

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 011 408**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)  
**C12Q 1/00** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12Q 1/6851** (2008.01)  
**C12Q 1/6853** (2008.01)  
**C12Q 1/689** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2013 E 19175608 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024 EP 3587587**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para cuantificar una secuencia de ácido nucleico en una muestra**

30 Prioridad:

**09.04.2012 US 201261621975 P**

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

**07.04.2025**

73 Titular/es:

**ENVIROLOGIX INC. (100.00%)  
500 Riverside Industrial Parkway  
Portland, Maine 04103, US**

72 Inventor/es:

**SHAFFER, DANIEL y  
JUDICE, STEPHEN A.**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

Observaciones:

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

ES 3 011 408 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

Composiciones y procedimientos para cuantificar una secuencia de ácido nucleico en una muestra

**Antecedentes de la invención**

5 Las tecnologías de amplificación de ácido nucleico han proporcionado un medio para comprender procesos biológicos complejos, detección, identificación y cuantificación de organismos patógenos y no patógenos, análisis criminológico forense, estudios de asociación de enfermedades y detección de acontecimientos en organismos genéticamente modificados, etc. La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) es una tecnología común de amplificación de ácido nucleico dependiente de ciclado térmico utilizada para amplificar el ADN, que consiste en ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento de la reacción para la fusión del ADN y la replicación enzimática del ADN mediante el uso de una ADN polimerasa. La PCR cuantitativa en tiempo real (cPCR) es una técnica utilizada para cuantificar el número de copias de una secuencia de ácido nucleico dada en una muestra biológica. En la actualidad, la cPCR utiliza la detección de productos de reacción en tiempo real durante toda la reacción y compara el perfil de amplificación con la amplificación de controles que contienen una cantidad conocida de ácidos nucleicos al comienzo de cada reacción (o una relación relativa conocida entre ácidos nucleicos y el ácido nucleico probado desconocido). Los resultados de los controles se utilizan para construir curvas estándar, típicamente basados en la porción logarítmica de las curvas de amplificación de reacción estándar. Estos valores se utilizan para interpolar la cantidad de incógnitas en función de dónde están sus curvas de amplificación en comparación con las cantidades de control estándar.

Además de la RCP, existen sistemas de amplificación no dependientes de ciclos térmicos o tecnologías de amplificación de ácido nucleico isotérmica, incluyendo, sin limitación: Reacción de amplificación de corte y extensión (RACE), Amplificación de círculo rodante (ACR), Amplificación dependiente de helicasa (HDA), Amplificación mediada por bucle (AMPB), Amplificación por desplazamiento de hebra (ADH), Amplificación mediada por transcripción (AMT), Replicación de secuencia autosostenida (3SR), Amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (ABSAN), Amplificación isotérmica de cebador único (AICU), Sistema de replicasa Q-β y amplificación con polimerasa recombinante (APR). Craw et Balachandran, Lab Chip, 2012, también ofrecen una visión general de las tecnologías de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos.

La amplificación RACE tiene similitudes con el termociclado por RCP. Al igual que la PCR, la amplificación NEAR usa secuencias de oligonucleótidos que son complementarias a secuencias objetivo denominadas cebadores en la PCR y moldes en la NEAR. Además, la amplificación NEAR de las secuencias objetivo produce un aumento logarítmico en la secuencia objetivo, tal como lo hace en la PCR estándar. A diferencia de la PCR estándar, la reacción NEAR progresa isotérmicamente. En la PCR estándar, se incrementa la temperatura para permitir que las dos hebras de ADN se separen. En una reacción NEAR, la secuencia de ácido nucleico objetivo se corta en sitios de corte específicos presentes en una muestra de prueba. La polimerasa se infiltra en el sitio de corte y comienza la síntesis de la hebra complementaria de la secuencia de nucleótidos objetivo cortada (el ADN exógeno añadido) junto con el desplazamiento de la hebra de ADN complementaria existente. El proceso de replicación por desplazamiento de hebra evita la necesidad de aumentar la temperatura. En ese momento, las moléculas de molde/cebador se hibridan con la secuencia complementaria desplazada del ADN exógeno añadido. A continuación, la polimerasa se extiende desde el extremo 3' del molde, creando una hebra complementaria a la hebra previamente desplazada. El segundo oligonucleótido molde/cebador se hibrida con la hebra complementaria recién sintetizada y se extiende formando un dúplex de ADN que incluye la secuencia de reconocimiento de la enzima de corte. Esta hebra es, entonces, sensible al corte con la consiguiente la extensión de desplazamiento de hebra por la polimerasa, lo que conduce a la producción de un dúplex de ADN que tiene sitios de corte en cualquier lado del ADN objetivo original. Una vez que se ha sintetizado, la molécula continúa amplificándose exponencialmente a través de la replicación de las hebras desplazadas con nuevas moléculas de molde. Además, la amplificación también procede linealmente desde cada molécula de producto a través de la acción repetida de la síntesis de traducción de corte en los sitios de corte introducidos en el molde. El resultado es un aumento muy rápido en la amplificación de la señal objetivo, mucho más rápido que el termociclado por PCR, con resultados de amplificación en menos de diez minutos.

La cuantificación ha sido problemática, sin embargo. El rendimiento óptimo de un sistema NEAR en tiempo real depende de la generación y amplificación de un producto específico. Se sabe que los sistemas NEAR generan niveles significativos de productos de fondo no específicos además del producto específico por las enzimas de reacción. Estos productos de fondo pueden servir como entidades amplificables y su generación puede superar a la generación de productos específicos. Si bien es posible diseñar sondas de detección específicas para el objetivo deseado (y, por lo tanto, el producto específico es detectable en un contexto complejo), niveles significativos de productos de fondo no específicos secuestran componentes de reacción que de otro modo podrían haberse utilizado para la amplificación del producto específico. Por tanto, el secuestro de los componentes de la reacción debido a la generación del producto de fondo no específico da como resultado una reacción que es subóptima.

Los documentos EP 1 201 768, EP 1 420 069, US 2009/081670 y WO 2012/021493 proporcionan enfoques para la modificación de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos.

Esto es particularmente problemático cuando el ácido nucleico diana está inicialmente en muy baja abundancia y cuando se requiere una reacción altamente optimizada para la detección fiable del diana. Asimismo, una reacción

subóptima puede no representar la cuantificación verdadera de un ácido nucleico objetivo aunque sea detectable. Sería ventajoso generar reacciones NEAR optimizadas que eliminen la amplificación de productos de fondo no específicos. Hacerlo proporcionaría una reacción adecuada para la cuantificación, ya sea mediante un sistema basado en curvas estándar o una cuantificación relativa.

5 Asimismo, es una práctica común evaluar las reacciones RACE por medio de espectrometría de masas. Los altos niveles de productos de fondo pueden enmascarar la interpretación de los datos de espectrometría de masas. Si, por ejemplo, una reacción contiene productos de fondo, uno o más productos derivados de la amplificación no específica (de objetivos relacionados pero diferentes), y el producto específico, sería difícil identificar estos productos derivados de la matriz a partir de los productos de fondo. La eliminación de productos de fondo conduce a una determinación clara del rendimiento/especificidad del ensayo particular.

10 De manera adicional, los altos niveles de productos de fondo pueden impedir la amplificación óptima de reacciones intencionalmente duplexadas o multiplexadas. Aunque múltiples sondas de detección marcadas de forma diferencial son compatibles con la detección en tiempo real, todavía existe el problema de las limitaciones de los reactivos debido a la formación de productos no específicos. Esto es particularmente cierto para las reacciones dúplex o multiplex, ya que estas reacciones contienen más de dos moldes/cebadores que potencialmente pueden formar poblaciones complejas de productos de fondo. Un sistema de reacción NEAR que elimina la amplificación de los productos de fondo también proporciona condiciones para la detección de reacciones intencionalmente duplexadas o multiplexadas en tiempo real. Sería muy ventajoso proporcionar un medio para eliminar los productos de fondo amplificables, maximizando de este modo el potencial de generación de productos específicos en las reacciones RACE. Sería deseable si se pudiera proporcionar un resultado cuantitativo monitorizando con precisión el progreso de la reacción en tiempo real.

### **Sumario de la invención**

25 Como se describe a continuación, la presente invención aborda procedimientos para la detección de un oligonucleótido diana en una muestra en tiempo real que reduce o elimina la generación de productos de fondo, permitiendo la cuantificación del oligonucleótido diana de la muestra. Estos procedimientos son compatibles con los oligonucleótidos objetivo amplificados usando una reacción NEAR. La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que se pueden generar productos específicos en reacciones NEAR unplexadas sin la generación de productos de fondo. Los procedimientos de reacción proporcionan una cuantificación relativa de muestras de prueba desconocidas, reacciones dúplex y reacciones multiplexadas, y la creación de curvas estándar para la cuantificación absoluta de muestras de prueba desconocidas.

30 En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de amplificación de un polinucleótido, comprendiendo el procedimiento:

35 (a) poner en contacto una molécula de ácido nucleico objetivo en condiciones sustancialmente isotérmicas con una polimerasa deficiente en exonucleasa, dos o más oligonucleótidos cebadores, en el que cada uno de los oligonucleótidos cebadores comprende de 5' a 3':

- i. una secuencia de reconocimiento de enzimas de corte;
- ii. una secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico objetivo; y
- iii. uno o más nucleótidos modificados en 2' en la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana; y

40 una enzima de corte que se une a la secuencia de reconocimiento de la enzima de corte en el ADN bicatenario y corta una hebra del ADN bicatenario; y

(b) generar amplicones que comprenden al menos una porción de dicha molécula de ácido nucleico diana.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de amplificación de un polinucleótido, comprendiendo el procedimiento:

45 (a) poner en contacto una molécula de ácido nucleico diana en condiciones sustancialmente isotérmicas con una polimerasa deficiente en exonucleasa, dos oligonucleótidos cebadores, en el que cada uno de los oligonucleótidos cebadores comprende de 5' a 3':

- i. una secuencia de reconocimiento de enzimas de corte;
- ii. una secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico objetivo; y
- iii. 5 nucleótidos modificados con 2'-O-metilo continuos en la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana; y

50

una enzima de corte que se une a la secuencia de reconocimiento de la enzima de corte en el ADN bicatenario y corta una hebra del ADN bicatenario; y

(b) generar amplicones que comprenden al menos una porción de dicha molécula de ácido nucleico diana.

5 En un aspecto particular, la invención proporciona un procedimiento para amplificar un polinucleótido derivado de un patógeno, comprendiendo el procedimiento:

(a) poner en contacto un polinucleótido derivado de un patógeno en condiciones sustancialmente isotérmicas con una polimerasa deficiente en exonucleasa, dos o más oligonucleótidos cebadores, en el que cada uno de los oligonucleótidos cebadores comprende de 5' a 3':

i. una secuencia de reconocimiento de enzimas de corte;

10 ii. una secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico objetivo; y

iii. uno o más nucleótidos modificados en 2' en la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana; y

una enzima de corte que se une a la secuencia de reconocimiento de la enzima de corte en el ADN bicatenario y corta una hebra del ADN bicatenario; y

15 (b) generar amplicones que comprenden al menos una porción de dicha molécula de ácido nucleico diana.

En varias realizaciones de los aspectos delineados en la presente memoria descriptiva, el oligonucleótido (por ejemplo, oligonucleótido de cebador/plantilla, oligonucleótido aislado) contiene un nucleótido modificado, incluyendo un nucleótido modificado en 2'. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, la modificación en 2' es una o más de un 2'-O-metil, 2'-metoxietoxi, 2'-fluoro, 2'-hidroxilo, 2'-alilo, 2'-O- [2-(metilamino)-2-oxoetil], 4'-tio, 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'-puente, 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'-puente, 2'-LNA, 2'-alquil y 2'-O-(N-metilcarbamato) o los nucleótidos modificados que comprenden un análogo de base. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, uno o más nucleótidos modificados en 2' se posicionan en o adyacentes al extremo 3' de la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo, el extremo 3' del oligonucleótido). En otras realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, uno o más nucleótidos modificados en 2' se colocan en el extremo 5' de la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, uno o más nucleótidos modificados en 2' posicionados en el extremo 5' de la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana están separados del sitio de corte por 1, 2, 3, 4, 5 o más nucleótidos no modificados. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, dos o más nucleótidos modificados en 2' son contiguos (2, 3, 4, 5, o más). En otras realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, dos o más nucleótidos modificados en 2' se alternan con nucleótidos no modificados. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, la secuencia de reconocimiento de la enzima de corte es 5'-GAGTC-3'. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, 5 nucleótidos contiguos modificados con 2'-O-metilo se colocan en o adyacentes al extremo 3' de la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana (por ejemplo, la terminal 3' del oligonucleótido) En otras realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, 5 nucleótidos contiguos modificados con 2'-O-metilo se colocan en el extremo 5' de la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana. En otras realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, 2 o más nucleótidos modificados con 2'-O-metilo alternando con nucleótidos no modificados se colocan en el extremo 5' de la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana (es decir, región específica de la diana).

En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, la etapa de detección no detecta un amplicón de una molécula no diana. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, el procedimiento se lleva a cabo en tiempo real. En ciertas realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, la etapa de generación de amplicones se lleva a cabo en tiempo real (por ejemplo, para determinar la cantidad de diana presente en la reacción).

En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, el procedimiento proporciona un procedimiento semicuantitativo y/o de umbral de cantidad para determinar la cantidad de molécula de ácido nucleico presente en una muestra biológica antes de la amplificación. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, el posicionamiento de uno o más nucleótidos modificados 2' más cerca del extremo 5' de la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana aumenta el tiempo de detección de la amplificación. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, el procedimiento implica además el uso de proporciones de oligonucleótidos cebador/plantilla para proporcionar una mayor resolución de los productos de reacción resultantes de diferentes cantidades de material diana de partida. Fue descubierto que incrementar la proporción del oligo de cebador/plantilla que tiene uno o más nucleótidos modificados en 2' en el extremo 3' de la secuencia de reconocimiento respecto al oligo de cebador/plantilla que tiene uno o más nucleótidos modificados en 2' en el extremo 5' de la secuencia de reconocimiento contrajo la curva de la señal y desplazó la pendiente de la curva.

