueden utilizar moléculas marcadoras generalmente conocidas en la técnica, incluyendo sondas conjugadas con acridinio (es decir, tecnología quimioluminiscente).

45 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un kit para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho kit: un oligonucleótido (ADN de conversión de secuencia o ADN SC) que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (A), un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS), y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. En algunas realizaciones, los kit pueden comprender además una polimerasa y/o una endonucleasa capaz de cortar un sitio de reconocimiento de la endonucleasa o un sitio adyacente a un sitio de reconocimiento de la endonucleasa. Los kit también pueden incluir reactivos tales como tampones de reacción, desoxirribonucleótidos y moléculas marcadoras tales como, por ejemplo, sondas de ADN modificadas con un fluoróforo (por ejemplo, sondas de baliza molecular) para la detección fluorescente de ADN recién sintetizado tal como un ADN señal. Los kit también pueden comprender instrucciones de uso en la práctica de cualquiera de los métodos divulgados en el presente documento.

55 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un kit para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho kit: un primer oligonucleótido (ADN de conversión de secuencia o ADN SC) que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (A), un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS), y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico; un segundo oligonucleótido (ADN amplificador de señal o ADN SA) que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (D) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) del primer oligonucleótido, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (E) (que puede ser el mismo o diferente del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) en el ADN SA), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS) (que puede ser igual o diferente de la secuencia PDS del primer oligonucleótido), y una secuencia (F) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) del primer oligonucleótido. En algunas realizaciones, el segundo oligonucleótido o ADN amplificador de señal (ADN SA) no tiene una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS). En algunas realizaciones, los kit pueden comprender además una polimerasa y/o una endonucleasa capaz de cortar un sitio de reconocimiento de la endonucleasa o un sitio adyacente a un sitio de

reconocimiento de la endonucleasa. Los kit también pueden incluir reactivos tales como tampones de reacción, desoxirribonucleótidos y moléculas marcadoras tales como, por ejemplo, sondas de ADN modificadas con un fluoróforo (por ejemplo, sondas de baliza molecular) para la detección fluorescente de ADN recién sintetizado tal como un ADN señal. Los kit también pueden comprender instrucciones de uso en la práctica de cualquiera de los métodos divulgados en el presente documento.

Los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kit divulgados en el presente documento pueden utilizarse en combinación con plataformas de sistemas integrados. Por ejemplo, los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kit de la presente invención pueden utilizarse en combinación con el sistema ARCHITECT de Abbott. Los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kit divulgados en el presente documento pueden utilizarse con plataformas de sistemas de preparación de muestras tales como, por ejemplo, el sistema de preparación de muestras m2000sp (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL). De forma similar, los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kit divulgados en el presente documento pueden utilizarse con plataformas de sistemas de diagnóstico inmediato, por ejemplo, el sistema de diagnóstico inmediato i-STAT de Abbott (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL). Además, los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kit de la presente invención pueden utilizarse con cualquier número de otros dispositivos, plataformas de ensayo e instrumental tales como, por ejemplo, detectores de fluorescencia portátiles, micro pH-metros, dispositivos microfluídicos, micromatrices, sistemas de detección enzimáticos, tiras inmunocromatográficas y dispositivos de flujo lateral.

Los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kit divulgados en el presente documento pueden utilizarse en el campo de los diagnósticos moleculares, incluyendo el diagnóstico de enfermedades no infecciosas y de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kit de la presente invención pueden utilizarse para detectar microARN, ARN mensajero, ARN no codificante y ADN metilado en fluidos humanos tales como sangre, orina, saliva, sudor y heces. De forma similar, los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kit de la presente invención pueden utilizarse para detectar ácidos nucleicos diana originarios de enfermedades infecciosas tales como, por ejemplo, VHB, VHC, VIH, VPH, HTLV-I, Parvovirus, Tuberculosis, Sífilis, Malaria y *Entamoeba histolytica* en fluidos humanos como, orina, saliva, sudor y heces.

se entiende que en algunos aspectos de la presente divulgación, los ADN SC y SA divulgados en el presente documento pueden comprender nucleótidos químicamente modificados. Por ejemplo, los ADN SC y SA divulgados en el presente documento pueden comprender LNA (ácido nucleico bloqueado), BNA (ácido nucleico puente), ENA (ácido nucleico con puente de etileno), GNA (ácido nucleico glicólico), TNA (ácido nucleico treósico), PNA (ácido nucleico peptídico), Ácido nucleico morfolino, nucleótidos de fosforotioato o combinaciones y/o derivados de los mismos.

Los aspectos adicionales, realizaciones y ventajas proporcionadas por la presente divulgación se harán evidentes en vista de la siguiente descripción.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es un diagrama que ilustra esquemáticamente un ejemplo no limitativo de un ADN de conversión de secuencia (ADN SC) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra. El ADN SC comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de señal (A), un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) que puede utilizarse en una reacción de corte, una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS), y una secuencia (C) complementaria al ácido nucleico diana.

La figura 1B es un diagrama que ilustra esquemáticamente un ejemplo no limitativo de un ADN amplificador de señal (ADN SA) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra. El ADN SA comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (D) homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) de un ADN SC; un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (E) (que puede ser el mismo o diferente del sitio de reconocimiento (B) de la endonucleasa de un ADN SC, una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS) (que puede ser igual o diferente de la secuencia PDS de un ADN SC), y una secuencia (F) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) del primer ADN SC. En algunas realizaciones, el ADN amplificador de señal (ADN SA) no tiene una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS).

La figura 2A es un diagrama que ilustra esquemáticamente la progresión de una reacción ejemplar de un ácido nucleico diana (T) con un ADN de conversión de secuencia (ADN SC) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra. Las secuencias (A)-(C), y las PDS, son las descritas en la figura 1A, la secuencia (T) representa una secuencia diana, la secuencia (X) representa la secuencia producida cuando la diana (T) ligada a la secuencia (C) es ampliada por la polimerasa, la secuencia (X') representa la secuencia de la extensión cortada, y la secuencia (S) representa la secuencia de ADN señal producida eventualmente.

La figura 2B es un diagrama que ilustra esquemáticamente la progresión de una reacción ejemplar de un ADN señal (S) con un ADN de amplificación de señal (SA) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra. Las secuencias (D)-(F), y las PDS, son las descritas en la figura 1B, la secuencia (S) es el ADN señal producido de la reacción del ácido nucleico diana (T) con el ADN SC como se describe en la figura 2A, la

secuencia (Y) representa la secuencia producida cuando el ADN señal (S) unido a la secuencia (D) es ampliado por la polimerasa, la secuencia (Y') representa la secuencia de la extensión cortada, y la secuencia (S) representa la secuencia de ADN señal producida eventualmente. Puesto que la secuencia de generación de señal SA (D) es homóloga a la secuencia de generación de señal SC (A), se produce el mismo ADN señal (S).

5 La figura 3 muestra los resultados de las reacciones realizadas en el ejemplo 1, demostrando que la presencia de una secuencia PDS situada entre el sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y la secuencia (C) de un ADN SC acelera la amplificación del ADN señal.

10 La figura 4 muestra los resultados de las reacciones realizadas en el ejemplo 2, demostrando que la presencia de una secuencia PDS situada entre el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) y la secuencia (C) de un ADN SC mejora el corte del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B).

### Descripción detallada

15 En un sentido general, la divulgación se refiere a constructos de ácidos nucleicos que son sorprendentemente efectivos en la detección de ácidos nucleicos diana en una muestra de ensayo. Los constructos descritos en el presente documento comprenden secuencias de ácidos nucleicos que permiten la producción de unos ADN señal que se generan en presencia de un ácido nucleico diana, con un aumento concomitante en la velocidad de la reacción. Los métodos y constructos de ácidos nucleicos descritos en el presente documento proveen una detección selectiva, sensible y rápida de los ácidos nucleicos diana que puede ser ventajosamente realizada en condiciones isotérmicas y de baja temperatura.

