

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 280**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/682 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.12.2015 PCT/IB2015/059986**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2016 WO16103234**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.12.2015 E 15843099 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3237641**

54 Título: **Método de detección, composición y kit basados en reacciones en cascada de ADN amplificador de señal con extensión de la diana**

30 Prioridad:

24.12.2014 US 201462096640 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2020

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (100.0%)
100 Abbott Park Road
Abbott Park, IL 60064-3502, US**

72 Inventor/es:

**KOMORI, MAKOTO y
YOSHIMURA, TORU**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 791 280 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

Método de detección, composición y kit basados en reacciones en cascada de ADN amplificador de señal con extensión de la diana

5

Antecedentes

La detección de un ácido nucleico diana en muestras de ensayo es importante en varios campos, incluyendo la medicina y la biología. Se dispone de muchas composiciones, plataformas de ensayo y procedimientos para la detección de moléculas específicas de ácido nucleico. Para que la detección sea reproducible y precisa, estos procedimientos requieren selectividad y sensibilidad adecuadas para permitir la detección de moléculas de ácido nucleico presentes en bajas concentraciones.

10

Un método común utilizado para la amplificación de secuencias específicas de una población de secuencias mixtas de ácido nucleico es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dado que una PCR estándar se lleva a cabo a tres temperaturas diferentes, la reacción puede estar asociada a desafíos tales como la dificultad para mantener temperaturas exactas y que la pérdida de tiempo aumenta en proporción al número de ciclos de amplificación. La desnaturalización de un molde de ADN bicatenario en cadenas sencillas (si bien depende en cierta medida de la secuencia determinada) requiere a menudo el uso de altas temperaturas de "fusión", lo que limita la clase de polimerasas de ADN que pueden utilizarse a aquellas que son altamente termoestables. En consecuencia, se han desarrollado tecnologías de plataformas de amplificación isotérmica para detectar ácidos nucleicos en condiciones de reacción menos estrictas que las utilizadas en la PCR. No obstante, estas tecnologías de amplificación isotérmica tienen desafíos que se presentan por acontecimientos de amplificación no específicos y altas señales de fondo, así como desafíos relacionados con la selectividad y sensibilidad en la detección de ácidos nucleicos diana a bajas concentraciones.

15

20

25

El documento US-A-2014/017692 desvela un método para detectar una secuencia diana en el que se usa un ADN de conversión de secuencia con una porción de unión a la diana, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una secuencia generadora de señal.

30

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

35

40 Sumario de la invención

En un aspecto, la divulgación se refiere a métodos para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, en donde la interacción de un ácido nucleico diana con un primer oligonucleótido (ADN de conversión de secuencia o ADN SC) produce una primera señal de ADN (S1) que, a su vez, interactúa con un segundo oligonucleótido (ADN 1 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 1) para producir un segundo ADN señal (S2) diferente de S1 que, a su vez, puede interactuar con un tercer oligonucleótido (ADN 2 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 2) para producir un tercer ADN señal único (S3). El tercer ADN señal único S3 puede interactuar con un cuarto oligonucleótido (ADN 3 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 3) para producir un cuarto ADN señal único (S4) que, a su vez, puede interactuar con un quinto oligonucleótido (ADN 4 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 4) para producir un quinto ADN señal único S5 que, a su vez, puede interactuar con un sexto oligonucleótido (ADN 5 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 5) para producir un sexto ADN señal único S5, y así sucesivamente hasta alcanzar la amplificación deseada.

45

50

Por ejemplo, la divulgación se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con: un primer oligonucleótido (ADN de conversión de secuencia o ADN SC) que comprende, en la dirección 5' a 3', una primera secuencia de generación de ADN señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana; un segundo oligonucleótido (ADN 1 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 1) que comprende, en la dirección 5' a 3', una segunda secuencia de generación de ADN señal único (D), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) (que puede ser igual o diferente del sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) en el ADN SC), y una secuencia (F) que es homóloga a la primera secuencia de generación de ADN señal (A) del primer oligonucleótido de ADN SC; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. Como se ha analizado anteriormente, a la reacción anterior se le pueden añadir n ADN amplificadores de señal en cascada (o ADN cSA), generando cada ADN cSA único un ADN señal único. Por ejemplo, n puede ser 10, 9, 8, 7, 5, 4, 3, 2 o 1, en cuyo caso se añaden 10, 9, 8, 7, 5, 4, 3, 2 o 1 ADN cSA diferentes a una reacción que comprende un ADN de conversión de secuencia y ácido nucleico diana (ADNsc). En realizaciones de este aspecto, el método también comprende

55

60

65

determinar la presencia o ausencia de uno o más ADN señal, en donde la presencia de dichos uno o más ADN señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

5 Por ejemplo, la divulgación también se refiere a un método para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha muestra con: un primer oligonucleótido (ADN de conversión de secuencia o ADN SC) que comprende, en la dirección 5' a 3', una primera secuencia de generación de ADN señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana; un segundo oligonucleótido (ADN 1 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 1) que comprende, en la dirección 5' a 3', una segunda secuencia de generación de ADN señal único (D), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) (que puede ser igual o diferente del sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) en el ADN SC), y una secuencia (F) que es homóloga a la primera secuencia de generación de ADN señal (A) del primer oligonucleótido de ADN SC; un tercer oligonucleótido (ADN 2 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 2) que comprende, en la dirección 5' a 3', una tercera secuencia de generación de ADN señal único (G), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (H) (que puede ser igual o diferente de los sitios de reconocimiento de endonucleasa (B) y (E)), y una secuencia (I) que es homóloga a la segunda secuencia de generación de ADN señal (D) del segundo oligonucleótido ADN 1 cSA; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. En realizaciones de este aspecto, el método también comprende la determinación de la presencia o ausencia de un ADN señal, en donde la presencia del ADN señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

20 En otro aspecto, la divulgación se refiere a métodos para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, en donde la interacción de un ácido nucleico diana con un primer oligonucleótido (ADN de conversión de secuencia o ADN SC) produce una primera señal de ADN (S1) que, a su vez, interactúa con un segundo oligonucleótido (ADN 1 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 1) para producir un segundo ADN señal (S2) diferente de S1 que, a su vez, puede interactuar con un tercer oligonucleótido (ADN 2 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 2) para producir ADN señal (S1), que es el mismo ADN señal generado al interactuar el ácido nucleico diana con el ADN SC. En este aspecto, El ADN señal amplificado (S2) se convierte en ADN señal (S1) tras la interacción con el ADN amplificador de señal en cascada ADN cSA 2, permitiendo la amplificación cíclica del ADN señal (S1).

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

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

45 Los métodos y oligonucleótidos de la presente divulgación pueden utilizarse en combinación con otros sistemas de amplificación y/o detección. Por ejemplo, cualquiera de los ADN señal producidos de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento puede servir como cebador en una reacción de amplificación por círculo rodante. En una realización, el extremo 3' de un ADN señal producido de acuerdo con los métodos de la presente divulgación puede ser complementario de un molde de ADN minicircular, y la amplificación por círculo rodante puede iniciarse tras la unión del ADN señal.

55 La divulgación también proporciona moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ADN SC y cSA como se desvela en el presente documento), composiciones, kits y métodos que permiten la medición de ADN señal que indican la presencia de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede detectar una señal resultante de la presencia de ácido nucleico diana de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 1 fM en una muestra dentro de un periodo de aproximadamente 10 a aproximadamente 120, de aproximadamente 5 a aproximadamente 120 o de aproximadamente 3 a aproximadamente 120 minutos.

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

65 En realizaciones, la endonucleasa puede comprender una endonucleasa de corte o una endonucleasa de restricción que puede utilizarse en una reacción que corta un oligonucleótido. Los sitios de reconocimiento de endonucleasa (B)

del ADN SC, (E) del primer ADN cSA 1 y H del segundo ADN cSA 2 pueden ser idénticos, diferentes o una combinación en la que dos son idénticos y el tercero es diferente.

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

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

25 En otro aspecto, la divulgación se refiere a otro oligonucleótido, que en el presente documento puede estar referenciado como "primer ADN 1 amplificador de señal en cascada" (o "ADN cSA 1"), que comprende, en la dirección 5' a 3', una segunda secuencia de generación de ADN señal único (D), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) y una secuencia que es homóloga a una secuencia de generación de ADN señal (A) de un ADN de conversión de secuencia (ADN SC).

30 En otro aspecto, la divulgación se refiere a otro oligonucleótido más, que en el presente documento puede estar referenciado como "segundo ADN 2 amplificador de señal en cascada" (o "ADN cSA 2"), que comprende, en la dirección 5' a 3', una tercera secuencia de generación de ADN señal único (G), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (H) y una secuencia que es homóloga a una secuencia de generación de ADN señal (D) de un primer ADN 1 amplificador de señal en cascada de (ADN cSA 1).