En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, el procedimiento comprende además el uso de un modificador de la velocidad de amplificación para proporcionar una mayor resolución de los productos de reacción resultantes de cantidades diferentes de material diana de partida. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, la molécula de ácido nucleico diana es una molécula de ácido nucleico ADN o ARN. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, la sonda detectable es SYBR green o una Molecular Beacon. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, la sonda detectable es una sonda de polinucleótido detectable no amplificable que tiene al menos unos 10 nucleótidos que son complementarios a una secuencia diana, una fracción detectable y una molécula de detención de la polimerasa, en la que la molécula de detención de la polimerasa impide que una polimerasa amplifique la sonda en condiciones que de otro modo favorecen la actividad de la polimerasa.

En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, la muestra de ensayo contiene un patógeno. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, el patógeno es un virus, bacteria, levadura u hongo. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, la muestra de prueba es una muestra biológica. En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, la muestra biológica es una célula, una muestra de tejido o un fluido biológico (por ejemplo, orina, semen, secreción vaginal o heces). En varias realizaciones de cualquier aspecto delineado en la presente memoria descriptiva, la muestra de prueba es una muestra ambiental.

La invención proporciona procedimientos para la detección de moléculas de ácido nucleico diana amplificadas mediante el uso de una reacción RACE. Las composiciones y artículos definidos por la invención se aislaron o se fabricaron de otro modo en relación con los ejemplos proporcionados a continuación. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las reivindicaciones.

### **Definiciones**

En esta divulgación, "comprende", "que comprende", "que contiene" y "que tiene" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la legislación de patentes de Estados Unidos y puede significar "incluye", "que incluye", y similares; "que consiste esencialmente en" o "consiste esencialmente en" también tiene el significado atribuido en la legislación de patentes de Estados Unidos y el término es abierto, lo que permite la presencia de más de lo que se cita, siempre que las características básicas o novedosas de lo que se cita no cambien por la presencia de más de lo que se cita, pero excluye realizaciones de la técnica anterior.

Por "molécula que detiene la polimerasa" se entiende un residuo asociado con una plantilla/cebador de polinucleótidos que previene o reduce significativamente la progresión de una polimerasa en la plantilla de polinucleótido. Preferentemente, el resto se incorpora en el polinucleótido. En una realización preferida, el resto evita que la polimerasa progrese sobre el molde.

Por "extensión de polimerasa" se entiende la progresión hacia adelante de una polimerasa desde un grupo 3'-hidroxilo accesible que incorpora monómeros entrantes complementarios a sus nucleótidos opuestos en una hebra de polinucleótidos plantilla.

Por "polimerasa deficiente en exonucleasa" se entiende una ADN polimerasa dependiente de ADN y/o una ADN polimerasa dependiente de ARN que carece de actividad de exonucleasa 5'-3' o que tiene niveles virtualmente indetectables de dicha actividad.

Por "aducto de nucleótidos" se entiende un residuo que está unido covalentemente o fijado de otra manera a una base de nucleótidos estándar.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión "sonda polinucleotídica detectable" se relaciona con cualquier polinucleótido, al menos parcialmente monocatenario, marcado con un residuo detectable con una región de secuencia complementaria al menos a una hebra de la secuencia diana, que libera una señal detectable del residuo detectable al unirse a la secuencia diana, mientras que la generación de señal por ese residuo detectable depende de la escisión de la sonda polinucleotídica detectable por una actividad de exonucleasa 5'-3' no específica. Un ejemplo de una "sonda polinucleotídica detectable" como se usa en el presente documento es, aunque sin limitaciones, una sonda fluorescente de baliza molecular como se ha descrito en la técnica anterior.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión "ácido nucleico" se relaciona con desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, o nucleótidos modificados, y sus polímeros en forma de hebra simple o doble. El término engloba ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos de la cadena principal modificados o enlaces que son sintéticos, de origen natural y no naturales, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, ribonucleótidos modificados en 2' (por ejemplo, ribonucleótidos 2'-O-metilo, nucleótidos 2'-F).

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "nucleótido modificado" se relaciona con un nucleótido que tiene una o más modificaciones al nucleósido, la base nitrogenada, anillo pentosa o grupo fosfato. Por ejemplo, los nucleótidos modificados excluyen los ribonucleótidos que contienen monofosfato de adenosina, monofosfato de

## ES 3 011 408 T3

- 5 guanosina, monofosfato de uridina y monofosfato de citidina, y desoxirribonucleótidos que contienen monofosfato de desoxiadenosina, monofosfato de desoxiguanosina, monofosfato de desoxitimidina y monofosfato de desoxicitidina. Las modificaciones incluyen aquellas que se producen de forma natural como resultado de la modificación por enzimas que modifican nucleótidos, tales como metiltransferasas. Los nucleótidos modificados también incluyen nucleótidos sintéticos o de origen no natural. Las modificaciones sintéticas o no naturales en los nucleótidos incluyen aquellas con modificaciones en 2', por ejemplo, 2'-alquilo, tal como 2'-O-metil y 2'-metoxietoxi, 2'-fluoro, 2'-hidroxilo (ARN), 2'-alilo, 2'-O- [2-(metilamino)-2-oxoetil], 4'-tio, 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'-puente, 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'-puente, 2'-LNA y 2'-O-(N-metilcarbamato) o los que comprenden análogos de bases.
- 10 Por "sustitución de base" se entiende un sustituyente de un polímero de base nitrogenada que no causa una interrupción significativa de la hibridación entre hebras de nucleótidos complementarias.
- Por "producto específico" se entiende un producto polinucleotídico que resulta de la hibridación de oligonucleótidos plantilla a una secuencia diana complementaria y la posterior extensión mediada por polimerasa de la secuencia diana.
- Por "reacción de amplificación de corte y extensión" se entiende ciclos alternos de corte y extensión que conducen a la amplificación de un polinucleótido de interés.
- 15 Por "condición sustancialmente isotérmica" se entiende a una temperatura única o dentro de un intervalo estrecho de temperaturas que no varía significativamente. En una realización, una reacción llevada a cabo bajo condiciones sustancialmente isotérmicas se lleva a cabo a una temperatura que varía en solo aproximadamente 1-5 °C (por ejemplo, variando en 1, 2, 3, 4 o 5 grados). En otra realización, la reacción se lleva a cabo a una temperatura única dentro de los parámetros de funcionamiento del instrumento utilizado.
- 20 Por "enzima de corte" se entiende un polipéptido capaz de reconocer y unirse a una estructura específica en moléculas de ácido nucleico de doble hebra y romper un enlace fosfodiéster entre nucleótidos adyacentes en una sola hebra al unirse a su estructura específica reconocida, creando así un grupo 3'-hidroxilo libre en el nucleótido terminal corriente arriba del sitio de corte que puede extenderse por una polimerasa deficiente en exonucleasa.
- 25 Por "sitio de corte" se entiende la posición de un enlace fosfodiéster "roto" en una hebra de una molécula de ácido nucleico bicatenaria hidrolizada por una enzima de corte.
- Por "amplicón" se entiende un polinucleótido o una multitud de polinucleótidos generados durante la amplificación de un polinucleótido de interés. En un ejemplo, se genera un amplicón durante una reacción en cadena de la polimerasa.
- Por "semicuantitativo" se entiende proporcionar una estimación de la cantidad relativa basada en un control interno.
- 30 Por "procedimiento de umbral de cantidad" se entiende proporcionar una estimación de la cantidad basada en exceder o no exceder en cantidad un patrón comparativo.
- Por "modificadores de la tasa de amplificación" se entiende un agente capaz de afectar a la tasa de extensión de la polimerasa o a la tasa de corte de hebra sencilla por la enzima de corte, o ambas.
- 35 Por "monitorizar una reacción" se entiende detectar el progreso de una reacción. En una realización, la monitorización de la progresión de la reacción implica detectar la extensión de la polimerasa y/o detectar una reacción NEAR completa.
- "Detectar" se relaciona con identificar la presencia, ausencia o cantidad del analito a detectar.
- 40 Por "residuo detectable" se entiende una composición que cuando se une a una molécula de interés hace que esta última sea detectable, por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen isótopos radiactivos, perlas magnéticas, perlas metálicas, partículas coloidales, colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se usa habitualmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos.
- 45 Por "fragmento" se entiende una porción de una molécula de ácido nucleico. Esta porción contiene, preferentemente, al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la longitud total de la molécula o polipéptido de ácido nucleico de referencia. Un fragmento puede contener 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 nucleótidos.
- "Hibridación" significa puentes de hidrógeno, que pueden ser puentes de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o de Hoogsteen invertidos, entre bases nitrogenadas complementarias. Por ejemplo, la adenina y la timina son bases nitrogenadas complementarias que se emparejan mediante la formación de puentes de hidrógeno.
- 50 Por "polinucleótido aislado" se entiende un ácido nucleico (por ejemplo, un ADN) que está libre de los genes que, en el genoma natural del organismo del que deriva la molécula de ácido nucleico de la invención, flanquean el gen. El término, por lo tanto, incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector; en un plásmido o virus que se replica de forma autónoma; o en el ADN genómico de un procarionte o eucariota; o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido por PCR o digestión con endonucleasas de restricción) independiente de otras secuencias. Además, el término incluye una molécula de ARN

que se transcribe a partir de una molécula de ADN, así como un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.

5 Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se relaciona con material que está libre en varios grados de componentes que normalmente lo acompañan como se encuentra en su estado nativo. "Aislado" denota un grado de separación de la fuente original o sus alrededores. "Purificar" denota un grado de separación que es mayor que el aislamiento. Una proteína "purificada" o "biológicamente pura" está suficientemente libre de otros materiales de manera que las impurezas no afectan materialmente a las propiedades biológicas de la proteína ni causan otras consecuencias adversas. Es decir, un ácido nucleico o péptido de la presente invención se purifica si está sustancialmente libre de material celular, material viral o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente utilizando técnicas de química analítica, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. El término "purificado" indica que un ácido nucleico o proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel de electroforesis. Para una proteína que puede estar sujeta a modificaciones, por ejemplo, fosforilación o glicosilación, diferentes modificaciones pueden dar lugar a diferentes proteínas aisladas, que se puede purificar por separado.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, "obtener" como en "obtener un agente" incluye sintetizar, comprar o adquirir de otro modo el agente.

Por "referencia" se entiende una condición estándar o de control. Como resulta evidente para los expertos en la técnica, una referencia apropiada es cuando se cambia un elemento para determinar el efecto del elemento.

20 Por "hibridar" se entiende un par para formar una molécula bicatenaria entre secuencias de polinucleótidos complementarias (por ejemplo, un gen descrito en la presente memoria descriptiva), o porciones de las mismas, en varias condiciones de rigurosidad. (Véanse, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507).

25 Por "individuo" se entiende un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, un mamífero humano o no humano, tal como una especie bovina, equina, canina, ovina o felina.

Por "molécula de ácido nucleico diana" se entiende un polinucleótido que se va a analizar. Tal polinucleótido puede ser una hebra sentido o antisentido de la secuencia objetivo. La expresión "molécula de ácido nucleico objetivo" también se refiere a amplicones de la secuencia objetivo original.

30 Los intervalos proporcionados en la presente memoria descriptiva se entienden como abreviatura de todos los valores dentro del intervalo. Por ejemplo, se entiende que un intervalo de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números o subintervalo del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50.

35 A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entiende que el término "o" es inclusivo. A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, tal como se usa en el presente documento, los términos "un", "uno/a" y "el/la" se entienden en singular o plural.

40 A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, tal como se usa en la presente memoria descriptiva, el término "aproximadamente" se entiende dentro de un intervalo de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente se puede entender como dentro del 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 %, 0,05 % o 0,01 % del valor establecido. A menos que sea claro por el contexto, todos los valores numéricos proporcionados en el presente documento se modifican por el término aproximadamente.

45 La relación de una lista de grupos químicos en cualquier definición de una variable en la presente memoria descriptiva incluye definiciones de esa variable como cualquier grupo único o combinación de grupos indicados. La mención de una realización para una variable o aspecto en el presente documento incluye esa realización como cualquier realización individual o en combinación con cualquier otra realización o partes de la misma.

Cualquier composición o procedimiento proporcionado en la presente memoria descriptiva puede combinarse con una o más de cualquiera de las otras composiciones y procedimientos proporcionados en la presente memoria descriptiva.

### **Breve descripción de los dibujos**

50 La figura 1 representa ejemplos de estructuras de entidades que detienen la polimerasa. Negro = secuencia del estabilizador, Azul = secuencia de reconocimiento de enzimas de corte, Verde = secuencia espaciadora de enzimas de corte, Rojo = Secuencia de reconocimiento específica del objetivo, A = adenina, T = timina, G = guanina, C = citosina, U = uracilo, mX = base de 2'-O-metil ARN. La(s) base(s) subrayada(s) delimitan el segmento de secuencia modificada.

Las Figuras 2A-2C representan la evaluación del intervalo dinámico sintético de longitud frente para *Clavibacter michiganensis sepidonicus* (Cms). Se muestran resultados de ejemplo de la titulación del objetivo sintético de "unidades de longitud" de Cms y la detección mediante una baliza molecular con flúor. El ensayo NEAR para Cms realizado sin ácido nucleico objetivo de entrada se indica como Control No Objetivo (CNO). La Figura 2A es un gráfico que muestra que la señal en los Controles No Objetivo (CNO) se había suprimido en las reacciones que contienen cebador/molde modificado con 2'-O-metilo. La figura 2B es un gráfico que muestra que la curva estándar mostraba un amplio intervalo dinámico utilizando las reacciones del molde 2'-O-metilo. La figura 2C es una comparación de datos de espectros de masas de ejemplo que muestran la eliminación de productos de amplificación no específicos en los Controles No Objetivo (CNO) del sistema de ensayo Cms usando cebadores/moldes modificados con 2'-O-metilo (panel derecho), en comparación con los cebadores/moldes no modificados (panel izquierdo). Para determinar el efecto de los cebadores/moldes modificados con 2'-O-metilo en la generación de productos de fondo, se analizaron muestras (10 µl) de reacciones de Controles No Objetivo representadas en la figura 2A mediante HPLC/espectrometría de masas. Los datos de espectros de masas demuestran claramente en presencia de cebadores/moldes modificados con 2'-O-metilo que se detectó la presencia de solo las especies moleculares esperadas y se eliminaron los productos de fondo complejos generados en presencia de cebadores/moldes no modificados.

