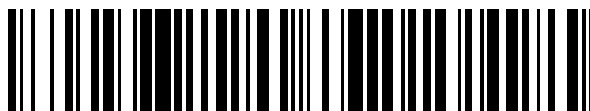


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 339**

51 Int. Cl.:

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/IB2015/002141**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2016 WO16059473**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2015 E 15850599 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2019 EP 3207160**

54 Título: **Conversión de secuencia y ADN amplificador de señal que tiene ácidos nucleicos bloqueados y métodos de detección que usan los mismos**

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
TORU, YOSHIMURA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 759 339 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

Conversión de secuencia y ADN amplificador de señal que tiene ácidos nucleicos bloqueados y métodos de detección que usan los mismos

Antecedentes

La detección de ácido nucleico objetivo en muestras de prueba es importante en varios campos, incluyendo medicina y biología. Muchas composiciones, plataformas de ensayo y procedimientos están disponibles para la detección de moléculas de ácido nucleico específicas. Para que la detección sea reproducible y precisa, estos procedimientos requieren niveles bajos o nulos de amplificación de fondo no específica. Sin embargo, los métodos de amplificación pueden dar lugar a falsas señales positivas que afectan a la calidad, la exactitud, la reproducibilidad y la fiabilidad general de los resultados. En algunos ensayos, estas señales positivas "falsas" se pueden detectar en muestras, incluidas muestras de control que contienen ADN sin molde (ADN no diana) o incluso muestras que carecen de molde de ADN.

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 típica se lleva a cabo a tres temperaturas diferentes, la reacción puede estar asociada con desafíos tales como la dificultad para mantener temperaturas precisas y que la pérdida de tiempo aumenta en proporción al número de ciclos de amplificación. La desnaturalización de un ADN molde de doble cadena en cadenas simples (aunque depende en cierta medida de la secuencia particular) a menudo requiere el uso de altas temperaturas de "fusión", que limita la clase de ADN polimerasas que pueden usarse para aquellas que son altamente termoestables. Por consiguiente, se han desarrollado tecnologías de plataforma de amplificación isotérmica para detectar ácidos nucleicos en condiciones de reacción que son más leves que las utilizadas en la PCR. No obstante, estas tecnologías de amplificación isotérmica no han abordado los desafíos que presentan los eventos de amplificación no específicos y las señales de fondo altas que pueden interferir con la detección de la secuencia objetivo. En el documento WO 2012/077819, se describe el mismo método de detección, excepto por la presencia de un ácido nucleico bloqueado (LNA) en la construcción de oligonucleótidos utilizada.

La publicación SILAHARTOGLU et al., NATURE PROTOCOLS, vol. 2, n.º 10, 2007, describe el uso de oligos modificados con LNA para ensayos de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) y YANG CHAOYONG JAMES et al., NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 35, n.º 12, 2007, describe el uso de modificaciones de LNA en sondas de baliza molecular.

La siguiente divulgación proporciona métodos y composiciones alternativos para detectar una secuencia de ácido nucleico (tal como ADN o ARN) en condiciones de reacción que son menos rigurosas que las usadas en la PCR. Los métodos y composiciones mantienen la selectividad y sensibilidad de secuencia que permiten la detección de moléculas de ácido nucleico que pueden estar en una muestra a bajas concentraciones y/o moléculas de ácido nucleico de corta longitud. Los métodos y composiciones también reducen cualquier señal de fondo que pueda dar como resultado eventos de amplificación no específicos y/o independientes del objetivo. Entre otros aspectos, la divulgación proporciona nuevos métodos y moléculas de ácido nucleico que pueden mejorar el límite de detección de ácidos nucleicos objetivo en una muestra a baja temperatura, condiciones isotérmicas y puede simplificar o mejorar la preparación de muestras y métodos automatizados de detección.

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 de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana, y que tiene al menos un nucleótido químicamente modificado; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. En realizaciones de este aspecto, el método también comprende determinar la presencia o ausencia de un ADN señal, en el que la presencia del ADN señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

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 de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana, y que tiene al menos un nucleótido químicamente modificado; un segundo oligonucleótido (ADN amplificador de señal o ADN SA) que comprende, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (D) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) del primer oligonucleótido, un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) (que puede ser igual o diferente del sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) en el ADN SA) y una secuencia (F) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) del primer oligonucleótido, y que tiene al menos un nucleótido modificado químicamente; una polimerasa; y una

endonucleasa para una reacción de corte. En realizaciones de este aspecto, el método también comprende determinar la presencia o ausencia de un ADN señal, en el que la presencia del ADN señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

- 5 En otro 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 de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana, y que tiene al menos un ácido nucleico bloqueado (LNA); una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. En realizaciones de este aspecto, el método también comprende determinar la presencia o ausencia de un ADN señal, en el que la presencia del ADN señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

- 15 En otro 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 de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana, y que tiene al menos un ácido nucleico bloqueado (LNA); un segundo oligonucleótido (ADN amplificador de señal o ADN SA) que comprende, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (D) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) del primer oligonucleótido, un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) (que puede ser igual o diferente del sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) en el ADN SA) y una secuencia (F) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) del primer oligonucleótido, y que tiene al menos un LNA; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. En realizaciones de este aspecto, el método también comprende determinar la presencia o ausencia de un ADN señal, en el que la presencia del ADN señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

- En ciertas realizaciones, el LNA presente en la secuencia (C) del ADN SC o en la secuencia (F) del ADN SA puede comprender cualquier LNA tal como, por ejemplo, G, T, U, A y C, así como derivados de los mismos modificados químicamente. En realizaciones en las que las moléculas de nucleótidos comprenden más de un LNA, cada LNA puede seleccionarse independientemente de cualquier LNA (por ejemplo, G, T, U, A y C), así como derivados químicamente modificados de los mismos o cualquier combinación de los mismos. En ciertas realizaciones hay al menos un LNA ubicado en la posición 1 a 50, 1 a 45, 1 a 40, 1 a 35, 1 a 30, 1 a 25, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10 o 1 a 5 desde el extremo 3' del ADN SA (dentro de la secuencia (F)), y el ADN SC (dentro de la secuencia (C)). Como se trata más adelante, los inventores han ilustrado ciertas realizaciones de la divulgación que ejemplifican que incluir uno o más LNA en el ADN SA y en el ADN SC, reduce las señales de fondo en el rendimiento de los métodos descritos en el presente documento (por ejemplo, como resultado de la amplificación independiente del objetivo).

- En algunas realizaciones que incorporan LNA en la secuencia (F) del ADN SA, y en la secuencia (C) del ADN SC, puede eliminar la generación de señales de fondo no específicas en una reacción de amplificación. En otras realizaciones, la incorporación de LNA en las moléculas de ADN SA y SC puede retrasar la generación de eventos de amplificación inespecíficos durante un período de tiempo que permita la medición específica y precisa del ácido nucleico diana. Por tanto, la divulgación proporciona moléculas de ácido nucleico, composiciones, kits y métodos que permiten la medición de la secuencia o secuencias de señal que indican la presencia de un ácido nucleico diana antes de que se genere una señal de fondo interferente no específica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una señal resultante de la presencia de ácido nucleico diana de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 fM en una muestra es detectable aproximadamente 10 a aproximadamente 120 minutos antes de que se detecte cualquier señal de fondo no específica interferente.

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

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

- Si bien el método descrito en el presente documento puede realizarse en condiciones de amplificación de ADN típicas (por ejemplo, temperaturas típicas asociadas con PCR estándar, concentraciones del reactivo, ciclos de tiempo, 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 que son inferiores a las temperaturas utilizadas en los métodos de PCR estándar. Como ejemplo, algunas realizaciones del método pueden realizarse a una temperatura igual o inferior a una temperatura de hibridación o recocido óptima calculada, o una temperatura de hibridación o recocido 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 como se describe a continuación. En realizaciones, el método se puede realizar a una temperatura que está por debajo de la temperatura de fusión del ácido nucleico diana (T) unido a la secuencia (C) del ADN SC, o el ADN señal (S) unido a la secuencia (F) del ADN

SA. En otras realizaciones más, el método puede realizarse a temperaturas que permitan la actividad de polimerasa y/o endonucleasa. En realizaciones adicionales, el método se puede realizar a temperaturas que están a la temperatura de reacción óptima para la polimerasa y/o endonucleasa presente en la mezcla de reacción o para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un oligonucleótido modificado químicamente, que se puede denominar en el presente documento como un "ADN de conversión de secuencia" (o "ADN SC") que comprende, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana, y que tiene al menos un ácido nucleico bloqueado (LNA).

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un oligonucleótido modificado químicamente, que puede denominarse en el presente documento "ADN amplificador de señal" (o "ADN SA") que comprende, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (D) homóloga a una secuencia de generación de ADN de señal (A) de un ADN de conversión de secuencia (ADN SC), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) y una secuencia que tiene al menos un ácido nucleico bloqueado (LNA) y que es homólogo a una secuencia de generación de ADN señal (A) de un ADN de conversión de secuencia (ADN SC).

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 un micro-ARN. En otras realizaciones, el ácido nucleico diana puede comprender una secuencia de un gen que puede estar asociado con una enfermedad o un trastorno.

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

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a una 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 de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana, y que tiene al menos un ácido nucleico bloqueado (LNA); una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte.

En un aspecto adicional, la divulgación se refiere a una 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 de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana, y que tiene al menos un ácido nucleico bloqueado (LNA); un segundo oligonucleótido (ADN amplificador de señal o ADN SA) que comprende, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (D) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) del primer oligonucleótido, un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) (que puede ser igual o diferente del sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) en el ADN SA) y una secuencia (F) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) del primer oligonucleótido, y que tiene al menos un LNA; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte.

Las composiciones también pueden comprender una polimerasa y/o una endonucleasa capaz de cortar en o adyacente al sitio de reconocimiento de endonucleasa del primer y segundo oligonucleótido cuando el sitio de reconocimiento de endonucleasa es bicatenario. Las composiciones también pueden incluir otros reactivos tales como tampones de reacción, desoxirribonucleótidos y moléculas indicadoras, tales como, por ejemplo, ADN de sonda modificada con fluoróforo (por ejemplo, sondas de baliza molecular) para la detección fluorescente de ADN recién sintetizado.