25 En un aspecto, la divulgación se refiere a un oligonucleótido, que en el presente documento puede estar referenciado como "ADN amplificador" (o "ADN SA") que comprende, en la dirección 5' a 3', una primera secuencia que es complementaria a una secuencia de ADN señal conocida, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa, una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS), y una segunda secuencia que es complementaria de la misma secuencia de ADN señal conocida que la primera secuencia. La primera secuencia es la secuencia de generación de ADN señal (D) de la figura 1B, que es homóloga a una secuencia conocida de generación de ADN señal (A) de un ADN SC. La segunda secuencia es la secuencia (F) de la figura 1B, que es homóloga a la misma secuencia conocida de generación de ADN señal (A) del mismo ADN de SC.

35 En este aspecto, las longitudes de la primera y segunda secuencia pueden variar, pero normalmente cada una de las secuencias tiene la misma longitud que la otra. En realizaciones, la longitud de las secuencias puede estar en un intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos, pero más típicamente van de aproximadamente 5 a aproximadamente 30, de aproximadamente 10 a aproximadamente 30, o de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. El sitio de reconocimiento de la endonucleasa comprende una secuencia que puede ser reconocida, ligada y cortada por una endonucleasa tal y como se describe en el presente documento. Tales secuencias se conocen generalmente en la técnica. El sitio de reconocimiento de la endonucleasa puede comprender nucleótidos adicionales 5' o 3' con respecto al sitio de unión de la endonucleasa (o tanto 5' como 3'), pero normalmente no tiene más de 10 nucleótidos de longitud.

45 La divulgación proporciona nuevos constructos de oligonucleótidos de conversión de secuencia (SC) y amplificadores de señal (SA), y combinaciones de los mismos, que son útiles para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, con un aumento concomitante en la velocidad de la reacción. Como se representa en la realización ilustrativa de la figura 1A, un oligonucleótido de ADN de conversión de secuencia (ADN SC) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (A), un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana.

50 Como se representa en la realización ilustrativa de la figura 1B, un ADN amplificador de señal (ADN SA) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (D) homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) de un ADN SC; un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (E) (que puede ser el mismo o diferente del sitio de reconocimiento (B) de la endonucleasa de un ADN SC), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS) (que puede ser igual o diferente de la secuencia PDS de un ADN SC), y una secuencia (F) que comprende una secuencia que es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) de un ADN SC. En algunas realizaciones, el ADN amplificador de señal (ADN SA) no tiene una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS).

60 Como se ilustra en la figura 1A, los ADN SC descritos en el presente documento comprenden una secuencia de generación de señal (A). La secuencia de generación de señal (A) en el ADN SC puede comprender cualquier secuencia de ácido nucleico deseada y no está limitada por ninguna secuencia en particular. Como se analiza en más detalle a continuación, la secuencia de generación de señal (A) proporciona al menos una parte del modelo para un ADN señal (por ejemplo, el ácido nucleico (S) en la figura 2), cuya producción indica la presencia del ácido nucleico diana. La secuencia de generación de señal (A) en el ADN SC, no está limitada por la longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de generación de señal (A) en el ADN SC es de aproximadamente 5 a aproximadamente

100 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 100. En realizaciones, la secuencia de generación de señal (A) en el ADN SC es de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 30. En algunas realizaciones, la secuencia de generación de señal (A) en el ADN SC es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 10 y 30. En otras realizaciones adicionales, la secuencia de generación de señal (A) en el ADN SC es de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 15 y 30 (por ejemplo, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29 o aproximadamente 30 bases).

Como se ilustra en la figura 1B, los ADN SA descritos en el presente documento comprenden una secuencia de generación de ADN señal (D) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) de un ADN SC, y una secuencia (F) que es homóloga a la misma secuencia de generación de ADN señal (A) del mismo ADN SC. En algunas realizaciones, para ser homólogas a la secuencia de generación de ADN señal (A) de un ADN SC, las secuencias (D) y (F) son completamente idénticas a la secuencia de generación de ADN señal (A) correspondiente. En otras realizaciones, la secuencia (F) es idéntica a la secuencia de generación de ADN señal correspondiente (A) de un ADN SC, excepto que es de aproximadamente 1 a aproximadamente 5, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 2, o 1 base más corta en el extremo 3'. Cuando la secuencia de generación de ADN señal (D) de un ADN SA es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) de un ADN SC, se produce el mismo ADN señal (S) y se amplifica exponencialmente.

Los ADN SC y SA comprenden los sitios de reconocimiento de endonucleasa (B) y (E) respectivamente, que pueden ser iguales o diferentes. En forma monocatenaria (por ejemplo, la estructura de las figuras 1A y 1B), los sitios de reconocimiento de endonucleasa (B) y (E) pueden comprender una secuencia complementaria a una secuencia que puede ser cortada por una endonucleasa. La secuencia que es cortada por la endonucleasa puede estar dentro, corriente abajo o corriente arriba de la secuencia reconocida por la endonucleasa. De manera adecuada, cuando es bicatenaria, los sitios de reconocimiento de endonucleasa (B) y (E) pueden ser reconocidos por una o más endonucleasas presentes en la reacción, y los sitios de reconocimiento de endonucleasa (B) y (E) (o una secuencia adyacente a los sitios de reconocimiento de endonucleasa (B) y (E)) pueden escindirse en una sola cadena del ADN bicatenario (es decir, se pueden cortar). Como se describe con mayor detalle a continuación, la unión de un ácido nucleico diana a la secuencia complementaria (C) del ADN SC ceba la replicación a través de la ADN polimerasa para crear una forma activa, bicatenaria del sitio de reconocimiento (B) de la endonucleasa que ahora puede servir como sitio de reconocimiento de una endonucleasa (figura 2A). El corte de la endonucleasa en el sitio de la endonucleasa bicatenario recién creado (B), o en un sitio adyacente al sitio de la endonucleasa bicatenario recién creado (B), ceba entonces la replicación a través de la ADN polimerasa y genera un ADN señal (S) (véase, por ejemplo, la figura 2A). Como se ilustra en la figura 2A, el sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) está orientado de tal manera que se corta la cadena recién replicada, no el ADN SC. Es decir, cuando se genera la cadena recién replicada, la orientación del sitio de reconocimiento de la endonucleasa en (B) dirige la actividad de la endonucleasa (escisión) de la cadena recién replicada. Por lo tanto, el sitio de reconocimiento de endonucleasa comprende una secuencia complementaria a una secuencia cortada por una endonucleasa, permitiendo que el oligonucleótido SC permanezca intacto a lo largo de la reacción (es decir, que el ADN SC no se corte ni se escinda).

Los ADN SC y SA también pueden comprender una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS). En el ADN SC, la secuencia PDS se sitúa entre el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) y la secuencia (C) complementaria al extremo 3' del ácido nucleico diana. En el ADN SA, la secuencia PDS se sitúa entre el sitio de reconocimiento de la endonucleasa en (E) y la secuencia (F) sustancialmente homóloga a la secuencia de generación de señal (A) de un ADN SC. En algunas realizaciones, el ADN amplificador de señal (ADN SA) no tiene una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS). La secuencia PDS de los ADN SC y SA puede ser igual o diferente. La secuencia PDS puede estar compuesta por una o más de las bases naturales G, A, T o C, y puede ser de 3 a 20, de 3 a 18, de 3 a 16, de 3 a 14, de 3 a 12, de 3 a 10, de 3 a 8, de 3 a 6 o de 3 a 5 bases de longitud. Como se ilustra a continuación, la presencia de una secuencia PDS en uno o más de los ADN SC o SA descritos en el presente documento puede acelerar las reacciones realizadas de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento tanto como de 5 a 60, 5 a 50, 5 a 40, 5 a 30, 5 a 20, o de 5 a 10 minutos.

