



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

(21) BR 112020005121-7 A2



(22) Data do Depósito: 14/09/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 24/09/2020

(54) **Título:** DETECÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO PELA POLIMERASE RECOMBINASE USANDO SONDA DE DUPLO HAPTENO

(51) **Int. Cl.:** C12Q 1/6858; C12Q 1/683; C12Q 1/6844; C12Q 1/6853; C12Q 1/6874.

(71) **Depositante(es):** ALERE SAN DIEGO INC..

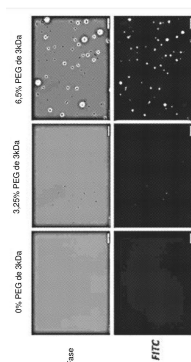
(72) **Inventor(es):** MICHAEL L. POWELL; FRANK RAY BOWLER; CATHERINE JEAN GREENWOOD; OLAF PIEPENBURG; NIAL A. ARMES.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2018051078 de 14/09/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/055780 de 21/03/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 13/03/2020

(57) **Resumo:** Esta divulgação refere-se a métodos e composições para detectar uma sequência de ácido nucleico alvo usando uma sonda de duplo hapteno. Mais especificamente, a presente divulgação refere-se ao uso da amplificação pela polimerase recombinase (RPA) e uma sonda de duplo hapteno para detectar uma sequência de ácido nucleico alvo. Em alguns casos, a detecção ocorre nas faixas de fluxo laterais.



DETECÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO PELA POLIMERASE RECOMBINASE USANDO SONDA DE DUPLO HAPTENO

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente US 62/558.705, intitulado “DETECÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO PELA POLIMERASE RECOMBINASE USANDO SONDA DUPLA-HAPTENO”, depositado em 14 de setembro de 2017, que é incorporado por referência na sua totalidade.

CAMPO TÉCNICO

[0002] Esta divulgação refere-se a métodos e composições para detectar uma sequência de ácido nucleico alvo usando uma sonda de duplo hapteno. Mais especificamente, a presente divulgação refere-se a métodos e composições para o uso da amplificação pela polimerase recombinase (RPA) e uma sonda de duplo hapteno para detectar uma sequência de ácido nucleico alvo. Em alguns casos, a detecção ocorre nas faixas de fluxo laterais.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0003] Certos métodos de amplificação isotérmicos têm capacidade de amplificar o ácido nucleico alvo a partir dos níveis vestigiais até níveis muito altos e detectáveis em questão de minutos. Tais métodos isotérmicos, por exemplo, a Amplificação pela Polimerase Recombinase (RPA) pode permitir que os usuários detectem uma sequência em particular em quantidades vestigiais, facilitando o teste no ponto de atendimento e aumentando a acessibilidade e a velocidade dos diagnósticos.

[0004] A RPA demonstrou ser adequada para uso em instalações não laboratoriais, com sensibilidades relatadas comparáveis aos diagnósticos baseados em PCR e detecção em tempo real do DNA alvo. No entanto, esses ensaios permanecem mais adequados para uso em instalações laboratoriais ou com uma configuração do tipo 'lab-in-a-suitcase'. Portanto, vários grupos desenvolveram ensaios de fluxo lateral,

para situações em que apenas dados qualitativos são necessários. Os testes de fluxo lateral são relativamente simples de serem executados para uso pessoal não treinado/uso doméstico e são um dos formatos preferidos para uso em instalações com recursos limitados, pois não requerem equipamentos caros para serem executados. A tecnologia de fluxo lateral, no entanto, ainda requer várias manipulações, incluindo etapas de diluição antes da análise de fluxo lateral. Permanece a necessidade de uma abordagem simplificada para o uso da amplificação de RPA e detecção de fluxo lateral, reduzindo o número de manipulações necessárias. Essa melhoria apresentaria benefícios na fabricação de consumíveis para ensaios de fluxo lateral de RPA, permitindo a simplificação do dispositivo de teste e, assim, custos de consumíveis reduzidos, tornando esses ensaios mais adequados para uso fora do laboratório.

SUMÁRIO

[0005] Esta divulgação é baseada, pelo menos em parte, na descoberta de que a RPA de uma sequência de ácido nucleico alvo pode ser detectada com precisão e eficiência em uma faixa de fluxo lateral sem etapa de diluição, usando uma sonda de duplo hapteno. Em vista desta descoberta, são fornecidas neste documento composições e métodos de RPA para detectar a presença ou ausência de um ácido nucleico alvo usando uma sonda de duplo hapteno. Estas sequências alvo de ácido nucleico podem ser diagnósticas de doença ou distúrbio.

[0006] Em um aspecto, esta divulgação apresenta uma composição de amplificação pela polimerase recombinase compreendendo, consistindo em ou consistindo essencialmente de um agente de aglomeração; uma sonda oligonucleotídica com um grupo lábil de duplo hapteno; e uma enzima nuclease. Em outro aspecto, esta divulgação apresenta uma composição de amplificação pela polimerase de recombinase para uso na análise de fluxo lateral de um ácido nucleico alvo presente em uma amostra que não requer diluição da mistura de

amplificação antes da separação de produtos de amplificação em uma tira de teste de fluxo lateral, compreendendo: consistindo em, ou consistindo essencialmente de um agente de aglomeração; uma sonda oligonucleotídica com um grupo lábil de duplo hapteno; e uma enzima nuclease.

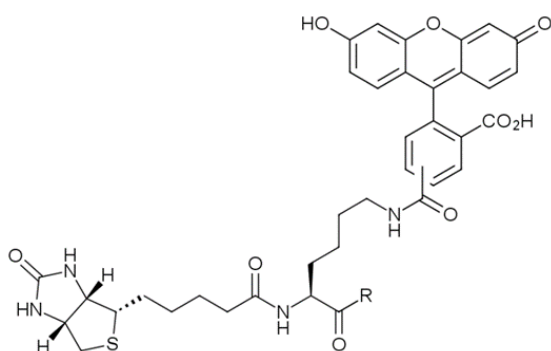
[0007] Em algumas modalidades de todos os aspectos, o agente de aglomeração das composições e métodos descritos neste documento compreende, consiste em ou consiste essencialmente em polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), Ficoll ou dextrano. Em algumas modalidades, o agente de aglomeração tem um peso molecular de pelo menos 1 kilodalton, pelo menos 2 kilodaltons, pelo menos 3 kilodaltons, pelo menos 4 kilodaltons, pelo menos 5 kilodaltons, pelo menos 6 kilodaltons, em pelo menos 8 kilodaltons, ou pelo menos 10 kilodaltons. Em algumas modalidades de todos os aspectos, o agente de aglomeração está presente na composição a uma concentração de pelo menos 15% v/v, uma concentração de pelo menos 12% v/v, uma concentração de pelo menos 10% v/v, a concentração de pelo menos 8% v/v, pelo menos 6% v/v, uma concentração de pelo menos 5% v/v, uma concentração de pelo menos 4% v/v ou uma concentração de pelo menos 3% v/v. Em algumas modalidades de todos os aspectos, o agente de aglomeração tem um perfil de viscosidade a 20 graus Celsius menor ou igual a 5mPa/s, menor ou igual a 4mPa/s, menor ou igual a 3mPa/s, menor ou igual a 2mPa/s ou menor ou igual a 1mPa/s. Em algumas modalidades de todos os aspectos, o agente de aglomeração é PEG tendo uma viscosidade a 20 graus Celsius é menor ou igual a 3 mPa/s. Em algumas modalidades de todos os aspectos, o agente de aglomeração é o PEG tendo um peso molecular de 3 kilodaltons e em que o PEG está na concentração de 6,5% v/v.

[0008] Em algumas modalidades de todos os aspectos, a sonda oligonucleotídica das composições e métodos descritos neste documento

compreende um nucleotídeo dR-O-[C]_n que carece de uma base ligando o grupo lábil ao oligonucleotídeo. Em algumas modalidades de todos os aspectos, a sonda oligonucleotídica com um duplo hapteno, quando clivada pela DNA glicosilase de formamidopirimidina quando a sonda oligonucleotídica é hibridizada a uma sequência nucleotídica complementar, libera o grupo lábil do duplo hapteno. Em algumas modalidades de todos os aspectos, o grupo lábil de duplo hapteno compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em dois grupos imunogênicos com epítomos diferentes. Em algumas modalidades de todos os aspectos, os grupos imunogênicos compreendem, consistem ou consistem essencialmente em um grupo fluorescente, uma enzima ou fragmento do mesmo, um peptídeo ou fragmento do mesmo, biotina. Em algumas modalidades de todos os aspectos, os grupos imunogênicos são selecionados a partir do grupo que compreende biotina, fluoresceína, digoxigenina ou dinitrofenil.

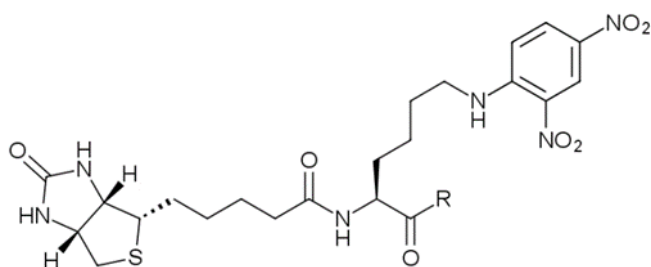
[0009] Em algumas modalidades de todos os aspectos, a nuclease das composições e métodos descritos neste documento é formamidopirimidina DNA glicosilase.

[0010] Em outro aspecto, esta divulgação apresenta composições que compreendem, consistem em ou consistem essencialmente em:



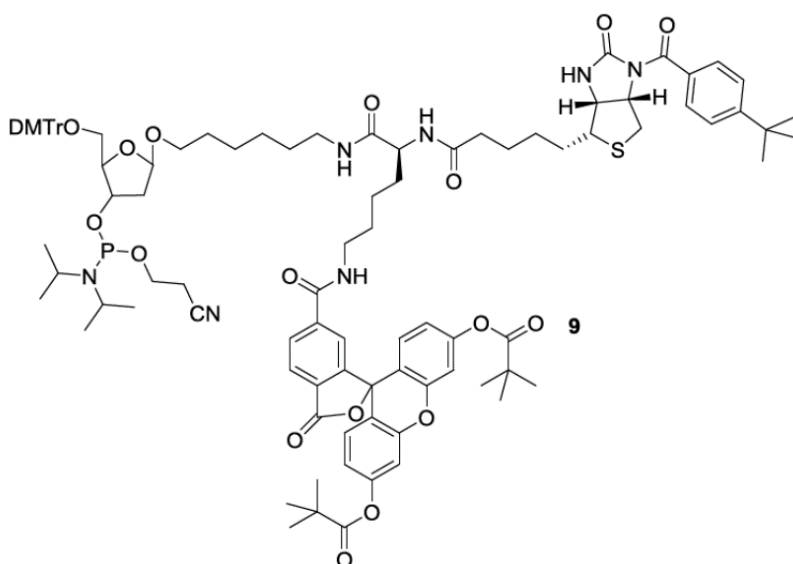
, em que R é OH ou -NH(CH₂)₆OH.

[0011] Em outro aspecto, esta divulgação apresenta composições que compreendem, consistem em ou consistem essencialmente em:



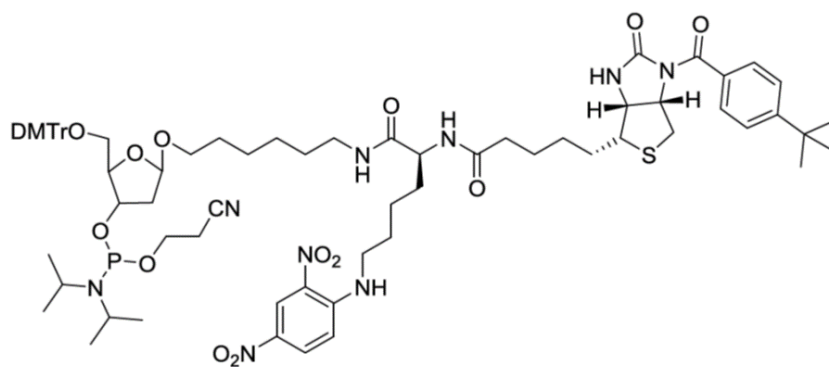
, em que R é OH ou -NH(CH₂)₆OH.

[0012] Em outro aspecto, esta divulgação apresenta composições que compreendem, consistem em ou consistem essencialmente em:



em que DMTr é dimetoxitritil.

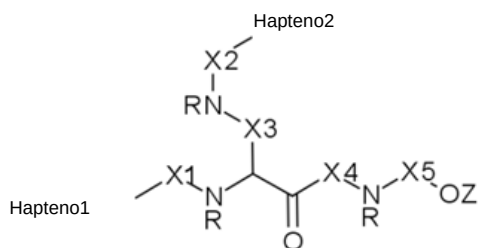
[0013] Em outro aspecto, esta divulgação apresenta composições que compreendem, consistem em ou consistem essencialmente em:



em que

DMTr é dimetoxitritil.

[0014] Em outro aspecto, esta divulgação apresenta composições que compreendem, consistem em ou consistem essencialmente em:



, em que: Hapteno1 e Hapteno2 são grupos imunogênicos conforme descrito neste documento; Z é selecionado dentre: (i) um C1' de um anel ribose ou desoxirribose básico dentro do contexto de um oligonucleotídeo de RNA ou DNA, respectivamente; com uma configuração beta no átomo de carbono anomérico; (ii) um composto fosforamidito configurado para se ligar a um oligonucleotídeo de DNA ou RNA; e em que quando Z é um fosforamidito de DNA ou RNA, os grupos reativos de Hapteno1 e Hapteno2 podem opcionalmente ser protegidos com pivaloíla; terc-butilbenzoíla; acila; benzoíla; ou isobutirila; R representa hidrogênio ou C1 a C6 alquil linear ou ramificado; X1, X2 e X4 são grupos de ligação que podem estar ausentes independentemente ou ser C1 a C12 alquil linear ou ramificado, que pode ser opcionalmente interrompido por um ou mais grupos -O-, -C(=O)- ou -NR-; X3 é C1 a C6 alquil linear ou ramificado; e X5 é C1 a C12 alquil linear ou ramificado, que é opcionalmente interrompido por um ou mais grupos -O-, -C(=O)- ou -NR-.

[0015] Em algumas modalidades, a sonda de oligonucleotídeo é clivável por uma exonuclease, e o oligonucleotídeo libera o grupo lábil de duplo hapteno quando clivado. Em algumas modalidades, a exonuclease é exonuclease III. Em algumas modalidades, a sonda oligonucleotídica tem a estrutura 5'X(n)_aL(n)_bH(n)_cB3', em que n são nucleotídeos, a, b e c são números inteiros, X é um 5' hexil, H é um resíduo THF, B é um espaçador

C3, e L é um modificador ramificado compreendendo uma pluralidade de haptenos. Em algumas modalidades, os haptenos são, por exemplo, DNP e Biotina, embora outros haptenos possam ser utilizados (por exemplo, FAM). Em algumas modalidades, a sonda oligonucleotídica compreende uma ligação de fosforotioato entre os haptenos. Em algumas modalidades, a e c são pelo menos 15 nucleotídeos. Em algumas modalidades, b é zero. Em algumas modalidades, a é aproximadamente 15 e c é aproximadamente 30. Em algumas modalidades, a sonda oligonucleotídica é complementar ao ácido nucleico alvo. Em algumas modalidades, L substitui um nucleotídeo de citosina.

[0016] Em outro aspecto, esta divulgação apresenta dispositivos que compreendendo, consistindo em, ou consistindo essencialmente em: uma faixa de fluxo lateral, compreendendo, consistindo em ou consistindo essencialmente em uma zona de aplicação de amostra; uma zona de reagente a jusante da zona de aplicação de amostra e em comunicação fluida com a mesma, sendo que a zona de reagente compreende a composição de reagente de RPA seco para amplificar um ácido nucleico alvo, um agente de ligação específico para um produto de ácido nucleico alvo amplificado e uma molécula de detecção; pelo menos uma zona de teste a jusante da zona de reagente e em comunicação fluida com a mesma, sendo que a zona de teste compreende uma molécula de captura imobilizada específica para o produto de ácido nucleico alvo amplificado; e uma zona de controle a jusante da zona de teste. Em algumas modalidades, os dispositivos fornecem RPA e detecção contínuos (por exemplo, simultâneos). Em algumas modalidades, os dispositivos compreendem uma almofada absorvente pesada na zona de teste.

[0017] Em algumas modalidades de todos os aspectos, a composição do reagente RPA seco compreende um agente de aglomeração, uma recombinase, uma polimerase, uma nuclease, uma sonda de duplo hapteno e uma molécula de detecção. Em algumas

modalidades de todos os aspectos, a sonda de duplo hapteno compreende um conjugado de biotina e carboxifluoresceína (FAM) ou biotina e dinitrofenil (DNP). Em algumas modalidades de todos os aspectos, a molécula de captura imobilizada específica para o ácido nucleico alvo amplificado é selecionada do grupo que consiste em uma molécula de captura anti-FAM ou uma molécula de captura anti-DNP. Em algumas modalidades de todos os aspectos, o anti-FAM ou o anti-DNP são selecionados independentemente do grupo que consiste em um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal e um fragmento de ligação funcional do mesmo, incluindo um FAB, um ScFv, um Fv ou um DAB. Em algumas modalidades, a molécula de detecção é selecionada do grupo que consiste em suspensões coloidais ("sol") de ouro, suspensões coloidais de prata, suspensões coloidais de látex, uma nanoesfera de celulose ou um nanostring de carbono.

[0018] Em algumas modalidades de todos os aspectos, a zona de controle compreende uma zona de ligação que indica a operação correta da faixa de fluxo lateral. Em algumas modalidades de todos os aspectos, a zona de controle compreende uma linha de captura de anticorpos anticamundongo.

[0019] Em outro aspecto, esta divulgação apresenta métodos para detectar produtos de amplificação que compreendem, consistem ou consistem essencialmente em: contatar uma amostra suspeita de conter um ácido nucleico alvo de interesse com reagentes RPA para amplificar o ácido nucleico alvo, uma sonda de oligonucleotídeo compreendendo uma sequência de ácido nucleico complementar ao ácido nucleico alvo e um grupo lábil de duplo hapteno covalentemente ligado e uma nuclease; amplificar o ácido nucleico alvo para produzir um produto de ácido nucleico alvo; e detectar o produto de ácido nucleico alvo detectando frações livres de duplo hapteno clivadas a partir da sonda oligonucleotídica hibridada com o ácido nucleico alvo.

[0020] Em algumas modalidades de todos os aspectos, os reagentes RPA estão localizados em uma zona de aplicação de amostra de uma faixa de fluxo lateral. Em algumas modalidades de todos os aspectos, a amplificação de ácido nucleico é realizada na faixa de fluxo lateral após o contato da amostra com os reagentes RPA para formar uma mistura de amplificação de ácido nucleico. Em algumas modalidades de todos os aspectos, a amplificação de ácido nucleico é realizada na faixa de fluxo lateral sem diluição ou adição de outro líquido à mistura RPA. Em algumas modalidades, a reação RPA e a detecção são simultâneas.

[0021] Em algumas modalidades de todos os aspectos, a fração de duplo hapteno clivada a partir da sonda oligonucleotídica é capturada seletivamente em uma zona de teste no fluxo lateral localizado a jusante da zona de aplicação de amostra. Em algumas modalidades de todos os aspectos, a sonda oligonucleotídica que compreende um duplo hapteno covalentemente ligado não é capturado seletivamente em uma zona de teste na faixa de fluxo lateral. Em algumas modalidades de todos os aspectos, a faixa de fluxo lateral compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em uma zona de teste e uma zona de controle, em que a zona de teste compreende, consiste em ou consiste essencialmente em um membro de par de ligação para captura de duplo hapteno clivado do oligonucleotídeo e a zona de controle compreende um membro de par de ligação para um controle interno. Em algumas modalidades de todos os aspectos, a zona de controle compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em um anticorpo anti-camundongo ou um fragmento do mesmo. Em algumas modalidades de todos os aspectos, a zona de teste compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em uma molécula de captura anti-DNP ou uma molécula de captura anti-FAM. Em algumas modalidades de todos os aspectos, a molécula de captura anti-FAM é selecionada do grupo que consiste em um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal e um fragmento de ligação funcional do mesmo. Em

algumas modalidades de todos os aspectos, a molécula de captura anti-DNP é selecionada do grupo que consiste em um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal ou um fragmento de ligação funcional do mesmo.