En otro aspecto más, 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 de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana, y que tiene al menos un ácido nucleico bloqueado (LNA); una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. En algunas realizaciones, los kits pueden comprender además una polimerasa y/o una endonucleasa capaz de cortar un sitio de reconocimiento de endonucleasa o un sitio adyacente a un sitio de reconocimiento de endonucleasa. Los kits también pueden incluir reactivos, tales como tampones de reacción, desoxirribonucleótidos y moléculas indicadoras, tales como, por ejemplo, ADN de sonda modificada con fluoróforo (por ejemplo, sondas de baliza molecular) para la detección fluorescente de ADN recién sintetizado, tal como un ADN de señal. Los kits también pueden comprender instrucciones para su uso en la práctica de cualquiera de los métodos desvelados en el presente documento.

En otro aspecto más, 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 de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana, y que tiene al menos un ácido nucleico bloqueado (LNA); un segundo oligonucleótido (ADN amplificador de señal o ADN SA) que comprende, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (D) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) del primer oligonucleótido, un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) (que puede ser igual o diferente del sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) en el ADN SA) y una secuencia (F) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) del primer oligonucleótido, y que tiene al menos un LNA; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. En algunas realizaciones, los kits pueden comprender además una polimerasa y/o una endonucleasa capaz de cortar un sitio de reconocimiento de endonucleasa o un sitio adyacente a un sitio de reconocimiento de endonucleasa. Los kits también pueden incluir reactivos, tales como tampones de reacción, desoxirribonucleótidos y moléculas indicadoras, tales como, por ejemplo, ADN de sonda modificada con fluoróforo (por ejemplo, sondas de baliza molecular) para la detección fluorescente de ADN recién sintetizado, tal como un ADN de señal. Los kits también pueden comprender instrucciones para su uso en la práctica de cualquiera de los métodos desvelados e el presente documento.

Los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kits desvelados en el presente documento pueden usarse en combinación con plataformas de sistemas integrados. Por ejemplo, los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kits de la presente invención pueden usarse en combinación con el sistema ARCHITECT de Abbott. Los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kits desvelados en el presente documento pueden usarse 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 manera similar, los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kits desvelados en el presente documento pueden usarse con plataformas de sistemas de punto de atención, tales como, por ejemplo, el sistema del punto de atención i-STAT de Abbott (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL). Adicionalmente, los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kits de la presente invención pueden usarse con cualquier número de otros dispositivos, plataformas de ensayo e instrumentación, tal como, por ejemplo, detectores de fluorescencia de mano, medidores de micro pH, dispositivos microfluídicos, micromatrices, sistemas de detección enzimática, tiras inmunocromatográficas y dispositivos de flujo lateral.

Los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kits desvelados en el presente documento pueden usarse en el campo del diagnóstico molecular, incluido el diagnóstico de enfermedades no infecciosas e infecciosas. Por ejemplo, los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kits de la presente invención pueden usarse para detectar microARN, ARN mensajero, ARN no codificante y ADN metilado en fluido humano, tal como sangre, orina, saliva, sudor y heces. De manera similar, los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kits de la presente invención pueden usarse para detectar ácidos nucleicos diana que se originan a partir de enfermedades infecciosas tales como, por ejemplo, VHB, VHC, VIH, HPV, HTLV-I, parvovirus, tuberculosis, sífilis, malaria y Entamoeba histolytica en fluido humano como sangre, orina, saliva, sudor y heces.

Se entiende que en algunos aspectos de la presente divulgación, los ADN SC y SA desvelados en el presente documento pueden comprender nucleótidos modificados químicamente que no sean ácidos nucleicos bloqueados, en la misma posición o en otra diferente. Por ejemplo, los ADN SC y SA descritos en el presente documento pueden comprender BNA (ácido nucleico en puente), ENA (ácido nucleico con puente de etileno), GNA (ácido glicol nucleico), TNA (ácido nucleico de treosa), PNA (ácido nucleico peptídico), ácidos nucleicos de morfolino y nucleótidos de fosforotioato.

Aspectos adicionales, realizaciones y ventajas proporcionadas por la divulgación se harán evidentes a la vista de la descripción siguiente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es un diagrama que ilustra esquemáticamente un ejemplo no limitante 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 de 5' a 3', una secuencia de generación de señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) que puede usarse en una reacción de corte, y una secuencia (C) complementaria al ácido nucleico diana y que comprende ácido nucleico bloqueado (LNA).

La figura 1B es un diagrama que ilustra esquemáticamente un ejemplo no limitante 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 de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (D) homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) de un ADN SC; un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) (que puede ser igual o diferente del sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) de un ADN SC) y una secuencia (F) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) de un primer ADN SC, y que comprende ácido nucleico bloqueado.

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 (SC) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra. Las secuencias (A) - (C) son como se describe en la Figura 1A, la secuencia (T) representa una

secuencia diana, la secuencia (X) representa la secuencia producida cuando la Diana (T) unida a la secuencia (C) se extiende por la polimerasa, la secuencia (X') representa la secuencia de extensión cortada y la secuencia (S) representa la secuencia de ADN de señal finalmente producida.

La figura 2B es un diagrama que ilustra esquemáticamente la progresión de una reacción ejemplar de un ADN de 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) son como se describe en la Figura 1B, la secuencia (S) es el ADN señal producido a partir 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 de señal (S) unido a la secuencia (D) se extiende por la polimerasa, la secuencia (Y') representa la secuencia de extensión cortada y la secuencia (S) representa la secuencia de ADN de señal finalmente producida. Como 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).

La Figura 3 representa la estructura de horquilla pronosticada de ADN SA N.º 339 (SEQ ID NO.: 25) calculada utilizando DINAMelt (Nucleic Acids Res., 33, W577-W581; Y Bioinformatics: Structure, Function and Applications (Series: Methods in Molecular Biology, Vol. No.: 453), capítulo 1, páginas 3-31 (ISBN 978-1-60327-428-9)). También se muestra la ubicación de dos LNA dentro del tallo de la estructura de horquilla en las posiciones 3 y 6 desde el extremo 3' del ADN SA # 339.

Descripción detallada

En un sentido general, la divulgación se refiere a construcciones de ácido nucleico que son sorprendentemente efectivas en la detección de ácidos nucleicos diana en una muestra de prueba. Las construcciones desveladas en el presente documento comprenden secuencias de ácido nucleico que permiten la producción de ADN de señal que se generan en presencia de un ácido nucleico diana, con una reducción concomitante en la señal de fondo que surge de eventos de amplificación no específicos y/o en ausencia de un ácido nucleico diana. Los métodos y las construcciones de ácido nucleico desvelados en el presente documento proporcionan una detección selectiva y sensible de ácidos nucleicos diana que pueden realizarse ventajosamente a baja temperatura y condiciones isotérmicas.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un oligonucleótido modificado químicamente, que puede denominarse en el presente documento "ADN amplificador de señal" (o "ADN SA") que comprende, en la dirección de 5' a 3', una primera secuencia que es complementaria a una secuencia de ADN de señal conocida, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una segunda secuencia que es complementaria a la misma secuencia de ADN de señal conocida que la primera secuencia, en el que la segunda secuencia comprende un ácido nucleico bloqueado (LNA). La primera secuencia es la secuencia de generación de ADN de señal (D) en la Figura 1B, que es homóloga a una secuencia de generación de ADN de señal conocida (A) de un ADN SC. La segunda secuencia es la secuencia (F) en la Figura 1B, que es homóloga a la misma secuencia de generación de ADN de señal conocida (A) del mismo ADN SC, y que tiene al menos un LNA. En algunas realizaciones de este aspecto, la segunda secuencia comprende una pluralidad de LNA (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 LNA). En algunas realizaciones, la segunda secuencia comprende de 2-6 LNA. En algunas realizaciones, la segunda secuencia comprende 2 LNA, 3 LNA o 4 LNA. En otras realizaciones, el oligonucleótido modificado químicamente comprende además una modificación del extremo 3'.

En este aspecto, las longitudes de la primera y segunda secuencia pueden variar, pero típicamente cada una de las secuencias tiene aproximadamente la misma longitud que la otra. En realizaciones, la longitud de las secuencias puede estar en un rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 nucleótidos, pero son más típicamente 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 endonucleasa comprende una secuencia que puede ser reconocido, unido y cortado por una endonucleasa como se describe en el presente documento. Dichas secuencias se conocen generalmente en la materia. El sitio de reconocimiento de endonucleasa puede comprender nucleótidos adicionales 5' o 3' al sitio de unión de endonucleasa (o ambos 5' y 3') pero típicamente no tiene más de 10 nucleótidos de longitud.

En ciertas realizaciones descritas en el presente documento, la ubicación del LNA, o la pluralidad de LNA, en la segunda secuencia se identifican con respecto al extremo 3' de la secuencia y pueden variar. En algunas realizaciones, el LNA o la pluralidad de LNA se encuentra en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 desde el extremo 3' de la secuencia. En algunas realizaciones que comprenden un solo LNA, el LNA está ubicado en cualquiera de las posiciones 1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 desde el extremo 3' de la secuencia.

En realizaciones que comprenden dos LNA, los LNA pueden ubicarse en cualquier combinación de dos posiciones seleccionadas de las posiciones 1 a 20 desde el extremo 3' de la secuencia. En algunas realizaciones, los LNA pueden ubicarse en la posición 6 y en cualquier otra posición 1-5 y 7-20 (por ejemplo, 1 y 6, 2 y 6, 3 y 6, 4 y 6, 5 y 6, 7 y 6, 8 y 6, 9 y 6, 10 y 6, 11 y 6, 12 y 6, 13 y 6, 14 y 6, 15 y 6, 16 y 6, 17 y 6, 18 y 6, 19 y 6, o 20 y 6) desde el extremo 3' de la secuencia; en las posiciones 1 y 2; en las posiciones 1 y 10; en las posiciones 2 y 10; en las

posiciones 4 y 8; en las posiciones 5 y 9; en las posiciones 1 y 8; en las posiciones 2 y 8; en las posiciones 3 y 8; y en las posiciones 2 y 7 desde el extremo 3' de la secuencia.

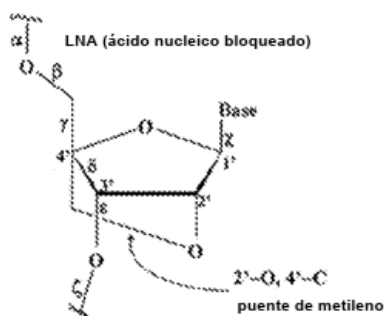
En realizaciones que comprenden tres LNA, los LNA se pueden ubicar en cualquier combinación de tres posiciones seleccionadas de las posiciones 1 a 20 desde el extremo 3' de la secuencia. En algunas realizaciones, los LNA pueden ubicarse en la posición 6 y en cualquier otra combinación de dos posiciones 1-5 y 7-20 desde el extremo 3' de la secuencia; y en las posiciones 1, 2 y 10 desde el extremo 3' de la secuencia.