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

40 En algunas realizaciones, los sitios de reconocimiento de endonucleasa (B), (E) y (H) comprenden una secuencia que es complementaria a una secuencia que se corta por una endonucleasa. En otras realizaciones, la secuencia cortada por la endonucleasa está adyacente (corriente abajo o corriente arriba) a la secuencia que es específicamente reconocida por la endonucleasa.

45 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 5' a 3', una primera secuencia de generación de ADN señal único (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana; un segundo oligonucleótido (ADN 1 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 1) que comprende, en la dirección 5' a 3', una segunda secuencia de generación de ADN señal único (D), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) y una secuencia (F) que es homóloga a la primera secuencia de generación de ADN señal (A) del primer oligonucleótido ADN SC; un tercer oligonucleótido (ADN 2 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 2) que comprende, en la dirección 5' a 3', una tercera secuencia de generación de ADN señal único (G), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (H) y una secuencia (I) que es homóloga a la segunda secuencia de generación de ADN señal (D) del segundo oligonucleótido ADN 1 cSA; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte. En realizaciones de este aspecto, las composiciones se usan en métodos para determinar la presencia o ausencia de un ADN señal, en donde la presencia del ADN señal indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

60 Las composiciones también pueden comprender una polimerasa y/o una endonucleasa capaz de cortar en o en posiciones adyacentes a los sitios de reconocimiento de endonucleasa (sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) del ADN SC, sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) del primer ADN cSA 1 y sitio de reconocimiento de endonucleasa (H) del segundo ADN cSA 2), cuando los sitios de reconocimiento de endonucleasa son bicatenarios. Las composiciones también pueden incluir otros reactivos tales como tampones de reacción, desoxirribonucleótidos y moléculas marcadoras tales como, por ejemplo, sondas de ADN modificadas con un fluoróforo (por ejemplo,

sondas de baliza molecular) para la detección fluorescente de ADN recién sintetizado.

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 5' a 3', una primera secuencia de generación de ADN señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana; un segundo oligonucleótido (ADN 1 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 1) que comprende, en la dirección 5' a 3', una segunda secuencia de generación de ADN señal único (D), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) y una secuencia (F) que es homóloga a la primera secuencia de generación de ADN señal (A) del primer oligonucleótido ADN SC; y un tercer oligonucleótido (ADN 2 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 2) que comprende, en la dirección 5' a 3', una tercera secuencia de generación de ADN señal único (G), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (H) y una secuencia (I) que es homóloga a la segunda secuencia de generación de ADN señal (D) del segundo oligonucleótido ADN cSA 1. En algunas realizaciones, los kit pueden comprender además una polimerasa y/o una endonucleasa capaz de cortar un sitio de reconocimiento de la endonucleasa o un sitio adyacente a un sitio de reconocimiento de la endonucleasa. Los kit también pueden incluir reactivos tales como tampones de reacción, desoxirribonucleótidos y moléculas marcadoras tales como, por ejemplo, sondas de ADN modificadas con un fluoróforo (por ejemplo, sondas de baliza molecular) para la detección fluorescente de ADN recién sintetizado tal como un ADN señal. Los kit también pueden comprender instrucciones de uso en la práctica de cualquiera de los métodos divulgados en el presente documento.

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

Los métodos, oligonucleótidos, composiciones y kit divulgados en el presente documento pueden utilizarse en el campo de los diagnósticos moleculares, incluyendo el diagnóstico de enfermedades no infecciosas y de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, los métodos, las composiciones y los kits de la presente invención pueden usarse para detectar cánceres y otras enfermedades genéticas. De forma similar, los métodos, composiciones y kit de la presente invención pueden utilizarse para detectar ácidos nucleicos diana originarios de enfermedades infecciosas tales como, por ejemplo, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, virus de la gripe A, virus de la gripe B o virus sincitial respiratorio.

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

Breve descripción de los dibujos

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

La figura 1B es un diagrama que ilustra esquemáticamente un ejemplo no limitativo de un primer ADN 1 amplificador de señal en cascada (ADN cSA 1) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra. El ADN cSA 1 comprende, en la dirección 5' a 3', una segunda secuencia de generación de ADN señal único (D); un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) y una secuencia (F) que es homóloga a la primera secuencia de generación de ADN señal (A) de un primer ADN SC.

La figura 1B es un diagrama que ilustra esquemáticamente un ejemplo no limitativo de un ADN 2 amplificador de señal (ADN cSA 2) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra. El ADN cSA 2 comprende, en la dirección 5' a 3', una tercera secuencia de generación de ADN señal (G); un sitio de reconocimiento de endonucleasa (H), y una secuencia (I) que es homóloga a la segunda secuencia de generación de ADN señal (D) de un primer ADN cSA 1.

La figura 2A es un diagrama que ilustra esquemáticamente la progresión de una reacción ejemplar de un ácido nucleico diana (T) con un ADN de conversión de secuencia (ADN SC) para la detección de un ácido nucleico

diana en una muestra. Las secuencias (A)-(C) 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) ligada a la secuencia (C) es ampliada por la polimerasa, la secuencia (X') representa la secuencia de extensión cortada, y la secuencia (S1) representa la primera secuencia de ADN señal finalmente producida tras la unión del ácido nucleico diana (T) al ADN SC.

La figura 2B es un diagrama que ilustra esquemáticamente la progresión de una reacción ejemplar de un ADN señal (S1) con un primer ADN 1 de amplificación de señal en cascada (ADN cSA 1) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra. Las secuencias (D)-(F) son como se describen en la figura 1B, la secuencia (S1) es el ADN señal producido por la reacción del ácido nucleico diana (T) con el ADN SC como se describe en la figura 2A, la secuencia (Y) representa la secuencia producida cuando el ADN señal (S1) unido a la secuencia (D) se extiende por la polimerasa, la secuencia (Y') representa la secuencia de la extensión cortada, y la secuencia (S2) representa la secuencia de ADN señal producida finalmente. Debido a que la secuencia de generación de señal de ADN cSA 1 (D) no es homóloga a la secuencia de generación de señal de SC (A), se produce un único ADN señal (S2) diferente.

La figura 2C es un diagrama que ilustra esquemáticamente la progresión de una reacción ejemplar de un ADN señal (S2) con un segundo ADN 2 amplificador de señal en cascada (ADN cSA 2) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra. Las secuencias (G)-(I) son como se describen en la Figura 1C, la secuencia de señal (S2) es el ADN señal producido como se describe en la Figura 2B, la secuencia (U) representa la secuencia producida cuando el ADN señal (S2) unido a la secuencia (I) se extiende por la polimerasa, la secuencia (U') representa la secuencia de extensión cortada, y la secuencia (S3) representa la secuencia de ADN señal único producida finalmente. Debido a que la secuencia de generación de señal de ADN cSA 2 (G) no es homóloga a la secuencia de generación de señal de cSA (D), se produce un único ADN señal (S3) diferente.

Descripción detallada

En un sentido general, la divulgación se refiere a constructos de ácidos nucleicos que son sorprendentemente efectivos en la detección de ácidos nucleicos diana en una muestra de ensayo. Los constructos desvelados en el presente documento comprenden secuencias de ácidos nucleicos que permiten la producción de unos ADN señal que se generan en presencia de un ácido nucleico diana. Los métodos y constructos de ácidos nucleicos desvelados en el presente documento proporcionan una detección selectiva y sensible de los ácidos nucleicos diana que puede realizarse ventajosamente en condiciones isotérmicas y de baja temperatura.

En realizaciones de este aspecto, la divulgación proporciona nuevos constructos de oligonucleótidos de conversión de secuencia (SC) y amplificadores de señal en cascada (SA), y combinaciones de los mismos, que son útiles para detectar un ácido nucleico diana en una muestra. Como se representa en la realización ilustrativa de la figura 1A, un oligonucleótido de ADN de conversión de secuencia (ADN SC) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra comprende, en la dirección 5' a 3', una primera secuencia de generación de señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) que se puede usar en una reacción de corte, y una secuencia (C) complementaria al ácido nucleico diana.

Como se representa en la realización ilustrativa de la figura 1B, un primer ADN amplificador de señal en cascada (ADN cSA 1) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra comprende, en la dirección 5' a 3', una segunda secuencia de generación de ADN señal único (D); un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) y una secuencia (F) que es homóloga a la primera secuencia de generación de ADN señal (A) de un primer ADN SC.

Como se representa en la realización ilustrativa de la figura 1C, un ADN 2 amplificador de señal en cascada (ADN cSA 2) para la detección de un ácido nucleico diana en una muestra comprende, en la dirección 5' a 3', una tercera secuencia de generación de ADN señal único (G); un sitio de reconocimiento de endonucleasa (H), y una secuencia (I) que es homóloga a la segunda secuencia de generación de ADN señal (D) de un primer ADN cSA 1.

