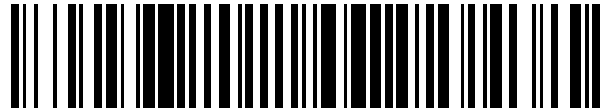


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 815**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2005 E 05824763 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014 EP 1805318**

54 Título: **Reacciones de amplificación de ácido nucleico de múltiples estadios en sistema cerrado**

30 Prioridad:

27.10.2004 US 622393 P

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

06.10.2014

73 Titular/es:

**CEPHEID (100.0%)
904 CARIBBEAN DRIVE
SUNNYVALE, CA 94089, US**

72 Inventor/es:

**CHANG, RONALD;
CHING, JESUS;
DORITY, DOUGLAS BRYAN;
ZHANG, JIAN PING;
WANG, JAMES JIAN QUAN;
WONG, WENDY WINGKEI;
PAUL, KENDRA LARA y
ATTA, REUEL VAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 502 815 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

Reacciones de amplificación de ácido nucleico de múltiples estadios en sistema cerrado

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere en general a métodos para analizar una muestra con respecto a la presencia de uno o más ácidos nucleicos y, más particularmente, a métodos para realizar reacciones de amplificación de ácido nucleico de múltiples estadios, especialmente reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), en condiciones cerradas.

10

Antecedentes

Las reacciones de amplificación de ácido nucleico son cruciales para muchas aplicaciones de investigación, médicas e industriales. Dichas reacciones se usan en investigación clínica y biológica, detección y control de enfermedades infecciosas, detección de mutaciones, detección de marcadores de cáncer, control ambiental, identificación genética, detección de patógenos en aplicaciones de biodefensa, y similares, por ejemplo Schweitzer *et al*, *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 21-27 (2001); Koch, *Nature Reviews Drug Discovery*, 3: 749-761 (2004). En particular, las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) ha encontrado aplicaciones en todas estas áreas, incluyendo aplicaciones para detección viral y bacteriana, control de carga viral, detección de patógenos poco habituales y/o difíciles de cultivar, detección rápida de amenazas de bioterrorismo, detección de enfermedad residual mínima en pacientes de cáncer, ensayos de patógenos alimentarios, exploración de suministro de sangre y similares, por ejemplo Mackay, *Clin. Microbiol. Infect.*, 10: 190-212 (2004); Bernard *et al*, *Clinical Chemistry*, 48: 1178-1185 (2002). Con respecto a la PCR, las razones clave para dicho uso generalizado son su velocidad y facilidad de uso (típicamente se realiza en unas pocas horas usando kits normalizados e instrumentos relativamente simples y de bajo coste), su sensibilidad (con frecuencia pueden detectarse varias decenas de copias de una secuencia diana en una muestra) y su robustez (se analizan fácilmente muestras de baja calidad o muestras conservadas, tales como muestras forenses o muestras de tejido fijo), Strachan y Read, *Human Molecular Genetics 2* (John Wiley & Sons, Nueva York, 1999).

A pesar de los avances en las técnicas de amplificación de ácido nucleico que se reflejan en dichas aplicaciones generalizadas, aún existe la necesidad de mejoras adicionales en la velocidad y sensibilidad, particularmente en áreas tales como la detección de enfermedades infecciosas, detección de enfermedad residual mínima, aplicaciones de biodefensa y similares.

Se han obtenido mejoras significativas en la sensibilidad de las PCR usando conjuntos anidados de cebadores en una reacción de amplificación de dos estadios, por ejemplo Albert *et al*, *J. Clin. Microbiol.*, 28: 1560-1564 (1990). En este enfoque, el amplicón de una primera reacción de amplificación se convierte en la muestra para una segunda reacción de amplificación usando un nuevo conjunto de cebadores, al menos uno de los cuales se une con una localización interior del primer amplicón. Aunque aumenta la sensibilidad, el enfoque padece un aumento de la manipulación del reactivo y aumento del riesgo de introducir secuencias contaminantes, lo que puede conducir a falsos positivos. Se han realizado intentos de superar estos obstáculos con las llamadas PCR anidadas de tubo cerrado; sin embargo, dichos enfoques se basan principalmente en esquemas para secuestrar reactivos en diferentes secciones del mismo recipiente de reacción de modo que pueda iniciarse una reacción del segundo estadio forzando a los reactivos a permanecer juntos por algún proceso físico, tal como centrifugación, por ejemplo Yourno, *PCR Methods and Applications*, 2: 60-65 (1992); Wolff *et al*, *PCR Methods and Applications*, 4: 376-379 (1995); Olmos *et al*, *Nucleic Acids Research*, 27: 1564-1565 (1999). Por lo tanto, están presentes partes sustanciales de componentes de la reacción de primer estadio en la reacción de segundo estadio.

También se han obtenido mejoras significativas en la sensibilidad y una reducción de los falsos positivos llevando a cabo reacciones en ambientes cerrados. Un inconveniente de las técnicas de amplificación altamente sensibles es la aparición de resultados de ensayo de falso positivo, provocada por la amplificación inapropiada de secuencias no diana, por ejemplo Borst *et al*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 23: 289-299 (2004). La presencia de secuencias no diana puede deberse a la falta de especificidad de la reacción, o a contaminación de reacciones anteriores (es decir contaminación de "arrastre") o a contaminación del ambiente inmediato, por ejemplo agua, productos desechables, reactivos, etc. Dichos problemas pueden aliviarse llevando a cabo amplificaciones en recipientes cerrados, de modo que una vez que se ha añadido una muestra y reactivos y el recipiente se ha sellado, no tiene lugar más manipulación de los reactivos o productos. Dichas operaciones se han hecho posibles en gran medida por la aparición de amplificaciones "en tiempo real" que emplean marcadores que indican continuamente la cantidad de un producto en una mezcla de reacción.

El documento US5229279 desvela una cubeta y método de uso para evitar que el ácido nucleico amplificado por PCR se libere a la atmósfera cuando aún se está detectando. El documento WO01/84463 describe un método, aparato y programa informático para el análisis cuantitativo de una reacción de amplificación de ácido nucleico, el documento US5556773 describe un método o aparato para PCR anidada con tubos de reacción cerrados individuales. Una divulgación anónima (396004) de la Base de Datos de Divulgación de Investigación (abril de 1997) desvela un procesador de PCT que consiste en bloques calentadores preacondicionados que se colocan

secuencialmente en contacto con un blíster de fluidos.

A pesar de los intentos de amplificaciones de múltiples estadios en recipientes cerrados, la técnica actual carece de métodos o sistemas en los que puedan tener lugar reacciones de múltiples estadios sin la posibilidad de que haya efectos de interferencia de componentes indeseados, por ejemplo cebadores u otros componentes, de reacciones previas. En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de nuevos enfoques para llevar a cabo reacciones de amplificación de múltiples estadios cerradas que tengan la conveniencia de técnicas de un único estadio, pero que tengan la mayor sensibilidad proporcionada por una amplificación de múltiples estadios usando cebadores anidados.

10 Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para reacciones de amplificación de ácido nucleico de múltiples estadios cerradas en donde una parte de una mezcla de reacción del estadio previo actúa como la muestra para la reacción del siguiente estadio.

En particular la invención proporciona un método para realizar una reacción de amplificación anidada, comprendiendo el método las etapas de:

- a) realizar una reacción de amplificación de primer estadio en una cámara de reacción de un sistema cerrado de forma fluida, comprendiendo la reacción de amplificación del primer estadio uno o más polinucleótidos diana de una muestra usando reactivos de amplificación de primer estadio en una primera mezcla de reacción para formar uno o más primeros amplicones, incluyendo los reactivos de amplificación del primer estadio cebadores iniciales para cada polinucleótido diana, en donde el o los primeros amplicones se amplifican en presencia de un indicador fluorescente capaz de generar una señal óptica relacionada con una cantidad de un amplicón en la reacción de amplificación del primer estadio;
- b) controlar la señal óptica del indicador fluorescente en la reacción de amplificación de primer estadio en la cámara de reacción;
- c) retener automáticamente una parte efectiva de la mezcla de reacción de la reacción de amplificación del primer estadio cuando la señal óptica alcanza o supera un nivel umbral;
- d) amplificar en la cámara de reacción el o los primeros amplicones en la parte efectiva usando reactivos de amplificación de segundo estadio en una segunda mezcla de reacción para formar uno o más segundos amplicones, incluyendo los reactivos de amplificación de segundo estadio al menos un cebador secundario para cada uno del o los primeros amplicones, de modo que cada cebador secundario esté anidado en dicho primer amplicón en relación con un cebador inicial de dicho primer amplicón; y
- e) detectar el o los segundos amplicones para determinar la presencia o ausencia del o los polinucleótidos diana en la muestra.

El método se usa para detectar la presencia o ausencia de uno o más polinucleótidos diana en una muestra que tiene las siguientes etapas: (a) amplificar en un sistema de reacción cerrado de forma fluida uno o más polinucleótidos diana de una muestra usando reactivos de amplificación de primer estadio en una primera mezcla de reacción para formar uno o más primeros amplicones, incluyendo los reactivos de amplificación de primer estadio cebadores iniciales para cada polinucleótido diana; (b) aislar una muestra de la primera mezcla de reacción en el sistema de reacción cerrado de forma fluida; y (c) amplificar en el sistema de reacción cerrado de forma fluida el o los primeros amplicones en la muestra usando reactivos de amplificación de segundo estadio en una segunda mezcla de reacción para formar uno o más segundos amplicones, incluyendo los reactivos de amplificación de segundo estadio al menos un cebador secundario para cada uno del o los primeros amplicones, de modo que cada segundo cebador esté anidado en dicho primer amplicón en relación con un cebador inicial de dicho primer amplicón.

El método se usa para detectar la presencia o ausencia de uno o más polinucleótidos diana en una muestra, comprendiendo el método las etapas de: (i) proporcionar una cámara de reacción de forma seleccionable en comunicación fluida con un depósito de residuos, un depósito de muestras que contiene una muestra, un primer depósito de reactivo que contiene reactivos de amplificación de primer estadio y un segundo depósito de reactivos que contiene reactivos de amplificación de segundo estadio, estando cada uno de dichos depósitos cerrado de forma fluida; (ii) transferir de forma fluida la muestra del depósito de muestras y reactivos de amplificación de primer estadio del primer depósito de reactivos a la cámara de reacción de modo que los reactivos de amplificación de primer estadio reaccionen con la muestra en una reacción de amplificación para producir un producto de reacción que contiene un primer amplicón siempre que esté presente un polinucleótido diana en la muestra; (iii) transferir de forma fluida el producto de reacción al depósito de residuos, excepto por una parte efectiva que permanece en la cámara de reacción; (iv) transferir de forma fluida reactivos de amplificación de segundo estadio del segundo depósito de reactivos a la cámara de reacción de modo que los reactivos de amplificación del segundo estadio reaccionen con la parte efectiva del producto de reacción en una reacción de amplificación para producir un segundo amplicón siempre que el primer amplicón esté presente en el producto de reacción; y (v) detectar el segundo amplicón para determinar si el polinucleótido diana está presente en la muestra.

En el presente documento también se describe un método para determinar las cantidades relativas de uno o más polinucleótidos diana en una muestra, comprendiendo el método las etapas de: (i) amplificar en la muestra el o los polinucleótidos diana y al menos una secuencia de referencia en una primera reacción de amplificación para formar un primer producto de reacción incluyendo un primer amplicón para cada polinucleótido diana y secuencia de referencia, incluyendo la primera reacción de amplificación cebadores iniciales para cada polinucleótido diana y secuencia de referencia; (ii) amplificar en una segunda reacción de amplificación primeros amplicones del o los polinucleótidos diana de una parte efectiva del primer producto de reacción para formar un segundo amplicón para cada primer amplicón, incluyendo la segunda reacción de amplificación cebadores secundarios para cada polinucleótido diana de modo que cada cebador secundario de cada primer amplicón esté anidado en dicho primer amplicón en relación con los cebadores iniciales del mismo; y (iii) comparar los segundos amplicones de la segunda reacción de amplificación con amplicones de la al menos una secuencia de referencia en la primera reacción de amplificación para determinar cantidades relativas del o los polinucleótidos diana en la muestra.

En el presente documento también se describe un sistema de reacción cerrado de forma fluida que se proporciona para realizar una reacción de amplificación anidada, comprendiendo el sistema: (i) una cámara de reacción de forma seleccionable en comunicación fluida con un depósito de muestras que contiene una muestra, un depósito de residuos, un primer depósito de reactivos que contiene reactivos de amplificación de primer estadio y un segundo depósito de reactivos que contiene reactivos de amplificación de segundo estadio, estando cada uno de dichos depósitos cerrado de forma fluida; y (ii) una bomba asociada operativamente con una válvula rotatoria para transferir de forma fluida la muestra y los reactivos de amplificación de primer estadio a la cámara de reacción, donde se realiza una primera reacción de amplificación para formar uno o más primeros amplicones en una mezcla de reacción; para aislar una parte efectiva de la mezcla de reacción; y para transferir de forma fluida dichos reactivos de amplificación del segundo estadio y la parte efectiva a la cámara de reacción, donde se realiza una segunda amplificación para formar uno o más segundos amplicones.

En el presente documento también se describe un recipiente de reacción para llevar a cabo el método de la invención, comprendiendo el recipiente de reacción: (i) una cámara de reacción para contener un líquido; (ii) un orificio de entrada conectado con la cámara de reacción por un canal de entrada; (iii) un orificio de salida conectado con la cámara de reacción por un canal de salida; y (iv) un miembro de retención en la cámara de reacción, situándose el miembro de retención para retener un volumen definido del líquido en la cámara de reacción siempre que el resto del líquido se retire de la cámara de reacción a través del canal de salida.

En el presente documento también se describe un aparato para realizar una reacción de múltiples estadios, comprendiendo el aparato: (a) un cuerpo que tiene al menos un primer y segundo canales formados en el mismo; y (b) un recipiente de reacción que se extiende desde el cuerpo, comprendiendo el recipiente de reacción. (i) una cámara de reacción para contener un líquido; (ii) un orificio de entrada conectado con la cámara de reacción por un canal de entrada; (iii) un orificio de salida conectado con la cámara de reacción por un canal de salida, y (iv) un miembro de retención en la cámara de reacción, situándose el miembro de retención para retener un volumen del líquido en la cámara de reacción siempre que el resto del líquido se retire de la cámara de reacción a través del canal de salida, donde el orificio de entrada del recipiente está conectado con el primer canal en el cuerpo y donde el orificio de salida del recipiente está conectado con el segundo canal en el cuerpo.