En realizaciones que comprenden cuatro LNA, los LNA pueden ubicarse en cualquier combinación de cuatro posiciones seleccionadas de las posiciones 1 a 20 desde el extremo 3' de la secuencia. En algunas realizaciones, los LNA pueden ubicarse en la posición 6 y en cualquier otra combinación de tres posiciones 1-5 y 7-20 desde el extremo 3' de la secuencia.

En realizaciones de este aspecto, la divulgación proporciona nuevas construcciones de oligonucleótidos de conversión de secuencia (SC) y amplificador de señal (SA), y combinaciones de los mismos, que son útiles para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, con una reducción concomitante en la señal de fondo. 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 de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana, y que tiene al menos un ácido nucleico bloqueado (LNA).

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 de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (D) homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) de un ADN SC; un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) (que puede ser igual o diferente de un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) de un ADN SC), y una secuencia (F) que comprende un ácido nucleico bloqueado (LNA) y una secuencia que es homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) de un ADN SC.

En algunas realizaciones de la presente divulgación, tanto la secuencia (C) del ADN SC como la secuencia (F) del ADN SA comprenden ácidos nucleicos bloqueados (LNA). En otras realizaciones, solo la secuencia (F) del ADN SA comprenderá ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Un ácido nucleico bloqueado es un nucleótido de ARN modificado que tiene la siguiente estructura:



Tal y como se ilustra, el resto ribosa de un nucleótido de LNA se modifica a partir de una estructura de anillo de ribosa típica mediante un puente de metileno que conecta el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', y que bloquea la ribosa en la conformación del extremo 3'. Tales LNA pueden comprender cualquier base de purina o pirimidina natural o bases no naturales (por ejemplo, inosina, bases modificadas químicamente, etc.).

Al incorporar los LNA en un oligonucleótido de amplificación como, por ejemplo, secuencia (F) del ADN SA descrito en el presente documento o en la secuencia (C) del ADN SC, la amplificación de señal de fondo no específica se elimina por completo o se retrasa durante un período de tiempo que es adecuado para detectar la secuencia de señal resultante de la presencia de ácido nucleico objetivo sin ninguna interferencia de la señal de fondo no específica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una señal resultante de la presencia de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 fM de ácido nucleico diana en una muestra es detectable en aproximadamente 5 a aproximadamente 120 minutos, en un plazo de aproximadamente 5 a aproximadamente 90 minutos, en un plazo de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 minutos, en un plazo de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 minutos, o en un plazo de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 minutos antes de que cualquier señal de fondo no específica sea detectable. En algunas realizaciones, una señal resultante de la presencia de ácido nucleico diana de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 pM en una muestra es detectable en aproximadamente 5 a aproximadamente 120 minutos, en un plazo de aproximadamente 5 a aproximadamente 90 minutos, en un plazo de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 minutos, en un plazo de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 minutos, o en un plazo de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 minutos antes de que cualquier señal de fondo no específica sea detectable. En otras realizaciones, una señal resultante de la presencia de

aproximadamente 1 pM a aproximadamente 1 fM de ácido nucleico diana en una muestra es detectable en aproximadamente 5 a aproximadamente 120 minutos, en un plazo de aproximadamente 5 a aproximadamente 90 minutos, en un plazo de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 minutos, en un plazo de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 minutos, o en un plazo de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 minutos antes de que cualquier señal de fondo no específica sea detectable. En algunas realizaciones, el método no genera ninguna señal de fondo no específica detectable.

Tal como se ha descrito anteriormente, los LNA se incorporan en la secuencia (F) del ADN SA y en la secuencia (C) del ADN SC, en cualquier posición efectiva para reducir o eliminar la amplificación de señal de fondo no específica en ausencia de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, los LNA se incorporan en la secuencia (F) del ADN SA y en la secuencia (C) del ADN SC, en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o combinaciones de los mismos, desde el extremo 3' del ADN SC o SA respectivo. En algunas realizaciones, un LNA está ubicado en la posición 6, o en las posiciones 3 y 6, desde el extremo 3' del ADN SA. En otras realizaciones, los LNA están presentes en el ADN SA en las posiciones (contando desde el extremo 3'): 1, 2, 6 y 10 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 2); 1, 2 y 6 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 3); 1, 2 y 10 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 4); 1, 6 y 10 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 5); 2, 6 y 10 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 6); 1 y 2 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 7); 1 y 6 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 8); 2 y 6 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 9); 1 y 10 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 10); 2 y 10 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 11); 1 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 16); 4 y 8 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 23); 2, 3 y 6 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 26); 2, 3, 6 y 10 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 27); o 3 y 10 (por ejemplo, SEQ ID NO.: 35).

En algunas realizaciones, los LNA se incorporan a la secuencia (F) del ADN SA, y a la secuencia (C) del ADN SC, en o dentro de un motivo estructural particular que incorpora cualquiera de las secuencias. Por ejemplo, la secuencia (F) del ADN SA puede formar una estructura de horquilla (tallo-asa) consigo misma o con porciones de alguna otra secuencia dentro del ADN SA (por ejemplo, secuencia (D) o (E)), y el LNA puede localizarse dentro del tallo. El tallo puede comprender entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 pares de bases, de entre aproximadamente 2 a aproximadamente 8 pares de bases, de entre aproximadamente 2 a aproximadamente 6 pares de bases, o de entre aproximadamente 2 a aproximadamente 4 pares de bases, y todos los enteros entre 2 y 10 pares de bases. Alternativamente, el LNA se puede ubicar en una región de ADN monocatenario (por ejemplo, un bucle o extremo de cola 3' de una estructura de horquilla). De manera análoga, la secuencia (C) del ADN SC puede formar una estructura de horquilla (tallo-bucle) consigo misma o con porciones de alguna otra secuencia dentro del ADN SC (por ejemplo, secuencia (A) o (B)), y el LNA puede estar ubicado dentro del tallo. En la alternativa, el LNA se puede ubicar en una región de ADN monocatenario (por ejemplo, un bucle o extremo de cola 3' de una estructura de horquilla). (Véase, por ejemplo, la Figura 3).

Como se ilustra en la Figura 1A, los ADN SC desvelados 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 particular. Como se analiza con más detalle a continuación, la secuencia de generación de señal (A) proporciona al menos una parte del molde para un ADN de señal (por ejemplo, ácido nucleico (S) en la Figura 2), cuya producción indica la presencia de 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 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 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 desvelados en el presente documento comprenden una secuencia de generación de ADN de señal (D) que es homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) de un ADN SC, y una secuencia (F) (que comprende un ácido nucleico bloqueado) que es homóloga a la misma señal de secuencia de generación de ADN (A) del mismo ADN SC. En algunas realizaciones, para ser homólogo a la secuencia de generación de ADN de señal (A) de un ADN SC, las secuencias (D) y (F) son completamente idénticas a la secuencia de generación de ADN de señal correspondiente (A). En otras realizaciones, la secuencia (F) es idéntica en secuencia a la secuencia de generación de ADN de 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 (s) más corta en el extremo 3'. Cuando la secuencia de generación de ADN de señal (D) de un ADN SA es homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) de un ADN SC, se deduce que la misma ADN señal (S) se produce y se amplifica exponencialmente.

Los ADN SC y SA comprenden sitios de reconocimiento de endonucleasa (B) y (E) respectivamente, que pueden ser

iguales o diferentes. En forma de cadena sencilla (por ejemplo, la estructura de las Figuras 1A y 1B), los sitios de reconocimiento de endonucleasa (B) y (E) pueden comprender una secuencia que es complementaria a una secuencia que puede ser cortada por una endonucleasa. La secuencia que es cortada por la endonucleasa puede estar dentro de, corriente abajo o corriente arriba de la secuencia reconocida por la endonucleasa. Adecuadamente, cuando es de doble cadena, los sitios de reconocimiento de endonucleasa (B) y (E) pueden reconocerse 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)) se puede escindir en una sola cadena del ADN bicatenario (es decir, mellado). Como se describe con mayor detalle a continuación, la unión de un ácido nucleico diana a la secuencia complementaria (C) de la replicación de ADN SC ceba a través de la ADN polimerasa para crear una forma activa de doble cadena del sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) que ahora puede servir como un sitio de reconocimiento para una endonucleasa (Figura 2A). El corte por la endonucleasa en el sitio de endonucleasa bicatenario recién creado (B), o en un sitio adyacente al sitio de endonucleasa bicatenario recién creado (B), luego ceba la replicación mediante ADN polimerasa y genera ADN de señal (S) (véase, por ejemplo, Figura 2A). Como se ilustra en la Figura 2 A, el sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) está orientado de tal manera que la cadena recién replicada es cortada, no el ADN SC. Esto es, cuando se genera la cadena recién replicada, la orientación del sitio de reconocimiento de endonucleasa en (B) dirige la actividad de endonucleasa (escisión) de la cadena recién replicada. Por tanto, el sitio de reconocimiento de endonucleasa comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia que es cortada por una endonucleasa, permitiendo que el oligonucleótido SC permanezca intacto durante toda la reacción (es decir, el ADN SC no se corta ni escinde).

Como se describe con mayor detalle a continuación, la unión de ADN señal (S), generado a partir de la secuencia de generación de señal (A) de un ADN SC, a la secuencia (F) de una replicación de cebadores de ADN SA a través de la ADN polimerasa para crear una forma de doble cadena del sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) del ADN SA que puede servir como un sitio de reconocimiento para una endonucleasa (Figura 2B). El corte de endonucleasa en el sitio de endonucleasa bicatenaria recién creado (E) del ADN SA, o en un sitio adyacente al sitio de endonucleasa bicatenaria recién creado (E), después ceba la replicación a través de la ADN polimerasa y genera una ADN señal (S) que es igual a el ADN señal (S) generada a partir del ADN SC (Figura 2B). Como se ilustra en la Figura 2B, el sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) está orientado de modo que la hebra recién replicada es cortada, no el ADN SA. Esto es, cuando se genera la cadena recién replicada, la orientación del sitio de reconocimiento de endonucleasa en E dirige la actividad de endonucleasa (escisión) de la cadena recién replicada. Por tanto, el sitio de reconocimiento de endonucleasa comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia que es cortada por una endonucleasa, permitiendo que el oligonucleótido SA permanezca intacto durante toda la reacción (es decir, el ADN SA no se corta ni escinde).