Como se ilustra en la figura 1A, los ADN SC desvelados en el presente documento comprenden una primera secuencia de generación de señal (A). La secuencia de generación de señal (A) en el ADN SC puede comprender cualquier secuencia de ácido nucleico deseada y no está limitada por ninguna secuencia en particular. Como se analiza en más detalle a continuación, la secuencia de generación de señal (A) proporciona al menos una parte del molde para un primer ADN señal (S1). La secuencia de generación de señal (A) en el ADN SC, no está limitada por la longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de generación de señal (A) en el ADN SC es de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 100. En algunas realizaciones, la secuencia de generación de señal (A) en el ADN SC es de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 30. En algunas realizaciones, la secuencia de generación de señal (A) en el ADN SC es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 10 y 30. En otras realizaciones adicionales, la secuencia de generación de señal (A) en el ADN SC es de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 15 y 30 (por ejemplo., aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23,

aproximadamente 24, aproximadamente 25, aproximadamente 26, aproximadamente 27, aproximadamente 28, aproximadamente 29 o aproximadamente 30 bases).

5 El ADN SC y los ADN cSA 1 y 2 comprenden sitios de reconocimiento de endonucleasa (B), (E) y (H) respectivamente, que pueden ser iguales o diferentes. En forma monocatenaria (por ejemplo, la estructura de las figuras 1A, 1B y 1C), los sitios de reconocimiento de endonucleasa (B), (E) y (H) pueden comprender una secuencia que es complementaria a una secuencia que puede cortarse por una endonucleasa. La secuencia que es cortada por la endonucleasa puede estar dentro, corriente abajo o corriente arriba de la secuencia reconocida por la endonucleasa. De manera adecuada, cuando es bicatenaria, los sitios de reconocimiento de endonucleasa (B), (E) y (H) pueden ser reconocidos por una o más endonucleasas presentes en la reacción, y los sitios de reconocimiento de endonucleasas (B), (E) y (H) (o una secuencia adyacente a los sitios de reconocimiento de endonucleasa (B), (E) y (H)) pueden escindirse en una sola cadena del ADN bicatenario (es decir, cortarse).

15 Como se describe con mayor detalle a continuación, la unión de un ácido nucleico diana a la secuencia complementaria (C) del ADN SC ceba la replicación a través de la ADN polimerasa para crear una forma activa, bicatenaria del sitio de reconocimiento (B) de la endonucleasa que ahora puede servir como sitio de reconocimiento de una endonucleasa (figura 2A). El corte de la endonucleasa en el sitio de la endonucleasa bicatenario recién creado (B), o en un sitio adyacente al sitio de la endonucleasa bicatenario recién creado (B), ceba entonces la replicación a través de la ADN polimerasa y genera un primer ADN señal (S1) (véase, por ejemplo, la figura 2A).
20 Como se ilustra en la figura 2A, el sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) está orientado de tal manera que se corta la cadena recién replicada, no el ADN SC. Es decir, cuando se genera la cadena recién replicada, la orientación del sitio de reconocimiento de la endonucleasa en (B) dirige la actividad de la endonucleasa (escisión) de la cadena recién replicada. Por lo tanto, el sitio de reconocimiento de endonucleasa comprende una secuencia complementaria a una secuencia cortada por una endonucleasa, permitiendo que el oligonucleótido SC permanezca intacto a lo largo de la reacción (es decir, que el ADN SC no se corte ni se escinda).

30 Como se describe con mayor detalle a continuación, la unión de un primer ADN señal (S1), generado a partir de la secuencia de generación de señal (A) de un ADN SC, a la secuencia (F) de un ADN cSA 1 ceba la replicación a través de la ADN polimerasa para crear una forma bicatenaria activa del sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) del ADN cSA 1 que puede servir como sitio de reconocimiento para una endonucleasa (figura 2B). La endonucleasa que corta en el sitio de endonucleasa bicatenario recién creado (E) del ADN cSA 1, o en un sitio adyacente al sitio de endonucleasa bicatenario recién creado (E), después ceba la replicación a través de la ADN polimerasa y genera un segundo ADN señal (S2) que es diferente del primer ADN señal (S1) generado a partir del ADN SC (figura 2B). Como se ilustra en la figura 2B, el sitio de reconocimiento de la endonucleasa (E) está orientado de tal manera que la cadena recién replicada se corte, no el ADN cSA 1. Es decir, cuando se genera la cadena recién replicada, la orientación del sitio de reconocimiento de la endonucleasa en E dirige la actividad de la endonucleasa (escisión) de la cadena recién replicada. Por lo tanto, el sitio de reconocimiento de endonucleasa comprende una secuencia complementaria a una secuencia cortada por una endonucleasa, permitiendo que el oligonucleótido ADN cSA 1 permanezca intacto durante toda la reacción (es decir, que el ADN cSA 1 no se corte ni se escinda).

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

50 Las secuencias complementarias son capaces de formar interacciones de puente de hidrógeno para formar una estructura de ácido nucleico bicatenaria (por ejemplo, pares de bases de ácido nucleico). Por ejemplo, una secuencia que es complementaria a una primera secuencia incluye una secuencia que es capaz de formar pares de bases Watson-Crick con la primera secuencia. Como se usa en el presente documento, el término "complementario" no requiere que una secuencia sea complementaria a lo largo de toda su extensión a su cadena complementaria, y engloba una secuencia que es complementaria a una parte de otra secuencia. Así, en algunas realizaciones, una secuencia complementaria abarca secuencias que son complementarias en toda la longitud de la secuencia o en una parte de la misma (por ejemplo, superior a aproximadamente el 10 %), aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80%, o aproximadamente el 90% de la longitud de la secuencia).
60 Por ejemplo, dos secuencias pueden ser complementarias entre sí a lo largo de una longitud que oscila entre aproximadamente 2 y aproximadamente 100 nucleótidos consecutivos (contiguos), o cualquier número entero entre 2 y 100. En algunas realizaciones, dos secuencias pueden ser complementarias entre sí a lo largo de una longitud que oscila entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos consecutivos (contiguos), o cualquier número entero entre 15 y 30. Como se usa en el presente documento, las secuencias complementarias pueden englobar secuencias que tienen algunos emparejamientos erróneos en la secuencia. Por ejemplo, las secuencias complementarias pueden incluir secuencias que son complementarias a al menos de un 70 % a un 100 %,
65

preferentemente a más del 95 % de la longitud de la secuencia. A pesar de algunos emparejamientos erróneos, las secuencias complementarias generalmente tienen la capacidad de hibridar de manera selectiva entre sí en condiciones adecuadas tales como, por ejemplo, condiciones rigurosas y altamente rigurosas como las descritas en el presente documento o normalmente conocidas por los expertos en la materia.

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

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

En otro aspecto, la presente invención engloba métodos para detectar un ácido nucleico diana (T) en una muestra. Los métodos generalmente comprenden poner en contacto con dicha muestra: un primer oligonucleótido (ADN de conversión de secuencia o ADN SC) que comprende, en la dirección 5' a 3', una primera secuencia de generación de ADN señal (A), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (B) y una secuencia (C) complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana; un segundo oligonucleótido (ADN 1 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 1) que comprende, en la dirección 5' a 3', una segunda secuencia de generación de ADN señal único (D), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) y una secuencia (F) que es homóloga a la primera secuencia de generación de ADN señal (A) del primer oligonucleótido ADN SC; y un tercer oligonucleótido (ADN 2 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 2) que comprende, en la dirección 5' a 3', una tercera secuencia de generación de ADN señal único (G), un sitio de reconocimiento de endonucleasa (H) y una secuencia (I) que es homóloga a la segunda secuencia de generación de ADN señal (D) del segundo oligonucleótido ADN 1 cSA; una polimerasa; y al menos una endonucleasa para una reacción de corte. En realizaciones de este aspecto, el método también comprende determinar la presencia o ausencia de uno de los ADN señal, en donde 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, la secuencia complementaria al sitio de reconocimiento de endonucleasa (E) dentro del primer ADN cSA 1, y la secuencia complementaria al sitio de reconocimiento de endonucleasa (H) dentro del segundo ADN cSA 2. En algunas realizaciones, la endonucleasa comprende una endonucleasa de corte o una endonucleasa de restricción que puede catalizar o puede utilizarse para catalizar una reacción de corte de ADN bicatenario. En realizaciones que proporcionan una endonucleasa de corte, el enlace fosfodiéster de una cadena de un ADN bicatenario puede escindirse para generar un grupo fosfato en el sitio 5' del sitio de escisión y un grupo hidroxilo en el sitio 3'. Los ejemplos no limitantes de endonucleasas de corte incluyen Nb.BbvCI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI, Nb.BsmI, Nt.CviPII y Nt.BsmAI.