[0022] Em algumas modalidades de todos os aspectos, a detecção de produtos de amplificação compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em capturar o grupo lábil de duplo hapteno em uma zona de teste e marcar o grupo lábil de duplo hapteno capturado com uma molécula de detecção. Em algumas modalidades de todos os aspectos, a molécula de detecção é selecionada do grupo que consiste em um coloidal ("sol") de ouro, coloidal de prata, coloidal de látex, uma nanoesfera de celulose ou um nanostring de carbono.

[0023] Em outro aspecto, esta divulgação apresenta um método que compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em: aplicar uma amostra suspeita de conter o ácido nucleico alvo a uma faixa de fluxo lateral; entrar em contato com a amostra com uma mistura de reagentes RPA para amplificar o ácido nucleico alvo seco em uma zona reagente da faixa de fluxo lateral; e detectar produtos de amplificação, se presentes, em uma zona de teste da faixa de fluxo lateral.

[0024] Em algumas modalidades de todos os aspectos, a amostra suspeita de conter um ácido nucleico alvo é aplicada a uma zona de aplicação de uma faixa de fluxo lateral. Em algumas modalidades de todos os aspectos, a mistura de reagentes RPA compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em um agente de aglomeração, uma recombinase, uma polimerase, uma nuclease e uma sonda oligonucleotídica de dois haptenos.

[0025] Em algumas modalidades de todos os aspectos, o agente de aglomeração é selecionado a partir do grupo que consiste em polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), Ficoll e dextrano. Em algumas modalidades, o agente de aglomeração tem um peso molecular de pelo menos 1 kilodalton, pelo menos 2 kilodaltons,

pelo menos 3 kilodaltons, pelo menos 4 kilodaltons, pelo menos 5 kilodaltons, pelo menos 6 kilodaltons, em pelo menos 8 kilodaltons, ou pelo menos 10 kilodaltons. Em algumas modalidades, o agente de aglomeração está presente na mistura em uma concentração de pelo menos 15% v/v, pelo menos 12% v/v de concentração final, pelo menos 10% v/v, pelo menos 8% v/v, pelo menos 6% v/v, pelo menos 5% v/v, pelo menos 4% v/v, ou pelo menos 3% v/v de concentração final. Em algumas modalidades de todos os aspectos, o agente de aglomeração tem um perfil de viscosidade a 20 graus Celsius menor ou igual a 5mPa/s, menor ou igual a 4mPa/s, menor ou igual a 3mPa/s, menor ou igual a 2mPa/s ou menor ou igual a 1mPa/s. Em algumas modalidades de todos os aspectos, o agente de aglomeração é PEG e tem uma viscosidade a 20 graus Celsius menor ou igual a 3 mPa/s. Em algumas modalidades de todos os aspectos, o agente de aglomeração é PEG compreendendo peso molecular de 3 kilodaltons e em que o PEG está em uma concentração final de 6,5% v/v.

[0026] Em algumas modalidades de todos os aspectos, a detecção de produtos de amplificação, se presente, compreende, consiste em, ou consiste essencialmente em detectar uma fração de duplo hapteno clivada a partir da sonda de oligonucleotídeo hibridizada com os produtos de amplificação. Em algumas modalidades de todos os aspectos, a diluição da mistura RPA não é necessária antes da detecção de produtos de amplificação.

[0027] O termo "um ou mais" ou "pelo menos um", conforme usado na presente divulgação, representa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 compostos ou até mais.

[0028] Uma "amostra", conforme usada neste documento, refere-se a um material biológico que é isolado de seu ambiente (por exemplo, sangue ou tecido de um animal, células ou meio condicionado da cultura de tecidos) e é suspeito de conter ou conhecido por conter um analito ou outro material desejado. Uma amostra também pode ser uma

fração parcialmente purificada de um tecido ou fluido corporal, por exemplo, de um sujeito com uma doença ou condição específica. Uma amostra de referência pode ser uma amostra "normal", de um doador que não tem a doença ou condição. Uma amostra de referência também pode ser de um doador não tratado ou cultura de células não tratada com um agente ativo (por exemplo, nenhum tratamento ou administração apenas de veículo) ou não submetida a condições para induzir um estado de doença. Uma amostra de referência também pode ser retirada em um "ponto de tempo zero" antes de entrar em contato com a célula com o agente para ser testado.

[0029] Os títulos das seções usados neste documento são para fins organizacionais apenas e não devem ser interpretados como limitando o assunto descrito de qualquer modo. Quando as definições dos termos nas referências incorporadas parecerem diferir das definições fornecidas nos presentes ensinamentos, a definição fornecida nos presentes ensinamentos prevalecerá. Será apreciado que existe um "sobre" implícito antes de métricas, como temperaturas, concentrações e tempos discutidos nos presentes ensinamentos, de modo que desvios leves e não substanciais estejam dentro do escopo dos presentes ensinamentos neste documento. Neste pedido, o uso do singular inclui o plural, a menos que especificamente indicado de outra forma. Além disso, o uso de "compreendem", "compreende", "compreendendo", "contém", "contendo", "contêm", "incluem", "inclui", "incluindo" e não se destina a limitar. Deve-se entender que tanto a descrição geral anterior quanto a seguinte descrição detalhada são apenas exemplificativas e explicativas e não são restritivas da invenção. Os artigos "um" e "uma" são usados neste documento para se referir a um ou mais de um (por exemplo, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais de um elemento.

[0030] Salvo definido de outra forma, todos os termos técnicos e

científicos usados neste documento têm o mesmo significado como comumente entendido por uma pessoa versada na técnica à qual esta divulgação pertence. Métodos e materiais são aqui descritos para a utilização na presente divulgação; outros métodos e materiais conhecidos na técnica adequados também podem ser usados. Os materiais, métodos e exemplos são ilustrativos apenas e não são destinados a serem limitantes. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes, sequências, banco de dados, entradas e outras referências mencionadas neste documento estão incorporadas por referência em suas totalidades. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo definições, servirão de base para controle.

[0031] Os detalhes de uma ou mais modalidades da divulgação são mencionados nos desenhos anexos e na descrição abaixo. Outros recursos, objetos e vantagens da divulgação estarão evidentes a partir da descrição e dos desenhos e a partir das reivindicações.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0032] As Figuras 1 i)-iii) mostram um método de reação RPA exemplar usando pequenos analitos de duplo hapteno para detecção não diluída nas faixas de fluxo laterais. A Figura 1 i) é uma imagem mostrando a formação de coacervados induzidos por PEG 3kDa e a localização de ácidos nucleicos marcados com FAM para os coacervados em reações RPA simuladas. A Figura 1 ii) é uma representação de estruturas de analitos de duplo hapteno exemplificativos de acordo com a presente divulgação, são mostradas estruturas de biotina-FAM, biotina-DNP e marcação genéricos, para ligação pós-sintética a oligonucleotídeos da sonda modificada por amino. A Figura 1 iii) são imagens mostrando a detecção de oligonucleotídeos de marcação dupla, marcação dupla de Biotina-FAM (R = OH) e sonda Fpg de Biotina-FAM diluídas em tampão de corrida ou não diluídas em uma reação simulada de RPA.

[0033] As Figuras 2 i)-iii) retrata a análise direta de RPA em

faixas de fluxo lateral usando sondas Fpg de duplo hapteno de acordo com a presente divulgação. A Figura 2 i) é um esquema que ilustra a liberação de analito induzido por amplificação a partir de coacervatos RPA e subsequente detecção em faixas de fluxo laterais. A Figura 2 ii) é uma imagem de um ensaio de protótipo para detecção não diluída de RPA. A Figura 2 iii) é uma imagem de tiras de teste de formato conjugado seco que incorporam controle de fluxo.

[0034] As Figuras 3 i)-iii) demonstram a redução do sinal falso positivo através da otimização da sonda. A Figura 3 i) mostra imagens de um ensaio de fluxo lateral exemplar em que o sinal não específico pode ser dependente de Fpg. A Figura 3 ii) é uma representação de estruturas em forma de gancho e autodímero de uma sonda de duplo hapteno Fpg exemplar (marcado 'Sonda 1' ou 'rs1207445'). A Figura 3 iii) mostra imagens de amplificações contendo uma sonda de duplo hapteno Fpg exemplar tendo estrutura secundária reduzida exibindo sinais falsos positivos reduzidos quando analisados no fluxo lateral.

[0035] A Figura 4 representa imagens da detecção por RPA não diluída de DNA modelo rs1207445 (DNA genômico) e *Campylobacter jejuni* (produto de PCR).

[0036] As Figuras 5 i)-ii) demonstram ensaios de marcadores serotípicos do protótipo *E. coli* O157: H7. A Figura 5 i) são os dados de fluorescência Fpg TwistAmp para o ensaio rfbEO157. NTCs (vermelho) e reações contendo 10 (amarelo), 100 (verde) e 1000 (azul) foram realizadas em quadruplicado. As reações de fluorescência foram comparadas com o ensaio de fluxo lateral direto do protótipo. A Figura 5 ii) é uma comparação dos dados TwistAmp Fpg para fliC_{H7} o respectivo ensaio de sonda de duplo hapteno Fpg.

[0037] A Figura 6 é uma imagem demonstrando análise de faixa de fluxo lateral de 'fluxo contínuo'.

[0038] A Figura 7 são imagens de uma análise de fluxo lateral

do teste TwistAmp Nfo contra o alvo *Salmonella InvA*.

[0039] A Figura 8 é um esquema que ilustra o mecanismo para detecção limitada de amplicon de dupla marcação quando executados não diluídos em faixas de fluxo laterais.

[0040] A Figura 9 mostra um esquema da detecção de Exo RPA LF não diluída.

[0041] A Figura 10 mostra Fpg não diluído vs Exo RPA LF.

[0042] A Figura 11 mostra amplificação/detecção simultânea usando Exo LF.

[0043] A Figura 12 mostra um dispositivo de fluxo contínuo exemplar.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0044] Esta divulgação é baseada, pelo menos em parte, na descoberta de que a RPA de uma sequência de ácido nucleico alvo pode ser detectada com precisão e eficiência em uma faixa de fluxo lateral sem etapa de diluição, usando uma sonda de duplo hapteno. Para esse fim, são fornecidas neste documento composições de RPA para detectar a presença ou ausência de um ácido nucleico alvo usando uma sonda de duplo hapteno. Também para esse fim, o presente pedido descreve métodos para detectar uma sequência de ácido nucleico alvo em uma faixa de fluxo lateral usando uma sonda de duplo hapteno.

[0045] Embora a presente divulgação descreva composições e métodos de RPA para detectar uma sequência de ácido nucleico alvo em uma faixa de fluxo lateral usando uma sonda de duplo hapteno, o versado na técnica apreciaria que os métodos e composições divulgados possam ser apropriados para outros métodos de amplificação de ácidos nucleicos (por exemplo, métodos de amplificação isotérmicos de ácidos nucleicos) conhecidos no campo.

[0046] A detecção rápida, econômica e sensível de ácidos nucleicos tem a capacidade de aprimorar as práticas atuais empregadas na

detecção de patógenos no diagnóstico de doenças infecciosas e testes alimentares. Além disso, se a complexidade do ensaio puder ser reduzida, os testes de amplificação de ácido nucleico poderiam ser implementados em cenários de uso limitado e em recursos domésticos.

[0047] Foi desenvolvida uma nova química da sonda RPA Fpg (Formamidopirimidina DNA glicosilase), que permite a detecção lateral do fluxo de produtos de amplificação em reações RPA não diluídas. Para superar a natureza viscosa das reações de RPA, um novo tipo de marcação de duplo hapteno foi desenvolvido para sondas de RPA de Fpg. Os ensaios exemplares foram baseados nos ensaios de fluorescência de Fpg existentes (o locus genômico humano rs1207445 e o rRNA 16S de *Campylobacter jejuni*), que foram modificados para uso com a nova química da sonda de duplo hapteno. A tecnologia da sonda de duplo hapteno divulgada neste documento foi então aplicada no desenvolvimento de dois novos ensaios singleplex para sorotipagem dos genes de *E. coli* O157:H7 (*rfb*_{O157} e *fliC*_{H7}). Espera-se que esses marcadores genéticos identifiquem formas de *E. coli* O157:H7 que outros NAATs possam falhar, devido à genética complicada de O157:H7. O objetivo era desenvolver um imunoensaio de fluxo lateral de ácido nucleico (NALFIA) de uma etapa e consumível para testes multiplex para O157: H7 para uso em testes de higiene alimentar. Além disso, a versatilidade da nova química da sonda de duplo hapteno significa que a tecnologia pode ser prontamente aplicada a uma ampla variedade de espécies-alvo, permitindo o desenvolvimento de ensaios não laboratoriais.

[0048] Nos exemplos abaixo, a nova química de fluxo lateral de ácido nucleico foi aplicada a um alvo genômico humano (rs1207445), ao rDNA de *Campylobacter jejuni* 16S e a dois marcadores genéticos do importante patógeno alimentar *E. coli* O157: H7. Todos os quatro ensaios têm uma sensibilidade analítica entre 10 e 100 cópias de DNA por reação de amplificação. Além disso, o ensaio requer menos etapas práticas em

comparação com os métodos existentes de ensaio de fluxo lateral RPA Nfo.

[0049] Os dados indicaram que a detecção do ácido nucleico alvo amplificado pode ser realizada simultaneamente com o RPA ('fluxo contínuo'). Isso permite que o tempo de teste seja reduzido (~ 30 minutos da amostra para o resultado). O fluxo de trabalho simplificado significa que a química do fluxo contínuo pode ser facilmente adaptada a um consumível de uso único e econômico, ideal para uso em instalações não laboratoriais, como assistência médica (por exemplo, usando os dispositivos descritos na Figura 12 ou outros dispositivos).

[0050] Em alguns casos, as sondas oligonucleotídicas de dupla marcação descritas neste documento compreendem um oligonucleotídeo ligado a uma estrutura bifuncional (por exemplo, um grupo lábil de duplo hapteno). A estrutura bifuncional pode incluir duas frações, por exemplo, dois haptenos, em que um dos haptenos é um primeiro membro de um primeiro par de ligação e o segundo hapteno é um primeiro membro de um segundo par de ligação. A sonda é configurada de modo que quando a sonda é ligada ao ácido nucleico alvo, a estrutura bifuncional é clivada do oligonucleotídeo, liberando a estrutura bifuncional. Essa estrutura bifuncional livre (por exemplo, marcação dupla livre) pode ser então detectada por vários métodos, incluindo, por exemplo, na faixa de fluxo lateral.

[0051] "Um membro de um par de ligação" deve ser um dentre um primeiro e um segundo grupo, em que o referido primeiro e segundo grupo têm uma afinidade de ligação específica entre si. Pares de ligação adequados para uso na divulgação incluem, mas não estão limitados a, antígenos/anticorpos (por exemplo, digoxigenina/anti-digoxigenina, dinitrofenil (DNP)/anti-DNP, dansil-X-anti-dansil, Fluoresceína/anti-fluoresceína, amarelo lucifer/amarelo anti-lucifer, peptídeo/antipeptídeo, ligante/receptor e rodamina/anti-rodamina), biotina/avidina (ou biotina/estreptavidina) e proteína de ligação à calmodulina

(CBP)/calmodulina. Outros pares de ligação adequados incluem polipeptídeos, como o peptídeo FLAG (DYKDDDDK) [Hopp et al., BioTechnology, 6: 1204 1210 (1988)]; o peptídeo do epítipo KT3 (Martin et al., Science 255: 192 194 (1992)); peptídeo epítipo da tubulina (Skinner et al., J. Biol. Chem 266:15163 15166 (1991)); e tag de peptídeo da proteína 10 do gene T7 (Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393 6397 (1990)) e os anticorpos em cada um deles. Geralmente, em uma modalidade preferencial, o menor dos parceiros de pares de ligação serve como marcação detectável, pois considerações estéricas podem ser importantes.

[0052] Os ácidos nucleicos (por exemplo, polinucleotídeos) adequados para amplificação em conexão com os presentes métodos incluem moléculas de ácido nucleico de fita dupla e fita simples, como moléculas de DNA e RNA. Os polinucleotídeos podem ser de origem genômica, cromossômica, plasmídeo, mitocondrial, celular e de ácido nucleico viral. Para polinucleotídeos de fita dupla, a amplificação pode ser de uma ou de duas fitas.

[0053] Conforme descrito neste documento, o RPA emprega enzimas, conhecidas como recombinases, as quais são capazes de emparelhar primers de oligonucleotídeos com sequências homólogas em ácido nucleico de fita dupla modelo. Dessa forma, a síntese de DNA é direcionada para pontos definidos em um modelo de ácido nucleico de fita dupla. Ao usar dois ou mais primers específicos à sequência (por exemplo, específicos ao gene), inicia-se uma reação de amplificação exponencial se o modelo de ácido nucleico estiver presente. A reação progride rapidamente e resulta na amplificação específica de uma sequência presente dentro do ácido nucleico de fita dupla modelo a partir de apenas algumas cópias do ácido nucleico modelo até níveis detectáveis dos produtos amplificados em minutos. Os métodos de RPA são divulgados, por exemplo, em US 7.270.981; US 7.399.590; US 7.666.598; US 7.435.561; US 2009/0029421;

e WO 2010/141940, todos os quais são incorporados neste documento por referência.

[0054] As composições divulgadas neste documento podem conter um conjunto de primers que amplificam a sequência de ácido nucleico alvo. Os primers podem incluir sequências que são complementares à sequência de ácido nucleico alvo ou que diferem da sequência de ácido nucleico alvo em uma ou mais posições. Conforme descrito neste documento, o produto de amplificação de RPA com um primer que difere da sequência de ácido nucleico alvo em uma ou mais posições pode diferir da sequência alvo em uma ou mais posições. O produto de amplificação das reações RPA descritas neste documento pode compreender uma sequência alvo.

[0055] O conjunto de primers de pode amplificar a sequência de ácido nucleico alvo ou introduzir uma sequência que difere da sequência de ácido nucleico alvo em uma ou mais posições. Essa sequência introduzida pode consistir em uma sequência de ácido nucleico alvo. O primeiro primer pode ser complementar à sequência de ácido nucleico alvo. O segundo primer pode compreender uma primeira porção que é complementar à sequência de ácido nucleico alvo e uma segunda porção que é diferente da sequência de ácido nucleico alvo em uma ou mais posições. Quando os dois primers amplificam a sequência de ácido nucleico, o segundo primer incorpora uma ou mais posições diferentes nos produtos amplificados. Essa região amplificada é diferente da sequência de ácido nucleico alvo em uma ou mais posições e pode consistir na sequência de alvo. Em alguns casos, a região amplificada é a mesma que a sequência de ácido nucleico alvo.

[0056] Os termos "primeiro" e "segundo" são usados nesta divulgação apenas em seu sentido relativo. Será entendido que, a menos que indicado de outra forma, esses termos são usados apenas como uma questão de conveniência na descrição de uma ou mais das modalidades. Os termos "primeiro", "segundo" são usados apenas para distinguir um

elemento de outro elemento, e o escopo dos direitos da tecnologia divulgada não deve ser limitado por esses termos. Por exemplo, um primeiro elemento pode ser designado como um segundo elemento e, da mesma forma, o segundo elemento pode ser designado como o primeiro elemento.

[0057] A composição de RPA divulgada neste documento contém uma recombinase, que pode originar-se de origem procariótica, viral ou eucariótica. Exemplos de recombinases incluem RecA e UvsX (por exemplo, uma proteína RecA ou proteína UvsX obtida de qualquer espécie) e fragmentos ou mutantes das mesmas e combinações das mesmas. As proteínas RecA e UvsX podem ser obtidas a partir de qualquer espécie. Fragmentos de RecA e UvsX ou proteínas mutantes também podem ser produzidas usando as sequências de proteína e ácidos nucleicos RecA e UvsS disponíveis e técnicas de biologia molecular (ver, por exemplo, as formas mutantes de UvsX descritas na Patente US 8.071.308). Exemplos de proteínas UvsX incluem aquelas derivadas de fagos de myoviridae, tais como T4, T2, T6, Rb69, Aeh1, KVP40, fago de *Acinetobacter* 133, fago de *Aeromonas* 65, cianofago P-SSM2, cianofago PSSM4, cianofago S-PM2, Rb14, Rb32, fago de *Aeromonas* 25, fago de *Vibrio* nt-1, phi-1, Rb16, Rb43, fago 31, fago 44RR2.8t, Rb49, fago Rb3 e fago LZ2. Exemplos adicionais de proteínas recombinase incluem proteínas RADA e RADB archaeobacterianas (por exemplo, de plantas, mamíferos e fungos) e proteínas Rad51 eucarióticas (por exemplo, RAD51, RAD51B, RAD51C, RAD51D, DMC1, XRCC2, XRCC3 e recA) (vide, por exemplo, Lin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 103:10328-10333, 2006).