Como se describe con mayor detalle a continuación, la unión del ADN señal (S), generado a partir de la secuencia de generación de señal (A) de un ADN SC, a la secuencia (F) de un ADN SA ceba la replicación a través de la ADN polimerasa para crear una forma bicatenaria activa del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (E) del ADN SA que puede servir como sitio de reconocimiento de una endonucleasa (figura 2B). El corte de la endonucleasa en el sitio de endonucleasa bicatenario recién creado (E) del ADN SA, o en un sitio adyacente al sitio de endonucleasa bicatenario recién creado (E), entonces ceba la replicación a través de la ADN polimerasa y genera un ADN señal (S) que es el mismo que el ADN señal (S) generado a partir del ADN SC (figura 2B). Como se ilustra en la figura 2B, el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (E) está orientado de tal manera que la cadena recién replicada se corte, no el ADN SA. Es decir, cuando se genera la cadena recién replicada, la orientación del sitio de reconocimiento de la endonucleasa en E dirige la actividad de la endonucleasa (escisión) de la cadena recién

replicada. Por lo tanto, el sitio de reconocimiento de endonucleasa comprende una secuencia complementaria a una secuencia cortada por una endonucleasa, permitiendo que el oligonucleótido SA permanezca intacto durante toda la reacción (es decir, que el ADN SA no se corte ni se escinda).

- 5 La secuencia (C) del ADN SC que es complementaria al ADN diana no está limitada por la longitud, y puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 100. En algunas realizaciones, la secuencia (C) del ADN SC es de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 30. En algunas realizaciones, la secuencia (C) del ADN SC es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 10 y 30.
- 10 En realizaciones adicionales, la secuencia (C) del ADN SC es de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 15 y 30.

Las secuencias complementarias son capaces de formar interacciones de puente de hidrógeno para formar una estructura de ácido nucleico bicatenaria (por ejemplo, pares de bases de ácido nucleico). Por ejemplo, una

15 secuencia que es complementaria a una primera secuencia incluye una secuencia que es capaz de formar pares de bases Watson-Crick con la primera secuencia. Como se usa en el presente documento, el término "complementario" no requiere que una secuencia sea complementaria a lo largo de toda su extensión a su cadena complementaria, y engloba una secuencia que es complementaria a una parte de otra secuencia. Así, en algunas realizaciones, una secuencia complementaria abarca secuencias que son complementarias en toda la longitud de la secuencia o en

20 una parte de la misma (por ejemplo, superior a aproximadamente el 10 %), aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80%, o aproximadamente el 90% de la longitud de la secuencia). Por ejemplo, dos secuencias pueden ser complementarias entre sí a lo largo de una longitud que oscila entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100 nucleótidos consecutivos (contiguos), o cualquier número entero entre

25 2 y 100. En algunas realizaciones, dos secuencias pueden ser complementarias entre sí a lo largo de una longitud que oscila entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos consecutivos (contiguos), o cualquier número entero entre 15 y 30. Como se usa en el presente documento, las secuencias complementarias pueden englobar secuencias que tienen algunos emparejamientos erróneos en la secuencia. Por ejemplo, las secuencias complementarias pueden incluir secuencias que son complementarias a al menos de un 70 % a un 100 %, preferentemente a más del 95 % de la longitud de la secuencia. A pesar de algunos emparejamientos erróneos, las secuencias complementarias generalmente tienen la capacidad de hibridar de manera selectiva entre sí en condiciones adecuadas tales como, por ejemplo, condiciones rigurosas y altamente rigurosas como las descritas en el presente documento o normalmente conocidas por los expertos en la materia.

- 35 Los ADN SC y SA pueden sintetizarse por métodos conocidos. Por ejemplo, los ADN SC y SA pueden sintetizarse utilizando el método fosforamidita, el método fosfodiéster, el método H-fosfonato o el método tiofosfonato. En algunas realizaciones, los ADN SC y/o SA pueden purificarse, por ejemplo, utilizando HPLC de intercambio iónico.

Los ADN SC y SA pueden comprender modificaciones químicas como es generalmente sabido en la técnica. En

40 algunas realizaciones, por ejemplo, los ADN SC y SA pueden comprender nucleótidos químicamente modificados (por ejemplo, el derivado 2'-O metilo, fosforotioatos, etc.), modificaciones en el extremo 3', modificaciones en el extremo 5', o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el extremo 3' de los ADN SC y SA puede modificarse de manera que no se produzca una reacción de ampliación a partir del extremo 3' del ADN SC o SA (por ejemplo, al unirse una secuencia diana u otra secuencia no diana), que podría servir como cebador para la ampliación por la polimerasa). Como se ilustra en la figura 2A, es el extremo 3' del ácido nucleico diana (T), no el ADN SC, el que inicia la replicación del ADN. Cualquier replicación iniciada desde el extremo 3' de los ADN SC o SA puede conducir a errores de detección (por ejemplo, falsos positivos). Además, las reacciones de ampliación no específicas procedentes de un extremo 3' no modificado del ADN SC que se deriven de sucesos tales como, por ejemplo, la unión entre el ADN SC y una secuencia no diana, la unión entre el ADN SC y una secuencia diana en una posición incorrecta, la unión entre los ADN SC y SA, o la síntesis de ADN sin molde *de novo* o *ab initio* también puede dar lugar a errores de detección. Por consiguiente, en realizaciones, los ADN SC y SA comprenden una modificación del extremo 3' que puede reducir o eliminar la aparición de reacciones de ampliación no deseadas, tales como los analizados anteriormente. Los ejemplos no limitativos de modificaciones del extremo 3' incluyen TAMRA, DABCYL y FAM. Otros ejemplos no limitativos de modificaciones incluyen, por ejemplo, biotilación,

50 fluorocromación, fosforilación, tiolación, aminación, nucleótidos invertidos, o grupos abásicos.

En otro aspecto, la presente invención engloba métodos para detectar un ácido nucleico diana (T) en una muestra. Los métodos generalmente comprenden poner en contacto con dicha muestra: un primer oligonucleótido (o ADN de conversión de secuencia o ADN SC) que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (A), un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS), y una secuencia (C) que es complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana (T); un segundo oligonucleótido (o ADN amplificador de señal o ADN SA) que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal (D) homóloga a la secuencia de generación de ADN señal (A) del primer oligonucleótido, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa (E) (que es el mismo que el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) del primer oligonucleótido), una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS) (que es igual o diferente de la PDS del primer oligonucleótido), y una secuencia (F) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal del primer

60

65

oligonucleótido (A); una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. En realizaciones de este aspecto, el método también comprende la determinación de la presencia o ausencia de un ADN señal, en donde la presencia del ADN señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra. En algunas realizaciones, el ADN amplificador de señal (ADN SA) no tiene una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS).

5 El método comprende poner en contacto una muestra con una endonucleasa. La endonucleasa puede ser una endonucleasa de corte o una endonucleasa de restricción capaz de o que puede utilizarse para cortar la secuencia complementaria al sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) dentro del ADN SC, o la secuencia complementaria al sitio de reconocimiento de la endonucleasa (E) dentro del ADN SA. En algunas realizaciones, la  
10 endonucleasa comprende una endonucleasa de corte o una endonucleasa de restricción que puede catalizar o puede utilizarse para catalizar una reacción de corte de ADN bicatenario. En realizaciones que proporcionan una endonucleasa de corte, el enlace fosfodiéster de una cadena de un ADN bicatenario puede escindirse para generar un grupo fosfato en el sitio 5' del sitio de escisión y un grupo hidroxilo en el sitio 3'. Los ejemplos no limitantes de endonucleasas de corte incluyen Nb.BbvCI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI, Nb.BsmI, Nt.CviPII y Nt.BsmAI.

En algunas realizaciones, la endonucleasa puede ser una endonucleasa de restricción. En estas realizaciones, el sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción puede modificarse de modo que la endonucleasa de restricción escinda el enlace fosfodiéster en una sola cadena de un ADN bicatenario y genere un corte en la doble  
20 cadena. Pueden utilizarse métodos o estrategias para modificar la actividad de la endonucleasa de restricción, tales como, por ejemplo, incluir una modificación química en al menos una cadena de un ácido nucleico bicatenario que no esté escindido por la enzima de restricción. Un ejemplo no limitativo de tal modificación incluye la sustitución del átomo de oxígeno del enlace fosfodiéster de una cadena por un átomo de azufre.