En el presente documento también se describe un producto legible por ordenador que incluye un programa para su ejecución por un ordenador para controlar el rendimiento de una reacción de amplificación anidada, comprendiendo el programa instrucciones para: (a) leer los valores de una señal óptica de una reacción de amplificación de primer estadio, estando la señal óptica relacionada de forma monótonica con una concentración de un amplicón en la reacción de amplificación de primer estadio, y teniendo los valores de la señal óptica un valor más reciente; (b) determinar un nivel de señal de línea basal a partir de los valores de la señal óptica; (c) calcular una nivel predeterminado a partir de los valores de la señal óptica; (d) comparar el valor predeterminado con el valor más reciente de la señal óptica; (e) iniciar una reacción de amplificación de segundo estadio siempre que el valor más reciente de la señal óptica sea igual a o mayor que el nivel predeterminado; y (f) repetir las etapas (d) y (e) hasta que se inicie la reacción de segundo estadio.

El método se usa para amplificar una o más secuencias de ARN, comprendiendo el método las etapas de: (i) transcribir una o más secuencias de ARN en un sistema de reacción cerrado de forma fluida para formar una o más secuencias de ADN monocatenarias complementarias usando reactivos de transcriptasa inversa en una primera mezcla de reacción; (ii) aislar una primera parte efectiva de la primera mezcla de reacción en el sistema de reacción cerrado de forma fluida; y (iii) amplificar en el sistema de reacción cerrado de forma fluida la o las secuencias de ADN monocatenarias complementarias en la primera parte efectiva usando reactivos de amplificación de primer estadio en una segunda mezcla de reacción para formar uno o más primeros amplicones, incluyendo los reactivos de amplificación de primer estadio cebadores iniciales para cada una de las secuencias de ADN monocatenarias complementarias.

La presente invención proporciona métodos para detectar o medir uno o más polinucleótidos en una muestra de ensayo o muestra que, en sus diversos aspectos, tiene varias ventajas sobre las técnicas actuales incluyendo, pero sin limitación, (1) mayor sensibilidad en reacciones de amplificación de dos estadios en sistemas cerrados evitando

reactivos de “arrastre”; (2) realización de reacciones de amplificación de múltiples estadios en tiempo real con control de bucle cerrado del inicio de la reacción y, más específicamente, realización de PCR anidada en tiempo real; (3) cuantificación más precisa de polinucleótidos diana de baja abundancia en amplificaciones de múltiples estadios por amplificación de un único estadio de secuencias de referencia y amplificación de múltiples estadios de secuencias diana; y (4) recipientes de reacción desechables, convenientes, para llevar a cabo los métodos de la invención.

Definiciones

Los términos y símbolos de química de ácidos nucleicos, bioquímica, genética y biología molecular usados en el presente documento siguen los de tratados y textos convencionales en el campo, por ejemplo Kornberg y Baker, DNA Replication, Segunda Edición (W. H. Freeman, Nueva York, 1992); Lehninger, Biochemistry, Segunda Edición (Worth Publishers, Nueva York, 1975); Strachan y Read, Human Molecular Genetics, Segunda Edición (Wiley-Liss, Nueva York, 1999); Eckstein, editor, Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach (Oxford University Press, Nueva York, 1991); Gait, editor, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press, Oxford, 1984); Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); y similares.

“Amplicón” significa producto de una reacción de amplificación de polinucleótidos. Es decir, es una población de polinucleótidos, habitualmente bicatenarios, que se replican a partir de una o más secuencias de partida. La o las secuencias de partida pueden ser una o más copias de la misma secuencia, o pueden ser una mezcla de diferentes secuencias. Pueden producirse amplicones por una diversidad de reacciones de amplificación cuyos productos son repeticiones múltiples de uno o más ácidos nucleicos diana. En general, las reacciones de amplificación que producen amplicones están “conducidas por molde” por que la formación de pares de bases de los reactivos, bien nucleótidos o bien oligonucleótidos, tienen complementos en un polinucleótido molde que se requiere para la creación de productos de reacción. En un aspecto, las reacciones conducidas por moldes son extensiones de cebadores con un ácido nucleico polimerasa o ligamientos de oligonucleótidos con un ácido nucleico ligasa. Dichas reacciones incluyen, pero sin limitación, reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), reacciones lineales de la polimerasa, reacciones en cadena de la ligasa (LCR), reacciones de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA), amplificaciones de círculo rodante y similares, desveladas en las siguientes referencias Mullis *et al*, patentes de Estados Unidos 4.683.195; 4.965.188; 4.683.202; 4.800.159 (PCR); Gelfand *et al*, patente de Estados Unidos 5.210.015 (PCR en tiempo real con sondas “taqman”); Wittwer *et al*, patente de Estados Unidos 6.174.670; Landegren *et al*, patente de Estados Unidos 4.988.617 (“LCR”); Birkenmeyer *et al*, patente de Estados Unidos 5.427.930 (“gap-LCR”); Kacian *et al*, patente de Estados Unidos 5.399.491 (“NASBA”); Walker, patentes de Estados Unidos 5.648.211; 5.712.124 (“SDA”); Lizardi, patente de Estados Unidos 5.854.033; Aono *et al*, publicación de patente Japonesa JP 4-262799 (amplificación por círculo rodante); y similares. En un aspecto, se producen amplicones de la invención por PCR. Una reacción de amplificación puede ser una amplificación “en tiempo real” si está disponible una química de detección que permita que se mida un producto de reacción a medida que progresa la reacción de amplificación, por ejemplo “PCR en tiempo real” descrita posteriormente, o “NASBA en tiempo real” como se describe en Leone *et al*, Nucleic Acids Research, 26: 2150-2155 (1998), y referencias similares. Como se usa en el presente documento, el término “amplificar” significa realizar una reacción de amplificación. Una “mezcla de reacción” significa una solución que contiene todos los reactivos necesarios para realizar una reacción, que puede incluir, pero sin limitación, agentes tamponantes para mantener el pH a un nivel seleccionado durante una reacción, sales, cofactores, neutralizantes, y similares.

“Cerrado” en referencia a una reacción de amplificación significa que dicha reacción tiene lugar dentro de un recipiente o envase o cámara que no tiene aperturas a través de las que pueden pasar líquidos, en particular, líquidos que contienen materiales no de muestra, tales como biomoléculas u organismos no de muestra, incluyendo, pero sin limitación, ácidos nucleicos, proteínas, virus, bacterias, o similares. En un aspecto, un recipiente, cámara o envase que contiene una reacción de amplificación cerrada puede incluir un orificio o agujero que es permeable al gas pero impermeable al líquido, por ejemplo, un orificio que permite la purga de aire a través de una membrana de filtro pero no líquidos en condiciones de reacción convencionales. Las membranas adecuadas para dichos orificios o agujeros incluyen películas de poliolefina tejidas, tales como película Tyrek® (DuPont), o similares.

“Complementario o sustancialmente complementario” se refiere a la hibridación o formación de pares de bases o la formación de una doble cadena entre nucleótidos o ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, entre las dos cadenas de una molécula de ADN bicatenaria o entre un cebador oligonucleotídico y un sitio de unión a cebadores en un ácido nucleico monocatenario. Los nucleótidos complementarios son, en general, A y T (o A y U) o C y G. Se dice que dos moléculas de ARN o ADN monocatenarias son sustancialmente complementarias cuando los nucleótidos de una cadena, alineados y comparados de forma óptima y con inserciones o deleciones de nucleótidos apropiadas, se emparejan con al menos aproximadamente el 80 % de los nucleótidos de la otra cadena, habitualmente al menos aproximadamente el 90 al 95 %, y más preferentemente de aproximadamente el 98 al 100 %. Como alternativa, existe complementariedad sustancial cuando una cadena de ARN o ADN hibride en condiciones de hibridación selectivas con su complemento. Típicamente, se producirá hibridación selectiva cuando haya al menos aproximadamente 65 % de complementariedad sobre un tramo de al menos 14 a 25 nucleótidos, preferentemente al

menos aproximadamente 75 %, más preferentemente al menos aproximadamente 90 % de complementariedad. Véase, M. Kanehisa *Nucleic Acids Res.* 12: 203 (1984).

5 El “producto legible por ordenador” significa cualquier medio tangible para almacenar información que pueda leerse o transmitirse a un ordenador. Los productos legibles por ordenador incluyen, pero sin limitación, disquetes magnéticos, cintas magnéticas, discos ópticos, CD-ROM, cintas o tarjetas perforadas, dispositivos de memoria solo de lectura, dispositivos de almacenamiento de acceso directo, matrices de puertas, memoria electrostática y cualquier otro medio similar.

10 “Doble cadena” significa que al menos dos oligonucleótidos y/o polinucleótidos que son completa o parcialmente complementarios experimentan formación de pares de bases de tipo Watson-Crick entre todos o la mayoría de sus nucleótidos de modo que se forme un complejo estable. Los términos “hibridar” e “hibridación” se usan de forma intercambiable para indicar la formación de una doble cadena estable. “Perfectamente coincidente” en referencia a una doble cadena significa que las cadenas poli u oligonucleotídicas que componen la doble cadena forman una estructura bicatenaria entre sí de modo que cada nucleótido en cada cadena experimenta formación de pares de bases de Watson-Crick con un nucleótido en la otra cadena. La expresión “doble cadena” comprende la formación de pares de bases de análogos nucleosídicos, tales como desoxiinosina, nucleósidos con bases de 2-aminopurina, PNA y similares, que pueden emplearse. Un “desapareamiento” en una doble cadena entre dos oligonucleótidos o polinucleótidos significa que un par de nucleótidos en la doble cadena no consigue experimentar formación de enlaces Watson-Crick.

20 “Cerrado de forma fluida” significa que, en condiciones de funcionamiento convencionales, los líquidos dentro de un sistema que comprende uno o más recipientes, cámaras, válvulas y/o conductos, posiblemente interconectados y en comunicación entre sí, no pueden comunicarse con el exterior de dicho sistema, y de forma similar los líquidos en el exterior de dicho sistema no pueden comunicarse con líquidos contenidos dentro del interior del sistema. En un aspecto, las condiciones de funcionamiento convencionales significan que los vasos, cámaras, válvulas y conductos de un sistema cerrado de forma fluida están presurizados hasta un grado menor de 0,69 MPa, o en otro aspecto, en un grado menor de 0,35 MPa, o en un grado menor de 0,21 MPa.

30 El “indicador fluorescente” significa una sonda que es capaz de generar una señal fluorescente en presencia de un producto de una reacción de amplificación (es decir un “producto de amplificación”) de modo que a medida que se acumula un producto en la mezcla de reacción la señal del indicador fluorescente aumenta, al menos sobre un intervalo predeterminado de concentraciones. Los indicadores fluorescentes pueden ser no específicos, tales como colorantes de intercalación que se unen con productos de ADN bicatenarios, por ejemplo YO-PRO-1, SYBR green 1, y similares, Ishiguro *et al*, *Anal. Biochem.*, 229: 207-213 (1995); Tseng *et al*, *Anal. Biochem.*, 245: 207-212 (1997); Morrison *et al*, *Biotechniques*, 24: 954-962 (1998); o tales como cebadores que tienen estructuras en horquilla con una molécula fluorescente mantenida próxima a un interruptor fluorescente hasta que se separa por extensión de cebadores, por ejemplo Whitecombe *et al*, *Nature Biotechnology*, 17: 804-807 (1999) (“cebadores Amplifluor™”). Los indicadores fluorescentes también pueden ser específicos de secuencia diana, comprendiendo habitualmente una molécula fluorescente próxima a un interruptor fluorescente hasta que un resto oligonucleotídico al que están fijados se une específicamente con un producto de amplificación, por ejemplo Gelfand *et al*, patente de Estados Unidos 5.210.015 (“taqman”); Nazarenko *et al*, *Nucleic Acids Research*, 25: 2516-2521 (1997) (“sondas scorpion”); Tyagi *et al*, *Nature Biotechnology*, 16: 49-53 (1998) (“balizas moleculares”). Pueden usarse indicadores fluorescentes en relación con PCR en tiempo real, o pueden usarse para medir la cantidad total de producto de reacción al final de una reacción.

45 “Patrón interno” significa una secuencia de ácido nucleico que se amplifica en la misma reacción de amplificación que un polinucleótido diana para permitir la cuantificación absoluta o relativa del polinucleótido diana en una muestra. Un patrón interno puede ser endógeno o exógeno. Es decir, un patrón interno puede aparecer de forma natural en la muestra, o puede añadirse a la muestra antes de la amplificación. En un aspecto, pueden añadirse múltiples secuencias de patrones internos exógenas a una mezcla de reacción en una serie de concentraciones predeterminadas para proporcionar una calibración con la que puede compararse un amplicón diana para determinar la cantidad de su polinucleótido diana correspondiente en una muestra. La selección del número, secuencias, longitudes y otras características de patrones internos exógenos es una elección de diseño rutinaria para un experto en la materia. Preferentemente, los patrones internos endógenos, también denominados en el presente documento “secuencias de referencia”, son secuencias naturales para una muestra que corresponden a genes mínimamente regulados que muestran un nivel de transcripción independiente del ciclo celular y constante, por ejemplo Selvey *et al*, *Mol. Cell Probes*, 15: 307-311 (2001). Las secuencias de referencia ejemplares incluyen, pero sin limitación, secuencias de los siguientes genes: GAPDH, β_2 -microglobulina, ARN ribosómico 18S y β -actina (aunque véase Selvey *et al*, citado anteriormente).

60 “Kit” se refiere a cualquier sistema de suministro para suministrar materiales o reactivos para llevar a cabo un método de la invención. En el contexto de ensayos de reacción, dichos sistemas de suministro incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte o suministro de reactivos de reacción (por ejemplo, sondas, enzimas, etc., en los recipientes apropiados) y/o materiales de apoyo (por ejemplo, tampones, instrucciones escritas para realizar el ensayo etc.) de una localización a otra. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más recipientes (por ejemplo,

cajas) que contienen los reactivos de reacción relevantes y/o materiales de apoyo. Dichos contenidos pueden suministrarse al receptor pretendido juntos o por separado. Por ejemplo, un primer recipiente puede contener una enzima para su uso en un ensayo, mientras que un segundo recipiente contiene sondas.