[0058] Em qualquer processo desta divulgação, a recombinase (por exemplo, UvsX) pode ser uma recombinase mutante ou híbrida. Em algumas modalidades, a UvsX mutante é uma UvsX Rb69 que inclui pelo menos uma mutação na sequência de aminoácidos de UvsX Rb69, em que a mutação é selecionada dentre o grupo que consiste em (a) um

aminoácido que não seja histidina na posição 64, uma serina na posição 64, a adição de um ou mais resíduos de ácido glutâmico no C-terminal, a adição de um ou mais resíduos de ácido aspártico no C-terminal e uma combinação dos mesmos. Em outras modalidades, a UvsX mutante é uma UvsX T6 com pelo menos uma mutação na sequência de aminoácidos UvsX T6, em que a mutação é selecionada a partir do grupo que consiste em: (a) um aminoácido que não seja histidina na posição 66; (b) uma serina na posição 66; (c) a adição de um ou mais resíduos de ácido glutâmico na extremidade C terminal; (d) a adição de um ou mais resíduos de ácido aspártico na C-terminal; e (e) uma combinação dos mesmos. Quando se usa uma proteína recombinase híbrida, a proteína híbrida pode, por exemplo, ser uma proteína UvsX que inclua pelo menos uma região que inclui uma sequência de aminoácidos derivada de uma espécie de UvsX diferente. A região pode ser, por exemplo, a região de loop-2 de ligação ao DNA de UvsX.

[0059] A DNA polimerase divulgada neste documento pode ser uma polimerase eucariótica ou procariótica. Exemplos de polimerases eucarióticas incluem pol-alfa, pol-beta, pol-delta, pol-epsilon e mutantes ou fragmentos das mesmas, ou combinações das mesmas. Exemplos de polimerases procarióticas incluem DNA polimerase I de *E. coli* (por exemplo, fragmento de Klenow), DNA polimerase do bacteriófago T4 gp43, fragmento grande da polimerase I de *Bacillus stearothermophilus*, DNA polimerase de Phi-29, DNA polimerase de T7, Pol I de *Bacillus subtilis*, Pol I de *Staphylococcus aureus*, DNA polimerase I de *E. coli*, DNA polimerase II de *E. coli*, DNA polimerase III de *E. coli*, DNA polimerase IV de *E. coli*, DNA polimerase V de *E. coli* e mutantes ou fragmentos das mesmas, ou combinações das mesmas. Em algumas modalidades, a DNA polimerase não possui atividade de exonuclease 3'-5'. Em algumas modalidades, a DNA polimerase tem propriedades de deslocamento de fita, por exemplo, grandes fragmentos de polimerases procarióticas da classe pol I ou pol V.

[0060] Em algumas modalidades, uma ou mais sondas (por exemplo, sondas de balizas moleculares) são marcadas com etiquetas detectáveis, que podem ser imunogênicas. Em alguns casos, as marcações detectáveis são haptenos. Os dois haptenos em uma sonda podem ser os mesmos ou podem ser diferentes. Em alguns casos, uma das marcações detectáveis é um membro de um par de ligação. As sondas descritas neste documento podem ser marcadas com haptenos, enzimas, substratos enzimáticos, coenzimas, supressores de enzimas, fluoróforos, extintores, cromóforos, partículas ou esferas magnéticas, frações sensíveis a redox (por exemplo, frações eletroquimicamente ativas), marcadores luminescentes, radioisótopos (incluindo radionucleotídeos) e membros de pares de ligação. Exemplos mais específicos incluem fluoresceína, ficobiliproteína, tetraetil rodamina e beta-galactosidase. Os pares de ligação podem incluir biotina/estreptavidina, biotina/avidina, biotina/neutravidina, biotina/captavidina, epítipo/anticorpo, proteína A/imunoglobulina, proteína G/imunoglobulina, proteína L/imunoglobulina, GST/glutathione, tag His/íon metálico (por exemplo, níquel, cobalto ou cobre), antígeno/anticorpo, anticorpo FLAG/M1, proteína de ligação à maltose/maltose, proteína de ligação à calmodulina/calmodulina, substrato enzima-enzima, pares de ligação receptor-ligante e análogos e mutantes dos pares de ligação.

[0061] Como usado neste, o termo "hapteno" refere-se a uma molécula pequena imunogênica que reage especificamente com um parceiro de ligação, como, por exemplo, um anticorpo gerado contra ele. Os haptenos para utilização nos métodos fornecidos neste documento incluem, por exemplo, digoxigenina, fluoresceína, dinitrofenil, glutathione e biotina. Os haptenos descritos neste documento também podem incluir, por exemplo, um grupo imunogênico. Em alguns casos, o grupo imunogênico compreende um grupo fluorescente, uma enzima ou fragmento da mesma, um peptídeo ou fragmento do mesmo ou biotina. Em alguns casos, os grupos imunogênicos são selecionados da lista que compreende biotina,

fluoresceína, digoxigenina ou dinitrofenil.

[0062] Conforme usado neste documento, os termos "marcação de fluorescência" e "fluoróforo" são usados de forma intercambiável e se referem a qualquer substância que emite energia eletromagnética em um determinado comprimento de onda (comprimento de onda de emissão) quando a substância é iluminada por radiação de um comprimento de onda diferente (comprimento de onda de excitação) e destina-se a abranger uma molécula química ou bioquímica ou fragmentos da mesma que é capaz de interagir ou reagir especificamente com um analito de interesse em uma amostra para fornecer um ou mais sinais ópticos.

[0063] Os fluoróforos representativos para uso nos métodos fornecidos neste documento incluem, por exemplo, FAM (tetrametilrodamina) Texas Red™, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente azul, proteína fluorescente vermelha, fluorescência, fluoresceína, 5-isotiocianato (FITC), corantes de cianina (Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7), corantes Bodipy (Invitrogen) e/ou corantes Alexa Fluor (Invitrogen), dansil, cloreto de dansil (DNS-C1), 5-(iodoacetamida)fluoresceína (5-IAF, 6-acriloil-2-dimetilaminonaftaleno (acrilodano), cloreto de 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-il (NBD-Cl), brometo de etídio, amarelo de lucifer, corantes de rodamina (cloridrato de 5-carboxi rodamina 6G, Cloreto de sulfonil de rodamina B da lisamina, isotiocianato de rodamina B (RITC), rodamina 800); tetrametilrodamina 5-(e 6-sotiocianato (TRITC)), Texas Red™, cloreto de sulfonil, ácidos naftalamina sulfônicos incluindo mas não limitado ao ácido 1-anilinaftaleno-8-sulfônico (ANS) e ácido 6-(p-toluidinil)naftalen-e-2-sulfônico (TNS), Ácido graxo antroil, DPH, ácido parinarico, TMA-DPH, ácido graxo fluorenil, fluorescência-fosfatidiletanolamina, vermelho-fosfatidiletanolamina do Texas, pirenil-fosfatidilcolina, fluorenil-fosfatidilcolina, merocianina 540, naftil estiril, 3,3'dipropilpropiridina (diS-C3-(5)), 4-(p-dipentil aminotiril)-1-metilpiridínio (di-5-ASP), Cy-3-iodoacetamida,

Cy-5-N- hidroxissuccinimida, Cy-7-isotiocianato, IR-125, tiazol laranja, azul azure B, azul do nilo, al-Ftalocianina, oxaxina 1,4',6-diamidino-2-fenilindol. (DAPI), Hoechst 33342, TOTO, laranja de acridina, homodímero de etídio, N(etoxicarbonilmetil)-6-metoxiquinolínio (MQAE), Fura-2, verde de cálcio, carboxílico SNARF-6, BAPTA, cumarina, fitofluores, coroneno e complexos de metal-ligantes.

[0064] Deve-se notar que um supressor de fluorescência também é considerado uma marcação detectável. Por exemplo, o supressor de fluorescência pode ser contatado com um corante fluorescente e a quantidade de supressão pode ser detectada.

[0065] As modalidades descritas neste documento também podem incluir um agente capaz de clivar uma sequência de ácido nucleico alvo específica ou uma nuclease. Conforme usado neste documento, o termo "nuclease" refere-se a enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ácidos nucleicos, clivando as ligações fosfodiéster entre as subunidades nucleotídicas dos ácidos nucleicos. Uma "nuclease de restrição" é uma nuclease que tem como alvo e cliva uma molécula de ácido nucleico no ou perto de sequências nucleotídicas de reconhecimento específicas conhecidas como sítio de restrição. Nucleases podem ainda ser divididas em endonucleases (ou seja, enzimas que clivam a ligação fosfodiéster dentro de uma cadeia polinucleotídica) e exonucleases (ou seja, enzimas que funcionam pela clivagem de nucleotídeos um de cada vez do final (exo) de uma cadeia polinucleotídica), embora algumas das enzimas pode cair em ambas as categorias. A nuclease pode ser uma endonuclease de restrição que ocorre naturalmente ou uma endonuclease artificial.

[0066] Em alguns casos, as sondas de duplo hapteno descritas neste documento são configuradas para serem clivadas pela DNA glicosilase de formamidopirimidina ("fpg") quando a sonda oligonucleotídica é hibridizada com a sequência nucleotídica complementar, para liberar o grupo lábil de duplo hapteno (por exemplo, o rótulo). Em alguns casos, a

nuclease é DNA glicosilase de formamidopirimidina.

[0067] Em algumas modalidades, são fornecidas neste documento sondas de hapteno (por exemplo, duplo hapteno ou hapteno de ordem superior) que são cliváveis por uma exonuclease (por exemplo, Exo III). Em algumas modalidades, a sonda oligonucleotídica tem a estrutura 5'X(n)_aL(n)_bH(n)_cB3', em que n são nucleotídeos, a, b e c são números inteiros, X é um 5' hexil, H é um resíduo THF, B é um espaçador C3, e L é um modificador ramificado compreendendo uma pluralidade de haptenos. Em algumas modalidades, os haptenos são, por exemplo, DNP e Biotina, embora outros haptenos possam ser utilizados (por exemplo, FAM). Em algumas modalidades, a sonda oligonucleotídica compreende uma ligação de fosforotioato entre os haptenos. Em algumas modalidades, a e c são de 1 a 50 nucleotídeos e b é de 0 a 50 nucleotídeos. Em algumas modalidades, a e c são pelo menos 15 nucleotídeos. Em algumas modalidades, b é zero. Em algumas modalidades, a é aproximadamente 15 e c é aproximadamente 30. Em algumas modalidades, a sonda oligonucleotídica é complementar ao ácido nucleico alvo. Em algumas modalidades, L substitui um nucleotídeo de citosina. Detalhes adicionais da sonda são descritos no Exemplo 16 abaixo.

[0068] Em uma reação RPA contendo amplicon alvo, o Exo III cliva o resíduo abásico H da sonda e a digestão subsequente 3'-5' pelo Exo III libera um mononucleotídeo L (com 5'-fosfato e 3'-OH) que é rotulado com dois haptenos distintos. Este mononucleotídeo com marcação de duplo hapteno é livre para sair do co-conservador RPA e interagir com anticorpos na visualização de partículas e na linha de teste de uma faixa LF.

[0069] Adicionalmente, uma ou mais proteínas de ligação ao DNA de fita única podem ser usadas para estabilizar ácidos nucleicos durante as várias reações de troca que estão em curso na reação. Uma ou mais proteínas de ligação ao DNA de fita única podem ser derivadas ou obtidas a partir de qualquer espécie, por exemplo, de uma espécie

procariótica, viral ou eucariótica. Exemplos não limitantes de proteínas de ligação ao DNA de fita única incluem SSB de *E. coli* e aquelas derivadas de fagos de myoviridae, tais como T4, T2, T6, Rb69, Aeh1, KVP40, fago de *Acinetobacter* 133, fago de *Aeromonas* 65, cianofago P-SSM2, cianofago PSSM4, cianofago S-PM2, Rb14, Rb32, fago de *Aeromonas* 25, fago de *Vibrio* nt-1, phi-1, Rb16, Rb43, fago 31, fago 44RR2.8t, Rb49, fago Rb3 e fago LZ2. Exemplos adicionais de proteínas de ligação ao DNA de fita única incluem Alide_2047 de *A. denitrificans*, BthaB_33951 de *Burkholderia thailandensis*, HMPREF9144_0124 de *Prevotella pallens* e proteína A de replicação de proteína de ligação ao DNA de fita única eucariótica.

[0070] Qualquer um dos processos desta divulgação pode ser realizado na presença de um agente de aglomeração. Em algumas modalidades, o agente aglomerante pode incluir um ou mais dentre polietilenoglicol, óxido de polietileno, álcool polivinílico, poliestireno, Ficoll, dextrano, poli(vinilpirrolidona) (PVP) e albumina. Em algumas modalidades, o agente de aglomeração tem um peso molecular inferior a 200.000 daltons. Adicionalmente, o agente de aglomeração pode estar presente, por exemplo, em uma quantidade de cerca de 0,5% a cerca de 15% em peso em volume (p/v). Em alguns casos, o agente de aglomeração é o PEG.

[0071] Em alguns casos, o agente de aglomeração tem um peso molecular de pelo menos 1 kilodalton, pelo menos 2 kilodaltons, pelo menos 3 kilodaltons, pelo menos 4 kilodaltons, pelo menos 5 kilodaltons, pelo menos 6 kilodaltons, pelo menos 8 kilodaltons ou pelo menos 10 kilodaltons.

[0072] Em alguns casos, o agente de agregação está presente na composição em uma concentração de pelo menos 15% v/v, numa concentração de pelo menos 12% v/v, numa concentração de pelo menos 10% v/v, numa concentração de pelo menos 8% v/v, de pelo menos 6% v/v, numa concentração de pelo menos 5% v/v, numa concentração de pelo menos 4% v/v ou numa concentração de pelo menos 3% v/v.

[0073] Em alguns casos, o agente de agregação tem um perfil de viscosidade a 20 graus Celsius menor ou igual a 5mPa/s, menor ou igual a 4mPa/s, menor ou igual a 3mPa/s, menor ou igual a 2mPa/s ou menor ou igual a 1mPa/s.

[0074] Em alguns casos, o agente de aglomeração é PEG com um peso molecular de 3 kilodaltons e uma concentração final de 6.5%. Em alguns casos, o agente de aglomeração é PEG e a viscosidade a 20 graus Celsius é menor ou igual a 3 mPa/s.

[0075] Se for usada uma proteína de carregamento da recombinase, a proteína de carregamento da recombinase pode ser de origem procariótica, viral ou eucariótica. Exemplos de proteínas de carregamento da recombinase incluem RecO de *E. coli*, RecR de *E. coli*, UvsY e mutantes ou fragmentos das mesmas, ou combinações das mesmas. Exemplos de proteínas UvsX incluem aquelas derivadas de fagos de myoviridae, tais como T4, T2, T6, Rb69, Aeh1, KVP40, fago de *Acinetobacter* 133, fago de *Aeromonas* 65, cianofago P-SSM2, cianofago PSSM4, cianofago S-PM2, Rb14, Rb32, fago de *Aeromonas* 25, fago de *Vibrio* nt-1, phi-1, Rb16, Rb43, fago 31, fago 44RR2.8t, Rb49, fago Rb3 e fago LZ2. Em quaisquer dos processos desta divulgação, o agente de carregamento da recombinase pode ser derivado de um fago de myoviridae. Os fagos de myoviridae podem ser, por exemplo, T4, T2, T6, Rb69, Aeh1, KVP40, fago de *Acinetobacter* 133, fago de *Aeromonas* 65, cianofago P-SSM2, cianofago PSSM4, cianofago S-PM2, Rb14, Rb32, fago de *Aeromonas* 25, fago de *Vibrio* nt-1, phi-1, Rb16, Rb43, Fago 31, fago 44RR2.8t, Rb49, fago Rb3 ou fago LZ2.

[0076] Adicionalmente, qualquer um dos processos desta divulgação pode ser realizado com um primer bloqueado. Um primer bloqueado é um primer que não permite o alongamento com uma polimerase. Onde um primer bloqueado é usado, um agente de desbloqueio pode ser usado para desbloquear o primer para permitir o alongamento. O

agente de desbloqueio pode ser uma endonuclease ou exonuclease que pode clivar o grupo bloqueador do primer. Agentes de desbloqueio exemplificativos incluem exonuclease III de *E. coli* e endonuclease IV de *E. coli*.

[0077] Os processos desta divulgação incluem a detecção de uma sequência de ácido nucleico alvo em que o ácido nucleico alvo pode incluir um sítio de corte natural para uma endonuclease de restrição ou uma nuclease. Adicionalmente, um sítio de corte pode ser introduzido na sequência de ácido nucleico alvo pela amplificação da sequência alvo com primers que diferem da sequência de ácido nucleico alvo em uma ou mais posições. A introdução de um sítio de corte artificial ou de um sítio de corte que não foi encontrado na sequência de ácido nucleico alvo pode ser utilizada para detectar a sequência de ácido nucleico alvo ou a presença de um SNP na sequência de ácido nucleico alvo.

[0078] Os processos descritos neste documento também podem ser realizados em paralelo usando uma variedade da endonuclease de restrição ou nucleases descritas neste documento. A detecção dos produtos de amplificação pode ser realizada em paralelo e as taxas de amplificação comparadas com uma amostra de referência. Os processos descritos neste documento podem ser utilizados para a detecção de uma sequência alvo ou a genotipagem de uma sequência.

[0079] Em algumas das modalidades, monitorar um aumento de produtos de amplificação de ácido nucleico pode incluir determinar o número ou proporção de produtos de amplificação na mistura de reação ao longo do tempo ou determinar o número ou proporção de marcação dupla, por exemplo, duplo hapteno ou hapteno/marcação dupla livre.

[0080] Em algumas modalidades, o duplo hapteno é detectável a olho. Em algumas modalidades, a marcação de duplo hapteno é detectado usando fluorescência, microscopia de contraste de fase, detecção luminescente, detecção espectral (colorida), detecção magnética,

detecção radioisotópica e/ou detecção eletroquímica. Aquele versado na técnica apreciaria que qualquer técnica conhecida na técnica para medir a quantidade de produtos de amplificação de ácido nucleico em uma mistura pode ser usada para detectar produtos de amplificação e monitorar o aumento de produtos de amplificação ao longo do tempo. Em alguns dos processos de RPA descritos neste documento, uma marcação detectável pode ser usada para monitorar o progresso (a produção de produtos de amplificação) da reação de RPA.

[0081] Os métodos e composições divulgados neste documento podem ser utilizados, por exemplo, para detectar uma sequência de ácido nucleico alvo. Esta divulgação também pode identificar um alelo variante compreendendo um SNP em comparação com um alelo do tipo selvagem. Em alguns casos, esse SNP pode estar associado a um status ou diagnóstico específico da doença (por exemplo, ao diagnóstico de anemia falciforme ou diagnóstico de um tumor ou câncer) ou a uma resistência ou suscetibilidade a fármacos. Os métodos e composições de reação de amplificação isotérmica descritos neste documento permitem a detecção rápida de uma sequência alvo e/ou polimorfismos associados nos mesmos.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Materiais e fabricação de faixas de fluxo lateral

[0082] Os reagentes e os produtos químicos para a formulação do tampão foram comprados da Fisher ou Sigma.

[0083] As faixas de fluxo lateral foram preparadas usando nitrocelulose Prima 40 (GE), cartões de suporte adesivo (HF000MC100, Millipore) e material de camada absorvente CF5 (GE), salvo indicação em contrário. Para experimentos de fluxo contínuo, os materiais adicionais das camadas de absorção testadas incluíram CF6 (GE) e celulose de peso espesso grau 320 (Ahlstrom). Anticorpos monoclonais anti-DNP (MAB2223, Millipore) e anti-FAM (MIF2902, Thermo Fisher) e anticorpos policlonais anticamundongos e anticorpos monoclonais (A16162, Novex) foram

preparados para distribuição trocando o tampão de armazenamento para fosfato de sódio a 10 mM, pH 7,4 + 0,005% de Triton X100, usando os concentradores centrífugos Amicon Ultra 10k MWCO, de acordo com as instruções do fabricante. Os anticorpos purificados foram detectados em faixas pré-cortadas (0,5 µg/faixa) ou distribuídos em membranas a uma taxa de 1 µg/m de membrana usando uma plataforma de distribuição Biodot ZX1010. As membranas ou faixas pontilhadas foram secas por 1 hora a 40°C em um forno de ar forçado antes da laminação.