La secuencia (C) del ADN SC que es complementaria al ADN objetivo 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) 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 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 pueden formar interacciones de enlace de hidrógeno para formar una estructura de ácido nucleico bicatenario (por ejemplo, pares de bases de ácido nucleico). Por ejemplo, una 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 emplea en el presente documento, el término "complementario" no requiere que una secuencia sea complementaria sobre la longitud completa de su cadena complementaria, y abarca una secuencia que es complementaria a una porción de otra secuencia. Por tanto, en algunas realizaciones, una secuencia complementaria abarca secuencias que son complementarias en toda la longitud de la secuencia o en una porción de la misma (por ejemplo, mayor que aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80%, o aproximadamente 90% de la longitud de la secuencia). Por ejemplo, dos secuencias pueden ser complementarias entre sí en una longitud que varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 nucleótidos consecutivos (contiguos), o cualquier número entero entre 2 y 100. En algunas realizaciones, dos secuencias pueden ser complementarias entre sí en una longitud que varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos consecutivos (contiguos), o cualquier número entero entre 15 y 30. Como se emplea en el presente documento, las secuencias complementarias pueden abarcar secuencias que tienen algunos apareamientos erróneos de secuencia. Por ejemplo, las secuencias complementarias pueden incluir secuencias que son complementarias de al menos aproximadamente 70 % a 100 %, preferiblemente mayor que por encima del 95 % de la longitud de la secuencia. A pesar de cierta cantidad de apareamientos erróneos, las secuencias complementarias generalmente tienen la capacidad de hibridarse selectivamente entre sí en condiciones apropiadas tales como, por ejemplo, condiciones rigurosas y altamente rigurosas tales como las descritas en el presente documento o generalmente conocidas por los expertos en la materia.

Los ADN SC y SA pueden sintetizarse por métodos conocidos. Por ejemplo, los ADN SC y SA se pueden sintetizar utilizando un método de fosforamidita, un método de fosfotriéster, un método de H-fosfonato, o un método de

tiofosfato. En algunas realizaciones, los ADN SC y/o SA se pueden purificar, por ejemplo usando HPLC de intercambio iónico.

Los ADN SC y SA pueden comprender modificaciones químicas tales como las generalmente conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, por ejemplo, los ADN SC y SA pueden comprender nucleótidos modificados químicamente (por ejemplo, derivado de 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 modo que no se produzca una reacción de extensión desde el extremo 3' del ADN SC o SA (por ejemplo, al unirse a una secuencia objetivo u otra secuencia no diana, eso podría servir como un cebador para la extensión de polimerasa). Como se ilustra en la Figura 2 A, es el extremo 3' del ácido nucleico objetivo (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). Adicionalmente, las reacciones de extensión no específicas de un extremo 3' no modificado del ADN SC que surge de eventos tales como, por ejemplo, unión entre el ADN SC y una secuencia no diana, 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 no templada de novo o *ab initio* también puede conducir a errores de detección. En consecuencia, en realizaciones, los ADN SC y SA comprenden una modificación del extremo 3' que puede reducir o eliminar la aparición de cualquier reacción de extensión no deseada, tales como los discutidos anteriormente. Ejemplos no limitativos de modificaciones en el extremo 3' incluyen TAMRA, DABCYL y FAM. Otros ejemplos no limitantes de modificaciones incluyen, por ejemplo, biotilación, fluorocromación, fosforilación, tiolación, aminación, nucleótidos invertidos o grupos abásicos.

En otro aspecto, la presente invención abarca métodos para detectar un ácido nucleico diana (T) en una muestra. Los métodos generalmente comprenden poner en contacto dicha muestra con: un primer oligonucleótido (o ADN de conversión de secuencia o ADN SC) que comprende, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) que tiene un ácido nucleico bloqueado (LNA) y que es complementario al extremo 3' de dicho ácido nucleico diana (T); un segundo oligonucleótido (o ADN amplificador de señal o ADN SA) que comprende, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal (D) homóloga a la secuencia de generación de ADN de señal (A) del primer oligonucleótido, un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) (que es el mismo que el sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) del primer oligonucleótido) y una secuencia (F) que comprende un ácido nucleico bloqueado (LNA) y que es homólogo a la secuencia de generación de ADN de señal (A) del primer oligonucleótido; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. En realizaciones de este aspecto, el método también comprende determinar la presencia o ausencia de un ADN señal, en el que la presencia del ADN señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

El método comprende poner en contacto una muestra con una endonucleasa. La endonucleasa puede ser una endonucleasa de corte o una endonucleasa de restricción que es capaz o puede usarse para cortar la secuencia complementaria al sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) dentro del ADN SC, o la secuencia complementaria al sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) dentro del ADN SA. En algunas realizaciones, la endonucleasa comprende una endonucleasa de corte o una endonucleasa de restricción que puede catalizar o puede usarse 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 de cadena doble se puede escindir para generar un grupo fosfato en el lado 5' del sitio de escisión y un grupo hidroxilo en el lado 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 escinde el enlace de fosfodiéster en solo una cadena de un ADN bicatenario y genera una muesca en la cadena doble. Se pueden usar métodos o estrategias para modificar la actividad de la endonucleasa de restricción, tales como, por ejemplo, incluyendo una modificación química en al menos una cadena de un ácido nucleico bicatenario que no es escindido por la enzima de restricción. Un ejemplo no limitativo de tal modificación incluye reemplazar el átomo de oxígeno del enlace fosfodiéster de una cadena con un átomo de azufre.

En realizaciones que proporcionan una endonucleasa de restricción, el enlace fosfodiéster de una cadena de un ADN de doble cadena se puede escindir para generar un grupo fosfato en el lado 5' del sitio de escisión y un grupo hidroxilo en el lado 3'. Ejemplos no limitantes de endonucleasas de restricción incluyen Hinc II, Hind II, Ava I, Fnu4HI, Tth111I y NciI.

El método comprende poner en contacto una muestra con una polimerasa. En algunas realizaciones, la polimerasa puede ser una ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de cadena. En algunas realizaciones, la polimerasa puede ser una polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5'-3', carece de actividad 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 modificarse genéticamente. En algunas realizaciones, la polimerasa se selecciona entre aquellas que funcionan a temperaturas más bajas, incluidas las temperaturas ambiente (por ejemplo, ambiente). Ejemplos no limitantes de ADN polimerasas incluyen fragmentos Klenow, ADN polimerasa I derivada de *E. coli*, ADN polimerasas Bst deficientes en exonucleasa de 5' a 3' derivadas de *Bacillus stearothermophilus* y ADN polimerasas Bca

deficientes en exonucleasa de 5' a 3' derivadas de *Bacillus caldotenax*.

Una realización no limitativa de los métodos desvelados en el presente documento se ilustra en las Figuras 2A y 2B. Brevemente, 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 mellar la forma bicatenaria (es decir, la secuencia complementaria) del sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) o un sitio adyacente a la forma bicatenaria del sitio de reconocimiento de endonucleasa (B). Si un ácido nucleico objetivo (T) está presente en la muestra, la secuencia del extremo 3' del 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 doble cadena secuencia de extensión (X) que incluye el sitio de reconocimiento de endonucleasa bicatenaria (B). El reconocimiento del sitio de reconocimiento de endonucleasa bicatenario recién generado (B) (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), y posterior corte de la hebra recién generada (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), genera secuencia de señal de oligonucleótido (S) y secuencia de extensión (X'). Debido a que el 3'-OH de la secuencia (X') en la muesca sirve como un sitio de inicio 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.

Como se ilustra adicionalmente en la Figura 2B, la señal resultante de la producción de ADN señal (S) puede amplificarse aún más por la presencia de un amplificador de ADN señal (o ADN SA). Brevemente, el ADN de 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 la secuencia de extensión de doble hebra (Y) que incluye la doble hebra sitio de reconocimiento de endonucleasa (E). El reconocimiento del sitio de reconocimiento de endonucleasa bicatenario recién generado (E) (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), y posterior corte de la hebra recién generada (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), genera una secuencia de señal de oligonucleótido (S) y una secuencia de extensión (Y'). Debido a que el 3'-OH de la secuencia (Y') en la muesca sirve como un sitio de inicio para rondas posteriores de replicación de desplazamiento de cadena, el oligonucleótido (S) se desplaza del ADN SA por la ADN polimerasa que continúa replicando y amplificando el ADN de señal (S) en la mezcla de reacción.

Los métodos de acuerdo con la invención pueden realizarse en condiciones de temperatura isotérmica o sustancialmente constante. En realizaciones que se refieren a la realización del método bajo una temperatura sustancialmente constante, se permite alguna fluctuación de temperatura. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una temperatura sustancialmente constante puede fluctuar dentro de un intervalo de temperatura objetivo deseado o identificado (por ejemplo, aproximadamente ± 2 °C o aproximadamente ± 5 °C). En realizaciones, una temperatura sustancialmente constante puede incluir temperaturas que no incluyen ciclos térmicos. En algunas realizaciones, los métodos se pueden realizar a temperaturas isotérmicas o sustancialmente constantes como, por ejemplo, (1) temperaturas iguales o inferiores a la temperatura de hibridación o recocido óptima calculada/predicha o determinada experimentalmente del ácido nucleico diana (T) a la secuencia (C) del ADN SC; (2) temperaturas iguales o inferiores a la temperatura de fusión del ácido nucleico objetivo (T) unido al ADN SC (típicamente, las temperaturas de hibridación o recocido están ligeramente por debajo de la temperatura de fusión); (3) temperaturas iguales o inferiores a la temperatura de fusión del ADN de señal (S) unido al ADN SA; o (4) temperaturas a o alrededor de la temperatura de reacción óptima calculada/predicha o determinada experimentalmente para la polimerasa y/o endonucleasa presente en la mezcla de reacción.

Los métodos pueden comprender temperaturas de reacción que varían de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 70 °C, incluyendo temperaturas más bajas que caen 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 es inferior a 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 más, 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 sea 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 todavía otras realizaciones, el tiempo de reacción puede variar de aproximadamente 5 a 120 minutos, o de aproximadamente 15 a 60 minutos.

- 5 A lo largo de la memoria descriptiva, el oligonucleótido (S) también se conoce como ADN señal (S). Debido a que el ADN señal se genera solo en presencia del ácido nucleico diana (T), los métodos según la presente invención detectan la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana (T) en una muestra mediante la detección de 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 detección. El ADN señal tampoco está limitado por la longitud. Preferiblemente, el
- 10 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 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
- 15 y todos los enteros entre 15 y 30.

Los métodos de acuerdo con la divulgación pueden realizarse en condiciones de tampón 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

20 aproximadamente 50 mM a 150 mM. En algunas realizaciones, el método puede realizarse usando una cantidad de ADN SC y/o SA que permite la amplificación de una cantidad detectable de secuencia señal en presencia de un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, la concentración de ADN SC y/o SA puede variar de aproximadamente 100 pM a aproximadamente 100 μ M, de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 150 nM, de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 50 nM, o de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 25 nM.