La Figura 3 representa la modificación 2'-O-metilo de las moldes/cebadores eliminados de la señal de fondo en el ensayo NEAR usando la detección SYBR Green. Se muestran datos de amplificación de ejemplo mediante el uso de cebadores/moldes modificados con 2'-O-metilo y la eliminación de productos de amplificación no específicos. La Figura 3A es un gráfico que muestra que se observó una señal significativa en los Controles No Objetivo (CNO), indicando la generación de producto de fondo en ausencia de ADN objetivo. La Figura 3B es un gráfico que muestra que en las reacciones que contienen moldes modificados con 2'-O-metilo se suprimió la señal en los Controles No Objetivo (CNO).

La Figura 4 representa la modificación de 2'-O-metilo de las moldes/cebadores eliminados de la señal de fondo en el ensayo NEAR utilizando la detección de baliza molecular. Se muestran datos de amplificación de ejemplo mediante el uso de cebadores/moldes modificados con 2'-O-metilo y la eliminación de productos de amplificación no específicos. La Figura 4A es un gráfico que muestra que se observó una señal significativa en los Controles No Objetivo (CNO), indicando la generación de producto de fondo en ausencia de ADN objetivo. La Figura 4B es un gráfico que muestra que en las reacciones que contienen moldes modificados con 2'-O-metilo se suprimió la señal en los Controles No Objetivo (CNO).

La Figura 5 representa ejemplos de entidades de detención de polimerasa que usan cebadores/moldes modificadas con 2'-O-metilo o se pueden usar relaciones de cebadores/moldes modificadas con 2'-O-metilo para manipular tanto el tiempo de detección como la eficacia de la reacción, así "ajustando" las reacciones. Se muestran representaciones esquemáticas de moldes/cebadores modificados con 2'-O-metilo de ejemplo para el ajuste de una reacción específica, incluyendo un cebador/molde que tiene un bloque de cinco nucleótidos 2'-O-metilo en el extremo 3' (molde "Terminal"; izquierda) y un cebador/molde que tiene un bloque de cinco nucleótidos de 2'-O-metilo que comienzan en el 3<sup>er</sup> nucleótido después del sitio de corte ("molde "corte +2"; derecho). Cada condición de ajuste comprende proporciones específicas de moldes directos e inversos con cada conjunto de moldes que tienen estructuras variables.

La Figura 6 muestra gráficos de amplificación que demuestran la utilidad de la modificación 2'-O-metilo de moldes/cebadores para el "ajuste" de una reacción específica. Se muestran datos de amplificación de ejemplo usando cebadores/moldes modificados con 2'-O-metilo. Todas las reacciones (por duplicado) contenían 10.000 equivalentes genómicos de ADN Cms. Cada condición de ajuste representa proporciones específicas de moldes directos e inversos con cada conjunto de moldes que tienen estructuras variables. Los círculos rojos demuestran un cambio en el tiempo hasta la detección para cada condición de ajuste. De manera adicional, la fase logarítmica de cada condición se contrajo y la pendiente de la curva se desplazó.

La Figura 7 representa el diseño de dos conjuntos de cebadores/moldes (TS3 y TS6) utilizados en un ensayo NEAR para amplificar un fragmento del gen ADH1 de maíz. La región específica objetivo en las secuencias de los conjuntos de cebadores/moldes TS3 y TS6 son significativamente más largas (15-17 bases) que en los conjuntos de cebadores/moldes de ensayos NEAR típicos (9 a 12 bases) en la técnica anterior. En el conjunto de cebador/molde TS3, el bloque de 5 nucleótidos modificados con 2'-O-metilo consecutivos adyacentes al extremo 3' está precedido por una región corriente arriba de nucleótidos modificados con 2'-O-metilo alternando con nucleótidos no modificados que comienzan con un nucleótido modificado con 2' -O-metilo 5 o 4 nucleótidos corriente abajo del sitio de corte, respectivamente. En contraste con TS3, solo hay cinco nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en cada uno de los cebadores/moldes del conjunto TS6, que forman un bloque de nucleótidos consecutivos adyacentes al nucleótido no modificado en el extremo 3'.

La Figura 8 muestra gráficos de amplificación del ensayo ADH1 utilizando dos conjuntos de cebadores/moldes (TS3 y TS6) registrados en el canal de detección de colorante SYBRVerde.

La Figura 9 muestra los gráficos de amplificación de las mismas reacciones de ensayo registradas en el canal ROX.

La Figura 10 representa los gráficos de amplificación de las reacciones de ensayo de ADH1 de CNO registradas. Al comparar los resultados mostrados en las figuras 8 y 9, se hace evidente que solo el conjunto de cebador/molde TS3

produce el amplicón específico de ADH1, mientras que la señal generada por el conjunto TS6 se basa principalmente en la amplificación no específica de productos de fondo detectados solo por SYBRverde.

### **Descripción detallada de la invención**

La invención se define por medio de las reivindicaciones adjuntas.

- 5 La invención presenta procedimientos que son útiles para la cuantificación de una molécula de ácido nucleico diana en una reacción isotérmica. En realizaciones particulares, la invención proporciona procedimientos para la cuantificación de una molécula de ácido nucleico objetivo en una reacción NEAR (por ejemplo, en tiempo real).

10 La invención se basa, al menos en parte, sobre el sorprendente descubrimiento de que los oligonucleótidos de plantilla-cebador que comprenden un nucleótido modificado en 2' (por ejemplo, 2'-O-metilo, 2"-fluoro) reduce o elimina la amplificación ilegítima por derivados deficientes en exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa Bst I.

### **Reacción NEAR.**

15 La reacción RACE se ha utilizado como una reacción de punto final que proporciona la detección no cuantitativa de oligonucleótidos diana. El ensayo NEAR convencional comprende (1) una molécula de ácido nucleico objetivo; (2) dos moléculas de oligonucleótidos que son análogas a las moléculas cebadoras de PCR; denominados "cebadores de molde" que comprenden cierto número de oligonucleótidos que son complementarios a la molécula de ácido nucleico objetivo y un sitio que puede ser escindido por una enzima de corte; (3) dNTP; (4) una hebra que se desplaza, polimerasa deficiente en exonucleasa 5'-3'; y (5) una enzima de corte. Los procedimientos actuales para cuantificar la reacción NEAR, particularmente en tiempo real, son inadecuados debido en parte a la amplificación ilegítima de moléculas no objetivo presentes en una muestra que puede ocultar la detección de secuencias objetivo en una reacción NEAR convencional. Por ejemplo, existe una amplificación indeseable constante en las reacciones NEAR que da como resultado una señal detectable en ausencia de una molécula objetivo o con señales que no reflejan con precisión la cantidad de molécula de ácido nucleico objetivo presente en la reacción. Aunque esto permite la detección de un producto de punto final, no proporciona una monitorización en tiempo real de la reacción.

25 La presente invención describe oligonucleótidos de cebador/plantilla modificados que superan el problema de cuantificar con precisión una molécula de ácido nucleico diana en una reacción RACE. Es particularmente útil para cuantificar una molécula de ácido nucleico objetivo en una reacción NEAR en tiempo real. La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que los oligonucleótidos de cebador-plantilla que comprenden un nucleótido modificado en 2' (por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-fluoro) reducen o eliminan la amplificación ilegítima sin evitar la extensión de dichos cebador-plantillas modificados con el fin de amplificar el producto específico. Los oligonucleótidos de cebador/plantilla de la invención son útiles en las reacciones RACE que comprenden uno o más de los componentes RACE mencionados anteriormente.

35 En otras realizaciones, la invención usa oligonucleótidos de cebador-plantilla que comprenden un 2' modificado (por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-fluoro) que se coloca en o adyacente al extremo 3' del cebador-plantilla. Sorprendentemente, los nucleótidos de 2'-O-metilo ubicados en la región 3'-terminal de un cebador-molde no solo comprenden sustratos de cebado efectivos para derivados deficientes en exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa Bst I en reacciones de amplificación de ADN isotérmicas, pero el uso de tales cebador-moldes modificados suprime completamente la amplificación inespecífica de cebador-dímero. Esto es particularmente sorprendente porque el pensamiento convencional en el campo de la amplificación de ADN isotérmica enseña que los nucleótidos modificados (por ejemplo, ribonucleótidos 2'-O-metilo, ribonucleótidos no modificados) solo se podrían introducir en la región 5'-terminal del cebador/molde lejos del extremo 3', porque se demostró que la colocación de 2'-O-metilo, así como de ribonucleótidos dentro de 6 nucleótidos del extremo 3' de un cebador, inhiben la extensión del cebador por las ADN polimerasas (incluidas como referencias la solicitud de patente de Amersham y la patente de Qiagen). Los derivados de la exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa I Bst utilizados en NEAR y otras tecnologías de amplificación isotérmica (LAMP) pertenecen a las ADN polimerasas bacterianas de tipo polA que participan en los procesos de reparación del ADN de baja fidelidad de síntesis. Por el contrario, la replicación del genoma de alta fidelidad en bacterias es catalizada por las holoenzimas de ADN polimerasa III de tipo DNAE y POLC, que utilizan exclusivamente cebadores de ARN para iniciar la replicación del ADN. En la técnica anterior publicada, se pensaba que la discriminación entre los cebadores de ARN y ADN era un mecanismo para prevenir la interferencia de enzimas de ADN polimerasa I de alta tasa de error con replicación del genoma de alta fidelidad. En este contexto, el sorprendente descubrimiento de que los derivados de la ADN polimerasa Bst I pueden utilizar eficientemente ribonucleótidos modificados en 2' como cebadores para la síntesis de ADN es notable y contraintuitivo.

### **Diseño de cebador-molde**

55 Estructuras ejemplares de entidad detenedora de polimerasa de 5' a 3' comprenden una secuencia estabilizadora, una secuencia de reconocimiento de enzima de corte, una secuencia espaciadora de enzima de corte y una secuencia de reconocimiento específica de diana, comprendiendo la secuencia de reconocimiento específica de diana uno o más nucleótidos 2' modificados (por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-metoxietoxi, 2'-fluoro, 2'-alilo, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo], 2'-hidroxilo (ARN), 4'-tio, 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'-puente, 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'-puente, 2'-LNA, y 2'-O-(N-metilcarbamato)). Sin quedar ligado a teoría alguna, se ha hipotetizado que la incorporación de uno o más nucleótidos modificados en 2' en las

regiones de reconocimiento hace que esas regiones modificadas no sean adecuadas para servir como molde para la extensión de polimerasa en complejos intermoleculares y/o intramoleculares inespecíficos formados por interacciones de cebadores/molde (por ejemplo, formación de cebador-dímero ) y, por lo tanto, reduce o elimina la señal de fondo en la amplificación isotérmica. El nucleótido modificado en 2' tiene, preferentemente, una base que se empareja con la secuencia objetivo. En realizaciones particulares, dos o más nucleótidos modificados en 2' (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más nucleótidos modificados en 2' ) en la región de reconocimiento específica del objetivo son contiguos (por ejemplo, un bloque de nucleótidos modificados). En algunas realizaciones, el bloque de nucleótidos modificados en 2' se coloca en el extremo 3' de la región de reconocimiento específica del objetivo. En otras realizaciones, el bloque de nucleótidos modificados en 2' se coloca en el extremo 5' de la región de reconocimiento específica del diana. Cuando el bloque de nucleótidos modificados en 2' se sitúa en el extremo 5' de la región de reconocimiento específica de la diana, los nucleótidos modificados en 2' pueden estar separados del sitio de corte por uno o más nucleótidos no modificados (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más nucleótidos no modificados en 2'). Los solicitantes han descubierto que el posicionamiento de uno o más nucleótidos modificados en 2' o de un bloque de nucleótidos modificados en 2' altera la cinética de amplificación. Cuando uno o más nucleótidos modificados en 2' o un bloque de nucleótidos modificados en 2' se sitúan en o cerca del extremo 5' de la región de reconocimiento o proximal al sitio de corte, las reacciones de amplificación en tiempo real mostraron una disminución del tiempo de detección. De manera adicional, la curva señal se contrajo y la pendiente de la curva se desplazó. Los solicitantes también han descubierto que en las regiones de reconocimiento que superan los 12 nucleótidos de longitud en un solo bloque de 5 nucleótidos modificados en 2' consecutivos no es suficiente suprimir la amplificación inespecífica y, por lo tanto, toda la región de reconocimiento hasta 4 o 5 nucleótidos corriente abajo del sitio de corte debe estar sustituida por nucleótidos modificados en 2' que se alternan con nucleótidos no modificados.