[0084] Salvo indicação em contrário, os laminados de faixas foram preparados por laminação de 300 mm x 25 mm de lavagem com membrana anti-FAM/anti-DNP com uma borda longa do cartão de suporte (pré-cortado a 300 mm x 45 mm). Faixas de 300 mm x 22 mm de material absorvente CF5 foram então laminadas niveladas com a borda superior do cartão de suporte, de modo que a camada de absorção se sobreponha à membrana em 2 mm. Os cartões laminados foram então cortados em faixas 5 mm x 45 mm usando uma guilhotina Biodot CM5000. As faixas cortadas foram armazenadas à temperatura ambiente em um exsiccador antes do uso.

[0085] Onde as camadas conjugadas foram empregadas, um conjugado de ouro foi trocado em tampão por centrifugação por 20 minutos a 9000x g, o sobrenadante removido e o ouro reconstituído para o volume original em 50mM de bórax, 10% de sacarose, 1% de caseína e 0,5% de Brij-35. O conjugado foi pulverizado sobre faixas de fibra de vidro (GFDX103000, Millipore) usando o dispensador Biodot ZX1010 a uma taxa de 3 µl/cm. A camada de conjugado de ouro foi então seca durante 2 horas a 40°C antes da laminação.

Exemplo 2: Conjugação de anti-biotina ao coloide de ouro de 20 nm

[0086] A anti-biotina monoclonal (ab201341, Abcam) foi preparada para conjugação usando o kit de remoção AbPure BSA (Innova Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. A anti-biotina

purificada foi conjugada ao ouro usando o kit InnovaCoat Gold 20nm (Innova Biosciences) também de acordo com as instruções do fabricante; com a exceção de que a anti-biotina estava presente a 0,5 mg/ml na etapa de conjugação. O ouro anti-biotina foi tipicamente adicionado diretamente à reação RPA, a menos que pulverizado sobre camadas conjugadas conforme descrito acima.

Exemplo 3: Oligonucleotídeos e marcação da sonda

[0087] Os primers oligonucleotídicos e sondas de fluxo lateral de Fpg não marcadas foram obtidas da Eurogentec; as sondas não marcadas foram compradas com uma modificação de amino no local dR abásico e uma modificação do espaçador C3 na extremidade 3'. Todas as sondas fluorescentes de Fpg foram obtidas da LGC Biosearch.

Exemplo 4: Síntese de marcações de duplo hapteno e marcação de oligo

[0088] A resina Fmoc-Lys (Mtt)-Wang foi comprada da Merck. Um kit de teste qualitativo de ninidrina foi comprado da Anaspec. Diclorometano (DCM), síntese de peptídeos grau *N,N*-dimetilformamida (DMF), (benzotriazol-1-iloxi) tripirrolidinofosfônio hexafluorofosfato (PyBOP), *N*-metilmorfolina (NMM), piperidina, D-biotina, triisopropilsilano (TIS) 5(6)-carboxifluoresceína, metanol, ácido fórmico, acetonitrila, éter dietílico, trietilamina (TEA) para HPLC, ácido acético, NaHCO₃, NaOH, 2,4-dinitrofluorobenzeno e *N,N,N',N'*-tetrametil-O-(*N*-succinimidil)urônio tetrafluoroborato de (TSTU) foi comprado da Fisher Scientific. Ácido trifluoroacético (TFA), *N,N'*-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC), *N*-hidroxissuccinimida (NHS), *N*-DNP-L-Lys, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), *N,N*-diisopropiletilamina (DiPEA), trietilamina (TEA) para LCMS e água para LCMS foram compradas da Sigma-Aldrich. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi da AppliChem. HCl e acetona foram da VWR. Água Millipore foi usada para síntese e dessalinização; Foi utilizada água de grau HPLC para purificações por HPLC. As colunas de exclusão de

tamanho NAP-10 (SE) eram da GE. A *N*-hidroxisuccinimidobiotina (biotina-OSu) foi comprado da Iris Biotech.

[0089] A análise de LCMS foi realizada em um sistema Agilent 1200 LC com um ESI-MS triplo quadrupolo Agilent 6410B. Todos os métodos de LC empregaram uma coluna Agilent Eclipse Plus C18, 3,5 μm , 3,0 x 150 mm à temperatura ambiente; todos os rendimentos citados são baseados na absorvância a 254 nm. Solventes de LC: A = água + 0,1% de ácido fórmico; B = acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico; C = HFIP 200 mM, TEA 4 mM aq.; D = metanol. Métodos de LC: 1 (solventes A e B) = 5 a 95% de B ao longo de 25 min, depois 95% de B durante 5 min; 2 (solventes C e D) = 20% D ao longo de 3 min, depois 20 a 30% D ao longo de 5 minutos, depois 30 a 50% D ao longo de 7 minutos, depois 50 a 60% D ao longo de 5 minutos, depois 60 a 80% D durante 1 minuto, depois 80% D durante 1 minuto.

[0090] A purificação por RP-HPLC de oligonucleotídeos marcados foi realizada em um sistema Agilent 1100/1200 LC equipado com um coletor de fração e uma coluna Phenomenex Clarity 10u Oligo-RP 250 x 4,6 mm com um cartucho de proteção Oligo-RP (AJO-8135, Phenomenex). Solventes LC A = metanol; B = acetonitrila a 5% v/v em TEAA 50 mM, pH 7,4. Método de LC para purificação: 5% de B ao longo de 5 min; 5 a 50% de B ao longo de 35 min; 50 a 60% de B ao longo de 5 min. Os cromatogramas foram registrados a 254 nm e 494 nm (para marcação Bio-FAM) ou 360 nm (para marcação Bio-DNP).

[0091] Os oligonucleotídeos marcados finais foram quantificados usando um Thermo-Fisher NanoDrop 2000 a 260 nm, assumindo $\epsilon_{260} = 20960 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para a marcação de Bio-FAM e negligenciando o ϵ_{260} para a marcação de Bio-DNP. A análise de NMR foi realizada usando um ímã Oxford 400 MHz equipado com um console Bruker Avance; O d₆-DMSO (99,9% do átomo D) era da Sigma-Aldrich.

Exemplo 5: Síntese em fase sólida de uma marcação de duplo

hapteno Bio-FAM

[0092] (D-)-Bio-(L-)-Lys(5(6)FAM)-OH foi sintetizado usando técnicas de síntese em fase sólida padrão (W.C. Chan e P.D. White, em *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, W.C. Chan e P.D. White, Oxford University Press, Oxford, 2000, cap. 3, pp. 41-76) começando da resina Fmoc-Lys (Mtt) -Wang. Especificamente, a resina (carga de 0,25 g, 0,57 mmol/) foi inchada com DCM por 1 h, antes de uma pequena amostra ser testada para confirmar a ausência de aminas livres (teste qualitativo de ninidrina). O grupo protetor Fmoc foi removido usando piperidina a 20% v/v em DMF (2 x 6 min) e a resina foi lavada com DMF (3 x) e depois DCM (3 x) antes que um teste qualitativo de ninidrina confirmasse a presença de amina livre. A D-biotina (3 eq.) Foi ativada com PyBOP (3 eq.) e NMM (5 eq.) em DMF (4,3 mL) por 4 min com sonicação, antes da reação com a resina a 60°C por 38 min; a resina foi subsequentemente lavada com DMF (3 x) e DCM (3 x). O teste de ninidrina de uma amostra da resina confirmou a ausência de aminas livres, antes de ser desprotegido com 1% v/v TFA, 5% v/v TIS no DCM por 30 min (2 x) e posteriormente lavado com DMF (3 x) e DCM (3 x). O teste de ninidrina de uma amostra da resina mostrou amina livre. 5(6)-carboxifluoresceína (3 eq.) foi ativada com PyBOP (3 eq.) e NMM (5 eq.) em DMF (4,3 mL) por 10 segundos, antes da reação com a resina a 60°C por 38 min; a resina foi subsequentemente lavada com DMF (3 x) e DCM (3 x). A resina foi tratada com piperidina a 20% v/v em DMF (2 x 10 min) para clivar os dímeros de fluoresceína, antes que a resina fosse lavada com DMF (3 x), DCM (3 x) e depois MeOH (3 x); a resina lavada foi seca e armazenada no refrigerador (aprox. 5°C) durante a noite. Para obter a marcação livre, a resina foi inchada em DCM (2 h), depois aprox. metade da resina inchada foi clivada com 2,5 mL de 90/2,5/2,5 v/v/v TFA/TIS/H₂O à temperatura ambiente por 2 h, lavando com TFA (2 x 1 mL). Coquetéis de clivagem combinados e lavagens de TFA foram secos sob vácuo em um frasco de vidro RB, depois transferidos para um tubo Eppendorf de 5 mL

com lavagens com DCM, soprado com Ar (g), e um sólido amarelo foi precipitado por adição de éter dietílico gelado (4,5 mL) e peletizado por centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi lavado centrifugamente com éter dietílico (2 x 4,5 mL). Obtiveram-se 30 mg (rendimento de 58%) de um sólido amarelo. LCMS (método 1) do produto indicou boa pureza (90%, t_R 11,85 min); ESI-MS (pos. M/z): 731,3 (100%, $[M+H]^+$). Foi preparada uma solução de 2,05 mM de DMSO da marcação livre, que foi adicionalmente diluída com água para estudos de fluxo lateral utilizando a marcação livre de Bio-FAM.

Exemplo 6: Fixação da marcação Bio-FAM a uma sonda de FPG modificada por amino

[0093] A marcação dupla Bio-FAM (5 mg, 6,8 μ mol) foi ativada com DCC (2,1 mg, 10 μ mol) e NHS (1,2 mg, 10 μ mol) no escuro por 3 h; em seguida, uma amostra da mistura de reação foi diluída com metanol e analisado por LCMS (método 1) que indicou a presença do éster Bio-FAM NHS com um rendimento de 21% (t_R 12,97 min; ESI-MS (pos. m/z): 828,8 (9%, $[M+H]^+$). Após 3,5 h de tempo de reação, 10 μ L da mistura de ativação foram adicionados a uma mistura da oligo sonda modificada por amino (rs1207445) a aprox. 1 mM em água (20 μ L) e 1 M de $NaHCO_3$ aq. A pH 9 (10 μ L). A mistura de marcação foi agitada em vórtice, sonicada por 10 min, agitada em vórtice e depois deixada repousar à temperatura ambiente no escuro durante a noite. A mistura foi então dessalinizada pela coluna NAP-10 SE, purificada por RP-HPLC (alvo t_R , 29,78 min), e as frações alvo foram concentradas *in vacuo*, dessalinizadas por NAP-10 SE e concentradas adicionalmente *in vacuo* para fornecer 190 μ L de uma solução de 13,4 μ M do oligo alvo marcado com Bio-FAM (rendimento de 25%). O oligo marcado foi caracterizado por LCMS (método 2); Pureza de 94%, t_R 11,58 min, ESI-MS (negativo): requer 11584,4, encontrado 11584,4. A caracterização por UV-Vis (Thermo-Fisher NanoDrop 2000) revelou picos de absorvância a 259 e 496 nm, consistentes com um oligo de DNA marcado com FAM.

Exemplo 7: Síntese em fase de solução de uma marcação de duplo hapteno Bio-DNP

[0094] Sintetizou-se (D-)Bio-(L-)Lys(DNP)-OH usando técnicas padrão de síntese em fase sólida, conforme descrito acima para a marcação Bio-FAM usando 2,4-dinitrofluorobenzeno (3 eq.) E DiPEA (4 eq.) em DMF (4,3 mL) para incorporar a fração DNP em vez de FAM. No entanto, uma síntese melhorada em fase de solução foi desenvolvida conforme descrito aqui. Especificamente, a biotina-OSu (602 μ mol, 1,05 eq.) e N α -DNP-L-Lys (1 eq.) foram suspensas em DMF (5,7 mL) e DiPEA (0,25 mL) e sonicadas por 30 min para obter uma solução clara antes de agitar à temperatura ambiente. Após 2 h, observou-se um precipitado na mistura de reação, que foi deixada em agitação à temperatura ambiente durante a noite antes da filtração (através de 2 papéis de filtro Whatman No. 1), lavando com acetona (10 mL) e éter dietílico (130 mL) para coletar um sólido amarelo (244 mg). Uma segunda colheita de sólido amarelo (30 mg) foi obtida combinando as lavagens orgânicas e adicionando éter dietílico adicional (100 mL) antes da filtração como acima e lavando com éter dietílico adicional (100 mL). Ambas as colheitas do sal DiPEA da marcação do alvo foram combinadas e dissolvidas em NaOH a 0,5 M aq. (5 mL) para proporcionar uma solução amarelo-alaranjada profunda, antes de 1 M de HCl aq. (5 mL) foi adicionado para precipitar o alvo do ácido carboxílico como um sólido amarelo. A mistura foi arrefecida em gelo antes de o sólido ser coletado por filtração de sucção (através de 2 x papeis de filtro Whatman No. 1), lavando com HCl a 1 M gelado aq. (2 x 25 mL), depois H₂O (2x 25 mL), depois éter dietílico (650 mL). As lavagens foram descartadas e o sólido amarelo foi seco *in vacuo* para obter o alvo com bom rendimento (0,41 mmol, 72%). LCMS (método 1) 97% de pureza, t_R 13,71 min, ESI-MS (pos. M/z): 539,2 (18%, [M+H]⁺); ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ_H 12,51 (br s, 1 H, OH), 8,88 (d, 1H, J = 5,8 Hz, NH-Ar), 8,86 (d, 1H, J = 2,7 Hz, Ar-H₃), 8,25 (dd, 1H, J = 9,7, 2,6 Hz, Ar-H₅), 8,05 (d, 1H, J =

7,8 Hz, NHC(O)CH_2), 7,22 (d, 1H, $J = 9,7$ Hz, Ar-H₆), 6,38 (d, 2H, $J = 16,2$ Hz, NHC(O)NH), 4,29 (dd, 1H, $J = 7,5, 5,0$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_2)\text{S}$), 4,20-4,10 (m, 2H, CHCO_2H , NHCHCH(R)S), 3,52-3,43 (m, 2H, CH_2NHAr), 3,10-3,06 (m, 1H, NHCHCH(R)S), 2,80 (dd, 1H, $J = 12,4, 5,0$ Hz, CH(H)S), 2,56 (d, 1H, $J = 12,4$ Hz, CH(H)S), 2,11 (t, 2H, NHC(O)CH_2), 1,78-1,25 (m, 12H, 6 x CH_2).

Exemplo 8: Fixação da marcação Bio-DNP a uma sonda de FPG modificada por amino

[0095] O rótulo duplo Bio-DNP (10 mg, 18,6 μmol) foi ativado com TSTU (8,4 mg, 27,9 μmol) e DiPEA (9,7 μL , 27,9 μmol) por 8 minutos, depois uma amostra da mistura de reação foi diluída com acetonitrila e analisada por LCMS (método 1) que indicou a presença do éster Bio-DNP NHS com um rendimento de 19% (t_R 15,09 min; ESI-MS (pos. m/z): 636,3 (9%, $[\text{M}+\text{H}]^+$). Após 1,5 h de tempo de reação, 10 μL da mistura de ativação foram adicionados a uma mistura da oligo sonda modificada por amino (rs1207445) a aprox. 1 mM em água (20 μL) e 1 M pH 9 NaHCO_3 aq. (10 μL). A mistura de marcação foi agitada em vórtice, sonicada por 10 min, e depois deixada repousar à temperatura ambiente no escuro durante a noite. A mistura foi então dessalinizada pela coluna NAP-10 SE, purificada por RP-HPLC (alvo t_R 31,10 min), e as frações alvo foram concentradas *in vacuo*, dessalinizadas por NAP-10 SE e concentradas adicionalmente *in vacuo* para proporcionar 470 μL de uma solução de 7,1 μM do oligo alvo marcado com Bio-DNP (rendimento de 17%). O oligo marcado foi caracterizado por LCMS (método 2); 90% de pureza, t_R 10,48 min, ESI-MS (negativo): requer 11392,4, obtidos 11392,2.

Exemplo 9: Condições RPA

[0096] Todas as reações de RPA foram incubadas a 40°C por 20 minutos, salvo indicação em contrário. As formulações de RPA para fluxo lateral (Fpg) contêm 420nM de cada primer apropriado para forward e reverse, 120nM da sonda de duplo hapteno Fpg, 50mM de Tris Acetato pH 8,3, 100mM de KOAc, 5mM de DTT, 1x creatina quinase, 30 μg de Gp32,

30µg UvsX, 7 µg de UvsY, 6,5% de PEG de 3kDa, 5,7% de trealose, 8,6 µg de DNA polimerase I (*S. aureus*), 9,48 µg de Fpg, 1x mix E, dNTPs 1,8 mM e Brij-35 a 0,5%. As reações são iniciadas pela adição de uma mistura contendo o modelo apropriado e Mg (OAc)₂ (concentração final de 22,5 mM) a um volume final de 100 µl.

[0097] As formulações de reação Nfo RPA foram as mesmas que Fpg, com exceção de Gp32 (28 µg/reação) e polimerase (12,8 µg/reação). Além disso, o Fpg é substituído por Nfo (Endonuclease IV; 4,6 µg/reação).

[0098] As reações de Fpg fluorescente foram realizadas usando kits TwistAmp Fpg disponíveis no mercado, de acordo com as instruções do fabricante em um instrumento T8 (Axxin). As reações foram incubadas por 20 minutos a 40°C.

Exemplo 10: Detecção de faixa de fluxo lateral

[0099] Salvo indicação em contrário, 1,5 µl de ouro antibiotina foram adicionados diretamente à reação RPA completa e a faixa de fluxo lateral foi adicionada. As tiras foram deixadas absorver por 20 minutos antes de secar à temperatura ambiente por 10 minutos. As camadas absorventes e os conjugados de fibra de vidro (onde apropriado) foram removidos e as faixas foram digitalizadas.

[00100] A detecção diluída em faixas de PCRD (Abingdon Health) foi realizada por diluição de 5 µl de amplicon em 70 µl de tampão de extração de PCRD. Os 75 µl inteiros foram processados no dispositivo PCRD de acordo com as instruções do fabricante.

Exemplo 11: Detecção não diluída de novos analitos em faixas de fluxo laterais

[00101] Até a presente data, a detecção de produtos RPA em dispositivos de fluxo lateral foi alcançada usando tiras NALFIA disponíveis comercialmente, como por exemplo tiras Milenia Hybridetect, tiras PCRD Abingdon Health e dispositivos UStar em combinação com a química

TwistAmp Nfo, que gera amplicon de duplo hapteno marcado que compreende cada marcador fixado ao ácido nucleico de fita única, que hibridiza para formar a marcação de duplo hapteno que pode ser detectada por imunoensaio de fluxo lateral em sanduíche. Embora essa tecnologia funcione comparativamente às abordagens baseadas em sonda fluorescente em termos de sensibilidade e especificidade, os usuários finais devem primeiro diluir o amplicon altamente viscoso para permitir a migração da marcação ao longo da faixa de ensaio e, portanto, permitir a determinação bem-sucedida de produtos de amplificação nessas faixas de fluxo lateral (Figura 8). Um esquema que ilustra o mecanismo para detecção limitada de amplicon de dupla marcação quando executados não diluídos em faixas de fluxo laterais mostrados na Figura 8. As reações TwistAmp Nfo contêm uma sonda marcada com hapteno bloqueada em 3' (contendo um resíduo de tetra-hidrofurano (THF) interno), um primer reverse marcado com hapteno e Endonuclease IV (Nfo). Neste estudo, as sondas foram tipicamente marcadas com biotina, enquanto o primer reverse foi marcado com DNP ou FAM. Após a amplificação, a sonda marcada com biotina se liga à fita recém-sintetizada, marcada com DNP/FAM. Uma vez que a sonda se liga, Nfo cliva a ligação fosfodiéster 5' do resíduo THF (Etapa 1). A sonda de corte atua como um primer para uma polimerase de deslocamento de fita que estende a sonda efetivamente removendo o bloco 3' (Etapa 2). Rodadas sucessivas de RPA resultam, portanto, na geração de amplicons marcados com dois haptenos (Etapa 3). No entanto, acreditamos que, a menos que a reação seja diluída, a maioria do analito permanece sequestrada em coacervatos de RPA (Etapa 4), tornando-o praticamente indisponível para ligação na linha de teste, resultando em sinais da linha de teste falsos negativos/positivos verdadeiros fracos.

