República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020013158-0 A2

(22) Data do Depósito: 02/01/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 08/12/2020

(54) Título: MELHORAS NA OU EM RELAÇÃO À AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

(51) Int. Cl.: C12Q 1/6848.

(30) Prioridade Unionista: 04/01/2018 GB 1800109.9.

(71) Depositante(es): LUMIRADX UK LTD.

(72) Inventor(es): DAIWEI SHEN; BRYAN KRAYNACK; VICTOR PEREZ; JARROD PROVINS.

(86) Pedido PCT: PCT GB2019050005 de 02/01/2019

(87) Publicação PCT: WO 2019/135074 de 11/07/2019

(85) Data da Fase Nacional: 26/06/2020

(57) Resumo: A presente invenção refere-se a um método para realizar uma reação de amplificação de ácido nucleico não isotérmica, em que o método compreende as etapas de: (a) misturar uma sequência-alvo com um ou mais iniciadores de fita simples complementares em condições que permitem um evento de hibridização em que os iniciadores se hibridizam ao alvo, sendo que esse evento de hibridização, direta ou indiretamente, leva à formação de uma estrutura de dúplex que compreende dois sítios de corte dispostos nas extremidades opostas do dúplex, ou próximo a elas; e realizar um processo de amplificação ao; (b) usar uma enzima de corte para causar um corte em cada um dos ditos sítios de corte nas fitas do dúplex; (c) usar uma polimerase para estender as fitas cortadas de modo a formar ácido nucleico recém-sintetizado, cuja extensão com a polimerase recria sítios de corte; (d) repetir as etapas (b) e (c) conforme desejável, de modo a causar a produção de múltiplas cópias do ácido nucleico recém-sintetizado; caracterizado pela temperatura em que o método é realizado ser não isotérmica e ser submetida à oscilação, uma pluralidade de vezes, entre uma temperatura superior e uma temperatura inferior durante o processo (...).

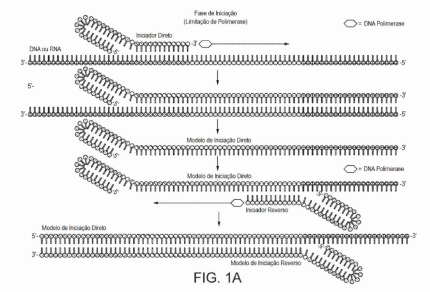


FIG. 1A

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"MELHORAS NA OU EM RELAÇÃO À AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS".**

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção refere-se a um método para amplificar uma molécula de ácido nucleico, especialmente de maneira quantitativa.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] A reação em cadeia da polimerase (PCR) é bem conhecida e uma técnica padrão usada para amplificar moléculas de ácido nucleico. Os produtos amplificados da PCR são detectados no fim da reação. A quantidade de produto tende a alcançar um nível de platô, o que não aumenta se a mistura de reação for deixada por mais tempo. Como resultado, em PCR convencional, a quantidade de produto não necessariamente se correlaciona com a concentração de sequência-alvo de amplificação presente na mistura no resultado.

[0003] A fim de obter dados quantitativos, a PCR quantitativa ("qPCR") é realizada, em que a quantidade de produto de amplificação produzido é monitorada ou detectada em tempo real (então, qPCR também é denominada como "PCR em Tempo Real" ou até mesmo "RT-PCR", embora a última abreviação seja não auxiliar, visto que pode ser confundida com PCR de Transcriptase Reversa), enquanto a reação ainda amplifica ativamente a sequência-alvo.

[0004] Tipicamente, o ácido nucleico amplificado é detectado por sua interação com uma entidade de marcador (usualmente um marcador é um fluoróforo). Essa interação pode ser não específica (isto é, a entidade de marcador se liga a essencialmente qualquer molécula de DNA de fita dupla) ou específica (isto é, a entidade de marcador interage de uma maneira dependente de sequência de nucleotídeo preferencialmente com uma sequência de ácido nucleico específica presente no produto de amplificação desejável). Um exemplo de uma entidade de marcador não específica é o corante SYBR Verde. Uma entida-

de de marcador específica (por exemplo, uma molécula de sonda marcada) pode ser, por exemplo, um "sinalizador molecular", que fluoresce quando é submetido a uma mudança conformacional induzida por hibridização a uma sequência-alvo.

[0005] Desse modo, monitorar o nível de fluorescência observado em tempo real, durante a PCR, permite a geração de dados quantitativos, em que a quantidade de produto de amplificação (conforme medido por detecção de fluorescência, por exemplo) se correlaciona com a concentração da molécula-alvo de amplificação na amostra.

[0006] qPCR, conforme descrito na Patente nº U.S. 6.814.943 utiliza faixas de temperatura para ciclo. Tipicamente, para qPCR, o seguinte procedimento é submetido: desnaturação em torno de 95°C, anelamento em torno de 55°C, extensão em torno de 70°C. Essas são mudanças de temperatura grandes (cerca de 40°C de diferença entre temperaturas máxima e mínima). Como resultado, qPCR, como PCR não quantitativa "normal", necessita do uso de aparelho de ciclo térmico relativamente sofisticado. Desse modo, enquanto qPCR é altamente útil em um contexto de pesquisa (por exemplo, quantificação de expressão de gene), a mesma não é prontamente aplicável a testes de diagnóstico de ponto de atendimento ("PoC") e semelhantes.

[0007] Muitas técnicas de amplificação de ácido nucleico foram inventadas, as quais são realizadas isotermicamente, a fim de evitar a necessidade por ciclo térmico. Uma lista não exaustiva de tais técnicas de amplificação inclui: amplificação mediada por sinal de tecnologia de RNA ("SMART"; documento nº WO 99/037805); amplificação com base em sequência de ácido nucleico ("NASBA" Compton 1991 Nature 350, 91 a 92); amplificação por círculo rolante ("RCA", por exemplo, consultar Lizardi *et al.*, 1998 Nature Genetics 19, 225 a 232); amplificação mediada por alça ("LAMP", consultar Notomi *et al.*, 2000 Nucl. Acids Res. 28, (12) e63); amplificação de recombinase polimerase

("RPA", consultar Piepenberg *et al*., 2006 PLoS Biology 4 (7) e204); amplificação de deslocamento de fita ("SDA"); amplificação dependente de helicase ("HDA" Vincent *et al*., 2004 EMBO Rep. 5, 795 a 800): amplificação mediada por transcrição ("TMA"), amplificação isotérmica de iniciador único ("SPIA", consultar Kurn *et al*., 2005 Clinical Chemistry 51, 1,973 a 1,981); replicação de sequência autossustentada ("3SR"); e reação de amplificação de enzima de corte ("NEAR").

[0008] SDA é uma técnica (revelada por Walker *et al*., 1992 Nucl. Acids Res. 20, 1,691 a 1,696) que envolve o uso de um par de iniciadores que compreende uma porção complementar de alvo e, 5' da porção complementar de alvo, um sítio de reconhecimento e corte para uma endonuclease. Os iniciadores hibridizam às respectivas moléculas-alvo de fita simples complementares. A extremidade 3' das fitas-alvo é estendida como o uso de uma mistura de reação incluindo uma DNA polimerase e pelo menos um nucleotídeo trifosfato modificado, com o uso do iniciador como modelo (e de modo semelhante, as extremidades 3' dos iniciadores são estendidas com o uso do alvo como modelo).

[0009] A extensão das fitas-alvo gera um sítio de reconhecimento de fita dupla para a endonuclease. Entretanto, devido ao fato de que o alvo é estendido com o uso de um trifosfato modificado, a endonuclease não cliva ambas as fitas, mas em vez disso, faz um corte de fita simples no iniciador. As extremidades 3' nos cortes são, então, estendidas pela DNA polimerase (tipicamente fragmento Klenow de DNA polimerase I, que não tem uma atividade de exonuclease). Visto que os iniciadores cortados são estendidos, os mesmos deslocam o produto de extensão inicialmente produzido. O produto deslocado é, então, livre para hibridizar para o iniciador oposto, visto que replica essencialmente a sequência do alvo para o iniciador oposto. Dessa maneira, a amplificação exponencial de ambas as fitas da sequência-alvo é alcançada.

[0010] O estágio de amplificação do processo de SDA é essenci-

almente isotérmico – tipicamente realizado a 37°C – a temperatura otimizada para a endonuclease e a polimerase. Entretanto, antes de alcançar o estágio de amplificação, é necessário dissociar completamente o alvo de fita dupla em suas fitas únicas constituintes, a fim de permitir que o par de iniciadores hibridize às suas fitas-alvo complementares.

[0011] Essa dissociação, ou "fusão" é normalmente alcançada aquecendo-se o alvo de fita dupla a uma alta temperatura – usualmente cerca de 90°C - a fim de quebrar as ligações de hidrogênio entre as duas fitas do alvo. A mistura de reação é, então, resfriada para permitir a adição das enzimas que são necessárias para a reação de amplificação. Devido à alta temperatura usada para gerar os alvos de fita simples, a técnica de SDA não é adequada de modo ideal para um contexto de PoC.

[0012] O documento nº US 6.191.267 revela a clonagem e a expressão de enzima de corte N.BstNBI e seu uso em SDA, em vez de endonucleases de restrição e trifosfatos modificados.

[0013] Outra técnica de amplificação, que é similar a SDA, é Reação de Amplificação de Enzima de Corte (ou "NEAR").

[0014] Em ‘NEAR’ (por exemplo, conforme revelado nos documentos nº US2009/0017453 e EP 2.181.196), iniciadores direto e reverso (denominados nos documentos nº US 2009/0017453 e EP 2.181.196 como "modelos") se hibridizam a respectivas fitas de um alvo de fita dupla e são estendidos. As cópias adicionais dos iniciadores direto e reverso (presentes em excesso) se hibridizam para o produto de extensão do iniciador oposto e são estendidos em si, criando um "dúplex de amplificação". Cada dúplex de amplificação então formado compreende um sítio de corte em direção à extremidade 5’ de cada fita, que é cortada por uma enzima de corte, permitindo a síntese de produtos de extensão adicionais. Os produtos de extensão anteriormente sintetiza-

dos podem, enquanto isso, se hibridizar com cópias adicionais dos iniciadores complementares, fazendo com que os iniciadores sejam estendidos e assim criando cópias adicionais do "dúplex de amplificação". Dessa maneira, a amplificação exponencial pode ser alcançada.

[0015] NEAR se difere de SDA, em particular, por nenhuma etapa de dissociação térmica inicial ser necessária. O evento de hibridização de iniciador/alvo inicial necessário para acionar o processo de amplificação ocorre enquanto o alvo ainda é substancialmente de fita dupla: é ensinado que a hibridização de iniciador/alvo inicial toma vantagem de dissociação localizada das fitas-alvo – um fenômeno conhecido como "respiração" (consultar Alexandrov *et al*., 2012 Nucl. Acids Res. e revisão por Von Hippel *et al*., 2013 Biopolymers 99 (12), 923 a 954). A respiração é o afrouxamento localizado e transiente do pareamento de base entre as fitas de DNA. A temperatura de fusão (Tm) do heterodúplex de iniciador/alvo inicial é tipicamente muito mais baixo do que a temperatura de reação, então, a tendência é de o iniciador se dissociar, mas a hibridização transiente dura o suficiente para a polimerase estender o iniciador, que aumenta a Tm do heterodúplex, e estabiliza o mesmo.

[0016] O estágio de amplificação em NEAR é realizado de modo isotérmico, a uma temperatura constante. Certamente, é convencional realizar tanto a hibridização de alvo/iniciador inicial quanto as rodadas de amplificação subsequentes, na mesma temperatura constante, usualmente na faixa de 54 a 56°C.

[0017] Evitar a necessidade por ciclo térmico significa que NEAR é potencialmente mais útil do que PCR em contextos de PoC. Além disso, a síntese de quantidades significativas de produto de amplificação, até mesmo quando iniciando a partir de um número de cópias muito baixo de moléculas-alvo (por exemplo, o mínimo de 10 moléculas-alvo de fita dupla), pode ser alcançada.

[0018] O documento nº WO 2011/030145 (Enigma Diagnostics Li-

mited) revela a ideia de realizar uma amplificação de ácido nucleico "isotérmica" (NASBA, SDA, TMA, LAMP, Q-beta replicase, amplificação por círculo rolante e 3SR são especificamente mencionados) a uma temperatura predeterminada inicialmente, mudando a temperatura da reação e, então, permitindo que a temperatura retorne à temperatura predeterminada pelo menos uma vez durante a reação. Mais especificamente, o documento sugere causar uma oscilação ou "balanço" de temperatura durante a reação de amplificação, o que é dito por "*melhorar o tempo geral para a conclusão e* [relação] *sinal ruído do ensaio*". A ideia foi explorada de modo experimental com o uso da técnica de amplificação TMA para amplificar RNA bacteriano. Os resultados mostraram que, enquanto a reação "de balanço" começou a amplificar o alvo mais cedo do que a reação verdadeiramente isotérmica, ainda houve um atraso de cerca de 13 minutos antes do sinal de fluorescência se elevar sobre o nível de fundo inicial.

[0019] A presente invenção objetiva fornecer uma técnica de amplificação de ácido nucleico inovadora que tem uma ou mais vantagens por meio de técnicas existentes e que, em particular, pode gerar dados quantitativos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0020] Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece um método para realizar a reação de amplificação de ácido nucleico não isotérmica, em que o método compreende as etapas de:

(a) misturar uma sequência-alvo com um ou mais iniciadores de fita simples complementares em condições que permitem que um evento de hibridização em que os iniciadores se hibridizem ao alvo, sendo que esse evento de hibridização, direta ou indiretamente, leva à formação de uma estrutura de dúplex que compreende dois sítios de corte dispostos em ou próximos às extremidades opostas do dúplex; e realizar um processo de amplificação por;

(b) usar uma enzima de corte para causar um corte em cada um dos ditos sítios de corte nas fitas do dúplex;

(c) usar uma polimerase para estender as fitas cortadas de modo a formar ácido nucleico recém-sintetizado, cuja extensão com a polimerase recria os sítios de corte;

(d) repetir as etapas (b) e (c) conforme desejável de modo a causar a produção de múltiplas cópias do ácido nucleico recém-sintetizado;

caracterizado pela temperatura em que o método é realizado ser não isotérmica, e submetida a oscilar, uma pluralidade de vezes, entre uma temperatura superior e uma temperatura inferior durante o processo de amplificação de etapas (b) a (d), em que na temperatura superior, uma das ditas polimerase ou enzima de corte é mais ativa do que a outra das ditas enzimas, de modo que haja uma disparidade na atividade das enzimas, e na temperatura inferior a disparidade na atividade das enzimas é reduzida ou invertida.

[0021] A enzima de corte e a polimerase terão certas taxas de atividade catalítica. Os mesmos variarão com a temperatura. As respectivas taxas de atividade das enzimas (em termos de moles de substrato reagidos por unidade de tempo por mg de enzima em uma dada concentração de substrato) serão usualmente diferentes em uma temperatura particular. Cada enzima terá uma temperatura otimizada em que sua taxa de atividade é máxima. Em geral, quanto mais a temperatura de uma mistura de reação se distancia de uma temperatura otimizada da enzima, mais lenta a taxa de atividade da enzima.

[0022] O favorecimento relativo de uma enzima sobre outra (de modo a alcançar uma disparidade entre a taxa de atividade da polimerase e enzima de corte) pode ser obtido usando-se condições de temperatura que permitem atividade maior de uma das ditas enzimas do que outra, ou usando-se condições de temperatura que são menos

favoráveis para uma das enzimas do que outras.

[0023] Por meio de explicação, a disparidade na atividade das enzimas é considerada "invertida" se, na temperatura superior, uma das enzimas tem uma atividade mais alta do que a outra enzima, enquanto, na temperatura inferior da outra das ditas enzimas, tem atividade mais alta.

[0024] Em outras modalidades, a disparidade na atividade das enzimas nas temperaturas superior e inferior não é invertida, mas meramente reduzida. Tipicamente, a disparidade em atividade entre as enzimas em uma dentre as ditas temperaturas superior ou inferior é reduzida por pelo menos 5% na temperatura inferior ou superior, conforme apropriado. Mais preferencialmente, a disparidade é reduzida por pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40% ou pelo menos 45%. Com máxima preferência, a disparidade é reduzida por pelo menos 50%, ou pelo menos 75%.

[0025] Para a evitação de dúvidas, "atividade de enzima" nesse contexto se refere à "atividade de enzima específica" (µmol de substrato alcançado min^{-1} mg^{-1} enzima), medida sob as mesmas condições para a polimerase e a enzima de corte.

[0026] Em uma modalidade preferencial, o método do primeiro aspecto da invenção compreende o uso de um conjunto de condições de temperatura em que em uma dentre as ditas temperaturas superior e inferior, tanto a enzima de corte quanto a polimerase são substancialmente ativas (isto é, com propósitos diferentes, operar em uma taxa que é pelo menos 50% ou mais, da taxa em que a enzima operaria em sua temperatura otimizada em condições idênticas de outro modo; preferencialmente em 60% ou superior, mais preferencialmente em 65% ou superior; e com máxima preferência em 70% ou superior, de sua taxa de atividade em sua temperatura otimizada); enquanto na outra

dentre as ditas temperaturas superior e inferior (conforme o caso), pelo menos uma dentre a enzima de corte ou polimerase é substancialmente inibida (isto é, opera em 49% ou menos do que a taxa em que a enzima operaria em sua temperatura otimizada em condições idênticas de outro modo; preferencialmente menos do que 45%, mais preferencialmente menos do que 40%; e com máxima preferência menos do que 35% de sua taxa de atividade em sua temperatura otimizada). Em algumas modalidades, a enzima de corte é substancialmente inibida em uma das temperaturas superior ou inferior. Em algumas modalidades, a enzima de corte é substancialmente inibida na temperatura superior.

[0027] Em algumas modalidades, a polimerase é substancialmente inibida em uma das temperaturas superior ou inferior. Em algumas modalidades, a polimerase é substancialmente inibida na temperatura inferior; em outras modalidades, a polimerase é substancialmente inibida na temperatura superior.

[0028] O comprimento de tempo em que a mistura de reação é mantida constante na temperatura superior, ou na temperatura inferior, pode ser denominado "tempo de residência", e para distinguir entre os mesmos, pode se referir a "tempo de residência de temperatura superior" e o "tempo de residência de temperatura inferior". O tempo de residência de temperatura superior e o tempo de residência de temperatura inferior podem ser iguais ou podem ser diferentes. Se diferente, o tempo de residência de temperatura superior pode ser mais longo ou curto do que o tempo de residência de temperatura inferior.

[0029] Um parâmetro crítico para a análise quantitativa é o quão bem os dados gerados se adaptam a uma linha de regressão, conhecido como coeficiente de determinação (R^2). Os dados não são considerados quantitativos se tiverem um coeficiente de determinação insatisfatório. Com presentes propósitos, os dados são considerados quantitativos se seu coeficiente de determinação for igual ou maior do que

0,850, tipicamente igual ou maior do que 0,900, preferencialmente igual ou maior do que 0,950, mais preferencialmente igual ou maior do que 0,975, e com máxima preferência igual ou maior do que 0,990. O coeficiente de determinação (R^2) pode ser convenientemente calculado com o uso do método descrito por Pfaffl (2001, Nucl. Acids Res. 29 (9) e45).

[0030] Consequentemente, um método para realizar uma reação de amplificação de ácido nucleico e/ou analisar uma amostra por meio de tal reação, é considerado quantitativo se gera dados que são quantitativos de acordo com a definição supracitada. Surpreendentemente, o método da invenção pode gerar dados quantitativos.

[0031] A reação de amplificação da invenção é preferencialmente realizada de maneira geralmente similar de modo superficial àquela conhecida como "NEAR" e revelada no documento nº EP 2.181.196. Entretanto, de modo importante, e relativamente diferente da técnica NEAR, o presente método é realizado de modo não isotérmico e envolve a oscilação repetida entre uma temperatura superior e uma inferior.

[0032] Em algumas modalidades, a temperatura superior pode favorecer relativamente a atividade da polimerase sobre aquela da enzima de corte, e a temperatura inferior favorecerá relativamente a atividade da enzima de corte sobre aquela da polimerase. De modo surpreendente, entretanto, os inventores constataram que as "preferências de temperatura" podem ser completamente invertidas, de modo que, em algumas modalidades, a temperatura superior pode favorecer relativamente a atividade da enzima de corte sobre aquela da polimerase e a temperatura inferior pode favorecer relativamente a atividade da polimerase sobre aquela da enzima de corte.

[0033] Sem se atrelar a qualquer teoria particular, parece que por seleção apropriada de uma polimerase e uma enzima de corte com temperatura diferente otimizada é possível ter a temperatura superior da reação de amplificação relativamente a favor da polimerase ou da

enzima de corte, e vice-versa em relação à temperatura inferior da reação de amplificação.

[0034] Sem se atrelar a qualquer teoria particular, é adicionalmente hipotetizado pelos inventores que um mecanismo possível para a amplificação rápida alcançada pelo método da presente invenção causa uma redução na atividade de uma ou outra dentre a enzima de corte ou a polimerase, usando-se uma temperatura que é consideravelmente subotimizada para a enzima, levando a um acúmulo de moléculas de substrato potenciais. Quando a temperatura da mistura de reação é ajustada a uma temperatura que é mais próxima da otimizada para a enzima em questão, a atividade da enzima é significativamente intensificada que, em combinação com a concentração relativamente alta de substrato acumulado, resulta em uma taxa grandemente acelerada de reação. Em termos simples, a taxa média de reação desse formato "rápido/lento" é maior do que a taxa média de reação alcançável com o uso de um sistema "de estado estável" com uma temperatura constante ou que muda de modo relativamente lento.

[0035] Será evidente para a pessoa versada na técnica que pode ser desejável que a temperatura otimizada da enzima de corte seja diferente (superior ou inferior) daquela da polimerase usada no método da invenção.

[0036] Tipicamente, as respectivas temperaturas otimizadas da enzima de corte e a polimerase deve diferir por pelo menos 1°C, preferencialmente por pelo menos 3°C, mais preferencialmente por pelo menos 5°C e com máxima preferência por pelo menos 10°C. Convenientemente, as respectivas temperaturas otimizadas diferirão por uma quantidade na faixa de 10 a 30°C, mais tipicamente na faixa de 10 a 25°C.

[0037] Não há necessidade absoluta de que a temperatura otimizada da polimerase seja mais alta do que a da enzima de corte. Desse

modo, por exemplo, há modalidades da invenção em que a reação utiliza uma polimerase (por exemplo, obtida de uma fonte psicrofílica) que tem uma temperatura otimizada muito inferior àquela da enzima de corte, enquanto, em outras modalidades, a polimerase tem uma temperatura otimizada superior àquela da enzima de corte.

[0038] Desse modo, em geral, a temperatura superior é preferencialmente selecionada de modo a favorecer relativamente uma fase de extensão mediada por polimerase específica de sequência (isto é, a formação de um complexo entre a polimerase e o dúplex de iniciador inicial hibridizado/alvo, seguido pela extensão mediada por polimerase do iniciador; e quase imediatamente após isso, a extensão do iniciador oposto hibridizado ao iniciador inicial estendido). O uso de uma temperatura elevada tende a reduzir a formação de dímero de iniciador e amplificação aberrante de duplexações hibridizadas incorretamente indesejáveis. A polimerase é convenientemente selecionada de modo a ser suficientemente estável na temperatura superior de modo a realizar a extensão de iniciador ao longo da duração da reação sem diminuição significativa de atividade. Com os presentes propósitos, "diminuição significativa" significa um declínio de 50% ou mais em atividade de enzima específica da polimerase.

[0039] A temperatura inferior é preferencialmente selecionada de modo a permitir que a enzima de corte faça corte dos sítios de corte no dúplex. A enzima de corte tem tipicamente (mas não necessariamente) uma temperatura otimizada que é mais baixa do que aquela da polimerase, então, a transição para a temperatura inferior move tipicamente a temperatura de reação mais próxima para a temperatura otimizada da enzima de corte.

[0040] Em algumas modalidades do método da invenção, conforme exemplificado no presente documento, a temperatura superior está preferencialmente na faixa de 50,0 a 64,0°C, mais preferencialmente

na faixa de 55,0 a 63,0°C. Entretanto, aqueles versados na técnica observarão que a "temperatura superior" preferencial pode variar dependendo da identidade das enzimas presentes e também possivelmente do comprimento e da sequência dos iniciadores e/ou do alvo de amplificação pretendido.

[0041] Por exemplo, em algumas modalidades, a temperatura superior pode ser tão alta quanto 68°C, mas, nessas condições:

(a) normalmente se desejaria usar um perfil de oscilação térmica com um tempo de residência reduzido na temperatura superior (por exemplo, no máximo cerca de 1 a 2 segundos por oscilação); e

(b) tal temperatura superior alta funciona de modo satisfatório com número de cópia relativamente alto de sequência-alvo na amostra (por exemplo, cerca de 10^3 cópias ou superior).

[0042] No método da invenção, conforme exemplificado no presente documento, a temperatura inferior está preferencialmente na faixa de 20,0 a 58,5°C, mais preferencialmente na faixa de 35,0 a 57,9°C. Novamente, entretanto, conforme observado acima, aqueles versados na técnica observarão que a "temperatura inferior" preferencial pode variar dependendo da identidade das enzimas presentes e também possivelmente do comprimento e da sequência dos iniciadores e/ou do alvo de amplificação pretendido.

[0043] Como regra geral, conforme é bem conhecido por aqueles versados na técnica, a severidade de hibridização aumenta com a temperatura crescente (dentro de limites), de modo que temperaturas mais altas reduzam geralmente as interações não específicas, como entre iniciadores sem correspondência e sequências de polinucleotídeo não complementares presentes na amostra. Desse modo, uma temperatura mais alta para reações de hibridização será normalmente preferencial para uma temperatura inferior, enquanto a temperatura não exceder a temperatura de fusão do iniciador específico/hibridi-

zação de sequência-alvo.

[0044] De modo desejável, em modalidades preferenciais, a diferença na temperatura entre a temperatura superior e a temperatura inferior estará na faixa de 4 a 12°C, mais preferencialmente na faixa de 4 a 10°C, e com máxima preferência na faixa de 4 a 8°C.

[0045] Em geral, embora não necessariamente, pode ser preferencial que a mistura de reação seja mantida na temperatura superior por um período de tempo mais curto (o "tempo de residência") do que aquele para a temperatura inferior, embora o "tempo de residência" nas temperaturas superior e inferior possa ser igual ou até mesmo, em outras modalidades, o tempo de residência na temperatura superior pode ser mais longo que aquele para a temperatura inferior – embora isso não seja geralmente preferencial.

