

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 159**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6811 (2008.01)

C12Q 1/6853 (2008.01)

C12Q 1/6841 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2020** **PCT/EP2020/052868**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.08.2020** **WO20161187**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2020** **E 20702483 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** **EP 3921440**

54 Título: **Método y productos para producir oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales**

30 Prioridad:

05.02.2019 GB 201901583

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

20.08.2024

73 Titular/es:

MOLIGO TECHNOLOGIES AB (100.0%)
Banvaktsvägen 20
171 48 Solna, SE

72 Inventor/es:

DUCANI, COSIMO y
HOGBERG, BJORN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 977 159 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y productos para producir oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales

La presente invención se refiere a un método para producir oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales. En particular, la invención proporciona un método que utiliza nucleótidos con grupos químicos funcionales en una reacción de amplificación de círculo rodante (RCA) mediada por enzimas para generar una pluralidad (por ejemplo, una biblioteca) de oligonucleótidos con grupos químicos funcionales. También se proporciona un kit para usar en el método.

Los nucleótidos monocatenarios son útiles en una amplia gama de aplicaciones debido a su capacidad para hibridarse, mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick, con secuencias complementarias, por ejemplo, intermolecularmente. Además, los oligonucleótidos monocatenarios pueden hibridarse entre sí (es decir, complementariedad intramolecular) para formar geometrías topológicas complejas y ensamblajes moleculares, incluidas estructuras secundarias conocidas como aptámeros. Estos aptámeros pueden unirse con alta afinidad a objetivos biológicos mediante interacciones no covalentes para efectuar una variedad de funciones diferentes. La utilidad de los oligonucleótidos podría mejorarse mediante la adición de grupos químicos funcionales a los nucleótidos, particularmente en las nucleobases (es decir, la adición de grupos químicos reactivos), que no interfieren con el emparejamiento de bases de Watson-Crick. Sin embargo, la síntesis de dichos oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales puede resultar problemática y esto ha inhibido el crecimiento de las aplicaciones antes mencionadas.

En la actualidad, los oligonucleótidos monocatenarios se producen normalmente mediante síntesis en fase sólida, en la que los nucleótidos se añaden paso a paso a una cadena en crecimiento unida a un soporte sólido. Sin embargo, este método puede estar muy limitado en términos de la longitud y precisión de los oligonucleótidos producidos. La tasa de error en la producción de oligonucleótidos mediante síntesis en fase sólida es significativamente mayor que la tasa de error de las enzimas polimerasas observadas en la naturaleza y aumenta drásticamente con la longitud del oligonucleótido, de modo que purezas de sólo el 70 % son comunes en oligonucleótidos comerciales de aproximadamente 50 residuos de longitud. Además, la disponibilidad de oligonucleótidos monocatenarios que contienen una alta densidad de nucleótidos con grupos químicos funcionales se ha visto restringida debido a limitaciones en términos de longitud, calidad y costes de la síntesis en fase sólida. En particular, el número de nucleótidos con grupos químicos funcionales que pueden incorporarse en oligonucleótidos monocatenarios producidos mediante síntesis en fase sólida es limitado, por ejemplo, debido a reacciones cruzadas causadas por los grupos funcionales.

Muchos de los usos de los oligonucleótidos sintéticos requieren altos niveles de pureza, lo que significa que a menudo se requieren etapas adicionales de purificación mediante métodos como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) para aislar los productos deseados de las reacciones de síntesis en fase sólida. Esto hace que los métodos actuales requieran mucha mano de obra y sean costosos. Además, incluso después de estas etapas de purificación adicionales, todavía se pueden observar problemas prácticos atribuibles a las impurezas restantes.

En vista de estos problemas con los métodos en fase sólida, existe el deseo de métodos alternativos para producir oligonucleótidos con grupos químicos funcionales, particularmente métodos rentables capaces de producir oligonucleótidos más largos con mayor precisión.

Los nucleótidos modificados (por ejemplo, con grupos químicos funcionales) se han utilizado anteriormente en reacciones enzimáticas para producir oligonucleótidos en el contexto de la producción de ADN con grupos químicos funcionales mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) o reacciones de extensión de cebadores (PE). Estas reacciones requieren el uso de cebadores específicos, que luego deben eliminarse, y requieren no sólo que la polimerasa incorpore los nucleótidos modificados, sino también, en el caso de la PCR, que los productos con grupos químicos funcionales sean reconocidos como plantillas. Esto puede resultar problemático en el caso de algunas modificaciones y, por tanto, limita la utilidad de estos métodos. Además, los cebadores se sintetizan mediante métodos en fase sólida y no se verifica la secuencia, lo que provoca la amplificación de errores en el ADN recién sintetizado. Además, los métodos basados en PCR dan como resultado abrumadoramente productos de ADN bicatenario y, por lo tanto, se necesitan etapas adicionales de elución y purificación para obtener oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales.

El documento WO 99/09216 describe métodos para la producción de oligonucleótidos marcados en forma detectable y multímeros que son útiles como sondas de diagnóstico en aplicaciones médicas, biológicas y químicas.

El documento WO 2015/179557 describe métodos para detectar la repeticiones teloméricas circulares que son indicativas de un alargamiento alternativo del mecanismo de los telómeros exhibido por algunas células cancerosas. Las repeticiones teloméricas circulares cortas actúan como una plantilla para una reacción de Amplificación de Círculo Rodante.

El documento WO 2006/108423 describe métodos para producir oligonucleótidos usando replicación de círculo rodante, en los que los oligonucleótidos multiméricos sintetizados se reducen hasta mononucleótidos usando un casete de corte.

Los presentes inventores han descrito previamente un método para la producción enzimática de oligonucleótidos de ADN monocatenario 'estequiométricos monoclonales' (MOSIC) a partir de plantillas de secuencia verificada (Ducani et al., 2013, Nature Methods, 647-652). Sorprendentemente, los inventores han determinado que el método MOSIC se puede adaptar con éxito para producir oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales.

En un ejemplo representativo, el método implica el diseño y preparación de una secuencia lineal que comprende una o más secuencias de oligonucleótidos, cada una delimitada por secuencias en horquilla que contienen un sitio de enzima de restricción. Luego, la secuencia lineal se circulariza en una plantilla de amplificación de círculo rodante (RCA) bicatenaria, que se corta y se amplifica mediante RCA en presencia de uno o más nucleótidos con grupos químicos funcionales para producir un concatémero lineal parcialmente monocatenario que comprende nucleótidos con grupos químicos funcionales. A continuación, el producto de RCA se trata con una enzima de restricción que reconoce el sitio de restricción en las regiones en horquilla antes mencionadas y escinde el concatémero para liberar una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales, que luego se aíslan o purifican, es decir, para producir una biblioteca de oligonucleótidos con grupos químicos funcionales.

Como se muestra en los Ejemplos, los inventores han determinado ventajosamente que, contrariamente a lo esperado, los nucleótidos con grupos químicos funcionales fueron incorporados eficientemente por ADN polimerasas con actividad de desplazamiento de cadena, y no impidieron la formación de estructuras en horquilla ni interfirieron con su estabilidad o escisión efectiva. Además, los inventores descubrieron que se pueden utilizar nucleótidos con grupos químicos funcionales en el método MOSIC manteniendo al mismo tiempo las características beneficiosas asociadas con el método. Por ejemplo, a diferencia de los métodos basados en PCR antes mencionados, el presente método no requiere cebadores y puede producir oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales directamente. Esto evita la necesidad de etapas adicionales para permitir la hibridación de cebadores o convertir productos bicatenarios en oligonucleótidos monocatenarios. Además, el presente método no requiere que los nucleótidos con grupos químicos funcionales sean reconocidos como plantilla para una amplificación adicional, lo que significa que se pueden incorporar un mayor número de residuos con grupos químicos funcionales.

Por consiguiente, se puede considerar que la invención proporciona el uso de una molécula de ADN circular que comprende una secuencia de oligonucleótidos delimitada por dominios de escisión en la producción de un oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales aislado o purificado, en el que los dominios de escisión contienen una secuencia que es reconocida por una enzima de escisión, y en el que un dominio de escisión comprende una secuencia capaz de formar una estructura en horquilla, en la que la porción bicatenaria de la estructura en horquilla comprende la secuencia que es reconocida por una enzima de escisión.

Será evidente que cuando los nucleótidos con grupos químicos funcionales se usan en combinación con el nucleótido convencional equivalente, los nucleótidos con grupos químicos funcionales pueden incorporarse aleatoriamente en el concatémero producido por la reacción de RCA y, por lo tanto, la escisión del concatémero da como resultado una pluralidad (por ejemplo, biblioteca) de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales, es decir, donde los nucleótidos con grupos químicos funcionales se incorporan en diferentes posiciones en los oligonucleótidos. Será aún más evidente que la diversidad de los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales producidos puede aumentarse utilizando una molécula de ADN circular que contenga una pluralidad de secuencias de oligonucleótidos, cada una de ellas delimitada por dominios de escisión. Las secuencias de oligonucleótidos pueden diferir en su secuencia y/o longitud. Adicional o alternativamente, la diversidad de los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales se puede aumentar usando una combinación de nucleótidos con grupos químicos funcionales en la reacción de RCA. Se puede introducir aún más diversidad en la biblioteca de oligonucleótidos con grupos químicos funcionales modificando los oligonucleótidos después de su síntesis, por ejemplo, conjugando moléculas o componentes con los nucleótidos con grupos químicos funcionales en los oligonucleótidos. Por lo tanto, será evidente que la invención proporciona ventajosamente un nuevo método para la producción enzimática de oligonucleótidos de ADN monocatenario con muchos grupos químicos funcionales que pueden abrir nuevas aplicaciones en nanotecnología de ADN, formación de imágenes de ácidos nucleicos y biomedicina. Por lo tanto, en un aspecto particular, la presente invención proporciona un método para producir oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar una molécula de ADN circular que comprende una secuencia de oligonucleótidos delimitada por dominios de escisión que contienen una secuencia que es reconocida por una enzima de escisión en la que un dominio de escisión comprende una secuencia capaz de formar una estructura en horquilla, en la que la porción bicatenaria de la estructura en horquilla comprende la secuencia que es reconocida por una enzima de escisión;

(b) realizar una reacción de amplificación de círculo rodante (RCA) con la molécula de ADN circular de (a) como plantilla y uno o más nucleótidos con grupos químicos funcionales (dNTP);

(c) escindir enzimáticamente el producto de la reacción de RCA en los dominios de escisión para liberar los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales; y
 (d) aislar o purificar los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales.

5 Como se analiza con más detalle a continuación, la etapa de proporcionar una molécula de ADN circular se puede lograr mediante cualquier medio adecuado y puede depender de la estructura de la molécula de ADN circular. A este respecto, la molécula de ADN circular puede ser una molécula de ADN monocatenaria o una molécula de ADN bicatenaria.

10 En realizaciones en las que la molécula de ADN circular es una molécula bicatenaria, será evidente que la molécula de ADN circular debe procesarse para proporcionar una plantilla de RCA. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el método comprende una etapa adicional de escindir una cadena sencilla de la molécula de ADN circular para proporcionar una plantilla de RCA, antes de que se realice la reacción de RCA.

15 La presente invención puede usarse ventajosamente para producir oligonucleótidos con grupos químicos funcionales que comprendan cualquier secuencia de oligonucleótidos. Por lo tanto, se puede utilizar cualquier secuencia adecuada como secuencia de oligonucleótidos en la molécula de ADN circular. Por secuencia adecuada se entiende que el dominio de secuencia de oligonucleótidos no debe interferir (es decir, inhibir o distorsionar) la producción o escisión del producto de RCA. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la secuencia de oligonucleótidos puede diseñarse para evitar la generación de estructuras secundarias que pueden inhibir la progresión o dar como resultado el desplazamiento de la polimerasa que realiza la reacción de RCA. Sin embargo, en algunas realizaciones, la secuencia de oligonucleótidos puede ser, o puede codificar, un aptámero.

20 Además, la secuencia de oligonucleótidos puede diseñarse de manera que no se hibride específicamente con los dominios de escisión en el producto de RCA. Visto de manera alternativa, los dominios de escisión que delimitan la secuencia de oligonucleótidos pueden diseñarse de manera que no se hibriden específicamente con la(s) secuencia(s) de oligonucleótido(s) en el producto de RCA.

25 En realizaciones donde la molécula de ADN circular comprende una pluralidad de secuencias de oligonucleótidos, cada secuencia puede diseñarse de manera que no se hibride específicamente con las otras secuencias de oligonucleótidos en el producto de RCA. Sin embargo, en algunas realizaciones, puede ser deseable producir oligonucleótidos con grupos químicos funcionales que contengan regiones de complementariedad, por ejemplo, para permitir que dichos oligonucleótidos interactúen, particularmente después de su liberación del producto de RCA. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las secuencias de oligonucleótidos pueden diseñarse para facilitar la interacción (por ejemplo, hibridación) de oligonucleótidos con grupos químicos funcionales producidos mediante el método en la medida en que dichas interacciones no interfieran con la producción o escisión del producto de RCA, es decir, la producción de los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales.

30 Por lo tanto, en algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de oligonucleótidos de la molécula de ADN circular tiene menos del 80 % de identidad de secuencia con las secuencias de ácido nucleico en el dominio de escisión y/u otras secuencias de oligonucleótidos en la molécula de ADN circular. Preferiblemente, la secuencia de oligonucleótidos de la molécula de ADN circular tiene menos del 70 %, 60 %, 50 % o menos del 40 % de identidad de secuencia con las secuencias de ácido nucleico en el dominio de escisión y/u otras secuencias de oligonucleótidos en la molécula de ADN circular. La identidad de secuencia puede determinarse mediante cualquier método apropiado conocido en la técnica, por ejemplo, el uso del algoritmo de alineación BLAST.

35 Por lo tanto, el término "secuencia de oligonucleótidos" no es particularmente limitante y se refiere a la secuencia plantilla utilizada para producir el oligonucleótido u oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales de la invención, o un complemento de los mismos. A este respecto, cuando la molécula de ADN circular es monocatenaria, la secuencia de la molécula de ADN circular es el complemento inverso de la secuencia repetida (en tándem) en el producto de RCA obtenido en la etapa (b). Cuando la molécula de ADN circular es bicatenaria, contiene tanto la secuencia repetida en el producto de RCA obtenido en la etapa (b) como su complemento inverso. Por consiguiente, la etapa de procesar el ADN circular para proporcionar una plantilla de RCA puede comprender una etapa de escindir la cadena de la molécula de ADN circular que contiene la secuencia que se repetirá en el producto de RCA.

40 La presente invención se puede utilizar para producir oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales de cualquier longitud deseada. Como se muestra en los Ejemplos, los métodos se pueden usar para producir oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales que superan con creces la longitud de los oligonucleótidos que se pueden producir con precisión usando métodos de síntesis en fase sólida. Por consiguiente, una secuencia de oligonucleótidos (y por lo tanto un oligonucleótido con grupos químicos funcionales producido mediante el método) puede tener una longitud de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10.000 nucleótidos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el método puede verse como la producción de polinucleótidos con grupos químicos funcionales. A este respecto, el límite entre el tamaño de un "oligonucleótido" y un "polinucleótido" no está bien definido en la técnica. Por ejemplo, una secuencia de más de 400 nucleótidos puede denominarse polinucleótido. Por consiguiente, los términos oligonucleótido y polinucleótido se usan indistintamente en el presente documento para

referirse a secuencias de nucleótidos dentro del intervalo de tamaño especificado anteriormente. Sin embargo, cuando se utiliza el término "polinucleótido", normalmente se referirá a secuencias que contienen más de 400 nucleótidos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se puede considerar que el método y el uso producen una pluralidad de moléculas de ADN monocatenarias con grupos químicos funcionales.

En algunas realizaciones, la secuencia de oligonucleótidos puede tener una longitud de aproximadamente 6 a aproximadamente 750 nucleótidos, incluyendo de aproximadamente 6 a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, tal como de aproximadamente 8 a aproximadamente 400 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 8 a aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 8 a aproximadamente 250 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 12 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 12 a aproximadamente 75 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 14 a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, de aproximadamente 14 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, y así sucesivamente. En algunas realizaciones, la secuencia de oligonucleótidos contiene aproximadamente 10-400, 11-390, 12-380, 13-370, 14-360 o 15-350 nucleótidos.

Como se señaló anteriormente, la invención es particularmente eficaz en la producción de oligonucleótidos más largos, por ejemplo, que comprende aproximadamente 30 o más nucleótidos, tal como aproximadamente 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más nucleótidos. Por ejemplo, los oligonucleótidos producidos por la invención pueden contener aproximadamente 30-1000, 40-900, 50-800, 60-700, 70-600, 80-500, 90-450 o 100-400 nucleótidos. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos) producidos por la invención pueden contener aproximadamente 400-10000, 500-9000, 600-8000, 700-7000, 800-6000, 900-5000 o 1000-4000 nucleótidos, por ejemplo, que comprenden aproximadamente 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 o más nucleótidos.

En algunas realizaciones, la molécula de ADN circular comprende una pluralidad de secuencias de oligonucleótidos, en las que cada secuencia de oligonucleótidos está delimitada por dominios de escisión. Las secuencias de oligonucleótidos pueden ser iguales o diferentes entre sí o una combinación de las mismas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la molécula de ADN circular puede comprender más de una copia de la misma secuencia de oligonucleótidos, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc. copias, como se define a continuación. En algunas realizaciones, la molécula de ADN circular puede comprender una copia de cada una de una pluralidad de secuencias de oligonucleótidos diferentes, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc. secuencias de oligonucleótidos diferentes, como se define a continuación. En algunas realizaciones, la molécula de ADN circular puede comprender una o más copias de una pluralidad de secuencias de oligonucleótidos diferentes. Como se analiza más adelante, la presente invención se puede usar para generar una pluralidad de oligonucleótidos con grupos químicos funcionales en estequiometría controlada en función del número de copias de secuencias de oligonucleótidos en la molécula de ADN circular.

Será evidente que la pluralidad de secuencias de oligonucleótidos en la molécula de ADN circular puede estar presente en cualquier orden. Por ejemplo, varias copias de la misma secuencia de oligonucleótidos pueden estar directamente adyacentes entre sí en la molécula de ADN circular (separadas únicamente por los dominios de escisión que delimitan las secuencias de oligonucleótidos). Alternativamente, se pueden intercalar múltiples copias de la misma secuencia de oligonucleótidos con diferentes secuencias de oligonucleótidos. La molécula de ADN circular puede diseñarse (por ejemplo, el orden de la pluralidad de secuencias de oligonucleótidos) para evitar o minimizar interacciones entre las secuencias repetidas en el producto de RCA que pueden interferir con la producción o escisión del producto de RCA como se definió anteriormente.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "pluralidad" significa dos o más, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 o 30 o más, tal como 50, 100, 150, 200, 250 o más dependiendo del contexto de la invención. Por ejemplo, la molécula de ADN circular puede contener al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 o 30 o más secuencias de oligonucleótidos, tales como 2-100, 3-90, 4-80, 5-70, 6-60, 7-50, 8-40, 9-30 o 10-20 secuencias de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, el método de la invención puede producir al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 o 30 o más oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales, tales como 50, 100, 150, 200, 250 o más, es decir oligonucleótidos con diferentes secuencias y/o estructuras. A este respecto, se pueden producir diferentes oligonucleótidos con grupos químicos funcionales a partir de la misma secuencia de oligonucleótidos plantilla porque los nucleótidos con grupos químicos funcionales pueden incorporarse aleatoriamente en el producto de RCA, es decir, cuando los nucleótidos con grupos químicos funcionales están presentes en una cantidad relativa inferior al 100 % como se describió anteriormente. Además, si la molécula de ADN circular contiene una pluralidad de secuencias de oligonucleótidos diferentes, cada plantilla dará como resultado una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales diferentes. Además, como una reacción de RCA puede utilizar una pluralidad de moléculas de ADN circulares, la reacción dará como resultado una pluralidad de cada oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales, por ejemplo, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} o más copias de cada oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales.

El término "diferente" se refiere a secuencias de oligonucleótidos u oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales que comprenden uno o más nucleótidos diferentes. Por lo tanto, diferentes secuencias de oligonucleótidos pueden diferir en uno o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, nucleótidos, por ejemplo,

20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o más nucleótidos. Las diferencias pueden estar en la longitud y/o secuencia de la secuencia de oligonucleótidos. Visto de manera alternativa, las diferentes secuencias de oligonucleótidos tienen menos del 100 % de identidad de secuencia entre sí, tal como menos del 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 % entre sí. Diferentes oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales pueden comprender las mismas secuencias de nucleótidos, pero difieren en la posición de los nucleótidos con grupos químicos funcionales dentro del oligonucleótido o el tipo de nucleótido con grupos químicos funcionales en una posición particular (por ejemplo, cuando se usa una combinación de nucleótidos con grupos químicos funcionales en la reacción de RCA). Alternativa o adicionalmente, diferentes oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales pueden diferir en la secuencia de oligonucleótidos como se definió anteriormente.

Por lo tanto, la presente invención puede usarse para producir simultáneamente varios oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales diferentes. En particular, alterando la secuencia de la molécula de ADN circular, específicamente, controlando el número de copias de cada secuencia de oligonucleótidos diferente que están presentes, es posible controlar la estequiometría de los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales que finalmente se producen mediante el presente método. Sin embargo, como los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales derivados de cada secuencia de oligonucleótidos pueden diferir (debido a la incorporación aleatoria de nucleótidos con grupos químicos funcionales en el producto de RCA), la estequiometría de los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales puede controlarse con respecto al número de oligonucleótidos basados en una secuencia de oligonucleótidos particular. La molécula de ADN circular puede por lo tanto comprender una pluralidad de copias de una pluralidad de diferentes secuencias de oligonucleótidos.

El término "dominio de escisión" como se utiliza en el presente documento normalmente se refiere a un dominio dentro de la molécula de ADN circular que da como resultado un dominio dentro del producto de RCA que puede escindirse enzimáticamente específicamente para liberar los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales.

"Escisión" incluye cualquier medio de romper un enlace covalente. Por lo tanto, en el contexto de la invención, la escisión implica la escisión de un enlace covalente en una cadena de nucleótidos (es decir, escisión de una cadena o rompimiento de una cadena), por ejemplo, mediante escisión de un enlace fosfodiéster.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, un dominio de escisión comprende una secuencia que es reconocida por una o más enzimas capaces de escindir una molécula de ácido nucleico, es decir, capaz de romper el enlace fosfodiéster entre dos o más nucleótidos.

Por consiguiente, la etapa (c) comprende poner en contacto el producto de la reacción de RCA con una enzima de escisión.

Por ejemplo, un dominio de escisión puede comprender una secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción (enzima de restricción). Las enzimas de restricción cortan ADN bicatenario o monocatenario en secuencias de nucleótidos de reconocimiento específicas conocidas como sitios de restricción y las enzimas adecuadas son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, puede ser particularmente ventajoso usar enzimas de restricción de corte raro, es decir, enzimas con un sitio de reconocimiento largo (al menos 8 pares de bases de longitud), para facilitar el diseño de la(s) secuencia(s) del oligonucleótido en la molécula de ADN circular, por ejemplo, para evitar la inclusión de un sitio de reconocimiento de escisión dentro de la(s) secuencia(s) de oligonucleótidos.