[00102] A presente divulgação fornece meios para que os usuários finais executem determinações de fluxo lateral com um número reduzido de etapas práticas, em particular sem etapas de diluição sendo

necessárias para uma separação de fluxo lateral bem-sucedida diretamente da mistura de amplicons RPA (detecção direta).

[00103] Inicialmente, a análise direta da RPA em dispositivos de fluxo lateral sem diluição mostrou-se mal sucedida. A alta concentração de PEG de 35kDa usada na mistura de amplificação padrão de RPA significava que as reações eram muito viscosas para absorver completamente, e uma porção significativa do coloide de ouro se agregava na extremidade proximal da faixa. A presente divulgação fornece uma mistura RPA aprimorada, que é projetada para mitigar os efeitos observados ao usar PEG de 35 kDa. A mistura RPA modificada utiliza PEG de baixo peso molecular como agente de aglomeração (6,5% PEG de 3kDa) e 0,5% v/v Brij-35, o que melhora significativamente a migração de coloide de ouro através da membrana de nitrocelulose. Embora a química de TwistAmp Nfo disponível comercialmente (que compreende 35kDa PEG) permitisse alguma detecção de amplicons, uma vez que eles foram adequadamente diluídos com tampão de corrida em faixas de ensaio de fluxo lateral existentes produzidas comercialmente ou internamente, houve pouca estimulação no sinal detectável no local de teste em reações RPA contendo 1.000 cópias de modelo vs. NTCs, quando o Nfo RPA de baixo MW PEG (6,5% 3kDa PEG) é executado não diluído nas faixas (Figura 7).

[00104] A análise de fluxo lateral do ensaio de TwistAmp Nfo contra o alvo *InvA* de *Salmonella* é mostrada na Figura 7. Reações de TwistAmp Nfo (NTCs e DNA modelo de 1.000 cópias por reação; reações de TwistAmp Nfo contêm PEG de 35kDa). Os RPAs foram analisados diluídos 1/50 em tampão de corrida em faixas de fluxo lateral comercial (PCRD, painel esquerdo) e faixas anti-FAM produzidas internamente (painel do meio). Paralelamente, as reações de 3kDa PEG RPA foram analisadas não diluídas no mesmo lote de faixas anti-FAM (painel direito).

[00105] Para determinar se uma marcação de duplo hapteno seria mais aplicável à detecção direta e não diluída em faixas de fluxo

laterais, três tipos de analito foram inseridos no TBST (de 0 a 120nM) ou em reações RPA simuladas contendo todos os componentes RPA em 6,5% PEG de 3kDa, antes da análise nas faixas. Os três analitos foram: 1) um oligonucleotídeo de 28mer marcado nas extremidades 5' e 3' com FAM e biotina, respectivamente; usado para simular um amplicon marcado com hapteno; 2) A nova sonda de duplo hapteno Bio-FAM; 3) Uma sonda Fpg, onde o grupo dR abásico é rotulado com o duplo hapteno Bio-FAM. É importante ressaltar que todos os três analitos foram detectados em uma extensão semelhante quando inseridos no tampão, com sinais positivos observados na menor concentração de analito testado (~ 1nM). Quando as detecções foram realizadas não diluídas contra RPA simulado inserida, as faixas executadas na ausência de analito demonstraram algum sinal não específico fraco. Também foram observados sinais fracos até 120nM de analito para o oligonucleotídeo de dupla marcação e a sonda de Fpg de duplo hapteno. No entanto, uma estimulação significativa no sinal da linha de teste vs. amostras negativas foi observada apenas para o analito de duplo hapteno livre (Figura 1 iii). Esses dados concordam com a hipótese de que pequenos rótulos podem ser usados para a detecção não diluída de produtos RPA em faixas de fluxo laterais, enquanto que rótulos de ácidos nucléicos marcados (conforme liberados das reações comerciais existentes de Nfo RPA) não são facilmente detectáveis, devido à localização de tais sondas volumosas no RPA coacervam, o que limita a disponibilidade para a detecção desses rótulos na faixa de fluxo lateral.

Exemplo 12: Detecção direta de RPA em faixas laterais de fluxo

[00106] Para usar o analito de duplo hapteno para detecção de RPA, é necessário que o rótulo seja efetivamente sequestrado até que a amplificação ocorra. Portanto, uma sonda de Fpg contra o alvo rs1207445 foi comprada com um local abásico de dR modificado por amino, que pode ser conjugado à marcação de duplo hapteno (sonda 1 rs1207445). Durante o RPA, a sonda hibridiza com o amplicon, momento em que Fpg cliva o sítio

abásico nos 5' e 3' do grupo dR por eliminação de $\beta\delta$ (Figura 2 i), Etapa 1), liberando a marcação de duplo hapteno (Figura 2 i), Etapa 2). Devido ao seu tamanho pequeno, o analito de duplo hapteno é livre para escapar dos coacervatos RPA (Figura 2i), Etapa 3), de modo que possa ser detectado por imunoensaio em sanduíche na faixa de fluxo lateral (Figura 2i), Passo 4). É importante ressaltar que a sonda não processada (que teoricamente pode ser detectável, pois é acoplada a ambos os haptenos) provavelmente é sequestrada em coacervados RPA, o que a torna não detectável nas reações RPA, nas quais não ocorre amplificação. Este efeito é exemplificado pelo fato de que a sonda pura inserida em reações simulada de RPA é menos detectável que a marcação livre (Figura 1 iii).

[00107] Para obter a prova de princípio de que as sondas Fpg de duplo hapteno podem ser usadas para detecção direta de RPA no fluxo lateral, reações de PEG RPA de baixo MW contra 10, 100 e 1.000 cópias/reacção de gDNA humano (mais NTCs) contendo a sonda de duplo hapteno rs1207445 (Sonda 1) foi realizada quadruplicada. Adicionou-se 1,5 μ l de ouro anti-biotina e a faixa caiu na mistura amplicon/ouro. Algum sinal não específico foi observado nas reações NTC, mas uma estimulação menor do sinal da linha de teste foi observada em réplicas de 2/4 de RPA contendo 10 cópias do modelo. Foi observada uma forte estimulação do sinal da linha de teste vs. NTCs em todas as reações contendo ≥ 100 cópias de gDNA por reacção (Figura 2 ii). Esses dados preliminares indicam que a nova química da sonda Fpg permite a detecção não diluída de produtos RPA em faixas de fluxo laterais.

[00108] Muitas faixas comerciais da NALFIA incorporam o conjugado de detecção na faixa, secando o coloide em uma camada conjugada. Além disso, a maioria das faixas também inclui uma linha de controle de fluxo, que atua para confirmar que as faixas foram absorvidas de maneira eficaz. Para determinar se poderiam ser produzidas faixas para detecção direta de RPA que incorporam esses recursos, as faixas foram

alinhadas com uma linha de teste anti-DNP, uma linha de controle de fluxo anticamundongo (que liga qualquer conjugado que desvia a linha de teste) e uma camada de conjugado de fibra de vidro contendo coloide de ouro seco antibiotina. O ensaio rs1207445 foi então realizado na ausência ou presença de 1000 cópias do gDNA humano, antes de soltar as faixas diretamente no RPA assim que a reação estivesse concluída. Em todos os casos, o fluxo efetivo foi observado como evidenciado pelo sinal forte na linha de controle de fluxo. Semelhante ao observado anteriormente, algum sinal fraco não específico foi observado na linha de teste anti-DNP em amplificações negativas; no entanto, uma estimulação significativa no sinal da linha de teste foi observada em amplificações positivas versus aquelas que não continham modelo (Figura 2 iii).

[00109] Tomados em conjunto, esses dados indicam que a nova sonda Fpg de duplo hapteno pode ser usada para a detecção direta e não diluída de produtos RPA em faixas de fluxo laterais.

Exemplo 13: Efeito do design da sonda no sinal falso positivo em reações RPA negativas

[00110] Sinais não específicos podem ser observados pelo olho em algumas reações negativas; no entanto, se alguém fizer uso de um leitor digital (tais dispositivos são rotineiramente usados com ensaios de fluxo lateral comercial), a instrumentação pode ser configurada para subtrair sinais de fundo por meio de algoritmos de análise de imagem. Se as faixas de teste forem usadas em configurações com recursos limitados, pode ser necessário visualizar as faixas de teste a olho nu; nesse caso, é desejável a capacidade de minimizar sinais não específicos na linha de teste para mitigar possíveis interpretações errôneas dos resultados pelos usuários.

[00111] O fato de o sinal não específico ser observado em reações negativas não é necessariamente uma questão se a faixa de fluxo lateral for analisada usando um leitor de faixa, pois isso pode subtrair o sinal de fundo em qualquer análise. No entanto, se as faixas forem usadas

em ambientes com recursos parcos, é desejável ser capaz de visualizá-las a olho nu, no caso em que o sinal não específico na linha de teste seja menos desejável. Portanto, a causa do sinal falso positivo foi determinada através da realização de reações de Fpg RPA de baixo MW de PEG para rs1207445 na presença ou ausência de Fpg, para determinar se o ruído foi causado pela ligação da sonda oligonucleotídica diretamente à linha de teste ou como um resultado do processamento aberrante da sonda pela enzima Fpg. Na presença de Fpg, o rs1207445 RPA demonstrou sinal falso positivo nas reações NTC, com um estímulo no sinal da linha de teste nas reações contendo 1.000 cópias do modelo de DNA genômico humano. As reações realizadas na ausência de Fpg demonstraram um sinal não específico significativamente reduzido nas reações NTC (e nenhuma amplificação nas reações contendo 1.000 cópias do DNA modelo), sugerindo que a sonda rs1207445 de hapteno duplo estava sendo processada aberrantemente, levando ao sinal falso positivo (Figura 3i). Em alguns casos, algum sinal não específico permanece na ausência de Fpg e esse sinal pode ser efetivamente removido pelo bloqueio da membrana.

[00112] Para determinar a causa do sinal não específico dependente de Fpg, a sequência da sonda Fpg de duplo hapteno rs1207445 foi analisada em busca de hairpins, primer/sonda e dímeros de sonda/sonda usando o NetPrimer (disponível em <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/>) ou o programa OligoAnalyser 3.1 (IDT; disponível em <https://eu.idtdna.com/calc/analyser>). Essas análises revelaram que a sonda poderia formar uma estrutura em hairpin fraca ($\Delta G = -7,9\text{kcal/mol}$) e um autodímero forte ($\Delta G = -14,19\text{kcal/mol}$). Em ambos os casos, o grupo dR (destacado em vermelho na Figura 3ii) encontra-se em um contexto de dupla fita e, portanto, pode atuar como um substrato para a enzima Fpg, fornecendo uma explicação potencial para o motivo de haver ruído dependente de Fpg nas reações NTC RPA.

[00113] Duas novas sondas rs1207445 foram projetadas: 1) Mod

da sonda 1 - essa sonda tem a mesma sequência da sonda 1 e forma as mesmas estruturas. No entanto, o sítio abásico agora está localizado fora das regiões de fita dupla putativas e não deve ser processado pelo Fpg; 2) Sonda 2 – essa sonda de duplo hapteno foi projetada para hibridar com uma região diferente dentro do amplicon rs1207445. Esta sonda demonstra hairpin reduzido ($\Delta G = -2,07\text{kcal/mol}$) e formação de auto-dímero ($\Delta G = -8,05\text{kcal/mol}$) vs. Sonda 1 e Sonda 1 mod. Além disso, o grupo dR está localizado fora de qualquer contexto de fita dupla e não deve servir como substrato para Fpg (Figuras 3 ii e iii).

To determine whether the improved probe designs could reduce the non-specific signal in negative amplifications whilst maintaining the ability to detect RPA in positive amplifications, NTC and positive (containing 1000 copies of human gDNA) RPA reactions in the presence of the three probes were detected undiluted on lateral flow strips. All positive reactions demonstrated significant stimulation in test line signal over

[00114] Para determinar se os projetos de sonda aprimorados podem reduzir o sinal não específico em amplificações negativas enquanto mantém a capacidade de detectar RPA em amplificações positivas, reações de NTC e RPA positivas (contendo 1000 cópias de gDNA humano) na presença das três sondas foram detectadas não diluídas nas faixas de fluxo laterais. Todas as reações positivas demonstraram estimulação significativa no sinal da linha de teste em amplificações negativas, sugerindo que o RPA estava desempenhando como esperado (Figura 3iii). A sonda 1 rs1207445 demonstrou o sinal de fundo mais alto em amplificações negativas. O sinal não específico quase não foi detectado em amplificações negativas contendo a sonda 1 mod e não era visível em reações contendo a sonda 2 (Figura 3iii). Assim, o sinal não específico em amplificações negativas pode ser efetivamente reduzido ou eliminado projetando sondas que não formam ou reduzem a probabilidade de formar estruturas secundárias, auto-ímeros ou cruzados. Em alguns casos, essas estruturas não podem ser evitadas, e o sítio abásico deve estar localizado fora de qualquer contexto de fita dupla.

Exemplo 14: Detecção direta de RPA no fluxo lateral - sensibilidade

analítica e aplicabilidade a outros alvos

[00115] Foi realizada uma exemplificação adicional da sonda de duplo hapteno de Fpg para detecção direta de RPA. O ensaio rs1207445 e outro ensaio interno existente para *Campylobacter jejuni* foram inicialmente comparados. O ensaio de *C. jejuni* utilizou primers projetados anteriormente direcionados contra o rRNA 16S, com a única modificação sendo que a sequência da sonda Fpg existente foi substituída pela nova sonda de marcação de haptenos duplo projetada para a detecção direta de fluxo lateral.

[00116] Em ambos os exemplos, foi realizado um PEG RPA de baixo MW quadruplicado, com reações contendo 10, 100 ou 1.000 cópias do DNA modelo apropriado (gDNA humano e modelo sintético de rDNA 16S de *C. jejuni* para os ensaios *Campylobacter* e rs1207445, respectivamente). Os produtos RPA foram então analisados não diluídos em faixas de fluxo laterais anti-DNP. No ensaio rs1207445 aprimorado (utilizando a sonda 2 rs1207445), nenhum sinal foi observado na linha de teste nas reações NTC. As linhas de teste eram fracas, mas presentes em todo RPA contendo 10 cópias do DNA modelo (delineadas em verde na Figura 4i); mais visível na borda da faixa), com bons sinais observados nas faixas de teste para todas as reações RPA contendo ≥ 100 cópias de gDNA humano (Figura 4 i).

[00117] No ensaio de *C. jejuni*, havia um sinal falso positivo fraco em todos os NTCs (deve-se notar que essa sonda não foi reprojeta para fluxo lateral, exibe alguma estrutura secundária menor e autodimerização). No entanto, sinais de linha de teste muito fortes foram observados em todas as amplificações contendo ≥ 10 cópias do DNA modelo (Figura 4 ii).

[00118] Tomados em conjunto, esses dados sugerem que a detecção da faixa de fluxo lateral é limitada apenas pelo sucesso da reação de amplificação; a mesma química RPA aprimorada para uso com o ensaio de fluxo lateral de detecção direta foi usada em ambos os casos. Além disso, os dados demonstram que a química aprimorada da sonda de Fpg

pode ser aplicada a uma ampla gama de processos RPA para detecção do ácido nucleico alvo. Essa tecnologia aprimorada pode ser prontamente aplicada a muitos alvos em potencial, com sensibilidades analíticas que equivalem a outros formatos comerciais de ensaios NAAT. Embora alguns sinais falsos positivos tenham sido observados no ensaio de *C. jejuni*, espera-se que essas observações possam ser mitigadas através de um processo de seleção cuidadosa da sequência de nucleotídeos da sonda para minimizar a possibilidade de formação de autodímeros/estruturas secundárias; como foi observado com a sonda revisada usada no ensaio para rs1207445.

[00119] Foi realizada uma exemplificação adicional da tecnologia aprimorada de fluxo lateral de detecção direta. Novos primers RPA e sondas para a detecção de *E. coli* O157:H7 foram preparados. Esse ensaio pode ser usado para testes em alimentos, com potencial para uso no diagnóstico rápido de doenças usando amostras fecais. Foram desenvolvidos ensaios de fluxo lateral de RPA que poderiam ser usados para identificar os genes marcadores (*rfb*_{O157}) e (*fliC*_{H7}) que representam regiões altamente conservadas em todas as cepas de *E. coli* O157:H7. Os ensaios RPA recém-desenvolvidos foram inicialmente projetados como testes singleplex, com possibilidade de multiplexagem bioquímica do teste em uma data futura (usando sondas Fpg marcadas com marcações de heptano duplo de bio-DNP e bio-FAM-respectivamente, uma vez que tais sondas podem ser detectadas independentemente em diferentes linhas de captura em uma faixa de teste de fluxo lateral).

[00120] A triagem preliminar de todas as combinações de primer/sonda para os sorotipos de *E. coli* foi realizada usando ensaios de sonda fluorescente TwistAmp Fpg (contendo 5,5% de 35kDa de PEG) usando o instrumento isotérmico T8 com a intenção de descobrir combinações de primer/sonda que exibissem uma sensibilidade analítica de ~10 cópias por reação, com cinética de amplificação rápida (tempos de

aparição de < 6 minutos a 10 cópias, com alta fluorescência máxima). As sondas com melhor desempenho em ensaios fluorescentes foram então modificadas para uso como sondas Fpg de duplo hapteno em PEG RPA de baixo MW para uso em fluxo lateral de ensaio direto (os primers são os mesmos entre ensaios de fluxo fluorescente e lateral).

[00121] A Figura 5 i) mostra uma comparação do novo ensaio de *Fpg* fluorescente de rfb_{O157} (35kDa PEG) contra o ensaio para detecção direta e não diluída de reações de PEG RPA de baixo MW em faixas de fluxo lateral. O teste da sonda fluorescente (usando 35kDa PEG) exibe sinal acima da linha de base do NTC (em vermelho) em todas as réplicas em 10 cópias do DNA modelo (DNA sintético quantificado). Conforme esperado, todas as reações contendo 100 cópias (verde) e 1.000 cópias (azul) foram positivas, com tempos de aparição e fluorescência máxima correlacionando-se bem com a quantidade de DNA modelo por reação. No ensaio de fluxo lateral direto, foram observados sinais positivos na linha de teste em três das quatro réplicas em 10 cópias do DNA modelo (todas as réplicas contendo ≥100 cópias do modelo foram fortemente positivas). Nenhum sinal falso positivo visível foi observado nos NTCs, demonstrando ainda mais que o bom design da sonda pode eliminar esses artefatos (porque a mesma química de faixa usada para o ensaio rs1207445 também foi utilizada na detecção de *E. coli*).

[00122] A Figura 5 ii) mostra o desempenho da sonda singleplex fluorescente *fliC_{H7}* em comparação com o método de fluxo lateral direto. Novamente, o teste da sonda fluorescente mostrou forte amplificação para 10 cópias (amarelo) em todas as réplicas testadas, com fluorescência máxima e tempos de aparição correlacionando-se bem com a quantidade de cópias do modelo de DNA sintético quantificado presente na reação. No ensaio de fluxo lateral de duplo hapteno Fpg, foi observado um sinal fraco em 10 cópias nas três das quatro repetições, com um sinal mais forte para uma réplica. Um sinal falso positivo muito fraco foi observado em todos os

NTCs para o ensaio de *fliC_{H7}*; Contudo; esse sinal não específico pode ser eliminado por meio de um projeto de sonda iterativa adicional e do uso de reagentes de bloqueio, como demonstrado anteriormente.

[00123] Esses dados demonstram a versatilidade da nova química da sonda Fpg de duplo hapteno e mostram que ensaios sensíveis podem ser projetados contra patógenos importantes com relativa facilidade, atingindo sensibilidade comparável aos ensaios de fluorescência Fpg comercial existentes.

Exemplo 15: Facilidade de uso aprimorada do ensaio de fluxo lateral de haptenos duplo Fpg - 'Fluxo contínuo'

[00124] A detecção direta e não diluída de produtos RPA pode reduzir a complexidade dos consumíveis de um ensaio, reduzindo assim os custos de fabricação e simplificando o procedimento de teste para os usuários finais. A presente divulgação pode reduzir os tempos de teste de aproximadamente 40 minutos, utilizando o ensaio RPA de fluxo lateral de duplo hapteno Fpg para 30 minutos ou menos, dependendo da sensibilidade do ensaio necessária.