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

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

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

En las figuras 2A, 2B y 2C se ilustra una realización no limitativa de los métodos desvelados en el presente documento. En resumen, como se ilustra en la figura 2A, se pone en contacto una muestra con ADN SC en presencia de una ADN polimerasa y una endonucleasa capaz de cortar la forma bicatenaria (es decir, la secuencia complementaria) del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B), o un sitio adyacente a la forma bicatenaria del sitio de reconocimiento de la endonucleasa (B). Si un ácido nucleico diana (T) está presente en la muestra, la secuencia del extremo 3' del ácido nucleico diana (T) se hibrida con la secuencia (C) del ADN SC que es complementaria a la diana y ceba o inicia la replicación (por la ADN polimerasa presente en la mezcla de reacción) generando así una secuencia de ampliación bicatenaria (X) que incluye el sitio de reconocimiento de la endonucleasa bicatenaria (B). El reconocimiento del sitio de reconocimiento bicatenario de la endonucleasa recién generada (B) (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), y el posterior corte de la cadena recién generada (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), genera un primer oligonucleótido de ADN señal 1 (S1) y una secuencia de extensión (X'). Como el 3'-OH de la secuencia (X') en el corte sirve como un sitio de iniciación para rondas posteriores de replicación de desplazamiento de cadena, el oligonucleótido (S1) se desplaza del ADN SC por la ADN polimerasa, que continúa replicando y amplificando el ADN 1 señal (S1) en la mezcla de reacción.

Como se ilustra más adelante en la figura 2B, el primer ADN señal (S1) producido por la interacción de un ácido nucleico diana (T) con un ADN SC puede convertirse en un segundo ADN señal 2 (S2) por la presencia de un primer ADN 1 amplificador de señal en cascada (o ADN cSA 1). En resumen, un primer ADN señal 1 (S1) presente en una reacción se hibrida con la secuencia (F) del primer ADN cSA 1 que ceba o inicia la replicación (por la ADN polimerasa presente en la mezcla de reacción) generando así una secuencia de extensión bicatenaria (Y) que incluye el sitio de reconocimiento de la endonucleasa bicatenario (E). El reconocimiento del sitio de reconocimiento bicatenario de la endonucleasa recién generada (E) (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), y el subsiguiente corte de la cadena recién generada (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), genera una secuencia señal de oligonucleótido (S2) diferente y la secuencia de extensión (Y'). Puesto que el 3'-OH de la secuencia (Y') en el corte sirve como un sitio de iniciación para rondas subsiguientes de replicación por desplazamiento de cadena, el oligonucleótido (S2) se desplaza del ADN cSA 1 por la ADN polimerasa, que continúa replicando y amplificando un segundo ADN señal 2 único (S2) en la mezcla de reacción.

Como se ilustra más adelante en la figura 2C, el segundo ADN señal (S2) producido por la interacción del primer ADN señal (S1) con un primer ADN SA en cascada (ADN cSA 1) puede convertirse en un tercer ADN señal 3 (S3) por la presencia de un segundo ADN 2 amplificador de señal en cascada (o ADN cSA 2). En resumen, un segundo ADN señal 2 (S2) presente en una reacción se hibrida con la secuencia (I) del segundo ADN cSA 2 que ceba o inicia la replicación (por la ADN polimerasa presente en la mezcla de reacción) generando así una secuencia de extensión bicatenaria (U) que incluye el sitio de reconocimiento de la endonucleasa bicatenario (H). El reconocimiento del sitio de reconocimiento bicatenario de la endonucleasa recién generado (H) (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), y el subsiguiente corte de la cadena recién generada (por la endonucleasa presente en la mezcla de reacción), genera una secuencia señal de oligonucleótido diferente (S3) y una secuencia de extensión (U'). Como el 3'-OH de la secuencia (U') en el corte sirve como un sitio de iniciación para rondas posteriores de replicación de desplazamiento de cadena, el oligonucleótido (S3) se desplaza del ADN cSA 2 por la ADN polimerasa, que continúa replicando y amplificando un tercer ADN señal 3 único (S3) en la mezcla de reacción.

En algunas realizaciones, la relación de ADN señal (S2)/ADN diana es de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000, de aproximadamente 100 a aproximadamente 800, de aproximadamente 100 a aproximadamente 600, de aproximadamente 100 a aproximadamente 400, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 200. En otras realizaciones, la relación de ADN señal (S3)/ADN diana es de aproximadamente 1000 a aproximadamente 10000, de aproximadamente 1000 a aproximadamente 8000, de aproximadamente 1000 a aproximadamente 6000, de aproximadamente 1000 a aproximadamente 4000, o de aproximadamente 1000 a aproximadamente 2000.

Los métodos de acuerdo con la invención pueden realizarse en condiciones de temperatura isotérmicas o sustancialmente constantes. En realizaciones que se relacionan con realizar el método a una temperatura sustancialmente constante, se permite alguna fluctuación de la temperatura. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una temperatura sustancialmente constante puede fluctuar dentro de un intervalo de temperatura diana deseado o determinado (por ejemplo, aproximadamente de +/- 2 °C o aproximadamente de +/- 5 °C). En realizaciones, una temperatura sustancialmente constante puede incluir temperaturas que no incluyan ciclos térmicos. En algunas

- realizaciones, los métodos pueden realizarse a temperaturas isotérmicas o sustancialmente constantes, tales como, por ejemplo, (1) temperaturas iguales o inferiores a aproximadamente la temperatura óptima de hibridación o anillado calculada/prevista o determinada experimentalmente para el ácido nucleico diana (T) para la secuencia (C) del ADN SC; (2) temperaturas iguales o inferiores a la temperatura de fusión del ácido nucleico diana (T) unido al ADN SC (normalmente, las temperaturas de hibridación o anillado son ligeramente inferiores a la temperatura de fusión); (3) temperaturas iguales o inferiores a la temperatura de fusión de un ADN señal (S) unido a un ADN cSA; o (4) temperaturas iguales o aproximadas a la temperatura de reacción óptima calculada/prevista o determinada experimentalmente para la polimerasa y/o endonucleasa presente en la mezcla de reacción.
- Los métodos pueden comprender temperaturas de reacción que oscilan entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 70 °C, incluyendo temperaturas más bajas que están dentro del intervalo de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 42 °C. En algunas realizaciones, el intervalo de temperatura de reacción es de 35 °C a 40 °C (por ejemplo, 35 °C), 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C o 40 °C). En otras realizaciones, la temperatura de reacción está por debajo de 65 °C, incluyendo temperaturas más bajas, por debajo de aproximadamente 55 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 40 °C o aproximadamente 30 °C. En otras realizaciones, las temperaturas de reacción pueden ser de aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 26 °C, aproximadamente 27 °C, aproximadamente 28 °C, aproximadamente 29 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 31 °C, aproximadamente 32 °C, aproximadamente 33 °C, aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C, aproximadamente 39 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 41 °C, aproximadamente 42 °C, aproximadamente 43 °C, aproximadamente 44 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 46 °C, aproximadamente 47 °C, aproximadamente 48 °C, aproximadamente 49 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 51 °C, aproximadamente 52 °C, aproximadamente 53 °C, aproximadamente 54 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 56 °C, aproximadamente 57 °C, aproximadamente 58 °C, aproximadamente 59 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 61 °C, aproximadamente 62 °C, aproximadamente 63 °C, aproximadamente 64 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 66 °C, aproximadamente 67 °C, aproximadamente 68 °C, aproximadamente 69 °C o aproximadamente 70 °C.
- Los métodos pueden realizarse durante un tiempo que es adecuado para permitir la amplificación de una cantidad detectable de secuencia señal en presencia de un ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, el tiempo de reacción puede variar de aproximadamente 5 minutos a 16 horas, o de aproximadamente 3 minutos a 16 horas. En otras realizaciones, el tiempo de reacción puede variar de aproximadamente 5 a 120 minutos o de aproximadamente 15 a 60 minutos.
- Debido a que los diversos ADN señal (S1), (S2) y (S3) se generan solo en presencia del ácido nucleico diana (T), los métodos de acuerdo con la presente invención detectan la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana (T) en una muestra detectando la presencia o ausencia de cualquier ADN señal. Los ADN señal (S1), (S2) y (S3) son diferentes, y no están limitados por la secuencia, y pueden ser cualquier secuencia que sea susceptible de detección. Los ADN señal (S1), (S2) y (S3) tampoco están limitados por la longitud. Preferentemente, los ADN señal (S1), (S2) y (S3) pueden ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 bases, y cualquier número entero entre 5 y 100. En algunas realizaciones, los ADN señal (S1), (S2) y (S3) pueden ser de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 bases de ácido nucleico, y todos los números enteros entre 5 y 30. En algunas realizaciones, los ADN señal (S1), (S2) y (S3) pueden ser de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 bases de longitud y todos los números enteros entre 10 y 30. En otras realizaciones adicionales, los ADN señal (S1), (S2) y (S3) pueden ser de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 bases de longitud y todos los números enteros entre 15 y 30.
- Los métodos de acuerdo con la divulgación pueden realizarse en condiciones tamponadas que comprenden un intervalo de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 9. El tampón puede comprender una concentración de sal de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM, o de aproximadamente 50 mM a 150 mM. En algunas realizaciones, el método puede realizarse utilizando una cantidad de ADN SC y/o cSA 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 cSA puede oscilar de aproximadamente 100 pM a aproximadamente 100 µM, de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 150 µM, de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 50 nM, o de aproximadamente 5 nM a aproximadamente 25 nM.
- La presencia de cualquier ADN señal (S1), (S2) y/o (S3) puede detectarse por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse electroforesis en gel y tinción con bromuro de etidio. También, la presencia de cualquier ADN señal (S1), (S2) y/o (S3) se puede detectar utilizando polarización de fluorescencia, inmunoensayo, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, etiquetado enzimático (tal como peroxidasa o fosfatasa alcalina), etiquetado fluorescente (tal como fluoresceína o rodamina), quimioluminiscencia, bioluminiscencia, resonancia de plasmón superficial (SPR), o una sonda de ADN modificada con un fluoróforo (por ejemplo, la sonda TaqMan). El producto de amplificación también puede detectarse usando un nucleótido marcado con biotina, por ejemplo. En un caso como este, puede detectarse la biotina en el producto de amplificación usando por ejemplo, avidina marcada con fluorescencia o avidina marcada con enzimas. El producto de amplificación también puede detectarse con electrodos utilizando un intercalante redox conocido por los expertos en la materia. El producto de