[0046] É previsto que, dentro de certos limites, em geral, quanto mais alta a frequência da oscilação térmica, mais rápido a reação de amplificação avançará. Desse modo, a duração de uma oscilação térmica completa será preferencialmente menor do que 3,0 minutos, mais preferencialmente menor do que 2,0 minutos, e com máxima preferência menor do que 1,0 minuto. Com máxima vantagem, a duração de uma oscilação térmica será menor do que 45 segundos e com máxima preferência menor do que 30 segundos. Uma duração mínima de uma oscilação térmica será tipicamente pelo menos 1 segundo, preferencialmente pelo menos 2 segundos, e mais preferencialmente pelo menos 5 segundos. Uma duração preferencial típica para uma oscilação térmica completa estará entre 5 e 30 segundos, preferencialmente entre 5 e 20 segundos, e com máxima preferência entre 5 e 15 segundos.

[0047] Um tempo de residência preferencial típico na temperatura superior pode estar entre 1 e 10 segundos, preferencialmente 1 a 5 segundos, e com máxima preferência 1 a 3 segundos.

[0048] Um tempo de residência preferencial típica na temperatura

inferior pode estar entre 2 e 40 segundos, mais preferencialmente entre 3 e 30 segundos e com máxima preferência entre 3 e 15 segundos.

[0049] O tempo levado para oscilar entre as temperaturas superior e inferior é preferencialmente mantido substancialmente em um mínimo. É previsto que o volume típico de uma mistura de reação de amplificação será menor do que 500 µl, provavelmente menor do que 250 µl e, visto que as temperaturas superior e inferior terão tipicamente menos do que 10°C de diferença, deve ser possível e preferencial a transição da temperatura inferior para a superior (ou vice-versa) em cerca de 0,5 a 10,0 segundos, mais preferencialmente na faixa de 1 a 5 segundos.

[0050] Convenientemente, o perfil de duração/temperatura de cada uma da pluralidade de oscilações é essencialmente idêntico – isso simplifica o desempenho do método. Desse modo, por exemplo, cada uma da pluralidade de oscilações térmicas terá convenientemente a mesma duração geral, o mesmo tempo de residência na temperatura superior, o mesmo tempo de residência na temperatura inferior, etc.

[0051] Entretanto, em algumas modalidades (especialmente aquelas nas quais há uma detecção em tempo real do(s) produto(s) direto(s) ou indireto(s) da reação de amplificação), pode ser desejável alterar o perfil da oscilação térmica durante o curso da reação, de modo que nem todas as oscilações sejam idênticas. Mais especificamente, se a quantificação em tempo real do produto (ou produtos) de reação de amplificação (direto ou indireto) indicar que a reação avança mais lentamente do que o desejável, estas informações podem ser fornecidas de volta para o aparelho de regulação térmica o que regula a temperatura da mistura de reação, fazendo com que o aparelho ajuste o perfil da oscilação térmica, de modo a aumentar a taxa de reação. Isso pode ser necessário se, por exemplo, a sequência-alvo estiver presente em número de cópia muito baixo. O aparelho pode ajustar o perfil de

oscilação térmica aumentando ou diminuindo-se a temperatura superior e/ou inferior, e/ou aumentando ou diminuindo o tempo de residência na temperatura superior e/ou inferior. Também é praticável que o aparelho possa aumentar ou diminuir o tempo tomado para transição entre as temperaturas superior e inferior (isto é, aumento ou diminuição do tempo da transição de temperatura para cima, ou transição de temperatura para baixo, ou ambos).

[0052] A oscilação térmica pode ser começada de modo substancialmente imediato após todos os componentes necessários da mistura de reação terem sido colocados juntos.

[0053] Alternativamente, a oscilação térmica pode ser começada após um intervalo de atraso. Por exemplo, é possível, e potencialmente desejável, que a mistura de reação possa ser mantida em uma temperatura elevada (a qual pode ser a mesma que, ou diferente de, a temperatura superior usada na oscilação térmica). Como uma ilustração, tal intervalo de atraso pode ser de, por exemplo, 5 segundos a 1 ou 2 minutos.

[0054] Adicionalmente, a oscilação térmica pode ser convenientemente realizada de modo substancialmente contínuo durante a reação de amplificação, ou pode ser submetida a uma ou mais pausas. Tipicamente, e preferencialmente, uma vez começada, a oscilação térmica não será interrompida até a reação de amplificação ter alcançado um ponto no tempo desejável, tipicamente por quando uma fluorescência detectável (ou outro) sinal foi obtido e que permite a determinação quantitativa vantajosa da quantidade e/ou concentração da sequência-alvo na amostra.

[0055] A oscilação térmica da mistura de reação de amplificação pode ser convenientemente efetuada com o uso do aparelho de regulação térmica automatizado, visto que é comercialmente disponível para realizar o ciclo térmico em PCR. Claramente, os perfis de tempe-

ratura gerados pelo aparelho precisarão corresponder às condições preferenciais aplicáveis no desempenho da presente invenção.

[0056] Em um segundo aspecto, a invenção fornece uma mistura de reação para realizar uma amplificação de ácido nucleico, em que a mistura compreende uma sequência-alvo a ser amplificada, dois ou mais iniciadores, em que um dos ditos iniciadores é complementar a uma primeira fita do alvo e o outro dos ditos iniciadores é complementar a uma segunda fita do alvo, uma DNA polimerase e uma enzima de corte; a dita mistura de reação está em associação de regulação térmica a meios de regulação de temperatura programáveis, em que os ditos meios de regulação de temperatura são programados para realizar oscilação térmica entre temperaturas superior e inferior, conforme definido anteriormente em relação ao primeiro aspecto da invenção.

[0057] Em um terceiro aspecto, a invenção fornece um método para determinar a quantidade e/ou concentração de um polinucleotídeo-alvo em uma amostra, em que o método compreende as etapas de: realizar uma reação de amplificação de acordo com o primeiro aspecto da invenção definido acima para amplificar o alvo e detectar, de maneira quantitativa, o produto (ou produtos) direto ou indireto da reação de amplificação, de modo a permitir uma determinação da quantidade e/ou concentração do polinucleotídeo-alvo na amostra.

[0058] O processo de amplificação do método da invenção pode ser aplicado a técnicas de amplificação geralmente conhecidas e convencionais incluindo SDA e NEAR, as quais utilizam uma polimerase e uma enzima de corte.

[0059] Desse modo, por exemplo, o processo de amplificação pode ter base no processo de amplificação empregado na amplificação de deslocamento de fita, ou com base naquele usado em NEAR ou certamente qualquer outro processo de amplificação de ácido nucleico que depende da criação de um corte de fita simples e extensão sub-

sequente da extremidade 3’ da fita cortada. Diferente dos ensinamentos da técnica anterior em relação à fabricação de temperatura constante durante a amplificação, os ensinamentos da técnica anterior em relação aos estágios de amplificação de SDA ou NEAR serão, em geral, igualmente aplicáveis ao processo de amplificação do método da presente invenção.

[0060] O método da presente invenção é uma melhora da técnica de amplificação nomeada Reação de Amplificação de Temperatura Seletiva (ou "STAR") descrita no documento nº WO2018/002649. O método da presente invenção, em modalidades preferenciais, permite a detecção quantitativa em tempo real de sequências-alvo, e é denominado no presente documento como "qSTAR", embora isso não seja destinado a indicar que o método da invenção fornecerá resultados em tempo real quantitativos sob todas as condições.

[0061] Preferencialmente, a etapa (a) compreende misturar uma amostra que contém alvo de fita dupla com iniciadores de duas fitas simples, em que um dos ditos iniciadores é complementar a uma primeira fita do alvo, e o outro dos ditos iniciadores é complementar a uma segunda fita do alvo, de modo que os dois iniciadores hibridizem ao alvo e as extremidades 3’ livres dos ditos iniciadores estejam voltadas uma à outra.

[0062] Os dois iniciadores podem ser convenientemente descritos como iniciadores ‘direto’ e ‘reverso’.

[0063] De modo desejável, tanto os iniciadores direto quanto reverso compreenderão a sequência de um sítio de reconhecimento de enzima de corte. Tipicamente, o corte criado por uma enzima de corte estará logo fora e tipicamente 3’ do sítio de reconhecimento de enzima de corte.

[0064] Em uma modalidade preferencial, o iniciador direto compreenderá uma porção em ou próxima de sua extremidade 3’ que é

complementar a, e pode se hibridizar com, a extremidade 3' da fita antissenso de sequência-alvo, enquanto o iniciador reverso compreende uma porção em ou próxima de sua extremidade 3' que é complementar a, e pode se hibridizar com, a extremidade 3' da fita senso de sequência-alvo.

[0065] Dessa maneira, um sítio de reconhecimento de enzima de corte é introduzido em extremidades opostas da sequência-alvo, e a amplificação da sequência-alvo (junto com qualquer sequência interveniente dos iniciadores a jusante do sítio de corte) é alcançado realizando-se múltiplos ciclos de extensão de polimerase dos iniciadores direto e reverso de modo a formar um sítio de reconhecimento de enzima de corte de fita dupla, e por corte dos sítios com uma enzima de corte, permitindo extensão adicional dos iniciadores cortados por uma polimerase etc., essencialmente conforme revelado, por exemplo, no documento nº US 2009/0017453, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento, a título de referência.

[0066] O alvo pode ter fita simples, fita dupla, ou compreender uma mistura dos dois. O alvo pode compreender RNA, DNA ou uma mistura dos dois. Em particular, o alvo pode incorporar um ou mais nucleotídeo trifosfatos modificados (isto é, um nucleotídeo trifosfato não normalmente encontrado em ácidos nucleicos de ocorrência natural), embora isso não seja essencial e certamente não preferencial.

[0067] O alvo pode ser selecionado da seguinte lista não exaustiva: ácido nucleico genômico (cujo termo abrange o ácido nucleico genômico de qualquer animal, planta, fungo, bactéria ou vírus), DNA de plasmídeo, DNA mitocondrial, cDNA, mRNA, rRNA, tRNA, ou um oligonucleotídeo sintético ou outra molécula de ácido nucleico.

[0068] Em particular, o método pode compreender adicionalmente uma etapa de transcrição reversa inicial. Por exemplo, RNA (por exemplo, RNA genômico viral, ou mRNA celular, ou RNA de alguma

outra fonte) pode ser usado para sintetizar DNA ou cDNA com o uso de uma transcriptase reversa por métodos bem conhecidos por aqueles versados na técnica. O DNA pode ser, então, usado como uma sequência-alvo no método da invenção. O RNA original será tipicamente degradado pela atividade de ribonuclease de transcriptase reversa, mas, se desejável, a RNase H adicional pode ser adicionada após a transcrição reversa ter sido completada. As moléculas de RNA são frequentemente presentes em amostras em número de cópia maior do que as sequências de DNA correspondentes (por exemplo, genômicas), então, pode ser conveniente produzir transcrições de DNA da molécula de RNA a fim de aumentar de modo eficaz o número de cópia da sequência de DNA.

[0069] A "sequência-alvo" é a sequência de bases no ácido nucleico-alvo, e pode se referir à fita senso e/ou antissenso de um alvo de fita dupla, e também abrange, a menos que o contexto dite de outro modo, a mesma sequência-base conforme reproduzido ou replicado em cópias amplificadas, produtos de extensão ou produtos de amplificação do ácido nucleico alvo inicial.

[0070] A sequência-alvo pode estar presente em qualquer tipo de amostra, por exemplo, biológica ou ambiental (água, ar, etc.). Uma amostra biológica pode ser, por exemplo, uma amostra alimentar ou uma amostra clínica. As amostras clínicas podem incluir o seguinte: urina, saliva, sangue, soro, plasma, muco, escarro, fluido lacrimal ou fezes.

[0071] A amostra pode ou pode não ser submetida ao processamento antes de fazer contato com os iniciadores. Tal processamento pode incluir um ou mais dentre: filtração, concentração, purificação parcial, sonicação, lise química e semelhantes. Tais processos são bem conhecidos por aqueles versados na técnica.

[0072] O método da presente invenção envolve o uso de um sítio

de corte e meios para criar um corte no sítio de corte. Um "corte" é a clivagem da cadeia principal de fosfodiéster de apenas uma fita de uma molécula de ácido nucleico completamente, ou pelo menos parcialmente, de fita dupla. O sítio de corte é a localização na molécula em que um corte é feito.

[0073] Em modalidades preferenciais a "sítio de reconhecimento de corte" estará presente em, dentro de, ou próximo a um sítio de corte. ("Próximo a", nesse contexto, significa que a base mais próxima do sítio de reconhecimento de corte está em 10 bases do sítio de corte, preferencialmente, em 5 bases do sítio de corte).

[0074] O sítio de reconhecimento de corte pode compreender pelo menos uma fita do sítio de reconhecimento de uma endonuclease de restrição, e o sítio de corte pode compreender pelo menos uma fita de uma sequência de base de ácido nucleico que, quando presente como uma molécula de fita dupla, é cortada por uma endonuclease de restrição. Tipicamente, uma endonuclease de restrição cortará ambas as fitas de uma molécula de ácido nucleico de fita dupla. Na presente invenção, uma quebra de fita dupla pode ser evitada pela incorporação de uma ou mais bases modificadas em ou próximas ao sítio de corte, cujas bases modificadas tornam uma fita de ácido nucleico não suscetível à clivagem pela endonuclease de restrição. Dessa maneira, uma endonuclease de restrição, que corta usualmente ambas as fitas de uma molécula de ácido nucleico de fita dupla, pode ser usada para introduzir um corte de fita simples em uma molécula de fita dupla. As bases modificadas e semelhantes adequadas para alcançar isso são bem conhecidos por aqueles versados na técnica e incluem, por exemplo, todos os nucleosídeo trifosfatos modificados por alfa fosfato e nucleosídeo trifosfatos modificados por alfa borano, especificamente; 2'-desoxiadenosina 5'-O-(tiotrifosfato), 5-metildesoxicitidina 5'-trifosfato, 2'-desoxiuridina 5'trifosfato, 7-deaza-2'desoxiguanosina 5'- trifos-

fato, 2'desoxiguanosina-5'-O-(1-boranotrifosfato) e outros. Os trifosfatos incluindo a base modificada podem estar presentes em uma mistura de reação usada para realizar o processo de amplificação, de modo que as bases modificadas sejam incorporadas em posições relevantes durante rodadas subsequentes de amplificação para impedir a formação de um sítio de fita dupla clivável pela endonuclease.

[0075] Entretanto, em modalidades preferenciais, o corte é feito no sítio de corte por meio de uma enzima de corte. As enzimas de corte são moléculas que, sob circunstâncias normais, fazem apenas quebra de fita simples em uma molécula de ácido nucleico de fita dupla. A enzima de corte tem tipicamente um sítio de reconhecimento de corte e o sítio de corte pode estar no sítio de reconhecimento de corte ou pode ser 5' ou 3' do sítio de reconhecimento. Muitas enzimas de corte são conhecidas por aqueles versados na técnica e estão comercialmente disponíveis. Uma lista não exaustiva de exemplos de enzimas de corte inclui: Nb.BsmI, Nb.Bts, Nt.AlwI, Nt.BbvC, Nt.BstNBI, e Nt.Bpu101. A última enzima está comercialmente disponível a partir de ThermoFisher Scientific; as outras estão disponíveis a partir de, por exemplo, New England Biolabs.

[0076] Em modalidades preferenciais, a enzima de corte é introduzida na mistura de reação no início do método (por exemplo, em um minuto de contato da amostra com iniciadores e DNA polimerase). Entretanto, em alguns casos, pode ser desejável introduzir a enzima de corte na mistura de reação após um atraso mais longo (por exemplo, para permitir que a temperatura fique mais próxima da temperatura otimizada da enzima de corte).

[0077] O método da invenção envolve o uso de uma DNA polimerase. Preferencialmente, mas não necessariamente, o método da invenção pode compreender o uso de pelo menos uma DNA polimerase termofílica (isto é, que tem uma temperatura otimizada em excesso de

60°C). Preferencialmente, a DNA polimerase é uma polimerase de deslocamento de fita. Preferencialmente, a DNA polimerase não tem atividade de exonuclease. Preferencialmente, a DNA polimerase é uma polimerase de deslocamento de fita sem atividade de exonuclease, e também é preferencialmente termofílica.

[0078] Exemplos de DNA polimerases preferenciais incluem Bst polimerase, Vent® DNA polimerase, 9oN polimerase, Manta 1.0 polimerase (Qiagen), BstX polimerase (Qiagen), SD polimerase (Bioron GmbH), Bsm DNA polimerase, grande fragmento (ThermoFisher Scientific), Bsu DNA polimerase, grande fragmento (NEB), e "Isopol"™ polimerase (de ArcticZymes).

[0079] A tabela abaixo dá exemplos de combinações de uma enzima de corte e uma DNA polimerase, junto com as temperaturas superior e inferior sugeridas para uso na realização do método da invenção com o uso das combinações de enzima exemplificadas. Embora a tabela liste DNA polimerases específicas, as mesmas são apenas a título de exemplo e qualquer exonuclease de deslocamento de fita menos polimerase com atividade na faixa de temperatura declarada seria o suficiente, como: Deep Vent (exo-), Bst DNA Polimerase I, II, e III, Manta 1.0 DNA Polimerase, Bst X DNA Polimerase, Bsm DNA Polimerase, IsoPol DNA. Polimerase

Enzima de Corte Sugerida (ou Enzimas de Corte Sugeridas)	DNA Polimerase Sugerida (ou DNA Polimerases Sugeridas)	Temperatura Superior Sugerida (°C)	Temperatura Inferior Sugerida (°C)
Nt.BstNBI	Bst DNA Polimerase, Grande Fragmento	62°C	57°C
Nt.BstNBI	Bsu DNA Polimerase, Grande Fragmento	45°C	38°C
Nt.AlwI	Bst DNA Polimerase, Grande Fragmento	62°C	57°C

Enzima de Corte Sugerida (ou Enzimas de Corte Sugeridas)	DNA Polimerase Sugerida (ou DNA Polimerases Sugeridas)	Temperatura Superior Sugerida (°C)	Temperatura Inferior Sugerida (°C)
Nt.AlwI	Bsu DNA Polimerase, Grande Fragmento	45°C	38°C
Nt.BsmAI	Bst DNA Polyerase, Grande Fragmento	60°C	55°C
Nt.BsmAI	Bsu DNA Polimerase, Grande Fragmento	44°C	37°C
Nt.BspQ1	Bst DNA Polimerase, Grande Fragmento	62°C	52°C
Nt. BspQ1	Bsu DNA Polimerase, Grande Fragmento	44°C	37°C

[0080] Em algumas modalidades, o método da invenção pode compreender convenientemente uma etapa de pré-amplificação ou enriquecimento. Essa é uma etapa em que a sequência-alvo faz contato com iniciadores direto e reverso e DNA polimerase, mas nenhuma enzima de corte. Isso dura tipicamente por cerca de 1 a 5 minutos e produz uma amplificação inicial (linear) da sequência-alvo de cerca de 1,000 vezes, o que pode ser especialmente útil se a sequência-alvo estiver presente na amostra em baixo número de cópia.

[0081] Em algumas modalidades, a etapa de pré-amplificação ou enriquecimento é realizada com o uso de uma DNA polimerase mesofílica, como Exo-Minus Klenow DNA Polimerase ou Exo-Minus psicrófilo DNA polimerase de Cenarchaeum symbiosum, a uma temperatura abaixo de 50°C, e a mistura é subsequentemente aquecida acima de 50°C para desnaturar ou desativar a DNA polimerase termolábil, e, então, uma DNA polimerase termofílica é adicionada para uma amplificação a jusante.

[0082] Tipicamente, o método da invenção compreende uma etapa de detecção, em que um ou mais dos produtos direto ou indireto do processo de amplificação são detectados e opcionalmente quantifica-

dos, em que isso indica a presença e/ou quantidade do alvo na amostra. Há muitas técnicas de detecção e/ou quantificação adequadas conhecidas, incluindo: eletroforese de gel, espectrometria de massa, captura de fluxo lateral, incorporação de nucleotídeos marcados, intercalação ou outros corantes fluorescentes, marcadores de enzima, técnicas de detecção eletroquímica, sinalizadores moleculares e outras sondas, hibridizando de modo especialmente específico oligonucleotídeos ou outras moléculas de contato de ácido nucleico.

[0083] O produto ou produtos que são detectados na etapa de detecção podem ser referidos no presente documento como a "detecção alvo". O ‘alvo’, em relação à etapa de detecção, não é necessariamente o mesmo ‘alvo’ no processo de amplificação e certamente as duas moléculas serão usualmente diferentes até pelo menos certo ponto, embora as mesmas possam ter alguma sequência (tipicamente 10 a 20 bases) em comum, em que o alvo de detecção compreende uma molécula de ácido nucleico ou oligonucleotídeo.

[0084] Os métodos de detecção de ácido nucleico podem empregar o uso de corantes que permitem a detecção específica de DNA de fita dupla. Os corantes intercalantes que exibem fluorescência intensificada mediante ligação a DNA ou RNA são bem conhecidos. Os corantes podem ser, por exemplo, fluoróforos intercalantes de DNA ou RNA e podem incluir *inter alia* o seguinte: laranja de acridina, brometo de etídio, Pico Verde, iodeto de propídio, SYBR I, SYBR II, SYBR Gold, TOTO-3 (um dímero de laranja de tiaxol) Óleo Verde e YOYO (um dímero de amarelo de oxazol).

[0085] Os métodos de detecção de ácido nucleico também podem empregar o uso de nucleotídeos marcados incorporados diretamente na sequência-alvo de detecção ou em sondas que contêm sequências complementares ou substancialmente complementares ao alvo de detecção de interesse. As identificações adequadas podem ser radioati-

vas e/ou fluorescentes e podem ser resolvidas em qualquer uma das maneiras convencionais na técnica. Os nucleotídeos marcados, os quais podem ser detectados, mas funcionam de outro modo como nucleotídeos nativos (por exemplo, são reconhecidos por e podem atuar como substratos para enzimas naturais), devem ser distinguidos de nucleotídeos modificados, os quais não funcionam como nucleotídeos nativos.

[0086] A presença e/ou quantidade de ácidos nucleicos-alvo e sequências de ácido nucleico pode ser detectada e monitorada com o uso de sinalizadores moleculares. Os sinalizadores moleculares são oligonucleotídeos em formato de grampo que contêm um fluoróforo em uma extremidade e um corante de arrefecimento brusco ("arrefecedor brusco") na extremidade oposta. A alça do grampo contém uma sequência de sonda que é complementar ou substancialmente complementar a uma sequência-alvo de detecção e o tronco é formado pelo anelamento de sequências autocomplementares ou substancialmente autocomplementares localizadas em qualquer lado da sequência de sonda.

[0087] O fluoróforo e o arrefecedor brusco são ligados em extremidades opostas do sinalizador. Sob condições que impedem o sinalizador molecular de hibridizar ao seu alvo ou quando o sinalizador molecular está livre em solução, o fluoróforo e o arrefecedor brusco são próximos um do outro, impedindo a fluorescência. Quando o sinalizador molecular encontra uma molécula-alvo de detecção, a hibridização ocorre; a estrutura de alça é convertida em uma conformação estável mais rígida que causa a separação do fluoróforo e o arrefecedor brusco que permite que a fluorescência ocorra (Tyagi *et al*. 1996, Nature Biotechnology 14: 303 a 308). Devido à especificidade da sonda, a geração de fluorescência é de modo substancialmente exclusivo devido à presença do produto amplificado pretendido/alvo de detecção.

[0088] Como regra geral, os sinalizadores moleculares funcionam melhor em temperaturas de hibridização inferiores, à medida que a relação sinal-ruído diminui com a temperatura crescente. Isso ocorre devido ao fato de que, em temperaturas inferiores, as partes de "tronco" autocomplementares do sinalizador molecular permanecem firmemente hibridizadas, permitindo que o arrefecedor brusco arrefeça bruscamente o fluoróforo, mas à medida que a temperatura aumenta, as partes de tronco da molécula podem começar a se fundir, permitindo que o "ruído" de fundo de fluorescência não específico aumente.

[0089] Os sinalizadores moleculares são altamente específicos e podem distinguir sequências de ácido nucleico que diferem por uma base única (por exemplo, polimorfismos de nucleotídeo único). Os sinalizadores moleculares podem ser sintetizados com fluoróforos coloridos diferentes e sequências complementares de alvo de detecção diferentes, possibilitando que diversos alvos de detecção diferentes na mesma reação sejam detectados e/ou quantificados simultaneamente, permitindo que a "multiplexação" de um ensaio PoC detecte uma pluralidade de patógenos diferentes ou marcadores bioquímicos. Para processos de amplificação quantitativos, os sinalizadores moleculares podem se ligar especificamente ao alvo de detecção amplificado após a amplificação, e devido ao fato de que sinalizadores moleculares não hibridizados não fluorescem, é necessário isolar híbridos de sonda-alvo para determinar quantitativamente a quantidade de produto amplificado. O sinal resultante é proporcional à quantidade do produto amplificado. Isso pode ser feito em tempo real. Como com outros formatos de tempo real, as condições de reação específicas devem ser otimizadas para cada conjunto de iniciador/sonda para garantir a exatidão e a precisão.

[0090] A produção ou presença de ácidos nucleicos-alvo de detecção e sequências de ácido nucleico também pode ser detectada e mo-

nitorada por transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET). FRET é um mecanismo de transferência de energia entre dois fluoróforos: uma molécula doadora e uma aceitante. Brevemente, uma molécula de fluoróforo doadora é excitada a um comprimento de onda de excitação específico. A emissão subsequente da molécula doadora, à medida que retorna a seu estado fundamental, pode transferir energia de excitação à molécula aceitante (através de uma interação dipolo-dipolo de longo alcance). FRET é uma ferramenta útil para quantificar a dinâmica molecular, por exemplo, em interações de DNA-DNA, conforme visto com sinalizadores moleculares. Para monitorar a produção de um produto específico, uma sonda pode ser marcada com uma molécula doadora em uma extremidade e uma molécula aceitante na outra. A hibridização de sonda-detecção alvo traz uma mudança na distância ou orientação do doador e aceitante e uma mudança nas propriedades de FRET é observada. (Joseph R. Lakowicz. "Principles of Fluorescent Spectroscopy", Plenum Publishing Corporation, 2ª edição (1 de julho de 1999)).