25 En realizaciones que proporcionan una endonucleasa de restricción, el enlace fosfodiéster de una cadena de un ADN bicatenario puede escindirse para generar un grupo fosfato en el sitio 5' del sitio de escisión y un grupo hidroxilo en el sitio 3'. Los ejemplos no limitativos de endonucleasas de restricción incluyen Hinc II, Hind II, Ava I, Fnu4HI, Tth111I y NciI.

30 El método comprende poner en contacto una muestra con una polimerasa. En algunas realizaciones, la polimerasa puede ser una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena. En algunas realizaciones, la polimerasa puede ser una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5'-3', carece de actividad de exonucleasa 3'-5' o carece de actividad exonucleasa 5'-3' y 3'-5'. La polimerasa puede ser eucariota, procariota o de origen viral, y también puede ser genéticamente modificada. En algunas realizaciones, la polimerasa se selecciona entre las que  
35 funcionan a temperaturas bajas, incluyendo la temperatura ambiente (por ejemplo, la temperatura ambiente). Los ejemplos no limitativos de ADN polimerasas incluyen los fragmentos de Klenow, la ADN polimerasa I derivada de *E. coli*, ADN polimerasas de Bst deficientes en actividad exonucleasa 5' a 3' derivadas de *Bacillus stearothermophilus*, y ADN polimerasas de Bca deficientes en actividad exonucleasa 5' a 3' derivadas de *Bacillus caldotenax*.

40 En las figuras 2A y 2B se ilustra una realización no limitativa de los métodos descritos en el presente documento. En resumen, como se ilustra en la figura 2A, se pone en contacto una muestra con ADN SC en presencia de una ADN polimerasa y una endonucleasa capaz de cortar la forma bicatenaria (es decir, la secuencia complementaria) del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B), o un sitio adyacente a la forma bicatenaria del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B). Si un ácido nucleico diana (T) está presente en la muestra, la secuencia del extremo 3' del  
45 ácido nucleico diana (T) se hibrida con la secuencia (C) del ADN SC que es complementaria a la diana y ceba o inicia la replicación (por la ADN polimerasa presente en la mezcla de reacción) generando así una secuencia de ampliación bicatenaria (X) que incluye el sitio de reconocimiento de la endonucleasa bicatenaria (B). El reconocimiento del sitio de reconocimiento bicatenario de la endonucleasa recién generada (B) (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), y el posterior corte de la cadena recién generada (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), genera la secuencia del oligonucleótido señal (S) y la secuencia de ampliación (X'). Como el 3'-OH de la secuencia (X') en el corte sirve como un sitio de iniciación para rondas posteriores de replicación de desplazamiento de cadena, el oligonucleótido (S) es desplazado del ADN SC por la ADN polimerasa, que continúa replicando y amplificando el ADN señal (S) en la mezcla de reacción.

55 Como se ilustra más adelante en la figura 2B, la señal resultante de la producción del ADN señal (S) puede amplificarse aún más por la presencia de un ADN amplificador de señal (o ADN SA). En resumen, El ADN señal (S) presente en una reacción se hibrida con la secuencia (F) del ADN SA que ceba o inicia la replicación (por la ADN polimerasa presente en la mezcla de reacción) generando así una secuencia de ampliación bicatenaria (Y) que incluye el sitio de reconocimiento de la endonucleasa bicatenaria (E). El reconocimiento del sitio de reconocimiento bicatenario de la endonucleasa recién generada (E) (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), y el  
60 subsiguiente corte de la cadena recién generada (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), genera la secuencia señal del oligonucleótido (S) y la secuencia de ampliación (Y'). Puesto que el 3'-OH de la secuencia (Y') en el corte sirve como un sitio de iniciación para rondas subsiguientes de replicación por desplazamiento de cadena, el oligonucleótido (S) es desplazado del ADN SA por la ADN polimerasa, que continúa replicando y amplificando el  
65 ADN señal (S) en la mezcla de reacción.

Los métodos de acuerdo con la presente invención son útiles para la detección de ácidos nucleicos diana en una muestra. En particular, los métodos de la presente invención son útiles para la detección de ARN diana en una muestra. Como se ejemplifica a continuación, la presencia en un ADN SC de una secuencia espaciadora de poli-ADN (PDS) entre el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) y la secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana mejora la producción del ADN señal (S). Como también se ejemplifica a continuación, la presencia de la PDS aumenta la velocidad a la que la endonucleasa corta el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B).

Los métodos de acuerdo con la invención pueden realizarse en condiciones de temperatura isotérmicas o sustancialmente constantes. En realizaciones que se relacionan con realizar el método a una temperatura sustancialmente constante, se permite alguna fluctuación de la temperatura. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una temperatura sustancialmente constante puede fluctuar dentro de un intervalo de temperatura diana deseado o determinado (por ejemplo, aproximadamente de +/- 2 °C o aproximadamente de +/- 5 °C). En realizaciones, una temperatura sustancialmente constante puede incluir temperaturas que no incluyan ciclos térmicos. En algunas realizaciones, los métodos pueden realizarse a temperaturas isotérmicas o sustancialmente constantes, tales como, por ejemplo, (1) temperaturas iguales o inferiores a aproximadamente la temperatura óptima de hibridación o anillado calculada/prevista o determinada experimentalmente para el ácido nucleico diana (T) para la secuencia (C) del ADN SC; (2) temperaturas iguales o inferiores a la temperatura de fusión del ácido nucleico diana (T) unido al ADN SC (normalmente, las temperaturas de hibridación o anillado son ligeramente inferiores a la temperatura de fusión); (3) temperaturas iguales o inferiores a la temperatura de fusión del ADN señal (S) unido al ADN SA; o (4) temperaturas iguales o aproximadas a la temperatura de reacción óptima calculada/prevista o determinada experimentalmente para la polimerasa y/o endonucleasa presente en la mezcla de reacción.

Los métodos pueden comprender temperaturas de reacción que oscilan entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 70 °C, incluyendo temperaturas más bajas que están dentro del intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 42 °C. En algunas realizaciones, el intervalo de temperatura de reacción es de 35 °C a 40 °C (por ejemplo, 35 °C), 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C o 40 °C). En otras realizaciones, la temperatura de reacción está por debajo de 65 °C, incluyendo temperaturas más bajas, por debajo de aproximadamente 55 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 40 °C o aproximadamente 30 °C. En otras realizaciones, las temperaturas de reacción pueden ser de aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 26 °C, aproximadamente 27 °C, aproximadamente 28 °C, aproximadamente 29 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 31 °C, aproximadamente 32 °C, aproximadamente 33 °C, aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C, aproximadamente 39 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 41 °C, aproximadamente 42 °C, aproximadamente 43 °C, aproximadamente 44 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 46 °C, aproximadamente 47 °C, aproximadamente 48 °C, aproximadamente 49 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 51 °C, aproximadamente 52 °C, aproximadamente 53 °C, aproximadamente 54 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 56 °C, aproximadamente 57 °C, aproximadamente 58 °C, aproximadamente 59 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 61 °C, aproximadamente 62 °C, aproximadamente 63 °C, aproximadamente 64 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 66 °C, aproximadamente 67 °C, aproximadamente 68 °C, aproximadamente 69 °C o aproximadamente 70 °C.

Los métodos pueden realizarse durante un tiempo que es adecuado para permitir la amplificación de una cantidad detectable de secuencia señal en presencia de un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el tiempo de reacción puede variar de aproximadamente 5 minutos a 16 horas, o de aproximadamente 3 minutos a 16 horas. En otras realizaciones, el tiempo de reacción puede variar de aproximadamente 5 a 120 minutos o de aproximadamente 15 a 60 minutos.