25 La presencia de ADN señal (S) se puede detectar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. Además, la presencia de ADN señal se puede detectar utilizando la polarización de fluorescencia, inmunoensayo, transferencia de energía de resonancia fluorescente, etiquetado enzimático (como peroxidasa o fosfatasa alcalina), marcaje fluorescente (como fluoresceína o rodamina), quimioluminiscencia, bioluminiscencia, resonancia de plasmón superficial (SPR), o una sonda de ADN modificada con fluoróforo (por ejemplo, sonda TaqMan). El producto de amplificación también se puede detectar usando un nucleótido marcado con una biotina, por ejemplo. En dicho caso, la biotina en el producto de amplificación se puede detectar usando avidina marcada con fluorescencia o avidina marcada con enzima, por ejemplo. El

30 producto de amplificación también se puede detectar con electrodos mediante el uso de un intercalador redox conocido por los expertos en la materia. El producto de amplificación también se puede detectar utilizando resonancia de plasmón superficial (SPR), una microbalanza de cristal Quarts (QCM) o métodos electroquímicos (incluidos los métodos que emplean sensores de nanoporos).

Los métodos según 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 se pueden usar para medir cuantitativamente la concentración de un ácido nucleico diana en una muestra de prueba. Por ejemplo, los métodos de acuerdo con la presente descripción se pueden realizar en presencia de un rango de diferentes concentraciones conocidas del ácido nucleico diana, y las curvas de calibración se pueden preparar y usar como se practica generalmente en la técnica. El ácido nucleico diana ((T) en la Figura 2) puede comprender cualquier secuencia de ácido nucleico y

45 puede incluir ADN, ARN, ácidos nucleicos modificados químicamente, ácidos nucleicos no naturales, análogos de ácido nucleico, o cualquier híbrido o combinación de los mismos. En consecuencia, en algunas realizaciones, El ADN puede incluir ADNc, ADN genómico y ADN sintético, y el ARN puede incluir ARN total, ARNm, ARNr, ARNip, ARNhn, ARNpi, ARNa, ARNMI y ARN sintético. Mientras que algunas realizaciones se refieren a secuencias de ácido nucleico diana particulares, cualquier secuencia de ácido nucleico, incluyendo secuencia auxiliar de ácido nucleico, puede ser una secuencia de ácido nucleico diana para ser detectada. La divulgación proporciona la detección de un ácido nucleico diana con selectividad y sensibilidad incluso cuando el ácido nucleico es un ácido nucleico de cadena corta. En consecuencia, el grado de complementariedad entre las secuencias (C) del ADN SC y el ácido nucleico objetivo (T) permite la hibridación específica entre las secuencias (por ejemplo, el número de nucleótidos complementarios en la secuencia (C) del ADN de conversión de secuencia y el ácido nucleico objetivo (

50 T) secuencias evita la hibridación no específica en un conjunto dado de condiciones de reacción).

En realizaciones, la secuencia de ácido nucleico objetivo puede ser de, o derivarse de cualquier número de fuentes, incluyendo, por ejemplo, ADN genómico, ARNm expresado, secuencias de ácido nucleico de patógenos (microbios, virus) o ácidos nucleicos terapéuticos. En consecuencia, los ADN SC y SA y los métodos descritos en el presente

60 documento pueden usarse para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades (por ejemplo, que surgen de fuentes genéticas e infecciosas), identificación de contaminantes (por ejemplo, enfermedades transmitidas por alimentos, contaminación de equipos), medicina personalizada (por ejemplo, monitorización y/o pronóstico de una terapia), y similares. Por ejemplo, las pruebas de diagnóstico molecular se pueden realizar con respecto a las siguientes enfermedades infecciosas: virus de la hepatitis B (VHB); hepatitis C (VHC); VHC (genotipos 1 - 6); virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1); Chlamydia trachomatis; Neisseria gonorrhoeae; gripe A; gripe B; virus sincitial respiratorio (VSR); y virus Parvo.

65

En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana puede comprender micro ARN (miARN). Los micro ARN incluyen pequeñas moléculas de ARN no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos. Se sabe que los micro-ARN funcionan en la transcripción y la regulación postranscripcional de la expresión génica. Se sabe que los micro-ARN funcionan mediante el emparejamiento de bases con regiones complementarias de ARN mensajero (ARNm), que da como resultado el silenciamiento génico a través de la represión traduccional o degradación diana.

Se puede usar cualquier tipo de muestra que pueda comprender un ácido nucleico diana en los métodos desvelados en el presente documento. Por 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, tal como sangre entera, suero, capa leucocitaria, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, fluido seminal, saliva, tejido (tal 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 preparaciones biológicas) que pueden contener o estar infectados con microorganismos como virus o bacterias; y muestras que pueden contener sustancias biológicas, tal como el suelo, proceso industrial y equipos de fabricación, y aguas residuales; y muestras derivadas de diversas fuentes de agua (por ejemplo, agua potable). Asimismo, una muestra puede procesarse por cualquier método conocido para preparar una composición que contiene ácido nucleico utilizada en los métodos desvelados en el presente documento. Los ejemplos de tales preparaciones pueden incluir la rotura celular (por ejemplo, lisados y extractos celulares), fraccionamiento de muestras, ácidos nucleicos en las muestras y grupos moleculares de ácido nucleico específicos tales como muestras enriquecidas con ARNm. La muestra utilizada en el método para detectar un ácido nucleico diana de la presente invención no se limita a los derivados de productos biológicos y naturales como se mencionó anteriormente y puede ser una muestra que contiene un oligonucleótido sintético.

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

Los métodos de acuerdo con la presente invención también pueden interactuar con plataformas de punto de atención. 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 un ion de hidrógeno cargado positivamente que afecta el pH de una reacción. Por tanto, la síntesis de ADN señal según los métodos de la presente invención puede detectarse mediante el seguimiento de los cambios en el pH utilizando, por ejemplo, medidores de micro pH del punto de atención. Por ejemplo, el sistema de punto de atención i-STAT de Abbott se puede suministrar con cartuchos desechables de un solo uso que contienen sensores microfabricados, soluciones de calibración, sistemas fluidicos y cámaras de residuos para análisis de pH.

Los métodos desvelados en el presente documento pueden comprender reactivos adicionales. Algunos ejemplos no limitantes de otros reactivos que pueden usarse en la reacción de amplificación de ácido nucleico incluyen sales metálicas como cloruro de sodio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio y sulfato de magnesio; sustratos, tales como 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. De manera análoga, detergentes, oxidantes y agentes reductores también pueden usarse en la práctica de los métodos desvelados en el presente documento. Asimismo, se pueden usar agentes como dimetilsulfóxido y betaína (N, N, N-trimetilglicina); sustancias ácidas descritas en la publicación internacional n.º WO 99/54455; y complejos catiónicos.

Los métodos y las estructuras de ácido nucleico proporcionados en el presente documento pueden usarse en combinación con otros métodos para proporcionar la amplificación exponencial de una ADN señal en presencia de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, los métodos y composiciones de acuerdo con la presente divulgación pueden usarse en combinación con ADN de conversión de secuencia cubierta, como se describe en la solicitud provisional de EE.UU. 61/927710, titulado "ADN de conversión de secuencia cubierta y métodos de detección" que se incorpora en el presente documento como referencia.

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

Los siguientes ejemplos pretenden ser ilustrativos de los aspectos y realizaciones descritos anteriormente. Ni la divulgación anterior ni los ejemplos a continuación deben considerarse como limitantes del alcance de las

reivindicaciones adjuntas. Un experto en la materia apreciará que la divulgación no está limitada por la terminología particular que se utiliza para describir e ilustrar los diversos aspectos de la divulgación.

EJEMPLO 1

Las reacciones se realizaron usando ADN SC # 246: 5'-AGCCCTGTACAATGCCCTCAGCCTGTTCTGCT-GAACTGAGCCA-idT-idT-3' (SEQ ID NO.: 32; las posiciones en negrita representan la presencia de LNA) y ADN SA # 253: 5'- AGCCCTGTACAATGCCCTCAGCAGCCCTGTACAAT-idT-idT-3' (SEQ ID NO.: 2; las posiciones en negrita representan la presencia de LNA) para detectar la producción de ADN señal en presencia de varias cantidades (1 nM, 100 pM, 10 pM, 1 pM, 100 fM, 10 fM o 1 fM) o ausencia de ADN objetivo, que es la misma secuencia de ADN que la hsa-miR-24 humana (SEQ ID NO.: 33). Tanto el ADN SC # 246 como ADN SA # 253 se purificaron usando HPLC de intercambio iónico.

Las reacciones se realizaron a 37 °C en un volumen de reacción de 25 µl que contenía Tampón 2 de New England Biolabs (NEB) que tenía una concentración final de Tris-HCl 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 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 Bst DNA Polymerase Large Fragment, que estaba presente a una concentración de 0,08 unidades/µl. Los dNTP estaban presentes a una concentración final de 200 µM cada uno. Los ADN SC y SA estaban presentes en la reacción a una concentración final de 5 nM y 20 nM, respectivamente. Una sonda de baliza molecular (SEQ ID NO.: 34;) presente en una concentración final de 100 nM se utilizó para detectar la generación de ADN señal. Las mediciones fluorescentes se realizaron utilizando un sistema de PCR en tiempo real BioRad CFX96, y los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación.

TABLA 1

Concentración de ADN diana	Tiempo de amplificación (min)
0	>138,22
1 nM	5,84
100 pM	15,03
10 pM	32,18
1 pM	55,31
100 fM	69,68
10 fM	73,48

EJEMPLO 2

Las reacciones se realizaron a varias temperaturas (20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C y 50 °C) usando ADN SC # 246 (SEQ ID NO.: 32) y ADN SA # 339 (SEQ ID NO.: 25) para detectar la producción de ADN señal en presencia (1 nM, 100 pM, 10 pM, 1 pM, 100 fM) o ausencia de ADN diana, que es la misma secuencia de ADN que la hsa-miR-24 humana (SEQ ID NO.: 33). Tanto el ADN SC # 246 como ADN SA # 339 se purificaron usando HPLC de intercambio iónico.

Excepto por la temperatura, las condiciones de reacción fueron como se describe en el Ejemplo 1 y los resultados se muestran en la Tabla 2 a continuación.