[00125] Estudos de viabilidade foram realizados para demonstrar os benefícios de ter a faixa de ensaio de fluxo lateral presente na reação RPA ao longo do ciclo de amplificação. Os volumes de reação foram aumentados de 100 µl para 200 µl para acomodar o fato de que a mistura começa a migrar ao longo da faixa antes que ocorra uma amplificação significativa. Inicialmente, a marcação de coloide antibiotina de ouro foi colocada diretamente na mistura de reação RPA antes da amplificação para impedir a liberação do conjugado da camada antes que o amplicon se acumulasse. Foram avaliados diferentes materiais da camada de absorção de peso pesado (material de controle: CF5, fibra de celulose de peso médio; materiais experimentais: CF6 e Grau 320, celulose de peso pesado) foram avaliados, a fim de aumentar o volume de reação que poderia ser processado na faixa. As faixas de teste foram laminadas com uma fita

adesiva de cobertura, para ajudar a impedir que a camada de absorção de delaminação do dispositivo à medida que o ensaio RPA prossegue.

[00126] A prova de conceito foi estabelecida usando o ensaio de duplo hapteno (Bio-DNP) de rs1207445 Fpg, usando 200 µl de péletes RPA liofilizadas para uso com o ensaio de fluxo lateral (3kDa PEG). Os péletes foram hidratados com um recipiente de tampão contendo 0 ou 5000 cópias do DNA modelo mais 1,5 µl de coloide antiotina de ouro e faixas anti-DNP com absorções feitas de camadas de peso pesado de CF5 (controle), CF6 ou grau 320; todas as misturas de reação foram adicionadas imediatamente a cada uma das faixas laterais de fluxo, que foram incubadas a 40°C por 30 minutos.

[00127] Na Figura 6, faixas feitas com os materiais de camadas de absorção indicados foram incubadas na reação RPA durante a amplificação. Os dados mostrados são para o ensaio Fpg de duplo hapteno rs1207445, as reações NTC foram comparadas àquelas contendo 5000 cópias do DNA modelo.

[00128] Nas faixas de controle (CF5), um sinal falso positivo muito forte foi observado em todas as reações NTC, com apenas uma pequena estimulação do sinal da linha de teste em 5000 cópias do DNA modelo de entrada (Figura 6i), painel superior). No entanto, enquanto as faixas CF6 emitiam algum sinal de falso positivo (mais fraco que nas faixas de controle), a resposta de falso positivo foi efetivamente eliminada ao usar as tiras de Grau 320. O que é esperado como resultado do grande volume de leitos do material Grau 320, que pode ter uma ação capilar aprimorada em comparação com os materiais CF5 ou CF6. O analito pode fluir mais prontamente pelas faixas baseadas em material de Grau 320 em comparação com as faixas CF5, reduzindo assim a quantidade de tempo disponível para que interações não específicas ocorram. Além disso, houve uma estimulação marcada no sinal da linha de teste nas amplificações contendo DNA modelo (Figura 6, painel inferior).

Exemplo 16: Design da sonda Exo

[00129] Este exemplo descreve um exemplo de projeto de sonda para uma sonda clivável por Exonuclease III (Exo). Uma estrutura de sonda exemplar é mostrada abaixo. A sequência abaixo é um exemplo de sonda; a sequência é projetada para ser complementar ao DNA de alvo amplificado.

5'-

XAAATTTCTACTTTTGGCCAGTTCTACAATTTGTTL**HATATCACATGGATG
TB-3'** (SEQ ID NO:1)

Em que:

X = 5' hexil

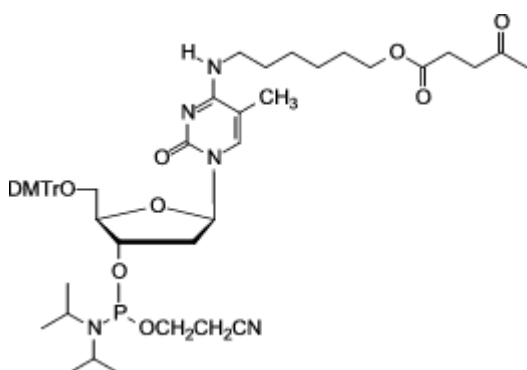
H = resíduo THF

B = espaçador C3 (um bloco para digestão com nuclease 3'-5')

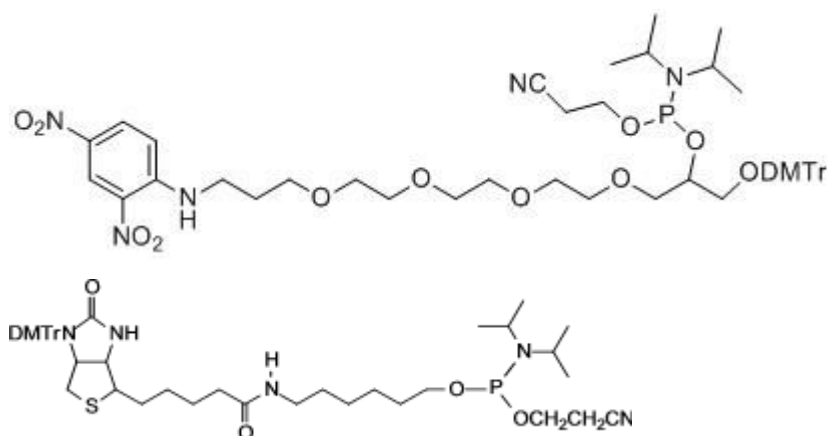
L = modificador ramificado compreendendo DNP TEG e Biotina Hexil; uma ligação fosforotioato (PS) entre as frações hexil biotina e DNP TEG pode ser empregada para garantir a estabilidade da ligação inter-hapteno.

[00130] As sondas são projetadas com um bloco 3' B (por exemplo, espaçador C3, por exemplo, propanol) que impede a digestão indesejada de nucleases da sonda. Um modificador ramificado, L, é incorporado ao lado 5' de um resíduo THF abásico H. No exemplo acima, L está imediatamente a 5' de H, mas é possível que L possa ser estendido adicionalmente de H na direção 5'-. Os resíduos de THF estão localizados com aproximadamente 30nt de sequência complementar a montante e aproximadamente 15nt de sequência complementar a jusante.

[00131] L representa uma nucleobase de citosina modificada (C) e, como tal, deve substituir um resíduo C na sequência da sonda. L é incorporado durante a síntese de oligo em fase sólida usando um fosforamidito disponível comercialmente com a seguinte estrutura (LGC LINK (Teddington, Reino Unido) item # 2150):



[00132] Este fosforamidito é incorporado durante o curso de uma síntese normal de oligo DNA da fase sólida; o 5'-OH do oligo é desprotegido (o grupo de proteção DMTr é removido) e depois tapado com um bloco 5' X (por exemplo, C6, por exemplo, hexil) antes do grupo protetor de levulinil anexado à amina exocíclica da citosina modificada representada acima é removido - isso libera um grupo hidroxil que permite adicionalmente uma extensão ramificada da nucleobase da citosina com outros fosforamiditos. Os amiditos que incorporam os heptanos, como DNP TEG (abaixo de cima, LGC LINK item # 2549) e depois biotina ('Bio') hexil (abaixo de fundo, LGC LINK item # 2109), produzem uma sonda com dupla marcação com haptenos no modificador ramificado L.



[00133] Em uma reação RPA contendo amplicon alvo, o Exo III cliva o resíduo abásico H da sonda e a digestão subsequente 3'-5' pelo Exo III libera um mononucleotídeo L (com 5'-fosfato e 3'-OH) que é marcado com dois haptenos distintos. Este mononucleotídeo com marcação de duplo hapteno é livre para sair do coconservador RPA e interagir com anticorpos na visualização de partículas e na linha de teste de uma faixa LF.

[00134] O projeto da sonda Exo descrito permite a incorporação modular de diferentes haptenos no sítio da ramificação L, usando fosforamiditos que estão disponíveis comercialmente. As marcações Bio/DNP, Bio/FAM e FAM/DNP em L são todas possíveis; a ordem de fixação dos haptenos à nucleobase da citosina de L também pode ser comutada livremente. Finalmente, um hapteno (por exemplo, DNP/FAM/BIO) pode ser empregado como tampa 5' X da sonda no lugar de, por exemplo, hexil, no caso de um terceiro hapteno distinto ser desejado para ligar e filtrar a sonda não processada. Se o fosforamidito DNP-TEG representado acima for empregado como tampa 5', então uma etapa adicional de desproteção e nivelamento é utilizada para remover o grupo DMTr e bloquear o resultante 5'-OH com, por exemplo, hexil).

[00135] A Figura 9 mostra estruturas exemplares de sondas Exo e seu uso. O painel esquerdo mostra uma comparação do analito da sonda Fpg e do analito Exo - as sondas Exo têm um modificador ramificado Levulnlyl dC marcado com DNP TEG e Biotin Hexil situado um nucleotídeo a montante do resíduo de tetra-hidrofurano. O painel direito mostra um mecanismo contemplado de como o analito é gerado no RPA. Quando a sonda liga a fita complementar do amplicon, o Exo corta no THF e depois mastiga novamente usando a atividade da exonuclease 3', liberando a citosina marcada com Biotina/DNP, que é detectada nas tiras (usando a linha de teste anti-DNP e coloide de ouro anti-biotina ou outras nanopartículas).

Formulação de reação

[00136] Resumidamente, as reações Exo LF RPA são incubadas a 40°C por 20 minutos. As formulações de RPA para fluxo lateral (Exo) contêm 420nM de cada primer forward e reverse apropriado, 120nM da sonda de duplo hapteno Fpg, 50mM de Tris Acetato pH 8,3, 100mM de KOAc, 5mM de DTT, 1x creatina quinase, 30µg de Gp32, 30µg UvsX, 7 µg de UvsY, 6,5% de PEG de 3kDa, 5,7% de trealose, 8,6 µg de DNA

polimerase I (*S. aureus*), 10 µg de Exonuclease III, 50mM de Fosfocreatina, 2,5mM de ATP, 1,8 mM de dNTP, e Brij-35 a 0,5%. As reações são iniciadas pela adição de uma mistura contendo o modelo apropriado e Mg(OAc)₂ (concentração final de 22,5 mM) a um volume final de 100 µl.

Fluxo contínuo – fluxo lateral RPA em uma etapa

[00137] A alta sensibilidade da química da sonda Exo LF permitiu o uso em um sistema de 'fluxo contínuo', onde a amplificação de ácidos nucleicos RPA e a detecção de faixas são realizadas simultaneamente, o que pode reduzir o tempo para resultar em aproximadamente 5 minutos após a adição do modelo (20 – 30 minutos para uma sensibilidade ideal contra baixos números de cópias de DNA de entrada). Para tornar isso viável, as faixas de fluxo laterais devem poder processar mais analito do que apenas no sistema RPA LF não diluído - isso pode ser alcançado usando materiais de camadas absorventes pesados (por exemplo, linter de algodão grau 320 (Ahlstrom)) vs. o material CF5 usado em faixas de detecção de desfecho. Este material não apenas permite que mais analito flua na faixa, mas também parece aumentar a velocidade do fluxo, o que reduz sinais não específicos vs. outros tipos de camadas. As tiras também incluem uma fita de cobertura, que ajuda a reduzir a delaminação; comum ao usar camadas absorventes de peso espesso.

[00138] Além de reduzir o tempo para o resultado, os benefícios do sistema de fluxo contínuo como um todo são: 1) não é necessário processar/diluir a reação de amplificação (reduz o risco de contaminação, simplifica possíveis fluidos consumíveis); 2) fluidos consumíveis são reduzidos (essencialmente o consumível é uma câmara aquecida para a RPA, que entra em contato diretamente com a faixa de fluxo lateral).

[00139] A Figura 10 mostra dados usando a química Exo LF não diluída descrita acima nos dois ensaios de *E. coli* descritos nos exemplos acima e comparados com o ensaio de Fpg descrito acima (os números indicam o número de cópia de DNA de entrada; NTC = Sem controle de

modelo). Novamente, as faixas são adicionadas após amplificação. O ensaio Exo exibiu maior sensibilidade e um forte sinal de linha de teste. Os sinais se desenvolvem muito mais rápido que a química do Fpg. Além disso, embora permaneça algum sinal de falso positivo, ele é muito aprimorado na configuração do Fpg.

[00140] A Figura 11 mostra amplificação/detecção simultânea usando a química da sonda Exo. A amplificação e detecção simultâneas têm o benefício de que o tempo de resultado é mais rápido (20-30 minutos) e, além disso, simplifica o design dos consumíveis. Os dados na Figura 10 mostra uma comparação da detecção de desfecho com fluxo contínuo. Sensibilidade semelhante é observada entre os dois. Sinais falsos positivos são mais fortes no fluxo contínuo, o que pode ser devido à presença de fita de cobertura.

[00141] A Figura 12 mostra um dispositivo exemplar para uso em um fluxo lateral de RPA de uma etapa. O dispositivo possui uma câmara de reação para reagentes de ensaio e uma câmara de faixa para detecção durante a amplificação. No dispositivo mostrado na Figura 12, existe um canal entre a câmara de reação e a câmara de faixa que permite o fluxo entre as duas câmaras. Em algumas modalidades, a câmara contém um pélete liofilizado contendo componentes RPA. A adição do DNA modelo, o tampão e a colocação da câmara em um bloco de calor a 40 graus C iniciam a amplificação. Em algumas modalidades, a câmara mantém um agitador magnético para mistura. A amplificação ocorre quando a reação corre pela faixa, resultando em sinal de linha de teste.

OUTRAS MODALIDADES

[00142] Deve ser entendido que embora a divulgação tenha sido descrita em conjunto com sua descrição detalhada, a descrição anterior destina-se a ilustrar e não a limitar o escopo da invenção, o qual está definido pelo escopo das reivindicações anexas. Outros aspectos, vantagens e modificações estão dentro do escopo das reivindicações a

seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de amplificação pela polimerase recombinase **caracterizada** pelo fato de que compreende:

um agente de agregação;

uma sonda de oligonucleotídeo com um grupo lábil de duplo hapteno; e

uma enzima nuclease.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o agente de agregação compreende polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), Ficoll ou dextrano.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizada** pelo fato de que o agente de agregação tem um peso molecular de pelo menos 1 kilodalton, pelo menos 2 kilodaltons, pelo menos 3 kilodaltons, pelo menos 4 kilodaltons, pelo menos 5 kilodaltons, pelo menos 6 kilodaltons, em pelo menos 8 kilodaltons, ou pelo menos 10 kilodaltons.

4. Composição, de acordo com as reivindicações 1 a 3, **caracterizada** pelo fato de que o agente de agregação está presente na composição em uma concentração de pelo menos 15% v/v, numa concentração de pelo menos 12% v/v, numa concentração de pelo menos 10% v/v, numa concentração de pelo menos 8% v/v, de pelo menos 6% v/v, numa concentração de pelo menos 5% v/v, numa concentração de pelo menos 4% v/v, ou numa concentração de pelo menos 3% v/v.

5. Composição, de acordo com as reivindicações 1 a 4, **caracterizada** pelo fato de que o agente de agregação tem um perfil de viscosidade a 20 graus Celsius menor ou igual a 5mPa/s, menor ou igual a 4mPa/s, menor ou igual a 3mPa/s, menor ou igual a 2mPa/s, ou menor ou igual a 1mPa/s.

6. Composição, de acordo com as reivindicações 1 a 5, **caracterizada** pelo fato de que o agente de agregação é PEG com uma viscosidade a 20 graus Celsius menor ou igual a 3 mPa/s.

7. Composição, de acordo com as reivindicações 1 a 6, **caracterizada** pelo fato de que o agente de agregação é PEG com um peso molecular de 3 kilodaltons e em que o PEG está na concentração de 6,5% v/v.

8. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a sonda oligonucleotídica compreende um nucleotídeo dR-O-[C]_n que não

possui uma base que liga o grupo lábil ao oligonucleotídeo.

9. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a nuclease é a formamidopirimidina DNA glicosilase.

10. Composição, de acordo com as reivindicações 1 a 9, **caracterizada** pelo fato de que a sonda oligonucleotídica com um duplo hapteno, quando clivada pela formamidopirimidina DNA glicosilase quando a sonda oligonucleotídica for hibridizada em uma sequência nucleotídica complementar, libera o grupo lábil de duplo hapteno.

11. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o grupo lábil de duplo hapteno compreende dois grupos imunogênicos com epítomos diferentes.

12. Composição, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizada** pelo fato de que os grupos imunogênicos compreendem um grupo fluorescente, uma enzima ou fragmento desta, um peptídeo ou fragmento deste, biotina.

13. Composição, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada** pelo fato de que os grupos imunogênicos são selecionados do grupo compreendendo biotina, fluoresceína, digoxigenina ou dinitrofenil.

14. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que a referida sonda oligonucleotídica é clivável por uma exonuclease e em que o referido oligonucleotídeo libera o referido grupo lábil de duplo hapteno quando clivado.

15. Composição, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada** pelo fato de que a referida exonuclease é exonuclease III.

16. Composição, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada** pelo fato de que a referida sonda oligonucleotídica tem a estrutura $5'X(n)_aL(n)_bH(n)_cB3'$, em que n são nucleotídeos, a, b e c são números inteiros, X é um 5' hexil, H é um resíduo THF, B é um espaçador C3, e L é um modificador ramificado compreendendo uma pluralidade de haptenos.

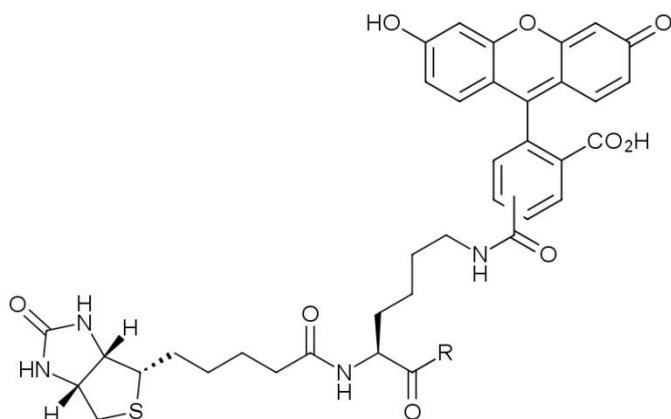
17. Composição, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizada** pelo fato de que os referidos haptenos são selecionados do grupo consistindo em DNP, FAM e biotina.

18. Composição, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizada** pelo fato

de que a referida sonda oligonucleotídica compreende uma ligação fosforotioato entre os haptenos.

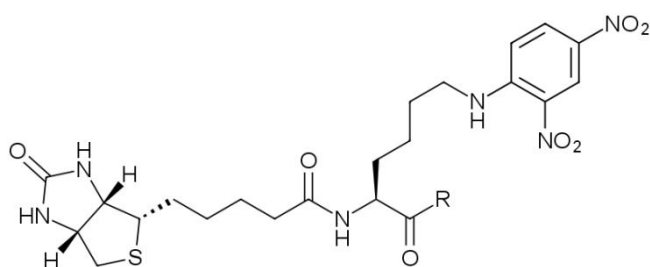
19. Composição, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizada** pelo fato de que o referido espaçador C3 é propanol.

20. Composição **caracterizada** pelo fato de que compreende:



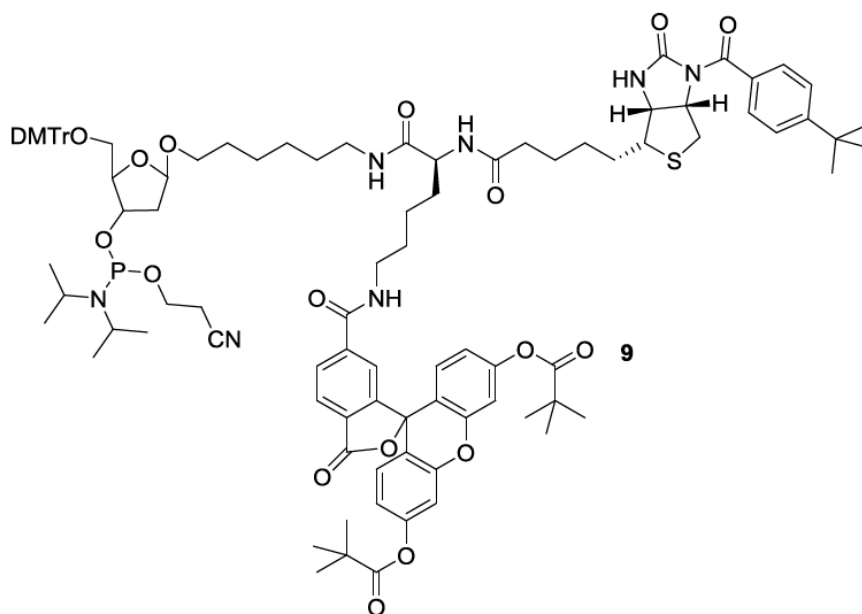
, em que R é OH ou $\text{-NH(CH}_2\text{)}_6\text{OH}$.