A lo largo de la memoria descriptiva, el oligonucleótido (S) también es mencionado como un ADN señal (S). Puesto que el ADN señal se genera sólo en presencia del ácido nucleico diana (T), los métodos de acuerdo con la presente invención detectan la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana (T) en una muestra detectando la presencia o ausencia de ADN señal. El ADN señal (S) no está limitado por la secuencia, y puede ser cualquier secuencia que sea susceptible de ser detectada. El ADN señal tampoco está limitado por la longitud. Preferentemente, el ADN señal puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 bases, y cualquier número entero entre 5 y 100. En algunas realizaciones, el ADN señal puede ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 30. En algunas realizaciones, el ADN señal puede ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 bases de longitud y todos los números enteros entre 10 y 30. En otras realizaciones adicionales, el ADN señal puede ser de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 bases de longitud y todos los números enteros entre 15 y 30.

Los métodos de acuerdo con la divulgación pueden realizarse en condiciones tamponadas que comprenden un intervalo de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 9. El tampón puede comprender una concentración de sal de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM, o de aproximadamente 50 mM a 150 mM. En algunas realizaciones el método puede realizarse utilizando una cantidad de ADN SC y/o SA que permite la amplificación de una cantidad detectable de secuencia señal en la presencia de un

ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la concentración de ADN SC y/o SA puede oscilar de aproximadamente 100 pM a aproximadamente 100 μM, de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 μM, de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 50 nM, o de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 25 nM.

- 5 La presencia de ADN señal (S) puede detectarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. También, la presencia de ADN señal puede detectarse usando polarización fluorescente, inmunoensayo, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, etiquetado enzimático (tal como peroxidasa o fosfatasa alcalina), etiquetado fluorescente (tal como fluoresceína o rodamina), quimioluminiscencia, bioluminiscencia, resonancia de plasmón superficial (SPR), o una sonda de ADN  
10 modificada con un fluoróforo (por ejemplo, la sonda TaqMan). El producto de amplificación también puede detectarse usando un nucleótido marcado con biotina, por ejemplo. En un caso como este, puede detectarse la biotina en el producto de amplificación usando por ejemplo, avidina marcada con fluorescencia o avidina marcada con enzimas. El producto de amplificación también puede detectarse con electrodos utilizando un intercalante redox conocido por los expertos en la materia. El producto de amplificación también puede detectarse usando resonancia de plasmón  
15 superficial (SPR), un Quartz Crystal Microbalance (QCM), o métodos electroquímicos (incluidos aquellos métodos que emplean sensores de nanoporos).

- Los métodos de acuerdo con la presente invención detectan la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana (T) en una muestra. Los métodos de acuerdo con la presente invención también pueden utilizarse para medir  
20 cuantitativamente la concentración de un ácido nucleico diana en una muestra de ensayo. Por ejemplo, los métodos de acuerdo con la presente divulgación pueden realizarse en la presencia de un intervalo de diferentes concentraciones conocidas del ácido nucleico diana, y las curvas de calibración pueden entonces prepararse y utilizarse como generalmente se practica en la técnica. El ácido nucleico diana ((T) en la figura 2) puede comprender cualquier secuencia de ácido nucleico y puede incluir ADN, ARN, ácidos nucleicos modificados químicamente, ácidos nucleicos no naturales, análogos de ácidos nucleicos, o cualquier híbrido o combinación de los mismos. Por  
25 consiguiente, en algunas realizaciones, El ADN puede incluir ADNc, ADN genómico y ADN sintético y el ARN puede incluir ARN total, ARNm, ARNr, ARNip, ARNnh, ARNpi, ARNa, miARN y ARN sintético. Mientras que algunas realizaciones se refieren a secuencias concretas del ácido nucleico diana, cualquier secuencia de ácido nucleico, incluyendo la secuencia de ácido nucleico auxiliar, puede ser una secuencia de ácido nucleico diana a detectar. La divulgación permite la detección de un ácido nucleico diana con selectividad y sensibilidad incluso cuando el ácido  
30 nucleico es un ácido nucleico de cadena corta. Por consiguiente, el grado de complementariedad entre las secuencias (C) del ADN SC y del ácido nucleico diana (T) permite una hibridación específica entre las secuencias (por ejemplo, el número de nucleótidos complementarios en la secuencia (C) de las secuencias de ADN de conversión y en el ácido nucleico diana (T) evita la hibridación inespecífica conforme a una serie determinada de  
35 condiciones de reacción).

- En realizaciones, la secuencia de ácido nucleico diana puede ser, o derivarse de, cualquier número de fuentes, incluyendo, por ejemplo, ADN genómico, ARNm expresado, secuencias de ácidos nucleicos de patógenos (microbios, virus), o ácidos nucleicos terapéuticos. Por consiguiente, los ADN SC y SA y los métodos divulgados en  
40 el presente documento pueden utilizarse para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades (por ejemplo, derivadas de fuentes genéticas e infecciosas), identificación de contaminantes (por ejemplo, enfermedades transmitidas por los alimentos, contaminación del instrumental), medicina personalizada (por ejemplo, monitoreo y/o pronóstico de una terapia), y similares. Por ejemplo, se pueden realizar pruebas de diagnóstico molecular con respecto a las siguientes enfermedades infecciosas: Virus de la hepatitis B (VHB); hepatitis C (VHC); VHC (genotipos 1 - 6); Virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1); *Chlamydia trachomatis*; *Neisseria gonorrhoeae*; gripe A; gripe B; Virus respiratorio sincitial (VRS); y Parvovirus.  
45

- En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana puede incluir unos micro-ARN (miARN). Los microARN incluyen pequeñas moléculas de ARN no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos. Se sabe que los microARN funcionan en la transcripción y en la regulación postranscripcional de la expresión génica. Se sabe que los micro-ARN funcionan por emparejamiento de bases con regiones complementarias del ARN mensajero (ARNm), dando como resultado el silenciamiento de genes a través de la represión traslacional o la degradación de la diana.  
50

- Cualquier tipo de muestra que pueda comprender un ácido nucleico diana puede utilizarse en los métodos descritos en el presente documento. Por lo tanto, la muestra que contiene o se sospecha que contiene un ácido nucleico diana no está específicamente limitada, e incluye, por ejemplo, muestras biológicas derivadas de sujetos vivos, tales como sangre completa, suero, capa leucocitaria, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, fluido seminal, saliva, tejido (tales como tejido canceroso o ganglios linfáticos), cultivos celulares (tales como cultivos celulares de mamíferos o cultivos bacterianos); muestras que contienen ácidos nucleicos, tales como viroides, virus, bacterias, hongos, levaduras, plantas y animales; muestras (como alimentos y preparados biológicos) que pueden contener o estar infectadas con microorganismos como virus o bacterias; y muestras que pueden contener sustancias biológicas, tales como suelo, equipos de procesos industriales y de fabricación, y aguas residuales; y muestras derivadas de varias fuentes de agua (por ejemplo, agua potable). Además, una muestra puede procesarse por cualquier método conocido para preparar una composición que contenga un ácido nucleico utilizado en los métodos descritos en el presente documento. Los ejemplos de tales preparaciones pueden incluir la rotura de células (por ejemplo, lisados celulares y extractos), fraccionamiento de la muestra, ácidos nucleicos en las muestras, y grupos moleculares específicos de  
55  
60  
65

ácidos nucleicos tales como las muestras enriquecidas con ARNm. La muestra utilizada en el método para detectar un ácido nucleico diana de la presente invención no se limita a las derivadas de productos biológicos y naturales tal y como se mencionó anteriormente y puede ser una muestra que contiene un oligonucleótido sintético.

5 Los métodos de acuerdo con la presente invención pueden realizarse en combinación con el sistema de preparación de muestras Abbott m2000. El m2000sp utiliza tecnología de partículas magnéticas para capturar ácidos nucleicos y lava las partículas para eliminar los componentes no ligados de la muestra. Los ácidos nucleicos ligados se eluyen y se transfieren a una placa de 96 pocillos profundos. El Abbott m2000sp también puede combinar los ácidos nucleicos lavados transferidos a la placa de 96 pocillos profundos con cualquier reactivo requerido para realizar los métodos de acuerdo con la tecnología actual. Por ejemplo, cuando sea necesario o se desee, pueden añadirse ADN SC y SA, polimerasas, endonucleasas, balizas moleculares y cualquier otro reactivo (por ejemplo, unos dNTP).