En una realización relacionada, se pueden usar relaciones de un oligo cebador/plantilla que tiene uno o más nucleótidos modificados en 2' para alterar el tiempo de detección y/o la eficiencia de la reacción para el "ajuste" de las reacciones, lo que da como resultado en un control predecible sobre la cinética de amplificación. El incremento de la proporción del oligo de cebador/molde que tiene uno o más nucleótidos modificados en 2' en el extremo 3' de la secuencia de reconocimiento respecto al oligo de cebador/molde que tiene uno o más nucleótidos modificados en 2' en el extremo 5' de la secuencia de reconocimiento contrajo la curva de la señal y desplazó la pendiente de la curva. Es ventajoso poder "ajustar" una reacción proporcionando un medio para manipular tanto el tiempo de detección como la eficacia de la reacción. La cuantificación relativa utilizando un control interno requiere que se cumplan dos condiciones importantes. En primer lugar, es beneficioso poder modificar el tiempo de detección de una reacción, creando una condición de reacción no competitiva. Por tanto, afectando a la reacción de control para que sea detectable en un momento posterior (en relación con el objetivo de interés), la reacción de control no supera al objetivo de interés específico, incluso cuando el objetivo de interés se encuentra en una abundancia inicial baja. En segundo lugar, para asegurar un verdadero cálculo de abundancia relativa, se requiere que el control y las reacciones específicas del objetivo tengan eficiencias similares. El control de la eficiencia de cada reacción usando una condición de "ajuste" permite la equivalencia de las reacciones, permitiendo cálculos de cuantificación relativa satisfactorios. El ajuste de las reacciones se puede usar para igualar las eficiencias de la amplificación de ácido nucleico objetivo y la amplificación del ácido nucleico de referencia (por ejemplo, patrón interno) en la PCR cuantitativa (cPCR). De manera adicional, las curvas de amplificación del ácido nucleico objetivo y el patrón interno pueden alterarse para que se separe el tiempo de detección de sus productos de amplificación, mientras proporciona la misma eficiencia para la amplificación del ácido nucleico objetivo y la amplificación del patrón interno. Mediante el uso de combinaciones y proporciones específicas de las estructuras de oligonucleótidos dentro de una reacción, es posible crear condiciones que permitan un rendimiento de reacción ajustado.

En varias realizaciones, pares de cebador/plantilla se construyen con una configuración de tallo y bucle. El extremo 5' del oligonucleótido de cebador/molde comprende una región autocomplementaria que forma al menos parte del tallo. En algunas realizaciones de la invención los tallos abarcan además al menos una porción o la totalidad de la secuencia de reconocimiento de enzimas de corte. En otras varias realizaciones de la invención la secuencia de reconocimiento de la enzima de corte en las cebadores-plantillas no es parte de la estructura del tallo bicatenario, pero reside dentro del bucle mayoritariamente monocatenario. Este sitio de reconocimiento de enzimas de corte está unido en el extremo 3' a un sitio libre de estructura secundaria que comprende un sitio de corte que está unido en el extremo 3' a una secuencia que es complementaria a una secuencia objetivo. Si se desea, la secuencia que es complementaria a la secuencia objetivo puede comprender una estructura secundaria o puede estar libre de estructura secundaria. La presencia de ausencia de estructura secundaria, que puede comprender una región autocomplementaria, se determinará para optimizar el ensayo NEAR particular.

En una realización, los procedimientos de la invención proporcionan una reacción RACE que comprende los componentes RACE estándar, pero también comprende una enzima capaz de cortar un nucleótido de ARN cuando está presente en un heterodúplex con una hebra de ADN complementaria. En un ejemplo, el nucleótido de ARN escindido estará presente en una cadena de 4-15 nucleótidos de ARN no escindibles (es decir, O-2-Me-ARN) hacia el extremo 5' de la región complementaria objetivo del PTO y el extremo 3' del oligonucleótido molde tendrá una "tapa" en el extremo 3'-terminal. Solo después de la hibridación adecuada completa del oligonucleótido molde, con la molécula de corte heterodúplex (es decir, ARNasa H) podrá escindir la base de ARN, creando un extremo 3' para que la enzima de traducción de corte se extienda desde; y permitiendo que la reacción NEAR progrese hasta su finalización. La unión aberrante del molde (dímeros de cebadores, hibridación parcial no objetivo, etc.) no conducirá a

la formación del heterodúplex de ARN-ADN; y así evitar la progresión de la reacción NEAR. Estos moldes solo se amplificarán después de unirse a una secuencia de nucleótidos complementaria mediante la eliminación de la "tapa" de la extensión de polimerasa 3'. Esto conducirá a un mayor nivel de especificidad y sensibilidad de la reacción NEAR.

5 Los oligonucleótidos plantilla de la invención pueden estar incluidos en una reacción RACE que comprende (1) una molécula de ácido nucleico diana; (2) dos moléculas de oligonucleótido plantilla que comprenden cierto número de oligonucleótidos que son complementarios a la molécula de ácido nucleico diana y un sitio que puede ser escindido por una enzima de corte y compuesto por 4-15 nucleótidos de ARN, uno de los cuales es responsable de RNasa; (3) dNTP; (4) polimerasa de desplazamiento de hebra; (5) una enzima de corte; y (6) una enzima de corte de ARN de heterodúplex de ADN-ARN y una tapa de extensión de polimerasa terminal 3'. Por consiguiente, la invención  
10 proporciona un procedimiento para usar estos componentes para cuantificar una molécula de ácido nucleico objetivo.

El procedimiento comprende poner en contacto una molécula de ácido nucleico diana en condiciones sustancialmente isotérmicas con una polimerasa, dos oligonucleótidos plantilla, cada uno de los cuales se une específicamente a una secuencia complementaria en la molécula de nucleótido diana, una enzima de corte, y una enzima de corte de heterodúplex de ADN-ARN (por ejemplo, RNasa H) con un capuchón de extensión polimerasa terminal 3'; generando un amplicón detectable que comprende al menos una porción de un oligonucleótido plantilla que se une a una  
15 secuencia diana.

### Moléculas de ácido nucleico objetivo

Los procedimientos de la invención son útiles para la identificación de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra de prueba. Las secuencias objetivo se amplifican a partir de prácticamente cualquier muestra que comprenda una molécula de ácido nucleico objetivo, incluyendo, pero sin limitaciones, muestras que comprenden hongos, esporas, virus o células (por ejemplo, procariotas, eucariotas). En realizaciones específicas, los procedimientos de la invención detectan *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, *Pseudomonas syringae pv Tomato*, *Xanthomonas campestris pv Vesicatoria*, *Alternaria spp*, *Cladosporium spp*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahlia*, *Pseudomonas currugata*, *Erwina carotovora* y *Ralstonia solanacearum*. Las muestras de prueba de ejemplo incluyen  
20 fluidos corporales (por ejemplo, sangre, suero, plasma, líquido amniótico, esputo, orina, líquido cefalorraquídeo, linfa, fluido lagrimal, heces o fluido gástrico), extractos de tejidos, medios de cultivo (por ejemplo, un líquido en el que una célula, tal como una célula patógena, se ha cultivado), muestras ambientales, productos agrícolas u otros productos alimenticios, y sus extractos, marcadores de identificación de ADN. Si se desea, la muestra se purifica antes de su inclusión en una reacción NEAR usando cualquier procedimiento estándar típicamente utilizado para aislar una  
25 molécula de ácido nucleico de una muestra biológica.

En una realización, los oligonucleótidos cebador/plantilla amplifican un ácido nucleico diana de un patógeno para detectar la presencia de un patógeno en una muestra. Los agentes patógenos de ejemplo incluyen hongos, bacterias, virus y levaduras. Dichos patógenos pueden detectarse identificando una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína patogénica, tal como una toxina, en una muestra de prueba. Las toxinas de ejemplo incluyen, pero sin limitaciones, aflatoxina, toxina del cólera, toxina diftérica, toxina de Salmonella, toxina Shiga, toxina de *Clostridium botulinum*, endotoxina y micotoxina. Para aplicaciones ambientales, las muestras de prueba pueden incluir agua, extractos líquidos de filtros de aire, muestras de terreno, materiales de construcción (por ejemplo, cartón yeso, tejas del techo, tablero de pared, telas, papel de pared y revestimientos de suelo), hisopos ambientales, o cualquier otra  
30 muestra.

En una realización desvelada en la presente memoria descriptiva, los oligonucleótidos cebador/plantilla amplifican un ácido nucleico diana de planta utilizado como control interno en experimentos de mejoramiento molecular orientados hacia la mejora de, por ejemplo, la resistencia de la planta a la sequía, la resistencia de la planta a los herbicidas, a la depredación por insectos dañinos. Un ejemplo de tal nucleico objetivo de control interno reducido a la práctica en el presente documento es el gen ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1) del maíz.

45 Las moléculas de ácido nucleico diana incluyen moléculas de ácido nucleico bicatenarias y monocatenarias (por ejemplo, ADN, ARN y otros polímeros de bases nitrogenadas conocidos en la técnica capaces de hibridarse con una molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria descriptiva). Las moléculas de ARN adecuadas para la detección con una sonda oligonucleotídica detectable o un oligonucleótido cebador/molde detectable de la invención incluyen, aunque sin limitaciones, moléculas de ARN bicatenarias y monocatenarias que comprenden una secuencia objetivo (por ejemplo, ARN mensajero, ARN viral, ARN ribosómico, ARN de transferencia, microARN y precursores de microARN, y ARNip u otros ARN descritos en el presente documento o conocidos en la técnica). Las moléculas de ADN adecuadas para la detección con una sonda oligonucleotídica detectable u oligonucleótido cebador/molde de la invención incluyen, aunque sin limitaciones, ADN bicatenario (por ejemplo, ADN genómico, ADN plásmido, ADN mitocondrial, ADN viral y ADN bicatenario sintético). Las moléculas de ácido nucleico objetivo de ADN monocatenario  
50 incluyen, por ejemplo, ADN viral, ADNc y ADN monocatenario sintético u otros tipos de ADN conocidos en la técnica.

En general, una secuencia diana para la detección tiene entre 10 y 100 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 nucleótidos). El contenido de GC de la molécula de ácido nucleico objetivo se selecciona para que sea inferior a aproximadamente 45, 50, 55 o 60 %. De forma deseable, la secuencia objetivo

y las enzimas de corte se seleccionan de manera que la secuencia objetivo no contenga sitios de corte para ninguna enzima de corte que se incluirá en la mezcla de reacción.

**Sondas oligonucleotídicas detectables**

5 La presente invención proporciona la detección cuantitativa de moléculas de ácido nucleico diana o de sus amplicones en una reacción RACE mediante el uso de sondas polinucleotídicas detectables no amplificables que comprenden al menos una molécula de detención de polimerasa (por ejemplo, modificación de nucleótidos u otro residuo que hace que el oligonucleótido sea capaz de unir una molécula de ácido nucleico diana, pero incapaz de soportar la extensión del plantilla mediante el uso de la sonda oligonucleotídica detectable como diana). Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la presencia de uno o más restos que no permite la progresión de la polimerasa probablemente causa la detención de la polimerasa en adiciones de la cadena principal de ácido nucleico al oligonucleótido o mediante el estancamiento de una polimerasa replicativa (es decir, espaciador C3, bases de ADN dañadas, otro resto espaciador, bases O-2-Me). Por tanto, estas construcciones evitan o reducen la amplificación ilegítima de la sonda durante el curso de una reacción NEAR. Esto las distingue de las sondas de detección convencionales, que debe añadirse al final de la reacción NEAR para evitar su amplificación.

15 Las sondas de detección convencionales han resultado poco prácticas para cuantificar una reacción RACE en tiempo real. Si se incorporan sondas de detección convencionales en la reacción NEAR, estas sondas de detección convencionales se amplifican simultáneamente con el objetivo. La amplificación de estas moléculas de detección enmascara la detección de amplicones objetivo legítimos debido al número de moléculas de inicio de la sonda de detección de detección al comienzo de la reacción.

20 La invención utiliza sondas polinucleotídicas detectables no amplificables que comprenden al menos una molécula que detiene la polimerasa. Una detención de molécula polimerasa de la invención incluye, aunque sin limitaciones, una modificación de nucleótidos u otro residuo que bloquea la extensión del cebador-plantilla por medio de las ADN polimerasas replicativas, evitando de este modo la amplificación de las moléculas de detección; pero puede permitir la hibridación adecuada o la separación de nucleótidos a la molécula diana o copias amplificadas de la molécula diana. En una realización, una sonda oligonucleotídica detectable comprende un espaciador de 3 carbonos (espaciador C3) que evita o reduce la amplificación ilegítima de una molécula de detección.

30 En una realización, la sonda de oligonucleótido detectable de la invención es un oligonucleótido en forma de horquilla que comprende una fracción detectable. En otra realización, la sonda polinucleotídica detectable no amplificable es un oligonucleótido en forma de horquilla que comprende un fluoróforo en un extremo y un colorante de extinción en el extremo opuesto. El bucle de la horquilla comprende una secuencia que es complementaria y capaz de hibridarse con una secuencia objetivo. El tallo de la horquilla se forma mediante la hibridación de las secuencias de brazo complementarias ubicadas a ambos lados del bucle. Un fluoróforo y una molécula de inactivación están unidos covalentemente en los extremos opuestos de cada brazo. Cuando la sonda oligonucleotídica detectable está en la configuración de horquilla, las moléculas fluorescentes y de inactivación son proximales entre sí, conduciendo así a la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) y a la inactivación de la fluorescencia del fluoróforo. Cuando la sonda oligonucleotídica detectable encuentra una molécula objetivo, se produce hibridación; la estructura de bucle se convierte en una conformación dúplex con la molécula objetivo, lo que causa la separación de las moléculas de fluoróforo y de inactivación que dan como resultado fluorescencia (Tyagi y col., Nature Biotechnology 14: Marzo de 1996, 303-308).

40 Las sondas oligonucleotídicas detectables son específicas de la secuencia diana. En una realización, una sonda oligonucleotídica detectable comprende una o más bases nucleotídicas modificadas que tienen mayor afinidad de unión a un nucleótido complementario. Ejemplos de bases incluyen, pero no se limitan a ácidos nucleicos bloqueados (ANB), 2' Fluoro amiditos, y 2'OMe RNA amiditos (que también funciona como una molécula de detención de la polimerasa). Las sondas oligonucleotídicas detectables de la invención pueden sintetizarse con fluoróforos de diferentes colores y pueden diseñarse para hibridarse con prácticamente cualquier secuencia diana. En vista de su notable especificidad, una sonda polinucleotídica detectable no amplificable de la invención se usa para detectar una sola molécula de ácido nucleico diana en una muestra, o se usa en combinación con sondas oligonucleotídicas detectables, cada una de las cuales se une a una molécula de ácido nucleico diana diferente. Por consiguiente, las sondas polinucleotídicas detectables no amplificables de la invención pueden usarse para detectar una o más moléculas de ácido nucleico diana en la misma reacción, permitiendo cuantificar estas dianas de forma simultánea. La presente invención describe el uso de tales fluoróforos junto con las sondas oligonucleotídicas detectables descritas en la presente memoria descriptiva.