amplificación también puede detectarse usando resonancia de plasmón superficial (SPR), un Quarts Crystal Microbalance (QCM), o métodos electroquímicos (incluidos aquellos métodos que emplean sensores de nanoporos).

Los métodos de acuerdo con la presente invención detectan la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana (T) en una muestra. Los métodos de acuerdo con la presente invención también pueden utilizarse para medir cuantitativamente la concentración de un ácido nucleico diana en una muestra de ensayo. Por ejemplo, los métodos de acuerdo con la presente divulgación pueden realizarse en presencia de un intervalo de diferentes concentraciones conocidas del ácido nucleico diana, y las curvas de calibración pueden prepararse y utilizarse como generalmente se practica en la técnica.

El ácido nucleico diana (T) en la figura 2A) puede comprender cualquier secuencia de ácido nucleico y puede incluir ADN, ARN, ácidos nucleicos modificados químicamente, ácidos nucleicos no naturales, análogos de ácidos nucleicos, o cualquier híbrido o combinación de los mismos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, El ADN puede incluir ADNc, ADN genómico y ADN sintético y el ARN puede incluir ARN total, ARNm, ARNr, ARNip, ARNnh, ARNpi, ARNa, miARN y ARN sintético. Mientras que algunas realizaciones se refieren a secuencias concretas del ácido nucleico diana, cualquier secuencia de ácido nucleico, incluyendo la secuencia de ácido nucleico auxiliar, puede ser una secuencia de ácido nucleico diana a detectar. La divulgación permite la detección de un ácido nucleico diana con selectividad y sensibilidad incluso cuando el ácido nucleico es un ácido nucleico de cadena corta. Por consiguiente, el grado de complementariedad entre las secuencias (C) del ADN SC y del ácido nucleico diana (T) permite una hibridación específica entre las secuencias (por ejemplo, el número de nucleótidos complementarios en la secuencia (C) de las secuencias de ADN de conversión y en el ácido nucleico diana (T) evita la hibridación inespecífica conforme a una serie determinada de condiciones de reacción).

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

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

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

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

Los métodos de acuerdo con la presente invención también pueden acoplarse con plataformas de diagnóstico

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

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

Los métodos y estructuras de ácido nucleico proporcionados en el presente documento pueden utilizarse en combinación con otros métodos para proporcionar la amplificación exponencial de un ADN señal en presencia de un ácido nucleico diana. Por ejemplo, los métodos y composiciones de acuerdo con la presente información pueden utilizarse en combinación con ADN de conversión de secuencias cubiertas, como se describe en la solicitud de los Estados Unidos WO-A-2015/114469 publicada el 06.08.2015. Los métodos y composiciones de acuerdo con la presente divulgación también pueden usarse en combinación con ADN amplificador de señal y de conversión de secuencia modificados químicamente, como se describe en las solicitudes de los Estados Unidos WO-A-2016/059473 y WO-A-2016/059474, ambas publicadas el 21.04.2016.

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

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

EJEMPLO 1

Se realizó una reacción de amplificación de ADN señal en cascada de dos pasos para detectar un ácido nucleico diana en una muestra. La reacción en dos pasos se realizó usando un ADN SC que tenía la secuencia 5'-TGATAGCCCTGTACAATGCCTCAGCTTGACAGGGCTATCACTGTTCTGCTG AA-idT-idT -3' (SEQ ID NO.:1;) en combinación con ADN cSA 2 que tenía la secuencia 5'-ACTGCCCTAAGTGCTCCTCCTCAGCAGGAGCACTTAGGGCAGTTGATAGCCCT GTACAATG-idT-idT -3' (SEQ ID NO.:2;). Se utilizaron ADN de partículas u. (SEQ ID NO.: 3) y ADN conjugado (SEQ ID NO.: 4) para detectar la producción de un segundo ADN señal (S2) a partir del ADN cSA 1 (SEC ID NO.:6;).

Las reacciones se realizaron a 37 °C en un volumen de reacción de 120 µl que contenía el 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, Tween 20 al 0,1%, pH 7,9. La endonucleasa de corte utilizada en todas las reacciones fue Nb.BbvCI, que estaba presente a una concentración de 0,1 unidades/µl. La polimerasa utilizada en todas las reacciones fue el fragmento grande de la ADN polimerasa de Bst, que estaba presente a una concentración de 0,08 unidades/µl. Los dNTP estaban presentes en una concentración final de 100 µM cada uno. Los ADN SC y cSA 1 estaban presentes en la reacción a una concentración final de 1,4 nM y 4,2 nM, respectivamente. Las mediciones quimioluminiscentes se realizaron usando ARCHITECT.

El ácido nucleico diana, que era la misma secuencia de ADN que hsa-miR-24 humano (SEQ ID NO.: 5), estuvo presente en concentraciones de 0,5 pM, 1 pM, 5 pM y 10 pM. Tal como se muestra en la Tabla 1, la relación de ADN señal (S2)/ADN diana era de aproximadamente 240 a aproximadamente 300.

TABLA 1

[ADN diana] pM	[ADN señal 2] pM	[ADN señal 2]/[ADN diana]
0,5	132	264
1,0	245	245

(continuación)

[ADN diana] pM	[ADN señal 2] pM	[ADN señal 2]/[ADN diana]
5,0	1329	266
10	2912	291

EJEMPLO 2

- 5 Se realizó una reacción de amplificación de ADN señal en cascada de tres pasos para detectar un ácido nucleico diana en una muestra. El método en cascada de tres pasos incluyó poner en contacto una muestra que tiene un ácido nucleico diana con: un ADN de conversión de secuencia (ADN SC) que comprende, en la dirección 5' a 3', una primera secuencia de generación de ADN señal, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una secuencia complementaria al extremo 3' de un ácido nucleico diana; un primer ADN 1 amplificador de señal en cascada (ADN cSA 1) que comprende, en la dirección 5' a 3', una segunda secuencia de generación de ADN señal único, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una secuencia que era homóloga a la primera secuencia de generación de ADN señal del oligonucleótido de ADN SC; un segundo ADN 2 amplificador de señal en cascada (ADN cSA 2) que comprende, en la dirección 5' a 3', una tercera secuencia de generación de ADN señal único, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una secuencia que era homóloga a la segunda secuencia de generación de ADN señal del primer ADN cSA 1; una polimerasa; y una endonucleasa para una reacción de corte.