15 Los métodos de acuerdo con la presente invención también pueden acoplarse con plataformas de diagnóstico inmediato. Por ejemplo, la incorporación de un desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) en una cadena de ADN en crecimiento implica la formación de un enlace covalente y la liberación de pirofosfato y de un ion hidrógeno cargado positivamente afectando al pH de una reacción. Por lo tanto, la síntesis de ADN señal de acuerdo con los métodos de la presente invención puede detectarse monitorizando cambios en el pH usando, por ejemplo, micro pH-metros de diagnóstico rápido. Por ejemplo, El sistema de diagnóstico rápido i-STAT de Abbott puede suministrarse con cartuchos desechables de un solo uso que contienen sensores microfabricados, soluciones de calibración, sistemas de fluidos y cámaras de residuos para el análisis del pH.

25 Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir reactivos adicionales. Algunos ejemplos no limitativos de otros reactivos que pueden utilizarse en la reacción de amplificación del ácido nucleico incluyen sales metálicas como el cloruro de sodio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio y sulfato de magnesio; sustratos tales como una mezcla de dNTP; y soluciones tampón como el tampón Tris-HCl, tampón de tricina, tampón de fosfato de sodio y tampón de fosfato de potasio. Del mismo modo, pueden utilizarse detergentes, agentes oxidantes y reductores en la práctica de los métodos descritos en el presente documento. Además, pueden utilizarse agentes tales como el dimetilsulfóxido y la betaína (N, N, N-trimetilglicina); sustancias ácidas descritas en la publicación internacional N.º WO 99/54455; y complejos catiónicos.

30 Los métodos y estructuras de ácido nucleico proporcionados en el presente documento pueden utilizarse en combinación con otros métodos para proporcionar la amplificación exponencial de un ADN señal en presencia de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, los métodos y composiciones de acuerdo con la presente información pueden utilizarse en combinación con ADN de conversión de secuencias cubiertas, como se describe en la Solicitud Provisional 61/927710 de Estados Unidos, titulada "Covered Sequence Conversion DNA and Detection Methods" que se incorpora en el presente documento como referencia.

40 El término "aproximadamente" generalmente se refiere a un intervalo numérico que un experto en la materia consideraría equivalente al valor indicado (es decir, que tiene la misma función o resultado). el término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere a intervalos de aproximadamente un 10-20 % mayores o menores que el valor de referencia. En determinadas circunstancias, un experto en la materia reconocerá que, debido a la naturaleza del valor de referencia, el término "aproximadamente" puede significar una desviación de más o menos un 10-20 % de ese valor.

45 Los siguientes ejemplos pretenden ser ilustrativos de los aspectos y realizaciones descritas anteriormente. Ni la divulgación anterior ni los ejemplos que figuran a continuación deben considerarse limitativos del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Un experto en la materia apreciará que la divulgación no está limitada por la terminología específica que se utiliza para describir e ilustrar los diversos aspectos de la divulgación.

50 **Ejemplo 1**

El siguiente ejemplo demuestra que la presencia de una secuencia PDS situada entre el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) y la secuencia (C) de un ADN SC acelera la amplificación del ADN señal. Las reacciones se realizaron utilizando el ADN SC 1: 5'-AGCCCTGTACAATGCCCTCAGCTGCTCTCTGCTGCTGAACTGAGCCA-TAMRA-3' (SEQ ID NO.:1), y varios de otros ADN SC con diferentes secuencias PDS posicionadas entre el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) y la secuencia (C) del ADN SC.

Estos ADN SC incluyen:

ADN SC	SEQ ID NO.	SECUENCIA (secuencia PDS en negrita)
1	1	5'-AGCCCTGTACAATGCCCTCAGCTGCTCTCTGCTGAACTGAGCCA--TAMRA-3'
T3	2	5'-AGCCCTGTACAATGCCCTCAGCT <b>TTT</b> CTGCTCTCTGCTGAACTGAGCCA--TAMRA-3'

(continuación)

ADN SC	SEQ ID NO.	SECUENCIA (secuencia PDS en negrita)
T4	3	5'-AGCCCTGTACAATGCCCTCAGCT <b>TTTT</b> CTGTTCTGCTGAACTGAGCCA-- TAMRA-3'
T5	4	5'-AGCCCTGTACAATGCCCTCAGCT <b>TTTT</b> CTGTTCTGCTGAACTGAGCCA-- TAMRA-3'

5 Las reacciones se realizaron a 37 °C en un volumen de reacción de 25 µl que contenía el tampón 2 de New England Biolabs (NEB) con una concentración final de Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, pH 7,9. La endonucleasa de corte utilizada en la reacción fue Nb.BbvCI, que estaba presente a una concentración de 0,1 unidades/µl. La polimerasa utilizada en la reacción fue el fragmento grande de la ADN polimerasa de Bst, que estaba presente a una concentración de 0,08 unidades/µl. Los dNTP estaban presentes en una concentración final de 200 µM cada uno.

10 Los ADN SC estaban presentes en la reacción a una concentración final de 200 nM. El ácido nucleico diana fue el micro ARN humano 24-3p (SEQ ID NO.:5), y estaba presente en una concentración de 1 nM o 100 pM. Se utilizó una sonda de baliza molecular presente en una concentración final de 100 nM para detectar la generación del ADN señal. Las mediciones fluorescentes se realizaron utilizando un sistema de PCR en tiempo real Bio-Rad CFX96, y los resultados se muestran en la figura 3. Tal y como se ilustra, la presencia de una secuencia PDS situada entre el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) y la secuencia (C) del ADN SC acelera la amplificación del ADN señal.

### Ejemplo 2

20 El ejemplo siguiente demuestra que la presencia de una secuencia PDS situada dentro de un ADN SC entre el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) y la secuencia (C) complementaria a un ácido nucleico diana acelera el corte por la endonucleasa del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B).

25 Las reacciones se realizaron utilizando el siguiente ADN SC: 5'-AGCCCTGTTACAATGCCCTCAGCTCTGCTTTCTCTGCTGAACTGAGCCA-idT-idTT' (SEQ ID NO.:6).

Se utilizaron varios ácidos nucleicos diana diferentes, incluyendo los siguientes:

Ácido nucleico	SEQ ID NO.	Secuencia
ADN #18	7	5' TGGCTCAGTTCAGCAGGAACAG
ARN #6	5	5' UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
ARN #7	8	5' UGGCUCAGUUCAGCAGGAA
ARN #8	9	5' UGGCUCAGUUCAGCAG

30 Se realizó una primera reacción de polimerización a 37 °C en un volumen de reacción de 50 µl que contenía el tampón 2 de New England Biolabs (NEB) con una concentración final de Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, pH 7,9. La polimerasa utilizada en la reacción fue el fragmento grande de la ADN polimerasa de Bst, que estaba presente a una concentración de 0,08 unidades/µl. Los dNTP estaban presentes en una concentración final de 200 µM cada uno. El ADN de conversión de secuencia estaba presente a 200 nM. El ácido nucleico diana (ADN #18, ARN # 6, 7 u 8) estaba presente a 200 nM. Las reacciones de polimerización se incubaron a 37 °C durante 10 minutos, seguido de incubación a 80 °C durante 20 minutos, después de lo cual las reacciones se cambiaron a 4 °C.