TABLA 2

Concentración de ADN diana	Temperatura	Tiempo de amplificación (min)
0	20 °C	>393,32
1 nM	20 °C	109,93
0	25 °C	>393,32
1 nM	25 °C	45,36
100 pM	25 °C	110,75
10 pM	25 °C	244,64

(continuación)

Concentración de ADN diana	Temperatura	Tiempo de amplificación (min)
0	30 °C	>393,32
1 nM	30 °C	18,42
100 pM	30 °C	45,58
10 pM	30 °C	105,79
1 pM	30 °C	186,44
0	37 °C	>393,32
1 nM	37 °C	7,59
100 pM	37 °C	19,61
10 pM	37 °C	42,89
1 pM	37 °C	83,07
100 fM	37 °C	120,90
0	45 °C	>393,32
1 nM	45 °C	3,68
100 pM	45 °C	10,07
10 pM	45 °C	25,88
1 pM	45 °C	60,34
0	50 °C	>393,32
1 nM	50 °C	3,65

EJEMPLOS 3 A 38

- 5 Se realizaron reacciones adicionales usando ADN SC # 246 (SEQ ID NO.: 32) junto con varios ADN SA diferentes (como se describe a continuación en la Tabla 3), para detectar la producción de ADN de señal en presencia (100 pM) o ausencia de ADN objetivo, que es la misma secuencia de ADN que la hsa-miR-24 humana (SEQ ID NO.: 33).

- 10 Las condiciones de reacción fueron como se describe en el Ejemplo 1 y los resultados son como se muestran en la Tabla 3. La secuencia de ADN de amplificación de secuencia se proporciona sobre la tabla e indica las posiciones (numeradas desde el extremo 3') que pueden comprender LNA.

35 30 25 20 15 10 5 1
 | | | | | | |
 5' - AGCCC TGTAC AATGC CCTCA GCAGC CCTGT ACAAT - 3'

15

TABLA 3

N.º de Ej.	ADN SA N.º	SEQ ID NO.	Posición de los LNA desde el extremo 3' del ADN SA	Tiempo de amplificación (min) Ácido nucleico diana 100 pM	Tiempo de amplificación (min) Ácido nucleico diana 0 pM	Diferencia (min) (Diana 0 pM) - (Diana 100 pm)
3	311	1	Ninguno	5,16	17,45	12,29
4	296	2	1, 2, 6, 10	19,44	61,99	42,55
5	297	3	1, 2, 6	16,21	55,60	39,39
6	298	4	1, 2, 10	13,38	31,76	18,38

(continuación)

N.º de Ej.	ADN SA N.º	SEQ ID NO.	Posición de los LNA desde el extremo 3' del ADN SA	Tiempo de amplificación (min) Ácido nucleico diana 100 pM	Tiempo de amplificación (min) Ácido nucleico diana 0 pM	Diferencia (min) (Diana 0 pM) - (Diana 100 pM)
7	299	5	1, 6, 10	22,62	86,26	63,64
8	300	6	2, 6, 10	20,47	84,86	64,39
9	301	7	1, 2	11,16	28,74	17,57
10	302	8	1, 6	19,00	77,69	58,69
11	303	9	2, 6	16,99	66,14	49,15
12	304	10	1, 10	16,30	47,75	31,45
13	305	11	2, 10	9,42	23,07	13,65
14	306	12	6, 10	13,97	104,81	90,85
15	307	13	10	5,89	18,83	12,94
16	308	14	6	12,94	70,61	57,67
17	309	15	2	5,03	15,87	10,84
18	310	16	1	13,03	70,22	57,19
19	326	2	1, 2, 6, 10	9,55	67,44	57,89
20	327	13	10	4,42	18,86	14,44
21	328	17	9	5,31	15,09	9,78
22	329	18	8	6,29	46,83	40,54
23	330	19	7	5,95	33,17	27,22
24	331	14	6	9,50	99,25	89,75
25	332	20	5	8,36	54,10	45,74
26	333	21	4	7,13	34,16	27,04
27	334	22	3	4,79	17,89	13,10
28	335	15	2	4,67	17,35	12,68
29	336	16	1	8,37	38,02	29,65
30	337	23	4, 8	10,15	91,63	81,48
31	338	24	5, 9	6,95	29,98	23,03
32	339	25	3, 6	12,80	>137,88	>125,08
33	340	26	2, 3, 6	12,98	>137,88	>124,91
34	341	27	2, 3, 6, 10	14,33	>137,88	>123,55
35	342	28	1, 8	11,44	84,57	73,14
36	344	29	2, 8	6,72	30,02	23,29
37	345	30	3, 8	8,83	46,90	38,07
38	346	31	2, 7	5,84	24,41	18,57

Ejemplos 39-92

- 5 Se realizaron reacciones adicionales usando ADN SC # 246 (SEQ ID NO.: 32) junto con varios ADN SA diferentes (como se describe a continuación en la Tabla 4), para detectar la producción de ADN de señal en presencia (1 nM, 100 pM, 10 pM, 1 pM y 100 fM) o ausencia de ADN diana, que es la misma secuencia de ADN que la hsa-miR-24 humana (SEQ ID NO.: 33). Como se ha indicado en la Tabla 4, los experimentos se realizaron utilizando ADN SA no

purificado o purificado por HPLC.

Las condiciones de reacción fueron como se describe en el Ejemplo 1 y los resultados son como se muestran en la Tabla 4. La secuencia de ADN de amplificación de secuencia se proporciona sobre la tabla e indica las posiciones (numeradas desde el extremo 3') que pueden comprender LNA.

5

35	30	25	20	15	10	5	1

5' - AGCCC TGTAC AATGC CCTCA GCAGC CCTGT ACAAT - 3'

TABLA 4

Ej.	ADN SA	SEQ ID NO.	HPLC	Posición de LNA (s) desde el extremo 3' del ADN SA	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 1 nM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 100 pM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 10 pM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 1 pM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 100 fM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 100 fM)
39	311	1	No	Ninguno	18,23	13,86	7,05	1,70	0,12	-0,46
40	311	1	Sí	Ninguno	24,08	20,01	14,17	9,28	1,48	-1,05
41	296	2	No	1, 2, 6, 10	50,09	38,24	20,86	5,20	-4,07	-6,85
42	296	2	Sí	1, 2, 6, 10	110,50	101,55	77,64	40,23	23,09	-0,48
43	298	4	No	1, 2, 10	27,75	22,53	13,28	4,31	-0,21	-0,90
44	298	4	Sí	1, 2, 10	27,61	23,07	14,71	5,91	0,92	0,00
45	299	5	No	1, 6, 10	81,47	72,26	49,38	15,09	-4,33	-6,79
46	299	5	Sí	1, 6, 10	>133,87	>123,93	>94,42	>38,84	N/D	N/D
47	300	6	No	2, 6, 10	81,75	72,64	51,27	20,57	-0,52	-5,63
48	300	6	Sí	2, 6, 10	126,12	116,85	91,02	49,23	10,15	3,71
49	301	7	No	1, 2	21,48	17,60	10,33	3,31	0,23	-0,74
50	301	7	Sí	1, 2	21,90	18,33	11,02	3,91	0,22	-0,37
51	302	8	No	1, 6	70,60	63,23	44,93	17,96	2,91	-1,32
52	302	8	Sí	1, 6	96,99	89,16	67,41	39,23	9,30	-3,69
53	303	9	No	2, 6	71,73	63,60	46,48	19,67	3,76	0,38
54	303	9	Sí	2, 6	89,19	80,59	62,28	37,42	13,29	0,96
55	304	10	No	1, 10	53,87	44,92	29,13	9,88	2,10	1,23
56	304	10	Sí	1, 10	70,68	61,59	45,79	25,84	7,74	-0,20
57	305	11	No	2, 10	18,67	14,10	8,68	3,08	0,39	0,57
58	305	11	Sí	2, 10	22,25	18,32	13,48	7,21	2,49	-0,57
59	306	12	No	6, 10	92,07	80,17	54,53	13,19	2,27	4,15
60	306	12	Sí	6, 10	>133,30	>120,41	>88,18	>24,20	N/D	N/D

(continuación)

Ej.	ADN SA	SEQ ID NO.	HPLC	Posición de LNA (s) desde el extremo 3' del ADN SA	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 1 nM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 100 pM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 10 pM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 1 pM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 100 fM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 100 fM)
61	307	13	No	10	21,95	17,15	9,96	2,02	0,69	0,38
62	307	13	Sí	10	25,99	21,80	16,71	8,38	2,06	1,42
63	308	14	No	6	65,98	56,79	36,08	7,00	3,18	0,47
64	308	14	Sí	6	117,75	108,40	85,99	44,28	8,00	-3,17
65	309	15	No	2	17,04	13,92	8,15	2,50	0,08	-0,08
66	309	15	Sí	2	20,43	18,22	12,59	7,62	2,23	1,09
67	310	16	No	1	37,55	30,61	16,68	4,85	0,04	-0,06
68	310	16	Sí	1	50,77	44,61	32,67	18,37	6,27	1,60
69	326	2	No	1, 2, 6, 10	66,95	56,25	34,00	12,44	5,24	2,03
70	326	2	Sí	1, 2, 6, 10	103,95	92,33	67,10	36,34	1,75	-0,24
71	327	13	No	10	24,95	20,71	13,02	5,84	0,87	-0,15
72	327	13	Sí	10	25,31	21,25	14,95	8,91	2,89	0,35
73	328	17	No	9	15,05	11,92	6,84	2,26	0,24	-0,20
74	328	17	Sí	9	20,53	17,38	12,21	7,25	2,93	0,56
75	329	18	No	8	61,98	54,25	37,98	23,51	16,85	14,40
76	329	18	Sí	8	63,53	56,82	42,94	27,45	13,69	5,17
77	330	19	No	7	36,79	31,21	20,02	8,36	2,40	0,86
78	330	19	Sí	7	50,62	44,32	32,65	20,78	4,03	0,05
79	331	14	No	6	106,33	95,63	71,62	30,73	6,38	0,44
80	331	14	Sí	6	122,99	111,94	85,44	40,13	9,04	0,00
81	332	20	No	5	69,31	60,27	42,72	19,21	4,02	0,31
82	332	20	Sí	5	78,59	69,51	51,76	26,48	5,25	-1,48

(continuación)