[0091] A produção ou presença de ácidos nucleicos-alvo de detecção também pode ser detectada e monitorada por dispositivos de fluxo lateral. Os dispositivos de fluxo lateral são bem conhecidos. Esses dispositivos incluem geralmente um trajeto de fluxo permeável de fluido de fase sólida através do qual o fluido flui por força capilar. Exemplos incluem, mas sem limitações, ensaios de vareta de medida e placas cromatográficas de camada fina com vários revestimentos apropriados. Imobilizados em ou sobre o trajeto de fluxo estão vários reagentes de ligação para a amostra, parceiros de ligação ou conjugados que envolvem parceiros de ligação para a amostra, e sistemas de produção de sinal. A detecção de analitos pode ser alcançada de diversas maneiras diferentes incluindo: detecção enzimática, detecção eletroquímica, detecção de nanopartícula, detecção colorimétrica e detecção

de fluorescência. A detecção enzimática pode envolver sondas marcadas por enzima que são hibridizadas para alvos de detecção de ácido nucleico complementares ou substancialmente complementares na superfície do dispositivo de fluxo lateral. O complexo resultante pode ser tratado com marcadores apropriados para desenvolver um sinal legível. A detecção de nanopartícula envolve tecnologia de microesfera que pode usar ouro coloidal, látex e nanopartículas paramagnéticas. Em um exemplo, microesferas podem ser conjugadas com um anticorpo antibiotina. As sequências-alvo podem ser diretamente biotiniladas, ou sequências-alvo podem ser hibridizadas a sondas biotiniladas específicas de sequência. Ouro e látex dão origem a sinais colorimétricos visíveis ao olho nu e partículas paramagnéticas dão origem a um sinal não visual quando excitadas em um campo magnético e podem ser interpretados por um leitor especializado.

[0092] Os métodos de detecção de fluxo lateral com base em fluorescência também são conhecidos, por exemplo, fluoresceína dupla e métodos de sonda de oligo marcado por biotina, ou o uso de pontos quânticos.

[0093] Os ácidos nucleicos também podem ser capturados em dispositivos de fluxo lateral. Os meios para captura podem incluir métodos dependentes de anticorpo e independentes de anticorpo. A captura independente de anticorpo geralmente usa interações não covalentes entre dois parceiros de ligação, por exemplo, a alta afinidade e a ligação irreversível entre uma sonda biotinilada e uma molécula de captura de estreptavidina. As sondas de captura podem ser imobilizadas diretamente em membranas de fluxo lateral.

[0094] O método inteiro da invenção, ou pelo menos a porção de processo de amplificação do método, podem ser realizados em um recipiente de reação (como um tubo de reagente plástico de laboratório convencional, por exemplo, de Eppendorf®) ou pode ser realizado

em e/ou sobre um suporte sólido. O suporte sólido pode ser poroso ou não poroso. Em uma modalidade particular, o suporte sólido pode compreender um material de membrana porosa (como nitrocelulose ou semelhantes). Mais especialmente, o suporte sólido pode compreender ou formar parte de um dispositivo de ensaio de fluxo lateral poroso, conforme descrito acima. Alternativamente, o suporte sólido pode compreender ou formar parte de um ensaio do tipo microfluido, em que um ou mais tubos capilares de orifício estreito sólido são usados para transportar um líquido juntamente com um dispositivo de ensaio.

[0095] Em modalidades preferenciais, todos ou pelo menos parte do método da invenção podem ser realizados com o uso de um dispositivo de ensaio de ponto de atendimento (PoC). Um dispositivo de PoC tem tipicamente as seguintes características: é não dispendioso para fabricar, é descartado após um uso único, é geralmente autocontido, não necessitando de qualquer outro aparelho ou equipamento para realizar ou interpretar o ensaio e, desejavelmente, não necessita de conhecimento clínico ou treino para uso.

[0096] O método da invenção especialmente se direciona ao desempenho com o uso de um dispositivo do tipo PoC visto que, em modalidades típicas, a diferença em temperatura entre as temperaturas superior e inferior da oscilação térmica é pequena. Como resultado, a oscilação térmica/regulação de temperatura relativamente simples é suficiente, em contraste a, por exemplo, realizar qPCR.

[0097] Independentemente, o método de amplificação da presente invenção também pode ser usado em um sistema com base em laboratório, em vez de um dispositivo de PoC, em vez de qPCR e pode alcançar tipicamente resultados quantitativos muito mais rapidamente do que podem ser alcançados realizando-se qPCR.

[0098] Exemplos de iniciadores adequados para uso na invenção são revelados no presente documento. Outros exemplos que podem

ser adequados para uso no método da invenção são revelados, *inter alia*, nos documentos nº US 2009/0017453, US2013/0330777, e EP 2.181.196, cujo conteúdo é incorporado ao presente documento, a título de referência. A pessoa versada na técnica poderá prontamente projetar outros iniciadores adequados para a amplificação de outras sequências-alvo sem experimentação indevida.

[0099] Conforme explicado em outra parte, os iniciadores de uso na invenção compreenderão preferencialmente não apenas uma porção-alvo complementar, como também um sítio de ligação de endonuclease de corte e sítio de corte e uma porção estabilizadora.

[00100] Os iniciadores de uso no método da invenção podem compreender nucleotídeos modificados (isto é, nucleotídeos não encontrados em moléculas de ácido nucleico de ocorrência natural). Tais nucleotídeos modificados podem estar convenientemente presentes na porção de alvo complementar do iniciador, e/ou em outra parte no iniciador. Os exemplos preferenciais de nucleotídeos modificados são nucleotídeos modificados em 2', especialmente nucleotídeos modificados em 2'O-metila, embora muitos outros nucleotídeos modificados sejam conhecidos por aqueles versados na técnica.

[00101] Os recursos da invenção serão descritos agora por meio de exemplos ilustrativos e com referência aos desenhos anexos, em que:

[00102] Figuras 1A e 1B são representações esquemáticas da fase de iniciação e fase de amplificação exponencial respectivamente de uma reação de amplificação de ácido nucleico adequada para realizar o método da invenção;

[00103] A Figura 2 é um gráfico (temperatura em °C contra o tempo, em minutos) que ilustra um perfil de temperatura típico para uma mistura de reação durante o desempenho do método da invenção;

[00104] A Figura 3 é uma representação esquemática de uma modalidade típica de uma molécula de oligonucleotídeo de iniciador útil

na realização do método da invenção;

[00105] As Figuras 4 a 5C são gráficos de (fundo subtraído) fluorescência (em unidades arbitrárias) contra tempo (segundos) para reações de amplificação realizadas de acordo com o método da invenção, com o uso de moléculas de iniciador que não compreendem, ou números diferentes de, bases 2'0- metiladas.

[00106] A Figura 6 é uma plotagem de dispersão que mostra o tempo médio para alcançar a amplificação (A_T, em minutos), conforme julgado pela geração de um sinal de fluorescência acima de um limiar de fundo, para um método de acordo com a invenção (plotagem esquerda), e um método realizado de acordo com o protocolo STAR revelado no documento nº WO2018/002649 (plotagem intermediária), ou um protocolo de reação isotérmica (plotagem direita);

[00107] As Figuras 7 e 8 são representações esquemáticas de, respectivamente, um ensaio de atividade de polimerase e um ensaio de atividade de corte, de uso na caracterização do método da invenção;

[00108] As Figuras 9A e 9B são gráficos de média (de três replicações) de fluorescência relativa (em unidades arbitrárias) contra tempo (em minutos) de um ensaio de atividade de polimerase (Figura 9A) ou um ensaio de atividade de corte (Figura 9B), conduzidos em uma variedade de temperaturas;

[00109] As Figuras 10A a 11D são gráficos de fluorescência relativa (unidades arbitrárias) contra número de ciclo para reações de amplificação tentadas com o uso de várias enzimas de polimerase diferentes com o uso de condições de PCR convencionais (Figuras 10A, 10B) ou condições de oscilação térmica de "qSTAR" de acordo com a invenção, mas na ausência de uma enzima de corte (Figuras 11A a 11D);

[00110] As Figuras 12 e 13 mostram os dados obtidos a partir da realização de amplificação de qPCR convencional (Figura 12), ou amplificação de "qSTAR" de acordo com o método da invenção (Figura

13), com o uso de amostras iniciais de concentração desconhecida, com um sumário dos resultados na Figura 13B;

[00111] As Figuras 14A a 14D são gráficos de fluorescência (unidades arbitrárias) contra tempo (segundos), que mostram os resultados de reações de amplificação realizadas de acordo com o método da invenção sobre faixas de temperatura diferentes;

[00112] A Figura 15 é um gráfico de fluorescência (unidades arbitrárias) contra tempo (minutos), que mostra os resultados de reações de amplificação realizadas de acordo com o método da invenção em temperaturas na faixa de 38 a 45°C; e

[00113] A Figura 16 é um gráfico de fluorescência (unidades arbitrárias) contra tempo (minutos), que mostra os resultados de reações de amplificação realizadas de acordo com o método da invenção, com o uso de uma sequência-alvo de RNA transcrita reversa.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: PROTOCOLO PARA TESTAR REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE TEMPERATURA SELETIVA QUANTITATIVA (QSTAR)

[00114] Quantificar a expressão de gene por Reação de Amplificação de Temperatura Seletiva (STAR), conforme descrito no documento nº WO2018/002649, ou outras tecnologias de amplificação de DNA/RNA relacionadas de modo similar, como PCR, SDA, ou uma técnica de amplificação isotérmica, seria, no máximo, não confiável. A quantidade de produto produzida alcançaria um platô que é não diretamente correlacionado à quantidade de DNA-alvo na amostra inicial. Estabelecendo-se um efeito de zona de oscilação de temperatura controlada em uma reação de amplificação, as amplificações quantitativas podem ser alcançadas com uma polimerase de deslocamento de fita e endonuclease de corte em que o produto amplificado é diretamente relacionado à quantidade inicial de DNA, RNA, ou outros ácidos nucleicos conhecidos. Uma reação de amplificação de temperatura sele-

tiva com base em enzima de corte, de acordo com a invenção, é denominada no presente documento como Reação de Amplificação de Temperatura Seletiva quantitativa (qSTAR). O protocolo é adicionalmente descrito abaixo a menos que observado de outro modo.

ENZIMAS, OLIGONUCLEOTÍDEOS E ALVO

[00115] *Chlamydia trachomatis* (Ct) foi usado como o alvo inicial para o desenvolvimento do mecanismo de qSTAR. O DNA genômico de *Chlamydia trachomatis* Serovar J (ATCC VR-886) foi adquirido a partir de American Type Culture Collection (Manassas, VA). A região 6 de quadro de leitura aberto do plasmídeo críptico foi amplificada com iniciadores qSTARctF61a (SEQ ID NO: 1 5'-CGACTCCATATGGAGTCGATTTCC CCGAATTA -3') e qSTARctR61c (SEQ ID NO: 2 5'-GGACTCCACA CGGAGTCTTTTTCCTTGTTTAC -3'). O modelo de DNA resultante foi detectado com o uso de um sinalizador molecular qSTARctMB1 (SEQ ID NO:3, 5'- FAM/ccattCCTTGTTTACTCGTATTTTTAGGaatgg/BHQ1-3') conforme descrito em EP nº 0728218. Bst X DNA polimerase foi adquirido a partir de Qiagen (Beverly, MA). A endonuclease de corte Nt.BstNBI foi adquirida a partir de New England BioLabs (Ipswich, MA) e é descrita na Patente nº U.S. 6.191.267. A mesma polimerase e endonuclease de corte também foram usadas em outros exemplos descritos no presente documento, a menos que declarado de outro modo.

[00116] Oligonucleotídeos e sinalizadores moleculares foram sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) e Bio-Synthesis (Lewisville, TX). Os recursos gerais dos iniciadores usados nas reações de qSTAR são conforme descrito no documento nº WO2018/002649.

[00117] Um sumário dos oligonucleotídeos e mecanismo de amplificação encontrados em uma reação em uma modalidade da presente invenção compreende (i) uma molécula-alvo de ácido nucleico; (ii) duas ou mais moléculas de oligonucleotídeo iniciador que compreendem

alguns oligonucleotídeos que são complementares à molécula-alvo de ácido nucleico e (iii) um sítio no iniciador que pode ser cortado por uma enzima de corte. O método envolve colocar uma molécula-alvo de ácido nucleico em contato com uma polimerase, dois ou mais oligonucleotídeos de iniciador, em que cada um se liga especificamente a uma sequência complementar na molécula de nucleotídeo-alvo, e uma enzima de corte, sob condições de amplificação de temperatura seletivas, gerando um amplicon detectável que compreende pelo menos uma porção das sequências-alvo que um oligonucleotídeo de iniciador se ligou. A reação de qSTAR geral pode ser entendida como submetida a duas fases distintas; amplificação de iniciação e exponencial, ilustrada esquematicamente nas Figuras 1A e 1B, respectivamente. A fase de iniciação é a formação inicial de um dúplex de proteína-iniciador cuja extensão inicial para amplificação exponencial pode ocorrer. A fase exponencial é quando a enzima de corte se torna ativa juntamente com a polimerase que leva à amplificação exponencial. Na Figura 1A, o contato inicial do iniciador a um ácido nucleico-alvo ocorre (etapa a), após a extensão de polimerase (etapa b) que gera o modelo de iniciação direta (c). O iniciador de fita oposta se liga (etapa d) ao modelo de iniciação direta recém-gerado, se estendendo (etapa e) em direção, e através de, ao sítio de corte de modelo de iniciação. Essa iniciação pode ocorrer simultaneamente tanto nas fitas direta quanto reversa. Esse processo inicial pode ser entendido como envolvendo predominantemente a polimerase por extensão, mas com essencialmente pouco ou nenhum envolvimento da enzima de corte.

[00118] Na Figura 1A, o alvo é mostrado como de fita simples. Isso tem o propósito de clareza e simplicidade. Na realidade, o método da invenção é realizado sem necessitar do uso de altas temperaturas para ‘fundir’ ou separar as fitas de polinucleotídeos-alvo de fita dupla – em vez disso, os iniciadores podem se associar à molécula-alvo (de

fita dupla) tomando vantagem de relaxamento localizado da ligação de hidrogênio entre as fitas – um fenômeno conhecido como "respiração".

[00119] A uma segunda temperatura seletiva (nessa modalidade, inferior), o corte é favorecido na fita que permite que a fita que desloca a polimerase se estenda em direção ao iniciador oposto e através do sítio de corte. Esse ciclo de corte/extensão de polimerase resulta na formação do Dúplex Exponencial (Figura 1B). O Dúplex Exponencial fornece, então, a uma amplificação bidirecional à medida que cada novo modelo gerado de um corte e extensão se torna um alvo para outro iniciador. A temperatura é oscilada de volta para a fase de iniciação para extensão específica de polimerase, limitando a amplificação de fundo e controlando a amplificação exponencial em fases discretas.

[00120] Controlando-se as temperaturas e, desse modo, a atividade da polimerase e endonuclease de corte, os requerentes alcançaram um método para amplificação rápida e controlada, que permite a quantificação de entrada de alvo desconhecido.

[00121] A Figura 2 mostra um perfil de temperatura típico (°C contra tempo, em minutos) para uma modalidade de uma reação de amplificação de acordo com a invenção. Na modalidade ilustrada, a polimerase tem uma temperatura otimizada mais alta do que a da enzima de corte. A temperatura superior é 63°C, a temperatura inferior é 57°C. A tempo de residência na temperatura inferior (cerca de 5 segundos) é mais longo do que o tempo de residência (cerca de 2 segundos) na temperatura superior. Cada oscilação de temperatura completa dura cerca de 8 a 9 segundos, de modo que aproximadamente 7 oscilações térmicas sejam completadas por minuto. Na metade de temperatura superior da oscilação (> 60°C), a fase de iniciação da reação (consultar a Figura 1B) é favorecida e predomina. Aqueles versados na técnica observarão que não há nenhuma distinção de temperatura aguda entre as duas fases da reação de amplificação, e a linha divisória ilus-

trada na Figura 2 é simplesmente para auxiliar o entendimento.

[00122] A abordagem de amplificação de temperatura seletiva quantitativa resultou surpreendentemente em uma reação de amplificação quantitativa, rápida, específica e de alto rendimento com desempenho significativamente maior do que os métodos anteriormente existentes, conforme será adicionalmente explicado e ilustrado em mais detalhes abaixo.

CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

[00123] A mistura de qSTAR básica conteve dois iniciadores, polimerase e enzima de corte (referidos acima). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl, incluindo 1,0 µM do iniciador direto, 0,5 µM do iniciador reverso, sinalizador molecular 0,25 µM, 10 µl de qSTAR Master Mix e 5 µl de amostra de DNA. A mistura-mestra de qSTAR conteve os seguintes reagentes; MgSO4 12,5 mM, Tris-HCl 90 mM (pH 8,5), 300 µM cada dNTPs, NH4OAc 20 mM, NaOAc 30 mM, DTT 2 mM, 0,02% de Triton X-100, endonuclease de corte 15U e polimerase 60U. A temperatura das reações foi controlada entre duas fases de temperatura discretas para tomar vantagem de atividades de enzima inerentes. A fase de iniciação, que consiste primariamente em atividade de polimerase, esteve na temperatura elevada de 62°C por dois segundos. (Nessa temperatura, a enzima de corte foi grandemente inibida – consultar a Figura 9B). A fase exponencial, em que tanto a polimerase quanto a enzima de corte são moderadamente ou altamente ativas, foi mantida a 57°C por cinco segundos. O tempo total para uma oscilação completa foi 15 segundos. Isso é mais do que o dobro do tempo de residência em cada temperatura devido aos limites do aparelho na mudança de temperatura (um instrumento mais responsivo permitiria a oscilação mais rápida entre temperaturas superior e inferior). A detecção de produto de qSTAR e amplificação foram realizadas com o uso do aparelho Agilent Mx3005 P qPCR (Agilent).

[00124] Toda reação teve uma pré-incubação para permitir que os reagentes alcançassem a temperatura de reação e para testar o efeito que a temperatura teve em cinética de amplificação, desempenho de enzima e fluorescência de sinal.

PROCEDIMENTO DE AMPLIFICAÇÃO

[00125] As etapas exatas sob as quais uma reação de amplificação foi realizada são conforme o seguinte: 1) preparar a mistura mestra; 2) preparar iniciadores com alvo ou nenhum alvo; 3) adicionar misturas de iniciador às fileiras A a G de uma placa de 96 poços, dependendo do número de reações a serem feitas por placa; 4) adicionar a mistura-mestra à fileira H da mesma placa de 96 poços; 5) vedar a placa e realizar uma incubação pré-reação por 15 segundos; 6) transferir a mistura-mestra da fileira H a cada fileira de mistura de iniciado; 7) vedar e iniciar o perfil de temperatura pré-selecionado e coleta de dados.

[00126] Durante a reação, o produto amplificado foi medido no fim de cada fase exponencial com o uso de um sinalizador molecular, conforme descrito abaixo. A fluorescência do sinalizador molecular na mistura de reação foi monitorada para medir a quantidade de produto específico gerado durante a reação que se liga ao sinalizador molecular que separa o fluoróforo do arrefecedor brusco, gerando fluorescência.

EXEMPLO 2: RESULTADOS COM O USO DE INICIADORES NÃO MODIFICADOS

[00127] Para demonstrar o potencial dessa tecnologia de amplificação inovadora, qSTAR foi executado com o uso de quatro replicações por diluição-alvo através de 6 logs de entrada de DNA genômico, e duas replicações para controles sem alvo (NTC). Os resultados de experimentos com o uso de iniciadores não modificados (isto é, moléculas de iniciador que não contêm bases de ácido nucleico anormais quimicamente modificadas) são mostrados na Figura 4. A quantidade de sinal (fluorescência subtraída de fundo) para o "controle sem alvo"

é indicada pela linha escura ("ntc"). A quantidade de sinal gerada na presença de 20 cp, 200 cp, 2 k, 20 k, 200 k e 2M cópias de alvo (DNA genômico de *C. trachomatis*) é indicada pelas respectivas linhagens.

[00128] As reações de qSTAR exibem um coeficiente de determinação linear da entrada de alvo enquanto também demonstra uma melhora em velocidade, sensibilidade e fluorescência total. É surpreendente e inesperado que tal melhora e separação entre entradas de alvo possam ser alcançadas controlando-se a temperatura das reações entre duas regiões de temperatura próximas, mas distintamente diferentes.

[00129] Sem limitação aos inventores de qualquer teoria particular, acredita-se que as melhoras de amplificação podem ser atribuídas a pelo menos duas características. Na maioria das reações de amplificação de ácido nucleico, os dímeros de iniciador formam eventualmente, competindo por reagentes limitados e, em concentrações-alvo baixas, dímeros de iniciador podem potencialmente se tornar a via de amplificação primária para uma reação. Limitar ou atrasar a formação de iniciador dímeros, até mesmo por uma quantidade pequena, fornece benefícios significantes. Devido à natureza rápida da reação de amplificação, atrasar a formação de iniciador-dímero permite que as vias de amplificação preferenciais sejam favorecidas (isto é, geração de modelo) melhorando todos os aspectos de amplificação. Iniciando-se as reações em temperaturas elevadas, essas vias de modelo se tornam favorecidas e até mesmo preferenciais. Isso é visto pela sensibilidade melhorada e velocidade no método qSTAR, sinal de fluorescência melhorado, replicações mais estritas e velocidade aumentada.

[00130] Durante a fase de iniciação, a reação é executada a uma temperatura elevada, 62°C. Essa temperatura elevada inibe seletivamente a enzima de corte sem danificar permanentemente a mesma funcionalmente (conforme mostrado em combinação com amplificação

e a Figura 9B, descrita em outra parte). Durante essa fase inicial, a polimerase é relativamente favorecida, permitindo a extensão rápida e específica, visto que a temperatura de reação é relativamente próxima da temperatura otimizada da polimerase.

[00131] Após a fase de iniciação da reação, a temperatura é reduzida a uma temperatura que é mais próxima da temperatura otimizada para a enzima de corte, resultando em eficácia aumentada e permitindo a geração aumentada de modelo. Visto que a via de modelo desejável foi favorecida sob vias errantes, a especificidade e a sensibilidade são grandemente aumentadas, o que é adicionalmente facilitado pela oscilação de temperatura de qSTAR e regulação de atividade seletiva das enzimas.

[00132] A mistura de reação é continuamente oscilada entre 62 e 57°C, para gerar uma tecnologia de amplificação rápida e controlada que pode ser utilizada para quantificação precisa.

[00133] O método de amplificação não isotérmica inovador da invenção fornece uma melhora substancial sobre muitos tipos de reações de amplificação existentes, incluindo reações isotérmicas e aquelas que dependem de altas temperaturas para dissociação de dúplex. Controlando-se a atividade de enzima por "comutação de temperatura" e otimizando a cinética de reação, em que o método da invenção tem consistência aumentada e controle de amplificação, enquanto aumenta a sensibilidade de detecção, para permitir uma quantificação confiável e precisa.

EXEMPLO 3: RESULTADOS COM O USO DE INICIADORES MODIFICADOS EM 2' O-METILA

[00134] Conforme descrito nas Patentes nº U.S. 6.794.142 e 6.130.038, o uso de modificadores modificados em 2' O -metila é conhecido por reduzir a formação de dímero de iniciador durante a amplificação. O documento nº US 2005-0059003 descreve o uso de modifi-

cações de 2’ O-metila localizadas na extremidade 3’ de iniciadores de SDA, sugerindo que Bst DNA Polimerase I e derivados podem utilizar de modo eficaz os ribonucleotídeos modificados em 2’ como iniciadores para síntese de DNA. As regiões de iniciador específicas de alvo que compreendem um ou mais nucleotídeos modificados em 2’ (por exemplo, 2’—O—metila, 2'—metoxietóxi, 2'— fluoro, 2'—alila, 2'—O—[2(metilamino)—2—oxoetil], 2’-hidroxila (RNA), 4'—tio, 4'—CH3—O—2'—ponte, 4'-(CH3) 3-O-2'—ponte, 2'—LN A, e 2‘—O—(N—metilcarbamato, 2’-Suc-OH)) devem melhorar as reações de amplificação. As reações foram executadas com o uso da oscilação de temperatura seletiva de enzima (62 a 57°C) conforme descrito no exemplo anterior juntamente com uma base 2’-O-metilada única ou uma cadeia de bases 2’-O-metiladas localizadas em direção a 3’ de iniciadores (ilustrados esquematicamente na Figura 3).

[00135] Os resultados de amplificação com o uso de iniciadores que compreendem um ou mais nucleotídeos modificados em 2’ na extremidade 3’ são mostrados nas Figuras 5A a 5C. As reações foram executadas com um mínimo de quatro replicações através de todas as concentrações de gDNA de entrada de cinco logs, juntamente com reações de controle sem alvo. Conforme demonstrado, as reações são quantitativas através de uma faixa de cinco logs com um coeficiente de determinação maior do que 0,99 (dados omitidos para brevidade). O coeficiente de determinação foi calculado usando-se um método similar conforme descrito por Pfaffl em "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR", (2001, Nucl. Acids Res. 29 (9) e45). O ponto inicial da fase exponencial, EP, de amplificação foi determinado identificando-se onde EP começou acima da fluorescência de fundo. A fluorescência de fundo foi calculada calculando-se a média das primeiras três leituras de cada reação. A EP foi, então, determinada com base em quando a fluorescência relativa para cada re-

ação alcançou 2,000. Com o uso da entrada conhecida para cada reação, a EP foi avaliada com o uso de um algoritmo de regressão linear para determinar o coeficiente de determinação através de valores de log. Essa curva padrão foi gerada e calculada para linearidade, tipicamente com reações de qSTAR que geram um valor ao quadrado R com valor 0,99 ou maior.

[00136] Os dados demonstram (Figura 5A) que o uso de um iniciador que incorpora um nucleotídeo 2' O -metilado único atrasa reações de amplificação, que atrasa a velocidade das reações para resolução melhor através de todas as concentrações de entrada. Adicionalmente, o uso do método qSTAR não apenas melhorou o uso de amplificação de 2' O-metila, como ilustrou a funcionalidade do método com modificações de amplificação conhecidas. Conforme mostrado nas Figuras 5B e 5C, incorporação de bases 2' O-metiladas adicionais ao longo do iniciador melhora a separação da amplificação, ou elevação de linha de base que permite a resolução maior, o que melhora a capacidade quantitativa da tecnologia. Em essência, a separação entre cada concentração é melhorada pelo atraso das reações causadas por uso de bases 2'O-metiladas: por exemplo, uma reação com uma separação de um ciclo que surge da linha de base, durante o uso de iniciadores não modificados, mostra uma separação de 2 ciclos durante o uso de iniciadores que incorporam as bases 2'O-metiladas. Isso sugere que, embora modificações de 2' O-metila reduzem a produção de amplificação errante não específica no método exemplificado da invenção, o benefício maior dessas modificações é controlar a taxa de reações de modo a permitir maior resolução e amplificação mais quantitativa.