**Uso de sondas polinucleotídicas detectables no amplificables**

55 Las sondas polinucleotídicas detectables no amplificables son útiles en procedimientos para cuantificar una molécula de ácido nucleico diana en una reacción de amplificación de corte y extensión (RACE). El procedimiento consiste en poner en contacto una molécula de ácido nucleico diana en condiciones sustancialmente isotérmicas con una polimerasa, dos oligonucleótidos cebador/plantilla, cada uno de los cuales se une específicamente a una secuencia complementaria en la molécula de nucleótido diana, una enzima de corte y la sonda oligonucleotídica detectable en presencia de un amortiguador adecuado y dNTPs, generando amplicones que comprenden al menos una porción de

dicha molécula de ácido nucleico diana; y determinar el nivel de molécula de ácido nucleico diana presente en la reacción cuantificando la sonda oligonucleotídica que se hibrida con la molécula de ácido nucleico diana en tiempo real durante la reacción basándose en la intensidad fluorescente de las moléculas de sonda en la reacción. Ventajosamente, tales procedimientos son útiles para supervisar RACE en tiempo real.

- 5 En general, las sondas polinucleotídicas detectables no amplificables de la invención se incluyen en una reacción RACE que comprende (1) una molécula de ácido nucleico diana; (2) dos moléculas de oligonucleótidos plantilla que comprenden cierto número de oligonucleótidos que son complementarios a la molécula de ácido nucleico diana y un sitio que puede ser escindido por una enzima de corte; (3) dNTP; (4) polimerasa de desplazamiento de hebra; y (5) una enzima de corte. Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento para usar estos componentes para  
10 cuantificar una molécula de ácido nucleico objetivo.

### **Ensayos NEAR**

La invención proporciona la detección de moléculas de ácido nucleico diana amplificadas en un ensayo RACE. Dichos procedimientos se conocen en la técnica y se describen en el presente documento. Véanse, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos 2009/0081670, la solicitud PCT 2009/012246 y las patentes de Estados  
15 Unidos Núm. 7.112.423 y 7.282.328. Las polimerasas útiles en los procedimientos descritos en el presente documento son capaces de catalizar la incorporación de nucleótidos para extender un terminal hidroxilo en 3' de un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido cebador/molde u otro cebador) unido a una molécula de ácido nucleico objetivo. Dichas polimerasas incluyen aquellas que son termofílicas y/o que son capaces de desplazamiento de hebra. Las polimerasas útiles en los procedimientos descritos en el presente documento carecen de una actividad de exonucleasa 5'-3', que, de lo contrario, degradarían la hebra de ácido nucleico monocatenario desplazada. La polimerasa también  
20 tiene actividad de transcriptasa inversa (por ejemplo, derivados de la ADN polimerasa Bst (fragmento grande), ADN polimerasa Therminator, ADN polimerasa Therminator II). Las polimerasas de ejemplo incluyen, pero sin limitaciones, los fragmentos grandes Bst de la ADN polimerasa Bst I, ADN polimerasa I de E. coli (fragmento Klenow), fragmento Klenow (3'-5' exo-), ADN polimerasa de T4, ADN polimerasa de T7, Deep Vent<sub>R</sub>. (exo-) ADN polimerasa, ADN polimerasa Deep Vent<sub>R</sub>, Therminator, ADN polimerasa II Therminator, ADN polimerasa AmpliTherm, ADN polimerasa SP6. Los siguientes ejemplos no limitantes de transcriptasas inversas (RT) se pueden usar en las reacciones del presente procedimiento para mejorar el rendimiento al detectar una secuencia de ARN: OmniScript (Qiagen),  
25 SensiScript (Qiagen), MonsterScript (Epicentre), Transcriptor (Roche), RT del VIH (Ambion), SuperScript III (Invitrogen), ThermoScript (Invitrogen), Thermo-X (Invitrogen), ImProm II (Promega).

30 Una enzima de corte se une a una secuencia de reconocimiento en el ADN bicatenario y corta una hebra de una hélice bicatenaria. Las enzimas de corte pueden escindirse corriente arriba o corriente abajo de su sitio de reconocimiento o dentro del sitio de reconocimiento de la enzima. Para los procedimientos desvelados en el presente documento, solo las enzimas de corte que cortan la hebra superior corriente abajo del sitio de reconocimiento se pueden usar para lanzar ciclos repetitivos de corte de ADN de sustrato y de corte y extensión por la polimerasa para impulsar la  
35 amplificación exponencial del fragmento nucleico objetivo entre el cebador-moldes. Idealmente, la enzima de corte es funcional en las mismas condiciones de reacción que la polimerasa. En una realización preferida de la invención, la enzima de corte es termoestable y activa entre 50 °C y 60 °C. Los ejemplos de enzimas de corte útiles para los procedimientos desvelados en el presente documento incluyen, aunque sin limitaciones, Nt.BspQI (NEB), Nt.BspD6I, Nt.BsmAI (NEB), , Nt.AIwI (NEB), Nt.BbvCI (NEB), N.Bst9I (Sibenzima) y Nt.Bst-NBI (NEB).

40 Una reacción RACE típicamente comprende nucleótidos, tales como, por ejemplo, didesoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP). La reacción también se puede llevar a cabo en presencia de dNTP que comprenden un resto detectable que incluye, pero sin limitaciones, un radiomarcador (por ejemplo, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S) una enzima (por ejemplo fosfatasa alcalina), un marcador fluorescente (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC)), biotina, avidina, digoxigenina, antígenos, haptenos o fluorocromos. La reacción NEAR comprende además ciertas sales y tampones que  
45 proporcionan la actividad de la enzima de corte y la polimerasa.

Ventajosamente, la reacción RACE se lleva a cabo bajo condiciones sustancialmente isotérmicas en las que la temperatura de la reacción es más o menos constante durante el curso de la reacción de amplificación. Debido a que la temperatura no necesita un ciclo entre una temperatura superior y una temperatura inferior, la reacción NEAR puede llevarse a cabo en condiciones en las que sería difícil llevar a cabo una PCR convencional. Típicamente, la reacción  
50 se lleva a cabo a aproximadamente entre 35 °C y 90 °C (por ejemplo, 35, 37, 42, 60, 65, 70, 75, 80 u 85 °C). Ventajosamente, no es esencial que la temperatura se mantenga con un alto grado de precisión. Alguna variabilidad en la temperatura es aceptable.

La temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) y los modificadores de la velocidad de reacción también se pueden usar para reducir la temperatura de fusión de los oligonucleótidos, tales como (pero sin limitaciones) etilenglicol y glicerol. Además, los  
55 modificadores de la velocidad de reacción de la ADN polimerasa (tales como la concentración de dNTP y de magnesio) pueden usarse para alterar la velocidad de reacción para conducir a una mayor precisión de la cuantificación.

Esta invención proporciona procedimientos de monitorización de una reacción RACE en tiempo real, mediante el uso de la estrategia de amplificación RACE como se ha descrito anteriormente y en las patentes US007112423B2 y US20090017452A1. En una realización, la RACE cuantitativa utiliza la amplificación de ácidos nucleicos diana junto

con una amplificación de control de cantidad conocida. La cantidad de ácido nucleico objetivo puede calcularse como una cuantificación absoluta o una cuantificación relativa (semicuantitativa) basada en la fuente del control (control exógeno o endógeno).

- 5 La cuantificación de la secuencia de nucleótidos desconocida se puede lograr por medio de la comparación de la amplificación del umbral logarítmico de lo desconocido con una serie de secuencias diana conocidas en un conjunto separado de reacciones o en la misma reacción; o como un producto interno de coamplificación endógena o exógena que produce un valor umbral, indicativo de un resultado positivo (si lo desconocido supera el umbral) o negativo (si lo desconocido no supera el umbral).

### Aplicaciones

- 10 La presente invención proporciona para la monitorización en tiempo real de la reacción RACE de amplificación isotérmica que puede proporcionar una medida cuantitativa de la cantidad del ácido nucleico diana inicial. Los procedimientos de la invención son útiles en el diagnóstico humano, cuando se desea una respuesta cuantitativa rápida (por ejemplo, amplificación detectable en menos de 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5 minutos o menos). En realizaciones particulares, la invención prevé el uso de ensayos de reacción RACE en diagnósticos humanos en entornos clínicos.
- 15 En otras realizaciones, la invención proporciona para el uso de los ensayos de reacción RACE en el trabajo de campo de diagnóstico, en el que el acceso al equipo de termociclado no está disponible o sería prohibitivamente caro. En todavía otras realizaciones, la invención proporciona para el uso de ensayos de reacción RACE en un entorno académico en el que se desean respuestas cuantitativas rápidas.

- 20 La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro del ámbito del experto en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tales como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención, y, como tales, pueden considerarse a la hora de hacer y practicar la invención. En las secciones siguientes se tratarán técnicas particularmente útiles para realizaciones particulares.

- 30 Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar el ensayo, procedimientos de detección y terapéuticos de la invención, y no están destinados a limitar el ámbito de lo que los inventores consideran su invención.

### Ejemplos

- 35 En la actualidad, la reacción RACE se utiliza para detectar de forma rápida e isotérmica la presencia o ausencia de un oligonucleótido diana en una muestra. Debido a limitaciones técnicas, los procedimientos NEAR convencionales no son adecuados para cuantificar oligonucleótidos objetivo en tiempo real debido, al menos en parte, a la amplificación ilegítima de moléculas no objetivo en la muestra, que oscurece la detección y cuantificación precisa de los amplicones objetivo. La presente invención proporciona procedimientos que superan estas limitaciones proporcionando cebadores/plantillas detectables que no son susceptibles de amplificación ilegítima. En una realización, un ensayo NEAR cuantificable emplea un cebador que comprende una o más modificaciones 2'-O-Me que previenen o reducen la amplificación ilegítima de las moléculas no objetivo durante la reacción NEAR. En la actualidad, el diseño de los ensayos de amplificación NEAR se limita a regiones muy cortas dentro del ácido nucleico objetivo que tienen al menos un sitio de reconocimiento de enzimas de corte en las proximidades. La síntesis de desplazamiento de hebra iniciada desde este sitio de corte proporciona moléculas de ADN objetivo monocatenario a las que se pueden unir cebador-moldes con regiones específicas de objetivo cortas e iniciar los ciclos de reacciones de amplificación de la objetivo de corte/extensión con polimerasa. La presente invención proporciona composiciones y procedimientos que superan esta limitación mediante el uso de cebador-plantillas con regiones específicas de diana más largas, que, por lo tanto, son capaces de invadir hebras entre 50 °C y 60 °C durante la primera fase de la reacción de amplificación sin la ayuda de la síntesis de desplazamiento de hebra. Las regiones específicas de objetivo más largas en los cebador-moldes vienen con la desventaja de proporcionar más espacio real para formar híbridos de ADN inespecíficos con extremos 3' extensibles que pueden lanzar la síntesis de productos de amplificación inespecíficos. Las composiciones en la presente invención mitigan esa desventaja al extender la colocación de nucleótidos modificados en 2' más allá de un bloque en el extremo 3' de cinco nucleótidos modificados consecutivos para cubrir toda la región específica diana mediante el uso de una secuencia alternativa de nucleótidos modificados y no modificados en 2'.

- 55 **Ejemplo 1: Oligonucleótidos cebador-molde que comprenden nucleótidos 2'-O-metilo reducen o eliminan la señal de fondo en la amplificación NEAR.**

Cuando se realiza amplificación RACE sin ácido nucleico diana de entrada (es decir, Controles No Objetivo; CNO), se genera señal a pesar de la ausencia del plantilla. Por tanto, la generación de la señal de fondo tiene el potencial de disminuir la precisión de la cuantificación del ácido nucleico objetivo utilizando la amplificación NEAR. Se planteó la

hipótesis de que la señal de fondo se generaba, en parte, mediante la formación de cebador-dímeros mediante oligonucleótidos de cebador/molde. Sin quedar ligado a teoría alguna, las estructuras de detención de polimerasa que comprenden nucleótidos modificados en 2' podrían usarse para reducir o eliminar las interacciones intermoleculares y/o intramoleculares de cebadores/molde (por ejemplo, formación de cebador-dímero), y, por lo tanto, reducir o eliminar la señal de fondo en el ensayo NEAR.

Las estructuras de ejemplo de entidades de detención de la polimerasa de 5' a 3' comprenden una secuencia estabilizadora, secuencia de reconocimiento de enzimas de corte, secuencia espaciadora de enzimas de corte y secuencia de reconocimiento específica de diana, la secuencia de reconocimiento específica del diana que comprende uno o más nucleótidos modificados en 2' (por ejemplo, ribonucleótidos 2'-O-metilo). Cuando dos o más nucleótidos modificados en 2' están presentes en la secuencia de reconocimiento específica del objetivo, los nucleótidos modificados en 2' pueden ser contiguos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más nucleótidos modificados en 2'). La valoración de la molécula de ADN objetivo bicatenario sintético de *Clavibacter michiganensis sepidonicus* (Cms) se evaluó utilizando detección mediante baliza con flúor. El ADN objetivo se diluyó en serie a partir de una solución madre de un ADN sintetizado de 250 pares de bases "unidades de longitud" que se diseñó con la secuencia objetivo y un solo sitio de corte.

La señal en los Controles No Objetivo (CNO) se suprimió en las reacciones que contenían plantillas modificadas con 2'-O-metilo (Figura 2A). La curva estándar mostró un amplio intervalo dinámico utilizando las reacciones del molde 2'-O-metilo (Figura 2B). Se analizaron muestras (10 µl) de las reacciones de Control No Objetivo mediante HPLC/Espectrometría de masas y se confirmó la supresión de los productos de amplificación de fondo (Figura 2C). Los espectros derivados de las reacciones usando oligos no modificados mostraron un espectro complejo compuesto de múltiples productos de amplificación derivados de productos de fondo no específicos junto con moldes sin reaccionar (Figura 2C, panel izquierdo). Los espectros derivados de las reacciones que usan oligos modificados con 2'-O-metilo mostraron un espectro simple compuesto de moldes sin reaccionar sin la presencia de productos de fondo no específicos (Figura 2C, panel derecho).