5 “Ligamiento” significa formar un enlace o unión covalente entre los extremos de dos o más ácidos nucleicos, por ejemplo oligonucleótidos y/o polinucleótidos, en una reacción conducida por molde. La naturaleza del enlace o unión puede variar ampliamente y el ligamiento puede llevarse a cabo de forma enzimática o química. Como se usa en el presente documento, los ligamientos habitualmente se llevan a cabo de forma enzimática para formar un enlace fosfodiéster entre un carbono 5’ de un nucleótido terminal de un oligonucleótido con carbono 3’ de otro oligonucleótido. Se describe una diversidad de reacciones de ligamiento conducidas por molde en las siguientes referencias. Whitely *et al*, patente de Estados Unidos 4.883.750; Letsinger *et al*, patente de Estados Unidos 5.476.930; Fung *et al*, patente de Estados Unidos 5.593.826; Kool, patente de Estados Unidos 5.426.180; Landegren *et al*, patente de Estados Unidos 5.871.921; Xu y Kool, *Nucleic Acids Research*, 27: 875-881 (1999); Higgins *et al*, *Methods in Enzymology*, 68: 50-71 (1979); Engler *et al*, *The Enzymes*, 15: 3-29 (1982); y Namsaraev, publicación de patente de Estados Unidos 2004/0110213.

10 “Dispositivo microfluídico” significa un sistema integrado de una o más cámaras, orificios y canales que están interconectados y en comunicación fluida y diseñados para llevar a cabo una reacción analítica o proceso, bien solo o bien en cooperación con un aparato o instrumento que proporciona funciones de soporte, tales como introducción de muestras, medios conductores de fluidos y/o reactivos, control de la temperatura y sistema de detección. La microfluídica puede incluir además válvulas, bombas y recubrimientos funcionales especializados en sus paredes interiores, por ejemplo para evitar la adsorción de componentes de la muestra o reactivos, facilitar los movimientos del reactivo por electroósmosis, o similares. Dichos dispositivos se fabrican habitualmente en o como un sustrato sólido, que puede ser vidrio, plástico u otros materiales poliméricos sólidos, y típicamente tienen un formato plano para facilitar la detección y el control del movimiento del reactivo y la muestra, especialmente mediante métodos ópticos o electroquímicos. Los elementos de un dispositivo microfluídico habitualmente tienen dimensiones de sección transversal de menos de algunos cientos de micrómetros cuadrados y los conductos típicamente tienen dimensiones capilares, por ejemplo tienen dimensiones de sección transversal máxima de aproximadamente 1000 μm a aproximadamente 0,1 μm. Los dispositivos microfluídicos típicamente tienen capacidades de volumen en el intervalo de 100 μl a algunos nl, por ejemplo 10-100 nl. La fabricación y el funcionamiento de dispositivos microfluídicos se conocen bien en la técnica como se ejemplifica por las siguientes referencias. Ramsey, patentes de Estados Unidos 6.001.229; 5.858.195; 6.010.607 y 6.033.546; Soane *et al*, patentes de Estados Unidos 5.126.022 y 6.054.034; Nelson *et al*, patente de Estados Unidos 6.613.525; Maher *et al*, patente de Estados Unidos 6.399.952; Ricco *et al*, publicación de patente Internacional WO 02/24322; Bjornson *et al*, publicación de patente Internacional WO 99/19717; Wilding *et al*, patentes de Estados Unidos 5.587.128; 5.498.392.

15 “Nucleósido” como se usa en el presente documento incluye los nucleósidos naturales, incluyendo formas 2’-desoxi y 2’-hidroxilo, por ejemplo como se describe en Kornberg y Baker, *DNA Replication*, 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992). Los “análogos” en referencia a nucleósidos incluyen nucleósidos sintéticos que tienen restos de bases modificados y/o restos de azúcares modificados, por ejemplo descritos por Scheit, *Nucleotide Analogs* (John Wiley, Nueva York, 1980); Uhlman y Peyman, *Chemical Reviews*, 90: 543-584 (1990), o similares, a condición de que tengan capacidad de hibridación específica. Dichos análogos incluyen nucleósidos sintético diseñados para potenciar propiedades de unión, reducir la complejidad, aumentar la especificidad y similares. Se describen polinucleótidos que comprenden análogos con propiedades de resistencia a nucleasa o hibridación potenciadas en Uhlman y Peyman (citado anteriormente); Crooke *et al*, *Exp. Opin. Ther. Patents*, 6: 855-870 (1996); Mesmaeker *et al*, *Current Opinion in Structural Biology*, 5: 343-355 (1995); y similares. Los tipos ejemplares de polinucleótidos que son capaces de potenciar la estabilidad de doble cadena incluyen oligonucleótido N3’→P5’ fosforamidatos (denominados en el presente documento “amidatos”), ácidos nucleicos peptídicos (denominados en el presente documento “PNA”), oligo-2’-O-alkuilribonucleótidos, polinucleótidos que contienen C-5 propinilpirimidinas, ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y compuestos similares. Dichos oligonucleótidos están disponibles en el mercado o pueden sintetizarse usando métodos descritos en la bibliografía.

20 La “reacción en cadena de la polimerasa” o “PCR”, significa una reacción para la amplificación *in vitro* de secuencias de ADN específicas por la extensión de cebadores simultánea de cadenas complementarias de ADN. En otras palabras, la PCR es una reacción para realizar múltiples copias o repeticiones de un ácido nucleico diana flanqueado por sitios de unión a cebadores, comprendiendo dicha reacción una o más repeticiones de las siguientes etapas: (i) desnaturalizar el ácido nucleico diana, (ii) hibridar cebadores con los sitios de unión a cebadores y (iii) extender los cebadores por una polimerasa de ácido nucleico en presencia de nucleósido trifosfatos. Habitualmente, la reacción se hace circular por diferentes temperaturas optimizadas para cada etapa en un instrumento termociclador. Las temperaturas, duraciones de cada etapa y tasas de cambio entre las etapas particulares dependen de muchos factores bien conocidos por los expertos habituales en la materia, por ejemplo ejemplificados por las referencias: McPherson *et al*, editores, *PCR: A Practical Approach* y *PCR2: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991 y 1995, respectivamente). Por ejemplo, en una PCR convencional usando ADN polimerasa Taq, puede desnaturalizarse un ácido nucleico diana bicatenario a una temperatura de >90 °C, los cebadores hibridarse a una temperatura en el intervalo de 50-75 °C, y los cebadores extenderse a una temperatura en el intervalo de 72-78 °C. El término “PCR” abarca formas derivadas de la reacción, incluyendo pero sin limitación, RT-PCR, PCR en tiempo

real, PCR anidada, PCR cuantitativa, PCR múltiple y similares. Los volúmenes de reacción varían de varios cientos de nanolitros, por ejemplo 200 nl, a algunos cientos de μ l, por ejemplo 200 μ l. "PCR de transcripción inversa" o "RT-PCR" significa una PCR que está precedida de una reacción de transcripción inversa que convierte un ARN diana en un ADN monocatenario complementario, que después se amplifica, por ejemplo Tecott *et al*, patente de Estados Unidos 5.168.038.

"PCR en tiempo real" significa una PCR para la que se controla la cantidad de producto de reacción, es decir amplicón, a medida que sucede la reacción. Hay muchas formas de PCR en tiempo real que difieren principalmente en las químicas de detección usadas para controlar el producto de reacción, por ejemplo Gelfand *et al*, patente de Estados Unidos 5.210.015 ("taqman"); Wittwer *et al*, patentes de Estados Unidos 6.174.670 y 6.569.627 (colorantes intercaladores); Tyagi *et al*, patente de Estados Unidos 5.925.517 (balizas moleculares); las químicas de detección para PCR en tiempo real se revisan en Mackay *et al*, *Nucleic Acids Research*, 30: 1292-1305 (2002).

"PCR anidada" significa una PCR de dos estadios en donde el amplicón de una primera PCR se convierte en la muestra de una segunda PCR usando un nuevo conjunto de cebadores, al menos uno de los cuales se une con una localización interior del primer amplicón. Como se usa en el presente documento, "cebadores iniciales" en referencia a una reacción de amplificación anidada significa los cebadores usados para generar un primer amplicón, y "cebadores secundarios" significa el o los cebadores usados para generar un segundo amplicón o amplicón anidado. "PCR múltiple" significa una PCR en donde múltiples secuencias diana (o una única secuencia diana y una o más secuencias de referencia) se llevan a cabo simultáneamente en la misma mezcla de reacción, por ejemplo Bernard *et al*, *Anal. Biochem.*, 273: 221-228 (1999) (PCR en tiempo real de dos colores). Habitualmente, se emplean conjuntos definidos de cebadores para cada secuencia que se amplifica. Típicamente, el número de secuencias diana en una PCR múltiple está en el intervalo de 2 a 10, de 2 a 6 o, más típicamente, de 2 a 4. "PCR cuantitativa" significa una PCR diseñada para medir la abundancia de una o más secuencias diana específicas en una muestra o muestra de ensayo. La PCR cuantitativa incluye tanto cuantificación absoluta como cuantificación relativa de dichas secuencias diana. Las mediciones cuantitativas se realizan usando una o más secuencias de referencia que pueden ensayarse por separado o junto con una secuencia diana. La secuencia de referencia puede ser endógena o exógena de una muestra o muestra de ensayo, y en este último caso, puede comprender uno o más moldes competidores. Las secuencias de referencia endógenas típicas incluyen segmentos de transcritos de los siguientes genes: β -actina, GAPDH, β_2 -microglobulina, ARN ribosómico, y similares. Se conocen bien por los expertos habituales en la materia técnicas para PCR cuantitativa, como se ejemplifica en las siguientes referencias Freeman *et al*, *Biotechniques*, 26:112-126 (1999); Becker-Andre *et al*, *Nucleic Acids Research*, 17: 9437-9447 (1989); Zimmerman *et al*, *Biotechniques*, 21: 268-279 (1996); Diviacco *et al*, *Gene*, 122: 3013-3020 (1992); Becker-Andre *et al*, *Nucleic Acids Research*, 17: 9437-9446 (1989); y similares.

"Polinucleótido" y "oligonucleótido" se usan de forma intercambiable y cada uno significa un polímero lineal de monómeros de nucleótidos. Los monómeros que componen los polinucleótidos y oligonucleótidos son capaces de unirse específicamente con un polinucleótido natural por medio de un patrón regular de interacciones monómero a monómero, tal como un tipo de formación de pares de bases Watson-Crick, apilamiento de bases, tipos de formación de pares de bases de Hoogsteen o Hoogsteen inverso o similares. Dichos monómeros y sus enlaces internucleosídicos pueden ser de origen natural o pueden ser análogos de los mismos, por ejemplo análogos de origen natural o de origen no natural. Los análogos de origen no natural pueden incluir PNA, enlaces internucleosídicos de fosforotioato, bases que contienen grupos de enlace que permiten la unión de marcadores, tales como fluoróforos, o haptenos, y similares. Siempre que el uso de un oligonucleótido o polinucleótido requiera procesamiento enzimático, tal como extensión por una polimerasa, ligamiento por una ligasa, o similares, un experto en la materia entenderá que los oligonucleótidos o polinucleótidos en estos casos no contendrían ciertos análogos de enlaces internucleosídicos, restos de azúcares, o bases en cualquiera o algunas posiciones. Los polinucleótidos típicamente varían de tamaño de algunas unidades monoméricas, por ejemplo 5-40, cuando habitualmente se denominan "oligonucleótidos", a varios miles de unidades monoméricas. Siempre que un polinucleótido u oligonucleótido se represente por una secuencia de letras (mayúsculas o minúsculas), tal como "ATGCCTG", se entenderá que los nucleótidos están en orden 5'→3' de izquierda a derecha y que "A" indica desoxiadenosina, "C" indica desoxicitidina, "G" indica desoxiguanosina y "T" indica timidina, "I" indica desoxiinosina, "U" indica uridina, a no ser que se indique de otro modo o resulte evidente por el contexto. A no ser que se indique de otro modo la terminología y las convenciones de numeración de átomos seguirán las desveladas en Strachan y Read, *Human Molecular Genetics 2* (Wiley-Liss, Nueva York, 1999). Habitualmente los polinucleótidos comprenden los cuatro nucleósidos naturales (por ejemplo desoxiadenosina, desoxicitidina, desoxiguanosina, desoxitimidina para ADN o sus homólogos de ribosa para ARN) unidos por enlaces fosfodiéster; sin embargo, también pueden comprender análogos de nucleótidos no naturales, por ejemplo incluyendo bases modificadas, azúcares o enlaces internucleosídicos. Resulta evidente para los expertos en la materia que cuando una enzima tiene requisitos de sustratos oligonucleotídicos o polinucleotídicos específicos para la actividad, por ejemplo ADN monocatenario, doble cadena de ARN/ADN, o similares, entonces la selección de la composición apropiada para los sustratos oligonucleotídicos o polinucleotídicos está dentro del conocimiento de un experto habitual, especialmente con indicaciones de tratados, tales como Sambrook *et al*, *Molecular Cloning*, Segunda Edición (Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1989) y similares.

“Cebador” significa un oligonucleótido, bien natural o bien sintético que es capaz, tras formar una doble cadena con un molde polinucleotídico, de actuar como un punto de inicio de la síntesis de ácido nucleico y extenderse desde su extremo 3' a lo largo del molde de modo que se forme una doble cadena extendida. La extensión de un cebador se lleva a cabo habitualmente con una polimerasa de ácido nucleico, tal como una ADN o ARN polimerasa. La secuencia de nucleótidos añadida en el proceso de extensión se determina por la secuencia del polinucleótido molde. Habitualmente los cebadores se extienden por una ADN polimerasa. Los cebadores habitualmente tienen una longitud en el intervalo de 14 a 40 nucleótidos, o en el intervalo de 18 a 36 nucleótidos. Los cebadores se emplean en una diversidad de reacciones de amplificación nucleica, por ejemplo, reacciones de amplificación lineales usando un único cebador, o reacciones en cadena de la polimerasa, empleando dos o más cebadores. Se conocen bien por los expertos en la materia directrices para seleccionar las longitudes y secuencias de cebadores para aplicaciones particulares, como resulta evidente por las siguientes referencias.

Dieffenbach, editor, PCR Primer: A Laboratory Manual, 2ª Edición (Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 2003).

“Lectura” significa un parámetro o parámetros, que se miden y/o se detectan, que pueden convertirse a un número o valor. En algunos contextos, la lectura puede referirse a una representación numérica real de dichos datos recogidos o registrados. Por ejemplo, una lectura de señales de intensidad fluorescentes de una micromatriz es la dirección e intensidad de fluorescencia de una señal que se genera en cada sitio de hibridación de la micromatriz; por lo tanto, dicha lectura puede registrarse o almacenarse de diversas maneras, por ejemplo, como una imagen de la micromatriz, como una tabla de números o similares.