La reacción de tres pasos se realizó usando un ADN SC que tenía la secuencia 5'-GCGATGATGATCCTCAGCGGATCATCATCGCCTGTTCTGCTGAACTGAGCCA idT -3' (SEQ ID NO.:7); en combinación con un primer ADN cSA 1, que tenía la secuencia 5'-TGATAGCCCTGTACAATGCCTCAGCTTGTACAGGGCTATCAGCGATGATGATC CTCA-idT -3' (SEQ ID NO.:8); y un segundo ADN cSA 2, que tenía la secuencia 5'-ACTGCCCTAAGTGCTCCTCCTCAGCAGGAGCACTTAGGGCAGTTGATAGCCCT GTACAATG-idT-idT -3' (SEQ ID NO.:2);. Se utilizaron ADN de partículas u. (SEQ ID NO.: 3) y ADN conjugado (SEQ ID NO.: 4) para detectar la producción de un tercer ADN señal (S3) a partir del ADN cSA 2 (SEC ID NO.:6).

Las reacciones se realizaron a 37 °C en un volumen de reacción de 120 µl que contenía el 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, Tween 20 al 0,1%, pH 7,9. La endonucleasa de corte utilizada en todas las reacciones fue Nb.BbvCI, que estaba presente a una concentración de 0,1 unidades/µl. La polimerasa utilizada en todas las reacciones fue el fragmento grande de la ADN polimerasa de Bst, que estaba presente a una concentración de 0,08 unidades/µl. Los dNTP estaban presentes en una concentración final de 200 µM cada uno. El ADN SC, el ADN cSA 1 y el ADN cSA 2 estaban presentes en la reacción a una concentración final de 1,4 nM, 4,2 nM y 4,2 nM respectivamente. Las mediciones de quimioluminiscentes se realizaron usando ARCHITECT.

- 35 El ácido nucleico diana, que era la misma secuencia de ADN que hsa-miR-24 humano (SEQ ID NO.: 5), estuvo presente en concentraciones de 0,025 pM, 0,05 pM, 0,1 pM, 0,2 pM, 0,5 pM y 1 pM. Tal como se muestra en la Tabla 2, la relación de ADN señal (S3)/ADN diana era de aproximadamente 4.500 a aproximadamente 7.000.

TABLA 2

[ADN diana] pM	[ADN señal 3] pM	[ADN señal 3]/[ADN diana]
0,025	119	4751
0,05	264	5287
0,1	597	5973
0,2	1132	5659
0,5	3217	6434
1,0	6735	6735

40

EJEMPLO 3

- Como se analiza en el presente documento, ciertos aspectos y realizaciones de la divulgación proporcionan un método de amplificación de bucle para detectar un ácido nucleico diana en una muestra. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana interactúa con un primer oligonucleótido (ADN de conversión de secuencia o ADN SC) para producir un primer ADN señal (S1) que, a su vez, interactúa con un segundo oligonucleótido (ADN 1 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 1) para producir un segundo ADN señal (S2) diferente de S1 que, a su vez, interactúa con un tercer oligonucleótido (ADN 2 amplificador de señal en cascada o ADN cSA 2) para producir ADN señal (S1), que es el mismo ADN señal (S1) generado al interactuar el ácido nucleico diana con el primer oligonucleótido o ADN SC. En esta realización, el ADN señal amplificado (S2) se convierte en ADN señal (S1) tras la interacción con un ADN amplificador de señal en cascada ADN cSA 2, permitiendo la amplificación cíclica del ADN señal (S1).

Para proporcionar un ejemplo ilustrativo del método de amplificación de bucle descrito anteriormente, se mezclaron

una polimerasa, una endonucleasa de corte y un ADN señal S1 a amplificar (ADN señal N.º 263 en la figura 3; SEQ ID NO: 9 que tiene la secuencia 5'-TGGAGAAGATACGCAAGA-3'), en presencia de tampón de reacción y dNTP, con 0,28 nM de un primer ADN cSA 1 (ADN convertidor N.º 265 en la figura 3; (SEQ ID NO.: 11) y 0,28 nM de un segundo ADN cSA 2 (ADN convertidor N.º 429 en la figura 3; (SEQ ID NO.: 12). Las reacciones se analizaron usando detección quimioluminiscente y el sistema ARCHITECT de Abbott.

Como se muestra en la figura 3, el primer ADN cSA 1 (ADN convertidor N.º 265 en la figura 3; SEQ ID NO.: 11) tiene una secuencia de reconocimiento para el ADN señal S1 (SEQ ID NO.: 9), cuya unión ceba la replicación y da como resultado la producción del ADN señal S2 (SEQ ID NO.: 10 que tiene la secuencia 5'-TTCTGCTATGTTGCTGCT-3'). El segundo ADN cSA 2 (ADN convertidor N.º 429 en la figura 3; SEQ ID NO.: 12) tiene una secuencia de reconocimiento para el ADN señal S2 (SEQ ID NO.: 10), cuya unión ceba la replicación y la posterior producción del ADN señal 1 (SEQ ID NO.: 9).

Como se ilustra en la figura 3, tanto el ADN cSA 1 (ADN convertidor N.º 265 en la figura 3; SEQ ID NO.: 11) como el ADN cSA 2 (ADN convertidor N.º 429 en la figura 3; SEQ ID NO.: 12) tenían secuencias de cobertura complementarias a sus respectivas secuencias de generación de señal (véanse, en general, por ejemplo, los documentos WO 2015/114469 o US PG PUB 2015/197823, titulado "Covered Sequence Conversion DNA and Detection Methods") (ADN de conversión de secuencia cubierto y métodos de detección). La relación de amplificación fue de aproximadamente 419. La S/N de la diana (0,01 pM/0 pM) fue de aproximadamente 2,0.

Si bien la aplicación se ha descrito con referencia a ciertos aspectos y realizaciones, los expertos en la materia entenderán que se pueden hacer cambios en la divulgación proporcionada en este documento, y se pueden sustituir equivalentes sin apartarse del alcance de la divulgación. Por consiguiente, la solicitud no debe limitarse a los aspectos y realizaciones particulares desvelados, sino que debe entenderse y apreciarse que incluye todos los aspectos y realizaciones que caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SEQUENCIAS

<110> Abbott Japan Co., Ltd. Komori, Makoto Yoshimura, Toru

<120> REACCIONES EN CASCADA DE ADN AMPLIFICADOR DE SEÑAL Y DE CONVERSIÓN DE SECUENCIA Y MÉTODOS DE DETECCIÓN USANDO EL MISMO

<130> 28296US02

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN de conversión de secuencia (DNA SC)

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(55)
<223> modificación del extremo 3': dos timidinas invertidas

<400> 1
tgatagccct gtacaatgcc tcagcttgta cagggtatc actgttctg ctgaa 55

<210> 2
<211> 61
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> ADN de amplificación de secuencia en cascada (ADN cSA 2)

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)

ES 2 791 280 T3

<223> modificación del extremo 3': dos timidinas invertidas

<400> 2

actgccctaa gtgctcctcc tcagcaggag cacttagggc agttgatagc cctgtacaat 60

g 61

5

<210> 3

<211> 13

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN de partículas u.

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> 3'-partícula u.

20

<400> 3

gtgctcctcc tca 13

<210> 4

<211> 10

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN conjugado

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> 5'-acridinio

35

<400> 4

actgccctaa 10

<210> 5

<211> 22

40 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN diana

45

<400> 5

tggctcagtt cagcaggaac ag 22

50

<210> 6

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> ADN señal

60

<400> 6

tgaggaggag cacttagggc agt 23

<210> 7

<211> 53

ES 2 791 280 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> ADN de conversión de secuencia (DNA SC)	
10	<220> <221> misc_feature <222> (53)..(53) <223> modificación del extremo 3': una timidina invertida	
	<400> 7 gcgatgatga tcctcagcgg atcatcatcg cctgttcctg ctgaactgag cca	53
15	<210> 8 <211> 57 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> ADN de amplificación de secuencia en cascada (ADN cSA 1)	
25	<220> <221> misc_feature <222> (57)..(57) <223> modificación del extremo 3': una timidina invertida	
30	<400> 8 tgatagccct gtacaatgcc tcagcttga cagggtatc agcgatgatg atcctca	57
35	<210> 9 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> ADN señal	
	<400> 9 tgaggtggag aagatagca aga	23
45	<210> 10 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> ADN señal	
	<400> 10 tgaggttctg ctatgtgct gct	23
55	<210> 11 <211> 61 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> ADN de amplificación de secuencia en cascada (ADN cSA)	
65	<220> <221> misc_feature <222> (61)..(61) <223> modificación del extremo 3': dos timidinas invertidas	
	<400> 11	

ES 2 791 280 T3

agcagcaaca tagcagaacc tcagcttctg ctatgttgct gcttctgcg tatctctcc a 61

<210> 12
<211> 61
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> ADN de amplificación de secuencia en cascada (ADN cSA)

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(61)
15 <223> modificación del extremo 3': dos timidinas invertidas

<400> 12
tcttgcgtat cttctccacc tcagctggag aagatagca agaagcagca acatagcaga a 61

REIVINDICACIONES

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

5 un ADN de conversión de secuencia que comprende, en la dirección 5' a 3', una primera secuencia de generación de ADN señal, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una secuencia complementaria al extremo 3' de dicho ácido nucleico diana, n ADN de amplificación de secuencia en cascada únicos, en donde uno de los n ADN de amplificación de secuencia en cascada únicos comprende, en la dirección 5' a 3', una segunda secuencia de generación de ADN señal, que es diferente de la primera secuencia de generación de señal, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una secuencia que es homóloga a la primera secuencia de generación de ADN señal del ADN de conversión de secuencia, en donde n es un número entero entre 1 y 10, una polimerasa y una endonucleasa para una reacción de corte, para formar una mezcla de reacción; mantener la mezcla de reacción en condiciones que permitan la unión del ácido nucleico diana al ADN de conversión de secuencia para cebar la replicación y generar un primer ADN señal; y detectar la presencia o ausencia de al menos un ADN señal generado por la secuencia de generación de señal de los n ADN de amplificación de secuencia en cascada únicos.