[00137] Sem limitar os requerentes a qualquer teoria particular, as melhoras potenciais obtidas usando-se um ou mais nucleotídeos modificados em 2' na região de iniciador são hipotetizadas como grandemente devido às intensificações na fase de iniciação de amplificação.

Durante a fase de extensão inicial, dois eventos auxiliam a explicar a atividade de nucleotídeos modificados em 2’ na reação de amplificação da invenção. Primeiro, as bases 2’ O-metiladas são conhecidas por reduzir a temperatura de fusão de dúplices de DNA/DNA resultando em iniciação mais controlada tendendo-se a inibir interações de modelo :: modelo, assim reduzindo a oportunidade por extensão de polimerase de complexos não específicos formados por interações entre iniciadores. Segundo, é possível que a polimerase atrase à medida que o nucleotídeo entra no bolso de ligação. Em reações não produtivas (isto é, formação fora de alvo ou de dímero de iniciador), o efeito de atraso é suficiente na minimização de extensão aberrante devido ao fato de que a ligação de modelo está próxima de sua temperatura de fusão. Consequentemente, as modificações em 2’ podem restringir vias de amplificação indesejáveis devido ao fato de que a reação foi dificultada. qSTAR pode alavancar modificações em 2’ e regular melhor a amplificação-alvo para sintonizar reações para capacidade quantitativa melhorada. Esse atraso de polimerase explica adicionalmente o motivo de qSTAR em combinação com modificações de 2’ O-metila melhorarem um ao outro. A região de temperatura de polimerase inicial encontrada no método exemplificado da invenção, além de diminuir a formação de dímero de iniciador, atrasa a iniciação de maneira controlada e confiável. Adicionalmente, visto que qSTAR oscila repetidamente a uma temperatura inferior, a redução em temperatura de fusão causada por modificações em 2' pode ser limitada à medida que a reação avança.

EXEMPLO 4: REPRODUTIBILIDADE

[00138] Para a validação da tecnologia de qSTAR, um estudo de replicação maior foi executado comparando-se o desempenho de qSTAR com o desempenho de STAR e outras condições isotérmicas publicadas conforme descrito na Patente nº U.S. 9.562.263. Amplifica-

ções (qSTAR vs. STAR vs. Isotérmica) foram executadas com o uso de 100 replicações a mais para reações que contêm alvo e 16 replicações para misturas de reação de controle sem alvo. Todas as condições usaram os mesmos tampões, polimerase, enzima de corte e alvo. Conforme mostrado na plotagem de dispersão na Figura 6, a amplificação de qSTAR e STAR mostra uma melhora clara em tempo médio (A_T) para alcançar a amplificação ao nível de limiar de fluorescência (TL), sensibilidade melhorada, e um desvio padrão reduzido entre replicações, em comparação com a reação de amplificação isotérmica. O tempo de A_T para reações realizadas de acordo com a invenção foi 2,38 minutos, enquanto o valor A_T para reações realizadas de acordo com os protocolos isotérmicos convencionais foi 4,12 minutos, uma diferença que é estatisticamente significante (teste de duas caudas). (Observação – reações falhadas mostram ter um tempo de amplificação de 10 minutos – o tempo máximo para o qual as reações foram executadas). Adicionalmente, o método de qSTAR é uma melhora sobre o método de STAR em relação à velocidade. A tecnologia de qSTAR demonstrou as replicações mais estritas, sensibilidade mais alta, amplificação mais rápida com o número mínimo de casos atípicos. De modo a não limitar o requerente a qualquer teoria particular, a redução significante em tempo de amplificação é considerada como devido à iniciação melhorada da reação, permitindo uma amplificação de cópia baixa mais eficaz, eventos de dímero de iniciador minimizados e extensão de produto específico aumentada que permite a geração de produto mais rápida do que os métodos anteriormente revelados. As replicações mais estritas são alcançadas alavancando-se a atividade da enzima de corte e a polimerase gerando múltiplas chances para amplificação específica, rápida e controlada de modelos desejáveis.

EXEMPLO 5: FUNCIONALIDADE QSTAR

[00139] Um recurso característico do método da presente invenção

compreende a modulação de atividade enzimática usando-se pequenas mudanças de temperatura durante o processo de amplificação, cujas mudanças de temperatura são muito menores do que, isto é, as mudanças alcançadas durante o desempenho de qPCR. Para verificar que a enzima de corte tem atividade reduzida durante a fase de iniciação, ainda que seja altamente ativa durante a fase exponencial, os inventores desenvolveram dois ensaios de atividade de proteína única: um ensaio de atividade de polimerase ("PAA"), e um ensaio de atividade de corte ("NAA").

PROJETO DE ENSAIO DE ATIVIDADE DE POLIMERASE, ENZIMAS E OLIGONUCLEOTÍDEOS:

[00140] Os oligonucleotídeos sintéticos para o PAA foram sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). O projeto consiste em três oligonucleotídeos; o oligo de modelo (NEF), (SEQ ID NO: 4 5'-/56-FAM/ACCGCGCGCACCGAGTCTGTCGGCAGCACCGCT-3'), oligo de iniciação (PO), (SEQ ID NO: 5 5'-AGCGGTGCTGCCGACA-3'), e oligo de arrefecimento brusco (POQ), (SEQ ID NO: 6 5'-GGTGC GCGCGGT/3BHQ_1/-3'). Juntos, esses três oligonucleotídeos formam um complexo em solução, cada uma com funções únicas, conforme mostrado na Figura 7. O NEF tem um fluoróforo 5', POQ tem uma porção química de arrefecimento brusco 3' que absorve os fótons liberados pelo fluoróforo de oligo de modelo 5'. O PO serve como o sítio de iniciação para uma polimerase de deslocamento de fita se estender e deslocar o oligo de arrefecimento brusco permitindo que a fluorescência seja gerada devido ao oligo de arrefecimento brusco não estar mais em proximidade com o oligo de modelo. As polimerases de deslocamento de fita altamente ativas geram um sinal fluorescente em uma taxa aumentada em comparação com polimerases menos ativas ou aquelas que não têm atividade de deslocamento de suporte.

CONDIÇÕES DE ENSAIO DE ATIVIDADE DE POLIMERASE

[00141] A mistura de Ensaio de Atividade de Polimerase (PAA) básica contém um oligo de modelo (NEF) com uma modificação 5'-FAM, um oligo de iniciação (PO) que anela à extremidade 3 do modelo, um oligo de arrefecimento brusco (POQ) com uma modificação de 3'-BHQ1 que anela à extremidade 5' do modelo, e uma polimerase sob teste (referida acima). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl, incluindo NEF 0,2 µM, PO 0,3 µM, POQ 0,7 µM, e PAA Master Mix 1X. A uma concentração 1X, a mistura-mestra PAA contém os seguintes reagentes; MgSO4 12,5 mM, Tris-HCl 90 mM (pH 8,5), 300 µM cada dNTPs, $NH_4CH_3CO_2$ 15 mM, Na_2SO_4 15 mM, DTT 5 mM, BSA 0,2 mg/ml, 0,02% Triton X-100, Rb_2SO_4 20 mM, L-treonina 10 mM, e polimerase 0,03 U/µl. As reações são executadas isotermicamente para determinar a atividade de enzimas selecionadas em temperaturas específicas. O PAA foi realizado com o aparelho Agilent Mx3005P qPCR (Agilent). Cada reação teve uma incubação pré-reação para permitir que os reagentes alcancem a temperatura para testar o efeito da temperatura selecionada e impedir a variação à medida que as reações se aqueceram. Cada reação avaliou cinética de amplificação, desempenho de enzima e fluorescência de sinal.

PROJETO DE ENSAIO DE ATIVIDADE DE CORTE (NAA), ENZIMAS E OLIGONUCLEOTÍDEOS:

[00142] Os oligonucleotídeos sintéticos para o NAA foram sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). O ensaio envolve dois oligonucleotídeos; o oligo de modelo (NEQ), (SEQ ID NO: 7 5'-ACCGCGCGCACCGAGTCTGTCGGCA/3BHQ_1/-3') e oligo de iniciação (POF, SEQ ID NO: 8 5'-/56-FAM/CTGCCGACAGACTC GGTG-CGCGCGGT-3'). Juntos, esses oligonucleotídeos formam um complexo em solução, cada uma com funções únicas, conforme mostrado na Figura 8. O oligo de modelo tem um sítio de corte para atividade de

endonuclease de corte e a jusante um arrefecedor brusco 3'. O oligo de iniciação tem a sequência de sítio de corte complementar e um fluoróforo 5'. Quando em solução, os dois formam um complexo que completa um sítio de ligação de corte que permite a endonuclease de corte para cortar. O arrefecedor brusco 3' de oligonucleotídeo do sítio de corte, após um corte por uma endonuclease de corte, agora, tem uma baixa temperatura de fusão. Devido ao fato de que a reação é realizada acima dessa temperatura de fusão, o fragmento encurtado que contém o arrefecedor brusco é liberado do complexo, resultando em fluorescência não bruscamente arrefecida. Quanto mais ativa a enzima de corte, mais rápido e maior é o sinal fluorescente gerado.

CONDIÇÕES DE ENSAIO DE ATIVIDADE DE CORTE

[00143] A mistura de NAA básica contém o oligo de modelo (NEQ) com uma modificação 3'-BHQ1, e o oligo de iniciação (POF) com uma modificação 5'-FAM que anela ao modelo, e uma endonuclease de corte a ser testada. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl, incluindo NEQ 1,3 µM, POF 1,6 µM e NAA Master Mix 1X. A uma concentração 1X, a mistura-mestra NAA contém os seguintes reagentes; $MgSO_4$ 12,5 mM, Tris-HCl 90 mM (pH 8,5), $NH_4CH_3CO_2$ 15 mM, Na_2SO_4 15 mM, DTT 5 mM, BSA 0,2 mg/ml, 0,02% Triton X-100, Rb_2SO_4 20 mM, L-treonina 10 mM, e endonuclease de corte 0,008 U/µl. As reações são executadas isotermicamente para determinar a atividade de enzimas selecionadas em temperaturas específicas. O NAA foi realizado com o aparelho Agilent Mx3005P qPCR (Agilent). Cada reação teve uma incubação pré-reação para permitir que os reagentes alcancem a temperatura para testar o efeito da temperatura selecionada e impedir a variação à medida que as reações se aqueceram. Cada reação avaliou cinética de amplificação, desempenho de enzima e fluorescência de sinal.

PERFIL DE TEMPERATURA DE ENZIMAS

[00144] A Figura 9A mostra o ensaio de atividade de polimerase para seis condições isotérmicas. A 63°C a polimerase tem a atividade mais forte e a cinética, conforme determinado pelo coeficiente linear da curva fluorescente e da fluorescência total. Cada queda subsequente na temperatura, 60°C, 55°C, 50°C, e 45°C mostra uma diminuição na atividade até alcançar a 40°C. Nessa baixa temperatura, a atividade da polimerase parece ser substancialmente não existente.

[00145] A Figura 9B mostra o ensaio de atividade de corte para seis condições isotérmicas. Diferente do ensaio de polimerase, que mostra uma temperatura otimizada clara em direção à extremidade de topo da faixa preferencial de temperaturas para o método de qSTAR, o ensaio de atividade de corte mostra uma otimização (cerca de 55°C) em direção à extremidade inferior da faixa preferencial de temperaturas para o método de qSTAR, enquanto demonstra pouca a nenhuma atividade a 63°C. Todas as outras temperaturas mostram algum nível de atividade para a enzima de corte.

[00146] Os dados desses ensaios demonstram a natureza distinta da tecnologia qSTAR. Diferente de outros métodos de amplificação que dependem do deslocamento de fita e/ou separação de temperatura, qSTAR usa unicamente "comutação de temperatura" para modular a atividade de enzima e controlar amplificação rápida. Reconhecer os recursos únicos para essas enzimas e dependência de temperatura mediante atividade, os inventores desenvolveram uma tecnologia de amplificação rápida, específica, controlada nova que pode quantificar entradas de amostra desconhecidas sob seis minutos.

[00147] Sem se atrelar a qualquer teoria particular, acredita-se que, nesse exemplo, qSTAR envolve modulação de atividade da enzima de corte à medida que se amplifica entre duas temperaturas. 63°C e 57°C são a escolha de temperatura preferencial no sistema exemplificado

descrito acima (com base em perfis de atividade de proteína atuais) devido ao fato de que permitem a amplificação controlada, uma necessidade por qualquer tecnologia quantitativa. Acredita-se adicionalmente que controlar a atividade de qualquer enzima é desejável para gerenciar um evento de amplificação eficaz para quantificação de material de ácido nucleico desconhecido.

EXEMPLO 6: RESULTADOS DE AMPLIFICAÇÃO QSTAR COM O USO DE POLIMERASES QPCR

[00148] Para demonstrar as propriedades inesperadas de qSTAR versus outras tecnologias de amplificação, como PCR, uma comparação de PCR polimerases comuns foi realizada, o que mostra que PCR polimerases comuns e métodos são inativos no método de qSTAR. Quatro PCR polimerases; Vent, Deep Vent, Taq, e Phusion foram usadas para amplificação em um método de qPCR, conforme descrito abaixo, e em comparação com o método de qSTAR. Devido ao fato de que os sinalizadores moleculares medem apenas um aumento na quantidade total de produto de DNA de fita simples específico, o produto de amplificação não específico não é medido independentemente do produto de amplificação pretendido. Para medir a produção de todos os produtos de amplificação (por exemplo, incluindo aqueles que surgem do dímero de iniciador formação), as reações foram executadas na presença de SYBR Verde I. SYBR Verde I é um dos corantes mais sensíveis conhecidos por detectar DNA de fita simples, RNA e DNA de fita dupla. Devido ao fato de que SYBR Verde I tem uma fluorescência intrínseca baixa, é uma boa escolha para a detecção de amplificação total em uma reação, tanto específica quanto não específica, para demonstrar que PCR polimerases comuns são inativas no método de qSTAR.

PROJETO DE ENSAIO QPCR/QSTAR, MISTURA MESTRA E OLIGONUCLEOTÍDEOS:

[00149] Os oligonucleotídeos sintéticos para o ensaio de qPCR interno (Ctx) foram sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) e projetados para a amplificação de DNA genômico de *Chlamydia Trachomatis*. O projeto consiste em dois oligonucleotídeos; o oligo de iniciação direta (Ctx_L.F1, SEQ ID NO: 9 AAAAAGATTTCCCCGAATTAG), e um oligo de iniciação reversa (Ctx_L.R1_3'(-2), SEQ ID NO: 10 AGTTACTTTTTCCTTGTTT). Os oligonucleotídeos foram sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). A Coloração de Ácido Nucleico SYBR Verde I (Lonza Rockland, Inc. P/N 50513) foi usada como um corante de intercalação para detecção de produtos de DNA de fita dupla (dsDNA). A mistura-mestra de PCR e polimerases usadas foram de New England Biolabs (Ipswich, MA); Tampão de Reação Thermopol 10X, Vent (exo-) DNA Polimerase (P/N M0257S), Deep Vent (exo-) (P/N M0257S), e Taq DNA Polimerase (P/N M0267S), Tampão 5X Phusion HF e Phusion HF DNA Polimerase (P/N M0530S). O DNA genômico para *Chlamydia Trachomatis* (Cepa: UW-36/Cx) (P/N VR-886D) foi adquirido através de ATCC (Manassas, VA).

CONDIÇÕES DE ENSAIO QPCR/QSTAR

A mistura de ensaio de qPCR interno (Ctx) básica continha um oligo de iniciador direto, um oligo de iniciador reverso, um corante de intercalação de dsDNA, uma concentração conhecida de modelo de DNA genômico, uma concentração 1X de mistura-mestra de PCR comercial, e sua polimerase correspondente (mencionada acima). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl, incluindo F1 0,3 µM, R1 0,3 µM, SYBR Verde I 0,1X, Mistura-mestra de PCR comercial 1X, polimerase 0,03 U/µl, e 5,000 cópias de modelo de DNA genômico.

[00150] O ensaio de qPCR interno foi executado com o uso de 2

métodos; um perfil de temperatura que replica a tecnologia qSTAR ou aquela de qPCR convencional. No método de qSTAR, a temperatura das reações foi controlada entre duas temperaturas distintas para tomar vantagem de atividades de enzima. A fase de iniciação, substancialmente (atividade apenas de polimerase), esteve na temperatura elevada de 62°C por dois segundos. A fase exponencial, (atividade de enzima de corte e polimerase), foi mais próxima da temperatura otimizada para a atividade da enzima de corte a 57°C por cinco segundos. O tempo total para uma oscilação completa foi 15 segundos, que é mais do que o dobro dos tempos de residência nas temperaturas máxima e mínima devido aos limites do aparelho na mudança de temperatura. As reações de qPCR foram realizadas com o uso de um programa de 2 etapas; 95°C por quinze segundos seguidos por 60°C por sessenta segundos, ciclo de 50x vezes. A detecção de produto de qSTAR e amplificação foram realizadas com o aparelho Agilent Mx3005 P qPCR (Agilent).

RESULTADOS

[00151] Nas Figuras 10A a 10B, os dados em tempo real para amplificação de qPCR de cinco mil cópias de DNA de *Chlamydia trachomatis* genômico em comparação com o controle sem alvo ("ntc"). É claramente vista a amplificação ou atividade de todas as polimerases com o uso desse método de qPCR. Deve ser observado que três das quatro polimerases mostram atividade nas condições sem alvo, o que ocorre provavelmente devido à formação de dímero de iniciador. Se o método de qSTAR foi similar a qPCR ou às tecnologias de amplificação de ciclo térmico anteriormente relatadas, se esperaria que todas ou no mínimo uma dessas polimerases fossem ativas com o uso do método de qSTAR.

[00152] Nas Figuras 11A a 11D, os dados de tempo real demonstram a incapacidade para todas as quatro polimerases supracitadas de

mostrar qualquer atividade em reações sem alvo ou com o uso de 10, 100, 1K, 10K cópias de DNA de *Chlamydia trachomatis* genômico sob o protocolo de oscilação de temperatura de qSTAR. É surpreendente que nenhuma dessas polimerases, todas usadas em suas faixas de temperatura otimizadas, pode mostrar até mesmo uma pequena quantidade de atividade durante o curso da incubação. Sem limitar os inventores a qualquer teoria particular, acredita-se que isso ocorre devido ao seguinte; (a) condições de qSTAR necessitam de polimerases de deslocamento de fita que funcionam em combinação com enzimas de corte; sem essa combinação de enzimas, a amplificação não pode avançar devido à rotatividade de produto não poder progredir; e (b) PCR e outros métodos de ciclo dependem da temperatura elevada (~95°C) para amplicons separados de fita para progressão de amplificação; visto que o método de qSTAR não usa tal temperatura elevada e, em vez disso, usa oscilação de temperatura mais moderada para controlar a atividade de enzima (em vez de para a separação de fita), o mesmo pode auxiliar a explicar a incapacidade de qualquer uma dessas enzimas de mostrar qualquer atividade nas condições de protocolo de qSTAR.

EXEMPLO 7: RESULTADOS DE QSTAR VERSUS QPCR

[00153] Para demonstrar a natureza quantitativa de qSTAR, uma comparação foi realizada versus qPCR. Se qSTAR é quantitativa, se esperaria que a tecnologia tem um alto coeficiente de determinação, e que possa prever corretamente a quantidade de DNA genômico em amostras cegas em comparação com qPCR.

PROJETO DE ENSAIO DE QPCR DE *C. TRACHOMATIS*, MISTURA-MESTRA E OLIGONUCLEOTÍDEOS:

[00154] Os oligonucleotídeos sintéticos (1) para o ensaio de qPCR de *C. trachomatis* (CtP) foram projetados para a amplificação de DNA genômico de *Chlamydia Trachomatis*. O ensaio envolve o uso de três

oligonucleotídeos; um oligo de iniciação direto, um oligo de iniciação reverso e uma sonda marcada dupla. Os oligonucleotídeos foram sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). A mistura-mestra de PCR usada, PrimeTime Gene Expression Master Mix (P/N 1055770), foi adquirida a partir de Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). O DNA genômico para *Chlamydia Trachomatis* (Cepa: UW-36/Cx) (P/N VR-886D) foi adquirido através de ATCC (Manassas, VA).

CONDIÇÕES DE ENSAIO DE QPCR DE *C. TRACHOMATIS*

[00155] A mistura de ensaio de qPCR (CtP) básica continha dois iniciadores, polimerase e DNA genômico. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl, incluindo iniciador direto 0,3 µM, iniciador reverso 0,3 µM, sonda marcada dupla 0,1 µM, Mistura-Mestra de PCR comercial 1X e várias concentrações de modelo de DNA genômico iniciando a partir de 100,000 cópias. As curvas padrão foram geradas com o uso de diluições de 10 vezes do DNA genômico. O qSTAR foi realizado conforme anteriormente descrito juntamente com as curvas padrão acima. As reações de qPCR foram realizadas com o uso de um programa de 2 etapas; 95°C por quinze segundos seguidos por 60°C por sessenta segundos, ciclo de 50x vezes.

RESULTADOS

[00156] A Figura 12 mostra os dados de tempo real de qPCR para a curva padrão e 5 amostras desconhecidas. O coeficiente de determinação para a curva padrão foi 0,9984, através de uma faixa de 5 log. qPCR pôde chamar corretamente todas as cinco amostras desconhecidas. A Figura 13 mostra os dados de tempo real de qSTAR para a curva padrão e cinco amostras desconhecidas. O coeficiente de determinação para a curva padrão foi 0,9981, através de uma faixa de 6 log. qSTAR pôde chamar corretamente todas as cinco amostras desconhecidas. A Tabela 2 mostra uma comparação de sumário das duas

tecnologias, é óbvio a partir do sumário que qSTAR é comparável a qPCR quando com o uso da tecnologia para quantificação.

TABELA 2

Amostra	Nº de cópias adicionadas	Nº de cópias estimado de qPCR	Nº de cópias estimado de qSTAR
UNK01	250	114	276
UNK02	50.000	45.848	75.699
UNK03	0	0	0
UNK04	100.000	96.886	140.611
UNK05	8.000	5.816	10.630

EXEMPLO 8: FAIXAS DE TEMPERATURA ELEVADAS DE QSTAR

[00157] Um benefício adicional de tecnologia de qSTAR é a capacidade para amplificar através de várias faixas de temperatura. Conforme descrito nas Patentes nº U.S. 5.712.124, 9.562.263, 5.399.391, e 6.814,943, a maioria das tecnologias têm uma faixa de temperatura estreita na qual a amplificação pode ocorrer, e desviar dessas faixas inibe a reação. Para demonstrar a versatilidade de qSTAR, as amplificações foram executadas conforme descrito na Tabela 3 abaixo.

TABELA 3

Condições de qSTAR			
Fase de Iniciação	Tempo	Fase Exponencial	Tempo
63°C	1 segundo	57°C	5 segundos
64°C	1 segundo	57°C	5 segundos
65°C	1 segundo	57°C	5 segundos
66°C	1 segundo	57°C	5 segundos

[00158] As Figuras 14A, 14B, 14C e 14D são gráficos de fluorescência (unidades arbitrárias) contra tempo (minutos). A Figura 14A mostra os resultados para reações que iniciam a 63°C. A Figura 14B mostra os resultados para reações que começam a 64°C. A Figura 14C mostra os resultados para reações que começam a 65°C e a Fi-

gura 14D mostra os resultados para reações que começam a 66°C. Em todos os casos, reações de controle negativo "sem alvo" não gerou qualquer sinal de fluorescência, enquanto houve amplificação satisfatória para 10, 100, e 1,000 cópias. Embora o sinal de fluorescência sinal seja levemente mais alto para a reação de 63°C, todas as condições de temperatura demonstraram amplificação mais forte em menos do que 3 minutos. Enquanto a modulação de enzima é alcançada, o método de qSTAR pode amplificar de modo satisfatório. Acredita-se que qualquer temperatura acima de 62°C reduz significativamente a atividade de enzima de corte (em relação à enzima de corte exemplificada, Nt. Bst NBI).

EXEMPLO 9: FAIXAS DE TEMPERATURA CONHECIDAS FORA DE QSTAR

[00159] Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR), conforme descrito na Patente nº U.S. 6.814.943 descreve faixas de temperatura para ciclo térmico. Tipicamente, para qPCR, o seguinte procedimento é submetido: desnaturação em torno de 95°C, anelamento em torno de 55°C, extensão em torno de 70°C. Seria surpreendente e inesperado se uma tecnologia pudesse amplificar em regiões de temperatura distintamente diferentes. Adicionalmente, os indivíduos com conhecimento na técnica não esperariam tal intervalo de temperatura grande para uma tecnologia funcionar. O documento nº WO 2011/030145A1 descreve "balanço" em que a temperatura de ensaio oscila em torno de um ponto definido de temperatura isotérmica publicado de, no máximo, 15°C, mas mais preferencialmente em torno de 5°C. Essa "oscilação" de temperatura para algumas tecnologias isotérmicas permitiu a cinética de amplificação melhorada. Seria surpreendente se qSTAR pudesse trabalhar em faixas de temperatura dramaticamente diferentes e ainda alcançar a amplificação.

CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO

[00160] A mistura de qSTAR de temperatura baixa conteve iniciadores (SEQ ID NO. 11 (5'- tGACTCCAcAcGGAGTCataaATCCTGCTG-CmUA-3') e SEQ ID NO. 12 (5'- TGACTCCAcAcGGAGTCAGAAC-CAACAAGAAGA-3')), Isopol polimerase fornecido por ArticZymes (Tromso, Noruega) e enzima de corte (referido anteriormente). As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl, incluindo 1,0 µM do iniciador direto, 0,5 µM do iniciador reverso, sinalizador molecular 0,25 µM (SEQ ID NO. 13 (5'- /56-FAM/tgaggTGCTGCTATGCCTCA/ 3IABkFQ/-3')), 10 µl de Mistura-Mestra de qSTAR e 5 µl de amostra de DNA. mistura-mestra de qSTAR continha os seguintes reagentes; MgSO4 12,5 mM, Tris-HCl 90 mM (pH 8,5), 300 µM cada dNTPs, NH4OAc 20 mM, NaOAc 30 mM, DTT 2 mM, Triton X-100 0,02%, endonuclease de corte 12,5U, polimerase 75U. A temperatura das reações foi controlada entre duas fases de temperatura discretas para tomar vantagem de atividades de enzima inerentes. A fase exponencial, que consiste primariamente em atividade de corte e polimerase, esteve na temperatura elevada de 45°C por dois segundos. A fase de iniciação, em que a polimerase é altamente ativa e a enzima de corte tem atividade grandemente reduzida, foi mantida a 38°C por cinco segundos. O tempo total para uma oscilação completa foi 15 segundos, que é mais do que o dobro dos tempos de residência em cada uma das temperaturas máxima e mínima devido aos limites do aparelho na mudança de temperatura. A detecção de produto de qSTAR e amplificação foram realizadas com o aparelho Agilent Mx3005 P qPCR (Agilent).