En algunas realizaciones, un dominio de escisión puede comprender una secuencia que es reconocida por una endonucleasa de restricción de tipo II, más preferiblemente una endonucleasa de restricción de tipos II. Si bien en la invención se puede usar cualquier dominio de escisión y enzima de escisión adecuados, en algunas realizaciones la enzima de escisión que reconoce un dominio de escisión que delimita las secuencias de oligonucleótidos puede ser BseGI, BtsCI o un isoesquízómero de los mismos, por ejemplo, BstF5I o FokI. Otras enzimas representativas que pueden usarse incluyen BsrDI, BtsI, BtsIMutI, MlyI o isoesquízómeros de las mismas.

Por lo tanto, la etapa de escindir el producto de la reacción de RCA comprende poner en contacto el producto de RCA con una enzima de escisión en condiciones adecuadas para escindir selectivamente el producto de RCA en los dominios de escisión.

Un dominio de escisión comprende o consiste en una secuencia capaz de formar una estructura en horquilla. Una estructura en horquilla también se conoce como un bucle de horquilla o un bucle de tallo y estos términos se usan indistintamente en el presente documento. Una horquilla es un patrón intramolecular de emparejamiento de bases que puede presentarse en una molécula de ADN o ARN monocatenaria. Una horquilla se presenta cuando dos regiones de la misma cadena, usualmente complementarias en la secuencia de nucleótidos cuando se lee en direcciones opuestas, empareja las bases (hibrida) para formar un tallo bicatenario (un dúplex) y un bucle no emparejado, es decir monocatenario. La estructura resultante se puede describir como con forma de piruleta.

Por lo tanto, ya que el dominio de escisión comprende o consiste en una secuencia capaz de formar una estructura en horquilla, el dominio de escisión comprende secuencias que son autocomplementarias. A medida que se extiende

el producto de RCA, la hibridación de estas regiones autocomplementarias da como resultado estructuras en horquilla, en las que la porción bicatenaria de la estructura en horquilla comprende una secuencia que es reconocida por una enzima de escisión. Por lo tanto, la escisión de la porción bicatenaria de las estructuras en horquilla en el producto de RCA da como resultado la liberación de los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales y las estructuras en horquilla (es decir, oligonucleótidos que forman las estructuras en horquilla).

El término "hibridación" o "hibrida", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la formación de un dúplex entre secuencias de nucleótidos que son suficientemente complementarias para formar dúplex mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick. Dos secuencias de nucleótidos son "complementarias" entre sí cuando esas moléculas comparten homología de organización de pares de bases.

Las secuencias de nucleótidos "complementarias" se combinarán con especificidad para formar un dúplex estable en condiciones de hibridación apropiadas. Por ejemplo, dos secuencias son complementarias cuando una sección de una primera secuencia puede unirse a una sección de una segunda secuencia en un sentido antiparalelo en el que el extremo 3' de cada secuencia se une al extremo 5' de la otra secuencia y cada A, T(U), G y C de una secuencia se alinea luego con una T(U), A, C y G, respectivamente, de la otra secuencia. Las secuencias de ARN también pueden incluir pares de bases complementarias G=U o U=G. Por lo tanto, no es necesario que dos secuencias tengan una homología perfecta para ser "complementarias" según la invención. Generalmente dos secuencias son suficientemente complementarias cuando al menos aproximadamente el 90 % (preferiblemente al menos aproximadamente el 95 %) de los nucleótidos comparten una organización de pares de bases a lo largo de una longitud definida de la molécula.

Tras la escisión del producto de RCA, se liberan los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales. Los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales que se liberan pueden consistir únicamente en la secuencia de oligonucleótidos (es decir, sin nucleótidos adicionales), o pueden comprender uno o más nucleótidos adicionales de los dominios de escisión que delimitan las secuencias de oligonucleótidos en uno o ambos extremos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más nucleótidos de los dominios de escisión en uno o ambos extremos. Preferiblemente, la secuencia de la molécula de ADN circular está diseñada de tal manera que cuando se escinde el producto de RCA, los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales que se liberan no contienen ningún nucleótido adicional de los dominios de escisión. Visto de manera alternativa, los dominios de escisión que delimitan la(s) secuencia(s) de oligonucleótidos pueden disponerse en la molécula de ADN circular de modo que su escisión en el producto de RCA dé como resultado la liberación de oligonucleótidos con grupos químicos funcionales que no contienen ningún nucleótido adicional de los dominios de escisión.

Como las enzimas de escisión pueden escindir una molécula de ácido nucleico en una posición fuera de la secuencia de reconocimiento de la enzima de escisión, puede haber uno o más nucleótidos entre un dominio de escisión y una secuencia de oligonucleótidos. Visto de manera alternativa, el dominio de escisión puede contener secuencias de nucleótidos además de la secuencia de reconocimiento de la enzima de escisión para garantizar que la escisión dé como resultado la liberación de los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales completos, preferiblemente sin ningún nucleótido adicional (por ejemplo, nucleótidos que formen parte de los dominios de escisión).

Por lo tanto, el término "delimitado" se refiere a dominios de escisión que son directa o indirectamente adyacentes a la secuencia de oligonucleótidos. Visto de forma alternativa, los dominios de escisión están situados en cualquier extremo de la secuencia de oligonucleótidos, es decir, los dominios de escisión están secuencia arriba y secuencia abajo (en los extremos 5' y 3') de la secuencia de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, el sitio de escisión de los dominios de escisión (por ejemplo, el sitio en el que una enzima de escisión escinde un dominio de escisión) está directamente adyacente al extremo de la secuencia de oligonucleótidos con el que limita. En algunas realizaciones, la secuencia de oligonucleótidos y la secuencia del dominio de escisión pueden superponerse, es decir, el extremo de la secuencia de oligonucleótidos puede formar parte del dominio de escisión, por ejemplo, cuando el sitio de escisión es un sitio interno dentro del dominio de escisión, es decir, los dominios de escisión pueden formar los extremos o parte de los extremos de la secuencia de oligonucleótidos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, puede haber uno o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más nucleótidos entre el dominio de escisión y la secuencia de oligonucleótidos (es decir, entre los extremos de las secuencias). En algunas realizaciones, el dominio de escisión y la secuencia de oligonucleótidos pueden superponer uno o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más nucleótidos.

El tamaño de los dominios de escisión en la molécula de ADN circular no está particularmente limitado y dependerá del tipo de dominio de escisión, como se describió anteriormente. El dominio de escisión puede diseñarse o seleccionarse de manera que la longitud del dominio de escisión sea diferente de la longitud de las secuencias de oligonucleótidos, para permitir que las secuencias de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales se purifiquen fácilmente una vez que el producto de RCA se haya escindido en el dominio de escisión. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el (los) dominio(s) de escisión pueden seleccionarse para que sean más cortos que la secuencia de oligonucleótidos en la molécula de ADN circular. Si la molécula de ADN circular contiene una pluralidad de secuencias de oligonucleótidos de diferentes longitudes, el (los) dominio(s) de escisión pueden seleccionarse para

que sean más cortos que la secuencia más corta en la molécula de ADN circular. En otras realizaciones, el (los) dominio(s) de escisión pueden seleccionarse para que sean más largos que la secuencia de oligonucleótidos en la molécula de ADN circular. Si la molécula de ADN circular contiene una pluralidad de secuencias de oligonucleótidos de diferentes longitudes, el (los) dominio(s) de escisión pueden seleccionarse para que sean más largos que la secuencia de oligonucleótidos más larga en la molécula de ADN circular. En algunas realizaciones, la longitud del (los) dominio(s) de escisión y las secuencias de oligonucleótidos difieren en al menos 2 nucleótidos, tal como al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos.

Si las secuencias de oligonucleótidos deseadas y los dominios de escisión tienen aproximadamente la misma longitud, los dominios de escisión pueden extenderse de modo que puedan separarse de los oligonucleótidos monocatenarios finales con grupos químicos funcionales por tamaño. Por ejemplo, se pueden agregar regiones adicionales de autocomplementariedad a los extremos de los dominios de escisión para extender la longitud de la región del tallo de la estructura en horquilla. Alternativa o adicionalmente, se pueden añadir nucleótidos a la región en bucle de la estructura en horquilla.

En algunas realizaciones, los dominios de escisión pueden tener una longitud de aproximadamente 4-50 nucleótidos, tal como aproximadamente 5-45, 6-40, 7-35 u 8-30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, pueden variar de aproximadamente 10 a 25 nucleótidos de longitud, incluyendo de aproximadamente 12 a 22 o de aproximadamente 14 a 20. Sin embargo, será evidente que se puede usar cualquier longitud adecuada de dominio de escisión en la invención siempre que cumpla con los requisitos funcionales descritos anteriormente.

Los dominios de escisión que delimitan las secuencias de oligonucleótidos pueden ser iguales o diferentes entre sí. Ventajosamente, los dominios de escisión que delimitan la(s) secuencia(s) de oligonucleótidos son los mismos, de modo que una única etapa de escisión es suficiente para liberar todos los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la etapa de escindir el producto de RCA comprende poner en contacto el producto de RCA con una única enzima de escisión en condiciones adecuadas para escindir los dominios de escisión en el producto de RCA.

Las condiciones adecuadas para escindir los dominios de escisión en el producto de RCA dependerán de los medios utilizados para lograr la escisión. Por ejemplo, cuando la escisión se logra usando una endonucleasa de restricción, las condiciones diferirán dependiendo de la enzima seleccionada y las condiciones adecuadas son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, la etapa de escisión puede seguir las instrucciones del fabricante. Un ejemplo de un intervalo de condiciones adecuadas que puede usarse en la etapa de escisión se expone a continuación.

Una enzima de escisión, por ejemplo, una endonucleasa de restricción, puede unirse específicamente a su sitio de reconocimiento de escisión y escindir selectivamente (por ejemplo, específicamente) el ácido nucleico en una variedad de tampones, tales como solución salina tamponada con fosfato (PBS), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico (HEPES), solución salina tamponada con HEPES (HBS) y solución salina tamponada con Tris (TBS), ambas con y sin EDTA. La escisión puede ocurrir en un intervalo de pH de aproximadamente 3.0-10.0, por ejemplo, 4.0-9.0, 5.0-8.0, en un amplio intervalo de temperaturas, por ejemplo, 0-70°C. El experto en la materia podrá determinar fácilmente otras condiciones adecuadas.

El método de la invención comprende una etapa de realizar una amplificación por círculo rodante utilizando la molécula de ADN circular como plantilla. La amplificación por círculo rodante (RCA) es bien conocida en la técnica y se describe en Dean et al., 2001 (Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification, Genome Research, 11, págs. 1095-1099). En resumen, RCA se relaciona con la síntesis de moléculas de ácido nucleico utilizando una molécula de ácido nucleico monocatenaria circular, por ejemplo, un oligonucleótido de círculo o circular, como plantilla de círculo rodante (una plantilla de RCA) y una polimerasa de desplazamiento de cadena para extender un cebador que se hibrida con la plantilla. La adición de una polimerasa y nucleótidos inicia la reacción de síntesis, es decir, la polimerización. Como la plantilla del círculo rodante es infinita, el producto resultante es una molécula larga de ácido nucleico monocatenario compuesta de repeticiones en tándem que son complementarias a la plantilla de círculo rodante.

Una mezcla de reacción de RCA típica incluye una molécula de ADN circular y uno o más cebadores que se emplean en la reacción de extensión del cebador, por ejemplo, una RCA puede estar formada por un único cebador para generar un único producto concatémico o múltiples cebadores, cada uno de los cuales se hibrida con una región diferente del oligonucleótido circular para producir múltiples productos concatémicos por círculo. Los cebadores oligonucleotídicos con los que se puede poner en contacto el ácido nucleico circular tendrán una longitud suficiente para permitir la hibridación con la molécula de ADN circular en condiciones de hibridación. En algunas realizaciones, el cebador puede proporcionarse escindiendo (por ejemplo, cortando) una cadena sencilla de una molécula de ADN circular bicatenaria proporcionada en la etapa (a).

Además de los componentes anteriores, la mezcla de reacción utilizada en la invención normalmente incluye una polimerasa (definida más adelante, por ejemplo, ADN polimerasa phi29), uno o más nucleótidos con grupos químicos funcionales, uno o más nucleótidos convencionales y otros componentes necesarios para una reacción de ADN

polimerasa como se describe a continuación. La actividad polimerasa deseada puede ser proporcionada por una o más enzimas polimerasas distintas.

La mezcla de reacción de RCA puede incluir además un medio tampón acuoso que incluye una fuente de iones monovalentes, una fuente de cationes divalentes y un agente de tamponamiento. Puede emplearse cualquier fuente conveniente de iones monovalentes, tales como KCl, acetato de K, acetato de NH_4 , glutamato de K, NH_4Cl , sulfato de amonio y similares. El catión divalente puede ser magnesio, manganeso, zinc y similares, donde el catión normalmente será magnesio. Puede emplearse cualquier fuente conveniente de catión magnesio, incluyendo MgCl_2 , acetato de Mg y similares. La cantidad de Mg^{2+} presente en el tampón puede oscilar entre 0.5 y 10 mM, pero preferiblemente oscilará entre aproximadamente 3 y 6 mM, e idealmente será aproximadamente 5 mM. Los agentes tamponantes o sales representativas que pueden estar presentes en el tampón incluyen Tris, Tricina, HEPES, MOPS y similares, donde la cantidad de agente tamponante oscilará típicamente entre aproximadamente 5 y 150 mM, normalmente entre aproximadamente 10 y 100 mM, y más normalmente de aproximadamente 20 a 50 mM, donde en ciertas realizaciones preferidas el agente tamponante estará presente en una cantidad suficiente para proporcionar un pH que varía de aproximadamente 6.0 a 9.5. Otros agentes que pueden estar presentes en el medio tamponante incluyen agentes quelantes, tales como EDTA, EGTA y similares.

En realizaciones en las que una cadena sencilla de la molécula de ADN circular bicatenaria se escinde (por ejemplo, se corta) para proporcionar la plantilla de RCA (y el cebador para la reacción de RCA), puede ser útil incluir una proteína de unión monocatenaria en la mezcla de reacción de RCA. Por ejemplo, se ha utilizado la proteína de unión al ADN monocatenario de *E. coli* para aumentar el rendimiento y la especificidad de las reacciones de extensión del cebador y de las reacciones de PCR (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,449,603 y 5,534,407). La proteína del gen 32 (proteína de unión a ADN monocatenario) del fago T4 aparentemente mejora la capacidad de amplificar fragmentos de ADN más grandes (Schwartz, et al., Nucl. Acids Res. 18: 1079 (1990)), mejora la fidelidad de la ADN polimerasa (Huang, DNA Cell. Biol. 15: 589-594 (1996)) y, lo más importante, evita que la ADN polimerasa cambie de plantilla, por ejemplo, al ADN monocatenario ya producido, y sintetizar ADN bicatenario (Ducani et al. Nucl. Acids Res. 42: 10596 (2014)). Cuando se emplea, dicha proteína se usará para lograr una concentración en la mezcla de reacción que oscila entre aproximadamente 0.01 ng/ μL y aproximadamente 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; tal como desde aproximadamente 0.1 ng/ μL hasta aproximadamente 100 ng/ μL ; incluyendo desde aproximadamente 1 ng/ μL hasta aproximadamente 10 ng/ μL .

La reacción de RCA produce en última instancia un producto polinucleotídico que comprende repeticiones adyacentes (en tándem) de la secuencia complementaria de la molécula de ADN circular. Este producto puede conocerse como un concatémero, un producto de RCA o "RCP". Por lo tanto, el producto de RCA comprende una secuencia lineal formada por secuencias de oligonucleótidos (o más particularmente el complemento inverso de las secuencias de oligonucleótidos de la plantilla de la molécula de ADN circular) que comprende nucleótidos con grupos químicos funcionales, delimitados por dominios de escisión.

Como se señaló anteriormente, cuando la molécula de ADN circular es monocatenaria, la mezcla de reacción de RCA puede comprender uno o más cebadores oligonucleotídicos, que inician la reacción de polimerización de RCA. Los cebadores tendrán una longitud suficiente para permitir la hibridación con la molécula de ADN circular en condiciones de hibridación. Los cebadores generalmente tendrán al menos 10 nucleótidos de longitud, normalmente al menos 15 nucleótidos de longitud y más habitualmente al menos 16 nucleótidos de longitud y pueden tener hasta 30 nucleótidos de longitud o más, donde la longitud de los cebadores generalmente variará de 18 a 50 nucleótidos de longitud, normalmente de aproximadamente 20 a 35 nucleótidos de longitud.

Los cebadores pueden hibridarse con cualquier región dentro de la molécula de ADN circular. En algunas realizaciones, la molécula de ADN circular puede comprender un dominio específico (un sitio de unión del cebador de RCA) con el que el cebador puede hibridarse. En una realización representativa, la molécula de ADN circular puede comprender una secuencia entre los dominios de escisión que delimitan la secuencia de oligonucleótidos, que no es la secuencia de oligonucleótidos y que puede funcionar como el sitio de unión del cebador de RCA. El sitio de unión del cebador de RCA puede diseñarse para que tenga una longitud diferente a la secuencia de oligonucleótidos, similar a los dominios de escisión discutidos anteriormente, para garantizar que pueda separarse fácilmente de los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales tras la escisión del producto de RCA. Será evidente que en una molécula de ADN circular que comprende una pluralidad de secuencias de oligonucleótidos delimitadas por dominios de escisión, el sitio de unión del cebador de RCA puede estar entre dos dominios de escisión cualesquiera.

El término "condiciones de hibridación" se refiere a las condiciones bajo las cuales dos moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de nucleótidos complementarias se hibridarán específicamente entre sí. Varios parámetros afectan la hibridación, incluida la temperatura, la concentración de sal, la concentración de ácido nucleico, la composición y longitud, y la composición del tampón. El experto puede determinar fácilmente las condiciones de hibridación adecuadas para una combinación particular de cebador/plantilla para una reacción de RCA como una cuestión de rutina.

Como se señaló anteriormente, en algunas realizaciones, la molécula de ADN circular es bicatenaria y el método comprende una etapa adicional de escindir una cadena sencilla de la molécula de ADN circular para proporcionar una plantilla de RCA, antes de que se realice la reacción de RCA. Será evidente que la etapa de escindir una cadena sencilla de la molécula de ADN circular puede reemplazar la etapa de proporcionar un cebador para iniciar la reacción de RCA, es decir, la cadena escindida funciona como cebador de RCA. Por lo tanto, visto de forma alternativa, el método comprende una etapa adicional de escisión de una cadena sencilla de la molécula de ADN circular para proporcionar una plantilla y un cebador de RCA, antes de que se realice la reacción de RCA, es decir, la introducción de una rotura de una sola cadena en la molécula de ADN circular crea un extremo 3' que puede actuar como cebador para la reacción de RCA. Sin embargo, en algunas realizaciones, puede ser ventajoso proporcionar uno o más cebadores de RCA en la mezcla de reacción además de escindir una cadena de la molécula de ADN circular bicatenaria, por ejemplo, para aumentar el número de productos de RCA obtenidos por círculo.

En algunas realizaciones, la etapa de escindir una cadena sencilla de la molécula de ADN circular para proporcionar una plantilla de RCA comprende escindir una cadena sencilla de la molécula de ADN circular con una enzima de escisión. Esta escisión de una sola cadena de la molécula de ADN circular da como resultado una rotura de una sola cadena (un corte).

En algunas realizaciones, puede ser ventajoso escindir una cadena sencilla de la molécula de ADN circular varias veces en estrecha proximidad, para facilitar la unión de la ADN polimerasa al extremo 3' generado por la escisión. En consecuencia, una cadena sencilla de la molécula de ADN circular puede escindirse dos o más veces, es decir, pueden generarse dos o más cortes, muy próximos entre sí. Preferiblemente, los cortes se generan con una diferencia de 20 nucleótidos, más preferiblemente con una diferencia de 10 nucleótidos, más preferiblemente con una diferencia de 5 nucleótidos entre sí, por ejemplo, dentro de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos entre sí.

En algunas realizaciones, la enzima de escisión utilizada para escindir una cadena de la molécula de ADN circular bicatenaria es una nickasa. Las nickasas son endonucleasas que escinden solo una cadena de un dúplex de ADN. Algunas nickasas introducen cortes monocatenarios sólo en sitios particulares de una molécula de ADN, al unirse y reconocer una secuencia de reconocimiento de nucleótidos particular. Se han descubierto varias nickasas naturales, de las cuales hasta la fecha se han determinado las propiedades de reconocimiento de secuencias de al menos cuatro. Las nickasas se describen en la Patente de los Estados Unidos No. 6,867,028, y se puede utilizar cualquier nickasa adecuada en los métodos de la invención. En algunas realizaciones, la enzima de escisión (nickasa) puede ser Nb.BsrDI, Nt.BspQI o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones que utilizan una enzima nickasa, la enzima nickasa puede eliminarse del ensayo o inactivarse después de la escisión de la molécula de ADN circular para evitar la escisión no deseada de los productos de RCA.

La enzima de escisión que escinde una sola cadena de la molécula de ADN circular (por ejemplo, nickasa) puede escindir en cualquier sitio dentro de la molécula de ADN circular. En algunas realizaciones, la molécula de ADN circular puede comprender un dominio específico (un sitio o dominio de escisión de cadena única, por ejemplo, un sitio de nickasa) en el que puede actuar la enzima de escisión. En una realización representativa, la molécula de ADN circular puede comprender una secuencia entre los dominios de escisión, que no es la secuencia de oligonucleótidos y que puede funcionar como el sitio o dominio de escisión de una sola cadena. El hecho de que la secuencia reconocida por la enzima de escisión (el sitio o dominio de escisión de una sola cadena) no esté en la secuencia del oligonucleótido garantiza que el oligonucleótido producido a partir del extremo 5' del producto de RCA no se trunca. El sitio o dominio de escisión monocatenario puede diseñarse para que tenga una longitud diferente a la secuencia de oligonucleótidos, similar a los dominios de escisión y al sitio de unión del cebador de RCA discutidos anteriormente, para garantizar que se pueda separar fácilmente de los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales tras la escisión del producto de RCA. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el sitio de unión del cebador de RCA también funciona como sitio o dominio de escisión de cadena sencilla o viceversa.

En la reacción de RCA de la invención se puede utilizar cualquier ADN polimerasa con al menos cierta actividad de desplazamiento de cadena. La actividad de desplazamiento de cadenas garantiza que una vez que la polimerasa se ha extendido aproximadamente la molécula de ADN circular, pueda desplazar la secuencia del cebador y el producto de elongación y continuar "girando" aproximadamente la plantilla. En realizaciones en las que la cadena cortada de la molécula de ADN circular proporciona el cebador para la extensión de RCA, la actividad de desplazamiento de la cadena garantiza que la polimerasa pueda desplazar la cadena cortada. Enzimas ADN polimerasas adecuadas con al menos alguna actividad de desplazamiento de cadenas incluye ADN polimerasa phi29, ADN polimerasa I de *E. coli*, ADN polimerasa Bsu (fragmento grande), ADN polimerasa Bst (fragmento grande) y fragmento Klenow. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ADN polimerasa" incluye no sólo enzimas naturales sino también todos esos derivados modificados, incluidos también derivados de enzimas ADN polimerasa naturales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la ADN polimerasa puede haberse modificado para eliminar la actividad exonucleasa 5'-3'.

Las enzimas ADN polimerasa particularmente preferidas para uso en la invención incluyen ADN polimerasa phi29, ADN polimerasa Bst y derivados, por ejemplo, derivados de secuencia modificada, o mutantes de las mismas.