Para estudiar el efecto de las reacciones que contienen plantillas modificadas con 2'-O-metilo en la amplificación de una muestra biológica, se usó *Clavibacter michiganensis sepidonicus* (Cms) genómico como ADN diana. Los productos amplificados fueron detectados por SYBR green, que detecta ADN bicatenario (Figuras 3A y 3B) o balizas moleculares, que detectaron un producto específico (Figuras 4A y 4B). Las reacciones estándar se llevaron a cabo con moldes de oligonucleótidos de ADN (Figuras 3A y 4A) y las reacciones que contenían moldes modificados con 2'-O-metilo (ADNble) se llevaron a cabo con oligonucleótidos que contenían un bloque de 5 nucleótidos contiguos de 2'-O-metilo en el extremo 3' en la secuencia de reconocimiento específica del objetivo (Figuras 3B y 4B). La señal en los Controles No Objetivo (CNO) se suprimió en las reacciones que contenían moldes modificados con 2'-O-metilo (Figuras 3B y 4B), mientras que se observa una señal significativa en los Controles No Objetivo (CNO) (figuras 4A y 4B), lo que indica la generación del producto de fondo en ausencia de ADN objetivo.

Por tanto, estos resultados indican que los cebadores que comprenden nucleótidos con 2'-O-metilo reducen o eliminan la señal de fondo en la amplificación RACE.

### **Ejemplo 2: El posicionamiento de los nucleótidos de 2'-O-metilo en oligonucleótidos cebador/molde alteró el tiempo de detección y la eficiencia de las reacciones NEAR.**

Se usaron entidades de detención de polimerasa de ejemplo que tienen nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en diferentes posiciones dentro de la región de especificidad en reacciones de amplificación RACE y se estudió su cinética de reacción. En particular, los cebadores/molde estudiados incluyeron un par de oligonucleótidos que tienen un bloque de cinco nucleótidos con 2'-O-metilo colocados en el extremo 3' de la región de especificidad o en el extremo 5' de la región de especificidad (2 nucleótidos corriente abajo del sitio de corte) (Figura 5). Las reacciones estándar se llevaron a cabo por duplicado con un bloque de nucleótidos con 2'-O-metilo en el extremo 3' o comenzando en el 3<sup>er</sup> nucleótido después del sitio de corte y continuando por 5 bases o una mezcla de estas dos estructuras como se indica. El ADN objetivo fue *Clavibacter michiganensis sepidonicus* genómico (Cms). La detección se basó en baliza molecular a una concentración final de 100 nM.

Las entidades modificadoras de la velocidad de reacción que tienen nucleótidos modificados con 2'-O-metilo en diferentes posiciones dentro de la región de especificidad del oligonucleótido cebador/plantilla mostraron una cinética de amplificación diferente (Figura 6). Las reacciones usando cebadores/molde que tienen un bloque de cinco nucleótidos de 2'-O-metilo en el extremo 3' mostraron una disminución del tiempo de detección (molde "Terminal"; 170 segundos) en comparación con los cebadores/molde que tienen un bloque de cinco nucleótidos con 2'-O-metilo que comienzan en el 3<sup>er</sup> nucleótido después del sitio de corte ("molde "Corte +2" "; 430 segundos). Por tanto, se planteó la hipótesis de que las proporciones de los dos oligos cebador/molde se pueden utilizar para manipular el tiempo de detección y/o la eficiencia de la reacción para el "ajuste" de las reacciones. Las reacciones con diferentes proporciones del molde "Terminal": "molde "Corte +2" mostraron un tiempo de detección intermedio entre los dos moldes (Figura 6). De manera adicional, con la proporción creciente de molde "Terminal": molde "Corte +2", la curva se contrajo y la pendiente de la curva se desplazó. Por tanto, se demostró que la colocación de nucleótidos modificados en 2' en oligonucleótidos cebador/molde y las proporciones de oligonucleótidos cebador/molde con nucleótidos modificados en

2' colocados diferencialmente alteraron el tiempo de detección y la eficiencia de las reacciones NEAR. La invención se basa al menos en parte en estos descubrimientos.

**Ejemplo 3: Supresión completa de la amplificación inespecífica en ensayos NEAR utilizando cebadores-moldes con regiones específicas de objetivo largas**

5 Se diseñó un ensayo RACE para la cuantificación del gen de la deshidrogenasa 1 de alcohol de maíz (ADH1) mediante el uso de dos conjuntos alternativos de cebadores directo e inverso-plantillas (TS3 y TS3). No se pudo ubicar un sitio de reconocimiento de enzimas de corte adecuado dentro de 500 nucleótidos corriente arriba o corriente abajo de la región de secuencia objetivo en el ADN<sub>g</sub> de maíz. Ambos conjuntos de cebadores-moldes presentan regiones complementarias objetivo más largas (16 y 19 nucleótidos, respectivamente) capaces de hibridación mediada por  
10 invasión de hebra con el ADN objetivo. En el primer conjunto (TS3), las regiones complementarias objetivo de los cebadores directo e inverso-moldes contienen un bloque de 5 ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo consecutivos inmediatamente corriente arriba del desoxinucleótido 3'-terminal. El resto de la región complementaria de la secuencia objetivo comprende una secuencia de desoxinucleótidos alternos no modificados y ribonucleótidos 2'-  
15 O-metilo que comienzan cinco nucleótidos (cebador directo-molde) o cuatro nucleótidos (cebador inverso-molde) corriente abajo del sitio de corte. El segundo conjunto (TS6) de cebador-moldes presenta solo un bloque de cinco ribonucleótidos de 2'-O-metilo adyacentes al desoxinucleótido no modificado en el extremo 3', mientras que el resto de la región complementaria objetivo comprende solo dextrinucleótidos no modificados.

Se configuraron reacciones RACE de diez microlitros en Tris 50 mM a pH 8,0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15 mM, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15 mM y MgSO<sub>4</sub> 15 mM mediante el uso de ADN polimerasa 1 de Bst 3,84 U Warmstart 2.0 (NEB), copias 10K de ADN diana  
20 ADH1 de maíz sintético, dNTP 0,3 mM, 3 U de enzima de corte Nt.BstNBI, sonda de baliza molecular ADH1 marcada con ROX/BHQ 200 nM, 0,5X de colorante SYBR verde (LifeTechnologies), cebador inverso-plantilla 1000 nM TS3 o TS6 y cebador directo-plantilla 100 nM TS3 o TS6. Un conjunto de reacciones de control de ADN no objetivo (CNO) estaban formadas por los mismos componentes sin el ADN objetivo DE ADH1 de maíz sintético. Todas las reacciones se incubaron a 56 °C durante 15 minutos y las señales de fluorescencia se registraron a 520 nm (SYBR verde) y 610  
25 nm (ROX).

Comparación de las gráficas de amplificación de las reacciones que contienen ADN diana en los canales de detección de SYBR verde (Figura 8A) y ROX (Figura 8B) con las gráficas de amplificación de las reacciones de CNO en el canal de detección de SYBRverde (Figura 8C)

30 Los resultados notificados en la presente memoria descriptiva se obtuvieron mediante el uso de los siguientes procedimientos y materiales a menos que se indique lo contrario.

**Reacciones de amplificación NEAR**

Las reacciones (50 µl) contenían MgSO<sub>4</sub> 15 mM, dNTP 0,3 mM, 19,2 unidades de polimerasa Bst, 15 unidades de n.BstNBI, plantilla 1 1000 nM y plantilla 2 200 nM. El ADN objetivo era *Clavibacter michiganensis sepidonicus* genómico  
35 (Cms) o un "unidades de longitud" basado en las secuencias de Cms. Las moldes y el objetivo se preincubaron juntos a 56 °C durante 30 segundos en un volumen total de 10 µl. La mezcla maestra de los componentes de reacción restantes se preincubó a 56 °C durante 30 segundos en un volumen total de 40 µl. La mezcla maestra se combinó con las moldes y el objetivo, y se incubó a 56 °C durante 10 minutos con detección fluorescente (SYBR verde o balizas moleculares) recogidos cada 10 segundos durante la incubación. Las reacciones se "inactivaron con calor" con una etapa de 2 minutos a 95 °C, seguida de un retorno a la temperatura ambiente. Los equivalentes de umbral de ciclo  
40 (Ct) se determinaron para cada reacción basándose en una fórmula de ajuste de curva en el software Biorad IQ5 y los valores se representaron en un gráfico usando Microsoft Excel. Se realizó una regresión lineal y se determinó un coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de amplificación de un polinucleótido, el procedimiento comprende:
- 5 (a) poner en contacto una molécula de ácido nucleico objetivo en condiciones sustancialmente isotérmicas con una polimerasa deficiente en exonucleasa, dos o más oligonucleótidos cebadores, en el que cada uno de los oligonucleótidos cebadores comprende de 5' a 3':
- i. una secuencia de reconocimiento de enzimas de corte;
- ii. una secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico objetivo; y
- iii. uno o más nucleótidos modificados en 2' en la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana; y
- 10 una enzima de corte que se une a la secuencia de reconocimiento de la enzima de corte en el ADN bicatenario y corta una hebra del ADN bicatenario; y
- (b) generar amplicones que comprenden al menos una porción de dicha molécula de ácido nucleico diana.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la detección de los amplicones.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la detección comprende la unión de los amplicones con una sonda detectable.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que uno o más nucleótidos modificados en 2' se sitúan en un extremo 5' de la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana; opcionalmente en el que uno o más nucleótidos modificados en 2' situados en el extremo 5' de la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana están separados de un sitio de corte por 1, 2, 3, 4, 5 o más nucleótidos no modificados.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dos o más nucleótidos modificados en 2' son contiguos.
- 20 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que 5 nucleótidos contiguos modificados con 2'-O-metilo se colocan en el extremo 3' de la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico objetivo.
7. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que 5 nucleótidos contiguos modificados con 2'-O-metilo se colocan en el extremo 5' de la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana.
8. Un procedimiento de amplificación de un polinucleótido, el procedimiento comprende:
- 25 (a) poner en contacto una molécula de ácido nucleico diana en condiciones sustancialmente isotérmicas con una polimerasa deficiente en exonucleasa, dos oligonucleótidos cebadores, en el que cada uno de los oligonucleótidos cebadores comprende de 5' a 3':
- i. una secuencia de reconocimiento de enzimas de corte;
- ii. una secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico objetivo; y
- 30 iii. 5 nucleótidos modificados con 2'-O-metilo continuos en la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana; y
- una enzima de corte que se une a la secuencia de reconocimiento de la enzima de corte en el ADN bicatenario y corta una hebra del ADN bicatenario; y
- (b) generar amplicones que comprenden al menos una porción de dicha molécula de ácido nucleico diana.
- 35 9. Un procedimiento de amplificación de un polinucleótido derivado de un patógeno, el procedimiento comprende:
- (a) poner en contacto un polinucleótido derivado de un patógeno en condiciones sustancialmente isotérmicas con una polimerasa deficiente en exonucleasa, dos o más oligonucleótidos cebadores, en el que cada uno de los oligonucleótidos cebadores comprende de 5' a 3':
- i. una secuencia de reconocimiento de enzimas de corte;
- 40 ii. una secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico objetivo; y
- iii. uno o más nucleótidos modificados en 2' en la secuencia complementaria a la molécula de ácido nucleico diana; y
- una enzima de corte que se une a la secuencia de reconocimiento de la enzima de corte en el ADN bicatenario y corta una hebra del ADN bicatenario; y
- (b) generar amplicones que comprenden al menos una porción de dicha molécula de ácido nucleico diana.

## ES 3 011 408 T3

10. El procedimiento de la reivindicación 9, comprende además detectar el amplicón con una sonda detectable.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el patógeno es un virus, una bacteria, una levadura o un hongo.
12. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el patógeno está presente en una muestra biológica.
- 5 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, líquido amniótico, esputo, orina, semen, secreción vaginal, líquido cefalorraquídeo, linfa, líquido lagrimal, heces o líquido gástrico.
14. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el patógeno está presente en una muestra ambiental.
- 10 15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la modificación 2' se selecciona del grupo que consiste en 2'-O-metilo, 2'-metoxietoxi, 2'-fluoro, 2'-hidroxilo, 2'-alilo, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetil], 4'-CH<sub>2</sub>-O-2'-puente, 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'-puente, 2'-LNA, y 2'-O-(N-metilcarbamato) y análogos de base.