RESULTADOS

[00161] A Figura 15 mostra os dados quantitativos em tempo real para amplificar qSTAR na faixa de referida acima. A primeira coisa que deve ser observada é que, nesse exemplo, em comparação com os

exemplos anteriores às fases de temperatura foram trocados: a fase de temperatura superior é para amplificação exponencial, em que ambas as enzimas são ativas, enquanto a temperatura inferior é para iniciação, em que a polimerase é altamente ativa e a enzima de corte é relativamente inibida. A diferença de temperatura entre qSTAR e tal "baixa temperatura" qSTAR é 24°C. É surpreendente e inesperado que uma tecnologia possa funcionar sobre tal grande faixa de temperaturas e demonstra adicionalmente que esse método de amplificação é diferente de qualquer método de amplificação conhecido anteriormente, para o melhor conhecimento dos inventores.

[00162] Sem limitar os inventores a qualquer teoria particular, acredita-se que qSTAR ainda pode alcançar a amplificação nessas baixas temperaturas devido ao fato de que a atividade de enzima de corte é grandemente reduzida na temperatura inferior. Essa comutação de enzimas permite a amplificação controlada e precisa de modelos e os inventores podem garantir muitas maneiras em que as múltiplas enzimas, iniciadores e esquemas de temperatura podem ser usados em uma reação única para alcançar resultados novos, rápidos e quantitativos.

EXEMPLO 10: RESULTADOS COM O USO DE ÁCIDO RIBONUCLEICO

[00163] qSTAR pode amplificar a partir de qualquer ácido nucleico, com o uso de qualquer composição de DNA (cDNA e gDNA), RNA (mRNA, tRNA, rRNA, siRNA, microRNA), análogos de RNA/DNA, análogos de açúcar, híbridos, ácido nucleico de poliamida e outros análogos conhecidos. A amplificação de RNA ribossômico foi executada conforme descrito abaixo.

ENZIMAS, OLIGONUCLEOTÍDEOS E ALVO:

[00164] *Listeria monocytogenes* foi usado como o alvo para o desenvolvimento de um ensaio de RNA de qSTAR. DNA genômico de

Listeria monocytogenes (ATCC VR-886) foi adquirido a partir de American Type Culture Collection (Manassas, VA). A triagem inicial foi realizada em gDNA, e uma região 23S de RNA ribossômico foi encontrada como amplificada com iniciadores LMONF72 ACAC 5-OM (SEQ ID NO: 14, 5'- GGACTCGACACCGAGTCCAGTTACGATTmTmGmTmTmG-3') e LMONR86 ATAT (SEQ ID NO: 15, 5'- gGACTCCATATGGAGTCCTACGGCTCCGCTTTT-3'). O modelo de DNA resultante foi detectado com o uso de um sinalizador molecular LMONMB1 (SEQ ID NO: 16, 5'-FAM/gctgcGTTCCAATTCGCCTTTTTCGCagc/BHQ1-3') conforme descrito no documento nº EP 0728218.

[00165] O RNA total foi isolado com o uso do minikit RNeasy Plus Qiagen (Hilden, Alemanha) combinado com lise mecânica rápida em um Mini Bead Mill 4 (VWR). *Listeria monocytogenes* (ATCC BAA-2660) foi adquirido a partir de American Type Culture Collection (Manassas, VA), e revivido por transferência de placa em placas ágar de infusão de cérebro-coração (BHI). Uma colônia única foi usada para inocular 25 ml de meios BHI que foi cultivada por 18 horas a 37°C para alcançar a fase estacionária. A cultura foi, então, retrodiluída em duas porções de 50 ml de BHI em frascos de 250 ml e cultivadas por quatro horas adicionais anteriores à colheita. As bactérias foram colhidas a partir de duas alíquotas de 30 ml da cultura retrodiluída a 5,000 xg por 15 min. Os grânulos foram ressuspensos e combinadas em 5 ml de Reagente de estabilização de RNA RNAlater (Qiagen) e permitiu a incubação por 10 min à temperatura ambiente. As bactérias foram colhidas e ressuspensas em 5 ml de bactérias de tampão de lise de RLT e homogeneizadas no Mini Bead Mill (VWR) na definição 5 (3x 30 segundos com um minuto em gelo entre pulsos).

[00166] RNA total foi purificado de acordo com as direções do fabricante (Qiagen). O DNA genômico foi removido passando-se lisados por uma coluna de ligação de DNA fornecida no kit de purificação

RNeasy Plus. A contaminação de DNA genômico foi adicionalmente reduzida utilizando-se uma digestão de RNase livre DNase I em coluna (Qiagen) de amostras na coluna de ligação de RNA RNeasy. Bst X DNA Polimerase foi adquirida a partir de Beverly Qiagen (Beverly, MA). Omniscript, uma Transcriptase Reversa, foi adquirido a partir de Qiagen (Hilden, Alemanha). A endonuclease de corte Nt.BstNBI foi adquirida a partir de New England BioLabs (Ipswich, MA) conforme descrito na Patente nº U.S. 6.191.267. Os oligonucleotídeos e sinalizadores moleculares foram sintetizados por Integrated DNA Technologies (Coralville, IA).

CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO:

[00167] A mistura de qSTAR básica continha tudo conforme descrito no exemplo 1 acima com a inclusão adicional do seguinte: 4U de Transcriptase Reversa (referido acima).

RESULTADOS

[00168] Os resultados são mostrados na Figura 16 que é um gráfico de fluorescência (unidades arbitrárias) contra tempo (minutos). As reações de controle negativo não geram qualquer sinal de fluorescência, enquanto 100, 1,000, 10,000, 100,000, 1,000,000 reações-alvo de número de cópias geraram sinal de fluorescência acima do limiar. Os resultados mostram que qSTAR pode se amplificar de modo eficaz a partir de um RNA alvo transcrito reverso. Adicionalmente, os dados indicam que pode ser usado para quantificar entradas de amostra de RNA desconhecidas.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para realizar uma reação de amplificação de ácido nucleico não isotérmica, sendo que o método compreende as etapas de:

(a) misturar uma sequência-alvo com um ou mais iniciadores de fita simples complementares em condições que permitem um evento de hibridização no qual os iniciadores se hibridizam ao alvo, sendo que esse evento de hibridização, direta ou indiretamente, leva à formação de uma estrutura de dúplex que compreende dois sítios de corte dispostos nas extremidades opostas do dúplex, ou próximo a elas; e realizar um processo de amplificação ao:

(b) usar uma enzima de corte para causar um corte em cada um dos ditos sítios de corte nas fitas do dúplex;

(c) usar uma polimerase para estender as fitas cortadas de modo a formar ácido nucleico recém-sintetizado, cuja extensão com a polimerase recria os sítios de corte;

(d) repetir as etapas (b) e (c) conforme desejável de modo a causar a produção de múltiplas cópias do ácido nucleico recém-sintetizado;

caracterizado pelo fato de que a temperatura em que o método é realizado é não isotérmica e é submetida à oscilação, uma pluralidade de vezes, entre uma temperatura superior e uma temperatura inferior durante o processo de amplificação de etapas (b) a (d), em que, na temperatura superior, uma dentre as ditas polimerase ou enzima de corte é mais ativa do que a outra dentre as ditas enzimas, de modo que haja uma disparidade na atividade das enzimas, e, na temperatura inferior, a disparidade na atividade das enzimas é reduzida ou invertida.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, na etapa (a), o alvo compreende duas fitas comple-

mentares de ácido nucleico, e o iniciador compreende iniciadores direto e reverso que são, cada um, complementares a uma respectiva fita do alvo, de modo que as extremidades 3' dos iniciadores direto e reverso sejam orientadas uma à outra.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que as etapas (b) a (d) são realizadas de modo substancialmente imediato após a etapa (a), e em que as etapas (a) a (d) são preferencialmente realizadas no mesmo recipiente de reação ou no mesmo suporte sólido.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de detectar, direta ou indiretamente, o ácido nucleico recém-sintetizado.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a dita etapa de detecção compreende o uso de um sinalizador molecular ou um corante fluorescente, uma sonda marcada de fluxo lateral, ou uma enzima que catalisa uma reação eletroquímica.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a quantidade de ácido nucleico recém-sintetizado é quantificada ou medida durante o desempenho da reação de amplificação.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a quantidade de ácido nucleico recém-sintetizado é usada para determinar a quantidade e/ou concentração da sequência-alvo de maneira quantitativa.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a temperatura superior favorece relativamente à atividade da polimerase.

9. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a temperatura superior favorece

relativamente à atividade da enzima de corte.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a temperatura otimizada da polimerase difere da temperatura otimizada da enzima de corte por uma quantidade na faixa de 10 a 30 °C, preferencialmente 10 a 25 °C.

11. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a temperatura superior está na faixa de 50 a 64 °C, preferencialmente 55 a 63 °C.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a temperatura inferior está na faixa de 20,0 a 58,5 °C, preferencialmente na faixa de 35,0 a 57,9 °C, mais preferencialmente na faixa de 36,0 a 57,9 °C, e com máxima preferência na faixa de 37,0 a 57,9 °C.

13. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a oscilação de temperatura é realizada continuamente por uma pluralidade de oscilações e preferencialmente por um período de pelo menos dois minutos, mais preferencialmente por um período de pelo menos três minutos.

14. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que cada uma dentre a pluralidade de oscilações é substancialmente idêntica.

15. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que cada uma dentre a pluralidade de oscilações de temperatura tem uma duração na faixa de 5 a 60 segundos, preferencialmente, 5 a 45 segundos, mais preferencialmente, 5 a 30 segundos, e, com máxima preferência, 5 a 20 segundos.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que cada uma dentre a

pluralidade de oscilações de temperatura tem um tempo de residência na temperatura superior na faixa de 1 a 10 segundos, preferencialmente, 1 a 5 segundos.

17. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que cada uma dentre a pluralidade de oscilações de temperatura tem um tempo de residência na temperatura inferior na faixa de 2 a 40 segundos, preferencialmente, 2 a 30 segundos.

18. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que que cada uma dentre a pluralidade de oscilações de temperatura tem um tempo de transição entre a temperatura inferior e a temperatura superior na faixa de 0,5 a 10 segundos, preferencialmente, na faixa de 1 a 5 segundos.

19. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a etapa (a) é precedida realizando-se uma etapa de transcrição reversa, que compreende colocar um analito de RNA de interesse em contato com uma transcriptase reversa de modo a formar uma transcrição de DNA do analito de RNA de interesse.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente a etapa de produzir DNA de fita dupla da transcrição de DNA.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende adicionalmente uma pré-amplificação ou etapa de enriquecimento.

22. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que um ou mais dos iniciadores compreende um nucleotídeo modificado.

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que o nucleotídeo modificado está em uma porção

complementar de alvo do iniciador.

24. Método, de acordo com a reivindicação 22 ou 23, caracterizado pelo fato de que os um ou mais iniciadores compreendem um nucleotídeo modificado em 2'.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 22 a 24, caracterizado pelo fato de que os um ou mais iniciadores compreendem um nucleotídeo modificado em 2' O-metila.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que os um ou mais iniciadores compreendem uma pluralidade de nucleotídeos modificados em 2' O-metila.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que os um ou mais iniciadores compreendem até sete nucleotídeos modificados em 2' O-metila.

28. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que um ou mais dos iniciadores compreendem uma porção autocomplementar.

29. Método, de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que a porção autocomplementar forma uma estrutura em grampo.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o grampo compreende 5 a 10 pares de base.

31. Método para determinar a quantidade e/ou concentração de um polinucleotídeo-alvo em uma amostra, sendo que o método é caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de: realizar a reação de amplificação, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, para amplificar o polinucleotídeo-alvo na amostra; e detectar, de maneira quantitativa, o(s) produto(s) direto(s) ou indireto(s) da reação de amplificação, de modo a permitir uma determinação da quantidade e/ou concentração do polinucleotídeo-alvo na amostra.

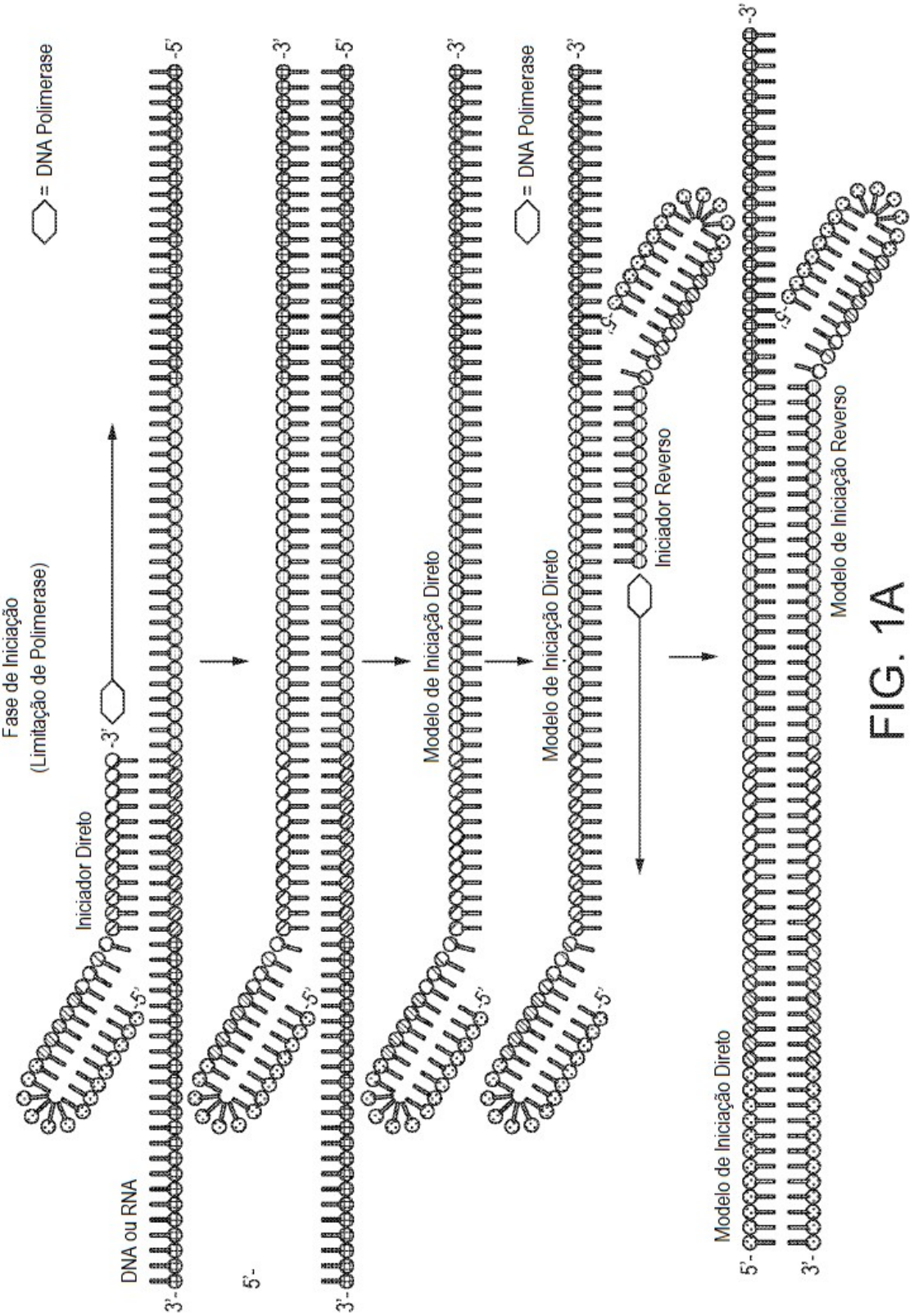

Fase de Iniciação
(Limitação de Polimerase)
= DNA Polimerase
Iniciador Direto
DNA ou RNA
Modelo de Iniciação Direto
Modelo de Iniciação Direto
= DNA Polimerase
Iniciador Reverso
Modelo de Iniciação Direto
Modelo de Iniciação Reverso

FIG. 1A

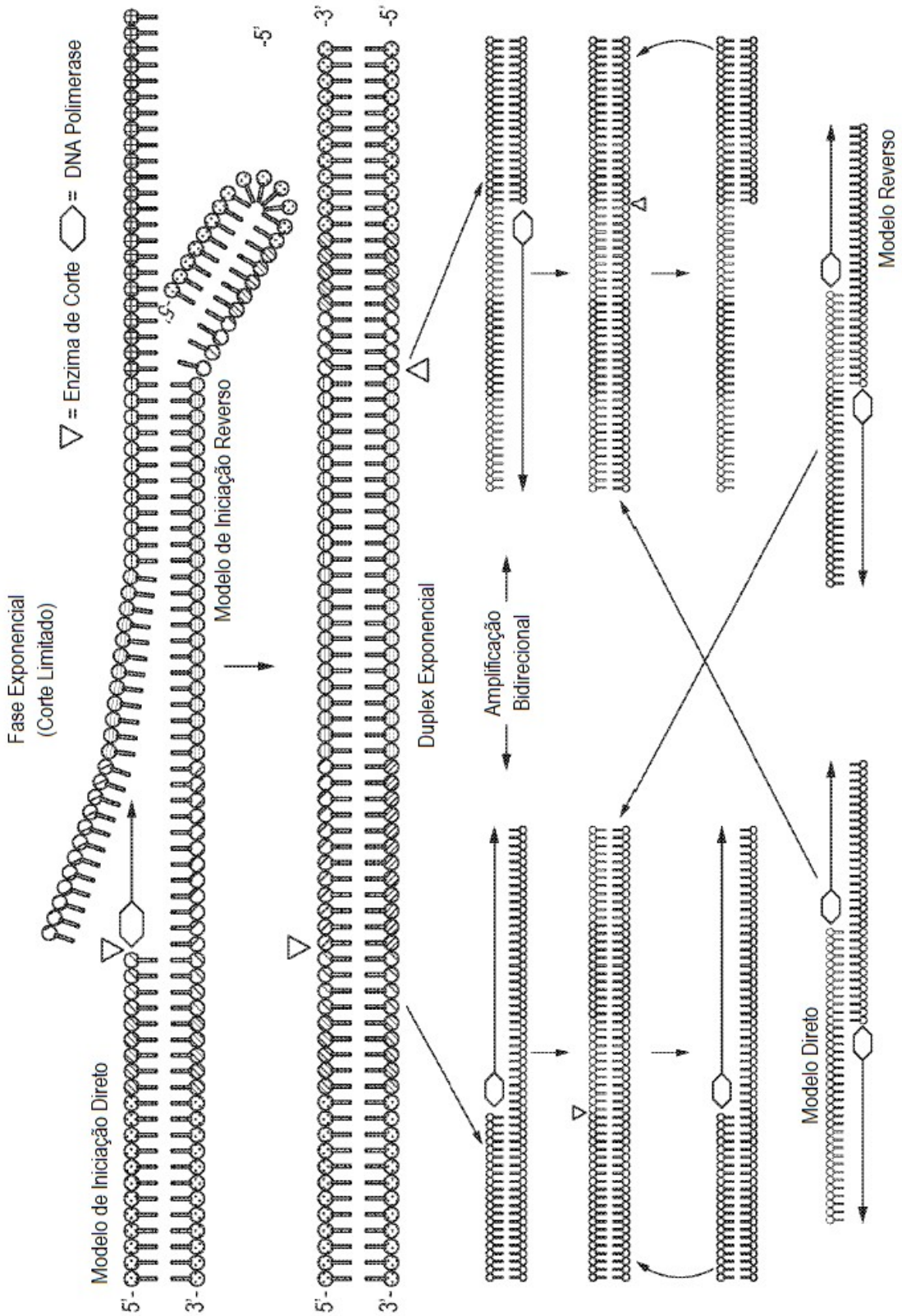

Fase Exponencial
(Corte Limitado)
= Enzima de Corte
= DNA Polimerase
Modelo de Iniciação Direto
Modelo de Iniciação Reverso
5'
3'
-5'
-3'
Duplex Exponencial
Amplificação
Bidirecional
Modelo Direto
Modelo Reverso

FIG. 1B

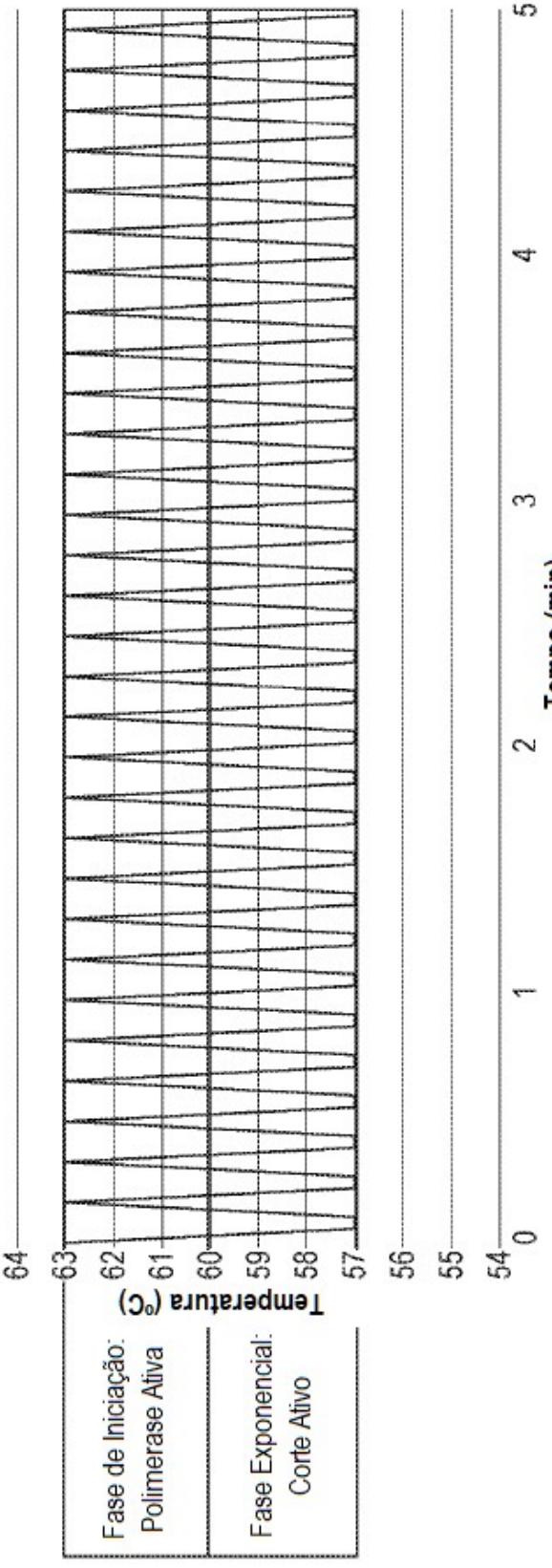

qSTAR, Perfil de Temperatura Exemplificativo
Temperatura (°C)
64
63
62
61
60
59
58
57
56
55
54
0
1
2
3
4
5
Tempo (min)
Fase de Iniciação: Polimerase Ativa
Fase Exponencial: Corte Ativo

FIG. 2

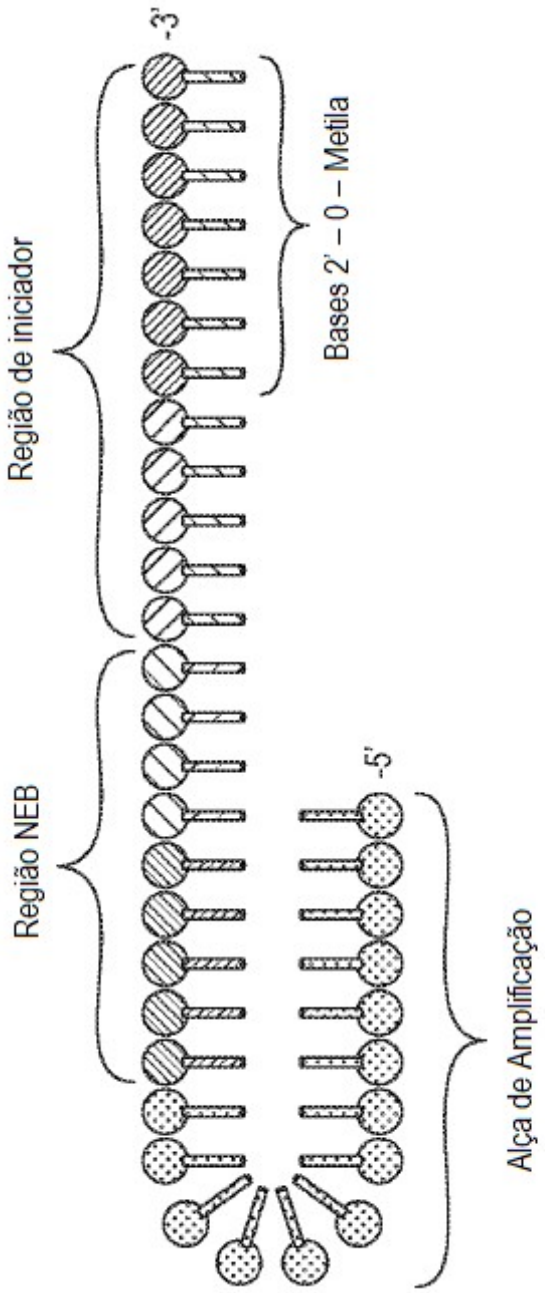

-3'
Região de iniciador
Bases 2' – 0 – Metila
Região NEB
-5'
Alça de Amplificação