“Específico” o “especificidad” en referencia a la unión de una molécula con otra molécula, tal como una secuencia diana marcada para una sonda, significa el reconocimiento, contacto y formación de un complejo estable entre las dos moléculas, junto con sustancialmente menos reconocimiento, contacto o formación de complejo de esa molécula con otras moléculas. En un aspecto, “específico” en referencia a la unión de una primera molécula con una segunda molécula significa que en la medida en que la primera molécula reconoce y forma un complejo con otra molécula en una reacción o muestra, forma el mayor número de los complejos con la segunda molécula. Preferentemente, este mayor número es al menos cincuenta por ciento. Generalmente, las moléculas implicadas en un acontecimiento de unión específico tienen áreas en sus superficies o en cavidades que dan lugar a reconocimiento específico entre las moléculas que se unen entre sí. Los ejemplos de unión específica incluyen interacciones anticuerpo-antígeno, interacciones enzima-sustrato, formación de dobles cadenas o triples cadenas entre polinucleótidos y/u oligonucleótidos, interacciones de receptor-ligando y similares. Como se usa en el presente documento, “contacto” en referencia a especificidad o unión específica significa que dos moléculas están lo suficientemente cerca para que las interacciones químicas no covalentes, tales como fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones de apilamiento de bases, interacciones iónicas e hidrófobas y similares, dominen la interacción de las moléculas.

“Tm” o “temperatura de fusión” significa la temperatura a la que una población de moléculas de ácido nucleico bicatenarias se disocian a la mitad en cadenas individuales. Se conocen bien en la técnica varias ecuaciones para calcular la Tm de ácidos nucleicos. Por ejemplo, puede calcularse una estimación sencilla del valor de Tm por la ecuación $T_m = 81,5 + 0,41 (\% G + C)$, cuando un ácido nucleico está en solución acuosa a NaCl 1 M. Se encuentran métodos para calcular la Tm basados en modelos más completos de la formación y disociación de dobles cadenas en Breslauer *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci., 83: 3746-3750 (1986); y Wetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 26: 227-259 (1991).

“Muestra” significa una cantidad de material de una fuente biológica, ambiental, médica o de paciente en la que se busca la detección o medición de ácidos nucleicos diana. Por un lado se pretende incluir una muestra de ensayo o cultivo (por ejemplo, cultivos microbiológicos). Por otro lado, se pretende incluir muestras tanto biológicas como ambientales. Una muestra puede incluir una muestra de ensayo de origen sintético. Las muestras biológicas pueden ser animales, incluyendo humanas, líquidas, sólidas (por ejemplo, heces) o tisulares, así como productos alimentarios y alimentos líquidos y sólidos e ingredientes tales como productos lácteos, verduras, carne y productos secundarios de carne, y residuos. Las muestras biológicas pueden incluir materiales tomados de un paciente incluyendo, pero sin limitación, cultivos, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, semen, aspirados de aguja y similares. Las muestras biológicas pueden obtenerse de todas las diversas familias de animales domésticos, así como animales salvajes o silvestres, incluyendo, pero sin limitación, animales tales como ungulados, osos, peces, roedores, etc. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia superficial, suelo, agua y muestras industriales, así como muestras obtenidas de instrumentos de procesamiento de alimentos y lácteos, aparatos, equipamiento, utensilios, artículos desechables y no desechables. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de los tipos de muestras aplicables a la presente invención. Los términos “muestra” y “muestra de ensayo” se usan de forma intercambiable.

“Espectralmente resoluble” en referencia a una pluralidad de marcadores fluorescentes significa que las bandas de emisión fluorescente de los marcadores son suficientemente distintas, es decir suficientemente no solapantes. Los marcadores moleculares con los que se unen los marcadores respectivos pueden distinguirse basándose en la señal fluorescente generada por los marcadores respectivos por sistemas de fotodetección convencionales, por ejemplo empleando un sistema de filtros de paso de banda y tubos fotomultiplicadores, o similares, como se ejemplifica por los sistemas descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 4.230.558; 4.811.218, o similares o en Wheelless *et al*,

págs. 21-76, en Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis (Academic Press, Nueva York, 1985).

Breve descripción de las figuras

- 5 Las Figuras 1A-1B ilustran las curvas de señal frente a número de ciclo (o tiempo de reacción) para reacciones de amplificación, tales como PCR en tiempo real.
 La Figura 1C es un diagrama de un aparato para implementar métodos de la invención.
 Las Figuras 2A-2H ilustran en forma de diagrama la implementación de una reacción de amplificación anidada en un sistema de reacción cerrado de forma fluida que emplea una válvula rotatoria y una bomba de fluidos de tipo
 10 pistón.
 Las Figuras 3A-3C ilustran en forma de diagrama cámaras de reacción alternativas para implementar ciertas realizaciones de la invención.

Descripción detallada de la invención

- 15 La invención se refiere a métodos para llevar a cabo reacciones de amplificación de múltiples estadios, especialmente en condiciones cerradas de forma fluida. En un aspecto, los métodos de la invención se llevan a cabo en un sistema de reacción cerrado de forma fluida que permite el aislamiento de una parte de una primera mezcla de reacción (o anterior) y su uso como una muestra o muestra de ensayo en una segunda mezcla de reacción (o posterior), evitando de este modo sustancialmente los efectos de interferencia que pueden tener los componentes de la primera reacción en la segunda reacción si ambas mezclas de reacción simplemente se combinaran entre sí. En este aspecto, los métodos de la invención pueden usarse con cualquier reacción de amplificación que permita
 20 múltiples estadios de amplificación basándose en el uso de cebadores anidados.

- 25 En particular, son adecuados para llevar a cabo reacciones de NASBA y PCR de dos estadios, o anidadas. Como ejemplo, se describen a continuación condiciones de reacción básicas para reacciones de NASBA y PCR anidadas; sin embargo, un experto habitual en la técnica apreciará que el mismo principio de usar cebadores anidados en reacciones de PCR o NASBA para conseguir mayor sensibilidad puede aplicarse de forma similar en otras reacciones de amplificación usando uno o más cebadores. En otro aspecto la invención también proporciona reacciones de RT-PCR de dos estadios en sistemas de reacción cerrados de forma fluida, en donde puede realizarse una PCR de segundo estadio sin que componentes de la reacción de RT afecten a la PCR posterior, por ejemplo Sellner *et al*, Nucleic Acids Research, 20: 1487 (1992). En un aspecto adicional, la invención proporciona una reacción de tres estadios en donde se realiza una reacción de transcriptasa inversa para convertir una o más dianas de ARN en uno o más ADN monocatenarios complementarios que, a su vez, se amplifican en una reacción
 30 de amplificación de dos estadios, tal como una PCR anidada de transcriptasa inversa o "RT-nPCR".

- Como se ha mencionado anteriormente, se describe un aparato para realizar una reacción de dos etapas, comprendiendo dicho aparato: a) un cuerpo que tiene un primer y segundo canales formados en el mismo; y b) un
 40 recipiente de reacción que se extiende desde el cuerpo, teniendo el recipiente de reacción: i) una cámara de reacción para recibir el líquido; ii) un orificio de entrada conectado con la cámara de reacción mediante un canal de entrada; iii) un orificio de salida conectado con la cámara de reacción mediante un canal de salida y iv) un miembro de retención en la cámara de reacción, estando situado el miembro de retención para retener una parte definida del líquido en la cámara de reacción mientras que el resto del líquido se retira a través del canal de salida, en donde el orificio de entrada del recipiente está conectado con el primer canal en el cuerpo y en donde el orificio de salida del
 45 recipiente está conectado con el segundo canal en el cuerpo. El aparato de la invención incluye además un agujero en comunicación fluida con el segundo canal para purgar gas del segundo canal. El aparato de la invención comprende además una fuente de presión diferencial para obligar al fluido en el primer canal en el cuerpo a que fluya a través del orificio de entrada del recipiente y a la cámara de reacción. El recipiente de la invención incluye además: i) un marco rígido que define paredes laterales de la cámara de reacción; y ii) primera y segunda películas
 50 poliméricas unidas en extremos opuestos del marco rígido para formar paredes principales opuestas de la cámara de reacción. El cuerpo del aparato incluye además una cámara de mezcla para mezclar una muestra fluida con reactivos de amplificación, estando la cámara de mezcla conectada con el orificio de entrada del recipiente mediante el primer canal. El cuerpo del aparato incluye además una cámara de residuos para recibir el resto del líquido retirado a través del canal de salida, estando la cámara de residuos conectada con el orificio de salida del recipiente mediante el segundo canal. El cuerpo del aparato ha formulado además en el mismo: i) una ruta de flujo de la muestra; y ii) una región de separación en la ruta de flujo de la muestra para separar un analito deseado de una muestra de fluido, estando la región de separación conectada con el orificio de entrada del recipiente mediante el primer canal. En un aspecto, la región de separación en el cuerpo comprende: a) una cámara de lisado en la ruta de flujo de la muestra para lisar células o virus en la muestra para liberar material de los mismos; y b) al menos un soporte sólido situado en la cámara de lisado para capturar las células o virus para lisar. El recipiente del aparato incluye una pluralidad de paredes que definen la cámara de reacción, comprendiendo al menos una de las paredes una lámina o película flexible, y el aparato comprende además: a) al menos una superficie térmica para poner en contacto la lámina o película, b) medios para aumentar la presión en la cámara de reacción, en donde el aumento de presión en la cámara es suficiente para obligar a la película o lámina a adaptarse a la superficie térmica; y c) al menos un elemento térmico para calentar o enfriar la superficie para inducir un cambio de temperatura dentro de la
 60 cámara.
 65

5 El recipiente del aparato incluye además dos paredes principales opuestas y paredes laterales que conectan las paredes principales entre sí para formar la cámara de reacción, al menos dos de las paredes laterales son ópticamente transmisoras y están dispuestas en ángulo entre sí, y el aparato comprende además un sistema óptico que tiene al menos una fuente de luz para transmitir luz a la cámara de reacción a través de una primera de las paredes laterales ópticamente transmisoras y que tiene al menos un detector para detectar luz emitida de la cámara a través de una segunda de las paredes laterales ópticamente transmisoras.

Reacciones de amplificación anidadas

10 Como se ha mencionado anteriormente con respecto a PCR, las reacciones de amplificación anidadas son reacciones de múltiples estadios en las que un amplicón de un estadio anterior actúa como una muestra para un estadio sucesivo usando un nuevo cebador o par de cebadores que se unen con al menos una localización interior en el amplicón producido anteriormente. Dentro de cada estadio de una región de amplificación anidada, la reacción de amplificación sucede de una manera convencional. Las elecciones de diseño para concatenar reacciones de amplificación individuales en una reacción de amplificación anidada incluyen las siguientes: (i) el número de ciclos o duración de cada estadio, (ii) el tamaño de una parte efectiva de una mezcla de reacción de primer estadio para actuar como la muestra para una reacción de segundo estadio, (iii) la selección del sitio o los sitios de unión interiores para cebadores de segundo estadio, (iv) si las secuencias de referencia deberían amplificarse en cada estadio, (v) si se debería procesar el mismo tipo de reacción de amplificación en cada estadio, por ejemplo para reacciones de amplificación anidadas de dos estadios: PCR-PCR, NASBA-NASBA, PCR-NASBA, y similares. Habitualmente las reacciones de amplificación anidadas son PCR sucesivas o reacciones NASBA sucesivas y se llevan a cabo en condiciones de reacción convencionales.

25 En un aspecto de la invención, cuando una PCR es un estadio de una reacción de amplificación anidada, el número de ciclos en la PCR está en el intervalo de 20 a 40, o en el intervalo de 24 a 36. En otro aspecto, el número de ciclos es un número suficiente para producir una cantidad predeterminable de amplicón que, a su vez, produce una señal predeterminada en una química de generación de señal en tiempo real. Si una reacción de amplificación anidada comprende dos PCR sucesivas, el número de ciclos y otras condiciones de reacción en las PCR sucesivas puede ser el mismo o diferente.

30 Para una reacción de primer estadio, o anterior, en un aspecto, una parte efectiva es una cantidad suficiente para permitir el inicio de una reacción de segundo estadio. En un aspecto, una parte efectiva es una cantidad suficiente para proporcionar en una reacción de segundo estadio una concentración diana de al menos 1 polinucleótido diana por μl , en otro aspecto al menos 10 polinucleótidos diana por μl , en otro aspecto, al menos 50 polinucleótidos diana por μl , en otro aspecto, al menos 100 polinucleótidos diana por μl , en otro aspecto, al menos 500 polinucleótidos diana por μl o, en otro aspecto, al menos 1000 polinucleótidos diana por μl . En otro aspecto, una parte efectiva es una cantidad que es de 0,5 a 10 por ciento del volumen de la mezcla de reacción de primer estadio, o una cantidad que es del 1 al 5 por ciento del volumen de la mezcla de reacción de primer estadio. Como se indica posteriormente, en algunas realizaciones, para retirar una parte efectiva con mayor precisión y para minimizar el error en la toma de muestras, se diluye una mezcla de reacción de primer estadio antes de la retirada o el aislamiento de una parte. Por ejemplo, para obtener una parte del 10 por ciento de una mezcla de reacción de primer estadio que tiene un volumen de 1 μl , se puede diluir a 10 μl seguido de la retirada de 1 μl de la mezcla diluida, en lugar de retirar directamente 0,1 μl de la mezcla no diluida. En general, los reactivos en una reacción de amplificación de segundo estadio pueden ser iguales que los de la reacción de primer estadio, con al menos la siguiente excepción: uno o más cebadores son distintos en la reacción de segundo estadio, pero las concentraciones de los cebadores en la reacción de segundo estadio son convencionales. Los esquemas generadores de señal en las reacciones de amplificación de primer estadio y segundo estadio pueden ser iguales o diferentes.