21. Composição **caracterizada** pelo fato de que compreende:



, em que R é OH ou $\text{-NH(CH}_2\text{)}_6\text{OH}$.

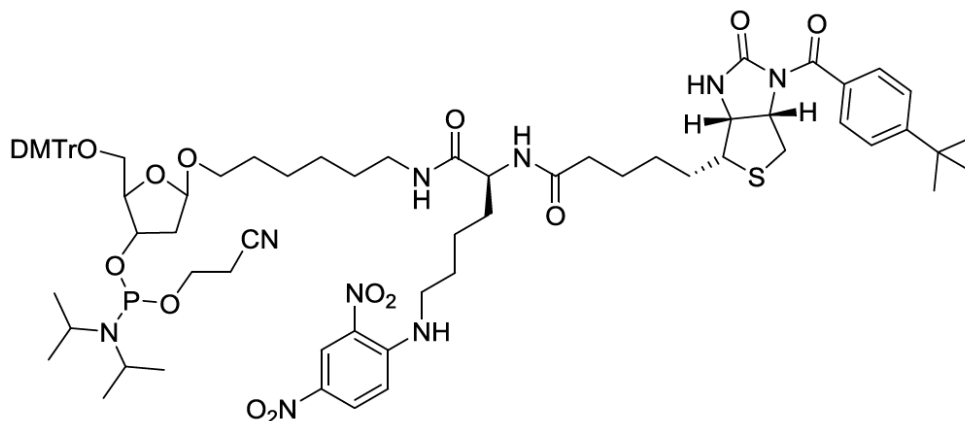
22. Composição **caracterizada** pelo fato de que compreende:



, em que DMTro é

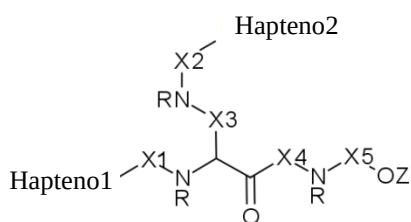
dimetoxitritil.

23. Composição **caracterizada** pelo fato de que compreende:



em que DMTr é dimetoxitritil.

24. Composição **caracterizada** pelo fato de que compreende:



, em que:

Hapteno1 e Hapteno2 são grupos imunogênicos de acordo com a reivindicação 22 ou 23;

Z é selecionado dentre: (i) um C1' de um anel de ribose ou desoxirribose abásico dentro do contexto de um oligonucleotídeo de RNA ou DNA respectivamente; com uma beta-configuração no átomo de carbono anomérico; (ii) um composto de fosforamidita configurado para se ligar em um oligonucleotídeo de DNA ou RNA; e em que, quando Z for uma fosforamidita de DNA ou RNA, os grupos reativos de Hapteno1 e Hapteno2 poderão ser, opcionalmente, protegidos com pivaloil; terc-butilbenzoil; acil; benzoil; ou isobutiril;

R representa hidrogênio, ou C1 a C6 alquil linear ou ramificado;

X1, X2 e X4 são grupos de ligação que podem estar independentemente ausentes, ou ser C1 a C12 alquil linear ou ramificado, que podem ser opcionalmente interrompidos por um ou mais grupos –O-, -C(=O)- ou –NR-;

X3 é C1 a C6 alquil linear ou ramificado; e

X5 é C1 a C12 alquil linear ou ramificado, que é opcionalmente interrompido por um ou mais grupos –O-, -C(=O)- ou –NR-.

25. Dispositivo **caracterizado** pelo fato de que compreende: uma faixa de fluxo lateral, compreendendo

uma zona de aplicação de amostra;

uma zona de reagente a jusante da zona de aplicação de amostra e em comunicação fluida com a mesma, a zona de reagente compreendendo uma composição de reagente RPA seco para amplificar um ácido nucleico alvo, um agente de ligação específico para um produto de ácido nucleico alvo amplificado e uma molécula de detecção;

pelo menos uma zona de teste a jusante da zona de reagente e em comunicação fluida com a mesma, a zona de teste compreendendo uma molécula de captura imobilizada específica para o produto de ácido nucleico alvo amplificado; e

uma zona de controle a jusante da zona de teste.

26. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que a composição de reagente RPA seco compreende um agente de agregação, uma recombinase, uma polimerase, uma nuclease, uma sonda de duplo hapteno e uma molécula de detecção.

27. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de que a sonda de duplo hapteno compreende um conjugado de biotina e carboxifluoresceína (FAM) ou biotina e dinitrofenil (DNP).

28. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de captura imobilizada específica para o ácido nucleico alvo amplificado é selecionada do grupo consistindo em uma molécula de captura anti-FAM ou em uma molécula de captura anti-DNP.

29. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 28, **caracterizado** pelo fato de que o anti-FAM ou o anti-DNP são selecionados independentemente do grupo consistindo em um anticorpo policlonal, um anticorpo monoclonal e um fragmento de ligação funcional do mesmo, incluindo um FAB, um ScFv, um Fv ou um DAB.

30. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de detecção é selecionada do grupo consistindo em suspensões

coloidais ("sol") de ouro, suspensões coloidais de prata, suspensões coloidais de látex, uma nanoesfera de celulose, ou um nanostring de carbono e uma molécula de captura anti-biotina.

31. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que a zona de controle compreende uma zona de ligação que indica a operação correta da faixa de fluxo lateral.

32. Dispositivo, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que a zona de controle compreende uma linha de captura de anticorpo anti-camundongo.

33. Método de detecção de produtos de amplificação, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

o contato de uma amostra suspeita de conter um ácido nucleico alvo de interesse com reagentes RPA para amplificar o ácido nucleico alvo, uma sonda oligonucleotídica compreendendo uma sequência de ácido nucleico complementar ao ácido nucleico alvo e um grupo lábil de duplo hapteno covalentemente ligado, e uma nuclease;

a amplificação do ácido nucleico alvo para produzir um produto do ácido nucleico alvo; e

a detecção do produto de ácido nucleico alvo pela detecção de frações livres de duplo hapteno clivadas a partir da sonda oligonucleotídica hibridizada no ácido nucleico alvo.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizado** pelo fato de que os reagentes RPA estão localizados em uma zona de aplicação de amostra de uma faixa de fluxo lateral.

35. Método, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizado** pelo fato de que a amplificação de ácido nucleico é realizada na faixa de fluxo lateral após o contato da amostra com os reagentes RPA para formar uma mistura de amplificação de ácido nucleico.

36. Método, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizado** pelo fato de que a amplificação de ácido nucleico é realizada na faixa de fluxo lateral sem diluição ou adição de outro líquido à mistura de RPA.

37. Método, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizado** pelo fato de

que a fração de duplo hapteno clivada a partir da sonda oligonucleotídica é capturada seletivamente em uma zona de teste no fluxo lateral localizado a jusante da zona de aplicação de amostra.

38. Método, de acordo com as reivindicações 33 a 37, **caracterizado** pelo fato de que a sonda oligonucleotídica compreendendo um duplo hapteno covalentemente ligado não é capturada seletivamente em uma zona de teste na faixa de fluxo lateral.

39. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 38, **caracterizado** pelo fato de que a faixa de fluxo lateral compreende uma zona de teste e uma zona de controle, em que a zona de teste compreende um membro de par de ligação para captura do duplo hapteno clivado a partir do oligonucleotídeo e a zona de controle compreende um membro do par de ligação para um controle interno.

40. Método, de acordo com a reivindicação 39, **caracterizado** pelo fato de que a zona de controle compreende um anticorpo anti-camundongo ou um fragmento do mesmo.

41. Método, de acordo com a reivindicação 39, **caracterizado** pelo fato de que a zona de teste compreende uma molécula de captura anti-DNP ou uma molécula de captura anti-FAM.

42. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de captura anti-FAM é selecionada do grupo consistindo em um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal e um fragmento de ligação funcional do mesmo.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, **caracterizado** pelo fato de que a molécula de captura anti-DNP é selecionada do grupo consistindo em um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal ou um fragmento de ligação funcional do mesmo.

44. Método, de acordo com as reivindicações 33 a 43, **caracterizado** pelo fato de que a detecção dos produtos de amplificação compreende a captura do grupo lábil de duplo hapteno em uma zona de teste e a marcação do grupo lábil de duplo hapteno capturado com uma molécula de detecção.

45. Método, de acordo com a reivindicação 44, **caracterizado** pelo fato de

que a molécula de detecção é selecionada do grupo consistindo em suspensões coloidais de ouro, suspensões coloidais de prata, suspensões coloidais de látex, uma nanoesfera de celulose e um nanostring de carbono.

46. Método **caracterizado** pelo fato de que compreende:

a aplicação de uma amostra suspeita de conter o ácido nucleico alvo a uma faixa de fluxo lateral;

o contato da amostra com uma mistura de reagente RPA para amplificar o ácido nucleico alvo seco em uma zona reagente da faixa de fluxo lateral; e

a detecção dos produtos de amplificação, se presentes, em uma zona de teste da faixa de fluxo lateral.

47. Método, de acordo com a reivindicação 46, **caracterizado** pelo fato de que a amostra suspeita de conter um ácido nucleico alvo é aplicada em uma zona de aplicação de uma faixa de fluxo lateral.

48. Método, de acordo com a reivindicação 47, **caracterizado** pelo fato de que a mistura de reagente RPA compreende um agente de agregação, uma recombinase, uma polimerase, uma nuclease e uma sonda oligonucleotídica de duplo hapteno.

49. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que o agente de agregação é selecionado do grupo consistindo em polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), Ficoll e dextrano.

50. Método, de acordo com a reivindicação 48 ou 49, **caracterizado** pelo fato de que o agente de agregação tem um peso molecular de pelo menos 1 kilodalton, pelo menos 2 kilodaltons, pelo menos 3 kilodaltons, pelo menos 4 kilodaltons, pelo menos 5 kilodaltons, pelo menos 6 kilodaltons, em pelo menos 8 kilodaltons, ou pelo menos 10 kilodaltons.

51. Método, de acordo com a reivindicação 49 ou 50, **caracterizado** pelo fato de que o agente de agregação está presente na mistura em uma concentração de pelo menos 15% v/v, pelo menos 12% v/v de concentração final, pelo menos 10% v/v, pelo menos 8% v/v, pelo menos 6% v/v, pelo menos 5% v/v, pelo menos 4% v/v, ou pelo menos 3% v/v de concentração final.

52. Método, de acordo com as reivindicações 46 a 51, **caracterizado** pelo fato de que o agente de agregação tem um perfil de viscosidade a 20 graus Celsius

menor ou igual a 5mPa/s, menor ou igual a 4mPa/s, menor ou igual a 3mPa/s, menor ou igual a 2mPa/s, ou menor ou igual a 1mPa/s.

53. Método, de acordo com a reivindicação 46, **caracterizado** pelo fato de que o agente de agregação é PEG e tem uma viscosidade a 20 graus Celsius menor ou igual a 3 mPa/s.

54. Método, de acordo com a reivindicação 46, **caracterizado** pelo fato de que o agente de agregação é PEG compreendendo um peso molecular de 3 kilodaltons e em que o PEG está em uma concentração final de 6,5% v/v.

55. Método, de acordo com a reivindicação 48, **caracterizado** pelo fato de que a detecção dos produtos de amplificação, se presentes, compreende a detecção de uma fração de duplo hapteno clivada a partir da sonda oligonucleotídica hibridizada nos produtos de amplificação.

56. Método, de acordo com a reivindicação 46, **caracterizado** pelo fato de que a diluição da mistura de RPA não é necessária antes da detecção dos produtos de amplificação.

FIG. 1 i)

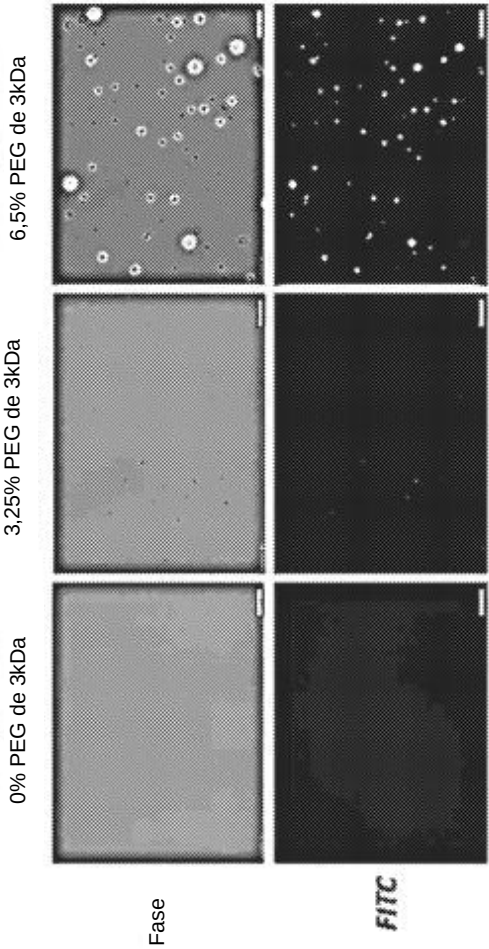
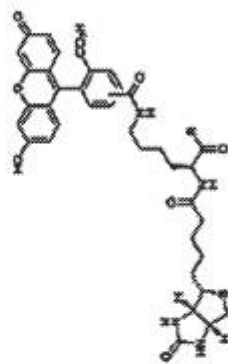
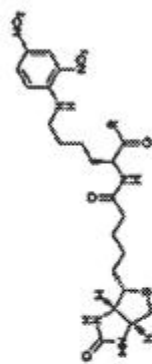


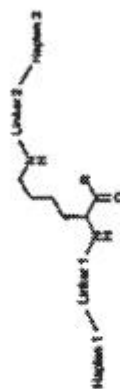
FIG. 1 ii)



Biotina-FAM



Biotina-DNP



Marcação de Duplo Hapteno

FIG. 1 iii)

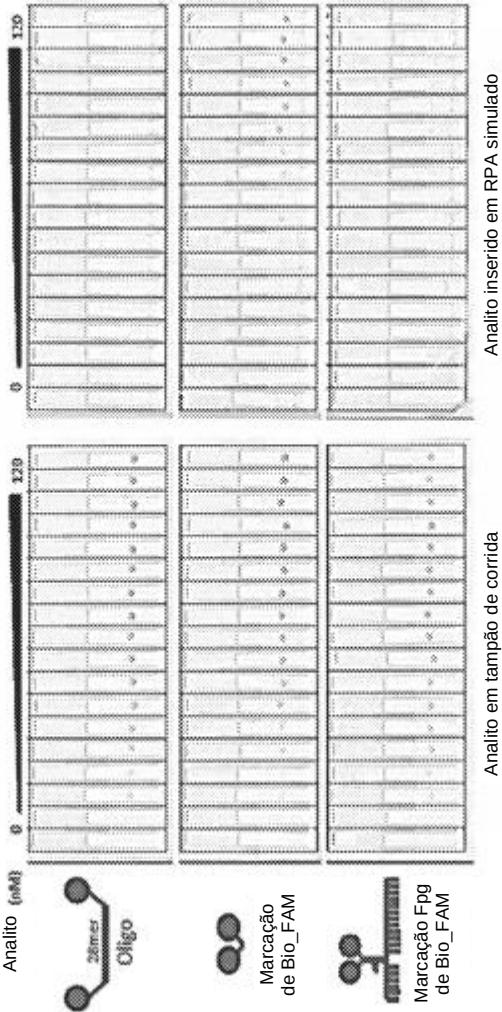


FIG 2. i)

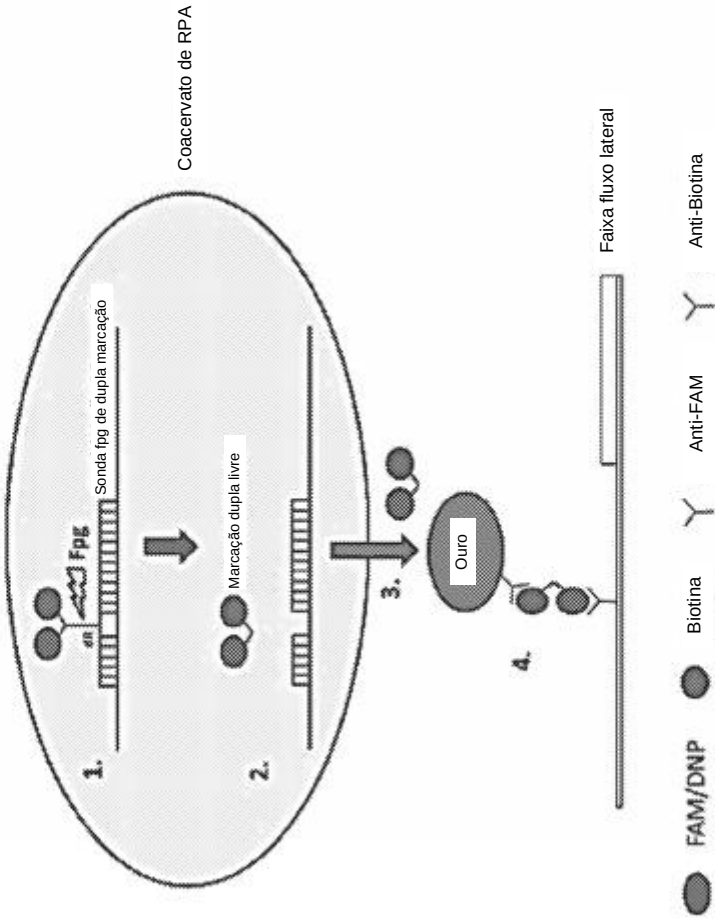


FIG. 2 ii)

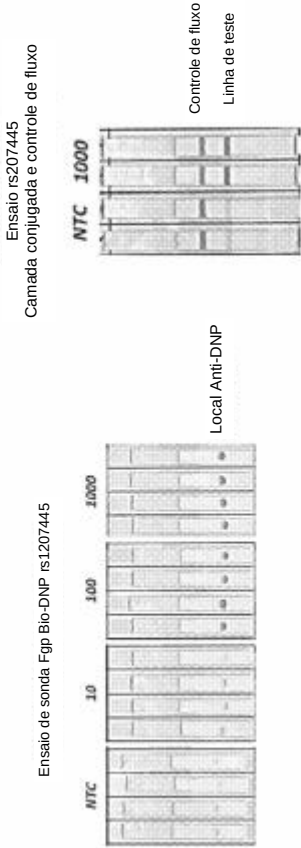
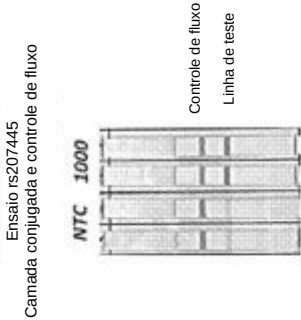


FIG. 2 iii)