Los derivados de secuencia modificada o mutantes de enzimas ADN polimerasa incluyen mutantes que conservan al menos parte de la actividad funcional, por ejemplo, actividad de ADN polimerasa y al menos algo de actividad de desplazamiento de cadena, de la secuencia de tipo silvestre. Las mutaciones pueden afectar el perfil de actividad de las enzimas, por ejemplo, mejorar o reducir la velocidad de polimerización, bajo diferentes condiciones de reacción, por ejemplo, temperatura, concentración de plantilla, concentración de cebador, etc. Las mutaciones o modificaciones de secuencia también pueden afectar la actividad exonucleasa y/o la termoestabilidad de la enzima.

Como se señaló anteriormente, la reacción de RCA del presente método normalmente se lleva a cabo usando una mezcla de nucleótidos convencionales y con grupos químicos funcionales.

El término "nucleótidos convencionales" como se utiliza en el presente documento se refiere a desoxinucleótidos que comprenden una de las cuatro bases que se encuentran en el ADN; adenina, guanina, citosina y timina. Por lo tanto, el término "nucleótidos convencionales" abarca, por ejemplo, dATP, dGTP, dCTP y dTTP. Aunque el uracilo no se encuentra normalmente en el ADN de forma natural, se puede utilizar dUTP en lugar de, o además de, dTTP. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, el dUTP puede verse como un nucleótido "convencional". Normalmente, la mezcla de reacción incluirá al menos tres de los cuatro tipos diferentes de dNTP correspondientes a las cuatro bases naturales presentes, es decir, dATP, dTTP, dCTP y dGTP. Sin embargo, como se señaló anteriormente, se puede utilizar dUTP en lugar de, o además de, dTTP. Además, en algunas realizaciones, la mezcla de reacción puede incluir cuatro o cinco dNTP, es decir, dATP, dCTP, dGTP, dTTP y/o dUTP. En los métodos en cuestión, cada dNTP normalmente estará presente en una cantidad que oscila entre aproximadamente 10 y 5000 μM , normalmente entre aproximadamente 20 y 1000 μM . Cada dNTP puede estar presente en diferentes cantidades o se puede usar una cantidad igual de cada dNTP.

Los términos "nucleótidos con grupos químicos funcionales" o "dNTP con grupos químicos funcionales" se refieren a nucleótidos que comprenden una modificación relativa a nucleótidos convencionales no modificados, en donde dicha modificación proporciona dichos nucleótidos y/u oligonucleótidos con grupos químicos funcionales que comprenden al menos un nucleótido con grupos químicos funcionales con propiedades o características adicionales o alternativas, es decir con respecto al nucleótido convencional correspondiente. Por ejemplo, la modificación puede hacer que el nucleótido sea detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un marcador, o capaz de interactuar y/o reaccionar con otro componente, es decir, un componente con el que el nucleótido convencional correspondiente no interactúa ni reacciona. En algunas realizaciones, la modificación puede hacer que el oligonucleótido que contiene el nucleótido sea resistente a la degradación, por ejemplo, degradación química y/o enzimática (por ejemplo, degradación de nucleasas), o puede alterar el metabolismo del nucleótido.

Los términos "oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales", "oligonucleótido con grupos químicos funcionales monocatenario" y "oligonucleótido con grupos químicos funcionales" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a un oligonucleótido monocatenario que contiene al menos un nucleótido con grupos químicos funcionales. Por lo tanto, un oligonucleótido con grupos químicos funcionales tiene propiedades o características adicionales o alternativas con respecto al oligonucleótido correspondiente que contiene sólo nucleótidos convencionales. Por ejemplo, la incorporación de uno o más nucleótidos con grupos químicos funcionales puede hacer que el oligonucleótido sea detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un marcador, o capaz de interactuar y/o reaccionar con otro componente, es decir, un componente con el que el oligonucleótido correspondiente que contiene sólo nucleótidos convencionales no interactúa ni reacciona. En algunas realizaciones, la modificación puede hacer que el oligonucleótido sea resistente a la degradación, por ejemplo, degradación química y/o enzimática (por ejemplo, degradación de nucleasa), o puede alterar el metabolismo del oligonucleótido. En algunas realizaciones, la modificación puede mejorar la estabilidad del oligonucleótido, por ejemplo, mejorar la estabilidad de los dúplex formados por el oligonucleótido, tal como la termoestabilidad de los dúplex (por ejemplo, temperatura de fusión). En algunas realizaciones, la incorporación de uno o más nucleótidos con grupos químicos funcionales puede hacer que el oligonucleótido sea capaz de formar estructuras secundarias o terciarias que no se forman por un oligonucleótido correspondiente que contiene sólo nucleótidos convencionales.

Por consiguiente, se entenderá que, en el contexto de un oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales, el término "monocatenario" se refiere a un oligonucleótido que es monocatenario en condiciones desnaturizantes, por ejemplo, tras la aplicación de calor o agentes químicos desnaturizantes adecuados, es decir, un oligonucleótido con una sola cadena principal continua (una cadena). Como se señaló anteriormente, esto no excluye que un oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales forme estructuras secundarias o terciarias. Por ejemplo, el oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales puede comprender regiones de autocomplementariedad y, por lo tanto, puede ser capaz de formar una estructura en horquilla o de bucle de tallo, mediada por una región del oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales que se hibrida con una región complementaria en otra parte del mismo oligonucleótido.

La incorporación de un grupo químico funcional de un nucleótido convencional se puede lograr mediante la alteración o modificación de la estructura de cualquier parte del nucleótido. Por lo tanto, un nucleótido con grupos químicos funcionales puede contener una modificación, por ejemplo, una modificación química, sobre la nucleobase, azúcar o grupo involucrado en el enlace internucleotídico. En algunas realizaciones preferidas, el nucleótido con grupos químicos funcionales contiene una modificación, por ejemplo, una modificación química, en la nucleobase. Las

modificaciones en diversas posiciones se describen con más detalle a continuación y se contempla que cualquiera de las posiciones específicas descritas a continuación pueda modificarse con cualquiera de los grupos funcionales descritos a continuación.

Por ejemplo, la sustitución de la posición C5 en pirimidinas (es decir, citosina, timina y uracilo) con un grupo que es pequeño, rígido e hidrófobo puede mejorar las interacciones de apilamiento de bases y/o estabilizar los dúplex formados por oligonucleótidos que comprenden nucleótidos con grupos químicos funcionales que contienen las pirimidinas sustituidas. Un grupo pequeño, rígido e hidrófobo puede ser un grupo alquililo, por ejemplo, metilo, etinilo, propinilo o un grupo halógeno, por ejemplo, flúor, cloro o bromo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales comprende una pirimidina con una sustitución en la posición C5, por ejemplo, un grupo alquililo o halógeno como se definió anteriormente.

En algunas realizaciones, una modificación que puede hacer que el nucleótido sea detectable puede implicar la incorporación de un marcador en el nucleótido. Cualquier marcador puede encontrar utilidad en la invención y puede ser una molécula que da señales directa o indirectamente. Por ejemplo, los marcadores que producen señales directamente pueden ser moléculas fluorescentes, es decir, los nucleótidos con grupos químicos funcionales pueden ser nucleótidos marcados con fluorescencia. Los marcadores que producen señales indirectamente pueden ser, por ejemplo, moléculas de biotina, es decir, los nucleótidos marcados pueden ser nucleótidos marcados con biotina, que requieren etapas adicionales para proporcionar una señal, por ejemplo, la adición de estreptavidina conjugada con una enzima que puede actuar sobre un sustrato químico para proporcionar una señal detectable, por ejemplo, un cambio de color visiblemente detectable. En algunas realizaciones, el marcador se incorpora (conjugado con) la nucleobase.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales comprende un grupo biotina conjugado con una nucleobase. En algunas realizaciones, el grupo biotina puede conjugarse indirectamente con la nucleobase, por ejemplo, mediante un enlazador o dominio de enlace y un enlazador adecuado puede seleccionarse fácilmente entre los bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el enlazador puede seleccionarse para facilitar la interacción entre biotina y estreptavidina, es decir, para minimizar o prevenir el impedimento estérico. En algunas realizaciones, el grupo biotina está conjugado con una pirimidina en la posición C5. En una realización representativa, el nucleótido con grupos químicos funcionales que contiene biotina puede ser biotina-16-aminoalil-2'-dUTP, biotina-16-aminoalil-2'-dTTP o biotina-16-aminoalil-2'-dCTP.

En algunas realizaciones, el nucleótido puede estar marcado con un grupo esterol, es decir, el nucleótido puede comprender un grupo esterol. En algunas realizaciones, el nucleótido puede estar marcado con o puede comprender un grupo colesterol.

Un marcador directamente detectable es aquel que se puede detectar directamente sin el uso de reactivos adicionales, mientras que un marcador indirectamente detectable es aquel que se puede detectar empleando uno o más reactivos adicionales, por ejemplo, donde el marcador es un miembro de un sistema productor de señales compuesto por dos o más componentes. En muchas realizaciones, el marcador es un marcador directamente detectable, donde los marcadores de interés directamente detectables incluyen, entre otros: marcadores fluorescentes, marcadores coloreados, marcadores radioisotópicos, marcadores quimioluminiscentes y similares. Puede usarse cualquier marcador detectable espectrofotométrica u ópticamente. En otras realizaciones, el marcador puede proporcionar una señal indirectamente, es decir, puede requerir la adición de componentes adicionales para generar la señal. Por ejemplo, el marcador puede ser capaz de unirse a una molécula que está conjugada con una molécula que produce señal.

En algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales es un nucleótido marcado con fluorescencia. Mientras que los marcadores fluorescentes requieren excitación para proporcionar una señal detectable, como la fuente de excitación se deriva del instrumento/aparato utilizado para detectar la señal, los marcadores fluorescentes pueden verse como etiquetas que producen señales directamente.

Las moléculas fluorescentes que pueden usarse para marcar nucleótidos son bien conocidas en la técnica. Se han identificado fluoróforos con espectros de excitación y emisión que van desde longitudes de onda UV hasta IR cercano. Por lo tanto, el fluoróforo puede tener una longitud de onda de excitación y/o emisión en el intervalo espectral UV, visible o IR.

El fluoróforo puede ser una proteína, un péptido, un pequeño compuesto orgánico, un oligómero sintético o un polímero sintético. En algunas realizaciones, el fluoróforo es un compuesto orgánico pequeño, por ejemplo, un compuesto orgánico con un peso molecular de 5000 Da o menos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el fluoróforo tiene un peso molecular de 4000 Da o menos, tal como 3500 Da, 3000 Da, 2500 Da, 2250 Da, 2000 Da, 1900 Da, 1800 Da, 1700 Da, 1600 Da, 1500 Da o menos.

Por lo tanto, el fluoróforo puede ser un derivado de xanteno (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, verde Oregón, eosina, rojo Texas), un derivado de cianina (por ejemplo, cianina, indocarbocianina, oxacarbocianina, tiacarbocianina, merocianina), un derivado de escuaraina (por ejemplo, escuaraina con anillo sustituido, Seta, SeTau), un derivado de

naftaleno (por ejemplo, derivado de dansil o prodán), un derivado de cumarina, un derivado de oxadiazol (tal como piridiloxazol, nitrobenzoxadiazol y benzoxadiazol), un derivado de antraceno (tal como una antraquinona, incluidos DRAQ5, DRAQ7 y CyTRAK Orange), un derivado de pireno (por ejemplo, azul cascada), un derivado de oxazina (por ejemplo, rojo Nilo, azul Nilo, violeta de cresilo, oxazina 170), un derivado de acridina (tal como proflavina, naranja de acridina, amarillo de acridina), un derivado de arilmetina (por ejemplo, auramina, violeta cristal, verde de malaquita) o un derivado de tetrapirrol (tal como porfirina, ftalocianina, bilirrubina).

Ejemplos específicos de fluoróforos o series de fluoróforos que pueden encontrar utilidad en la presente invención incluyen Alexa Fluor (tal como Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647, etc.), Atto, Cianina (Cy), indocianina, sulfocianina, DyLight, Abberior STAR, Chromeo, Verde Oregón, Fluoresceína, Rojo Texas, Rodamina, Silicio-rodamina (SiR), Esquaraina, FluoProbes, Tetrapirrol, Bodipy, HiLyte, Quasar, CAL Fluor, Cumarina, Seta, CF, Tracy, IRDye, CruzFluor, Tide Fluor, Oyster, iFluor, Chromis y Violeta Brillante y sus derivados fluorescentes o análogos.

En algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales contiene un marcador fluorescente de cianina, tal como Cy3. En algunas realizaciones particulares, el nucleótido con grupos químicos funcionales es dATP marcado con Cy3, por ejemplo, 7-Propargilamino-7-deaza-ATP-Cy3.

En algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales contiene un marcador atto fluorescente, tal como atto-488. En algunas realizaciones particulares, el nucleótido con grupos químicos funcionales es dATP marcado con atto-488, por ejemplo, 7-Propargilamino-7-deaza-ATP-Atto-488.

En algunas realizaciones, una modificación que puede hacer que el nucleótido sea reactivo implica la incorporación de un grupo reactivo, por ejemplo, un grupo capaz de formar un enlace covalente con otro grupo químico, por ejemplo, un grupo químico en una molécula o componente que se va a conjugar con el oligonucleótido con grupos químicos funcionales, tal como un marcador como se define en el presente documento. Los grupos reactivos potenciales incluyen grupos funcionales nucleofílicos (alquinos, alquenos, aminas, alcoholes, tioles, hidrazidas, azidas), grupos funcionales electrófilos (aldehídos, ésteres, vinilcetonas, epóxidos, isocianatos, maleimidas), grupos funcionales capaces de reacciones de cicloadición, que forman enlaces disulfuro o unión a metales. Los ejemplos específicos incluyen etino (acetileno), propino, 1-butino, 2-butenazida, vinil (etenilo), propenilo, 1-butenilo, aminas primarias y secundarias, ácidos hidroxámicos, ésteres de N-hidroxisuccinimidilo, carbonatos de N-hidroxisuccinimidilo, oxicarbonilimidazoles, ésteres de nitrofenilo, ésteres trifluoretílicos, éteres glicídlicos, vinilsulfonas, azidas y maleimidas.

En algunas realizaciones, una modificación que puede hacer que el nucleótido sea reactivo implica la incorporación de un grupo reactivo que es capaz de reaccionar con otro grupo químico, por ejemplo, un grupo químico en una molécula o componente que se conjugará con el oligonucleótido con grupos químicos funcionales, mediante química clic. Tal como se utiliza en este documento, el término "química clic", generalmente se refiere a reacciones que son modulares, de amplio alcance, producen altos rendimientos, generan sólo subproductos inofensivos, como aquellos que pueden eliminarse mediante métodos no cromatográficos y son estereoespecíficos (pero no necesariamente enantioselectivos). Véase, por ejemplo, Angew. Chem. Int. Ed., 2001, 40(11): 2004-2021. En algunos casos, la química clic puede describir pares de grupos funcionales que pueden reaccionar selectivamente entre sí en condiciones acuosas suaves. Por consiguiente, los grupos de química clic son adecuados para la conjugación de grupos funcionales adicionales con los oligonucleótidos del presente método. Las reacciones químicas clic comunes incluyen cicloadiciones azida-alquino, cicloadiciones alquino-nitrona, reacciones alqueno-tetrazina y reacciones alqueno-tetrazol. Por consiguiente, el nucleótido con grupos químicos funcionales puede comprender un grupo azida, un grupo alquino, un grupo alqueno, un grupo nitrona, un grupo tetrazina o un grupo tetrazol.

Un ejemplo específico de reacción de química clic puede ser la cicloadición 1,3-dipolar de Huisgen de una azida y un alquino, es decir, la reacción catalizada por cobre de una azida con un alquino para formar un anillo de heteroátomo de 5 miembros llamado 1,2,3-triazol. La reacción también puede conocerse como cicloadición de azida-alquino catalizada por Cu(I) (CuAAC), química clic de Cu(I) o química clic de Cu⁺. El catalizador para la química clic puede ser sales de Cu(I), o sales de Cu(I) obtenidas *in situ* reduciendo el reactivo de Cu(II) a reactivo de Cu(I) con un reactivo reductor (Pharm Res. 2008, 25(10): 2216-2230). Los reactivos de Cu(II) conocidos para la química clic pueden incluir, entre otros, complejo Cu(II) (TBTA) y complejo Cu(II) (THPTA). TBTA, que es tris-[(1-bencil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina, también conocida como tris-(benciltriazolilmetil)amina, puede ser un ligando estabilizador para sales de Cu(I). THPTA, que es tris-(hidroxipropiltriazolilmetil)amina, puede ser otro ejemplo de agente estabilizante para Cu(I). También se pueden lograr otras condiciones para construir el anillo de 1,2,3-triazol a partir de una azida y un alquino (por ejemplo, un cicloalquino, tal como ciclooctina o ciclononina) usando química clic sin cobre, tal como mediante la reacción de química clic de azida-alquino promovida por tensión (SPAAC, véase, por ejemplo, Chem. Commun., 2011, 47: 6257-6259 y Nature, 2015, 519(7544): 486-90).

En algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales contiene un grupo reactivo en el grupo del azúcar, por ejemplo, una modificación en la posición 2 en el azúcar desoxirribosa, tal como sustituir el hidrógeno por un grupo flúor, cloro, bromo o azida. En algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales es un 2'-Azido-dNTP, por ejemplo, 2'-Azido-dATP.

En algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales contiene un grupo reactivo en la nucleobase, particularmente seleccionado entre un grupo alquino, alquenilo, tio o halógeno. Como se señaló anteriormente, el nucleótido con grupos químicos funcionales puede comprender una pirimidina que comprende una sustitución en la posición C5. En algunas realizaciones, el grupo alquino es etino, por ejemplo, el nucleótido con grupos químicos funcionales es un etinil-dNTP, tal como 5'-Etinil-dUTP. Alternativamente, el grupo alquino puede ser un grupo propinilo, por ejemplo, el nucleótido con grupos químicos funcionales es un propinilo dNTP, tal como 5'-Propinil-dUTP. En algunas realizaciones, el grupo alquenilo es vinilo (etenilo), por ejemplo, el nucleótido con grupos químicos funcionales es un vinil-dNTP, tal como 5'-vinil-dUTP. En algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales es un tio-dNTP, tal como 4'-tio-dTTP. En algunas realizaciones, el grupo halógeno es bromo, por ejemplo, el nucleótido con grupos químicos funcionales es un bromo-dNTP, tal como 5'-Bromo-dUTP. La incorporación de grupos halógeno en oligonucleótidos con grupos químicos funcionales se puede utilizar para promover sustituciones aromáticas nucleofílicas o entrecruzamiento mediado por UV, por ejemplo, con proteínas. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales producidos mediante el presente método pueden modificarse adicionalmente para comprender grupos aromáticos o pueden conjugarse con otras moléculas, por ejemplo, proteínas o péptidos, mediante entrecruzamiento mediado por UV.

En algunas realizaciones, un nucleótido con grupos químicos funcionales puede contener un grupo capaz de interactuar con otro componente, por ejemplo, interactuando a través de un enlace no covalente. Por ejemplo, el nucleótido puede modificarse para incorporar una parte o componente de un par de unión afín, por ejemplo, un compañero de unión por afinidad, por ejemplo, biotina o un hapteno, capaz de unirse a su compañero de unión, es decir, un compañero de unión afín, por ejemplo, estreptavidina o un anticuerpo. Dichos nucleótidos con grupos químicos funcionales pueden, por ejemplo, encontrar utilidad en la producción de oligonucleótidos con grupos químicos funcionales que pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido.

En algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales contiene una modificación que hace que el oligonucleótido que contiene el nucleótido sea resistente a la degradación, por ejemplo, degradación química y/o enzimática (por ejemplo, degradación por nucleasas). En algunas realizaciones, el nucleótido contiene una modificación en el grupo azúcar, por ejemplo, una modificación en la posición 2 en el azúcar desoxirribosa, tal como sustituir el hidrógeno por un grupo flúor, cloro, O-metilo u O-etilo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales es un 2'-flúor-dNTP, por ejemplo, 2'-flúor-UTP. En algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales comprende un grupo O-Me, por ejemplo, 2'-O-Metil-ATP. En algunas realizaciones, el nucleótido contiene una modificación en el grupo fosfato que forma el enlace internucleotídico, tal como sustituir un oxígeno por un azufre, por ejemplo, el nucleótido contiene un grupo fosforotionato. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales es tiotrifosfato de nucleótido, por ejemplo, 2-desoxitimidina-5'-O-(1-tiotrifosfato), 2-desoxicitidina-5'-O-(1-tiotrifosfato), 2-desoxiuridina-5'-O-(1-tiotrifosfato), 2-desoxiadenosina-5'-O-(1-tiotrifosfato) o 2-desoxiguanosina-5'-O-(1-tiotrifosfato). En algunas realizaciones, los nucleótidos con grupos químicos funcionales contienen una modificación en la nucleobase, tal como una modificación de amino, metilo, etilo o propinilo, por ejemplo, 2-amino-dATP, 5-metil-dCTP, propinil-dCTP C-5 o propinil-dUTP C-5.

En algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales contiene una modificación que afecta la termoestabilidad del oligonucleótido. En algunas realizaciones, el nucleótido comprende un azúcar ribosa bloqueado, es decir, comprende un enlace covalente adicional entre el oxígeno 2' y el carbono 4' del anillo de pentosa. En algunas realizaciones, el nucleótido es un nucleótido de LNA (ácido nucleico bloqueado), es decir, LNA-NTP tal como LNA-ATP. La conformación de ribosa bloqueada mejora el apilamiento de bases y, por lo tanto, aumenta la temperatura de fusión de los oligonucleótidos que comprenden nucleótidos de LNA.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, los nucleótidos con grupos químicos funcionales que pueden usarse en la invención incluyen: nucleótidos que comprenden un grupo alquino o azida (internalizado), nucleótidos marcados en forma fluorescente, nucleótidos que comprenden un grupo esterol, nucleótidos que comprenden un grupo poliéter, nucleótidos que comprenden un complejo metálico, nucleótidos que comprenden un grupo vinilo, nucleótidos que comprenden un grupo tiol, nucleótidos tionados, nucleótidos modificados para tener mayor resistencia a las nucleasas, nucleótidos que comprenden un grupo químico capaz de participar en la química clic, nucleótidos que afectan (p. ej. aumentan) la termoestabilidad del oligonucleótido (por ejemplo, nucleótidos de LNA) o una combinación de los mismos. La incorporación de estos nucleótidos con grupos químicos funcionales en los oligonucleótidos monocatenarios proporcionados por el método de la presente invención puede proporcionar una variedad de funciones útiles. Por ejemplo, se pueden usar oligonucleótidos monocatenarios que comprenden fluoróforos como sondas fluorescentes específicas de secuencia. La inclusión de nucleótidos tiolados en un oligonucleótido monocatenario permite marcar el oligonucleótido con moléculas reactivas con tiol y utilizarlo como sonda para la detección molecular de tales moléculas reactivas con tiol.

En algunas realizaciones, los nucleótidos con grupos químicos funcionales que pueden usarse en la invención no incluyen nucleótidos que comprenden un grupo digoxigenina. Dicho de manera alternativa, en algunas realizaciones, los nucleótidos con grupos químicos funcionales no son nucleótidos marcados con digoxigenina. En particular, en algunas realizaciones los nucleótidos con grupos químicos funcionales no son digoxigenina-11-dUTP.

En una realización preferida, los dNTP con grupos químicos funcionales son nucleótidos que comprenden un grupo alquino o un grupo vinilo, por ejemplo, una nucleobase modificada que contiene un grupo alquino (por ejemplo, etinilo) o un grupo vinilo, por ejemplo, un nucleótido que comprende una pirimidina con un grupo alquino o vinilo en la posición C5. En otra realización preferida, los dNTP con grupos químicos funcionales son nucleótidos que comprenden un grupo azida, por ejemplo, que comprenden un azúcar modificado que contiene un grupo azida, por ejemplo, un nucleótido que comprende un grupo azida en la posición 2 del azúcar desoxirribosa.