2. El método de la reivindicación 1, en donde al menos uno de los n ADN de amplificación de secuencia en cascada únicos es un ADN minicircular, y en donde un ADN señal se une a dicho ADN minicircular y ceba la amplificación de círculo rodante.

3. El método de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método dos ADN de amplificación de secuencia en cascada únicos en donde el segundo de los dos ADN de amplificación de secuencia en cascada únicos comprende, en la dirección 5' a 3', una tercera secuencia de generación de ADN señal, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una secuencia que es homóloga a la segunda secuencia de generación de ADN señal del primero de los n ADN de amplificación de secuencia en cascada únicos.

4. El método de la reivindicación 3, en donde dicho segundo de los dos ADN de amplificación de secuencia en cascada únicos es un ADN minicircular, y en donde un ADN señal se une a dicho ADN minicircular y ceba la amplificación en círculo rodante.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho método se realiza a una temperatura sustancialmente constante.

6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho método se realiza a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 42 °C.

7. Una composición para detectar un ácido nucleico diana en una muestra por el método de la reivindicación 1, comprendiendo dicha composición:

un primer oligonucleótido que comprende, en la dirección 5' a 3', una primera secuencia de generación de ADN señal, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una secuencia complementaria al extremo 3' de dicho ácido nucleico diana; y al menos uno y hasta diez ADN de amplificación de secuencia en cascada únicos en donde uno de los ADN de amplificación de secuencia en cascada únicos comprende, en la dirección 5' a 3', una segunda secuencia de generación de ADN señal, que es diferente de la primera secuencia de generación de señal, un sitio de reconocimiento de endonucleasa, y una secuencia que es homóloga a la primera secuencia de generación de ADN señal del primer oligonucleótido.

8. La composición de la reivindicación 7, que comprende además una polimerasa y una endonucleasa para una reacción de corte.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8, en donde dicha polimerasa tiene actividad de desplazamiento de cadena.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8, en donde dicha polimerasa es deficiente en actividad exonucleasa 3' a 5', deficiente en actividad exonucleasa 5' a 3', o en ambas.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición de la reivindicación 8, en donde dicha polimerasa comprende una ADN polimerasa seleccionada del grupo que consiste en fragmentos Klenow de ADN polimerasa I derivada de *E. coli*, ADN polimerasas de Bst deficientes en actividad exonucleasa 5' a 3' derivadas de *Bacillus stearothermophilus*, y ADN polimerasas de Bca deficientes en actividad exonucleasa 5' a 3' derivadas de

Bacillus caldotenax.

- 5 12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8, en donde dicha endonucleasa es una enzima seleccionada del grupo que consiste en Nb.BbvCI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI y Nt.BsmAI.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la composición de la reivindicación 8, en donde dicho ácido nucleico diana es un microARN.
- 10 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la composición de la reivindicación 8, en donde dicho ácido nucleico diana se origina a partir de un agente infeccioso.
- 15 15. Un kit para detectar un ácido nucleico diana en una muestra por el método de la reivindicación 1, comprendiendo dicho kit:
- 20 un primer oligonucleótido que comprende, en la dirección 5' a 3', una primera secuencia de generación de ADN señal, un sitio de reconocimiento de endonucleasa y una secuencia complementaria al extremo 3' de dicho ácido nucleico diana; y
al menos uno y hasta diez ADN de amplificación de secuencia en cascada únicos en donde uno de los ADN de amplificación de secuencia en cascada únicos comprende, en la dirección 5' a 3', una segunda secuencia de generación de ADN señal, que es diferente de la primera secuencia de generación de señal, un sitio de reconocimiento de endonucleasa, y una secuencia que es homóloga a la primera secuencia de generación de ADN señal del primer oligonucleótido.

FIGURA 1A

ADN de Conversión de Secuencia (ADN SC)

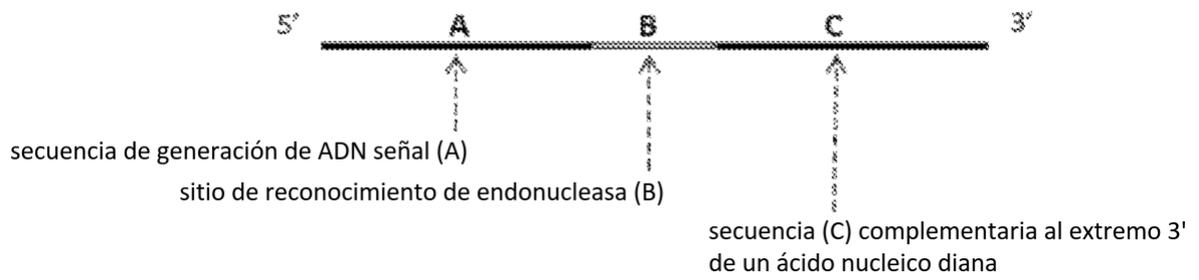


FIGURA 1B

ADN 1 Amplificador de Señal en Cascada (ADN cSA 1)

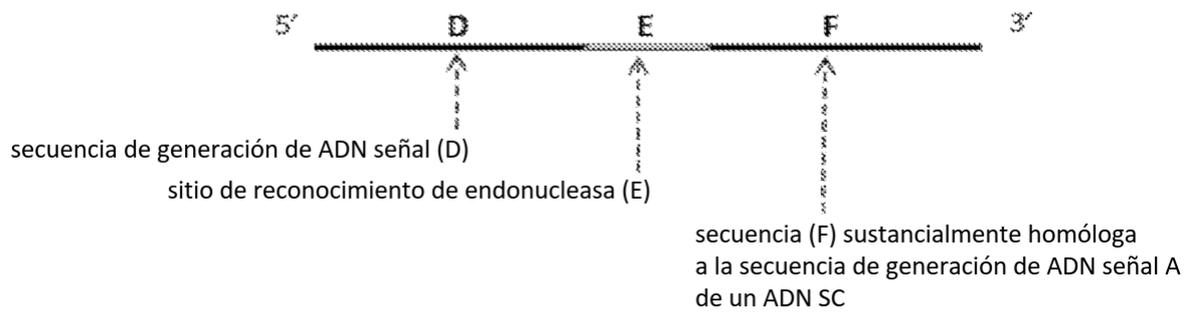


FIGURA 1C

ADN 2 Amplificador de Señal en Cascada (ADN cSA 2)