FIG. 3

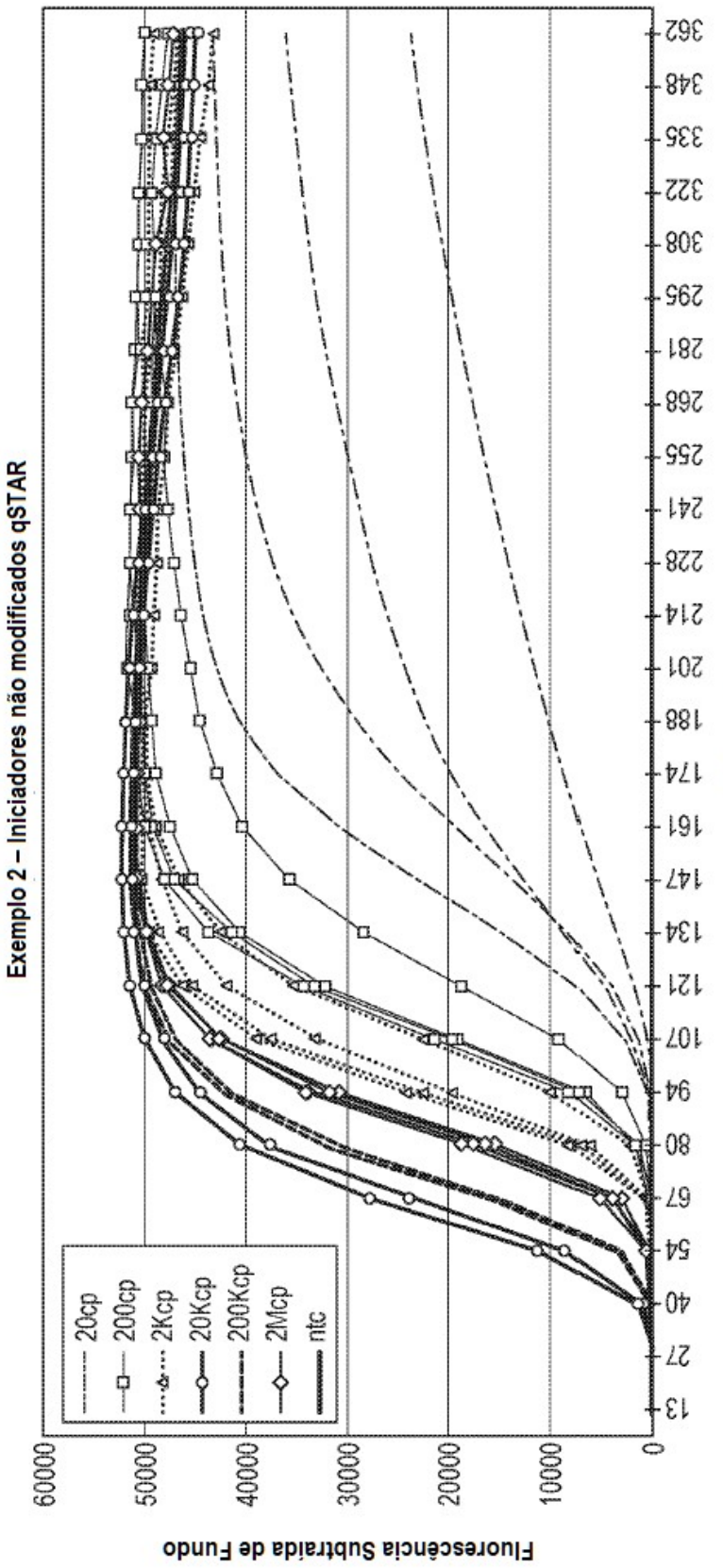

Exemplo 2 – Iniciadores não modificados qSTAR
Fluorescência Subtraída de Fundo
Tempo (s)
20cp
200cp
2Kcp
20Kcp
200Kcp
2Mcp
ntc
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
13
27
40
54
67
80
94
107
121
134
147
161
174
188
201
214
228
241
255
268
281
295
308
322
335
348
362

FIG. 4

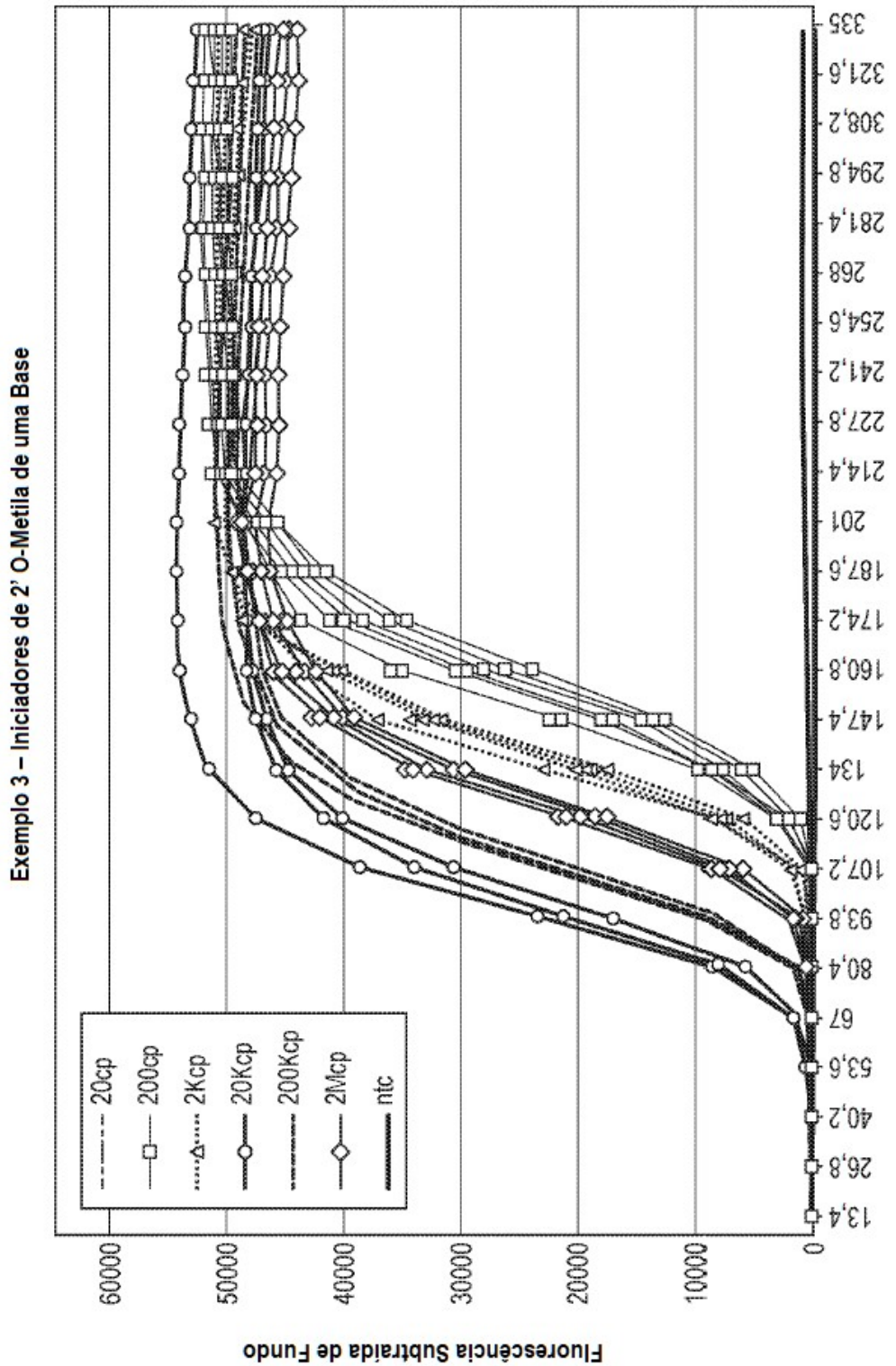

Exemplo 3 – Iniciadores de 2' O-Metila de uma Base
Fluorescência Subtraída de Fundo
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
20cp
200cp
2Kcp
20Kcp
200Kcp
2Mcp
ntc
13,4
26,8
40,2
53,6
67
80,4
93,8
107,2
120,6
134
147,4
160,8
174,2
187,6
201
214,4
227,8
241,2
254,6
268
281,4
294,8
308,2
321,6
335
Tempo (s)

FIG. 5A

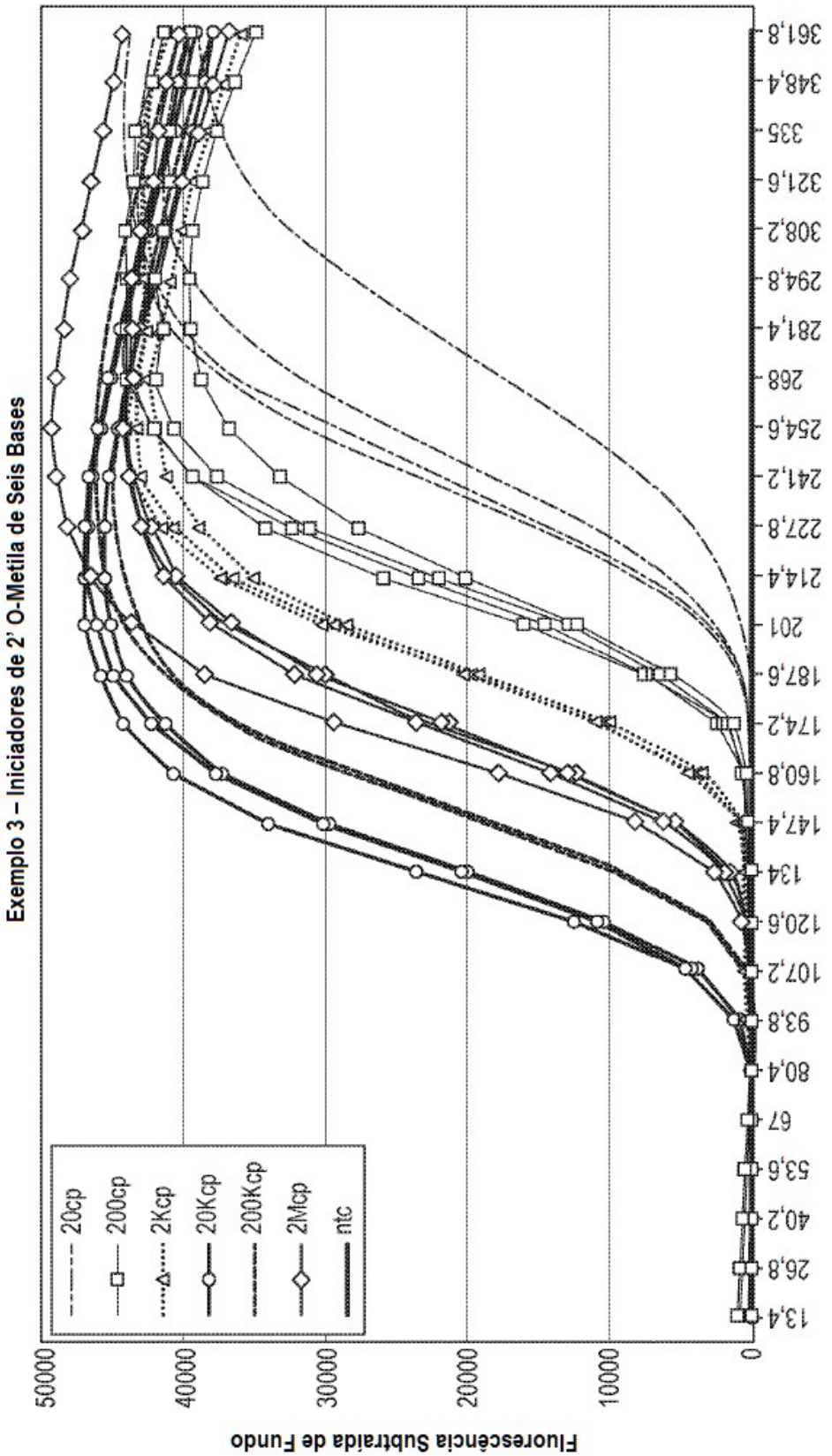

Exemplo 3 – Iniciadores de 2' O-Metila de Seis Bases
Fluorescência Subtraída de Fundo
50000
40000
30000
20000
10000
0
20cp
200cp
2Kcp
20Kcp
200Kcp
2Mcp
ntc
13,4
26,8
40,2
53,6
67
80,4
93,8
107,2
120,6
134
147,4
160,8
174,2
187,6
201
214,4
227,8
241,2
254,6
268
281,4
294,8
308,2
321,6
335
348,4
361,8
Tempo (s)

FIG. 5B

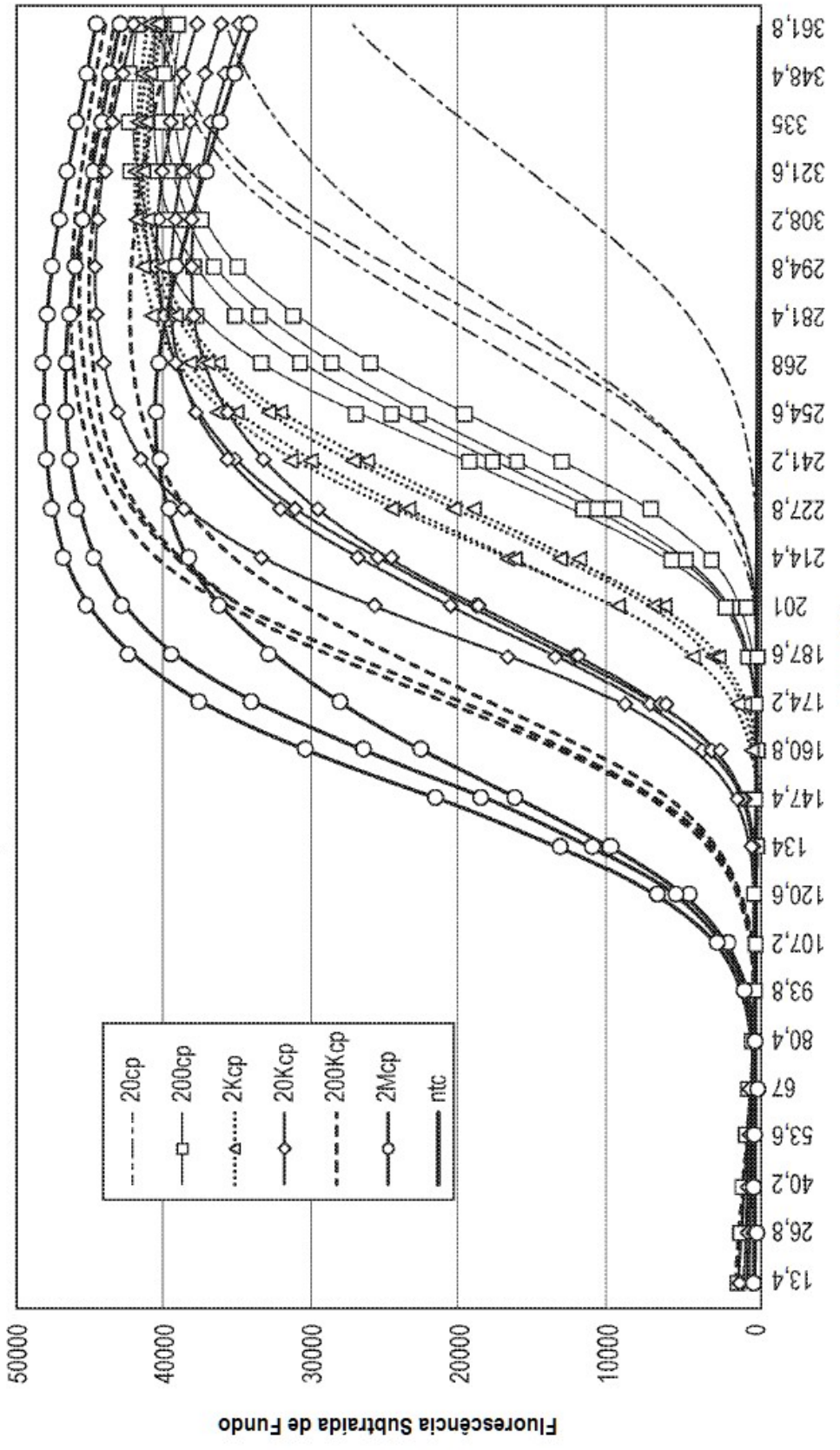
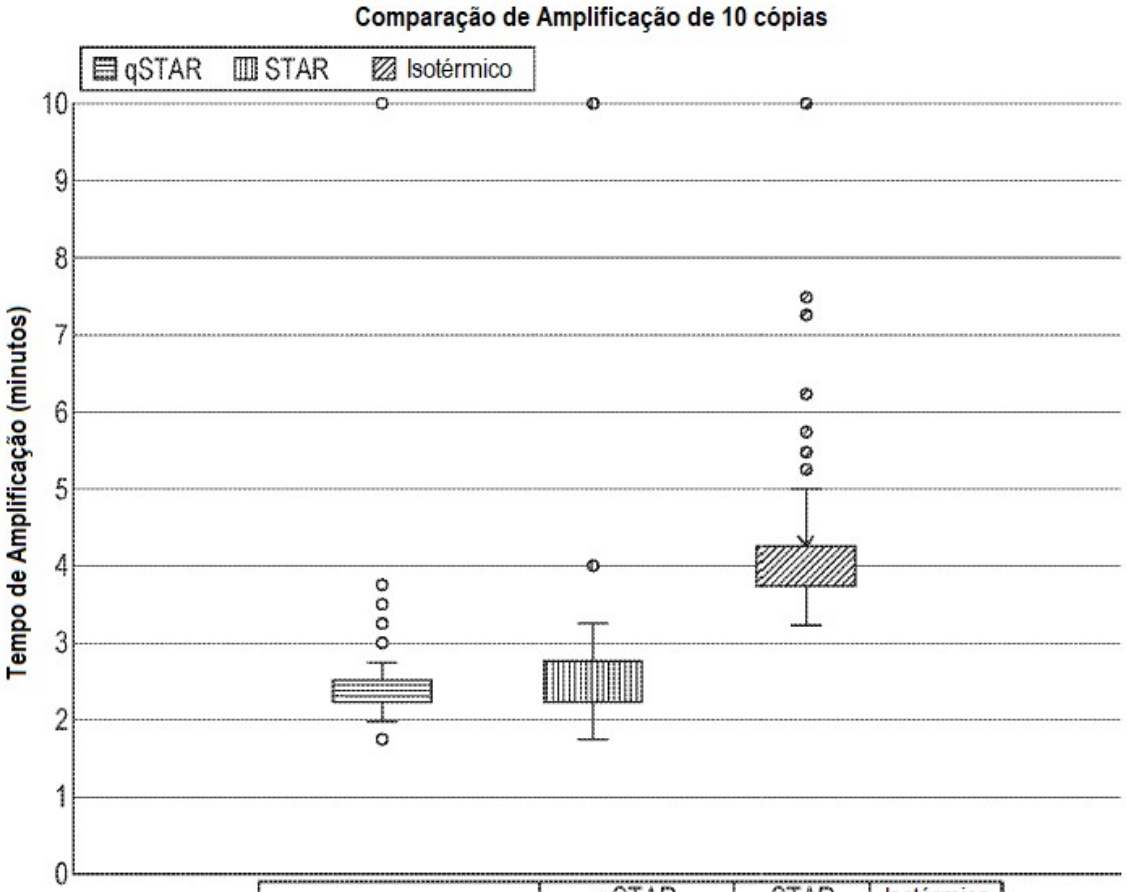

Exemplo 3 – Iniciadores de 2' O-Metila de Sete Bases
Fluorescência Subtraída de Fundo
50000
40000
30000
20000
10000
0
Tempo (s)
13,4
26,8
40,2
53,6
67
80,4
93,8
107,2
120,6
134
147,4
160,8
174,2
187,6
201
214,4
227,8
241,2
254,6
268
281,4
294,8
308,2
321,6
335
348,4
361,8
20cp
200cp
2Kcp
20Kcp
200Kcp
2Mcp
ntc

FIG. 5C



	qSTAR	STAR	Isotérmico
Correspondência	107	103	101
Divergência	1	1	3
Sensibilidade	99,07%	99,04%	97,12%
At(minutos) médio	2.38	2.47	4.12

FIG. 6

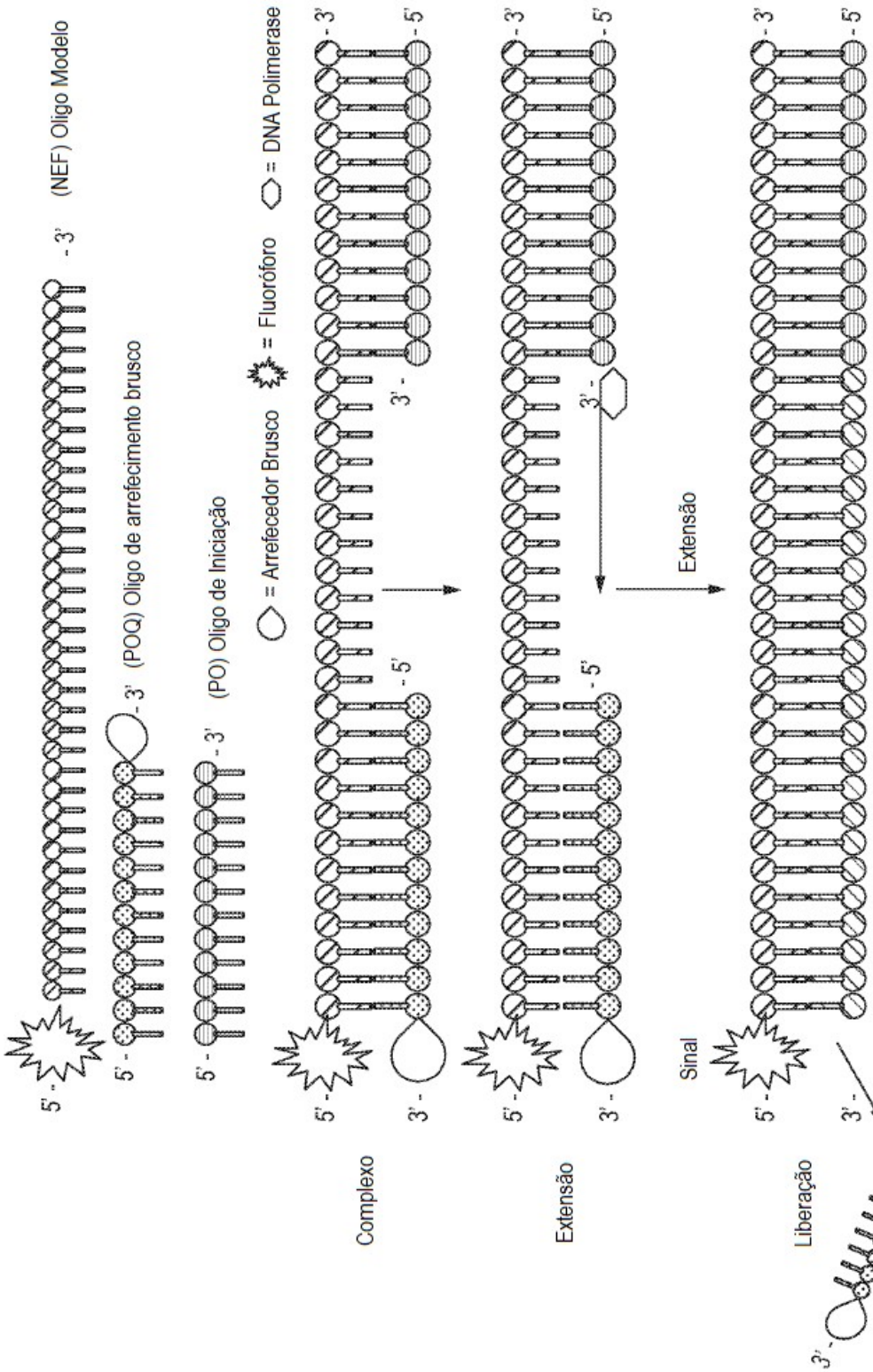

5' -
- 3'
(NEF) Oligo Modelo
5' -
- 3'
(POQ) Oligo de arrefecimento brusco
5' -
- 3'
(PO) Oligo de Iniciação
= Arrefecedor Brusco
= Fluoróforo
= DNA Polimerase
Complexo
Extensão
Extensão
Sinal
Liberação
3' -
- 5'

FIG. 7

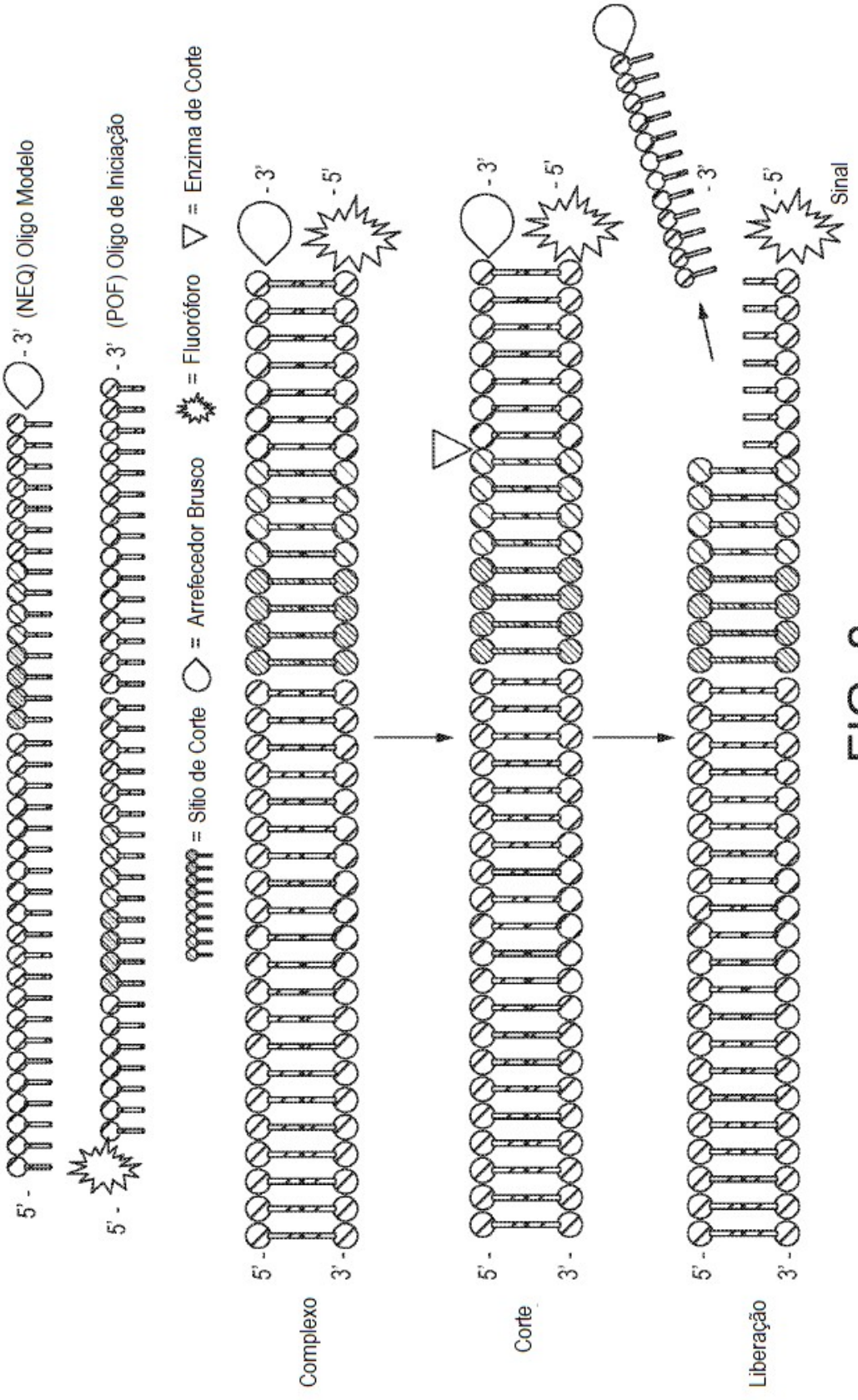

5' -
- 3' (NEQ) Oligo Modelo
5' -
- 3' (POF) Oligo de Iniciação
= Sitio de Corte
= Arrefecedor Brusco
= Fluoróforo
= Enzima de Corte
- 3'
- 5'
5' -
3' -
Complexo
- 3'
- 5'
5' -
3' -
Corte
- 3'
- 5'
Sinal
5' -
3' -
Liberação