La mezcla de reacción para la reacción de RCA debe contener una combinación de componentes capaces de generar un producto de RCA a partir de la molécula de ADN circular de plantilla. Por ejemplo, los nucleótidos presentes en la mezcla de reacción (por ejemplo, la mezcla de nucleótidos convencionales y con grupos químicos funcionales) deben ser capaces de hibridarse con sus respectivos nucleótidos en la plantilla de ADN circular para permitir la amplificación por círculo rodante. Las cantidades relativas de nucleótidos con grupos químicos funcionales y convencionales presentes en la mezcla de reacción pueden variar dependiendo de la identidad del nucleótido con grupos químicos funcionales y la polimerasa. Además, la cantidad relativa de cada nucleótido presente en la mezcla de reacción puede usarse para controlar la incorporación de nucleótidos con grupos químicos funcionales en el producto de RCA. Por ejemplo, aumentar la concentración de los nucleótidos con grupos químicos funcionales (o disminuir la proporción de nucleótidos convencionales) puede dar como resultado una mayor proporción de nucleótidos con grupos químicos funcionales en el producto de RCA (por ejemplo, cuando el nucleótido con grupos químicos funcionales se usa en combinación con su nucleótido convencional equivalente). Por el contrario, disminuir la concentración de nucleótidos con grupos químicos funcionales (o aumentar la proporción de nucleótidos convencionales) puede dar como resultado una menor proporción de nucleótidos con grupos químicos funcionales en el producto de RCA.

Por lo tanto, los nucleótidos con grupos químicos funcionales pueden usarse además de, o completamente en lugar de, los nucleótidos convencionales que se hibridan con la misma base de ADN (nucleótido) en el ADN plantilla. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción puede contener solo un tipo de nucleótido con grupos químicos funcionales. En algunas realizaciones, se puede usar una combinación de diferentes nucleótidos con grupos químicos funcionales en la misma reacción. En algunas realizaciones, todos los nucleótidos con grupos químicos funcionales en la mezcla de reacción contienen el mismo tipo de grupo funcional, por ejemplo, grupo alquino. En algunas realizaciones, los nucleótidos con grupos químicos funcionales en la mezcla de reacción contienen los diferentes tipos de grupos funcionales. A modo de ejemplo, los diferentes tipos de nucleótidos con grupos químicos funcionales pueden ser capaces de hibridarse con la misma base de ADN (nucleótido), tal como un nucleótido dATP con grupos químicos funcionales con un fluoróforo y un segundo nucleótido dATP con grupos químicos funcionales con un grupo esterol. En otro ejemplo representativo, los diferentes tipos de nucleótidos con grupos químicos funcionales pueden ser capaces de hibridarse con diferentes bases de ADN (nucleótidos), como por ejemplo un nucleótido dATP con grupos químicos funcionales con un fluoróforo y un nucleótido dTTP con grupos químicos funcionales con un grupo esterol (o un fluoróforo diferente al fluoróforo en el nucleótido dATP). Por lo tanto, en la invención se puede utilizar cualquier combinación de nucleótidos con grupos químicos funcionales y convencionales. En una realización preferida, la mezcla de reacción de RCA contiene sólo un tipo de nucleótido con grupos químicos funcionales.

La cantidad de nucleótidos con grupos químicos funcionales presentes en la mezcla de reacción se puede medir como un porcentaje relativo del total de nucleótidos capaces de hibridarse con una base de ADN (nucleótido) particular. Alternativamente, este valor puede considerarse como el porcentaje en el que el nucleótido con grupos químicos funcionales ha reemplazado al correspondiente nucleótido convencional. Por ejemplo, el uso de cantidades iguales de dATP convencional y un dATP modificado con un fluoróforo podría expresarse como el 50 % del total de nucleótidos de dATP que se modifican (adición de grupos funcionales), o el reemplazo del 50 % de los nucleótidos de dATP convencionales con nucleótidos de dATP con grupos químicos funcionales.

La cantidad relativa de nucleótidos con grupos químicos funcionales en la mezcla de reacción de RCA se puede variar para controlar la frecuencia de nucleótidos con grupos químicos funcionales en los oligonucleótidos monocatenarios finales. En algunas realizaciones, los nucleótidos con grupos químicos funcionales pueden representar hasta aproximadamente el 5 % del total de nucleótidos capaces de hibridarse con una base de ADN (nucleótido) particular, por ejemplo, aproximadamente el 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o 5 %. Alternativamente, en algunas realizaciones el nucleótido con grupos químicos funcionales puede representar una proporción mayor, tal como 25 %, 50 %, 75 % o 100 % del total de nucleótidos capaces de unirse a una base de ADN (nucleótido) particular.

La cantidad relativa de nucleótidos con grupos químicos funcionales presentes puede variar por numerosas razones. Por ejemplo, algunos nucleótidos con grupos químicos funcionales, como el dATP modificado con Cy3, no están disponibles comercialmente en altas concentraciones. Además, como se muestra en los Ejemplos, los inventores han determinado que la inclusión de nucleótidos con grupos químicos funcionales puede afectar el rendimiento de los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales producidos por la invención, por ejemplo, el uso de cantidades relativas elevadas del nucleótido con grupos químicos funcionales puede inhibir la actividad de la ADN polimerasa responsable de la reacción de RCA (por ejemplo, reducir la eficiencia con la que se sintetiza el producto de RCA), o la enzima de escisión responsable de escindir el producto de RCA y liberar los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales (por ejemplo, reducen la eficacia con la que se escinde el producto de RCA).

Sin embargo, cabe destacar que los inventores han determinado sorprendentemente que se pueden lograr altos rendimientos de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales incluso cuando se usan cantidades relativas elevadas de oligonucleótidos con grupos químicos funcionales, por ejemplo, hasta aproximadamente el 75 %, tal como hasta aproximadamente el 70 %, 65 %, 60 %, 55 % o 50 %. En algunas realizaciones, puede ser posible utilizar más del 75 % de los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales, tal como aproximadamente el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %. En particular, los inventores han descubierto inesperadamente que los nucleótidos con grupos químicos funcionales que contienen grupos alquino o vinilo en la nucleobase son particularmente útiles en la invención ya que pueden incorporarse eficientemente al producto de RCA. Además, el producto de RCA podría escindirse fácilmente para producir los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales, aunque como se analiza más adelante, en algunas realizaciones puede requerirse una mayor cantidad de enzima de escisión en relación con la cantidad necesaria para escindir un producto de RCA equivalente que contiene sólo nucleótidos convencionales.

De manera similar, los inventores han descubierto que los nucleótidos con grupos químicos funcionales que contienen grupos O-metilo en el azúcar desoxirribosa pueden sustituir completamente un nucleótido convencional en la reacción de RCA y aún producir productos de RCA. Además, los inventores determinaron sorprendentemente que la incorporación de estos nucleótidos en los productos de RCA no afecta la formación de los dominios de escisión (por ejemplo, dominios de escisión en horquilla) o su escisión enzimática (por ejemplo, con endonucleasas de restricción).

Por consiguiente, la cantidad relativa de nucleótido con grupos químicos funcionales que está presente en la mezcla de reacción se puede ajustar para optimizar el rendimiento de los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales deseados o para optimizar la generación del producto de RCA. Dichas modificaciones están dentro del ámbito del experto en la materia basándose en los métodos descritos en los Ejemplos siguientes. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la cantidad relativa de nucleótidos con grupos químicos funcionales en la mezcla de reacción puede ser aproximadamente 1-5 %, 1-10 %, 1-25 %, 5-25 %, 10-25 %, 25-50 %, 25-75 %, 25-100 %, 50-75 %, 50-100 % o 75-100 %.

El término "liberación" se utiliza en el presente contexto para referirse a la escisión del producto de RCA en los dominios de escisión que delimitan las secuencias de oligonucleótidos para despegar o separar los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales de los dominios de escisión. Es deseable que la liberación de un oligonucleótido con grupos químicos funcionales determinado implique la escisión en ambos dominios de escisión que delimitan la secuencia del oligonucleótido.

No es necesario que se produzca escisión en todos los dominios de escisión en el producto de RCA para generar los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales. Como se señaló anteriormente, la incorporación de nucleótidos con grupos químicos funcionales en el producto de RCA, particularmente en los dominios de escisión, puede reducir la eficacia de la etapa de escisión. Sin embargo, la escisión de una parte de los dominios de escisión dará como resultado la liberación de una parte de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la etapa de escindir el producto de RCA da como resultado la escisión de al menos aproximadamente el 30 % de los dominios de escisión en el producto de RCA, por ejemplo, al menos aproximadamente 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 %. En algunas realizaciones, la etapa de escindir el producto de RCA da como resultado la escisión de al menos aproximadamente el 90 % de los dominios de escisión en el producto de RCA, por ejemplo, 95 % o más.

Visto alternativamente, en algunas realizaciones, la etapa de escindir el producto de RCA da como resultado la liberación de al menos aproximadamente el 30 % de los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales contenidos en el producto de RCA, por ejemplo, al menos aproximadamente 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 % u 80 %. En algunas realizaciones, la etapa de escindir el producto de RCA da como resultado la liberación de al menos aproximadamente el 90 % de los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales contenidos en el producto de RCA, por ejemplo, 95 % o más.

Una vez que se han liberado los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales, se aíslan, separan o purifican de la mezcla de reacción de escisión (por ejemplo, componentes de reacción y/o productos de degradación tales como dominios de escisión, productos de RCA no escindidos, etc.).

Por lo tanto, el método de la presente invención comprende una etapa de aislar, separar o purificar los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales. Este aislamiento, separación o purificación se puede realizar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica.

En algunas realizaciones, después de la etapa de aislamiento, separación o purificación, los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales preferiblemente están sustancialmente libres de cualquier componente contaminante derivado de los materiales o componentes utilizados en el procedimiento de aislamiento o en su preparación (por ejemplo, componentes de reacción y/o productos de degradación tales como dominios de escisión, productos de RCA no escindidos, etc.). En algunas realizaciones, los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales se purifican hasta un grado de pureza de más de aproximadamente el 50 o el 60 %, por ejemplo, más de aproximadamente 70, 80 o 90 %, tal como más de aproximadamente 95 o 99 % de pureza.

evaluada p/p (peso seco). Dichos niveles de pureza pueden incluir productos de degradación de los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales.

5 En algunas realizaciones, puede ser útil preparar preparaciones enriquecidas de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales que tengan menor pureza, por ejemplo, contienen menos de aproximadamente el 50 % de los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales de interés, por ejemplo, menos de aproximadamente 40 o 30 %.

10 Como se analizó anteriormente, la invención puede dar como resultado una mezcla o pluralidad (por ejemplo, una biblioteca) de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales. Por lo tanto, en algunas realizaciones, puede ser deseable separar adicionalmente los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales, por ejemplo, por tamaño, para obtener oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales específicos (es decir, para aislar oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales específicos) o para
15 generar subgrupos o subbibliotecas de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales. Se puede emplear cualquier medio adecuado para separar las mezclas de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales para aislar los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales específicos o subgrupos o subbibliotecas de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales.

20 Por lo tanto, en algunas realizaciones, el método comprende una etapa adicional de separación de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales de una mezcla (por ejemplo, biblioteca) de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales obtenidos mediante el método descrito anteriormente, para aislar un oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales específico o un subgrupo de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales.

25 Por ejemplo, los productos de la reacción de escisión se pueden separar por tamaño usando electroforesis en gel usando un gel de agarosa o un gel de poliacrilamida. Los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales deseados pueden entonces aislarse del gel y purificarse adicionalmente, si es necesario, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Otros métodos para purificar, aislar o separar los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales utilizan cromatografía (por ejemplo, HPLC, exclusión por tamaño, intercambio iónico, afinidad, interacción hidrofóbica, fase
30 inversa) o electroforesis capilar.

Como se mencionó anteriormente, los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales producidos mediante el método descrito anteriormente pueden contener un grupo reactivo que es capaz de reaccionar con otro grupo químico, por ejemplo, un grupo químico en una molécula o componente que se va a conjugar con el oligonucleótido con grupos
35 químicos funcionales, por ejemplo, mediante química clic. Por ejemplo, conjugar moléculas o componentes adicionales (que a su vez pueden comprender o verse como grupos funcionales) con los oligonucleótidos monocatenarios puede ser particularmente útil para incorporar grupos grandes o voluminosos, tales como grupos que pueden inhibir o disminuir la eficiencia del presente método si está presente en los nucleótidos con grupos químicos funcionales utilizados en la reacción de RCA. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden producir oligonucleótidos con grupos químicos
40 funcionales que contengan moléculas o componentes que una polimerasa no podría incorporar directamente durante la reacción de RCA, o que sólo se incorporarían con eficiencias o rendimientos bajos. Adicional o alternativamente, someter los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales obtenidos mediante el método a una etapa de conjugación adicional puede aumentar la diversidad de las estructuras presentes en una biblioteca de oligonucleótidos con grupos químicos funcionales.

45 Por consiguiente, en algunas realizaciones, el método comprende además una etapa de conjugar una molécula o componente con el(los) oligonucleótido(s) con grupos químicos funcionales mediante un grupo funcional (por ejemplo, reactivo) en el oligonucleótido, tal como mediante química clic. En algunas realizaciones preferidas, la molécula o componente se conjuga con el oligonucleótido con grupos químicos funcionales a través de un grupo alquino, vinilo o azida (es decir, un grupo alquino, vinilo o azida en un nucleótido con grupos químicos funcionales incorporado al
50 producto de RCA en el método definido en el presente documento).

El término "conjugación" en el contexto de la presente invención con respecto a enlazar o unir una molécula o componente a un oligonucleótido con grupos químicos funcionales (por ejemplo, un grupo alquino, vinilo o azida en
55 dicho oligonucleótido con grupos químicos funcionales) se refiere a unir dicha molécula o componente a dicho oligonucleótido mediante un enlace covalente. En particular, esta conjugación puede ocurrir mediante una reacción de química clic.

Un ejemplo de una reacción de química clic específica que se puede usar para conjugar moléculas o componentes
60 adicionales a oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales que comprenden uno o más grupos alquino es la cicloadición azida-alquino. Para lograr la conjugación deseada, el oligonucleótido que comprende el grupo alquino se puede incubar durante un período de tiempo adecuado con una molécula o componente (por ejemplo, un marcador tal como un fluoróforo) que contenga un grupo azida. La reacción de cicloadición azida-alquino comúnmente utiliza un catalizador de cobre, particularmente un catalizador de cobre (I). En algunas realizaciones, el
65 oligonucleótido y la molécula o componente que contiene azida se pueden incubar en presencia de sulfato de cobre.

También se puede usar un agente reductor para generar el catalizador de cobre(I) activo. El agente reductor puede ser, por ejemplo, ascorbato de sodio.

Un ejemplo representativo adicional para conjugar moléculas o componentes adicionales a oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales de la presente invención que comprenden uno o más grupos vinilo puede utilizar la reacción alqueno-tetrazina. Esta reacción tiene la ventaja de estar libre de cobre. Además, es completamente ortogonal a la reacción de química clic de alquino-azida antes mencionada. En consecuencia, un oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales que comprende tanto un grupo alquino como un grupo vinilo podría participar en dos reacciones de química clic de forma independiente para conjugar dos moléculas o componentes adicionales diferentes al mismo oligonucleótido.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, se puede considerar que la invención proporciona un método de dos etapas para producir oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales que comprende una primera etapa de incorporación de nucleótidos con grupos químicos funcionales (por ejemplo, que comprende grupos reactivos, tales como grupos capaces de participar en reacciones de química clic, por ejemplo, grupos alquino, vinilo o azida) en un oligonucleótido usando el método descrito en el presente documento, y una segunda etapa de conjugar moléculas o componentes adicionales a los oligonucleótidos monocatenarios a través de los grupos funcionales en los nucleótidos con grupos químicos funcionales.

Será evidente que cualquier molécula o componente deseable (es decir, entidades) puede conjugarse con los grupos funcionales en los oligonucleótidos monocatenarios producidos mediante el presente método. Tales moléculas o componentes simplemente requieren la presencia de un grupo (por ejemplo, grupo reactivo) capaz de reaccionar con un grupo funcional en el oligonucleótido para formar un enlace covalente. En algunas realizaciones, la molécula o componente puede ser una molécula de ácido nucleico, proteína, péptido, compuesto orgánico de molécula pequeña (por ejemplo, un esteroide, tal como colesterol), fluoróforo, complejo de metal-ligando, polisacárido, nanopartícula, nanotubo, polímero, célula, orgánulo, vesícula, virus, partícula similar a virus o cualquier combinación de estos.

La célula puede ser una célula procariota o eucariota. En algunas realizaciones, la célula es una célula procariota, por ejemplo, una célula bacteriana.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido con grupos químicos funcionales puede conjugarse o fusionarse con un compuesto o molécula que tenga un efecto terapéutico o profiláctico, por ejemplo, un antibiótico, antiviral, vacuna, agente antitumoral, por ejemplo, un compuesto o isótopo radiactivo, citocina, toxina, oligonucleótido, gen que codifica un ácido nucleico o vacuna de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido con grupos químicos funcionales (por ejemplo, un aptámero) se puede conjugar o fusionar con un marcador, por ejemplo, un radiomarcador, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador cromóforo, así como a sustancias y enzimas que generan un sustrato detectable, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa o fosfatasa alcalina. Esta detección se puede aplicar en numerosos ensayos en los que los anticuerpos se utilizan convencionalmente, incluidos los formatos de transferencia Western /inmunotransferencia, histoquímica, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o citometría de flujo (FACS). También se pueden conjugar marcadores para imágenes por resonancia magnética, sondas de tomografía por emisión de positrones y boro 10 para terapia de captura de neutrones con los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, la molécula o componente se puede seleccionar del grupo que consiste en: un fluoróforo, un esteroide (por ejemplo, colesterol), un poliéter, un complejo metálico, una molécula que contiene tiol, una molécula que contiene un grupo que proporciona una mayor resistencia a las nucleasas y una molécula que contiene un grupo capaz de participar en una reacción de química clic.

Será evidente que la molécula o componente conjugado con el oligonucleótido con grupos químicos funcionales puede interactuar con otras moléculas y dichas interacciones pueden ser interacciones covalentes o no covalentes. Por ejemplo, un péptido conjugado con el oligonucleótido puede interactuar con su compañero de unión afín, tal como un anticuerpo, de forma no covalente. En un ejemplo adicional, una molécula que contiene un grupo capaz de participar en una reacción de química clic puede conjugarse con otra molécula o componente como se definió anteriormente mediante reacción con un grupo reactivo de dicha molécula o componente para formar un complejo covalente.

La molécula de ADN circular proporcionada en la etapa (a) del presente método se puede producir mediante cualquier medio adecuado y se conocen bien en la técnica diversos medios. Por consiguiente, el método de la presente invención puede comprender etapas adicionales antes de la etapa (a) de proporcionar una molécula de ADN circular.

Por ejemplo, el proceso de producción de la molécula de ADN circular puede comprender una etapa de diseño de una secuencia que comprende una o más secuencias de oligonucleótidos deseadas delimitadas por dominios de escisión (denominados en el presente documento "pseudogén") *in silico*. Por lo tanto, el método puede utilizar un método implementado por ordenador para diseñar el pseudogén y dichos métodos se describen en la técnica, por ejemplo, Ducani et al. , 2013, citado anteriormente.

El término "pseudogén" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de nucleótidos que comprende una o más secuencias de oligonucleótidos deseadas, delimitadas por dominios de escisión. Alternativamente, esta secuencia puede denominarse en el presente documento como la "construcción de ácido nucleico".

La secuencia del pseudogén diseñada *in silico* se puede producir (por ejemplo, sintetizar) usando métodos de síntesis de genes disponibles comercialmente, o cualquier otro medio adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, PCR de montaje. Por lo tanto, el método puede comprender una etapa de producción del pseudogén.

El pseudogén puede producirse como una molécula monocatenaria o bicatenaria. El pseudogén se puede circularizar utilizando cualquier medio adecuado conocido en la técnica para proporcionar la molécula de ADN circular de la etapa (a). Por ejemplo, se puede ligar una molécula bicatenaria usando una enzima ligasa, como se describe a continuación. Se entenderá a este respecto que al menos uno de los extremos 5' del pseudogén está fosforilado para permitir que tenga lugar la ligación. En realizaciones en las que la etapa de producir el pseudogén da como resultado una molécula de ADN en la que los extremos 5' no están fosforilados, el método puede comprender una etapa adicional de fosforilar el(los) extremo(s) 5' del pseudogén, por ejemplo, usando una enzima quinasa, tal como polinucleótido quinasa T4.

De manera similar, cuando el pseudogén se proporciona como una molécula monocatenaria, se puede circularizar utilizando una enzima ligasa apropiada capaz de catalizar la ligación intramolecular de moléculas de oligonucleótidos monocatenarios, tal como CírculoLigase. Nuevamente, el método puede comprender una etapa adicional de fosforilar el(los) extremo o extremos 5' del pseudogén, por ejemplo, usando una enzima quinasa, tal como polinucleótido quinasa T4, para facilitar la reacción de ligación.

En algunas realizaciones, puede resultar ventajoso insertar el pseudogén en un plásmido, que puede replicarse en bacterias, tal como *E. coli*. Las secuencias de plásmidos adecuadas son bien conocidas en la técnica. Esto permite comprobar la secuencia del pseudogén (por ejemplo, mediante secuenciación) y corregir cualquier error en la secuencia que se va a corregir, por ejemplo, mediante iteraciones de secuenciación y mutagénesis utilizando cualquier método adecuado.

La inserción del pseudogén en un plásmido también facilita la generación de un número significativo de copias de la molécula de ADN circular. Por ejemplo, se puede cultivar una única colonia bacteriana que contiene un plásmido que comprende el pseudogén de secuencia verificada para amplificar el plásmido, que posteriormente se puede purificar de las bacterias usando cualquier medio adecuado conocido en la técnica.

A continuación, la secuencia del pseudogén se corta del plásmido, por ejemplo, usando enzimas de restricción como se describió anteriormente. La secuencia del pseudogén lineal cortada se puede purificar usando PAGE y extracción en gel, u otros métodos adecuados. La secuencia del pseudogén lineal purificada puede luego recircularizarse usando una enzima ligasa adecuada, tal como ligasa T4, para formar la molécula de ADN circular que se proporcionará en la etapa (a) del presente método.

Además de la amplificación, el proceso de transfectar el pseudogén que contiene el plásmido en bacterias también permite producir una reserva bacteriana de glicerol. Las bacterias que comprenden el plásmido del pseudogén deseado pueden prepararse en glicerol, congelarse y almacenarse de manera estable durante largos períodos de tiempo.

Por consiguiente, en algunas realizaciones la etapa (a) del presente método comprende:

- (i) clonar en un plásmido de ADN una molécula de ADN lineal que comprende la secuencia de oligonucleótidos delimitada por dominios de escisión;
- (ii) amplificar dicho plásmido;
- (iii) escindir parte del plásmido que contiene la molécula de ADN que comprende la secuencia de oligonucleótidos delimitada por dominios de escisión; y
- (iv) circularizar la parte del plásmido obtenido en la etapa (iii).

En algunas realizaciones, la etapa (ii) comprende transfectar dicho plásmido de ADN en bacterias y hacer crecer las bacterias.