50 Se proporciona un método para iniciar automáticamente una reacción de amplificación de segundo estadio (o estadio posterior) bajo control de bucle abierto o control de bucle cerrado. En realizaciones con control de bucle abierto, se lleva a cabo una reacción de amplificación de primer estadio durante un número de ciclos predeterminado o durante un tiempo de reacción predeterminado, después de lo cual se aísla una parte efectiva de la mezcla de reacción, combinada con reactivos de segundo estadio y se inicia una reacción de amplificación de segundo estadio. En dichas realizaciones, el control en tiempo real de los amplicones de primer estadio es opcional. De acuerdo con la invención, en realizaciones con control de bucle cerrado, se controla un parámetro de reacción de una reacción de amplificación de primer estadio y cuando toma un valor predeterminado, o cruza un valor umbral predeterminado, la reacción de primer estadio se detiene, se aísla una parte efectiva de la mezcla de reacción, combinada con reactivos de segundo estadio, y se inicia una reacción de amplificación de segundo estadio. El parámetro de reacción usado para determinar cuándo iniciar la amplificación de segundo estadio puede ser cualquier parámetro que tenga una relación bien definida con la acumulación de productos de reacción o, en otras palabras, con el grado de completación de dicha reacción de primer estadio. Preferentemente, el parámetro de reacción tiene una relación monotónica con la acumulación de uno o más productos en la reacción de primer estadio, de modo que el aumento de los valores del parámetro puede correlacionarse de forma positiva o negativa con la cantidad o las cantidades de dichos productos, que habitualmente son uno o más amplicones. En particular, el parámetro de reacción se basa en una o más señales fluorescentes. En un aspecto, un parámetro de reacción está relacionado monotónicamente con la

concentración de al menos un amplicón en la reacción de primer estadio. Dicho amplicón puede producirse a partir de un polinucleótido diana, o una secuencia de referencia u otro patrón interno. Por lo tanto, en una PCR anidada con control de bucle cerrado, la reacción de amplificación de primer estadio es una PCR en tiempo real. En un aspecto de la invención, el parámetro de reacción es un amplicón detectado por un indicador fluorescente cuya señal está relacionada monotónicamente con la concentración del amplicón en la mezcla de reacción. Cuando hay variabilidad en la cantidad o calidad del ácido nucleico diana en una muestra o muestra de ensayo, el control de bucle cerrado de la reacción de segundo estadio puede producir una lectura más uniforme y menos variable.

En un aspecto, el amplicón de una o más secuencias de referencia, u otro patrón interno, se controla para determinar cuándo iniciar una reacción de segundo estadio.

Los amplicones tanto de un patrón interno como de un polinucleótido diana pueden alcanzar o superar los niveles predeterminados, que pueden ser los mismos o diferentes, para iniciar una reacción de segundo estadio.

En otro aspecto de la invención, cuando una reacción de amplificación de primer estadio es una PCR bajo control de bucle abierto, el número de ciclos llevado a cabo antes del inicio de una reacción de segundo estadio está en el intervalo de entre 20 y 40 o, en otro aspecto, en el intervalo de entre 20 y 30. En otro aspecto, cuando se detiene una reacción de amplificación de primer estadio y se inicia una reacción de amplificación de segundo estadio después de un tiempo predeterminado, el tiempo predeterminado puede seleccionarse de forma empírica para el tipo de muestra particular que se analiza. Por ejemplo, en muestras que tienen secuencias de referencia, puede seleccionarse un tiempo predeterminado como el tiempo medio que se tarda en amplificar una secuencia de referencia seleccionada hasta cierta fracción, por ejemplo un cuarto, tercio, mitad o similar, de su valor meseta en una muestra media.

Cuando una reacción de amplificación de primer estadio está bajo control de bucle cerrado, el valor del parámetro de reacción de primer estadio en el que se inicia la reacción de segundo estadio puede seleccionarse de diversas maneras. En un aspecto, el valor se determina en función de un valor de nivel de señal de línea basal, o ruido de fondo, o como una característica de una función que describe la acumulación de uno o más amplicones en la mezcla de reacción, como se ilustra en las Figuras 1A y 1B. En la Figura 1A, las curvas (1000) y (1002) representan amplicón acumulado de, por ejemplo, una secuencia de referencia y polinucleótido diana, respectivamente, como se determina por dos señales fluorescentes diferentes generadas por sondas específicas de amplicón, por ejemplo balizas moleculares que tienen colorantes fluorescentes que emiten fluorescencia a longitudes de onda distinguibles. Dichas curvas son típicamente sigmoideas como se ilustra, teniendo cada una una región de pendiente positiva baja por debajo de un nivel de ruido, o señal de línea basal, (1004), una región lineal logarítmica (1010) de pendiente positiva alta, y una región de meseta (1012) de pendiente positiva baja que se corresponde con el estadio en la reacción donde los reactivos se agotan y/o se acumulan los productos secundarios de interferencia. En un aspecto de la invención, se inicia una reacción de segundo estadio cuando la curva (1002) del amplicón diana alcanza o supera un nivel predeterminado (1006) que puede estar en función de la señal de línea basal (1004). En otro aspecto, se inicia una reacción de segundo estadio cuando tanto la curva (1002) del amplicón diana como la curva (1000) de una secuencia de referencia alcanzan o superan un nivel predeterminado (1006). La selección del nivel predeterminado (1006) es una elección de diseño rutinaria para un experto habitual en la materia que puede depender de diversos factores, por ejemplo la probabilidad de que la secuencias estrechamente relacionadas con la diana se amplifiquen en la reacción de primer estadio (es decir, falta de especificidad en un ensayo), la calidad de la muestra y el grado en que contribuye al valor de señal de línea basal, el tipo de reacción de amplificación usado, el sistema de detección de señal empleado, y similares. En un aspecto, el nivel predeterminado (1006) es un múltiplo del valor de señal de línea basal (1004). Como ejemplo, el nivel predeterminado (1006) puede seleccionarse de un intervalo entre 1,5 y 25 veces un valor de señal de línea basal. En otro aspecto, el nivel predeterminado (1006) es 1,5 veces el valor de señal de línea basal, 2 veces el valor de señal de línea basal, 3 veces el valor de señal de línea basal, 5 veces el valor de señal de línea basal o 10 veces el valor de señal de línea basal. Un valor de señal de línea basal puede ser una función, por ejemplo una media, de las medidas de fluorescencia de un número predeterminado de ciclos, o para un intervalo de tiempo predeterminado, cerca del comienzo de una reacción de amplificación. Las medidas de fluorescencia pueden ser, o incluir, medidas de señales del mismo canal que para la señal fluorescente generada por el amplicón que se controla. En un aspecto, un valor de señal de línea basal está en función de los 10, 25, 50 o 100 valores de señal óptica iniciales medidos para al menos una curva de crecimiento de amplicón. En un aspecto, dicha función es una media aritmética de dichos valores de señal óptica iniciales. Preferentemente, el nivel predeterminado (1006) se interseca con la curva (1002) y/o curva (1000) en sus regiones lineales logarítmicas respectivas (1010). Se identifican y/o miden amplicones con indicadores fluorescentes.

En otro aspecto, el valor de un parámetro de reacción en el que se inicia una reacción de segundo estadio puede determinarse por una característica de una curva que describe la relación de un amplicón acumulado y el número de ciclo o tiempo en una reacción de amplificación, como se ilustra en la Figura 1B (denominada en el presente documento "curva de crecimiento de amplicón"). Como en la Figura 1A, la curva (1013) y la curva (1015) describen la acumulación de amplicones correspondientes a una secuencia de referencia y un polinucleótido diana, respectivamente. Ambas curvas en cada punto tienen pendientes positivas, sin embargo, la magnitud de las pendientes cambia desde el principio de la reacción hasta el final de la reacción, siendo las pendientes planas al comienzo, inclinadas en la región lineal logarítmica, y planas de nuevo en la región de meseta. Si se toma la

derivada de dicha curva, se produce una función aproximadamente simétrica (1018) que tiene un máximo en el tiempo o valor de ciclo (1019). El valor (1019) es una raíz de la primera derivada de la curva (1015). El valor (1019) se corresponde con el punto (1014) en el que la pendiente de la curva (1015) para de crecer y comienza a decrecer, es decir, es un punto de inflexión, que se localiza aproximadamente en el medio de la región lineal logarítmica, lo que lo hace una característica atractiva de la curva (1015) para determinar un valor señal (1022) en el que iniciar una reacción de segundo estadio. En otro aspecto, puede determinarse una segunda derivada de la curva (1015) para producir otra función aproximadamente simétrica ilustrada por la curva (1021). La raíz de la curva (1021) proporciona otra característica candidata para determinar un valor señal, por ejemplo (1023), en el que iniciar una reacción de segundo estadio. La determinación de valores de señal correspondientes a dichas características de curvas (1015) que describen la acumulación del amplicón se desvela en McMillan *et al*, patente de Estados Unidos N° 6.783.934, que se incorpora en el presente documento por referencia. Como se ha mencionado anteriormente, la expresión "curva de crecimiento de amplicón" significa una curva, tal como las curvas (1000), (1002), (1013) o (1015), que describe la acumulación del amplicón en una mezcla de reacción en función del número de ciclo o tiempo, o en función de un parámetro relacionado, por ejemplo la temperatura en una reacción de amplificación con temperatura no regulada, o similares. Se entiende que las características, tales como primera o segunda derivadas, de las curvas de crecimiento del amplicón se calculan repetidas veces durante un ensayo a medida que se recogen datos que componen la curva. También se entiende que debido a la naturaleza en tiempo real de los anteriores ensayos, puede ser posible solamente determinar ciertas características de una curva de crecimiento de amplicón retrospectivamente; por lo tanto, dichas características pueden no ser adecuadas en todas las situaciones para determinar cuándo debería iniciarse una reacción de amplificación de segundo estadio. La selección de una característica apropiada de una curva de crecimiento de amplicón para determinar cuándo iniciar una reacción de amplificación de segundo estadio es una elección de diseño rutinaria para un experto habitual en la materia.

De acuerdo con la invención, se implementa el control de bucle cerrado del inicio de una reacción de segundo estadio detectando una señal óptica correspondiente a un parámetro de reacción que alcanza o supera un valor predeterminado. El parámetro de reacción es la concentración de un amplicón, habitualmente el amplicón correspondiente a un polinucleótido diana. Está disponible una diversidad de esquemas generadores de señal fluorescente para producir una señal fluorescente en una región de amplificación que está relacionada monotónicamente con la concentración de amplicón. Dichos esquemas generadores de señal fluorescente incluyen, pero sin limitación, balizas moleculares, colorantes de intercalación, tales como verde SYBR, sondas taqman, cebadores Amplifluor™, cebadores "scorpion", y similares, que se desvelan en referencias citadas anteriormente. Puede emplearse una diversidad de sistemas de instrumentación para llevar a cabo dicho control de bucle cerrado basándose en una señal óptica generada por un parámetro de reacción, tal como la concentración de amplicón. Como se describe más completamente posteriormente, en un aspecto, un sistema de detección óptica multicanal desvelado por Christel *et al*, patente de Estados Unidos 6.369.893 es adecuado para dichas mediciones. Un esquema de dicho sistema aplicable a la presente invención se ilustra en la Figura 1C. Christel *et al*. proporcionan diodos emisores de luz LED (1050) a (1056) para iluminar una mezcla de reacción en una cámara de reacción (1070). La fluorescencia excitada por los LED (1050) a (1056) se recoge por los detectores (1060) a (1066), que típicamente están asociados operativamente con un filtro de paso de banda que restringe la longitud de onda de luz que se detecta. Los haces de excitación de LED (1050) a (1056) pueden ser iguales o diferentes. En un aspecto, se seleccionan filtros de paso de banda para pasar selectivamente fluorescencia emitida por una pluralidad de colorantes fluorescentes espectralmente resolubles de modo que cada detector (1060) a (1066) recoge fluorescencia principalmente de solamente uno de la pluralidad de colorantes fluorescentes. Para su uso con la presente invención, uno de los pares de LED-detector, por ejemplo (1052) y (1062), se localiza para detectar la señal fluorescente de un amplicón correspondiente a un polinucleótido diana, y uno de los pares LED-detector, por ejemplo (1056) y (1066) se localiza para detectar la señal de fluorescencia de un amplicón correspondiente a una secuencia de referencia.

El control de todos los componentes del sistema de detección y sistema de reacción cerrado de forma fluida (1086) se controla por un microprocesador (1080). Se procesan señales ópticas recogidas por los detectores (1060) a (1066) por óptica convencional y se convierten en señales eléctricas que, después de la preamplificación y condicionamiento convencionales (1082), se digitalizan para su almacenamiento y/o procesamiento adicional por el microprocesador (1080). En un aspecto de la invención, el microprocesador (1080) se programa para controlar continuamente el valor de la señal recogido por uno de los detectores, tal como el detector (1062). Cuando el valor alcanza o supera un nivel preprogramado, entonces el microprocesador (1080) inicia una subrutina que proporciona controladores (1084) con una serie de comandos para accionar componentes de un sistema de reacción cerrado de forma fluida (1086) para iniciar una reacción de amplificación de segundo estadio. El microprocesador (1080) también cambian y/o regula la temperatura de la cámara de reacción (1070) mediante el controlador (1088). Se consigue preferentemente control de la temperatura con una o más placas de calentamiento que tienen elementos de calentamiento resistentes y un ventilador de enfriamiento como se enseña en Chang *et al*. Patente de Estados Unidos 6.565.815 y Patente de Estados Unidos 6.391.541 cuyas divulgaciones se incorporan por referencia en el presente documento. En realizaciones que emplean control de bucle cerrado, el microprocesador (1080) puede calcular valores de características de curvas, tales como (1013) o (1015) de la Figura 1B, a niveles predeterminados de modo que pueden compararse con un nivel predeterminado. Cuando dicho valor calculado alcanza o supera un valor predeterminado, entonces el microprocesador (1080) inicia la subrutina para iniciar una reacción de amplificación de segundo estadio, como se ha descrito anteriormente.

Como se ha mencionado anteriormente, un ordenador realiza preferentemente las etapas del método de iniciar una reacción de segundo estadio, como se ha descrito anteriormente. En una realización, un ordenador comprende una unidad de procesamiento, memoria, dispositivo I/O y estructuras de bus de datos/dirección asociadas para comunicar la información entre ellos. La unidad de procesamiento puede ser un microprocesador convencional controlado por un sistema operativo apropiado, incluyendo procesadores RISC y CISC, un microprocesador dedicado que emplea software inalterable incluido, o un circuito de procesamiento de señal digital adaptado (DSP), que está dedicado a las tareas de procesamiento específicas del método. La memoria puede estar dentro del microprocesador, es decir caché de nivel 1, S-RAM rápida, es decir cache de nivel 2, D-RAM, o disco, bien óptico o bien magnético. El dispositivo I/O puede ser cualquier dispositivo capaz de transmitir información entre el ordenador y el usuario, por ejemplo un teclado, ratón, tarjeta de red o similares. El bus de direcciones/datos puede ser un bus de PCI, bus de NU, ISA o cualquier otra estructura de bus similar. Cuando el ordenador realiza el método de la invención, las etapas del método anteriormente descrito pueden realizarse en un programa almacenado en un producto legible por ordenador. Dicho producto legible por ordenador también puede incluir programas para interfaces de usuario gráficas y programas para cambiar los ajustes de sistemas de electroforesis o dispositivos de recogida de datos. En un aspecto, la invención proporciona algoritmos y productos legibles por ordenador para controlar las operaciones descritas en la Figura 1C en un sistema de reacción cerrado de forma fluida seleccionado.