FIG. 1

**Estructuras ejemplares de entidades de detención de polimerasa**

**Posiciones ejemplares de una única base de 2'-O-metil ARN:**



**Posiciones ejemplares de un bloque de dos bases contiguas de 2'-O-metil ARN:**



**FIG.1 Continuada**

**Posiciones ejemplares de un bloque de tres bases contiguas de 2'-O-metil ARN:**



**Posiciones ejemplares de un bloque de cuatro bases contiguas de 2'-O-metil ARN:**



## FIG.1 Continuada

Posiciones ejemplares de un bloque de cinco bases contiguas de 2'-O-metil ARN:



Posiciones ejemplares de bases completamente contiguas de 2'-O-metil ARN:



### Clave:

**Negro** = secuencia del estabilizador

**Azul** = secuencia de reconocimiento de enzimas de corte

**Verde** = secuencia espaciadora de enzimas de corte

**Rojo** = Secuencia de reconocimiento específica del objetivo

A = adenina

T = timina

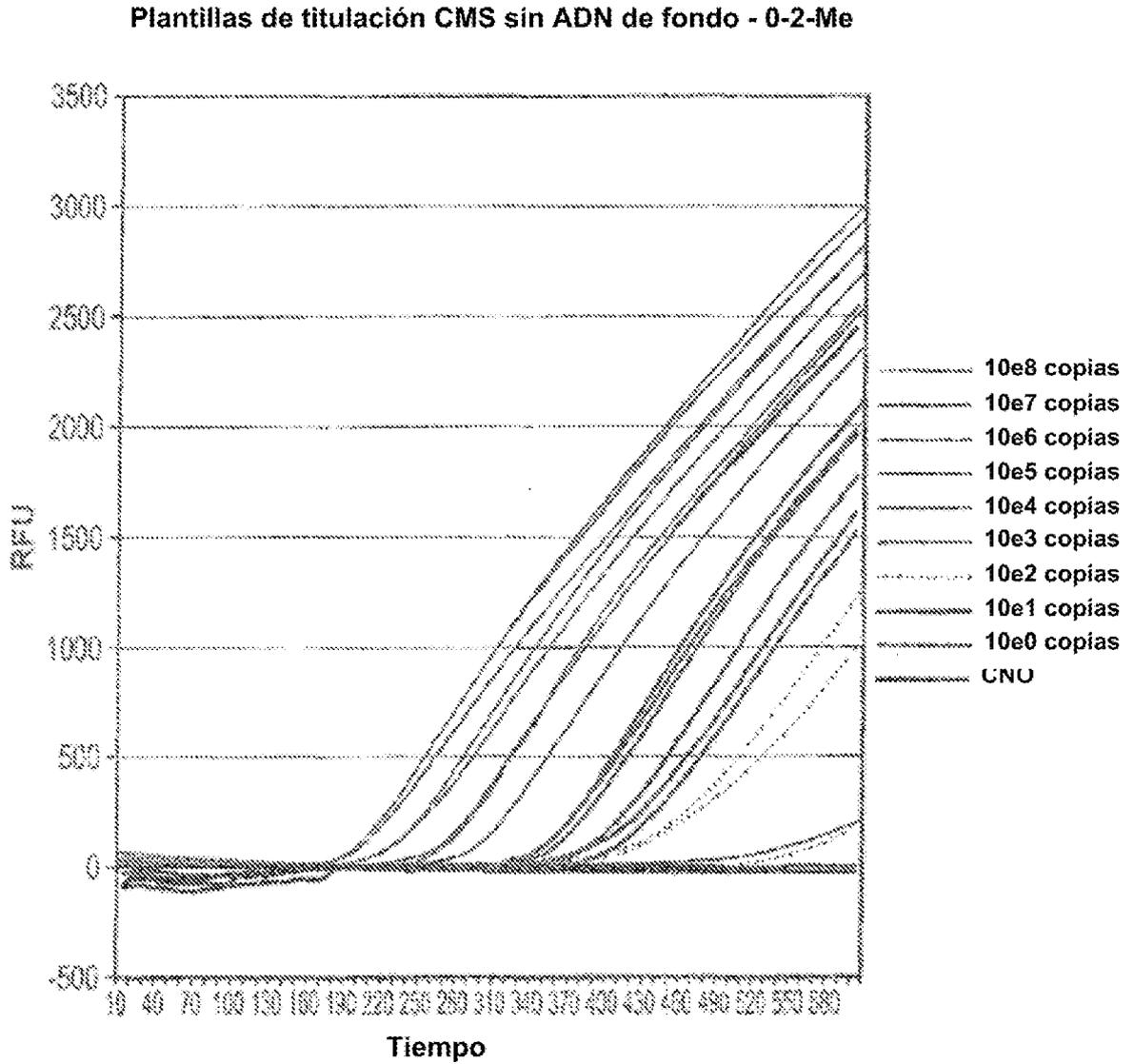
G = guanina

C = citosina

U = uracilo

Subrayado = base(s) que delimitan el segmento modificado de la secuencia

FIG. 2A



**Evaluación de intervalo dinámico de unidades de longitud de Cms sintético-**

Titulación ejemplar de unidades de longitud de Cms sintético localización y detección por medio de fluorobeacon. La señal en los Controles No Objetivos (CNOs) se suprime en las reacciones que contienen plantillas modificadas en 2'-O-metil (panel izquierdo). La curva estándar muestra un amplio intervalo dinámico mediante el uso de reacciones plantilla 2'-O-metil (panel derecho).

FIG. 2B

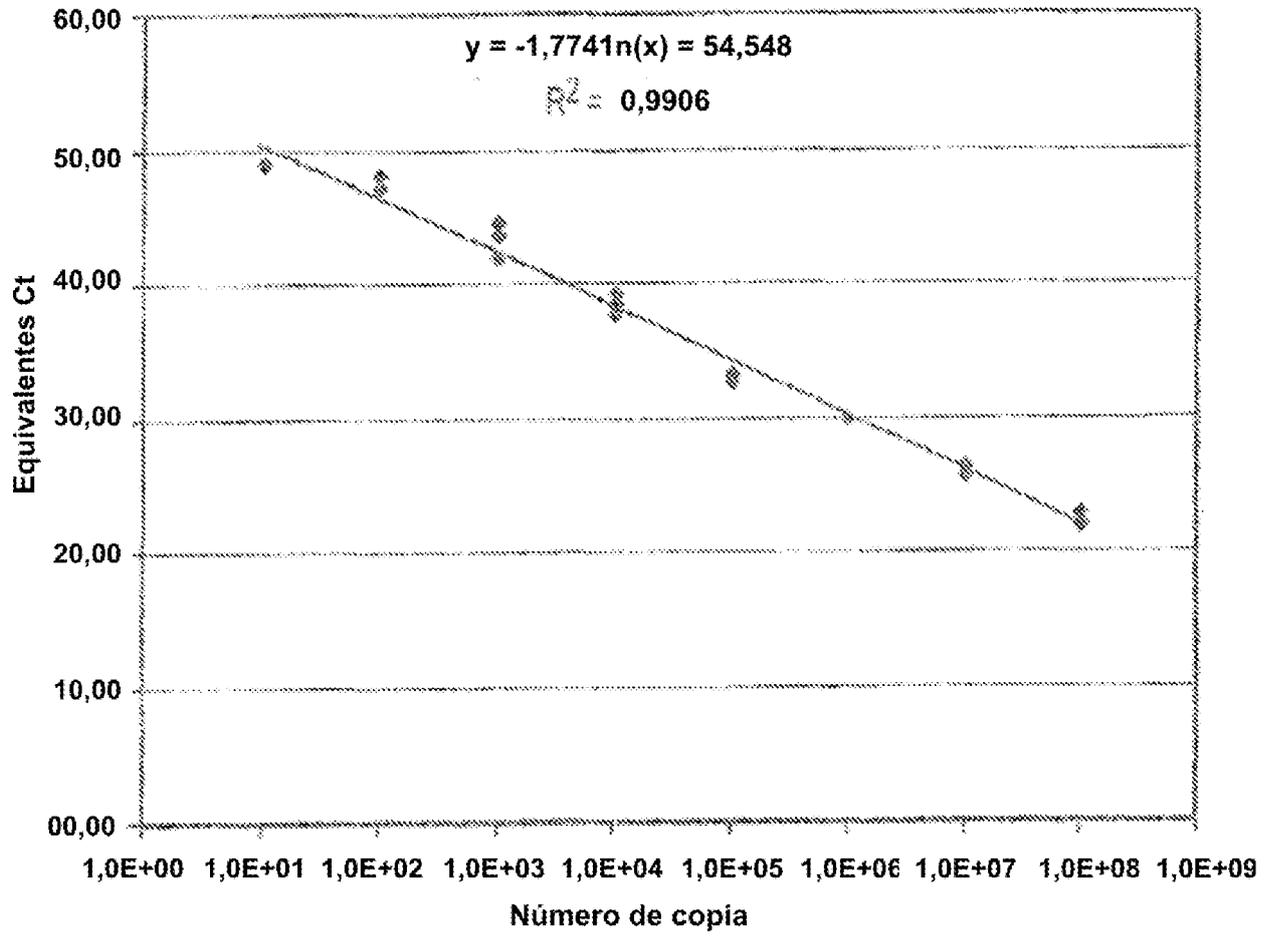
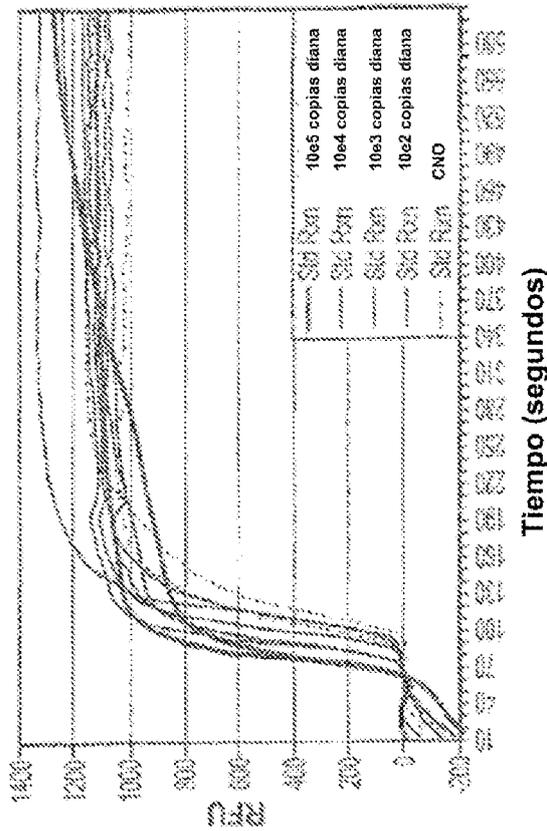




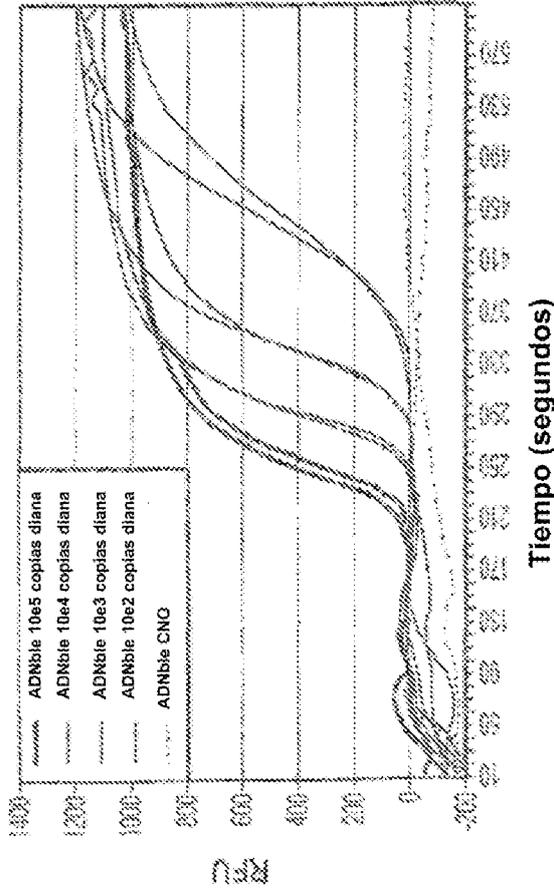
FIG. 3

Detección SYBR Green I

Plantillas originales estándar



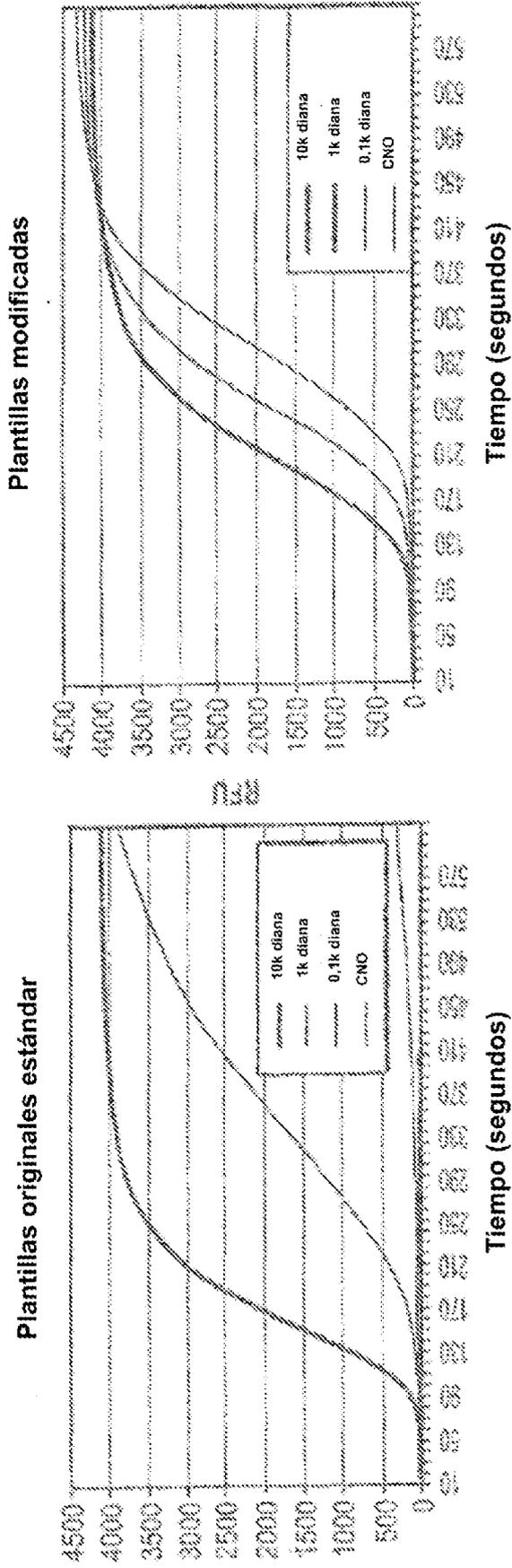
Plantillas modificadas



Datos de amplificación ejemplares mediante el uso de cebadores/plantillas modificadas con 2'-O-metil y la eliminación de productos de amplificación no específicos. Se muestra aquí un ejemplo de ensayo RACE demostrando la utilidad de cebadores/plantillas modificadas con 2'-O-metil para la eliminación de señal de fondo. La señal en los Controles No Objetivo (CNOs) se suprime en las reacciones que contienen plantilla modificadas con 2'-O-metil (panel derecho) mientras que la señal en los Controles No Objetivo (CNOs) muestra significativa señal (panel izquierdo) indicando la generación de producto de fondo en la ausencia de ADN diana.