Ej.	ADN SA	SEQ ID NO.	HPLC	Posición de LNA (s) desde el extremo 3' del ADN SA	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 1 nM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 100 pM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 10 pM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 1 pM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 100 fM)	Diferencia (min.) (Diana 0) - (Diana 100 fM)
83	333	21	No	4	40,90	33,09	21,21	9,29	1,97	0,05
84	333	21	Sí	4	52,10	44,17	33,30	21,03	8,37	1,80
85	334	22	No	3	23,34	17,95	11,50	4,68	0,61	0,49
86	334	22	Sí	3	31,21	26,09	18,85	10,91	3,83	0,28
87	335	15	No	2	21,21	17,85	9,96	3,44	-0,68	-0,07
88	335	15	Sí	2	21,33	18,31	12,00	8,21	1,06	-1,79
89	336	16	No	1	41,11	33,90	21,81	8,70	2,53	0,85
90	336	16	Sí	1	50,65	43,87	31,68	18,42	5,77	0,96
91	339	25	No	3, 6	164,66	155,83	125,30	68,44	17,49	-1,41
92	339	25	Sí	3, 6	>246,97	>237,39	>202,59	>128,53	>28,94	N/D

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Ken Komiya Makoto Komori Toru Yoshimura	
10	<120> Conversión de secuencia y ADN del amplificador de señal que tienen ácidos nucleicos bloqueados y métodos de detección utilizando el mismo	
	<130> 28295US01 (12350USO1)	
	<160> 35	
15	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 35	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN de amplificación de señal	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
30	<400> 1 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 2	
	<211> 35	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 26, 30, 34, 35	
40	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (26)..(26)	
	<223> base modificada con LNA	
45	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (30)..(30)	
	<223> base modificada con LNA	
50	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (34)..(34)	
	<223> base modificada con LNA	
55	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (35)..(35)	
	<223> base modificada con LNA	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
65	<400> 2 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35

5	<210> 3 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 30, 34, 35	
15	<220> <221> base_modificada <222> (30)..(30) <223> base modificada con LNA	
20	<220> <221> base_modificada <222> (34)..(34) <223> base modificada con LNA	
25	<220> <221> base_modificada <222> (35)..(35) <223> base modificada con LNA	
30	<220> <221> misc_feature <222> (35)..(35) <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
35	<400> 3 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
40	<210> 4 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 26, 34, 35	
50	<220> <221> base_modificada <222> (26)..(26) <223> base modificada con LNA	
55	<220> <221> base_modificada <222> (34)..(34) <223> base modificada con LNA	
60	<220> <221> base_modificada <222> (35)..(35) <223> base modificada con LNA	
65	<220> <221> misc_feature <222> (35)..(35) <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
	<400> 4 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 5 <211> 35 <212> ADN	

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 26, 30, 35
 5
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (26)..(26)
 <223> base modificada con LNA
 10
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (30)..(30)
 <223> base modificada con LNA
 15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (35)..(35)
 <223> base modificada con LNA
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas
 25
 <400> 5
 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
 30
 <210> 6
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 26, 30, 34
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (26)..(26)
 40
 <223> base modificada con LNA
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (30)..(30)
 45
 <223> base modificada con LNA
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (34)..(34)
 50
 <223> base modificada con LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 55
 <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas
 <400> 6
 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
 60
 <210> 7
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 34, 35

5	<220> <221> base_modificada <222> (34)..(34) <223> base modificada con LNA	
10	<220> <221> base_modificada <222> (35)..(35) <223> base modificada con LNA	
15	<220> <221> misc_feature <222> (35)..(35) <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
20	<400> 7 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
25	<210> 8 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <221> base_modificada <222> (30)..(30) <223> base modificada con LNA	
35	<220> <221> base_modificada <222> (35)..(35) <223> base modificada con LNA	
40	<220> <221> misc_feature <222> (35)..(35) <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
45	<400> 8 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
50	<210> 9 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 30, 34	
60	<220> <221> base_modificada <222> (30)..(30) <223> base modificada con LNA	
65	<220> <221> base_modificada <222> (34)..(34) <223> base modificada con LNA	
65	<220> <221> misc_feature <222> (35)..(35)	

	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
	<400> 9	
5	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 10	
	<211> 35	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 26, 35	
	<220>	
15	<221> base_modificada	
	<222> (26)..(26)	
	<223> base modificada con LNA	
	<220>	
20	<221> base_modificada	
	<222> (35)..(35)	
	<223> base modificada con LNA	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
	<400> 10	
30	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 11	
	<211> 35	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 26, 34	
40	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (26)..(26)	
	<223> base modificada con LNA	
45	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (34)..(34)	
	<223> base modificada con LNA	
50	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
55	<400> 11	
	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 12	
	<211> 35	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 26, 30	
	<220>	

	<221> base_modificada	
	<222> (26)..(26)	
	<223> base modificada con LNA	
5	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (30)..(30)	
	<223> base modificada con LNA	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
15	<400> 12	
	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 13	
	<211> 35	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en la posición	26
25	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (26)..(26)	
	<223> base modificada con LNA	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
35	<400> 13	
	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 14	
	<211> 35	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en la posición	30
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (30)..(30)	
50	<223> base modificada con LNA	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
55	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
	<400> 14	
	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
60	<210> 15	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en la posición	34

5	<220> <221> base_modificada <222> (34)..(34) <223> base modificada con LNA	
10	<220> <221> misc_feature <222> (35)..(35) <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
15	<400> 15 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
20	<210> 16 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> base_modificada <222> (35)..(35) <223> base modificada con LNA	
30	<220> <221> misc_feature <222> (35)..(35) <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
35	<400> 16 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
40	<210> 17 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <221> base_modificada <222> (27)..(27) <223> base modificada con LNA	
50	<220> <221> misc_feature <222> (35)..(35) <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
55	<400> 17 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
60	<210> 18 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <221> base_modificada	

	<222> (28)..(28)	
	<223> base modificada con LNA	
	<220>	
5	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
	<400> 18	
10	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 19	
	<211> 35	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en la posición	29
20	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (29)..(29)	
	<223> base modificada con LNA	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
30	<400> 19	
	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 20	
	<211> 35	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en la posición	31
40	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (31)..(31)	
	<223> base modificada con LNA	
45	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
50	<400> 20	
	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 21	
55	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en la posición	32
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (32)..(32)	
65	<223> base modificada con LNA	

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas
 5
 <400> 21
 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
 <210> 22
 10 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en la posición 33
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (33)..(33)
 20 <223> base modificada con LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 25 <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas
 <400> 22
 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
 30 <210> 23
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 28, 32
 <220>
 <221> base_modificada
 40 <222> (28)..(28)
 <223> base modificada con LNA
 <220>
 <221> base_modificada
 45 <222> (32)..(32)
 <223> base modificada con LNA
 <220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (35)..(35)
 <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas
 <400> 23
 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35
 55 <210> 24
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 27, 31
 <220>
 <221> base_modificada
 65 <222> (27)..(27)

	<223> base modificada con LNA	
	<220>	
5	<221> base_modificada	
	<222> (31)..(31)	
	<223> base modificada con LNA	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
	<400> 24	
15	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 25	
	<211> 35	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 30, 33	
	<220>	
25	<221> base_modificada	
	<222> (30)..(30)	
	<223> base modificada con LNA	
	<220>	
30	<221> base_modificada	
	<222> (33)..(33)	
	<223> base modificada con LNA	
	<220>	
35	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
	<400> 25	
40	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 26	
	<211> 35	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 30, 33, 34	
50	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (30)..(30)	
	<223> base modificada con LNA	
55	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (33)..(33)	
	<223> base modificada con LNA	
60	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (34)..(34)	
	<223> base modificada con LNA	
65	<220>	
	<221> misc_feature	

	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
5	<400> 26 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 27	
	<211> 35	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 26, 30, 33, 34	
15	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (26)..(26)	
	<223> base modificada con LNA	
20	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (30)..(30)	
	<223> base modificada con LNA	
25	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (33)..(33)	
	<223> base modificada con LNA	
30	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (34)..(34)	
	<223> base modificada con LNA	
35	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
40	<400> 27 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
	<210> 28	
	<211> 35	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 28, 35	
50	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (28)..(28)	
	<223> base modificada con LNA	
55	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> (35)..(35)	
	<223> base modificada con LNA	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (35)..(35)	
	<223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
65	<400> 28	

	agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
5	<210> 29 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 28, 34	
15	<220> <221> base_modificada <222> (28)..(28) <223> base modificada con LNA	
20	<220> <221> base_modificada <222> (34)..(34) <223> base modificada con LNA	
25	<220> <221> misc_feature <222> (35)..(35) <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
	<400> 29 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
30	<210> 30 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 28, 33	
40	<220> <221> base_modificada <222> (28)..(28) <223> base modificada con LNA	
45	<220> <221> base_modificada <222> (33)..(33) <223> base modificada con LNA	
50	<220> <221> misc_feature <222> (35)..(35) <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
	<400> 30 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
55	<210> 31 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 29, 34	
65	<220> <221> base_modificada <222> (29)..(29) <223> base modificada con LNA	

5	<220> <221> base_modificada <222> (34)..(34) <223> base modificada con LNA	
10	<220> <221> misc_feature <222> (35)..(35) <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
15	<400> 31 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat	35
20	<210> 32 <211> 44 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> ADN convertidor de secuencia que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 30, 38	
30	<220> <221> base_modificada <222> (30)..(30) <223> base modificada con LNA	
35	<220> <221> base_modificada <222> (38)..(38) <223> base modificada con LNA	
40	<220> <221> misc_feature <222> (44)..(44) <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas	
45	<400> 32 agccctgtac aatgccctca gctgttctt gctgaactga gcc	44
50	<210> 33 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Misma secuencia de ADN que la hsa-miR-24 humana	
60	<400> 33 tggctcagtt cagcaggaac ag	22
65	<210> 34 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sonda de baliza molecular, que tiene ácido 6-carboxifluoresceína en el extremo 5' y ácido 4-(4'-dimetilaminofenilazo)benzoico en el extremo 3'	
	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> Modificación FAM en el extremo 5'	
	<220>	

ES 2 759 339 T3

<221> misc_feature
 <222> (19)..(19)
 <223> Modificación DABCYL en el extremo 3'

5 <400> 34
 agccctgtac aatgcggct 19

<210> 35
 <211> 35
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ADN de amplificación de señal que tiene un ácido nucleico bloqueado en las posiciones 26, 33

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (26)..(26)
 <223> base modificada con LNA

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (33)..(33)
 <223> base modificada con LNA

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (35)..(35)
 <223> Modificación extremo 3': dos timidinas invertidas