En un aspecto, un producto legible por ordenador comprende un programa para su ejecución por un ordenador para controlar el rendimiento de una reacción de amplificación anidada en un sistema de reacción cerrado de forma fluida. En una realización, dicho programa puede comprender instrucciones para lo siguiente: (a) leer los valores de una señal óptica de una reacción de amplificación de primer estadio, estando la señal óptica relacionada monotónicamente con una concentración de un amplicón en la reacción de amplificación de primer estadio, y teniendo los valores de la señal óptica un valor más reciente; (b) determinar un nivel de señal de línea basal a partir de los valores de la señal óptica; (c) calcular un nivel predeterminado a partir de los valores de la señal óptica; (d) comparar el valor predeterminado con el valor más reciente de la señal óptica; (e) iniciar una reacción de amplificación de segundo estadio siempre que el valor más reciente de la señal óptica sea igual a o mayor que el nivel predeterminado; y (f) repetir las etapas (d) y (e) hasta que se inicie la reacción de segundo estadio. Como se usa en el presente documento, "un valor más reciente" en referencia a una señal óptica significa el valor correspondiente a la medición más reciente de una señal óptica por un sistema de detección que controla la reacción de amplificación. En otras palabras, es el valor más reciente de una curva de crecimiento de amplicón como se genera en el transcurso de una reacción de amplificación.

En otro aspecto, se describe un producto legible por ordenador que comprende un programa para su ejecución por un ordenador para controlar el rendimiento de una reacción de amplificación anidada en un sistema de reacción cerrado de forma fluida. En una realización, dicho programa puede comprender instrucciones para lo siguiente: (a) leer los valores de una señal óptica a partir de una reacción de amplificación de primer estadio, estando la señal óptica relacionada con una cantidad o concentración de un amplicón en la reacción de amplificación de primer estadio; (b) determinar a partir de los valores de la señal óptica si se ha producido un cruce del umbral; y (c) iniciar una reacción de amplificación de segundo estadio si y cuando se haya producido el cruce del umbral.

Las PCR anidadas son adecuadas para su uso en el aparato anterior, por ejemplo, cuando las reacciones tanto de primer estadio como de segundo estadio son PCR en tiempo real. Como ejemplo, una reacción de amplificación de primer estadio puede ser una PCR en tiempo real en la que se usa un cebador en horquilla Amplifluor™ para generar una señal fluorescente cuya intensidad está relacionada monotónicamente con un amplicón, por ejemplo Whitcombe *et al*, Nature Biotechnology, 17: 804-808 (1999). La reacción de amplificación de segundo estadio puede usar el mismo esquema de marcaje o uno diferente. Brevemente, un cebador en horquilla Amplifluor™ tiene una parte de unión a diana, que se selecciona como con un cebador convencional, y una parte en horquilla en el extremo 5' de la parte de unión a diana, que mantiene un par de fluoróforo-interruptor en proximidad estrecha siempre que esté presente la horquilla, interrumpiendo de este modo cualquier señal fluorescente del fluoróforo. Durante la etapa de extensión inversa de la PCR, la región bicatenaria de la horquilla se desplaza a medida que la cadena inversa se extiende por ella hasta el extremo del polinucleótido diana, moviendo de este modo el interruptor lejos de las cercanías del fluoróforo de modo que se genere una señal fluorescente. A medida que se acumula el producto de ADN bicatenario, la señal fluorescente de la mezcla de reacción aumenta. Cuando la intensidad de la señal fluorescente alcanza o supera un nivel predeterminado, por ejemplo tres veces la línea basal, la PCR se detiene y se aísla una parte efectiva de la mezcla de reacción, después de lo cual se combina con reactivos de segundo estadio. Retirando una parte efectiva de la primera mezcla de reacción (y por lo tanto una parte del primer amplicón) y tratándola como una muestra o muestra de ensayo para su amplificación en una segunda reacción separada, puede eliminarse sustancialmente la interferencia de los componentes de primera reacción, tales como la fluorescencia de los cebadores extendidos Amplifluor™.

También pueden implementarse reacciones de NASBA anidadas de modo que se inicie la NASBA de segundo estadio después de que una señal generada relacionada con un parámetro de reacción alcanza o supera un nivel predeterminado. Una reacción de NASBA se basa en la actividad simultánea de una transcriptasa inversa (habitualmente transcriptasa inversa de virus de mieloblastosis aviar (AMV)), y RNasa H y una ARN polimerasa (habitualmente ARN polimerasa T7) con dos cebadores oligonucleotídicos que, en condiciones convencionales, pueden producir una amplificación de una secuencia diana deseada por un factor en el intervalo de 10^9 a 10^{12} en 90

a 120 minutos. En una reacción de NASBA, los ácidos nucleicos son un molde para la reacción de amplificación solamente si son monocatenarios y contienen un sitio de unión de cebadores. Debido a que NASBA es isotérmica, (habitualmente llevada a cabo a 41 °C con las enzimas anteriores), puede conseguirse amplificación específica de ARN monocatenario si se evita la desnaturalización de ADN bicatenario en el procedimiento de preparación de muestras. Es decir, es posible detectar una diana de ARN monocatenaria en un fondo de ADN bicatenario sin obtener resultados de falsos positivos provocados por ADN genómico complejo, a diferencia de otras técnicas, tales como RT-PCR. Usando indicadores fluorescentes compatibles con la reacción, tales como balizas moleculares, pueden llevarse a cabo NASBA con detección en tiempo real del amplicón. Las balizas moleculares son oligonucleotídicos de estructura de tallo y bucle, con un marcador fluorescente en un extremo y un interruptor en el otro extremo, por ejemplo 5'-fluoresceína y 3'-ácido (4-(dimetilamino)fenil)azo benzoico (es decir, 3'-DABCYL), como se desvela en Tyagi y Kramer (citado anteriormente). Una baliza molecular ejemplar puede tener cadenas de tallo complementarias de seis nucleótidos, por ejemplo 4 G o C y 2 A o T y un bucle específico de diana de aproximadamente 20 nucleótidos, de modo que la baliza molecular puede formar un híbrido estable con una secuencia diana a temperatura de reacción, por ejemplo 41 °C. Una mezcla de reacción de NASBA típica es Tris-HCl 80 mM [pH 8,5], MgCl₂ 24 mM, KCl 140 mM, DTT 1,0 mM, 2,0 mM de cada dNTP, 4,0 mM de cada uno de ATP, UTP y CTP, GTP 3,0 mM e ITP 1,0 mM en DMSO 30 %. La concentración de cebadores es 0,1 μM y la concentración de balizas moleculares es 40 nM. La mezcla enzimática es 375 sorbitol, 2,1 μg de BSA, 0,08 U de RNasa H, 32 U de ARN polimerasa T7 y 6,4 U de transcriptasa inversa AMV. Una reacción puede comprender 5 μl de muestra, 10 μl de mezcla de reacción de NASBA y 5 μl de mezcla de enzima, para un volumen de reacción total de 20 μl. Se desvelan directrices adicionales para llevar a cabo reacciones de NASBA en tiempo real en las siguientes referencias que se incorporan por referencia: Polstra *et al*, BMC Infectious Diseases, 2: 18 (2002); Leone *et al*, Nucleic Acids Research, 26: 2150-2155 (1998); Gulliksen *et al*, Anal. Chem., 76: 9-14 (2004); Weusten *et al*, Nucleic Acids Research, 30(6) e26 (2002); Deiman *et al*, Mol. Biotechnol., 20: 163-179 (2002). Se llevan a cabo reacciones de NASBA anidadas de forma similar a PCR anidadas; concretamente el amplicón de una primera reacción de NASBA se convierte en la muestra para una segunda reacción de NASBA usando un nuevo conjunto de cebadores, al menos uno de los cuales se une con una localización interior del primer amplicón.

Como se ha mencionado anteriormente, en un aspecto, la invención proporciona métodos para realizar reacciones de transcriptasa inversa en serie con una o más reacciones de amplificación en un sistema de reacción cerrado de forma fluida. En una realización, una o más secuencias de ARN, tales como ARNm seleccionadas extraídas de una muestra tisular o celular, puede amplificarse de la siguiente manera: (i) transcribiendo una o más secuencias de ARN en un sistema de reacción cerrado de forma fluida para formar una o más secuencias de ADN monocatenarias complementarias usando reactivos de transcriptasa inversa en una primera mezcla de reacción; (ii) aislar una primera parte efectiva de la primera mezcla de reacción en el sistema de reacción cerrado de forma fluida; y (iii) amplificando en el sistema de reacción cerrado de forma fluida la o las secuencias de ADN monocatenarias complementarias en la primera parte efectiva usando reactivos de amplificación del primer estadio en una segunda mezcla de reacción para formar uno o más primeros amplicones, incluyendo los reactivos de amplificación de primer estadio cebadores iniciales para cada una de las secuencias de ADN monocatenarias complementarias. La etapa de transcripción se lleva a cabo con una reacción de transcriptasa inversa convencional, cuyos componentes, es decir reactivos de transcriptasa inversa, están fácilmente disponibles en el mercado, por ejemplo de Ambion. Aproximadamente, en esta realización, la reacción de transcriptasa inversa se trata de forma similar a una reacción de amplificación de primer estadio en una PCR anidada, como se ha descrito anteriormente. Es decir, se aísla una parte efectiva (una "primera parte efectiva") de la mezcla de reacción de transcriptasa inversa, preferentemente conservando dicha parte en una cámara de reacción, mientras que el resto de la mezcla se descarta. En esta realización, dicha primera parte efectiva significa que la parte contiene una cantidad suficiente de ADN monocatenario complementario que puede detectarse por reacciones de amplificación posteriores. Por lo tanto, las definiciones para la parte efectiva proporcionadas anteriormente son aplicables a una primera parte efectiva en esta realización. Como se ha mencionado anteriormente, la reacción de dos estadios anterior puede seguirse de una amplificación anidada de tercer estadio. Este aspecto del método se realiza por las siguientes etapas adicionales: (i) aislar una segunda parte efectiva de dicha segunda mezcla de reacción en dicho sistema de reacción cerrado de forma fluida; y (ii) amplificar en dicho sistema de reacción cerrado de forma fluida dichos uno o más primeros amplicones en dicha segunda parte efectiva usando reactivos de amplificación de segundo estadio en una tercera mezcla de reacción para formar uno o más segundos amplicones, incluyendo los reactivos de amplificación de segundo estadio al menos un cebador secundario para cada uno de los uno o más primeros amplicones, de modo que cada cebador secundario esté anidado en dicho primer amplicón en relación con dicho cebador inicial de dicho primer amplicón. Preferentemente, el aspecto anterior de la invención se realiza como una RT-nPCR en un sistema de reacción cerrado de forma fluida.

Sistemas para implementar métodos de la invención

Los métodos de la invención pueden implementarse por una diversidad de sistemas y aparatos que se basan en diferentes enfoques de ingeniería genética para secuestrar reactivos, mover reactivos y productos de reacción en y fuera de las reacciones, controlar la temperatura y detener los productos de reacción. La selección de un sistema depende de muchos factores incluyendo, pero sin limitación, disponibilidad de muestras o muestras de ensayo, forma de las muestras o muestras de ensayo, grado de peligro o infecciosidad presentado por las muestras o

muestras de ensayo, idoneidad de portabilidad, naturaleza de la reacción de amplificación empleada y similares. Los sistemas ejemplares que pueden usarse para implementar métodos de la invención incluyen sistemas de reacción cerrados de forma fluida que emplean una válvula rotatoria y una bomba fluida de tipo pistón bajo el control de un microprocesador, tal como se desvela en Christel *et al*, patente de Estados Unidos 6.369.893 y Dority, patente de Estados Unidos 6.374.684; cubetas desechables cerradas que tienen depósitos de reactivos flexibles para conducir mecánicamente muestras, reactivos y productos a través de cámaras de reacción y estaciones de detección, como se desvela en Schnipelsky *et al*, patente de Estados Unidos 5.229.297; y Findlay *et al*, Clin. Chem., 39: 1927-1933 (1993); y dispositivos microfluidicos, tales como se desvelan en las referencias citadas en Definiciones, y se desvelan adicionalmente en Shoji *et al*, Appl. Biochem. Biotechnol., 41: 21-34 (1993) y J. Micromech. Microeng., 4: 157-171 (1994); McCormick *et al*, Anal. Chem., 69: 2626-2630 (1997); Cheng *et al*, Topics Curr. Chem., 194: 215-231 (1998); Stave *et al*, patente de Estados Unidos 6.663.833; Neri *et al*, patente de Estados Unidos 5.714.380; Northrup *et al*, patente de Estados Unidos 5.589.136; y similares. Dichos sistemas pueden transferir, de forma fluida, reactivos, muestras y productos de reacción entre depósitos y cámaras de reacción de una manera controlada. Es decir, dichos sistemas mueven reactivos, muestras, productos de reacción y similares, en soluciones líquidas bajo fuerza de movimiento de líquidos de una manera dirigida. Las fuerzas de movimiento de líquidos incluyen presión diferencial generada por diversos tipos de bombas o depósitos de gas comprimido, bombas electrocinéticas y similares.

En un aspecto, pueden implementarse convenientemente métodos de la invención por diseños y métodos específicos de funcionamiento de válvulas rotatorias, depósitos de reactivos y residuos y cámaras de reacción desveladas en general en Dority (citado anteriormente). En otro aspecto, en el que se desea control en tiempo real de los productos de amplificación, dicho aparato se usa convenientemente con el controlador de temperatura y fluorímetro desvelado por Christel *et al* (citado anteriormente). Como se describirá más completamente a continuación, el aparato de Christel *et al* puede usarse además para proporcionar el control de bucle cerrado del inicio de una reacción de segundo estadio en el sistema de reacción cerrado de forma fluida de Dority.