En algunas realizaciones, la molécula de ADN lineal que comprende la secuencia de oligonucleótidos delimitada por dominios de escisión comprende además una región del extremo 5' y una región del extremo 3' que comprende cada una un dominio de escisión y en el que la etapa (iii) comprende escindir los dominios de escisión en las regiones terminales con una enzima de escisión.

Puede usarse cualquier enzima de escisión adecuada como se define en el presente documento para escindir el pseudogén del plásmido. En algunas realizaciones, la enzima de escisión es BsmBI o BsaI o un isoesquizómero de los mismos.

En algunas realizaciones particulares de la invención, el método utiliza una ADN polimerasa phi29 o un derivado de la misma y un nucleótido con grupos químicos funcionales que comprende una nucleobase modificada. En algunas realizaciones, el nucleótido con grupos químicos funcionales comprende un grupo reactivo en la nucleobase, tal como un grupo reactivo capaz de participar en una reacción de química clic. En algunas realizaciones, el grupo reactivo en la nucleobase es un grupo alquino o vinilo como se definió anteriormente. En algunas realizaciones, la cantidad relativa de nucleótido con grupos químicos funcionales en la mezcla de RCA es aproximadamente del 25-100 %, por ejemplo, 25-75 %, 50-100 % o 75-100 % o cualquier valor dentro de estos intervalos. En algunas realizaciones, los dominios de escisión son capaces de formar estructuras en horquilla en el producto de RCA como se definió anteriormente.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit para usar en el método descrito en el presente documento que comprende:

- (i) una molécula de ADN circular que comprende una secuencia de oligonucleótidos delimitada por dominios de escisión, en donde los dominios de escisión comprenden o consisten en una secuencia capaz de formar una estructura en horquilla y en el que la porción bicatenaria de la estructura en horquilla comprende una secuencia que es reconocida por una enzima de escisión;
- (ii) dNTP con grupos químicos funcionales (por ejemplo, como se define en el presente documento); y
- (iii) una o más enzimas de escisión que escinden los dominios de escisión de (i).

En algunas realizaciones, el kit puede comprender una enzima ADN polimerasa capaz de realizar amplificación por círculo rodante, es decir, que comprende al menos algo de actividad de desplazamiento de cadena, como se define en el presente documento. Por ejemplo, el kit puede comprender una polimerasa phi29 o un derivado de la misma, o una ADN polimerasa Bst o un derivado de la misma.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender una o más nickasas. Por ejemplo, el kit puede comprender Nb.BsrDI, Nt.BspQI o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender una o más proteínas de unión monocatenarias como se define en el presente documento. Por ejemplo, el kit puede comprender una proteína de unión a ADN monocatenario de *E. coli*, una proteína del gen 32 del fago T4 o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender una o más moléculas o componentes que se conjugarán con un oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales como se definió anteriormente.

La molécula de ADN circular, las enzimas de escisión y los dNTP con grupos químicos funcionales del kit son los descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, al menos el 5 % de los residuos de nucleótidos del oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales producidos por el método son nucleótidos con grupos químicos funcionales, es decir, nucleótidos que contienen un grupo funcional como se define en el presente documento. En algunas realizaciones, al menos el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 % o más de los residuos de nucleótidos del oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales producidos por el método son nucleótidos con grupos químicos funcionales. Por lo tanto, en algunas realizaciones, aproximadamente el 5-100 % de los residuos de nucleótidos del oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales producidos por el método son nucleótidos con grupos químicos funcionales, por ejemplo, aproximadamente 10-95 %, 15-90 %, 20-85 %, 25-80 %, 30-75 %, 35-70 %, 40-65 % o 45-55 % de los residuos de nucleótidos del oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales producidos por el método son nucleótidos con grupos químicos funcionales.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales producido por el método puede contener al menos un nucleótido con grupos químicos funcionales internos, es decir, un nucleótido con grupos químicos funcionales que no está en el extremo 5' o 3' del oligonucleótido. En algunas realizaciones, el oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales producido por el método puede contener 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos con grupos químicos funcionales internos, por ejemplo, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos con grupos químicos funcionales internos.

El oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales producido por el método puede contener uno cualquiera o más de los nucleótidos con grupos químicos funcionales definidos en el presente documento. El oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales producido por el método puede comprender nucleótidos con grupos químicos funcionales que contienen un grupo funcional seleccionado de un grupo alquino, un grupo alqueno (por ejemplo, un grupo vinilo), un grupo azida, un grupo halógeno, un grupo O-metilo, un azúcar ribosa bloqueado o una combinación de los mismos.

Por lo tanto, un oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales puede ser obtenido mediante el método descrito en el presente documento, en el que;

- (i) el oligonucleótido contiene al menos 50 nucleótidos; y
 (ii) al menos el 5 % de los residuos de nucleótidos contienen un grupo funcional seleccionado entre un grupo alquino, un grupo alqueno (por ejemplo, vinilo), un grupo azida, un grupo halógeno, un grupo O-metilo, un azúcar ribosa bloqueado o una combinación de los mismos, en donde las posiciones preferidas de los grupos funcionales dentro de los residuos de nucleótidos con grupos químicos funcionales son como se definieron anteriormente.

Una biblioteca que comprende una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales puede obtenerse mediante el método descrito en el presente documento. La biblioteca de una pluralidad de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales puede incluir uno o más oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales como se definió anteriormente.

Aún en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método como se define en el presente documento que es un método para producir un conjunto de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales para su uso en hibridación fluorescente *in situ* de una sola molécula (smFISH), en el que los nucleótidos con grupos químicos funcionales son nucleótidos marcados en forma fluorescente y en el que cada oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales del conjunto contiene aproximadamente 15-30, preferiblemente aproximadamente 20-25 nucleótidos. En realizaciones preferidas, los nucleótidos con grupos químicos funcionales están marcados con la misma molécula fluorescente.

Como alternativa al uso de nucleótidos con grupos químicos funcionales marcados directamente con fluorescencia, el método puede implicar el uso de nucleótidos que comprenden un grupo químico capaz de participar en la química clic, al que posteriormente se puede conjugar un marcador fluorescente. Los marcadores fluorescentes adecuados son bien conocidos en la técnica y se definieron anteriormente.

Por consiguiente, en aún un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método como se define en el presente documento que es un método para producir un conjunto de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales para uso en hibridación fluorescente *in situ* de una sola molécula (smFISH), en el que los nucleótidos con grupos químicos funcionales son nucleótidos que comprenden un grupo químico capaz de participar en la química clic, y en el que el método comprende además una etapa de conjugar un marcador fluorescente con al menos un nucleótido con grupos químicos funcionales en cada oligonucleótido con grupos químicos funcionales mediante química clic, y en el que cada oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales del conjunto contiene aproximadamente 15-30, preferiblemente aproximadamente 20-25, nucleótidos. Los nucleótidos que comprenden un grupo químico capaz de participar en la química clic se definieron anteriormente e incluyen nucleótidos que comprenden un grupo azida, un grupo alquino, un grupo alqueno, un grupo nitrona, un grupo tetrazina o un grupo tetrazol, o una combinación de los mismos.

En la técnica de smFISH, los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales actúan como sondas de hibridación para identificar la presencia y ubicación de moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia diana específica que se va a detectar. Por consiguiente, una vez que se ha producido el conjunto de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales para uso en hibridación fluorescente *in situ* de una sola molécula (smFISH) mediante el método divulgado en el presente documento, los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales pueden hibridarse con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia diana para detectarse en un método de smFISH.

Cuando los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales producidos por el método comprenden nucleótidos con grupos químicos funcionales que comprenden un grupo químico capaz de participar en la química clic, la etapa de conjugar un marcador fluorescente con los nucleótidos con grupos químicos funcionales mediante la química clic se puede llevar a cabo antes o después de que los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales se hibriden con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia diana.

Por ejemplo, los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales que comprenden nucleótidos con grupos químicos funcionales que comprenden un grupo químico capaz de participar en la química clic pueden someterse a una etapa de conjugación de un marcador fluorescente con al menos un nucleótido con grupos químicos funcionales en cada oligonucleótido con grupos químicos funcionales mediante química clic, y luego pueden hibridarse con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia diana, una vez que se han conjugado los marcadores fluorescentes. Alternativamente, los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales que comprenden nucleótidos con grupos químicos funcionales que comprenden un grupo químico capaz de participar en la química clic pueden hibridarse primero con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia diana, y luego pueden someterse a una etapa de conjugación de un marcador fluorescente con al menos un nucleótido con grupos químicos funcionales en cada oligonucleótido con grupos químicos funcionales mediante química clic, una vez hibridado con la secuencia diana.

Por consiguiente, en otro aspecto más, la presente invención proporciona un método como se define en el presente documento que es un método para producir un conjunto de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales para uso en hibridación fluorescente *in situ* de una sola molécula (smFISH), en el que los nucleótidos con grupos químicos funcionales son nucleótidos que comprenden un grupo químico capaz de participar en la química clic,

y en el que el método comprende además una etapa de conjugar un marcador fluorescente con al menos un nucleótido con grupos químicos funcionales en cada oligonucleótido con grupos químicos funcionales mediante química clic, y en el que cada oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales del conjunto contiene aproximadamente 15-30, preferiblemente aproximadamente 20-25, nucleótidos, y en el que la etapa de conjugar un marcador fluorescente con al menos un nucleótido con grupos químicos funcionales en cada oligonucleótido con grupos químicos funcionales mediante la química clic se lleva a cabo antes de que los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales se hibriden con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia diana.

De manera similar, la presente invención también proporciona un método como se define en el presente documento que es un método para producir un conjunto de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales para uso en hibridación fluorescente *in situ* de una sola molécula (smFISH), en el que los nucleótidos con grupos químicos funcionales son nucleótidos que comprenden un grupo químico capaz de participar en la química clic, y en el que el método comprende además una etapa de conjugar un marcador fluorescente con al menos un nucleótido con grupos químicos funcionales en cada oligonucleótido con grupos químicos funcionales mediante química clic, y en el que cada oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales en el conjunto contiene aproximadamente 15-30, preferiblemente aproximadamente 20-25, nucleótidos, y en el que la etapa de conjugar un marcador fluorescente con al menos un nucleótido con grupos químicos funcionales en cada oligonucleótido con grupos químicos funcionales mediante química clic se lleva a cabo después de que los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales se hibridan con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia diana.

Un "conjunto" de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales se refiere a una pluralidad de oligonucleótidos con diferentes secuencias, es decir, secuencias que se hibridan con diferentes secuencias (por ejemplo, no superpuestas) dentro de la diana (la molécula que se va a detectar). En algunas realizaciones, el conjunto contiene al menos aproximadamente 20 oligonucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 22, 25, 27, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 oligonucleótidos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el conjunto contiene aproximadamente 30-96 oligonucleótidos, por ejemplo, aproximadamente 36, 48, 60, 72, 84 o 96 oligonucleótidos.

Visto de manera alternativa, en algunas realizaciones el pseudogén contiene al menos aproximadamente 20 secuencias de oligonucleótidos delimitadas por dominios de escisión, por ejemplo, aproximadamente 22, 25, 27, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 secuencias de oligonucleótidos delimitadas por dominios de escisión. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el pseudogén contiene aproximadamente 30-96 secuencias de oligonucleótidos delimitadas por dominios de escisión, por ejemplo, aproximadamente 36, 48, 60, 72, 84 o 96 secuencias de oligonucleótidos delimitadas por dominios de escisión.

La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes con referencia a los siguientes dibujos:

La Figura 1 muestra fotografías de geles de agarosa visualizados con luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio (arriba) e imágenes fluorescentes utilizando longitudes de onda correspondientes a las longitudes de onda de emisión de los fluoróforos (abajo). Los geles de agarosa muestran productos oligonucleotídicos monocatenarios con grupos químicos funcionales del método de la invención (que contienen 378 nucleótidos) que comprenden los fluoróforos ATTO-488 (A) o Cy3 (B).

La Figura 2 muestra la imagen negativa de una fotografía de un gel de agarosa visualizada con luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio. El gel de agarosa muestra productos de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales del método de la invención (que contienen 420 nucleótidos) que comprenden 5-etinil-dUTP (5-EdUTP) producidos usando diversas cantidades relativas de nucleótidos 5-EdUTP/dTTP, es decir, 25 %, 50 %, 75 % y 100 % y ADN polimerasa phi29 (A) o ADN polimerasa Bst (B).

La Figura 3 muestra una fotografía de un gel de agarosa visualizado con luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio (izquierda) e imágenes fluorescentes utilizando longitudes de onda correspondientes a las longitudes de onda de emisión de los fluoróforos Cy3 (derecha). Los geles de agarosa muestran productos de oligonucleótidos monocatenarios del método de la invención (que contienen 420 nucleótidos) que comprenden 5-etinil-dUTP (5-EdUTP) o dTTP convencional que posteriormente se hicieron reaccionar con la molécula de fluoróforo-azida Cy3 (N3-Cy3). Los cuadros sombreados denotan la presencia de las especies indicadas.

La Figura 4 muestra imágenes negativas de fotografías de geles de agarosa visualizadas con luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio. Los geles de agarosa muestran productos oligonucleotídicos monocatenarios con grupos químicos funcionales del método de la invención (que contienen 420 nucleótidos) que comprenden: (A) 2'-Flúor-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato (2'-F-dUTP); (B) 2'-Desoxitimidina-5'-O-(1-Tiotrifosfato) (α -tiol-dTTP); y (C) nucleótidos 2-dNTP Alfa S (Alfa S-dATP, Alfa S-dTTP, Alfa S-dCTP, Alfa S-dTTP y una mezcla de Alfa S-dNTP), producidos utilizando diversas cantidades relativas de nucleótidos con grupos químicos funcionales. Los paneles de la derecha en A y B muestran el carril correspondiente al 100 % de nucleótidos con grupos químicos funcionales sobreexposados para mostrar una banda correspondiente al producto de RCA. El panel derecho en C muestra los carriles correspondientes a la mezcla Alfa S-dNTP sobreexpuesta para mostrar las bandas correspondientes al producto de RCA.

La Figura 5 muestra imágenes negativas de fotografías de geles de agarosa visualizadas con luz ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio. Los geles de agarosa muestran oligonucleótidos producidos por el método de la invención sometidos a diversas concentraciones de DNasa I, en los que: (A) muestra los productos de reacción de un oligonucleótido que contiene sólo nucleótidos convencionales (ODN natural); (B) muestra los productos de reacción de un oligonucleótido que contiene nucleótidos con grupos químicos funcionales con 2'-Fluoro-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato (2'-F-dUTP); y (C) muestra los productos de reacción de un oligonucleótido que contiene 2'-Desoxitimidina-5'-O-(1-Tiotrifosfato) (S-ODN).

La Figura 6 muestra una imagen negativa de una fotografía de un gel PAGE desnaturalizante visualizado usando luz UV después de la tinción con SybrGold. El gel PAGE muestra productos de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales del método de la invención que comprenden 5-Vinil-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato (5-Vinil-dUTP) producido usando diversas cantidades relativas de nucleótidos de 5-Vinil-dUTP, es decir, 25 %, 50 %, 75 % y 100 %.

La Figura 7 muestra una imagen negativa de una fotografía de un gel PAGE desnaturalizante visualizado usando luz UV después de la tinción con SybrGold. El gel PAGE muestra productos de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales del método de la invención que comprenden 4-Tiotimidina-5'-Trifosfato (4-Tio-dTTP) producido usando diversas cantidades relativas de nucleótidos 5-Vinil-dUTP, es decir, 25 %, 50 %, 75 % y 100 %.

La Figura 8 muestra versiones anotadas de las secuencias de pseudogenes que se usaron en la producción de oligonucleótidos que tienen secuencias correspondientes a las SEQ ID NOs: 1-13. Se identifican las secuencias reconocidas por las enzimas de escisión y corte, las secuencias en horquilla y las secuencias de oligonucleótidos finales.

La Figura 9 muestra la estructura de un 2'-Azido-dATP (A) e imágenes negativas de fotografías de geles PAGE desnaturalizantes visualizados con luz ultravioleta después de la tinción con SybrGold (B y C). Los geles PAGE muestran productos de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales del método de la invención que comprenden 2'-Azido-dATP producido utilizando diversas cantidades relativas de nucleótidos 2'-Azido-dATP, es decir, 25 %, 50 %, 75 % y 100 % y ADN polimerasa phi29 (B) o ADN polimerasa Bst (C).

La Figura 10 muestra la estructura de una Biotina-16-Aminoalil-2'-dUTP (A) y una imagen negativa de una fotografía de un gel PAGE desnaturalizante visualizado usando luz UV después de la tinción con SybrGold (B). El gel PAGE muestra productos de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales del método de la invención que comprenden Biotina-16-Aminoalil-2'-dUTP producido usando diversas cantidades relativas de nucleótidos de biotina-16-AA-dUTP, es decir, 25 %, 50 %, 75 % y 100 % y ADN polimerasa phi29.

La Figura 11 muestra las estructuras de un nucleótido 5'-Bromo-2'-desoxiuridina-5'-Trifosfato (A) y un nucleótido 5'-Propinil-2'-desoxicitidina-5'-Trifosfato (B); imágenes negativas de fotografías de geles PAGE desnaturalizantes visualizadas con luz ultravioleta después de la tinción con SybrGold (C, D, E y F). Los geles PAGE muestran productos de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales del método de la invención que comprenden 5'-Br-dUTP (C y E) o 5'-Propinil-dCTP (D y F) producidos usando diversas cantidades relativas de los respectivos nucleótidos con grupos químicos funcionales, es decir, 25 %, 50 %, 75 % y 100 % y ADN polimerasa phi29 o ADN polimerasa Bst.

La Figura 12 muestra la estructura de un nucleótido 2'-O-Metiladenosina-5'-Trifosfato (A) y una imagen negativa de una fotografía de un gel PAGE desnaturalizante visualizado con luz ultravioleta después de la tinción con SybrGold (B). El gel PAGE muestra productos de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales del método de la invención que comprenden 2'-OMe-ATP producido utilizando diversas cantidades relativas de nucleótidos 2'-OMe-ATP, es decir, 25 %, 50 %, 75 % y 100 % y ADN polimerasa phi29.

La Figura 13 muestra la estructura de un nucleótido LNA-adenosina-5'-trifosfato (A) e imágenes negativas de fotografías de geles PAGE desnaturalizantes visualizados usando luz UV después de la tinción con SybrGold (B y C). Los geles PAGE muestran productos de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales del método de la invención que comprenden LNA-ATP producido utilizando diversas cantidades relativas de nucleótidos LNA-ATP, es decir, 25 %, 50 %, 75 % y 100 % y ADN polimerasa phi29 (B) o ADN polimerasa Bst (C).

Ejemplos

Ejemplo 1 - Producción enzimática de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden nucleótidos fluorescentes

Se produjeron oligonucleótidos fluorescentes monocatenarios de 378 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: 1) enzimáticamente usando ADN polimerasa phi29. Esto se hizo a través de incorporación de dos nucleobases dATP con grupos químicos funcionales diferentes, uno que comprende el fluoróforo Cy3 (7-Propargilamino-7-deaza-ATP-Cy3) y otro que comprende el fluoróforo ATTO-488 (7-Propargilamino-7-deaza-ATP-ATTO-488).

Se preparó una plantilla de ADN circular bicatenaria que contenía la SEQ ID NO: 1 y dominios de escisión en horquilla como se describe en Ducani et al., 2013, Nature Methods, 647-652. La plantilla (1 ng/μL) se cortó con Nb.BsrDI y Nt.BspQI (0.25 U/μL) y se realizó varias veces una reacción de amplificación en círculo rodante (0.1-0.25 ng/μL de ADN plantilla, ADN polimerasa phi29 0.25 U/μL, 0.1 μg del gen T4 32) con diferentes proporciones de dATP naturales y dATP con grupos químicos funcionales en cada reacción (es decir, diferentes cantidades relativas de dATP con grupos químicos funcionales, 2 %, 3 % o 5 %). Los productos de RCA resultantes se diluyeron cinco veces en agua desionizada y tampón de digestión 1X (acetato de potasio 50 mM, acetato de Tris 20 mM, acetato de magnesio 10 mM, 100 μg/mL de BSA, pH 7.9 a 25 °C) y luego se digirieron con enzima de restricción BtsCI (0.5 U/μL) durante la noche a 50 °C y los productos de la digestión se procesaron en geles de agarosa. Las imágenes se realizaron utilizando las longitudes de onda de emisión correspondientes a los dos fluoróforos y, después de la tinción con bromuro de etidio, mediante visualización con UV.

Las imágenes resultantes se muestran en las Figuras 1A y B para ATTO-488 y Cy3, respectivamente. Se puede observar que el aumento del porcentaje de nucleótidos dATP-ATTO-488 dio como resultado oligonucleótidos con mayor fluorescencia. Sin embargo, la cantidad total de producto de RCA disminuyó aproximadamente un 60 % cuando el 5 % de los nucleótidos dATP eran dATP-ATTO-488.

Sorprendentemente y a diferencia del uso de dATP-ATTO-488, el porcentaje de nucleótidos dATP-Cy3 presentes no pareció afectar la eficiencia de la ADN polimerasa phi29; los productos de ADN monocatenario fueron visibles con un 5 % de dATP-Cy3 en la mezcla de RCA (Figura 1 B). Además, la incorporación de los nucleótidos modificados no impidió ni redujo la eficacia de la enzima de restricción BtsCI y, en consecuencia, la liberación de las horquillas diseñadas que comprenden los dominios de escisión.

SEQ ID NO: 1:

```
CCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCAT
TGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTCACCAGCGTTT
CTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACAC
GGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTA
TTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTC
GCGCACATTTCCCCGAAAAGTG
```

Ejemplo 2 - Producción enzimática de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden nucleótidos con grupos alquino internalizados, es decir, grupos alquino en la nucleobase.

Se produjeron enzimáticamente oligonucleótidos monocatenarios de 420 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: 2) que comprenden nucleótidos con grupos alquino usando ADN polimerasa phi29.

Se preparó una plantilla de ADN circular bicatenaria que contenía la SEQ ID NO: 2 y dominios de escisión en horquilla como se describe en Ducani et al., 2013, Nature Methods, 647-652. Se realizaron cortes de las reacciones de RCA de plantilla usando las condiciones descritas en el Ejemplo 1, pero usando cantidades relativas crecientes de 5'-Ethinil-dUTP (5'-EdUTP), es decir, reemplazando dTTP con 5'-EdUTP de modo que la cantidad relativa de 5'-EdUTP fuera 0 % (reacción de control), 25 %, 50 %, 75 % o 100 %. Después de la amplificación, los productos de RCA se digirieron con la enzima de restricción BtsCI y se cargaron en un gel de agarosa como se describe en el Ejemplo 2.

Los resultados de la Figura 2A muestran sorprendentemente que incluso cuando se reemplazó el 100 % de los nucleótidos dTTP con dUTP con grupos químicos funcionales alquino, los rendimientos de RCA cayeron solo entre un 15-20 %. Por lo tanto, la Figura 2A también demuestra que BtsCI escindió exitosa y eficientemente el producto de RCA. La incorporación del nucleótido dUTP con grupos químicos funcionales alquino se confirmó por el hecho de que se observó una menor movilidad del oligonucleótido con grupos químicos funcionales.