40 Después se transfirieron 12,5 µl de la reacción de polimerización anterior a una reacción de endonucleasa. La reacción de endonucleasa se realizó a 37 °C en un volumen de reacción de 25 µl que contenía el tampón 2 de New England Biolabs (NEB) con una concentración final de Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DTT 1 mM, pH 7,9. La endonucleasa de corte utilizada en la reacción fue Nb.BbvCI, que estaba presente a una concentración de 0,1 unidades/µl. Las reacciones se incubaron durante 0 y 5 minutos a 37 °C. Las reacciones se interrumpieron con la adición de 5 µl de EDTA 0,5 M, seguido de incubación a 95 °C. Se utilizó una sonda de baliza molecular para detectar la generación de ADN señal y se visualizaron productos de reacción en un TBE-PAGE al 12 %. (Véase la figura 4 (la flecha indica la ubicación de un pequeño fragmento generado a partir del corte de la endonucleasa Nb.BbvCI).) Como se muestra, cuando se usó el ARN #6, no se generó ningún fragmento corto, demostrando que la presencia de una secuencia PDS en un ADN SC entre el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B) y la secuencia (C) complementaria de un ácido nucleico diana acelera el acoplamiento de la endonucleasa al sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Ken Komiya Makoto Komori Toru Yoshimura
- 5 <120> ADN DE CONVERSIÓN DE SECUENCIA Y ADN AMPLIFICADOR DE SEÑAL CON SECUENCIAS ESPACIADORAS DE POLI-ADN Y MÉTODOS DE DETECCIÓN QUE LOS UTILIZAN
- <130> 28298US01
- 10 <160> 9
- <170> PatentIn versión 3.5
- 15 <210> 1  
<211> 44  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>  
<223> ADN convertidor de secuencia (SC DNA 1)
- <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (44)..(44)  
25 <223> modificación del extremo 3': TAMRA
- <400> 1  
agccctgtac aatgccctca gctgttcct gctgaactga gcca 44
- 30 <210> 2  
<211> 47  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>  
<223> ADN convertidor de secuencia (ADN SC con espaciador T3)
- <220>  
<221> misc\_feature  
40 <222> (47)..(47)  
<223> modificación del extremo 3': TAMRA
- <400> 2  
agccctgtac aatgccctca gcttctgtt cctgctgaac tgagcca 47
- 45 <210> 3  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>  
<223> ADN convertidor de secuencia (ADN SC con espaciador T4)
- <220>  
<221> misc\_feature  
55 <223> modificación del extremo 3': TAMRA
- <400> 3  
agccctgtac aatgccctca gctttctgt tcctgctgaa ctgagcca 48
- 60 <210> 4  
<211> 49  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>

ES 2 759 337 T3

<223> ADN convertidor de secuencia (ADN SC con espaciador T5)  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 5 <222> (49)..(49)  
 <223> modificación del extremo 3': TAMRA  
  
 <400> 4  
 10 agccctgtac aatgccctca gcttttctg ttctgctga actgagcca 49  
 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> micro ARN humano 24-3p  
  
 <400> 5  
 20 uggcucaguu cagcaggaac ag 22  
 <210> 6  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> ADN convertidor de secuencia  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <223> modificación del extremo 3': dos timidinas invertidas  
  
 <400> 6  
 35 agccctgtac aatgccctca gctgttctct gctgaactga gcca 44  
 <210> 7  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de ADN para el micro ARN humano 24-3p  
  
 <400> 7  
 45 tggctcagtt cagcaggaac ag 22  
 <210> 8  
 <211> 19  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> micro ARN humano 24-3p  
  
 <400> 8  
 55 uggcucaguu cagcaggaac 19  
 <210> 9  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 65 <223> micro ARN humano 24-3p

<400> 9

uggcucaguu cagcag

16

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con:

5 un primer oligonucleótido que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa, una secuencia espaciadora de poli-ADN, y una secuencia complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana;

10 un segundo oligonucleótido que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal homóloga a la secuencia de generación de ADN señal del primer oligonucleótido, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa, una secuencia espaciadora de poli-ADN, y una secuencia que es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal del primer oligonucleótido;

15 una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte;

20 detectar la presencia o ausencia de al menos un ADN señal generado por al menos una secuencia de generación de señal; en donde la detección de la presencia del ADN señal indica la presencia del ácido nucleico diana en dicha muestra; y en donde dicha secuencia espaciadora de poli-ADN en dicho primer oligonucleótido o dicho segundo oligonucleótido comprende de 3 a 20 bases.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método se realiza a una temperatura sustancialmente constante.

3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho método se realiza a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 42 °C.

4. El método de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha polimerasa tiene una actividad de desplazamiento de cadena.

5. El método de las reivindicaciones 1-4 en donde dicha diana es un micro-ARN u procede de un agente infeccioso.

6. El método de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho segundo oligonucleótido es un ADN minicircular, y en donde un ADN señal se une a dicho ADN minicircular y ceba la amplificación por círculo rodante.

7. Una composición para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicha composición:

40 un primer oligonucleótido que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa, una secuencia espaciadora de poli-ADN, y una secuencia complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana;

45 un segundo oligonucleótido que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal homóloga a la secuencia de generación de ADN señal del primer oligonucleótido, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa, una secuencia espaciadora de poli-ADN, y una secuencia que es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal del primer oligonucleótido; y

en donde dicha secuencia espaciadora de poli-ADN de dicho primer oligonucleótido o dicho segundo oligonucleótido comprende de 3 a 20 bases.

8. La composición de la reivindicación 7 en donde dicho ácido nucleico diana es un micro-ARN o procede de un agente infeccioso.

9. La composición de la reivindicación 7-8, en donde dicho segundo oligonucleótido es un ADN minicircular.

10. Un kit para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho kit:

55 un primer oligonucleótido que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa, una secuencia espaciadora de poli-ADN, y una secuencia complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana; y

60 un segundo oligonucleótido que comprende, en la dirección 5' a 3', una secuencia de generación de ADN señal homóloga a la secuencia de generación de ADN señal del primer oligonucleótido, un sitio de reconocimiento de la endonucleasa, un espaciador de poli-ADN, y una secuencia que es homóloga a la secuencia de generación de ADN señal del primer oligonucleótido; y

65 en donde dicha secuencia espaciadora de poli-ADN de dicho primer oligonucleótido o dicho segundo oligonucleótido comprende de 3 a 20 bases.

11. El kit de la reivindicación 10 en donde dicho kit comprende además una ADN polimerasa que tiene una actividad de desplazamiento de cadena.

5 12. El kit de las reivindicaciones 10-11 en donde el kit comprende además una endonucleasa para una reacción de corte.

FIGURA 1A

ADN de conversión de secuencia (ADN SC)

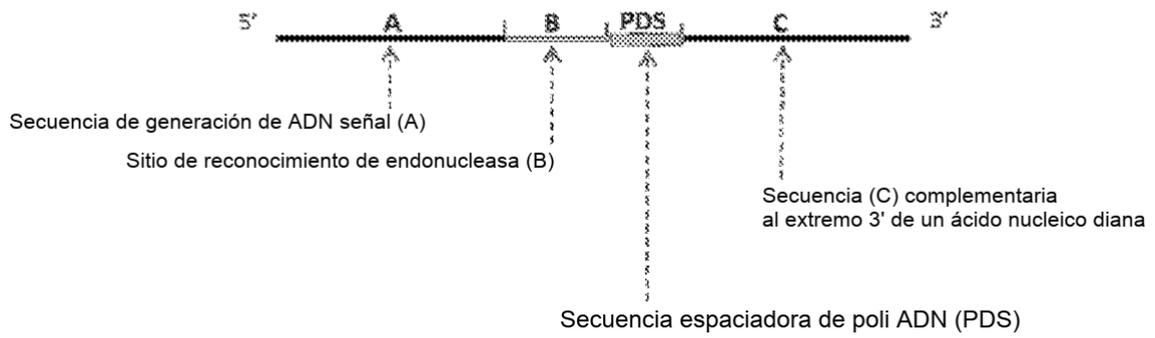
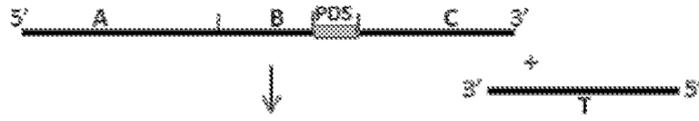