30 <400> 35
 agccctgtac aatgccctca gcagccctgt acaat 35

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido modificado químicamente que comprende, en la dirección de 5' a 3', una primera secuencia que es complementaria a una secuencia de ADN de señal conocida, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una segunda secuencia que es complementaria a la misma secuencia de ADN de señal conocida que la primera secuencia, en el que la segunda secuencia comprende un ácido nucleico bloqueado.
2. El oligonucleótido modificado químicamente de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico bloqueado está ubicado en las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o una combinación de los mismos, desde el extremo 3' de dicho oligonucleótido.
3. El oligonucleótido modificado químicamente de la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico bloqueado está ubicado en las posiciones 3 y 6 desde el extremo 3' de dicho oligonucleótido.
4. El oligonucleótido modificado químicamente de la reivindicación 1, que comprende ácidos nucleicos bloqueados en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en:
 - a) posición 6 en combinación con cualquier otra posición 1-5 y 7-10 desde el extremo 3' del oligonucleótido;
 - b) posiciones 1 y 2 desde el extremo 3' del oligonucleótido;
 - c) posiciones 1 y 10 desde el extremo 3' del oligonucleótido;
 - d) posiciones 2 y 10 desde el extremo 3' del oligonucleótido;
 - e) posiciones 4 y 8 desde el extremo 3' del oligonucleótido;
 - f) posiciones 5 y 9 desde el extremo 3' del oligonucleótido;
 - g) posiciones 1 y 8 desde el extremo 3' del oligonucleótido;
 - h) posiciones 2 y 8 desde el extremo 3' del oligonucleótido;
 - i) posiciones 3 y 8 desde el extremo 3' del oligonucleótido; y
 - j) posiciones 2 y 7 desde el extremo 3' del oligonucleótido.
5. El oligonucleótido modificado químicamente de la reivindicación 1, en el que dicha segunda secuencia comprende 3 ácidos nucleicos bloqueados.
6. El oligonucleótido modificado químicamente de la reivindicación 5, en el que los ácidos nucleicos bloqueados están en posiciones seleccionadas del grupo que consiste en:
 - a) posición 6 en combinación con cualquiera de las dos posiciones 1-5 y 7-10 desde el extremo 3' del oligonucleótido; y
 - b) posiciones 1, 2 y 10 desde el extremo 3' del oligonucleótido.
7. El oligonucleótido modificado químicamente de la reivindicación 1, en el que dicha segunda secuencia comprende 4 ácidos nucleicos bloqueados.
8. El oligonucleótido modificado químicamente de la reivindicación 7, en el que los ácidos nucleicos bloqueados están en la posición 6 y en cualquier otra combinación de tres posiciones 1-5 y 7-10 desde el extremo 3' del oligonucleótido.
9. El oligonucleótido modificado químicamente de la reivindicación cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además una modificación del extremo 3'.
10. El oligonucleótido modificado químicamente de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 en el que dicha segunda secuencia es adicionalmente complementaria al extremo 3' de una molécula de ácido nucleico diana.
11. Un método para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con:
 - un primer oligonucleótido que comprende, en la dirección de 5' a 3', una secuencia de generación de ADN de señal, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una secuencia complementaria al extremo 3' de dicho ácido nucleico diana y que comprende un ácido nucleico bloqueado;
 - un segundo oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicha primera secuencia y dicha segunda secuencia son cada una homólogas a la secuencia de generación de ADN señal del primer oligonucleótido;
 - una polimerasa; y
 - una endonucleasa para una reacción de corte; y
 - determinar la presencia o ausencia de una ADN señal, en el que la presencia del ADN señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.
12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho método se realiza a una temperatura sustancialmente

constante.

13. El método de las reivindicaciones 11-12, en el que dicho método se realiza a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 42 °C.

5 14. El método de las reivindicaciones 11-13 en el que dicho objetivo es un micro-ARN o se origina en un agente infeccioso.

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

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

15 un segundo oligonucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicha primera secuencia y dicha segunda secuencia son cada una homólogas a la secuencia de generación de ADN señal del primer oligonucleótido;

una polimerasa; y

una endonucleasa para una reacción de corte.

FIGURA 1A

ADN de conversión de secuencia (ADN SC)

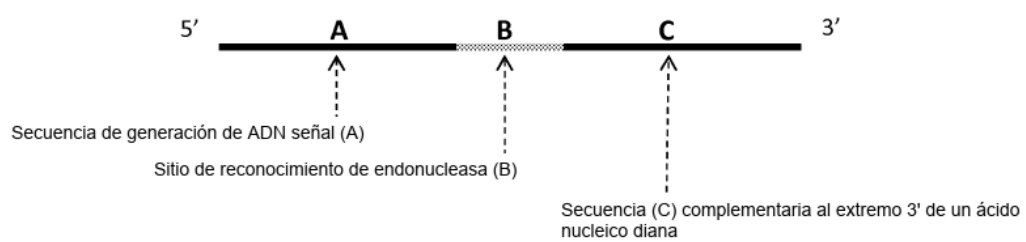


FIGURA 1B

ADN amplificador de señal (ADN SA)

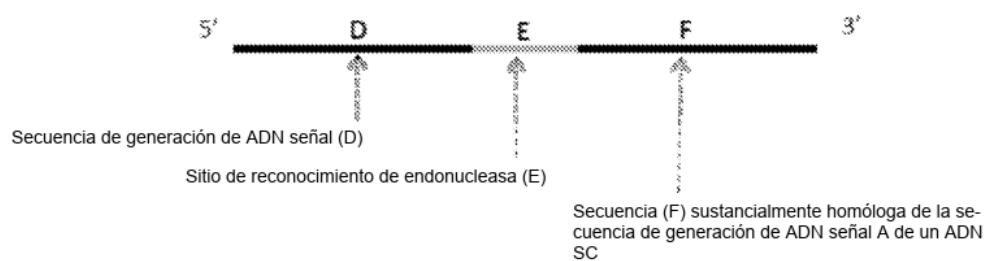


FIGURA 2A

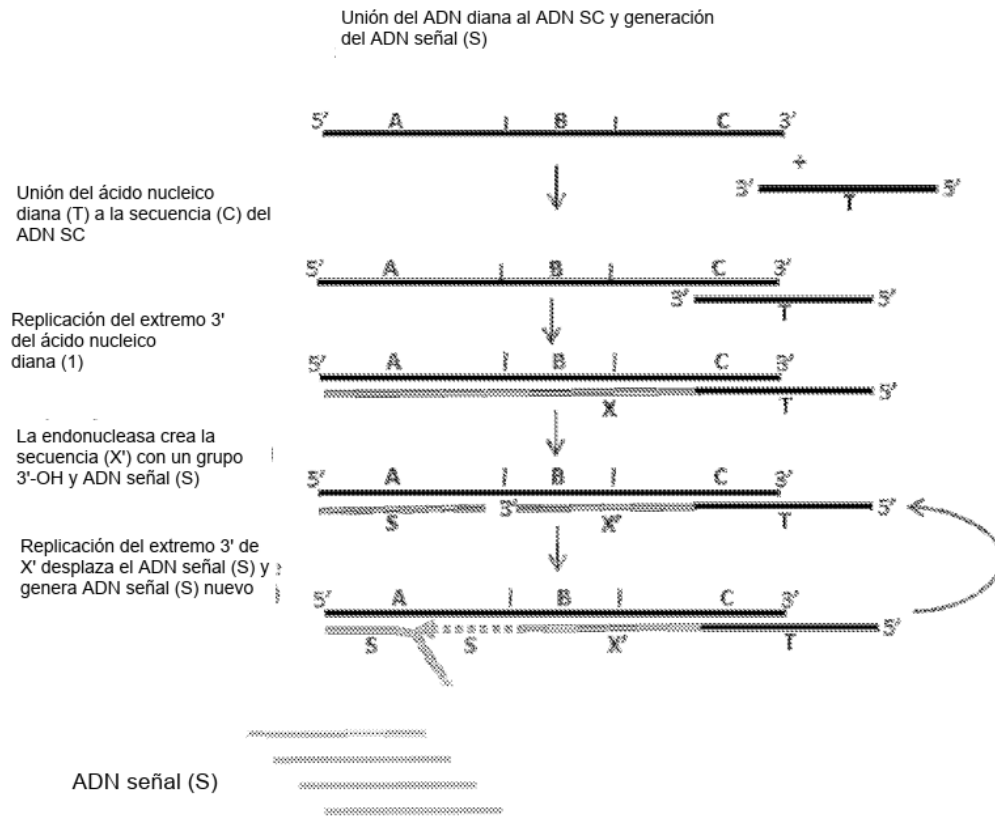


FIGURA 2B

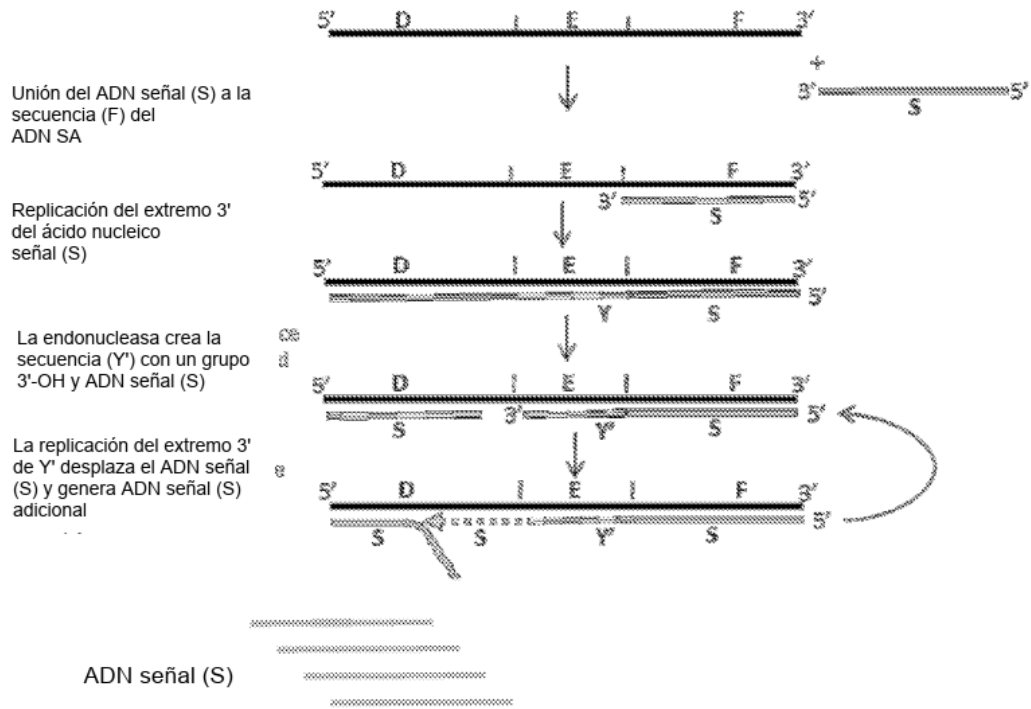


FIGURA 3