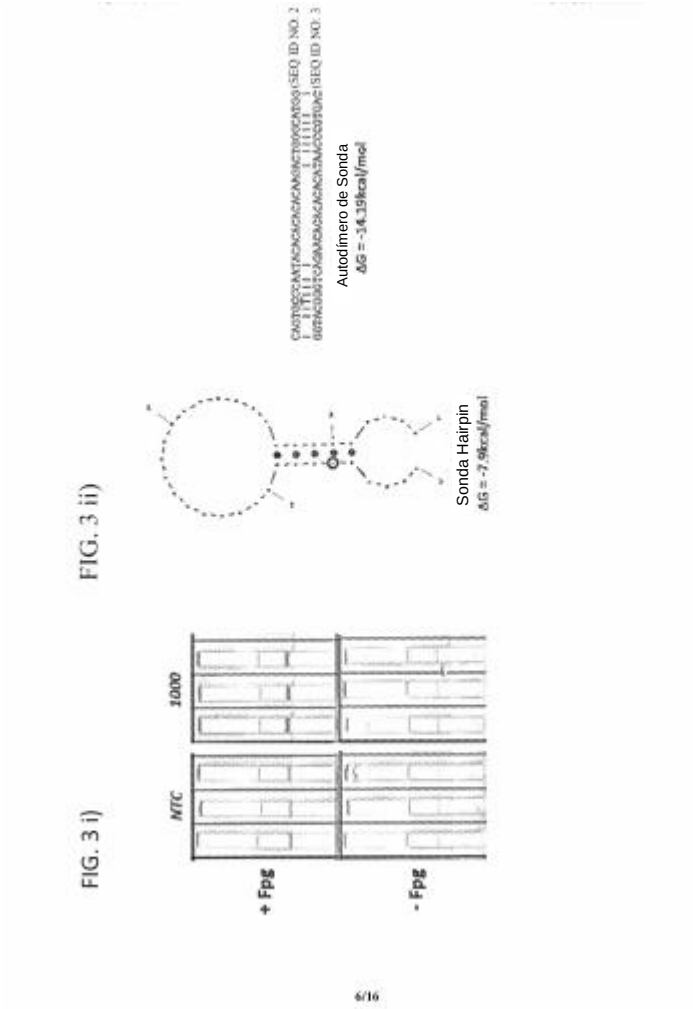
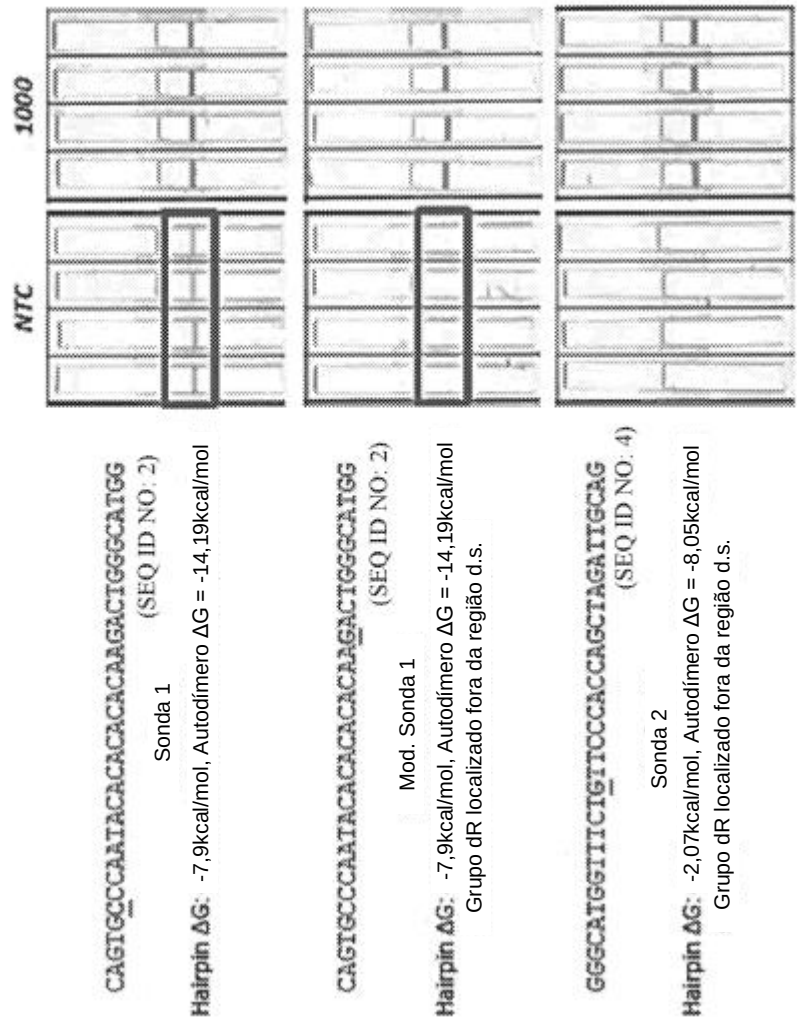


FIG. 3 iii)



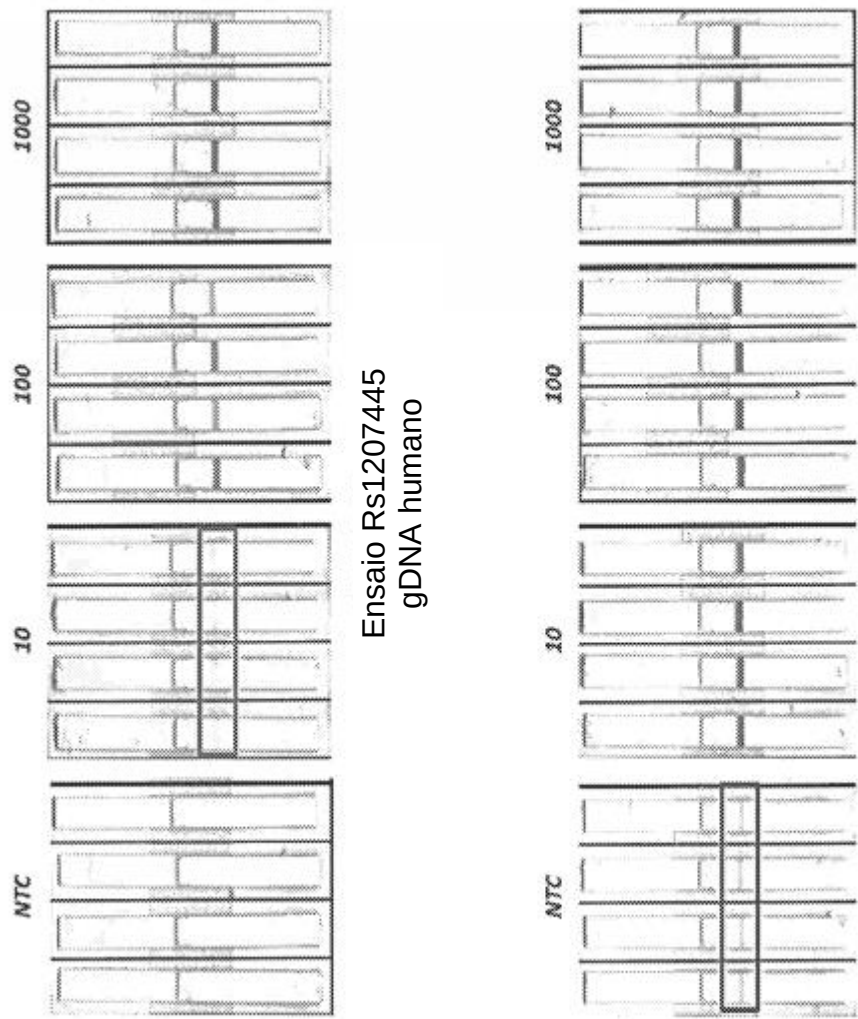


FIG. 4

FIG. 5 i)

FIG. 5 ii)

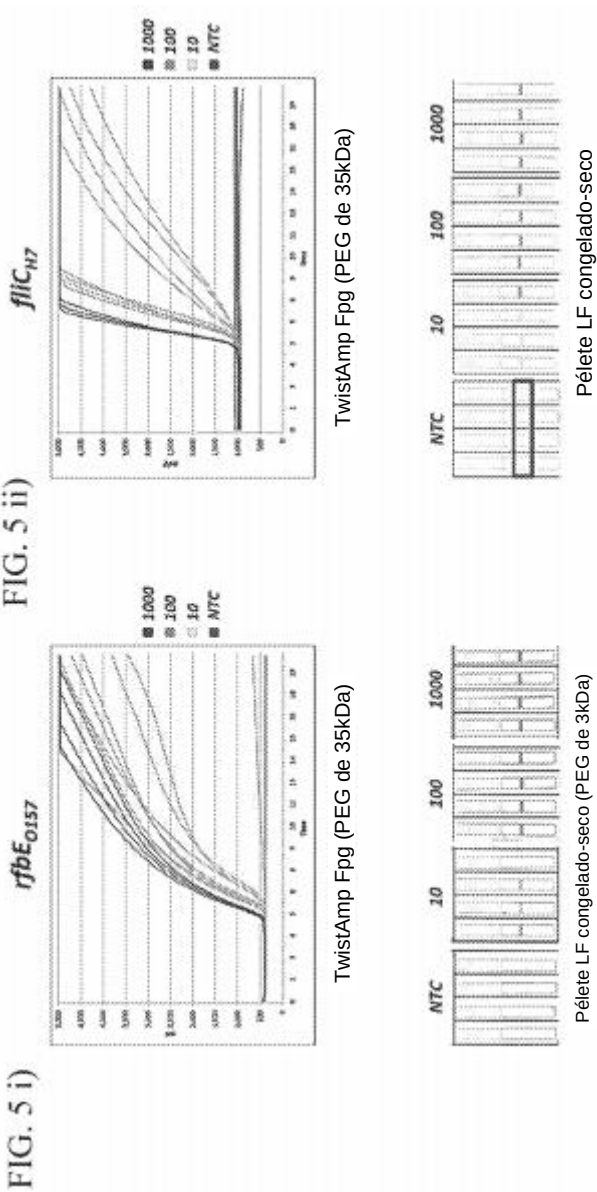


FIG. 6

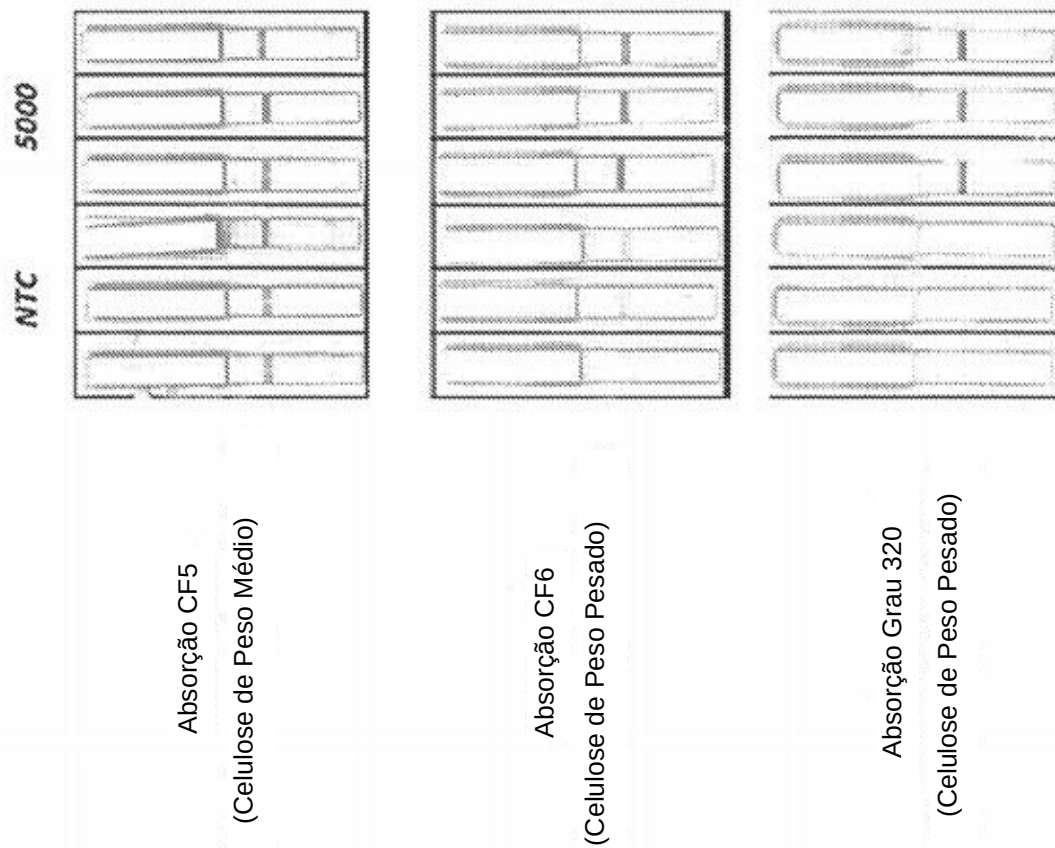


FIG. 7

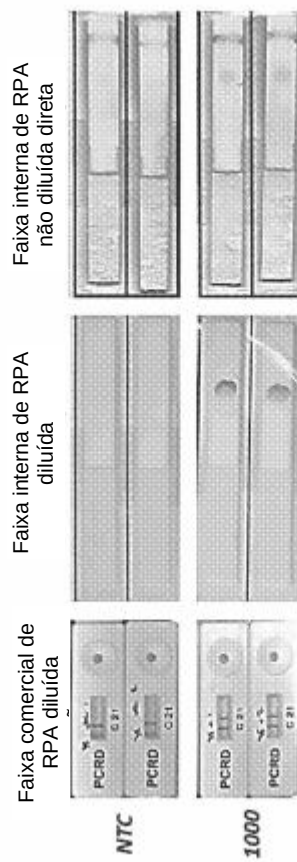
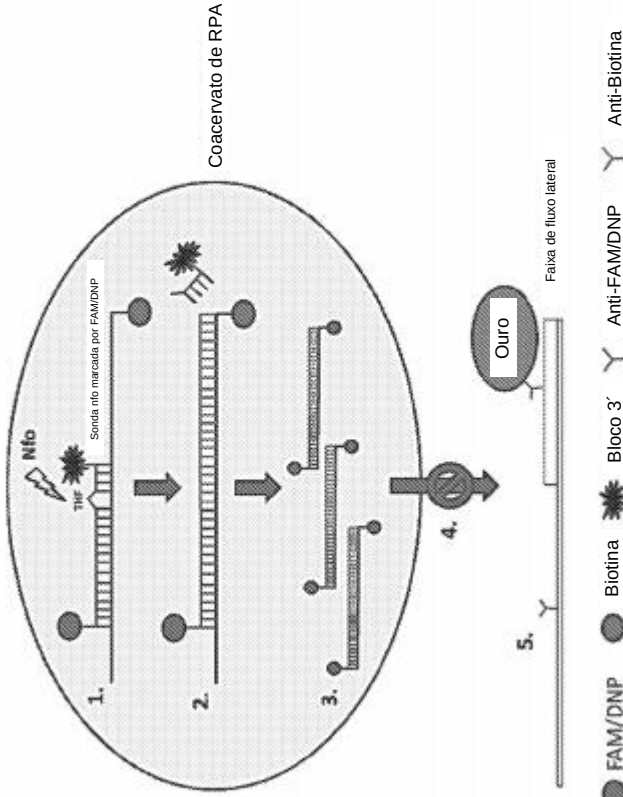


FIG. 8



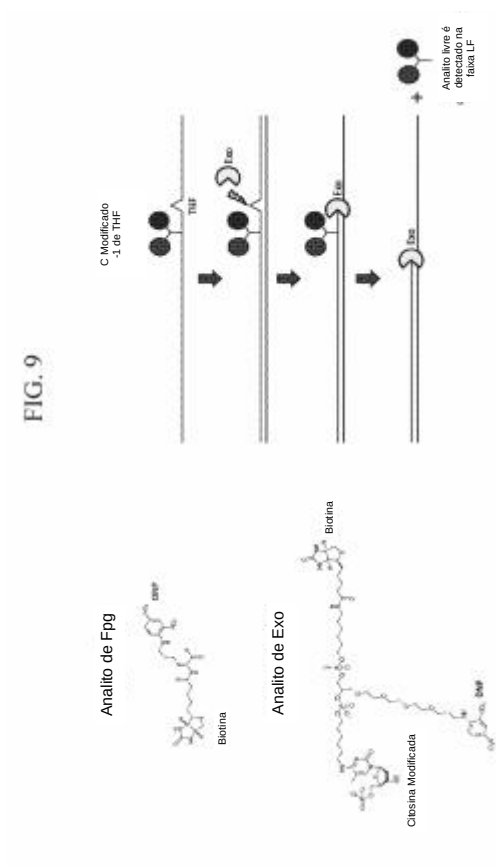


FIG. 10

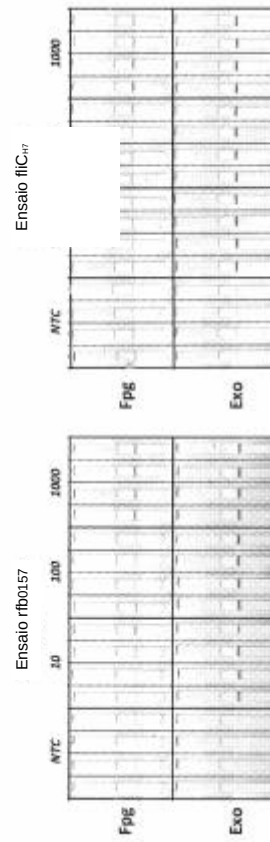


FIG. 11

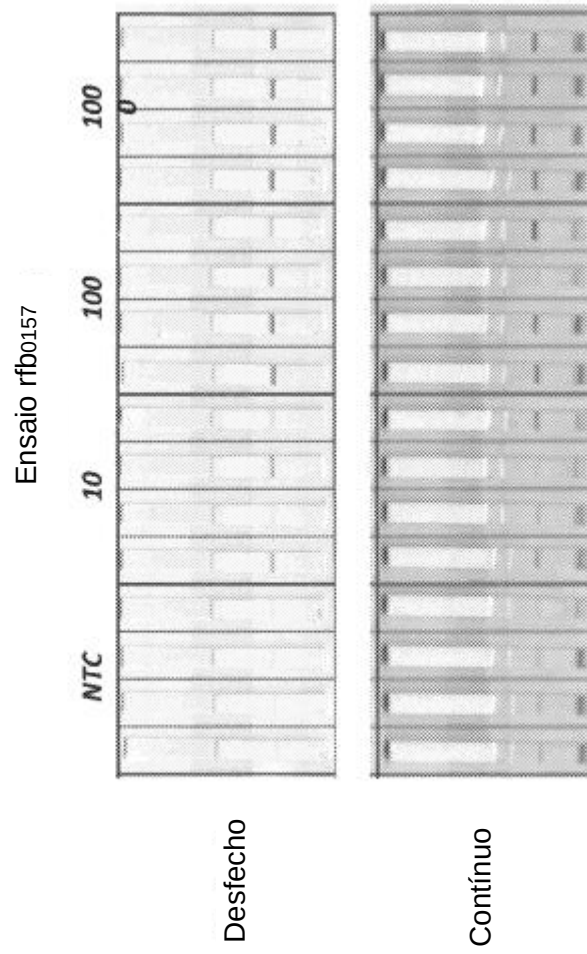
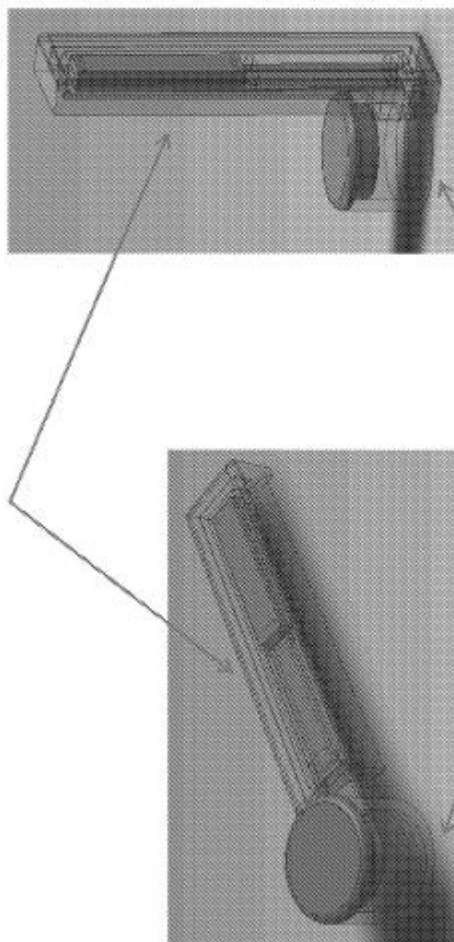


FIG. 12

Câmara de faixa -- tem canal para câmara de reação que permite fluir enquanto a amplificação ocorre



Câmara de reação -- mantém o pélete de RPA seco congelado -- essa seção é aquecida para amplificação

RESUMO**DETECÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO PELA POLIMERASE RECOMBINASE
USANDO SONDA DE DUPLO HAPTENO**

Esta divulgação refere-se a métodos e composições para detectar uma sequência de ácido nucleico alvo usando uma sonda de duplo hapteno. Mais especificamente, a presente divulgação refere-se ao uso da amplificação pela polimerase recombinase (RPA) e uma sonda de duplo hapteno para detectar uma sequência de ácido nucleico alvo. Em alguns casos, a detecção ocorre nas faixas de fluxo laterais.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: PP13170 - Listagem de Sequências_LT.txt
- Data de Geração do Código: 11/05/2020
- Hora de Geração do Código: 15:14:43
- Código de Controle:
 - Campo 1: 44E787C619D9B7B8
 - Campo 2: C3A85D4B1E4E6D6E