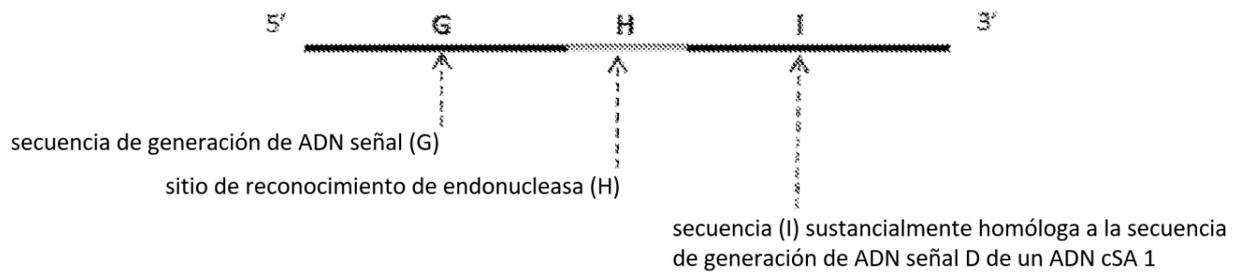


FIGURA 2A

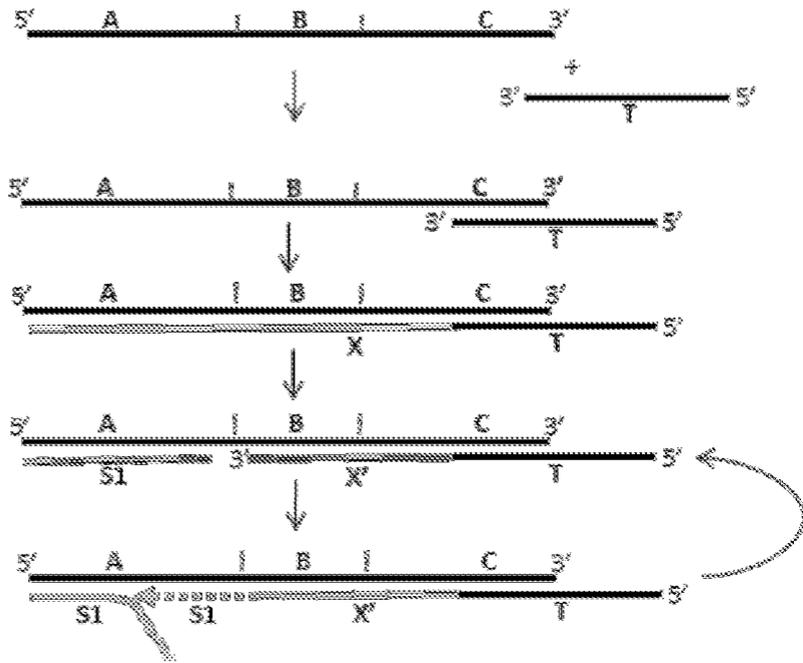
Unión de ADN diana a ADNsc y generación de ADN señal (S1)

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

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

Una endonucleasa crea una secuencia (X') con grupos 3'-OH libres y ADN señal (S1)

La replicación desde el extremo 3' de X' desplaza el ADN señal (S) y genera al mismo tiempo nuevo ADN señal (S1)



ADN señal (S1)



FIGURA 2B

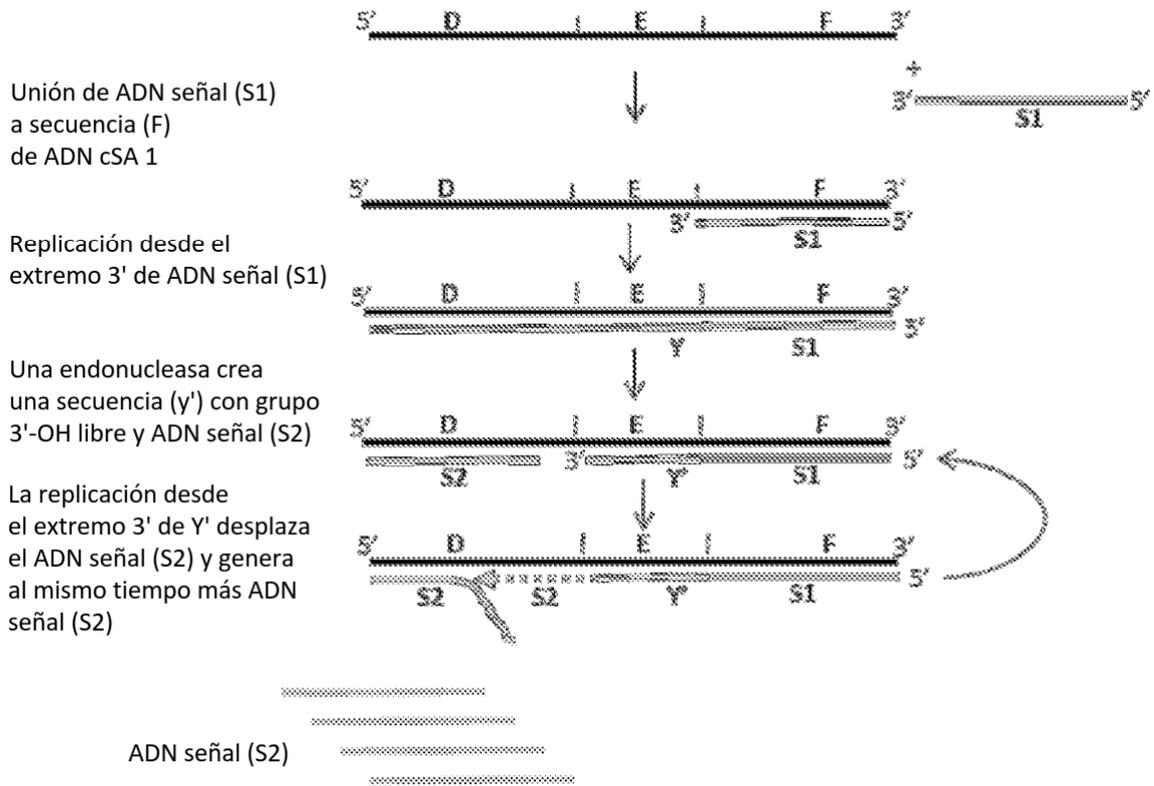


FIGURA 2C

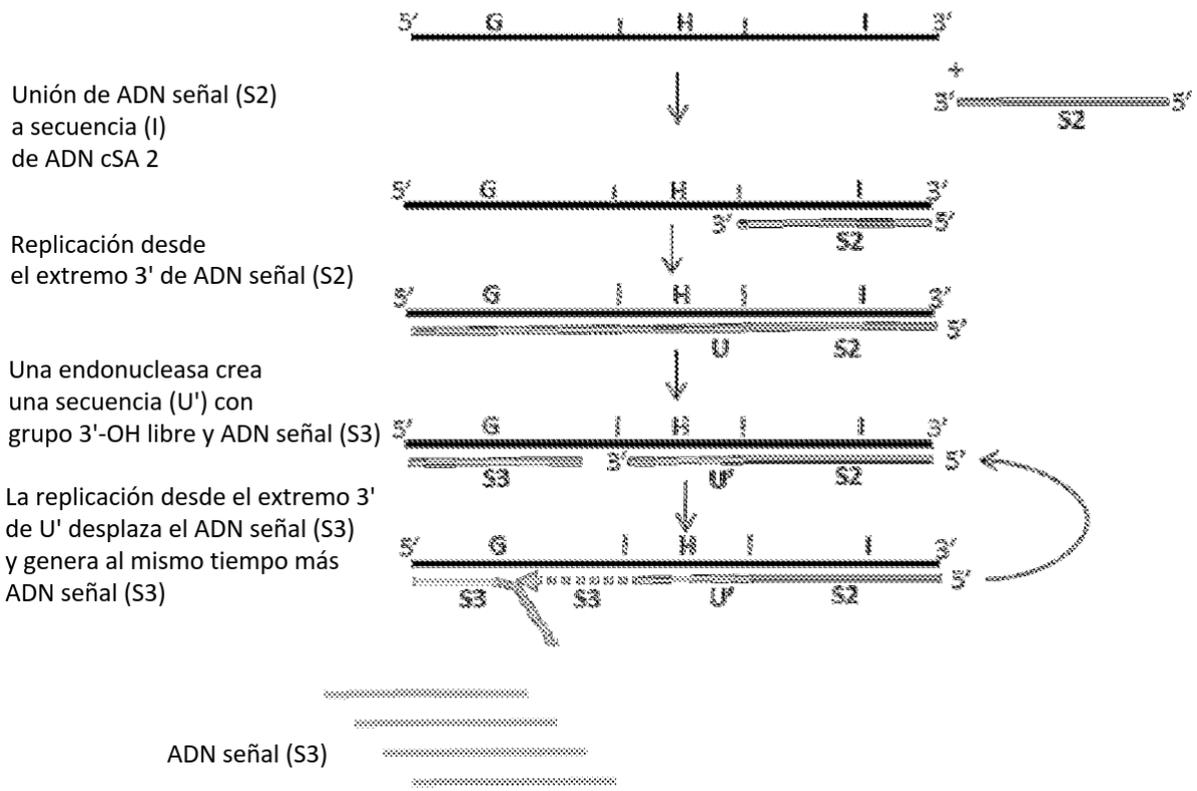
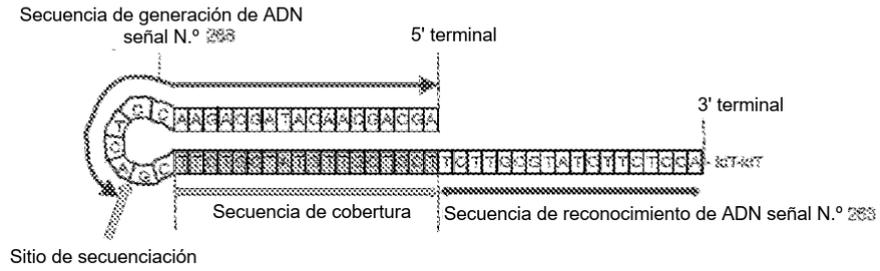


FIGURA 3

ADN Convertidor N.º 265



ADN Convertidor N.º 429