Se realizó un experimento adicional reemplazando la ADN polimerasa phi29 con ADN polimerasa Bst. La electroforesis en gel no mostró cambios en el rendimiento de amplificación hasta el 50 % de dUTP con grupos químicos funcionales, con el producto final desplazado respecto al 25 % de dUTP modificado, confirmando la incorporación del nucleótido modificado que tiene mayor peso molecular que su correspondiente nucleótido natural (dTTP) (Figura 2B).

SEQ ID NO: 2:

ATTGAAGCATGCGGCGTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATGCGTAAGATACCACCA
 CACCCGCATTGCGCCATTGAGGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTGCTGTTTC
 CTGTGTAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGTCATATTTGTTCCCTTTAGATCCGCCTCCAT
 CTACAGGGCGCGTCCCCGCGCTTAATGCGCGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGA
 CTTACCTTCGAAAAGAAATTGTTATCCGCTCACAAAAGCCAGAGTATTTAAGCTCCCTC
 GTGCGCTCTCCTGTTCCGGGTTATTGTCTCATCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCTTATCA
 GACCCTGCCGCTTACAAGTGGTCGCCAGTCTATTAACAGCACTCAATACGGGATAATTT
 TTCAATATT

Ejemplo 3 - Reacción de química clic para conjugar azida-fluoróforo con un nucleótido monocatenario que comprende grupos alquino internalizados

5 La incorporación exitosa de los nucleótidos 5-Etínil-dUTP con grupos químicos funcionales en el oligonucleótido producido en el Ejemplo 2 se demostró además realizando una reacción de química clic.

10 El oligonucleótido con grupos químicos funcionales de la reacción con el 75 % del nucleótido dUTP con grupos químicos funcionales alquino se incubó con una Cy3-azida (50 μ M). La solución de química clic también incluía sulfato de cobre (50 μ M) como catalizador, ascorbato de sodio (50 mM) y THPTA (250 μ M). Como control negativo, también se incubó con la Cy3-azida un oligonucleótido producido por el mismo método a partir de la misma plantilla, pero con dNTP convencionales. Además, el oligonucleótido con grupos químicos funcionales que comprende grupos alquino internalizados también se incubó en ausencia de Cy3-azida. Las mezclas de reacción de las tres reacciones se procesaron en un gel de agarosa y se tomaron imágenes (Figura 3). Se observaron oligonucleótidos monocatenarios fluorescentes de la longitud esperada sólo para la reacción que comprende el oligonucleótido con grupos químicos funcionales y el fluoróforo-azida. Además, no se observó degradación visible del ADN debido a la presencia del sulfato de cobre.

20 Ejemplo 4 - Producción enzimática de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden nucleótidos resistentes a endonucleasas

25 El 2'-Flúor-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato (2'F-dUTP) o el 2'-Desoxitimidina-5'-O-(1-Tiotrifosfato) (dTTP con fosforotioato) se han utilizado previamente para modificar oligonucleótidos de ARN y ADN para aplicaciones biomédicas y terapéuticas, por su capacidad de conferir estabilidad a las nucleasas. Estos nucleótidos modificados se incorporaron en oligonucleótidos de ADN monocatenario mediante RCA utilizando los esquemas experimentales descritos anteriormente. Los nucleótidos dTTP convencionales fueron reemplazados por los nucleótidos con grupos químicos funcionales en porcentajes crecientes del 0 al 100 %. Los productos de RCA repetidos en tándem fueron luego digeridos por la enzima de restricción BtsCI en oligonucleótidos con grupos químicos funcionales monocatenarios discretos de 420 bases (SEQ ID NO: 2).

35 En el experimento realizado con los nucleótidos con grupos químicos funcionales 2'F-dUTP, se hicieron visibles rendimientos similares de RCA desde el 0 % hasta el 75 % del nucleótido con grupos químicos funcionales, observándose una caída drástica en el rendimiento con el 100 % del nucleótido con grupos químicos funcionales (Figura 4A).

40 En el experimento de dTTP con fosforotioato, el rendimiento de RCA disminuyó gradualmente a medida que aumentaba la cantidad de nucleótido con grupos químicos funcionales, hasta aproximadamente una caída del 65 % con el 75 % del nucleótido con grupos químicos funcionales, en relación con el rendimiento solo con nucleótidos convencionales (Figura 4B).

45 Sin embargo, la sobreexposición de los geles de agarosa mostró cómo se produjeron oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales incluso con el 100 % de nucleobases con grupos químicos funcionales - véanse los paneles a la derecha de las Figuras 4A y B.

Otros dNTP con fosforotioato (indicados como dNTP Alfa S) se probaron en experimentos adicionales, ya sea agregados uno por uno o en combinación (Figura 4C). Incluso en el último caso, en el que el 75 % de todos los nucleótidos convencionales fueron reemplazados por sus correspondientes nucleótidos con grupos químicos funcionales Alfa S, los productos de RCA se sintetizaron y se escindieron enzimáticamente para producir oligonucleótidos visibles en el gel de agarosa.

Se investigó la resistencia a la endonucleasa de los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales en relación con los oligonucleótidos de control producidos únicamente con nucleótidos convencionales. Se incubó un oligonucleótido de control de 420 nt de longitud producido únicamente con nucleótidos convencionales, los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales 2'-F-dUTP y los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales dTTP con fosforotioato (ambos producidos usando una cantidad relativa del 75 % del nucleótido con grupos químicos funcionales) con concentraciones crecientes de ADNasa I (Figuras 5A-C). El oligonucleótido de control se digirió completamente con 18 mU/mL de ADNasa I, pero tanto los oligonucleótidos de ADN con grupos químicos funcionales con 2'-F-dUTP y dTTP con fosforotioato producidos enzimáticamente todavía eran visibles en geles de agarosa después de la incubación con la misma concentración de endonucleasa.

Ejemplo 5 - Producción enzimática de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden nucleótidos con grupos vinilo

Se produjeron oligonucleótidos de ADN monocatenario enzimáticamente con longitudes de 76-81 bases (SEQ ID NOs: 3 - 13), con grupos químicos funcionales con el análogo de timidina 5-Vinil-2'-desoxiuridina-5'-trifosfato (5-Vinil-dUTP) mediante una reacción de RCA de acuerdo con los esquemas experimentales descritos anteriormente. Todos los oligonucleótidos se codificaron en un único pseudogén (SEQ ID NO: 16). La incorporación de dicho nucleótido con grupos químicos funcionales en oligonucleótidos monocatenarios permite utilizar reacciones de química clic sin cobre para conjugar moléculas similares a tetrazina con el oligonucleótido. Esta reacción de alqueno-tetrazina puede ser completamente ortogonal a la reacción de química clic de alquino-azida realizada anteriormente.

El aumento de la cantidad de nucleótido con grupos químicos funcionales en la mezcla de reacción de RCA, en relación con el nucleótido convencional dTTP, condujo a la incorporación exitosa del 5-Vinil-dUTP en el producto de RCA monocatenario y a la digestión exitosa de las estructuras en horquilla. Sin embargo, los niveles de actividad tanto de la ADN polimerasa phi29 como de la endonucleasa tipo II utilizadas para escindir el producto de RCA fueron más bajos que en ausencia del nucleótido con grupos químicos funcionales, lo que en consecuencia condujo a bandas de mayor peso molecular con estructuras en horquilla no digeridas cuando los nucleótidos con grupos químicos funcionales reemplazaron completamente los nucleótidos dTTP convencionales (Figura 6).

SEQ ID NO	Secuencia
3	GAACCGTCCCAAGCGTTGCGCCACATCTGCTGGAAGGTGGAC AGTGAGAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCT
4	GAACCGTCCCAAGCGTTGCGCCTGGGTACATGGTGGTACCAC CAGACAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCT
5	GAACCGTCCCAAGCGTTGCGGAGAGCATAGCCCTCGTAGATG GGCAAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCT
6	GAACCGTCCCAAGCGTTGCGGTCCCAGTTGGTAACAATGCCA TGTTCAATGAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCT
7	GAACCGTCCCAAGCGTTGCGCGGACTCATCGTACTCCTGCTT GCTGAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCT
8	GAACCGTCCCAAGCGTTGCGTTCTCTTTGATGTCACGCACGAT TTCCCAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCT
9	GAACCGTCCCAAGCGTTGCGCTCGGTCAGGATCTTCATGAGG TAGTCTGTAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCT
10	GAACCGTCCCAAGCGTTGCGTTTCACGGTTGGCCTTAGGGTT CAGGGGAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCT
11	GAACCGTCCCAAGCGTTGCGGTACTTCAGGGTCAGGATACCT CTCTTGAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCT
12	GAACCGTCCCAAGCGTTGCGCTGCTCGAAGTCTAGAGCAACA TAGCACAAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCT
13	GAACCGTCCCAAGCGTTGCGCCTCGTCACCCACATAGGAGTC CTTCAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCT

Ejemplo 6 - Producción enzimática de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden nucleótidos tiolados

- 5 Se produjeron enzimáticamente oligonucleótidos de ADN monocatenario con grupos químicos funcionales con un dTTP tiolado (4-Tiotimidina-5'-Trifosfato) mediante una reacción de RCA usando el esquema de reacción y las plantillas descritas anteriormente (SEQ ID NOs: 3-13). Todos los oligonucleótidos se codificaron en un único pseudogén (SEQ ID NO: 16).
- 10 La incorporación del nucleótido tiolado en el oligonucleótido monocatenario mediante la incorporación de la ADN polimerasa phi29 fue muy exitosa en cantidades del nucleótido con grupos químicos funcionales de hasta el 75 % de reemplazo del correspondiente nucleótido convencional (dTTP) (Figura 7), es decir, una cantidad relativa del 75 % del nucleótido con grupos químicos funcionales.
- 15 Los productos de RCA se digirieron mediante enzimas de restricción de tipo II como se describió anteriormente; sin embargo, una digestión completa de los productos de RCA con grupos químicos funcionales requirió una concentración de enzima 10 veces mayor que la concentración utilizada en los productos de RCA que comprenden sólo nucleótidos convencionales. Cuando el nucleótido dTTP convencional se reemplazó completamente con el nucleótido tiolado con grupos químicos funcionales, no se observaron oligonucleótidos monocatenarios después del

tratamiento con las enzimas de restricción de tipo II, aunque solo se observó una acumulación muy débil de productos de RCA no digeridos en el pocillo, lo que sugiere que la actividad de la polimerasa también se vio afectada.

Ejemplo 7 - Producción enzimática de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden nucleótidos de azida

Se produjeron enzimáticamente oligonucleótidos monocatenarios de 420 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: 2) que comprenden porcentajes crecientes de nucleótidos 2'-Azido-dATP con grupos químicos funcionales (Figura 9A), que reemplazan a los correspondientes nucleótidos dATP convencionales usando ADN polimerasa phi29 (Figura 9B) y ADN polimerasa Bst (Figura 9C).

Los grupos azido de alta densidad en las cadenas de ADN recién sintetizadas permiten la introducción de grupos funcionales después de la síntesis con moléculas de alquino, ya sea mediante una cicloadición de Huisgen catalizada por Cu(I) (química "clic") o mediante una cicloadición [3 + 2] promovida por cepa de azidas y cicloalquinos, por ejemplo, ciclooctino o ciclononino.

En la etapa de amplificación se utilizaron dos polimerasas diferentes con actividad de desplazamiento de cadena: ADN polimerasa phi29 o ADN polimerasa Bst. Ambas polimerasas pudieron incorporar el nucleótido con grupos químicos funcionales en los productos de amplificación, que luego se digirieron y se procesaron en un gel de agarosa.

Los productos de ADN producidos con las ADN polimerasas phi29 fueron visibles en el gel hasta el 75 % de los nucleótidos modificados (Figura 9B), mientras que los productos de las ADN polimerasas Bst fueron visibles hasta el 100 % (Figura 9C), aunque las sales del tampón de amplificación de Bst produjeron un efecto de manchado (incluso en el carril correspondiente al 0 % de 2'-Azido dATP). Los nucleótidos con grupos químicos funcionales se incorporaron con éxito y no afectaron significativamente a la formación de estructuras en horquilla, que permiten la escisión del producto de amplificación.

Ejemplo 8 - Producción enzimática de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden nucleótidos biotinilados

Se utilizaron oligonucleótidos monocatenarios de 420 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: 2) que comprenden porcentajes crecientes (25 %-100 %) de biotina-16-Aminoalil-2'-dUTP con grupos químicos funcionales (Figura 10A), que reemplazan el correspondiente nucleótido convencional dTTP producidos enzimáticamente usando ADN polimerasa phi29 (Figura 10B).

La incorporación de los nucleótidos biotinilados sólo afectó ligeramente a la reacción de amplificación del ADN y, sorprendentemente, a pesar del potencial de impedimento estérico debido al gran tamaño del nucleótido con grupos químicos funcionales, no interfirió con la formación de las estructuras en horquilla, que permiten la escisión de los productos de RCA. La incorporación de múltiples biotinas internas en un polinucleótido con grupos químicos funcionales permite la conjugación con moléculas con grupos químicos funcionales con estreptavidina.

Ejemplo 9 - Producción enzimática de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden pirimidinas modificadas en 5': 5-Bromo-2'-desoxiuridina-5'-Trifosfato y 5-Propinil-2'-desoxicitidina-5'-Trifosfato

Oligonucleótidos monocatenarios de 420 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: 2) que comprenden porcentajes crecientes (25 %-100 %) de pirimidinas modificadas en 5 no naturales: 5-Bromo-2'-desoxiuridina-5'-Trifosfato (Figura 11A) y 5-Propinil-2'-desoxicitidina-5'-Trifosfato (Figura 11 B), que reemplazan los correspondientes nucleótidos convencionales dTTP y dCTP, respectivamente, se produjeron enzimáticamente usando ADN polimerasa phi29 (Figuras 11C y 11 D) y ADN polimerasa Bst (Figuras 11 E y 11 F). Sorprendentemente, ambos nucleótidos con grupos químicos funcionales se incorporaron con éxito en la secuencia de ADN recién sintetizada sin afectar la formación de las estructuras en horquilla en el producto de RCA, permitiendo así que se produjera la reacción de escisión.

Ejemplo 10 - Producción enzimática de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden 2'-O-Metil-ATP

Se produjeron enzimáticamente oligonucleótidos monocatenarios de 420 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: 2) que comprenden porcentajes crecientes (25 %-100 %) de 2'-O-Metil-ATP (Figura 12A), que reemplazan al nucleótido convencional correspondiente dATP, usando ADN polimerasa phi29 (Figura 12B). Incluso con el 100 % del nucleótido con grupos químicos funcionales presente, el producto de la amplificación seguía siendo visible. Este resultado fue contrario a estudios previos que demostraron que ninguna polimerasa natural conocida es capaz de aceptar eficientemente estos sustratos modificados (Romesberg, JACS 2004, 10.1021/ja038525p).

Además, no se observaron bandas de ADN no digerido de mayor peso molecular en el gel, lo que demuestra que la presencia de los nucleótidos con grupos químicos funcionales no afectó la formación de la estructura en horquilla ni su digestión por la enzima de restricción. Este fue un resultado sorprendente en vista de la resistencia a las nucleasas que los grupos O-metilo confieren a las moléculas de ADN.

Ejemplo 11 - Producción enzimática de oligonucleótidos monocatenarios que comprenden LNA-adenosina-5'-trifosfato

Se produjeron enzimáticamente oligonucleótidos monocatenarios de 420 nucleótidos de longitud (SEQ ID NO: 2) que comprenden porcentajes crecientes (25 %-100 %) de LNA-adenosina-5'-trifosfato (Figura 13A), que reemplazan al correspondiente nucleótido convencional dATP, usando ADN polimerasa phi29 (Figura 13B) y ADN polimerasa Bst (Figura 13C).

5 Aunque los monómeros de LNA imitan estructuralmente al ARN, incluso con el 100 % del nucleótido con grupos químicos funcionales, la eficacia de las polimerasas, tanto la ADN polimerasa phi29 como las ADN polimerasas Bst, no se vio afectada significativamente. Además, el nucleótido con grupos químicos funcionales no interfirió con la
10 formación de las estructuras en horquilla que permiten la digestión de los productos de amplificación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales, comprendiendo dicho método:

(a) proporcionar una molécula de ADN circular que comprende una secuencia de oligonucleótidos delimitada por dominios de escisión que contienen una secuencia que es reconocida por una enzima de escisión en la que un dominio de escisión comprende una secuencia capaz de formar una estructura en horquilla, en la que la porción bicatenaria de la estructura en horquilla comprende la secuencia que es reconocida por una enzima de escisión;

(b) realizar una reacción de amplificación de círculo rodante (RCA) con la molécula de ADN circular de (a) como plantilla y uno o más nucleótidos con grupos químicos funcionales (dNTP);

(c) escindir enzimáticamente el producto de la reacción de RCA en los dominios de escisión para liberar los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales; y

(d) aislar o purificar los oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la molécula de ADN circular es bicatenaria y en el que el método comprende una etapa adicional de escindir una cadena sencilla de la molécula de ADN circular para proporcionar una plantilla de RCA, antes de que se realice la reacción de RCA, opcionalmente en el que la etapa de escindir una cadena sencilla de la molécula de ADN circular para proporcionar una plantilla de RCA comprende escindir una cadena sencilla de la molécula de ADN circular con una enzima de escisión, preferiblemente en el que la enzima de escisión es una nickasa, opcionalmente en el que la enzima de escisión es Nb.BsrDI, Nt.BspQI o una combinación de las mismas, más preferiblemente en el que la molécula de ADN circular contiene una secuencia que es reconocida por la enzima de escisión, opcionalmente en el que la secuencia que es reconocida por la enzima de escisión está entre los dominios de escisión que delimitan la secuencia de oligonucleótidos y no está en la secuencia de oligonucleótidos.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que los dNTP con grupos químicos funcionales: (i) se seleccionan del grupo que consiste en: nucleótidos que comprenden un grupo alquino, nucleótidos marcados en forma fluorescente, nucleótidos que comprenden un grupo esteroil, nucleótidos que comprenden un grupo poliéter, nucleótidos que comprenden un complejo metálico, nucleótidos que comprenden un grupo vinilo, nucleótidos que comprenden un grupo tiol, nucleótidos tionados, nucleótidos modificados para tener mayor resistencia a la nucleasa, nucleótidos que comprenden un grupo químico capaz de participar en una reacción de química clic, y nucleótidos que afectan la termoestabilidad del oligonucleótido; y/o (ii) nucleótidos que comprenden un grupo alquino, un grupo alqueno, un grupo azida, un grupo halógeno, un grupo O-metilo, o un azúcar ribosa bloqueado.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los dNTP con grupos químicos funcionales son nucleótidos que comprenden un grupo alquino, un grupo vinilo o un grupo azida.

5. El método de la reivindicación 3 o 4, en el que el método comprende además una etapa de conjugar una molécula o componente con el oligonucleótido mediante el grupo alquino, vinilo o azida, opcionalmente en el que la molécula o componente se selecciona del grupo que consiste en: un fluoróforo, un esteroil, un poliéter, un complejo metálico, una molécula que contiene un grupo tiol, una molécula que contiene un grupo que proporciona mayor resistencia a la nucleasa y una molécula que contiene un grupo capaz de participar en una reacción de química clic.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los dominios de escisión: (i) están directamente adyacentes a la secuencia de oligonucleótido; y/o (ii) que delimita la secuencia de oligonucleótido son los mismos.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la enzima de escisión es una endonucleasa de restricción tipo II, opcionalmente una endonucleasa de restricción tipo IIS, tal como BseGI o BtsCI.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la reacción de RCA usa ADN polimerasa phi29 o ADN polimerasa Bst.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la molécula de ADN circular comprende una pluralidad de secuencias de oligonucleótidos, en el que cada secuencia de oligonucleótido está delimitada por dominios de escisión, opcionalmente en el que las secuencias de oligonucleótidos son diferentes.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la etapa (a) comprende:

(i) clonar en un plásmido de ADN una molécula de ADN lineal que comprende la secuencia de oligonucleótidos delimitada por dominios de escisión;

(ii) amplificar dicho plásmido, que opcionalmente comprende transfectar dicho plásmido de ADN en bacterias y cultivar las bacterias;

(iii) escindir parte del plásmido que contiene la molécula de ADN que comprende la secuencia de oligonucleótidos delimitada por dominios de escisión; y

(iv) circularizar la parte del plásmido obtenido en la etapa (iii),

opcionalmente en el que la molécula de ADN lineal que comprende la secuencia de oligonucleótidos delimitada por dominios de escisión comprende además una región del extremo 5' y una región del extremo 3' comprendiendo cada una un dominio de escisión y en el que la etapa (iii) comprende escindir los dominios de escisión en las regiones del extremo con una enzima de escisión, opcionalmente en el que dicha enzima de escisión es BsmBI o BsaI.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la molécula de ADN circular comprende una secuencia entre los dominios de escisión que delimitan la secuencia de oligonucleótidos, que no es la secuencia de oligonucleótidos, y que funciona como: (a) un sitio de unión al cebador de RCA; y/o (b) un sitio de escisión para una enzima nickasa.

12. Uso de una molécula de ADN circular que comprende una secuencia de oligonucleótidos delimitada por dominios de escisión en la producción de un oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales, en la que los dominios de escisión contienen una secuencia que es reconocida por una enzima de escisión, y en la que el dominio de escisión comprende una secuencia capaz de formar una estructura en horquilla, en la que la porción bicatenaria de la estructura en horquilla comprende la secuencia que es reconocida por una enzima de escisión.

13. El uso de la reivindicación 12, en la que los dominios de escisión son como se definen en la reivindicación 6 o 7 y/o la molécula de ADN es como se define en la reivindicación 9.

14. Un kit para uso en el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende:

(i) una molécula de ADN circular que comprende una secuencia de oligonucleótidos delimitada por dominios de escisión, en donde los dominios de escisión comprenden o consisten en una secuencia capaz de formar una estructura en horquilla y en el que la porción bicatenaria de la estructura en horquilla comprende una secuencia que es reconocida por una enzima de escisión;

(ii) dNTP con grupos químicos funcionales, opcionalmente como se define en la reivindicación 3 o 4; y

(iii) una o más enzimas de escisión que escinden los dominios de escisión de (i),

opcionalmente en el que los dominios de escisión son como se definen en las reivindicaciones 6 o 7 y/o la molécula de ADN es como se define en la reivindicación 9.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6 a 11, que es un método para producir un conjunto de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales para uso en hibridación fluorescente *in situ* de una sola molécula (smFISH), en el que los nucleótidos con grupos químicos funcionales son nucleótidos marcados en forma fluorescente y en el que cada oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales en el conjunto contiene aproximadamente 15-30, preferiblemente aproximadamente 20-25, nucleótidos.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que es un método para producir un conjunto de oligonucleótidos monocatenarios con grupos químicos funcionales para uso en hibridación fluorescente *in situ* de una sola molécula (smFISH), en el que los nucleótidos con grupos químicos funcionales son nucleótidos que comprenden un grupo químico capaz de participar en química clic, y en el que el método comprende además una etapa de conjugar un marcador fluorescente con al menos un nucleótido con grupos químicos funcionales en cada oligonucleótido con grupos químicos funcionales mediante química clic, y en el que cada oligonucleótido monocatenario con grupos químicos funcionales en el conjunto contiene aproximadamente 15-30, preferiblemente aproximadamente 20-25, nucleótidos.

17. El método de la reivindicación 16, en el que: (i) los nucleótidos que comprenden un grupo químico capaz de participar en la química clic son nucleótidos que comprenden un grupo azida, un grupo alquino, un grupo alqueno, un grupo nitrona, un grupo tetrazina o un grupo tetrazol, o una combinación de los mismos; y/o (ii) la etapa de conjugar un marcador fluorescente con al menos un nucleótido con grupos químicos funcionales en cada oligonucleótido con grupos químicos funcionales mediante química clic se lleva a cabo antes o después de que los oligonucleótidos con grupos químicos funcionales se hibriden con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia diana.