Las Figuras 2A-2I muestran en forma de diagrama el funcionamiento de un aparato que sigue el enfoque de diseño general desvelado en Dority (citado anteriormente), que permite la evacuación parcial de una cámara de reacción para dejar una parte efectiva de una primera mezcla de reacción en la cámara de reacción para actuar como una muestra para una segunda reacción de amplificación. La evaluación parcial se efectúa controlando electrónicamente el volumen desplazado por una bomba de tipo pistón. Como alternativa, como se describe posteriormente, también puede llevarse a cabo la evacuación parcial de la cámara de reacción de forma pasiva por un diseño alternativo de la cámara de reacción en donde un "volumen muerto" en la cámara define una parte efectiva y permite emplear impulsos completos de una de una bomba de tipo pistón.

La Figura 2A muestra el alojamiento (2000) que contiene la válvula rotaria (2002) que tiene la cámara interna (2004) que está conectada operativamente con la bomba de tipo pistón (2006). Los impulsos de subida del pistón (2056) de la bomba (2006) presurizan la cámara (2004) y hacen salir a los contenidos fluidos a través de cualquier orificio que pueda estar en comunicación con depósitos o similares; de forma similar, los impulsos hacia abajo del pistón (2056) de la bomba (2006) despresurizan la cámara (2004) e introducen fluidos a través de cualquier orificio que pueda estar abierto y en comunicación con depósitos o similares. Se proporcionan descripciones adicionales del funcionamiento y construcción de dichos dispositivos de válvula rotatoria-bomba y el uso de la cámara (2004) para la preparación de muestras en Dority (citado anteriormente), que se incorpora por referencia para este fin. La válvula rotaria (2002) tiene diversos orificios, por ejemplo (2050) y (2052), y conductos asociados, (2008) y (2012), que permiten que la cámara (2004) esté en comunicación fluida con diversos depósitos (descritos más completamente posteriormente) o la cámara de reacción (2042) siempre que dichos orificios estén alineados con los orificios correspondientes para conductos a dichos depósitos o cámara de reacción (2042). En las presentes realizaciones ejemplares, los ejes longitudinales de dichos conductos asociados están dispuestos de forma radial en la válvula rotatoria (2002) dentro de uno de dos planos perpendiculares al eje de la válvula rotatoria (2002) (mostrada con líneas discontinuas (2048) y (2049)), de modo que la cámara (2004) puede colocarse en comunicación fluida con orificios de conductos a depósitos, y similares, dispuestos en el alojamiento (2000). La válvula rotatoria (2002) incluye además conductos de conexión (2010), que permiten que un orificio en un plano de la válvula se coloque en comunicación fluida con orificios del alojamiento (2000) que se alinean con el otro plano de la válvula rotatoria (2002). Dichos conductos de conexión (2010) no permiten la comunicación fluida con la cámara interior (2004). Como se ilustra en la Figura 2A, cuando dichos conductos de conexión (2020) se alinean (2046) con orificios de los conductos (2044) y (2016), los conductos (2044) y (2016) están en comunicación fluida. De forma similar, cuando dichos conductos conectores (2020) están alineados en (2038) con orificios de los conductos (2040) y (2036), los conductos (2040) y (2036) están en comunicación fluida. En las Figuras tanto 2A-2I como 3A-3I, los conductos sombreados y depósitos en el alojamiento (2000) están en el plano próximo a la bomba de la válvula rotatoria (2002), mientras que los conductos y depósitos no sombreados están en el plano distante a la bomba. Como se ha mencionado anteriormente, la válvula rotatoria (2000) puede colocar la cámara interior (2004) en comunicación fluida con diversos depósitos y la cámara de reacción (2042) que están conectados por conductos y tienen orificios en el asiento del alojamiento (2000) dentro del que rota la válvula rotatoria (2002). En el presente ejemplo, dichos depósitos incluyen los siguientes: (i) depósito (2014) que contiene reactivos de amplificación de primer estadio, que pueden estar conectados de forma fluida con la válvula rotatoria (2002) por el conducto (2016); (ii) depósito (2018) que contiene reactivos de lisado, por ejemplo, para alterar las membranas superficiales de muestras celulares,

pudiendo estar dicho depósito conectado de forma fluida con la válvula rotatoria (2002) por el conducto (2020); (iii) depósito (2022) que contiene material de muestra o muestra de ensayo, que puede estar conectado de forma fluida con la válvula rotatoria (2002) por el conducto (2024); (iv) el depósito (2026) que contiene reactivo de lavado, que puede estar conectado de forma fluida con la válvula rotatoria (2002) por el conducto (2028), (v) el depósito de residuos (2030), que puede estar conectado de forma fluida con la válvula rotatoria (2002) por el conducto (2032); y (vi) el depósito (2034) que contiene los reactivos de amplificación de segundo estadio, que pueden estar conectados de forma fluida con la válvula rotatoria (2002) por el conducto (2036).

Las Figuras 2B a 2H ilustran el funcionamiento del aparato de la Figura 2A para llevar a cabo una reacción de amplificación de dos estadios en condiciones cerradas de forma fluida. Para el fin de enseñar cómo funcionan las realizaciones particulares de la válvula rotatoria (2002), la válvula rotatoria (2002) se muestra en forma de diagrama en cada una de las Figuras 2B a 2H dividida en 32 sectores, que están numerados. Adyacente a cada sector numerado de la válvula rotatoria (2002) hay una localización correspondiente en el asiento del alojamiento (2000) que también está numerado. El número 32 es simplemente una elección de diseño que refleja, entre otras cosas, la capacidad de la válvula rotatoria (2002) para proporcionar interconexiones en un sistema complejo de depósitos y cámaras. En una posición de partida de la válvula rotatoria (2002), los números adyacentes entre sí en cada sector para los dos conjuntos son iguales, como se muestra en la Figura 2B. Algunos de los números ("números internos") en la válvula rotatoria (2002) están rodeados por un círculo (1, 5, 14, 28) y algunos de los números ("números externos") adyacentes y exteriores a la válvula rotatoria (2002) están rodeados por un círculo (1, 6, 8, 21, 30, 31). Los círculos indican los sectores en los que están localizados los orificios para los diversos depósitos y cámaras. Los círculos con interiores sombreados, por ejemplo 5, 6 y 8, indican orificios localizados en el plano "próximo a la bomba" (2049) de la válvula rotatoria (2002) y los círculos no sombreados, por ejemplo 1, 21, 30, 31 indican orificios localizados en el plano "distante a la bomba" (2048) de la válvula rotatoria (2002). Los círculos (2126) y (2124) en los sectores 14 y 28, respectivamente, que tienen interiores punteados indican conductos conectores (2010). En la Figura 2B, se muestra la válvula rotatoria (2002) en una posición de partida en la que el orificio 1 (2108) de la válvula está alineado con el orificio 1 del alojamiento (2000) de modo que el depósito de muestras (2022) está en comunicación fluida con la cámara interior (2004) en donde pueden llevarse a cabo procedimientos de preparación de muestras. Con un impulso hacia abajo de la bomba (2006), se extrae la muestra a través de la ruta definida por el conducto (2024), orificios (2106) y (2108) y conducto (2012) para llenar (2104) la cámara interior (2104). Pueden realizarse etapas de lavado como se muestra en las Figuras 2C y 2D. Brevemente, en la Figura 2C, la válvula rotatoria (2002) se rota de modo que el orificio (2128) en el sector 5 se alinea con el orificio 6 (2110) del alojamiento (2000) de modo que con un impulso hacia abajo del pistón (2056) se extrae (2200) (y (2204)) solución de lavado en el depósito (2026) a la cámara interior (2004). Rotando la válvula rotatoria (2002) de modo que el orificio 5 (2128) se alinee con el orificio 8 del alojamiento (2000) permitiendo la comunicación fluida entre la cámara interior (2004) y el depósito de residuos (2030), la solución de lavado en la cámara interior (2004) puede expulsarse (2202) al depósito de residuos (2030) tras un impulso hacia arriba del pistón (2056). Este proceso puede repetirse según sea necesario.

Para muestras que contienen células intactas, puede añadirse un reactivo para lisar membranas de superficie celular a la cámara interior (2004) para generar un lisado, que puede lavarse adicionalmente según sea necesario. En la Figura 2D, la válvula rotatoria (2002) se rota para alinear el orificio 1 (2108) de la válvula con el orificio 31 (2114) del alojamiento (2000), poniendo de este modo la cámara interior (2004) en comunicación fluida con el depósito (2018). Un impulso hacia abajo del pistón (2056) extraerá (2300) reactivo de lisado del depósito (2018) a la cámara interior (2302). Después de la incubación en el reactivo de lisado, opcionalmente la muestra puede lavarse adicionalmente como se ha descrito anteriormente. Después de la incubación, o incubación y lavado adicional, la válvula rotatoria (2002) se rota de modo que el orificio 1 (2108) se alinea con el orificio del conducto (2016) (en el sector 30) del alojamiento (2000), de modo que el lisado en la cámara interior (2004) se pasa (2400) por un impulso hacia arriba del pistón (2056) a través de los orificios 1 y 30, el conducto (2016) y al depósito (2014) donde se mezcla con reactivos de amplificación de primer estadio. No hay flujo al conducto (2044) porque no hay conexión fluida entre el orificio 1 y el orificio del conducto (2044), ya que uno está en el plano próximo a la bomba (2049 en la Figura 2A) y el otro está en el plano distante a la bomba (2048 en la Figura 2A) de la válvula rotatoria (2002). Después de mezclar el material de muestra y reactivos de amplificación de primer estadio, la mezcla se transfiere a la cámara de reacción (2042). Como se muestra en la Figura 2F, esto puede conseguirse rotando la válvula rotatoria (2002) de modo que el orificio 5 (2128) se alinee con el orificio del conducto (2040) que está en comunicación fluida con la cámara de reacción (2042) y el conducto de conexión 14 (2126) se alinea con los orificios de los conductos (2016) y (2044) en el sector 30 (2112). Con un impulso hacia abajo del pistón (2056), la mezcla de reacción se extrae (2500) del depósito (2014) a través del conducto (2016), el conducto de conexión 14 y el conducto (2044) a la cámara de reacción (2042), donde se realiza una reacción de amplificación de primer estadio, tal como una PCR en tiempo real usando óptica de control como se enseña en Christel *et al* (citado anteriormente). De acuerdo con otra realización, los reactivos de amplificación de primer estadio se colocan simplemente en la cámara de reacción (2042) de modo que no es necesario el primer depósito de reactivos (2014), y el material de muestra se transfiere de forma fluida a la cámara de reacción donde se mezcla con los reactivos de amplificación de primer estadio para formar la primera mezcla de reacción.

La reacción de amplificación de primer estadio se lleva a cabo en la cámara de reacción para producir un primer amplicón. Después de detenerse la reacción de amplificación de primer estadio y (opcionalmente) haber puesto el

pistón (2056) próximo a la válvula rotatoria (2002) por extracción al depósito de residuos (2030), el grueso de la mezcla de reacción puede retirarse de la cámara (2042) con un impulso hacia abajo parcial del pistón (2056), en el que la cantidad de mezcla de reacción restante (2600) en la cámara de reacción (2042) está predeterminada por la realización del impulso hacia abajo del pistón (2056) bajo control informático. La cantidad restante se selecciona para que sea efectiva para llevar a cabo el siguiente estadio de la reacción de múltiples estadios; por lo tanto, para determinar el volumen real en realizaciones particulares puede requerirse experimentación rutinaria. Después de dicha retirada parcial, como se muestra en la Figura 2H, la válvula rotatoria (2002) se rota de modo que el orificio 5 (2128) se alinee con el orificio del conducto (2044) y por lo tanto que el conducto de conexión se alinee en el sector 21 (2504) con los orificios del conducto (2040) y (2036). Con esta configuración, hay comunicación fluida entre el depósito (2034) que contiene reactivos de amplificación de segundo estadio y la cámara interior (2004) a lo largo de la siguiente ruta: conducto (2036), conducto de conexión 28 (2124), conducto (2040), cámara de reacción (2042) y 10 conducto (2044). Con un impulso hacia abajo del pistón (2056), se extraen reactivos de amplificación de segundo estadio (2700) del depósito (2034) y a la cámara de reacción (2042), donde se realiza una amplificación de segundo estadio, actuando el amplificador en la parte efectiva (2600) como una muestra.

Como se ilustra en la Figura 3A, como una alternativa a usar un impulso de bomba parcial para determinar el volumen de mezcla de reacción que se conserva en la cámara de reacción (2042) para la amplificación de segundo estadio (y por lo tanto la parte efectiva), el volumen puede controlarse de forma pasiva empleando una cámara de 20 reacción (2042) que contiene un "volumen muerto" de tamaño predeterminado. Esto puede conseguirse moviendo el orificio de la cámara de reacción del conducto (2040) "hacia arriba" a lo largo de la pared de la cámara de reacción (2042) de modo que una parte (2804) de una mezcla de reacción permanezca en la cámara (2042) en el fondo (2805) de la cámara de reacción (2042) siempre que se drene a través del conducto (2040). Dicho control pasivo es especialmente deseable en aplicaciones donde se requiere fiabilidad y hay baja tolerancia para averías debidas a fallos de componente eléctrico o de software. En un aspecto, la invención proporciona cámara de reacción (2042) 25 que tienen un volumen muerto para recoger una parte efectiva de una mezcla de reacción para actuar como una muestra para una reacción de amplificación de segundo estadio. Como alternativa, en lugar de alterar el diseño del conducto (2040), puede añadirse un miembro de retención tal como una pared de retención (2852) a la cámara de reacción, como se muestra en la Figura 3B. En esta realización, a medida que el nivel de fluido (2850) se reduce por drenaje de una mezcla de reacción a través del conducto (2040), se retiene un volumen (2858) (denominado en el presente documento "volumen retenido") en la cámara de reacción. El fluido no retenido por el miembro de retención 30 (2852) se transfiere de forma fluida fuera de la cámara de reacción a la cámara de residuos a través del conducto (2040) hasta que no queda fluido en la cámara, excepto el retenido por el miembro de retención (2852).