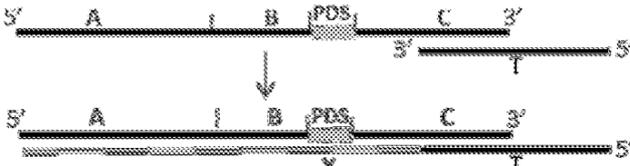


FIGURA 2A

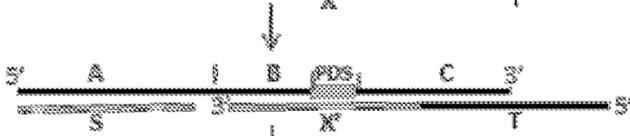
Unión de ácido nucleico diana (T) a secuencia (C) de ADN SC



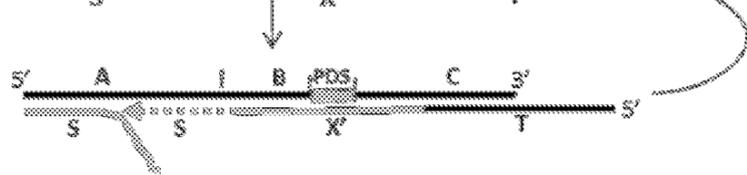
Replicación desde el extremo 3' de ácido nucleico diana (T)



La endonucleasa crea una secuencia (X') con un grupo 3'-OH libre y ADN señal (S)



La replicación desde el extremo 3' de X' desplaza al ADN señal (S), mientras se genera un nuevo ADN señal (S)



ADN señal (S)



FIGURA 2B

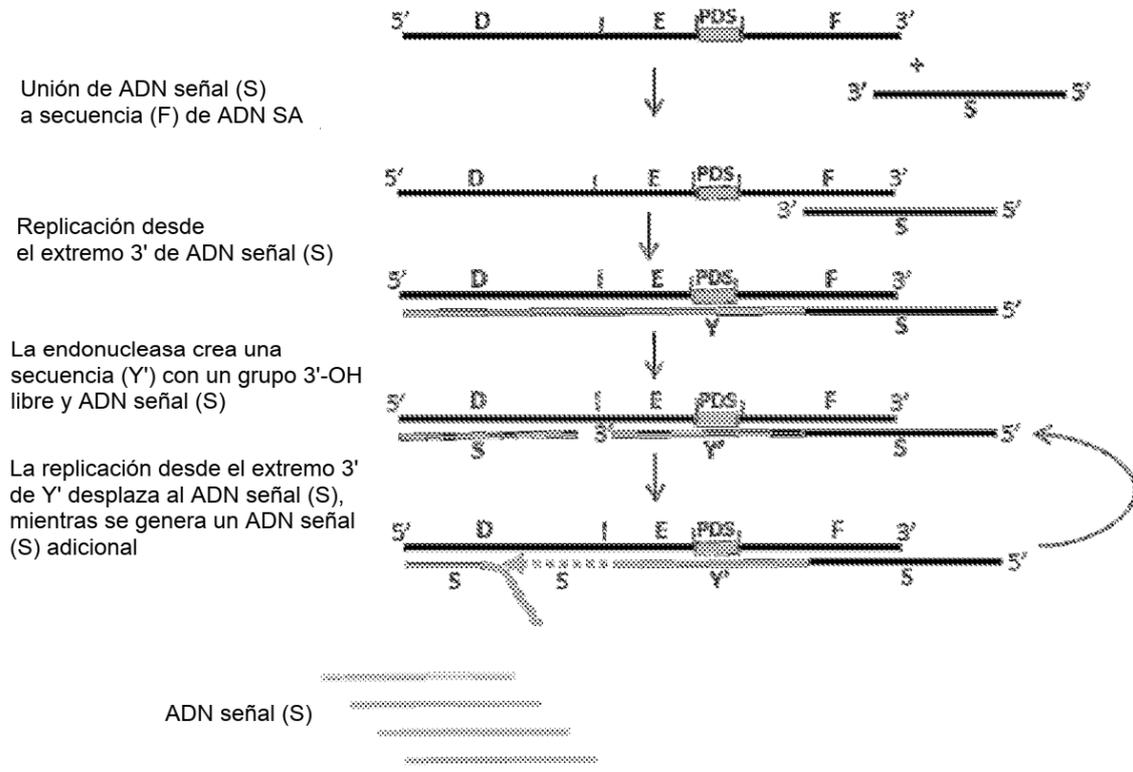


FIGURA 3

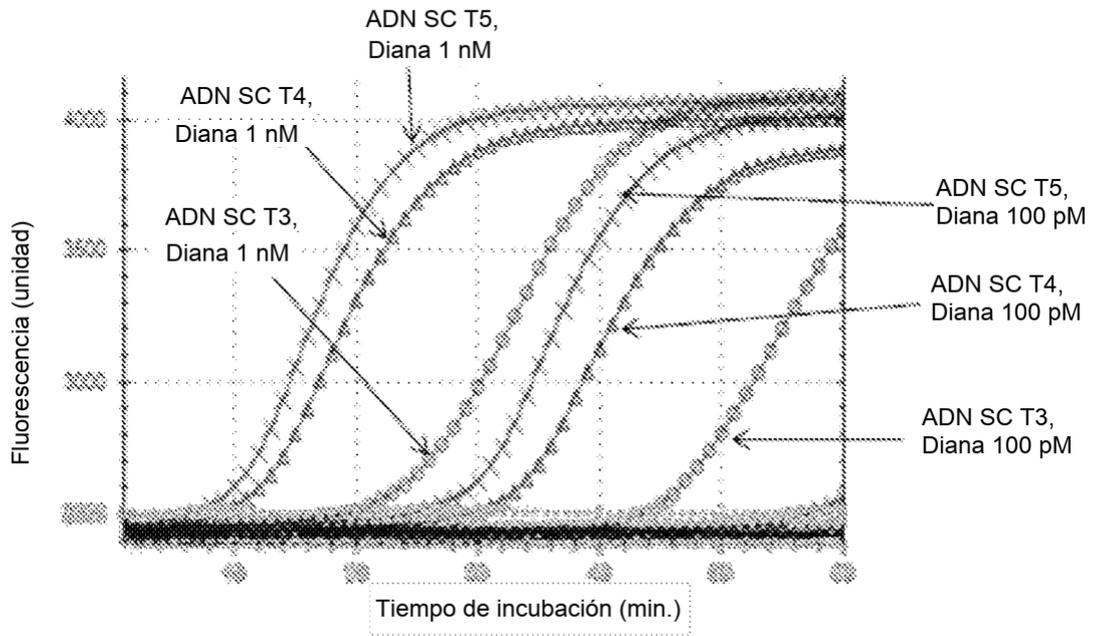
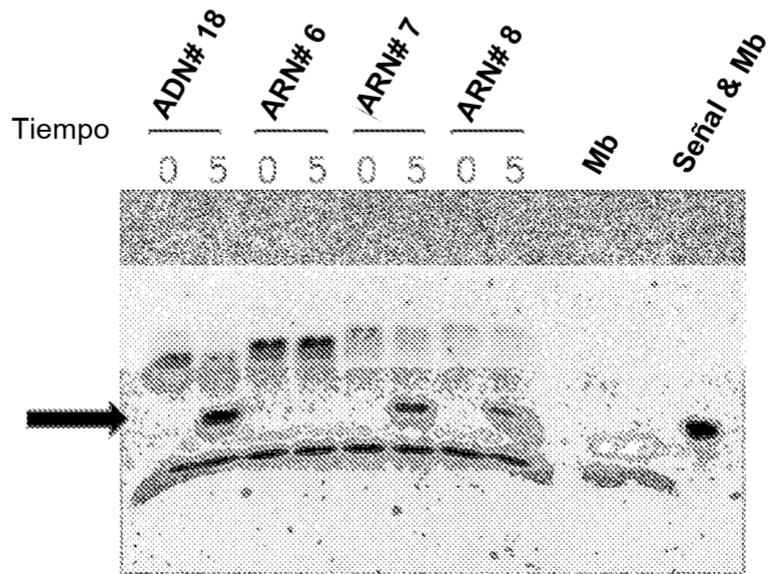


FIGURA 4



12 % TBE-PAGE  
180V, 45 min  
Vol. de Carga 15 ul (+ 3 ul 6 x Colorante)