FIG. 4

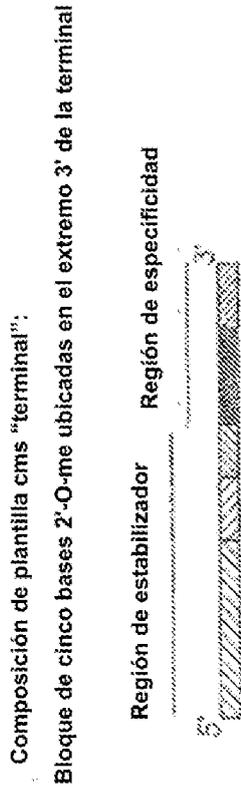
Detección molecular Beacon



Datos de amplificación ejemplares mediante el uso de cebadores/plantillas modificadas con 2'-O-metil y la mejora de productos de amplificación. Se muestra aquí un ejemplo de ensayo RACE demostrando la utilidad de cebadores/plantillas modificadas con 2'-O-metil para la mejora de la detección diana de baja abundancia. El ensayo mediante el uso de plantillas originales estándar (panel izquierdo) y el mismo ensayo mediante el uso de plantillas modificadas con 2'-O-metil (panel derecho).

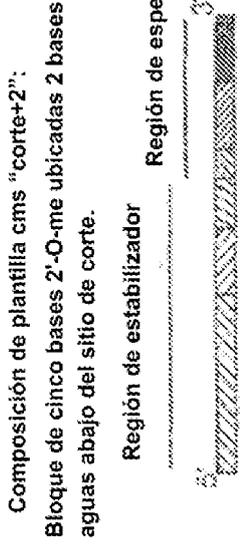
FIG. 5

Detalles  
Estructuras nóveles de plantillas



- ▨ Secuencia de estabilizador
- ▧ Secuencia de reconocimiento de enzima de corte
- ▩ Secuencia de espaciador de enzima de corte
- ▦ Bases de ADN estándar
- Bloque de cinco bases 2'-O-metil

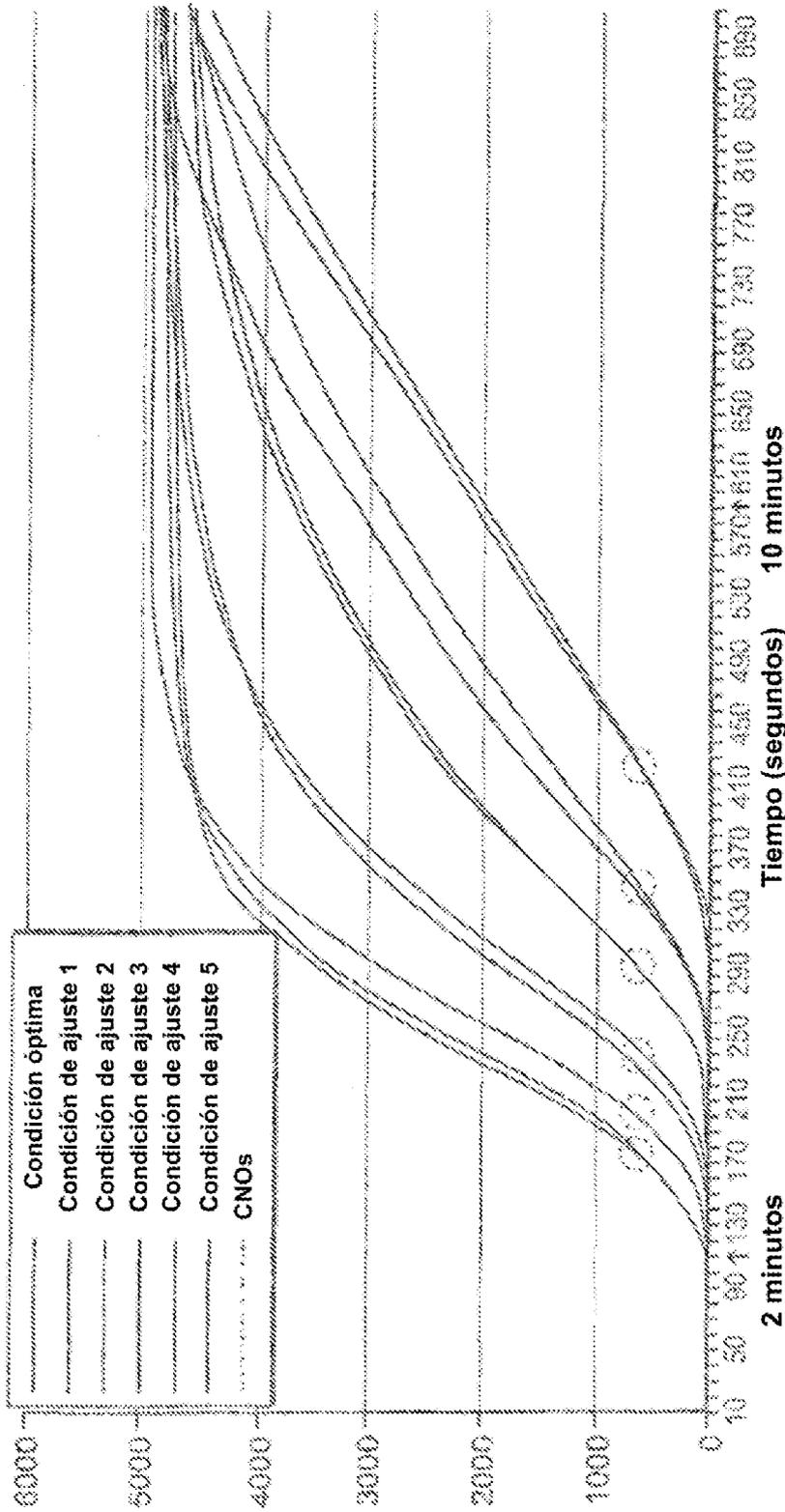
Detalles  
Estructuras nóveles de plantillas



- ▨ Secuencia de estabilizador
- ▧ Secuencia de reconocimiento de enzima de corte
- ▩ Secuencia de espaciador de enzima de corte
- ▦ Sitio de corte + 2 bases
- Bloque de cinco bases 2'-O-metil
- ▦ Bases de ADN estándar

**Estructuras ejemplares de entidad detenidora de polimerasa mediante el uso de cebadores/plantillas modificadas con 2'-O-metil para el ajuste de reacciones.** Se muestran aquí representaciones esquemáticas del ejemplo de plantillas/cebadores modificados con 2'-O-metil para el ajuste de una reacción específica. Cada una de las condiciones de ajuste está compuesta por relaciones específicas de plantillas directas e indirectas con cada conjunto de plantillas teniendo estructuras variantes.

FIG. 6

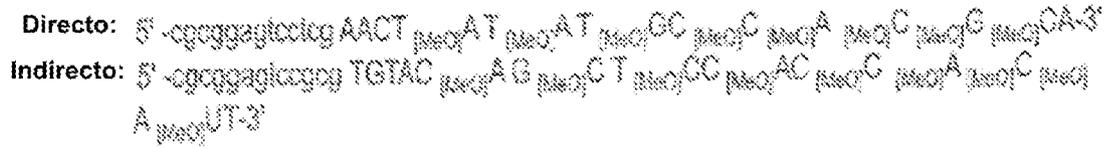


**Reacciones duplicadas 50 ul, 10K ADN genómico dianacomo equivalentes genómicos, FAM Beacon, IQ5**

Datos de amplificación ejemplares mediante el uso de cebadores/plantillas modificadas con 2'-O-metil y el "ajuste" de reacciones. Se muestran aquí gráficas de amplificación demostrando la utilidad de plantillas/ cebadores modificados con 2'-O-metil para el ajuste de una reacción específica. Todas las reacciones (en duplicado) contienen 10.000 equivalentes genómicos de ADN Cms. Cada una de las condiciones de ajuste está compuesta por relaciones específicas de plantillas directas e indirectas con cada conjunto de plantillas teniendo estructuras variantes. Los círculos rojos demuestran un desplazamiento en el tiempo de detección para cada condición de ajuste. Adicionalmente, debe ser notado que la fase de carga de cada condición está contraída y la pendiente de la curva está desplazada.

FIG. 7

**Conjunto TS3 de plantilla-cebador directo e indirecto:**



**Conjunto TS6 de plantilla-cebador directo e indirecto:**

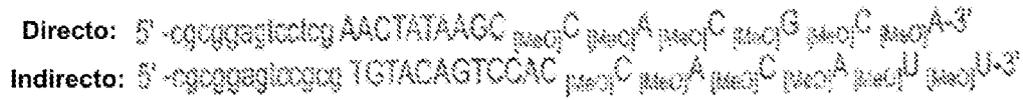


FIG. 8

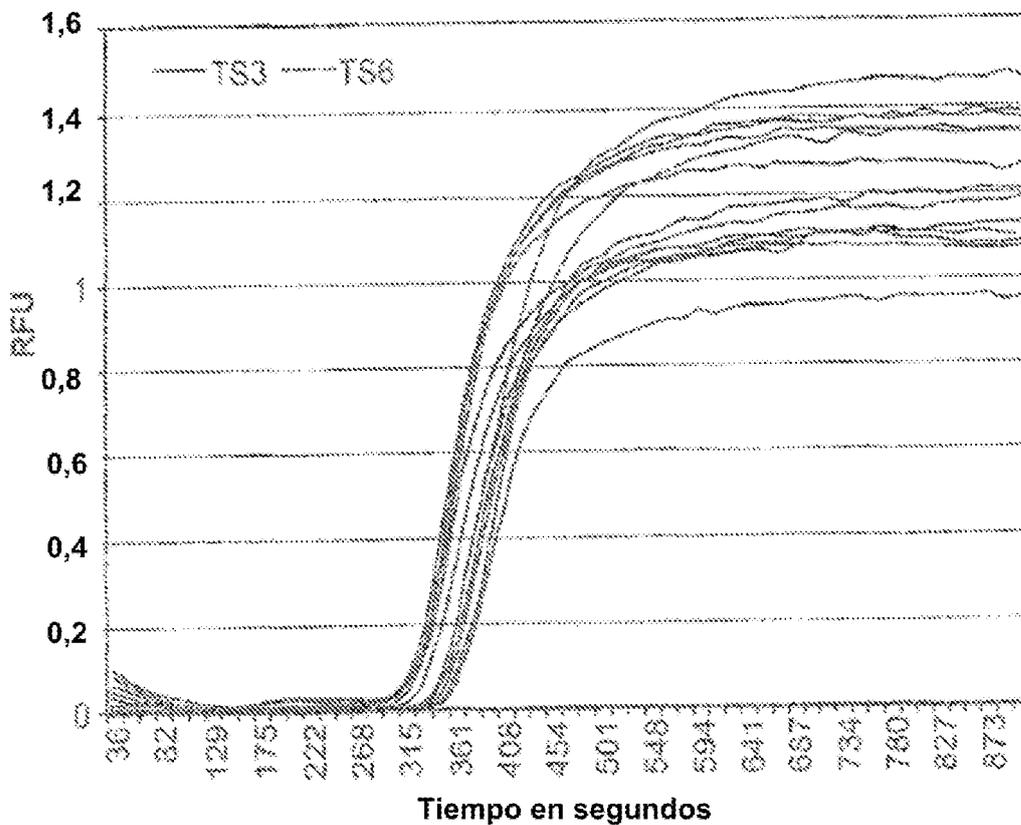


FIG. 9

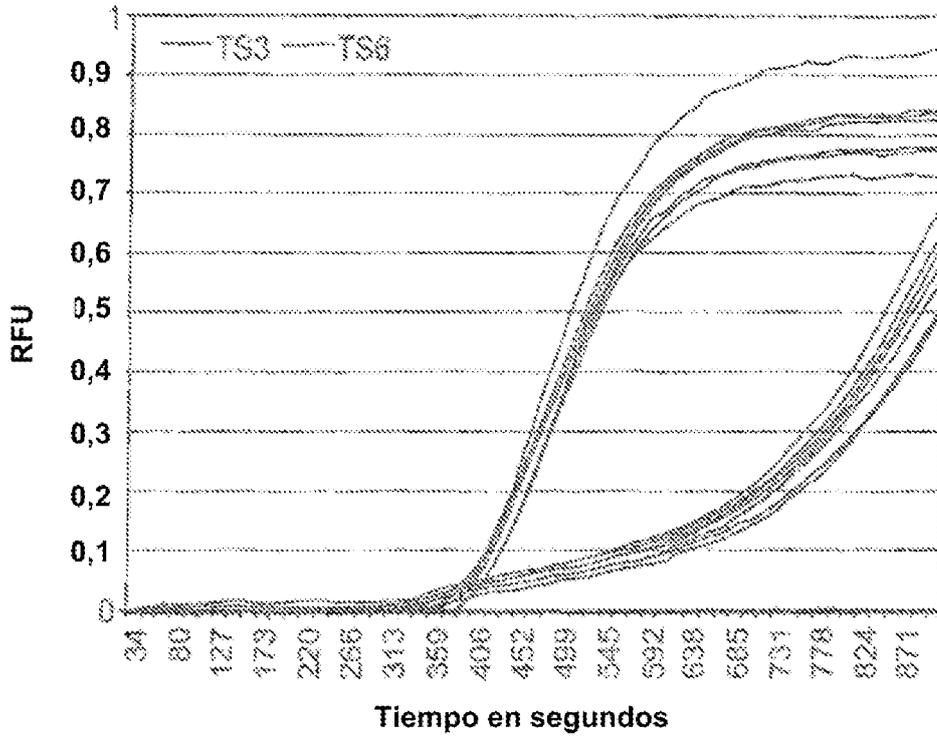


FIG. 10