Figura 1

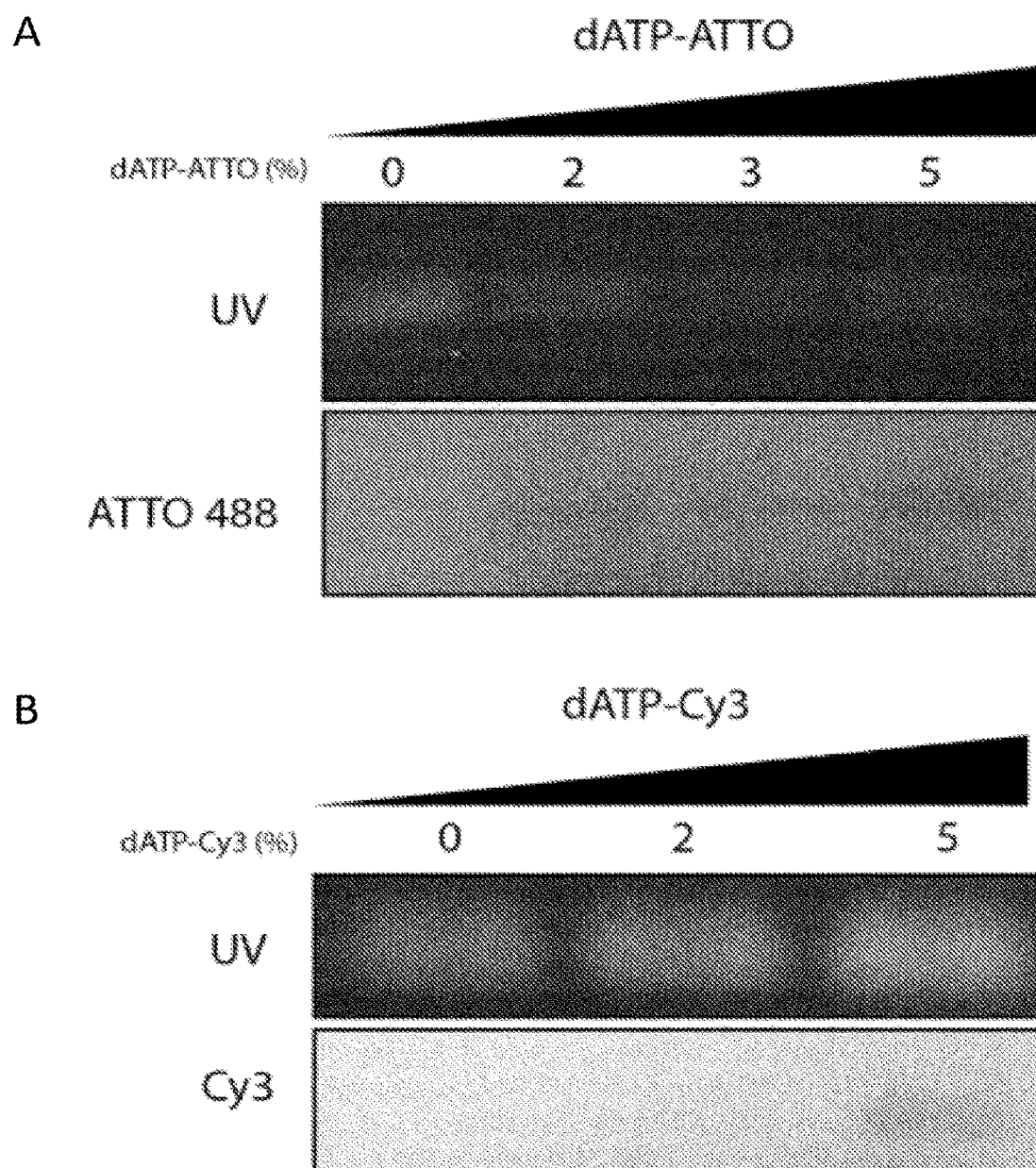


Figura 2

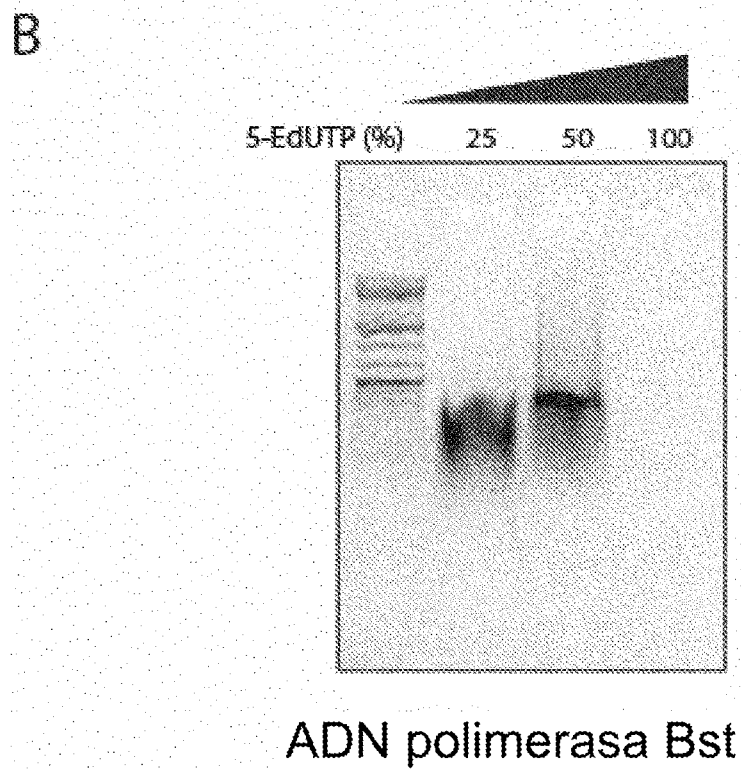
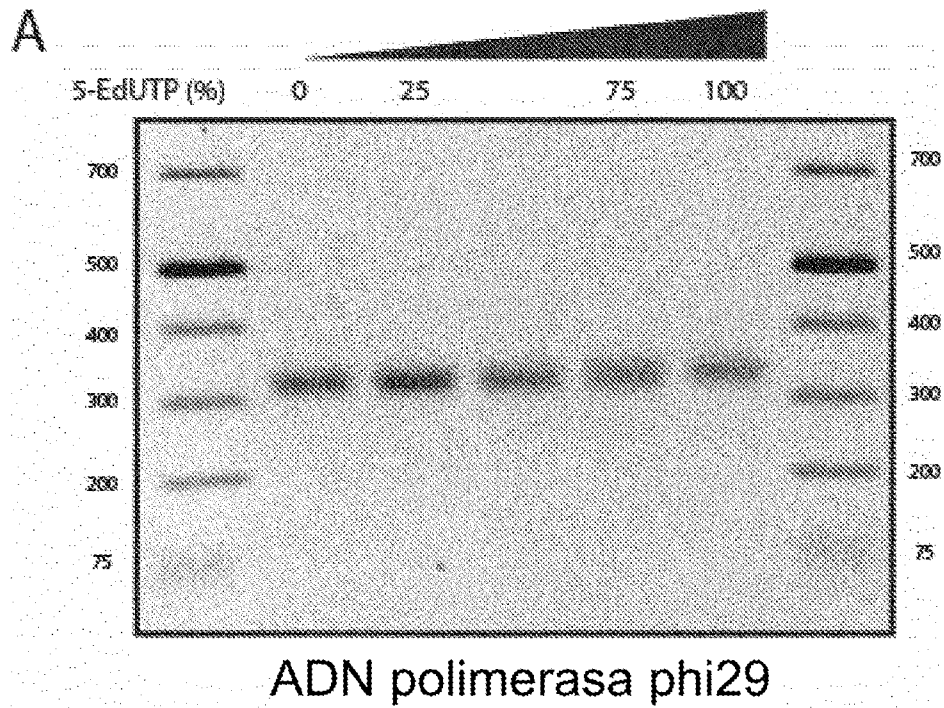


Figura 3

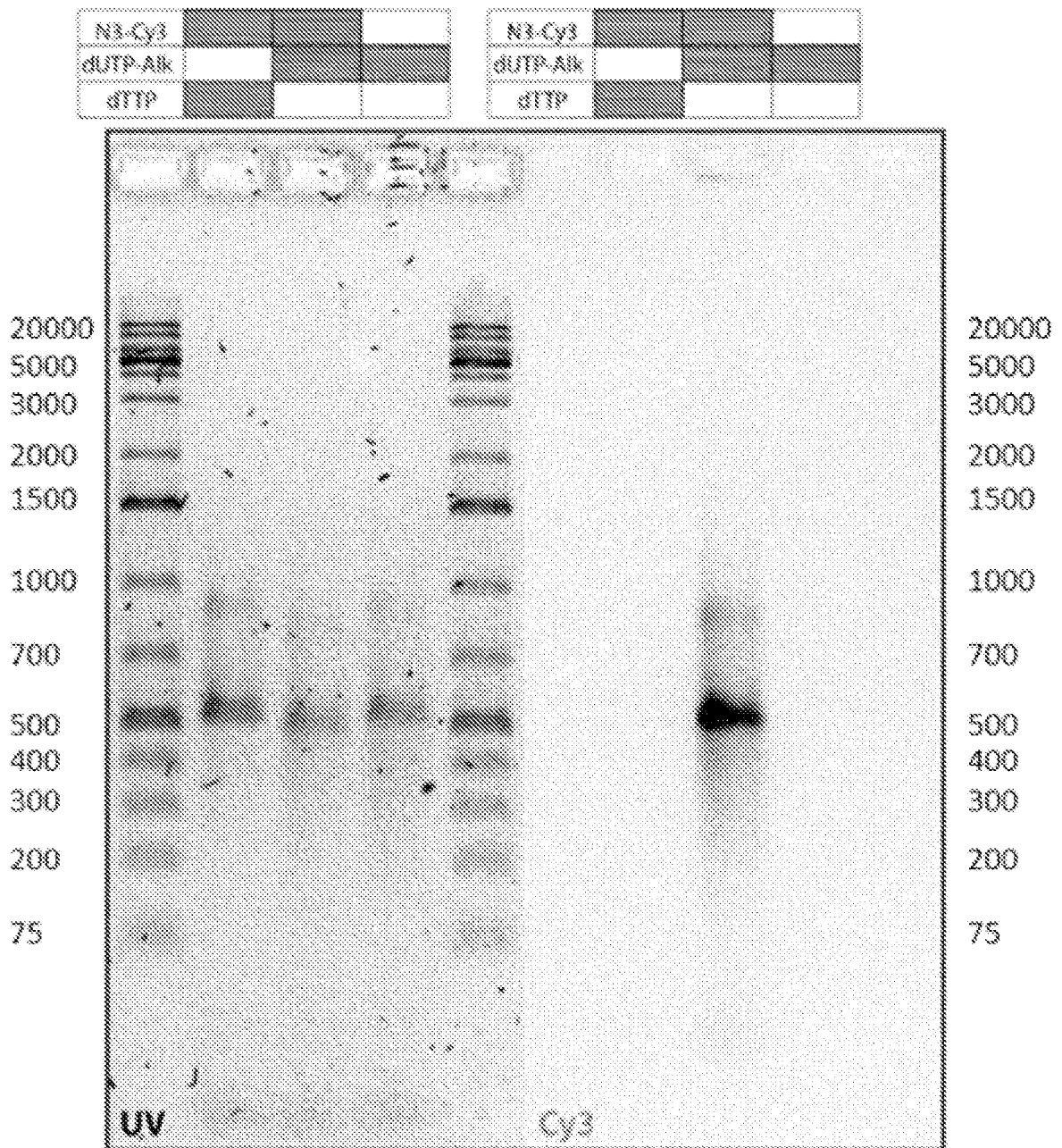


Figura 4

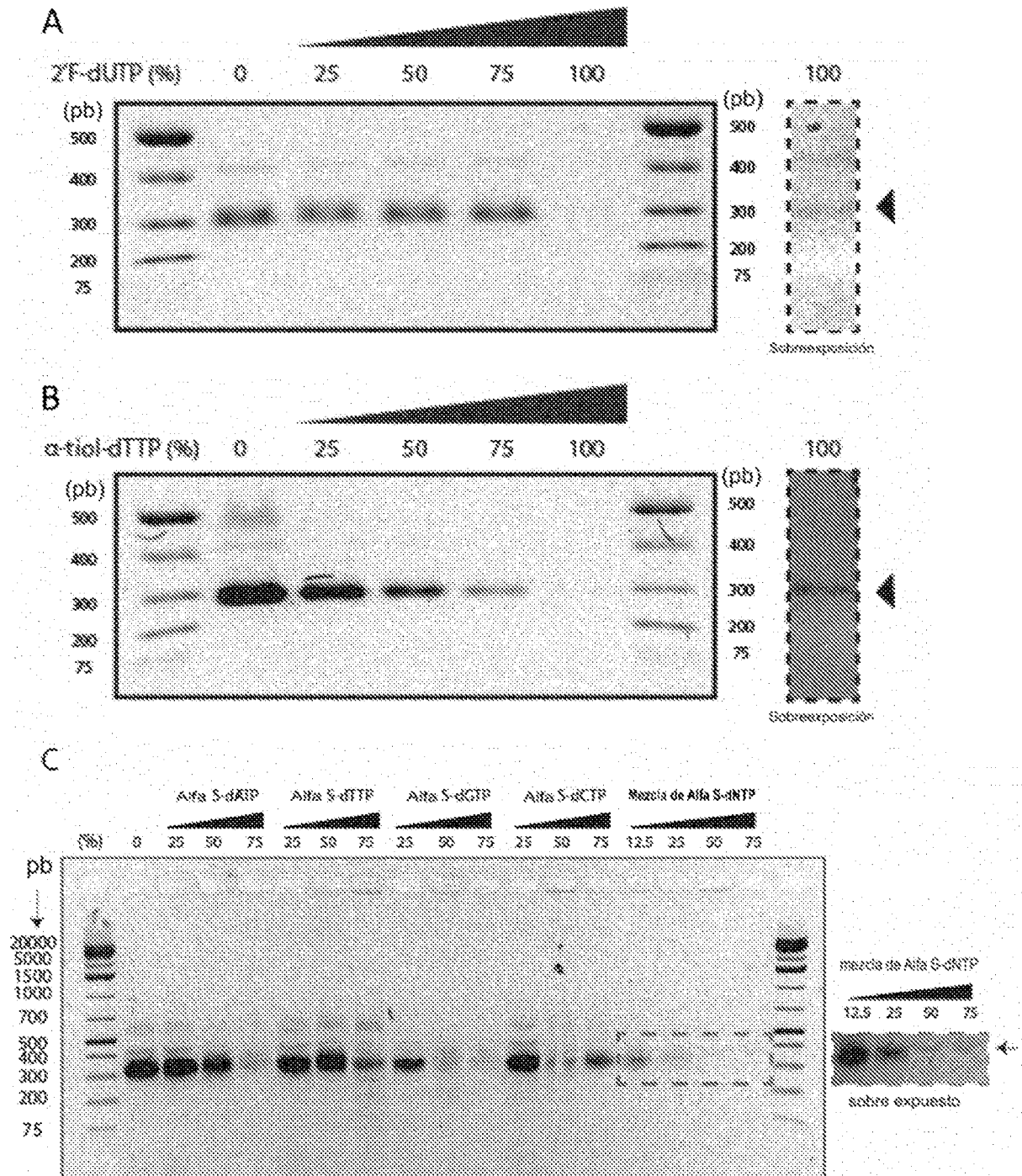


Figura 5

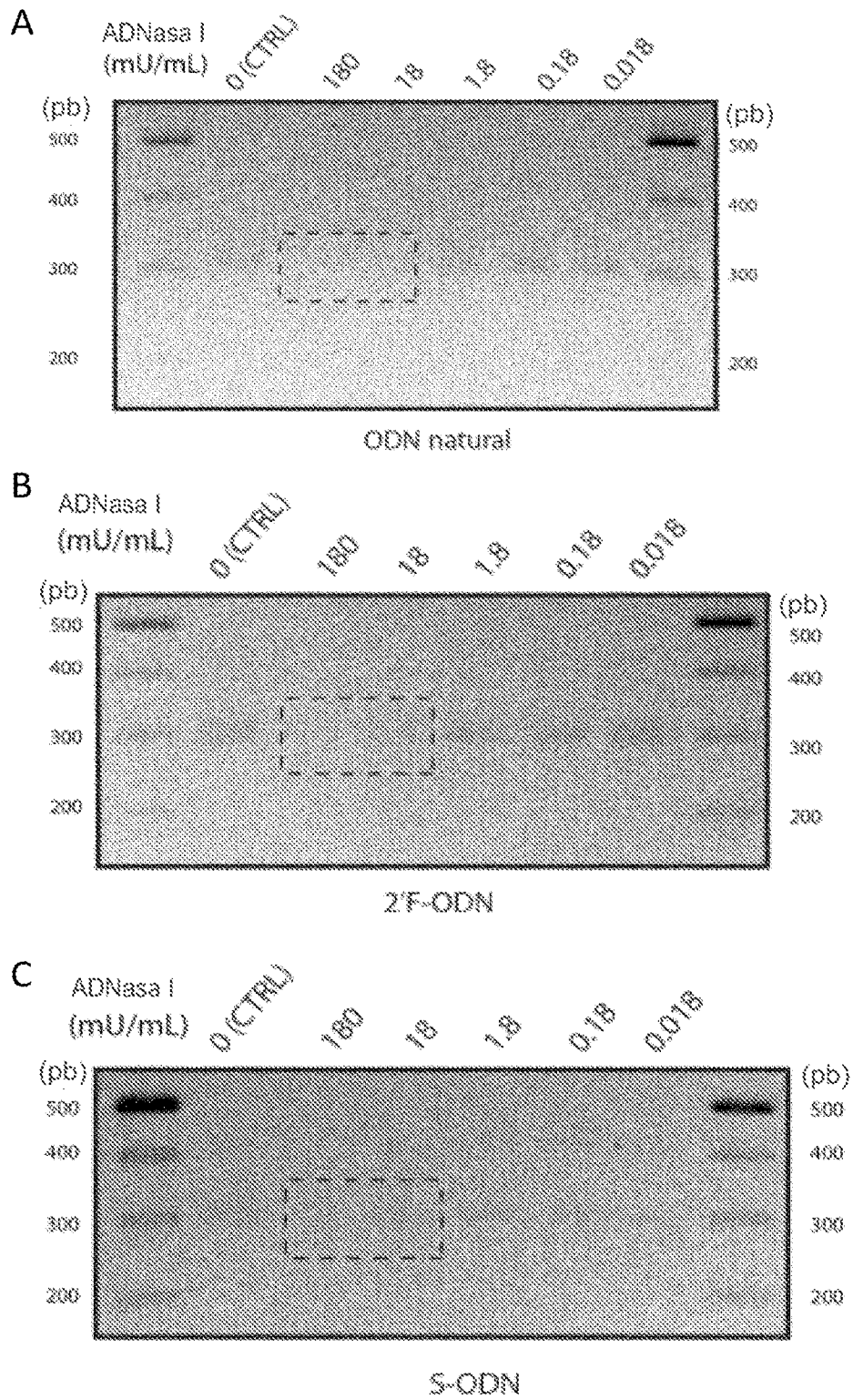


Figura 6

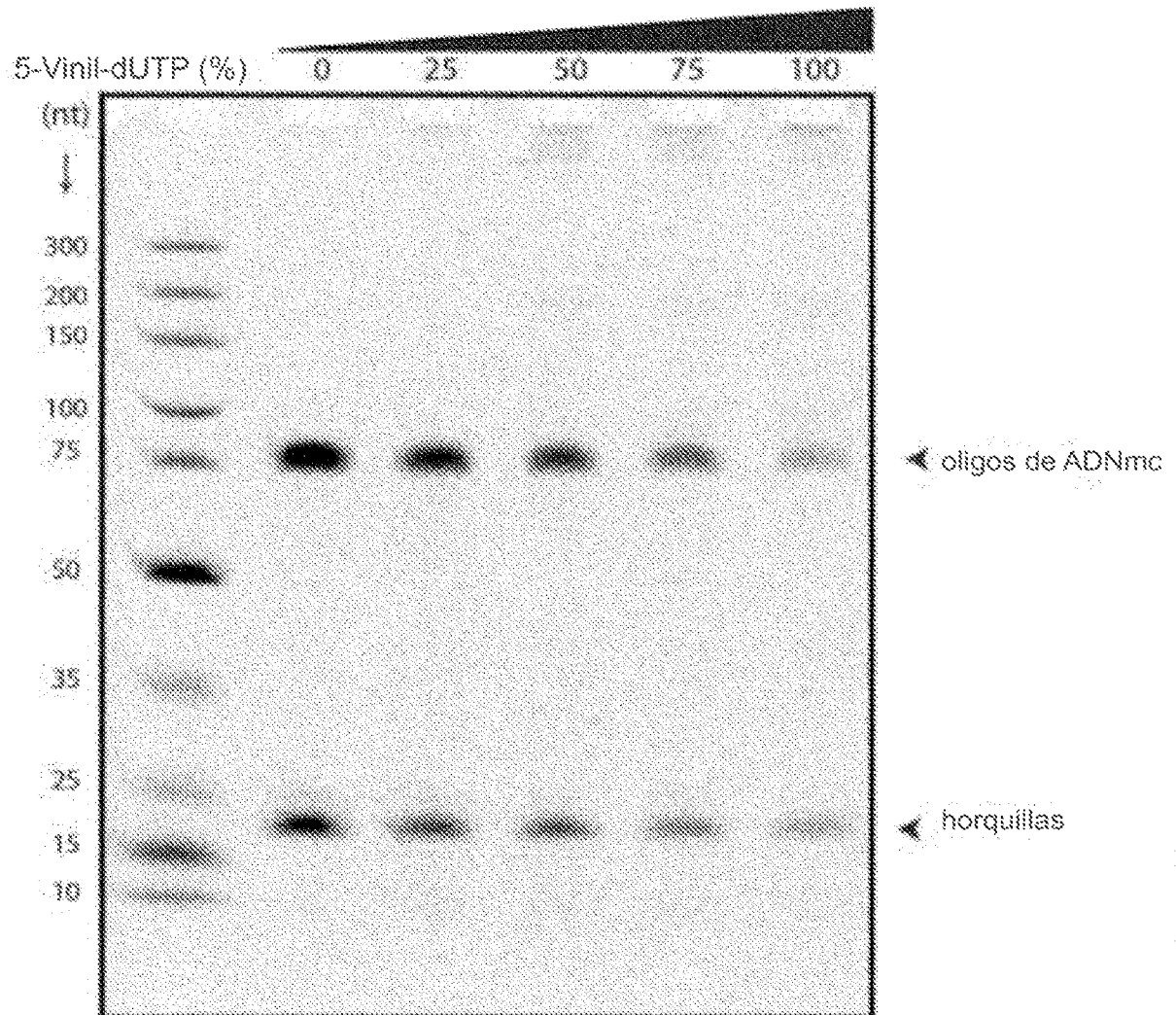


Figura 7

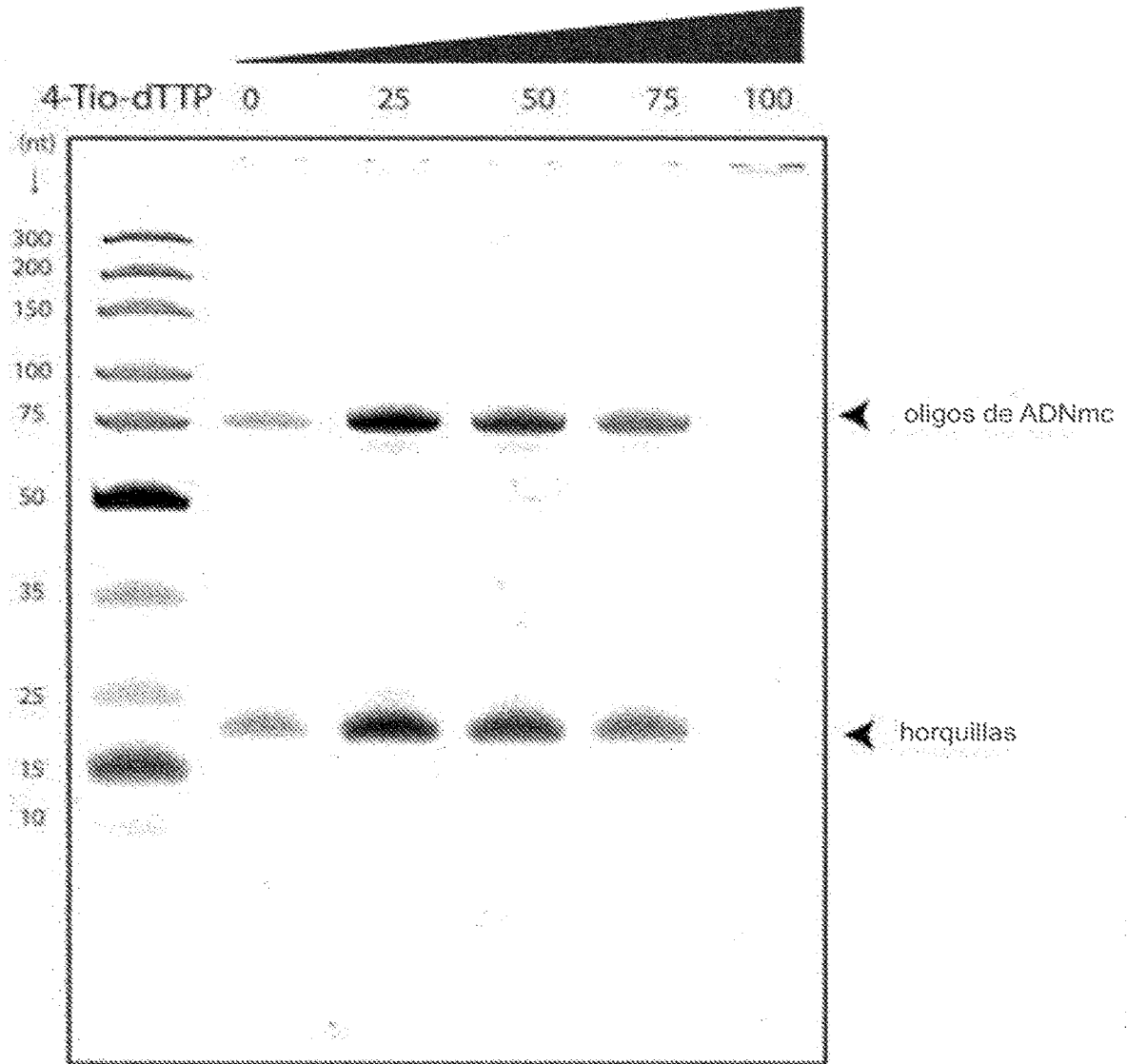


Figura 8

Leyenda:

Negrita (secuencia de la enzima de restricción BsaI)

Recuadro : recuadro de secuencia de enzima de corte Nb.BsrDI

Cursiva: cursiva de secuencia de enzima de corte Nt.BspQI

Gris: estructuras en horquilla

Subrayado: secuencia de oligonucleótido después de escisión con BtsCI/BseGI

SEQ ID NO: 14 – Secuencia de pseudogén para SEQ ID NO: 1

GGTCTCACATTGCATAATTAACATCCGCGGAACGCGGATGTTCCGGCGTCAATACGGG
 ATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGCTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCG
 GGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCG
 TGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAA
 CAGGAAGGCCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACT
 CATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA
 TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGA
 AAAGTGCATCCGCGGAACGCGGATGCAGCTCTTCTGCATTGGAGACC

SEQ ID NO: 15 – Secuencia de pseudogén para SEQ ID NO: 2

GGTCTCACATTGCATAAATTTTCATCCGTTGGGAACCCACGGATGAAATTGAAGCATGCGG
 CGTGCATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATGCGTAAGATACCACCACACCCGATTTCGCC
 ATTACAGGCGGCGCGCCACCGCGGTGGAGCTCCAGCTGCTGTTTCTGTGTAGAGTTGGT
 AGCTCTTGATCCGGTCAATTTGTTCCCTTTAGATCCGCCCTCCATCTACAGGGCGCGCTC
 CCGCGCTTAATGCGCGGCTTAACCTACGGCTACACTAGAAGGACTTACCTTCGGAAAA
 GAAATTGTTATCCGCTCACAAAAGCCAGAGTATTTAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGT
 TCCGGGTTATTGTCTCATCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCTTATCAGACCCCTGCCGCTTA
 CAAGTGGTCCCGAGTCTATTAACAGCACTCAATACGGGATAATTTTCAATATTTCATCCG
 TGGGAACCCACGGATGAATAGCTCTTTCATGCATTGGAGACC

SEQ ID NO: 16 – Secuencia de pseudogén para SEQ ID NOs: 3-13

GGTCTCACATTGCATAATCTTCATCCGTTGGGAACCCACGGATGAAGAACCGTCCCAAGC
 GTTGCGCCACATCTGCTGGAAGGTGGACAGTGAGAGGACACCTACGAATCGCAACGG
 GTATCCTCATCCGTGGGAACCCACGGATGAGGAACCGTCCCAAGCGTTGCGCTGGGTA
 CATGGTGGTACCACACAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCTCATCCGTGG
 GAACCCACGGATGAGGAACCGTCCCAAGCGTTGCGGAGAGCATAGCCCTCGTAGATGG
 GCAAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCTCATCCGTGGGAACCCACGGATGAGGA
 ACCGTCCCAAGCGTTGCGGTCCAGTTGGTAACAATGCCATGTTCAATGAGGACACCT
 ACGAATCGCAACGGGTATCCTCATCCGTGGGAACCCACGGATGAGGAACCGTCCCAAGC
 GTTGCGCGGACTCATCGTACTCCTGCTTGCTGAGGACACCTACGAATCGCAACGGGT
 TCCTCATCCGTGGGAACCCACGGATGAGGAACCGTCCCAAGCGTTGCGTTCTCTTTGAT
 GTCACGCACGATTTCCCAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCTCATCCGTGGGA
 ACCACGGATGAGGAACCGTCCCAAGCGTTGCGCTCGGTGAGGATCTTCATGAGGTAGT
 CTGTAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCTCATCCGTGGGAACCCACGGATGAGG
 AACCGTCCCAAGCGTTGCGTTTACCGTTGGCCTTAGGGTTACGGGGAGGACACCTAC
 GAATCGCAACGGGTATCCTCATCCGTGGGAACCCACGGATGAGGAACCGTCCCAAGCGT
 TGCGGTACTTCAGGGTCAGGATACCTCTCTTGAGGACACCTACGAATCGCAACGGGT
 TCCTCATCCGTGGGAACCCACGGATGAGGAACCGTCCCAAGCGTTGCGCTGCTCGAAGT
 CTAGAGCAACATAGCACAAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCTCATCCGTGGG
 AACCCACGGATGAGGAACCGTCCCAAGCGTTGCGCTCGTCAACCCACATAGGAGTCTTT
 CAGGACACCTACGAATCGCAACGGGTATCCTCATCCGTGGGAACCCACGGATGAGGAG
 CTCTTCATGCATTGGAGACC

Figura 9

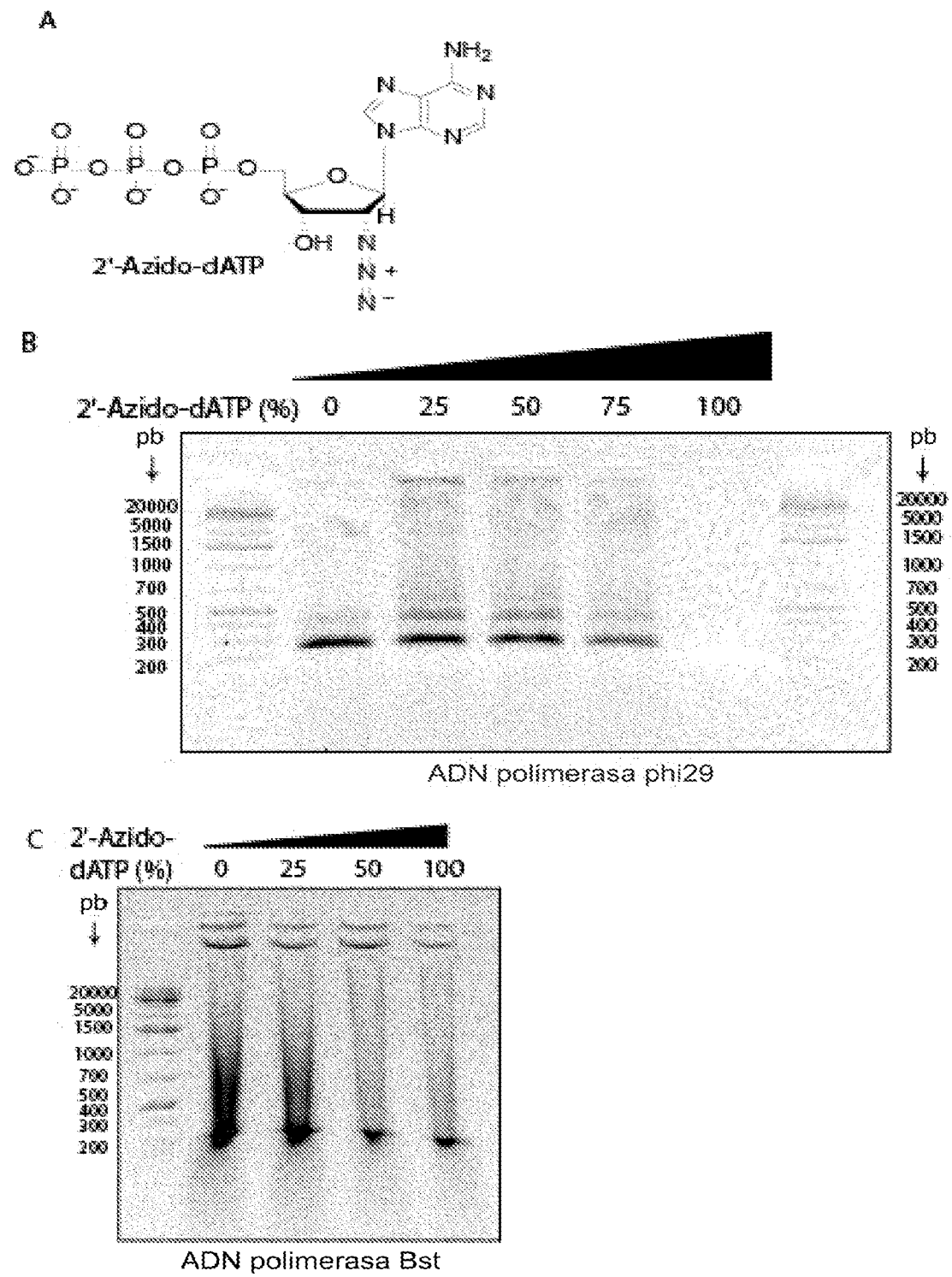
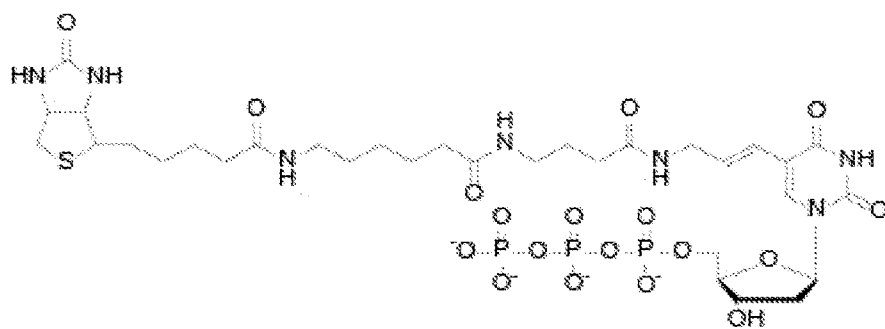


Figura 10

A



Biotina-16-Aminoalil-2'-dUTP (Biotina-16AA-dUTP)

B

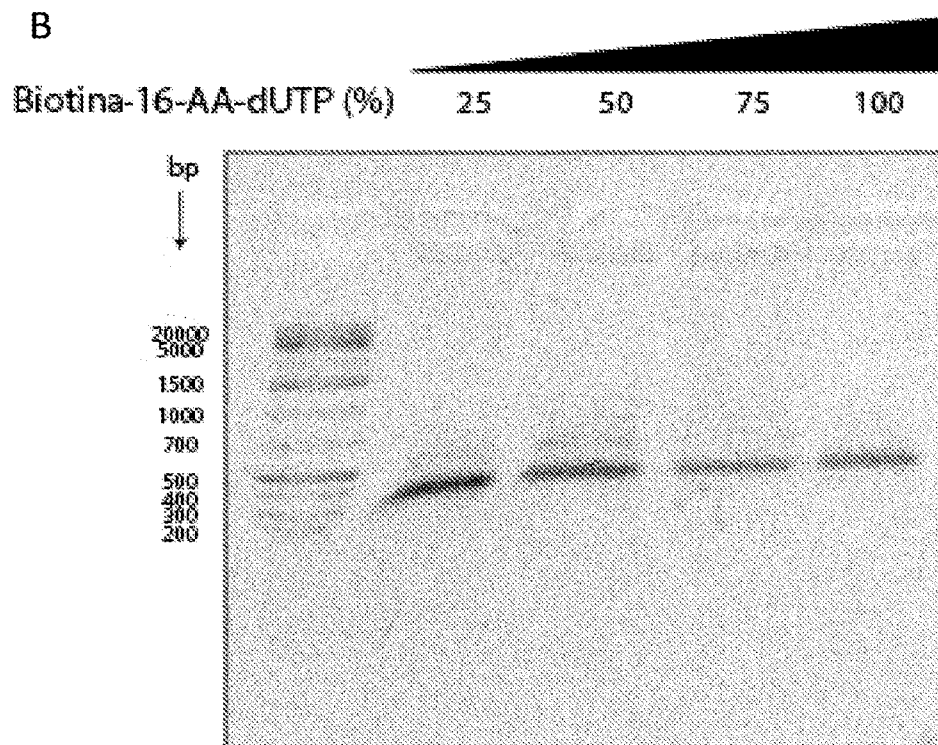


Figura 11

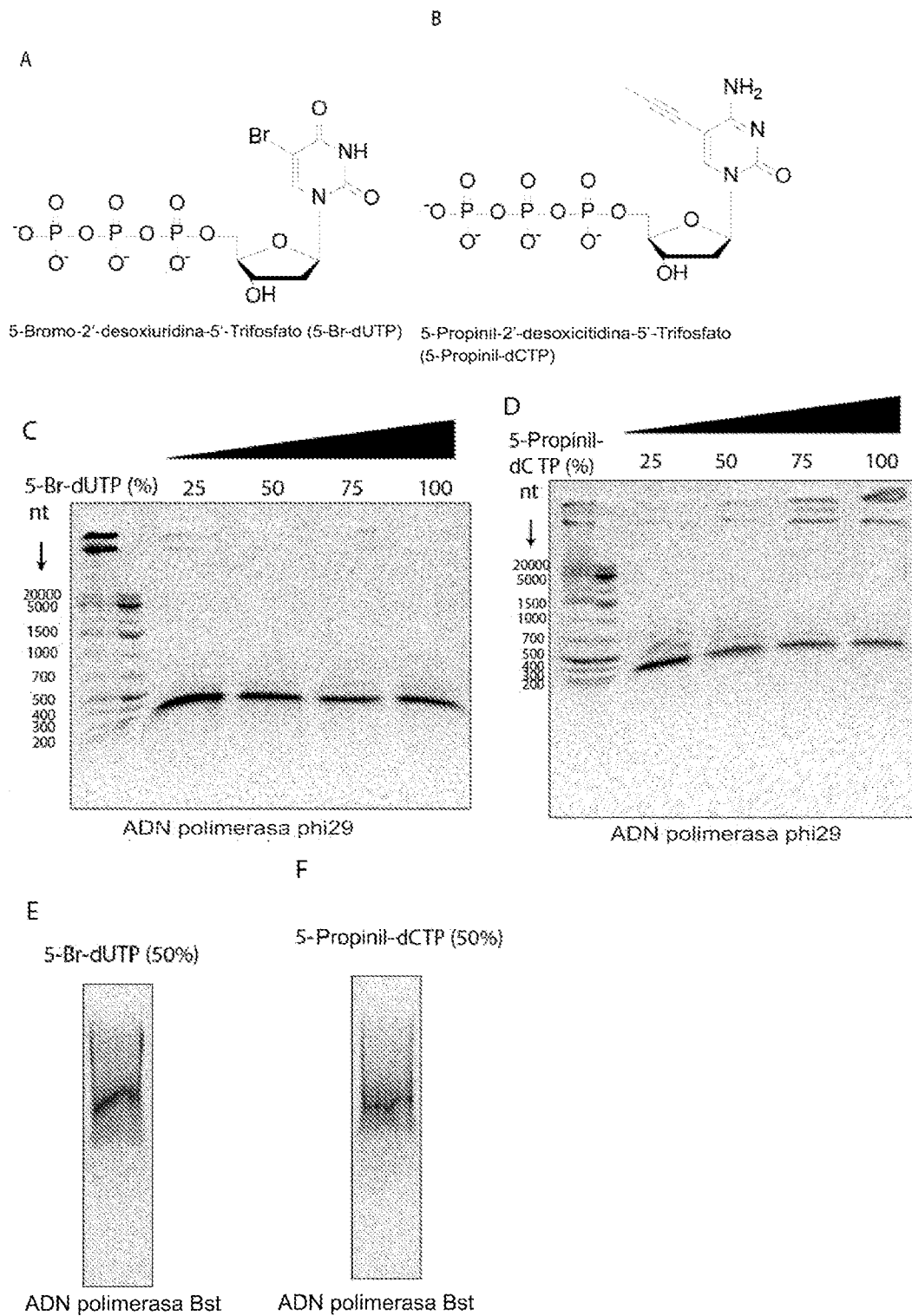
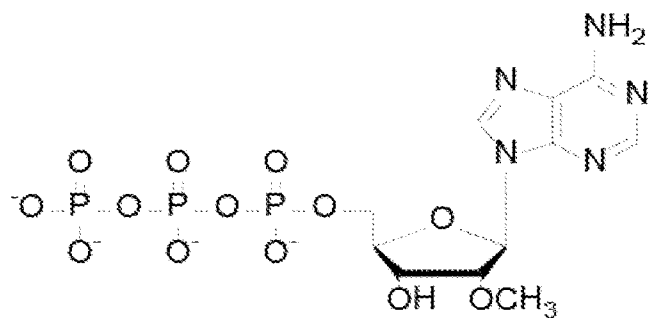


Figura 12

A



2'-O-Metiladenosina-5'-Trifosfato (2' OMe-ATP)

B

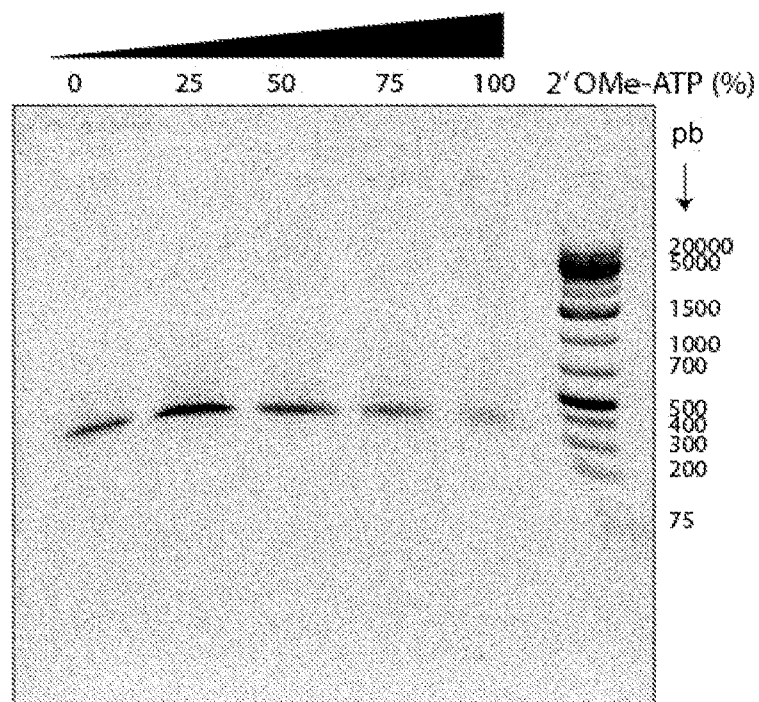
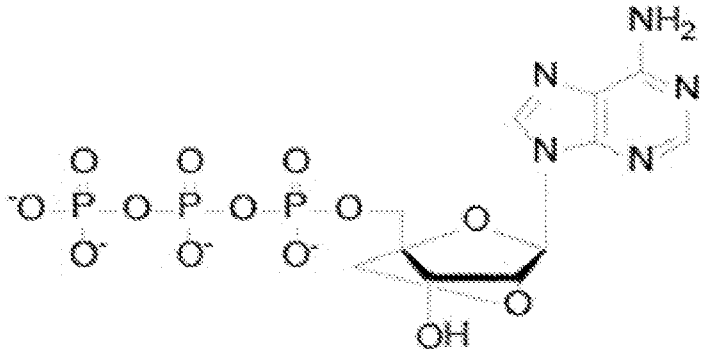


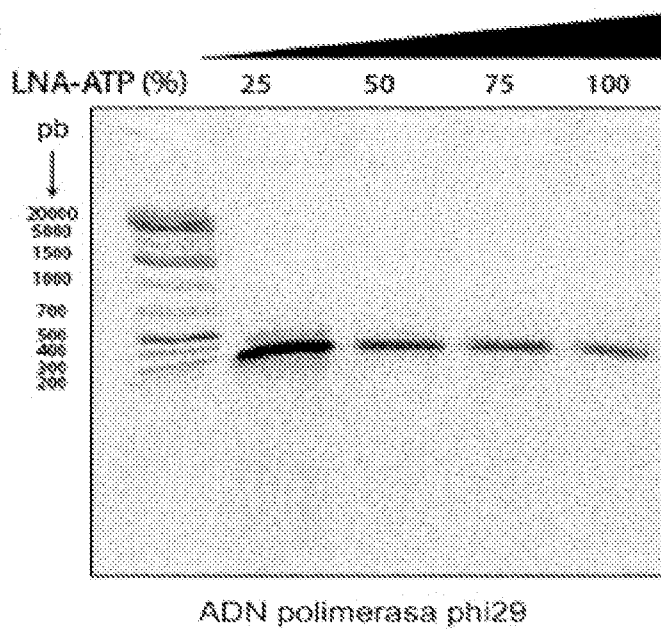
Figura 13

A



LNA-adenosina-5'-trifosfato (LNA-ATP)

B



C