FIG. 8

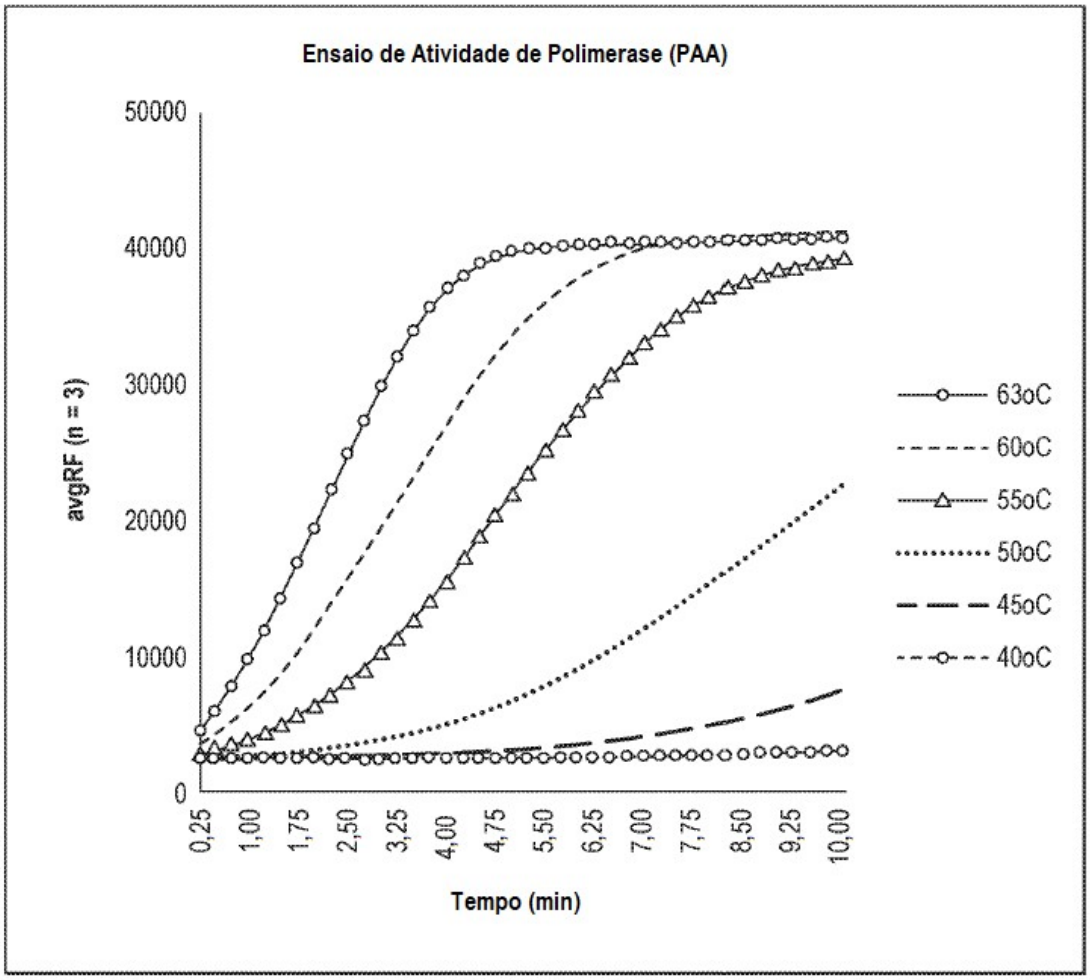

Ensaio de Atividade de Polimerase (PAA)
avgRF (n = 3)
50000
40000
30000
20000
10000
0
0,25
1,00
1,75
2,50
3,25
4,00
4,75
5,50
6,25
7,00
7,75
8,50
9,25
10,00
Tempo (min)
63oC
60oC
55oC
50oC
45oC
40oC

FIG. 9A

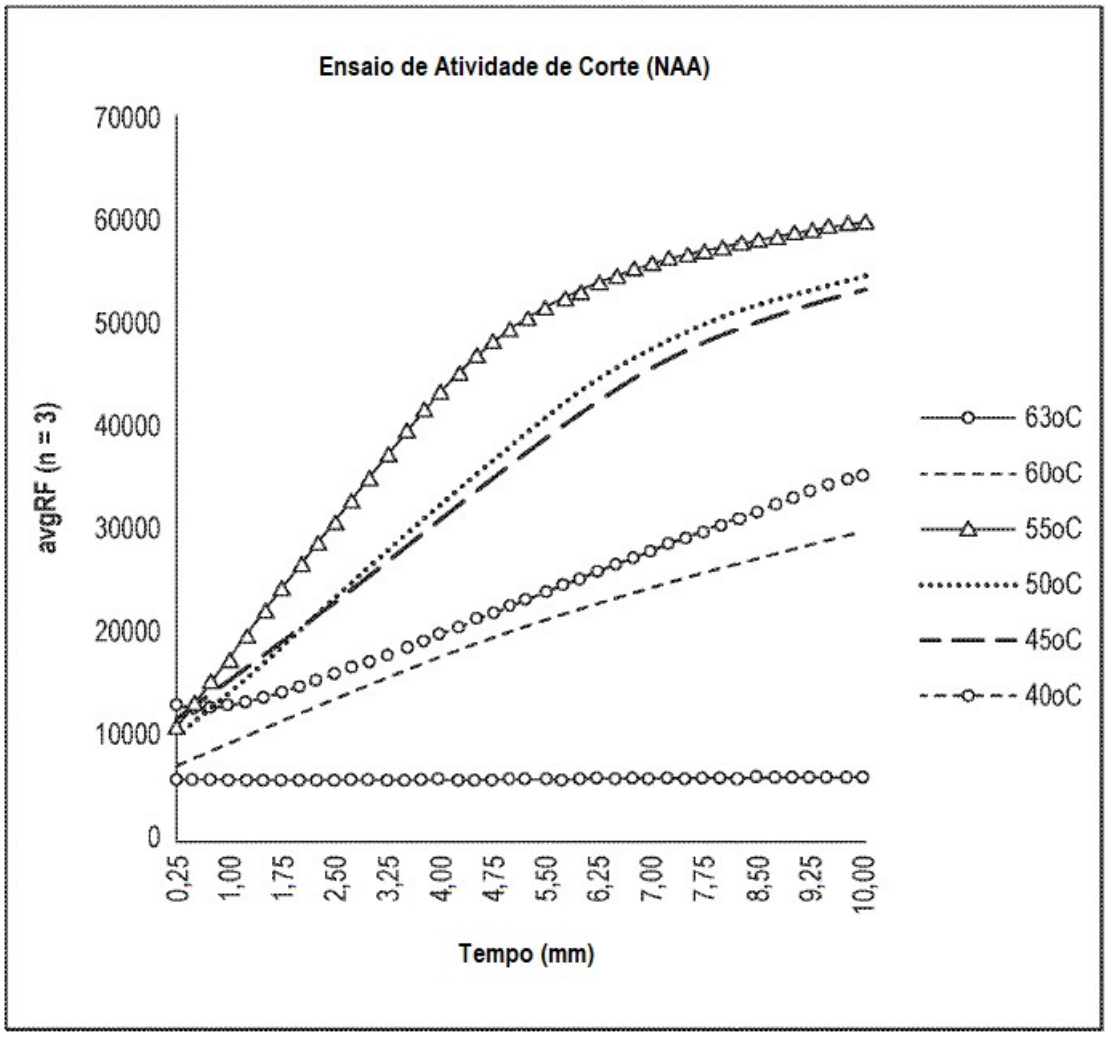

Ensaio de Atividade de Corte (NAA)
avgRF (n = 3)
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0,25
1,00
1,75
2,50
3,25
4,00
4,75
5,50
6,25
7,00
7,75
8,50
9,25
10,00
Tempo (mm)
63oC
60oC
55oC
50oC
45oC
40oC

FIG. 9B

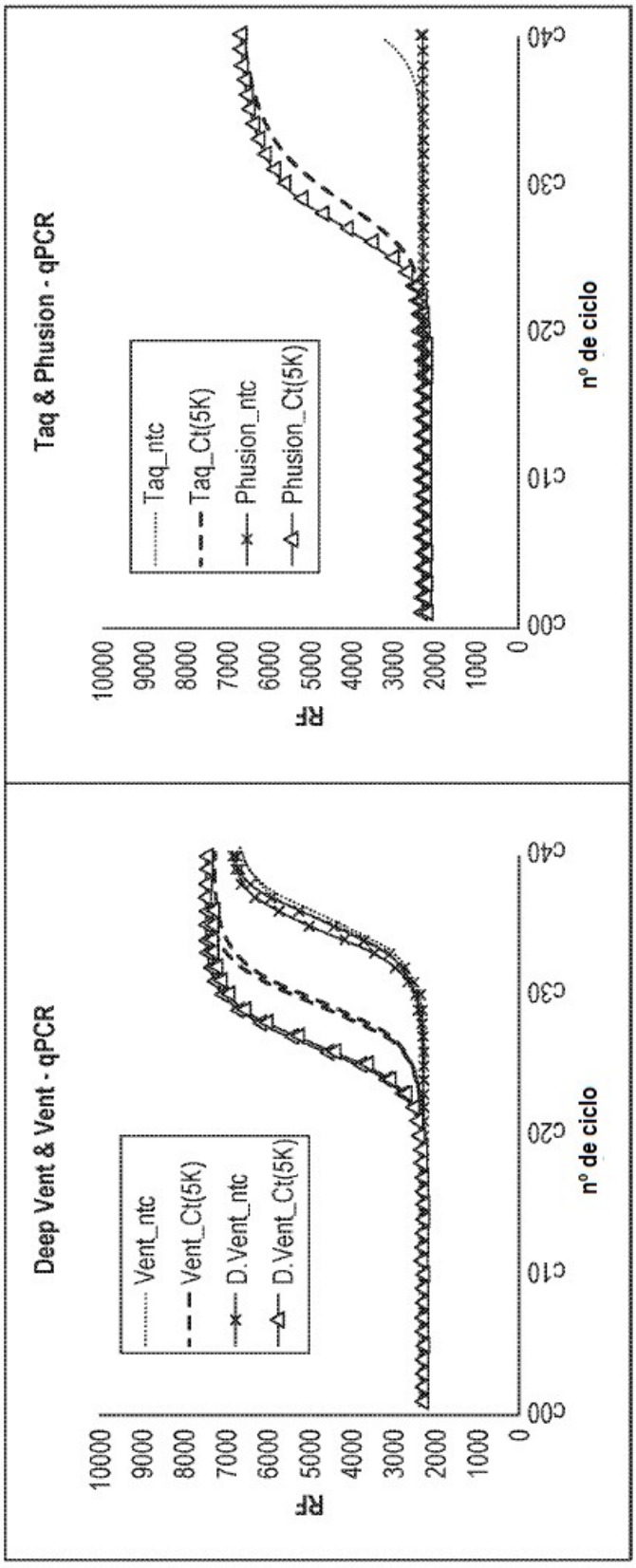


FIG. 10A

FIG. 10B

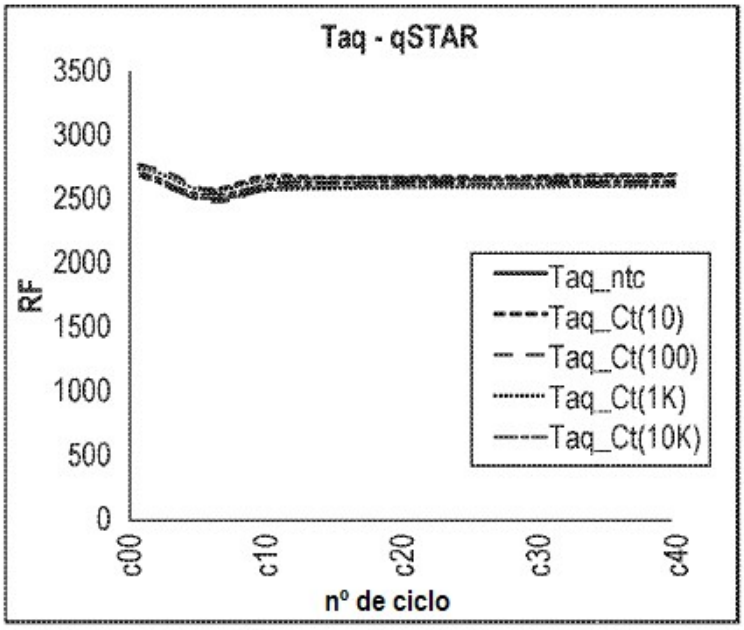


FIG. 11A

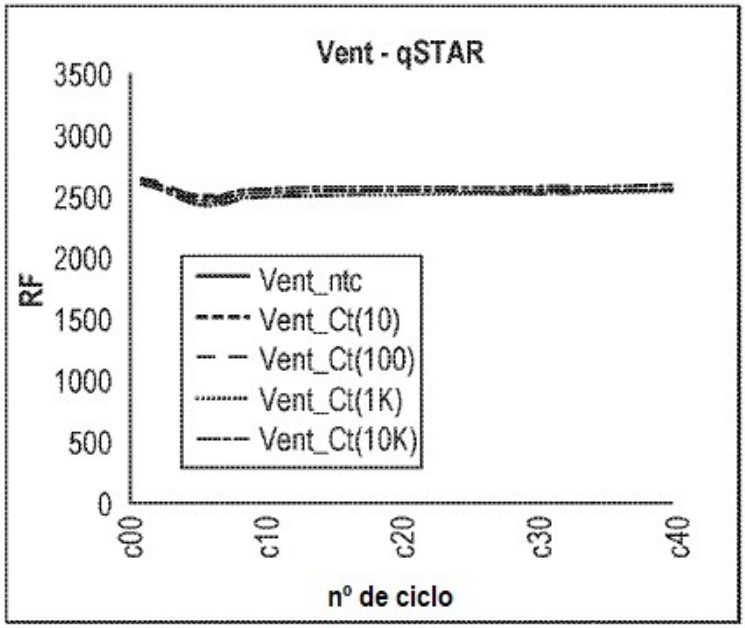


FIG. 11B

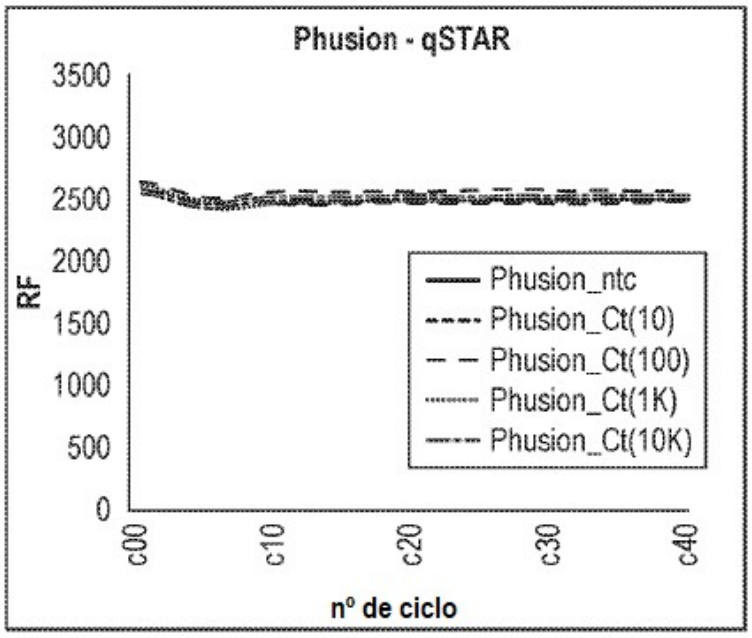


FIG. 11C

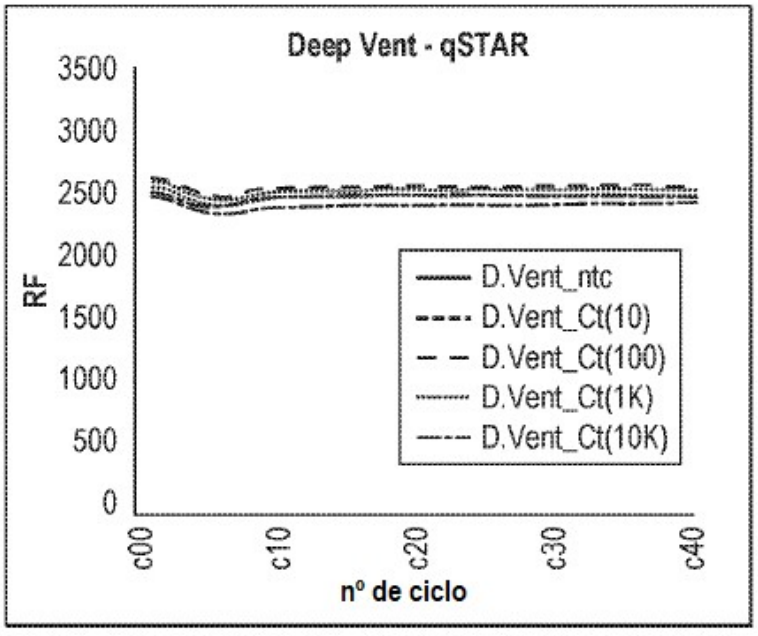
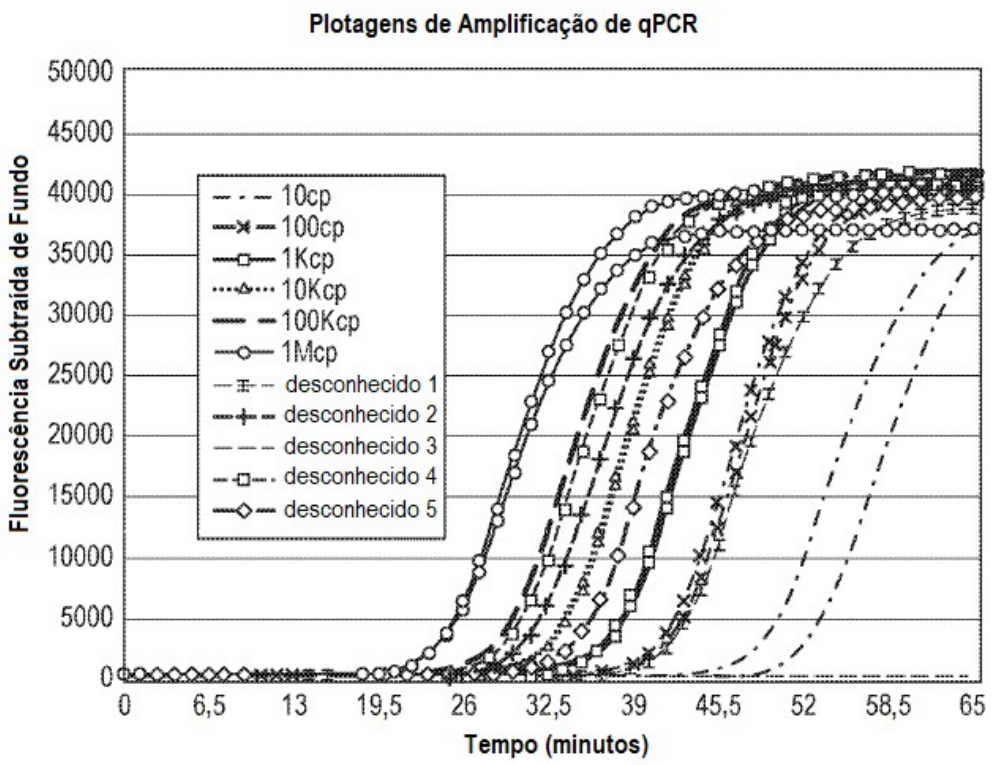


FIG. 11D

Amostras Desconhecidas de Teste Quantitativo
Exemplificativo de qPCR



Amostra	Nº de Cópias Adicionadas	C (t)	Cópia/ul	Nº de Cópias Estimado
UNK01	250	30,79	4,74	114
UNK02	50000	22,46	10,73	45848
UNK03	0	nenhum Ct	0	0
UNK04	100000	21,42	11,48	96886
UNK05	8000	25,33	8,67	5816

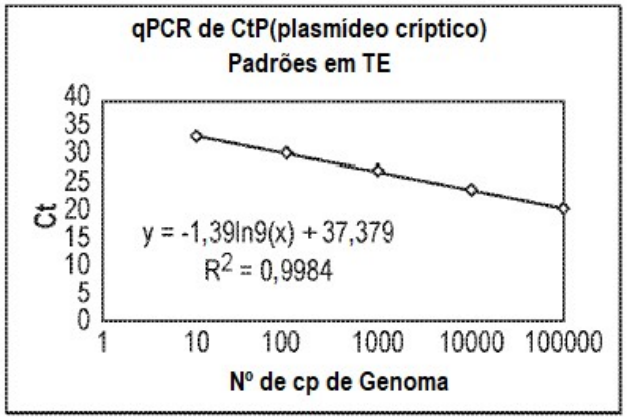
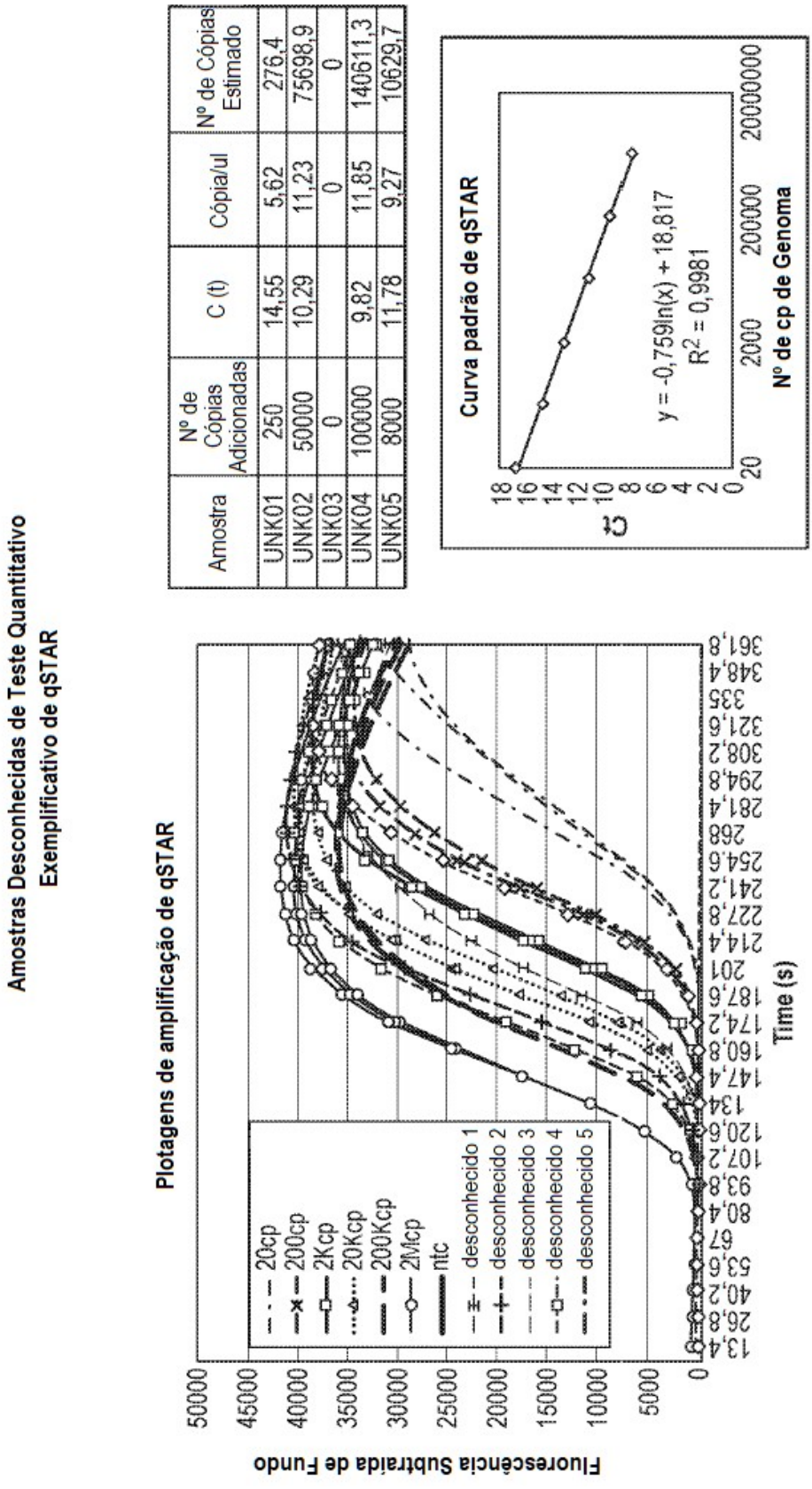


FIG. 12



Amostra	Nº de Cópias Adicionadas	C (t)	Cópia/ul	Nº de Cópias Estimado
UNK01	250	14,55	5,62	276,4
UNK02	50000	10,29	11,23	75698,9
UNK03	0		0	0
UNK04	100000	9,82	11,85	140611,3
UNK05	8000	11,78	9,27	10629,7

FIG. 13A

Sumário de Amostras Desconhecidas de Teste Quantitativo Exemplificativo

Tabela 2

Amostra	Nº de Cópias Adicionadas	Nº de Cópias Estimado de qPCR	Nº de Cópias Estimado de qSTAR
UNK01	250	114	276
UNK02	50000	45848	75699
UNK03	0	0	0
UNK04	100000	96886	140611
UNK05	8000	5816	10630

FIG. 13B

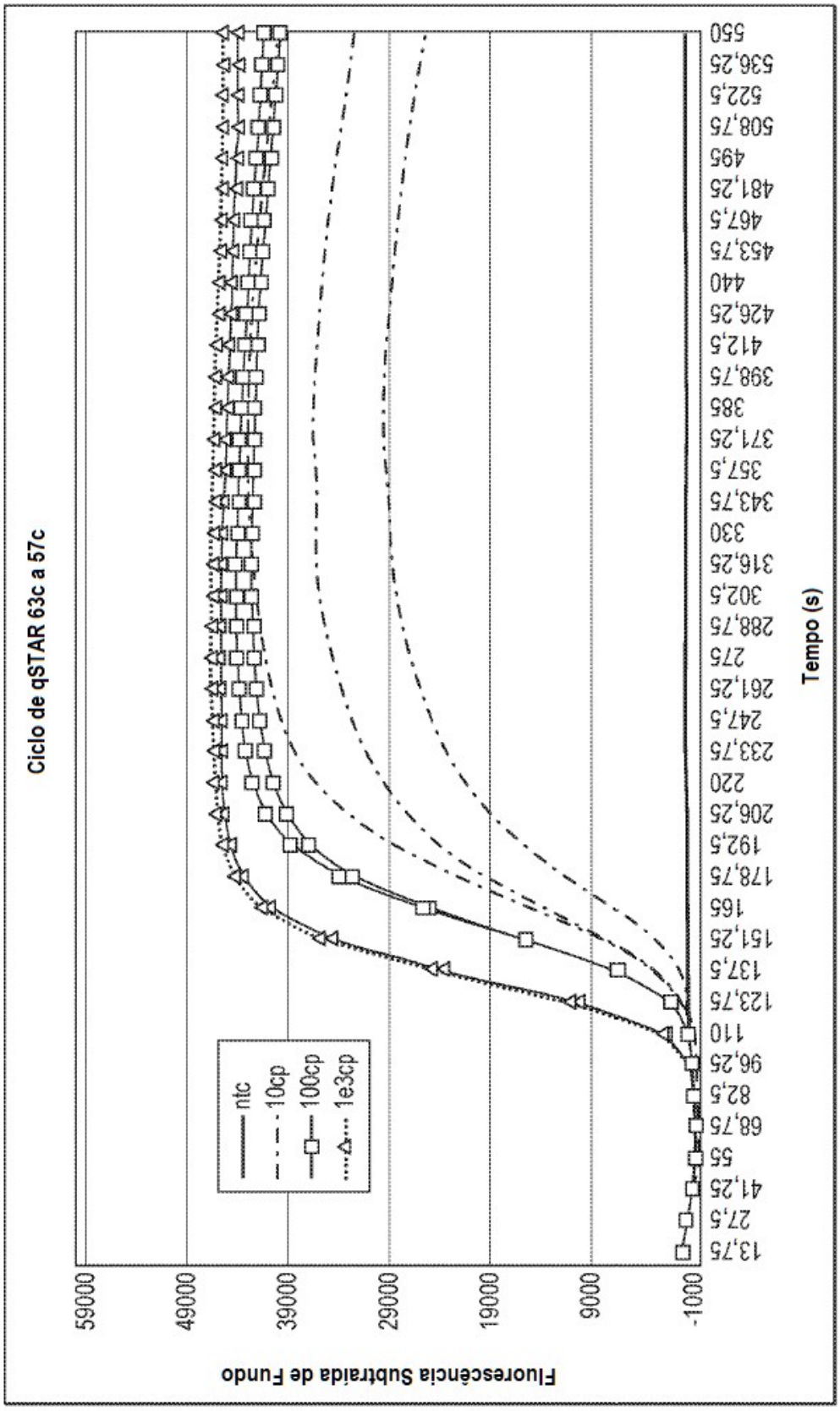

Ciclo de qSTAR 63c a 57c
Fluorescência Subtraída de Fundo
59000
49000
39000
29000
19000
9000
-1000
Tempo (s)
13,75
27,5
41,25
55
68,75
82,5
96,25
110
123,75
137,5
151,25
165
178,75
192,5
206,25
220
233,75
247,5
261,25
275
288,75
302,5
316,25
330
343,75
357,5
371,25
385
398,75
412,5
426,25
440
453,75
467,5
481,25
495
508,75
522,5
536,25
550
ntc
10cp
100cp
1e3cp

FIG. 14A

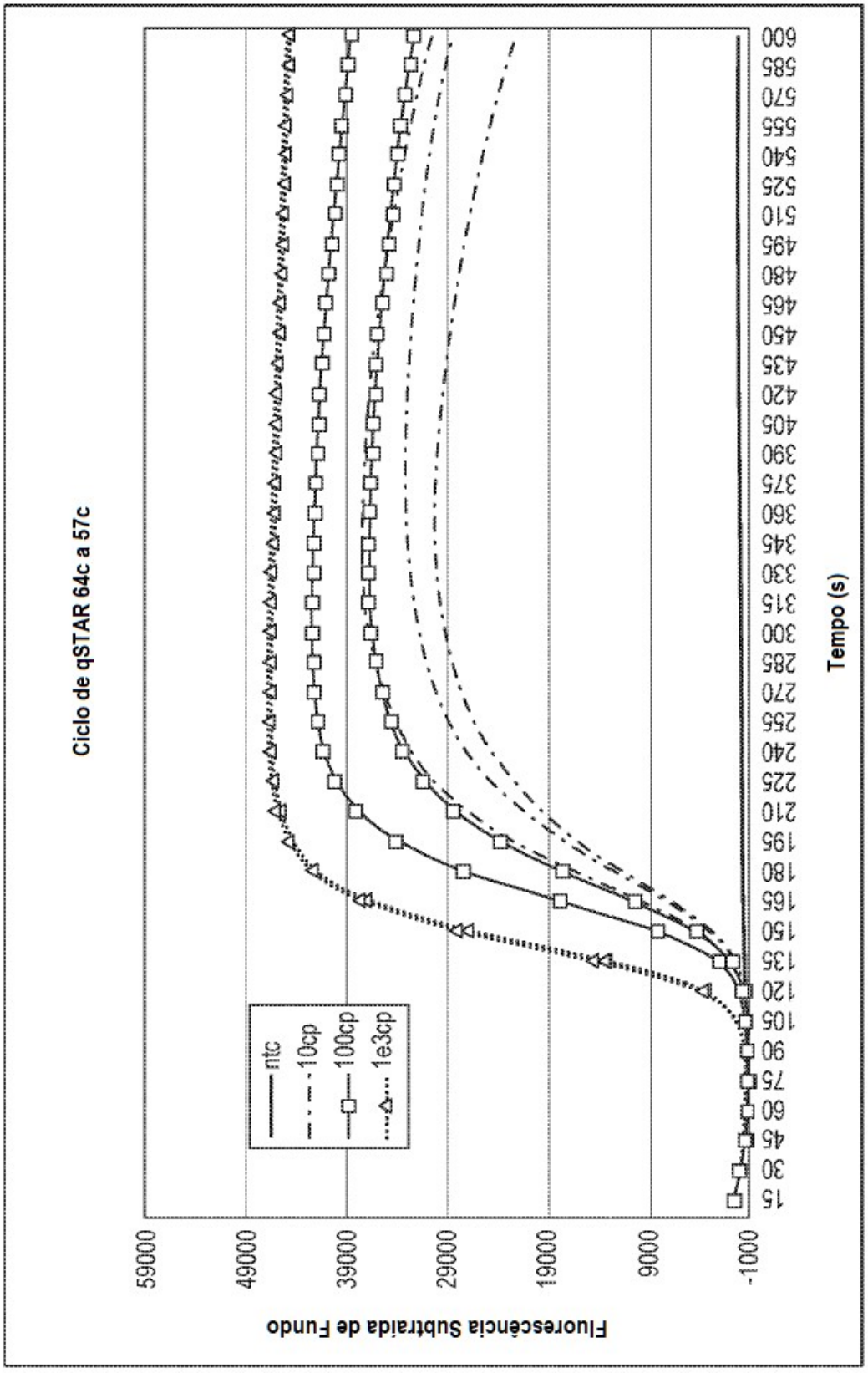

Ciclo de qSTAR 64c a 57c
Fluorescência Subtraída de Fundo
59000
49000
39000
29000
19000
9000
-1000
Tempo (s)
15
30
45
60
75
90
105
120
135
150
165
180
195
210
225
240
255
270
285
300
315
330
345
360
375
390
405
420
435
450
465
480
495
510
525
540
555
570
585
600
ntc
10cp
100cp
1e3cp

FIG. 14B

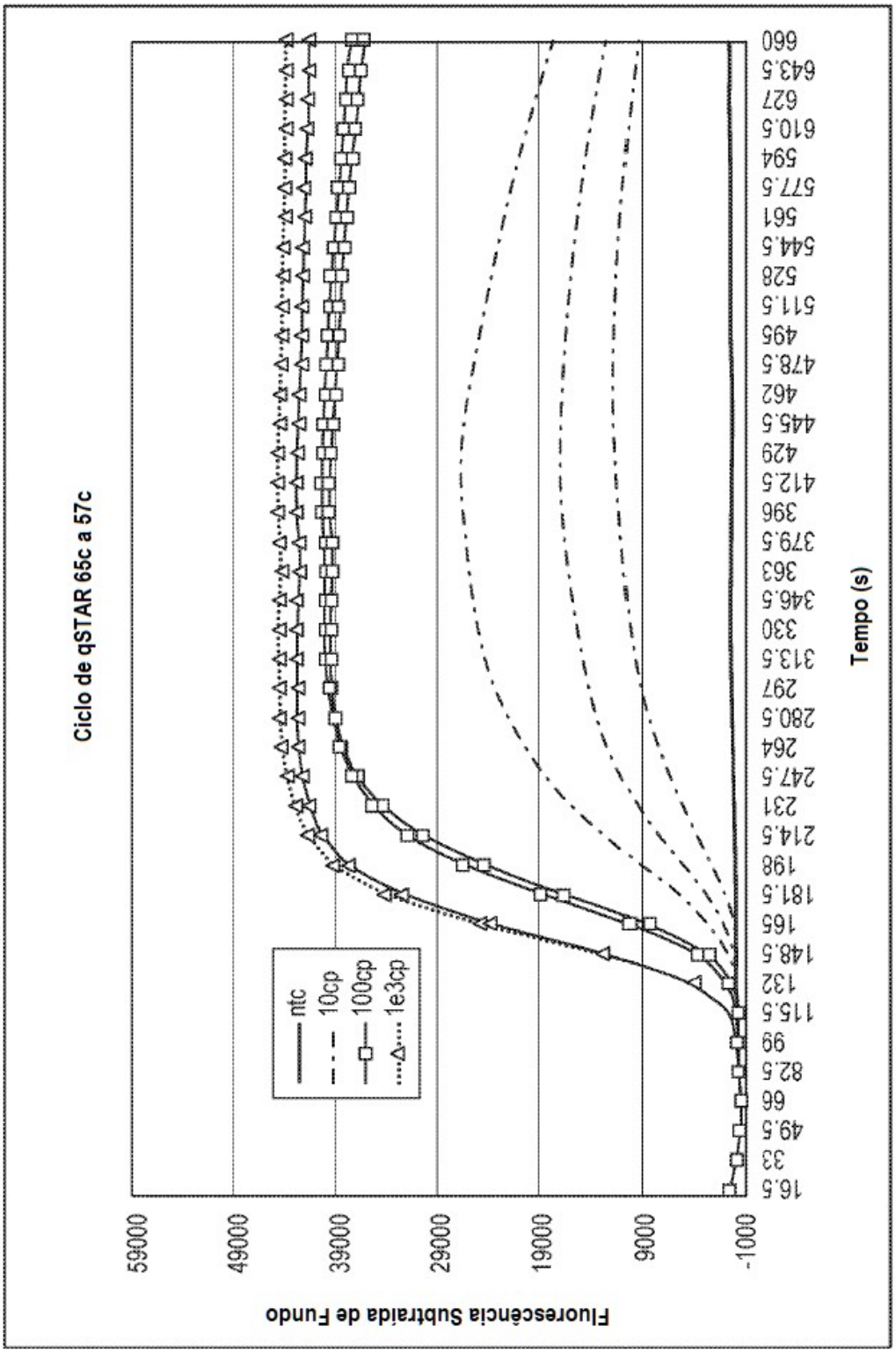

Ciclo de qSTAR 65c a 57c
Fluorescência Subtraída de Fundo
59000
49000
39000
29000
19000
9000
-1000
Tempo (s)
16.5
33
49.5
66
82.5
99
115.5
132
148.5
165
181.5
198
214.5
231
247.5
264
280.5
297
313.5
330
346.5
363
379.5
396
412.5
429
445.5
462
478.5
495
511.5
528
544.5
561
577.5
594
610.5
627
643.5
660
ntc
10cp
100cp
1e3cp

FIG. 14C

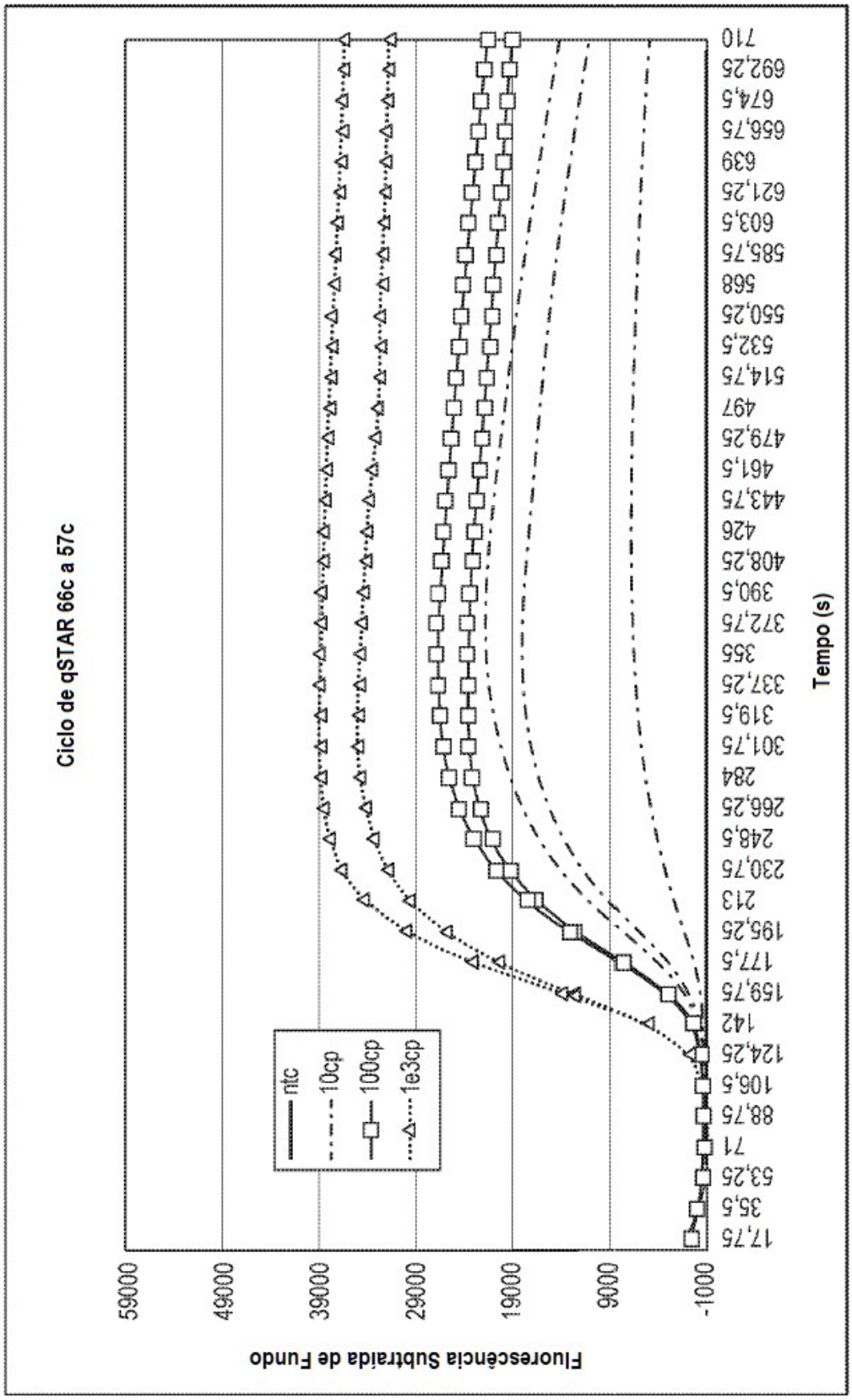

Ciclo de qSTAR 66c a 57c
Fluorescência Subtraída de Fundo
59000
49000
39000
29000
19000
9000
-1000
ntc
10cp
100cp
1e3cp
17,75
35,5
53,25
71
88,75
106,5
124,25
142
159,75
177,5
195,25
213
230,75
248,5
266,25
284
301,75
319,5
337,25
355
372,75
390,5
408,25
426
443,75
461,5
479,25
497
514,75
532,5
550,25
568
585,75
603,5
621,25
639
656,75
674,5
692,25
710
Tempo (s)

FIG. 14D

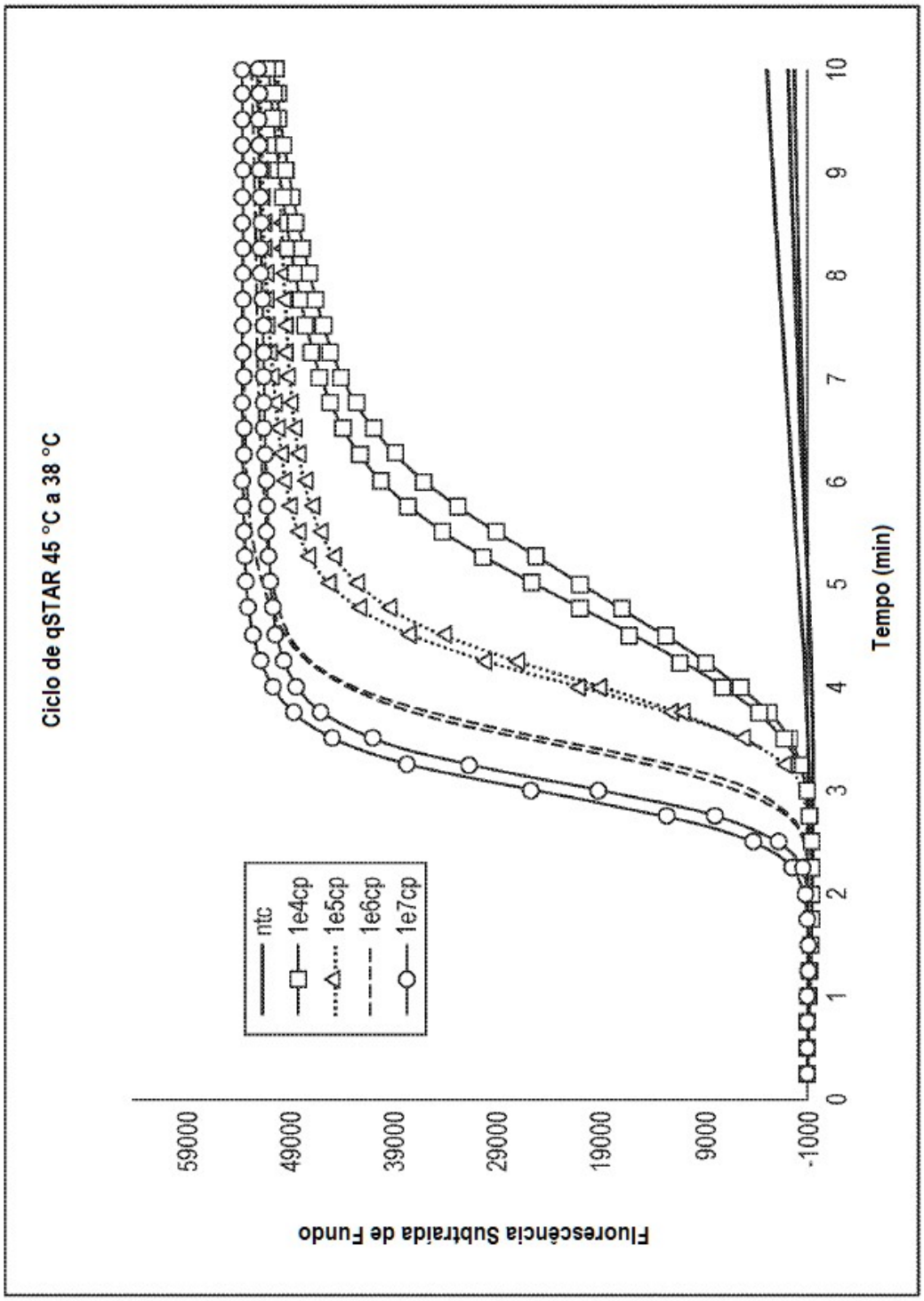

Ciclo de qSTAR 45 °C a 38 °C
Fluorescência Subtraída de Fundo
59000
49000
39000
29000
19000
9000
-1000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Tempo (min)
ntc
1e4cp
1e5cp
1e6cp
1e7cp

FIG. 15

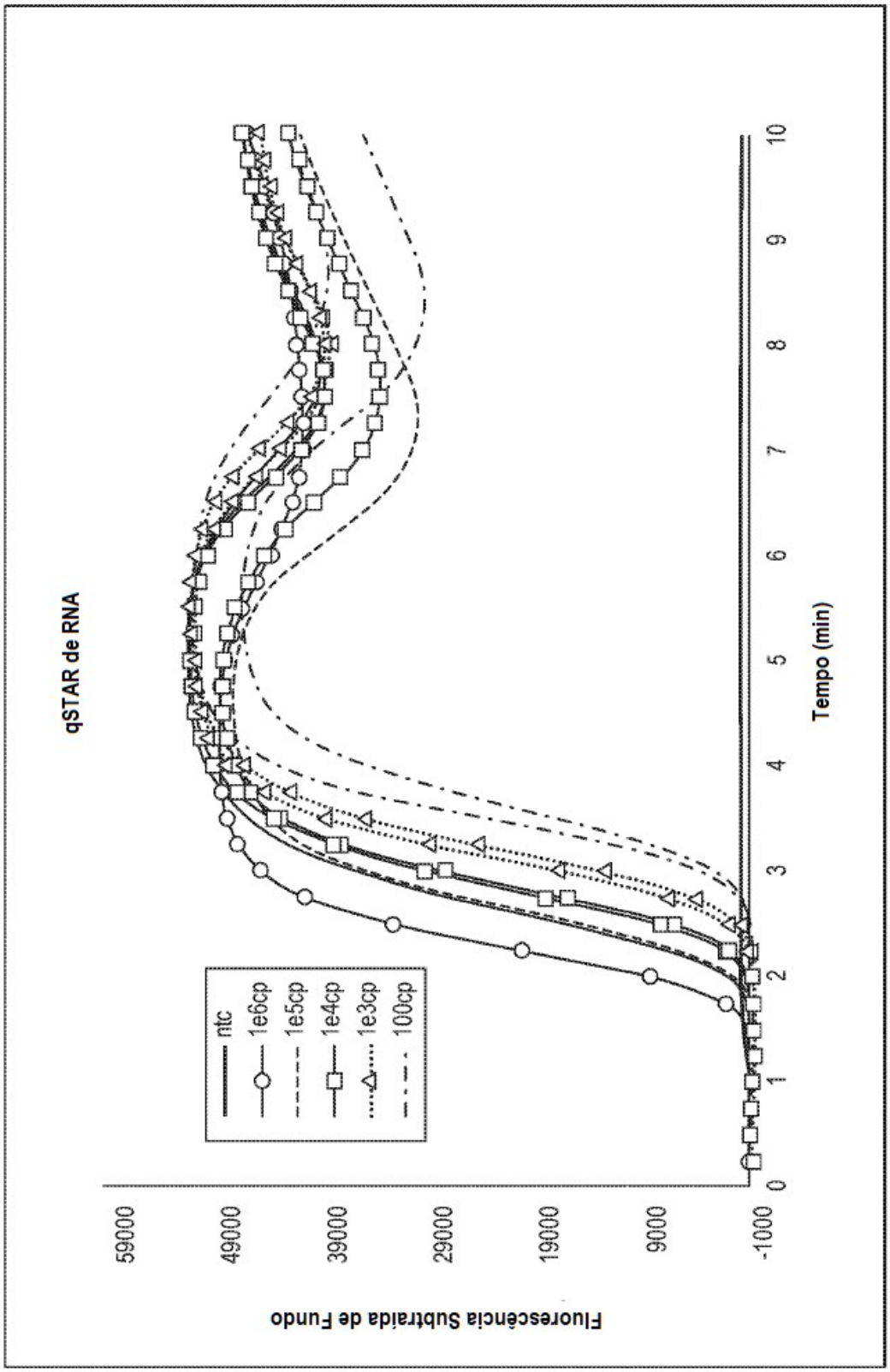

qSTAR de RNA
Fluorescência Subtraída de Fundo
Tempo (min)
59000
49000
39000
29000
19000
9000
-1000
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
ntc
1e6cp
1e5cp
1e4cp
1e3cp
100cp

FIG. 16

RESUMO

Patente de Invenção: **"MELHORAS NA OU EM RELAÇÃO À AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS".**

A presente invenção refere-se a um método para realizar uma reação de amplificação de ácido nucleico não isotérmica, em que o método compreende as etapas de: (a) misturar uma sequência-alvo com um ou mais iniciadores de fita simples complementares em condições que permitem um evento de hibridização em que os iniciadores se hibridizam ao alvo, sendo que esse evento de hibridização, direta ou indiretamente, leva à formação de uma estrutura de dúplex que compreende dois sítios de corte dispostos nas extremidades opostas do dúplex, ou próximo a elas; e realizar um processo de amplificação ao; (b) usar uma enzima de corte para causar um corte em cada um dos ditos sítios de corte nas fitas do dúplex; (c) usar uma polimerase para estender as fitas cortadas de modo a formar ácido nucleico recém-sintetizado, cuja extensão com a polimerase recria sítios de corte; (d) repetir as etapas (b) e (c) conforme desejável, de modo a causar a produção de múltiplas cópias do ácido nucleico recém-sintetizado; caracterizado pela temperatura em que o método é realizado ser não isotérmica e ser submetida à oscilação, uma pluralidade de vezes, entre uma temperatura superior e uma temperatura inferior durante o processo de amplificação das etapas (b) a (d), em que, na temperatura superior, uma dentre a dita polimerase ou enzima de corte é mais ativa do que a outra dentre as ditas enzimas, de modo que haja uma disparidade na atividade das enzimas, e na temperatura inferior, a disparidade na atividade das enzimas seja reduzida ou invertida.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUÊNCIA P247705.TXT
- Data de Geração do Código: 26/06/2020
- Hora de Geração do Código: 15:44:38
- Código de Controle:
  - Campo 1: 0C9D9C92249A442B
  - Campo 2: 3C2F4625118B7144