En un aspecto de la invención, se proporciona un recipiente de reacción para su uso con aparatos y métodos de la invención. La Figura 3C ilustra en forma de diagrama una realización de dicho recipiente de reacción. Más en general, el recipiente de reacción (2874) comprende la cámara de reacción (2876) para contener un líquido, tal como una mezcla de reacción, un orificio de entrada (2878) conectado con una cámara de reacción (2876) por el canal de 35 entrada (2882), un orificio de salida (2880) conectado con la cámara de reacción (2876) por el canal de salida (2884) y un miembro de retención (2852) en la cámara de reacción (2876) situado de modo que retenga un volumen de líquido (por ejemplo (2858) de la Figura 3B) siempre que la cámara de reacción (2876) se drene del líquido a través del orificio de salida (2880) y el conducto de salida (2884). En una realización, el recipiente de reacción (2874) comprende un marco rígido (2900) que define las paredes laterales de la cámara de reacción (2876) incluyendo 40 paredes laterales (2886) y (2888) que son cada una ópticamente transmisoras y están dispuestas en ángulo entre sí, permitiendo de este modo la iluminación de indicadores fluorescentes en la cámara de reacción (2876) y recogida de señales fluorescentes generadas por los mismos. En una realización preferida descrita anteriormente de forma más completa, los indicadores fluorescentes en la cámara de reacción (2876) se iluminan a través de una de las paredes laterales (2886) o (2888) y se recogen señales fluorescentes a través de la otra pared lateral (2886) o (2888). Se forma una cámara de reacción estanca (2876) a partir del marco rígido (2900) uniendo de forma sellante a lados opuestos de dicho marco las primera y segunda películas de plástico (2870) y (2872), respectivamente. Cuando 45 están unidas de este modo, las primera y segunda películas de plástico (2870) y (2872) forman la primera y segunda paredes principales, respectivamente, de la cámara de reacción (2876). Preferentemente, las películas de plástico (2870) y (2872) son suficientemente flexibles para adaptarse a una superficie térmica para permitir la conducción de calor eficaz para la regulación precisa de la temperatura dentro de la cámara (2876). La cámara de reacción (2876) tiene una profundidad (la dimensión que va hacia el plano del dibujo en la Figura 3C) y una anchura (2902), en donde en las realizaciones ilustradas la anchura (2902) es una medida de las áreas de superficie de las paredes principales de la cámara de reacción (2876). En un aspecto del recipiente de reacción, la anchura (2902) y la profundidad de la cámara de reacción (2876) se seleccionan de modo que haya una relación de superficie y volumen grande para un rápido calentamiento o enfriamiento de los contenidos de la cámara de reacción (2876). En una 50 realización, la anchura (2902) y profundidad de la cámara de reacción (2876) tienen una relación de aproximadamente 4:1 y la profundidad de la cámara de reacción (2902) es menor de 2 mm.

Patrones internos

Con frecuencia es deseable comparar las lecturas de ensayos diferentes, por ejemplo, cuando se intenta determinar si los niveles de expresión medidos de un gen diana en una muestra de ensayo de pacientes están dentro de los intervalos normales. En aplicaciones médicas en particular, se desea con frecuencia comparar resultados de ensayo 65

de una muestra de paciente con los de muestras de referencia. Dichas comparaciones se realizan fácilmente determinando las relaciones de una señal asociada con el polinucleótido diana y una señal asociada con una secuencia de referencia de la misma muestra. Esto permite comparar los valores para un polinucleótido diana con los de otras muestras o muestras de ensayo. El uso y selección de patrones internos, y en particular, las secuencias de referencia, se conocen bien por los expertos en la materia, como se refleja en las siguientes referencias:

Radonic *et al*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 313: 856-862 (2004); Bustin, J. *Mol. Endocrinol.*, 29: 23-39 (2002); Hoorfar *et al*, *J. Clin. Microbiol.*, 42: 1863-1868 (2004); y similares. Se entiende que la señal o un valor asociado con una secuencia de referencia también puede ser una función, por ejemplo, una media, de las señales o valores medidos a partir de múltiples secuencias de referencia.

En un aspecto de la invención, dichos valores relativos de polinucleótidos diana se proporcionan amplificando tanto secuencias de referencia como polinucleótidos diana en una reacción de amplificación de primer estadio, amplificando solamente amplicones de polinucleótidos diana en una reacción de amplificación de segundo estadio y formando relaciones, comprendiendo cada una una señal de un amplicón de un polinucleótido diana en la segunda reacción de amplificación y una señal de un amplicón de una secuencia de referencia en la primera reacción de amplificación. Este aspecto de la invención es particularmente adecuado para comparar niveles de polinucleótidos diana poco comunes, o de nivel muy bajo, de diferentes muestras. En dichas circunstancias, las secuencias de referencia están típicamente presentes en gran exceso con respecto a los polinucleótidos diana; en consecuencia, si ambas secuencias debían experimentar dos estadios de amplificación, la señal de secuencia de referencia puede verse superada fácilmente por la señal de polinucleótido diana, si las señales respectivas se solapan incluso ligeramente, como sucede con las bandas de emisión de colorantes fluorescentes orgánicos. En consecuencia, en una realización del presente aspecto, se proporciona un método para medir cantidades relativas de un polinucleótido diana en múltiples muestras llevando a cabo una PCR anidada donde (i) se amplifica una secuencia diana en una PCR de primer estadio pero no en una PCR de segundo estadio y (ii) se determinan cantidades relativas de un polinucleótido diana a partir de relaciones de las siguientes dos mediciones: una señal fluorescente de un amplicón producido en la PCR de segundo estadio a partir de un polinucleótido diana, y una señal fluorescente de un amplicón producido en la PCR de primer estadio a partir de una secuencia de referencia. En una realización preferida, las reacciones tanto de primer estadio como de segundo estadio son PCR en tiempo real. En otra realización de este aspecto, se proporciona un método para medir cantidades relativas de un polinucleótido diana en múltiples muestras llevando a cabo una reacción de NASBA anidada donde (i) una secuencia de referencia se amplifica en una reacción de NASBA de primer estadio pero no en una reacción de NASBA de segundo estadio y (ii) se determinan cantidades relativas de un polinucleótido diana a partir de las relaciones de las dos siguientes mediciones: una señal fluorescente de un amplicón producido en la reacción de NASBA de segundo estadio a partir de un polinucleótido diana y una señal fluorescente de un amplicón producido en la reacción de NASBA de primer estadio a partir de una secuencia de referencia. En una realización preferida, las reacciones tanto de primer estadio como de segundo estadio son reacciones de NASBA en tiempo real. En ambos de los enfoques descritos anteriormente, las reacciones de segundo estadio pueden iniciarse controlando una señal óptica en la PCR o NASBA de primer estadio, En un aspecto, dicha señal óptica proporciona una medida de la cantidad de amplicón de la secuencia de referencia o el polinucleótido diana o ambos. En un aspecto, la reacción de segundo estadio puede iniciarse cuando la señal óptica alcanza o supera un nivel predeterminado que está en el intervalo de 1,5 a 10 veces un nivel de señal de línea basal. En otro aspecto, la reacción de segundo estadio puede iniciarse cuando la señal óptica alcanza o supera un nivel predeterminado que se corresponde con una raíz de la segunda derivada de una curva de crecimiento de amplicón correspondiente a una secuencia de referencia.

El tipo de patrón interno o secuencia de referencia seleccionado depende de la naturaleza de las muestras que se analizan. Para muestras que comprenden células o tejidos de mamífero se enumeran secuencias de referencia ejemplares en la Tabla I

Tabla I

Secuencias de referencia ejemplares		
Gen de Referencia	Nombre del Producto Génico	Número de Referencia del NCBI
GAPDH	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	J02642
G6PDH	glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	X03674
HPRT	hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa	L29382
PBGD	porfobilinógeno desaminasa	X04808
Alb		L00132
Act	β -actina	M10277
Tub	α -tubulina	X01703

Secuencias de referencia ejemplares		
Gen de Referencia	Nombre del Producto Génico	Número de Referencia del NCBI
TBP	proteína de unión de caja TATA	M55654
L13	proteína ribosómica L13	X56923
β2M	β2-microglobulina	J00115
PPIA	peptidil prolil isomerasa A	Y00052
PLA	fosfolipasa A2	M86400
	ARN ribosómico 18S y 28S	

Preparación de muestras o muestras de ensayo

5 Las muestras o muestras de ensayo que contienen polinucleótidos diana pueden venir de una amplia diversidad de fuentes para su uso con la presente invención, incluyendo cultivos celulares, tejidos animales o vegetales, biopsias de pacientes, muestras ambientales o similares. Las muestras se preparan para ensayos de la invención usando técnicas convencionales que típicamente dependen de la fuente de la que se toma una muestra o muestra de ensayo.

10 Las muestras o muestras de ensayo se recogen para minimizar la probabilidad de contaminación de la muestra o muestra de ensayo por elementos externos, o el ambiente por la muestra o muestra de ensayo si contiene componentes peligrosos. En general, esto se lleva a cabo introduciendo una muestra para su análisis, por ejemplo, tejido, sangre, saliva, etc., directamente en una cámara de recogida de muestras dentro de un sistema cerrado de forma fluida. Típicamente, la prevención de la contaminación cruzada de la muestra puede conseguirse inyectando
15 directamente la muestra en la cámara de recogida de muestras mediante una apertura sellable, por ejemplo, una válvula de inyección o un septo. En general, se prefieren válvulas sellables para reducir cualquier amenaza potencial de filtración durante o después de la inyección de muestras. Además de lo anterior, la parte de recogida de muestras del dispositivo también puede incluir reactivos y/o tratamientos para la neutralización de agentes infecciosos, estabilización de la muestra o muestra de ensayo, ajustes del pH y similares. Los tratamientos de estabilización y
20 ajuste del pH pueden incluir, por ejemplo, introducción de heparina para evitar la coagulación de muestras de sangre, adición de agentes tamponantes, adición de proteasa o inhibidores de nucleasa, conservantes y similares. Dichos reactivos pueden almacenarse en general dentro de la cámara de recogida de muestras del dispositivo o pueden almacenarse dentro de una cámara accesible por separado, donde los reactivos pueden añadirse a o mezclarse con la muestra tras la introducción de la muestra en el dispositivo. Estos reactivos pueden incorporarse
25 dentro del dispositivo en forma líquida o liofilizada, dependiendo de la naturaleza y estabilidad del reactivo particular usado.

30 Antes de llevar a cabo reacciones de amplificación en una muestra, será con frecuencia deseable realizar una o más operaciones de preparación de muestras sobre la muestra. Típicamente, estas operaciones de preparación de muestras incluirán manipulaciones tales como extracción de material intracelular, por ejemplo, ácidos nucleicos de muestras celulares completas, virus y similares. Una o más de estas diversas operaciones pueden incorporarse fácilmente en los sistemas cerrados de forma fluida contemplados por la presente invención.

35 Para las realizaciones donde se analizan células completas, virus u otras muestras tisulares, será necesario típicamente extraer los ácidos nucleicos de las células o virus, antes de continuar con las diversas operaciones de preparación de muestras. En consecuencia, después de la recogida de muestras, los ácidos nucleicos pueden liberarse de las células recogidas, la cubierta viral, etc., en un extracto en bruto, seguido de tratamientos adicionales para preparar la muestra para operaciones posteriores, por ejemplo desnaturalización de proteínas contaminantes (que se unen al ADN), purificación, filtración, desalación y similares. Puede realizarse en general liberación de
40 ácidos nucleicos de las células o virus de la muestra y desnaturalización de proteínas de unión a ADN por métodos de lisis química, física o electrolítica. Por ejemplo, los métodos químicos generalmente emplean agentes de lisis para romper las células y extraer los ácidos nucleicos de las células, seguido del tratamiento del extracto con sales caotrópicas tales como isotiocianato de guanidinio o urea para desnaturalizar cualquier proteína contaminante y potencialmente de interferencia. En general, cuando se usan métodos de extracción y/o desnaturalización químicos,
45 los reactivos apropiados pueden incorporarse dentro de una cámara de preparación de muestras, una cámara accesible por separado o pueden introducirse de forma externa.

50 Pueden usarse métodos físicos para extraer los ácidos nucleicos y desnaturalizar proteínas de unión al ADN. Wilding *et al*, Patente de Estados Unidos N° 5.304.487, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines, analiza el uso de protrusiones físicas con microcanales o partículas de borde afilado dentro de una cámara o canal para agujerear membranas celulares y extraer sus contenidos. Las combinaciones de dichas estructuras con elementos piezoeléctricos para agitación pueden proporcionar fuerzas de corte adecuadas

para lisis. Dichos elementos se describen en más detalle con respecto a la fragmentación de ácidos nucleicos, posteriormente. También pueden usarse métodos más tradicionales de extracción celular, por ejemplo, empleando un canal con dimensión de sección transversal restringida que provoca lisis celular cuando la muestra se pasa a través del canal con suficiente presión de flujo. Como alternativa, puede llevarse a cabo extracción celular y desnaturalización de las proteínas contaminantes aplicando una corriente eléctrica alterna a la muestra. Más específicamente, la muestra de células se hace fluir a través de una matriz microtubular mientras que se aplica una corriente eléctrica alterna a través del flujo de fluido. Puede utilizarse una diversidad de otros métodos dentro del dispositivo de la presente invención para realizar lisis/extracción de células, incluyendo, por ejemplo, someter a las células a agitación ultrasónica, o pasando las células a través de aperturas pequeñas, sometiendo de este modo las células a alta tensión de corte que da como resultado ruptura.

Después de la extracción, será con frecuencia deseable separar los ácidos nucleicos de otros elementos del extracto en bruto, por ejemplo, proteínas desnaturalizadas, partículas de membrana celular, sales y similares. Se consigue en general retirada de materia en partículas por filtración, floculación o similares. Puede incorporarse fácilmente una diversidad de tipos de filtros al dispositivo. Además, cuando se usan métodos de desnaturalización química, puede ser deseable desalar la muestra antes de continuar a la siguiente etapa. La desalación de la muestra, y el aislamiento del ácido nucleico puede llevarse a cabo en general en una única etapa, por ejemplo, uniendo los ácidos nucleicos con una fase sólida y retirando por lavado las sales contaminantes o realizando cromatografía de filtración en gel en la muestra, pasando las sales a través de membranas de diálisis y similares. Los soportes sólidos adecuados para unión de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, tierras diatomeas, sílice (es decir, lana de vidrio), o similares. También pueden incorporarse fácilmente medios de exclusión de geles adecuados, también bien conocidos en la técnica, en los dispositivos de la presente invención, y están disponibles en el mercado de, por ejemplo, Pharmacia y Sigma Chemical.

El aislamiento y/o filtración en gel/desalación puede llevarse a cabo en una cámara adicional o, como alternativa, el medio cromatográfico particular puede incorporarse en un canal o conducto de fluidos que conduce a una cámara de reacción posterior. Como alternativa, las superficies internas de uno o más conductos de fluidos o cámaras pueden ellas mismas derivatizarse para proporcionar grupos funcionales apropiados para la purificación deseada, por ejemplo, grupos con carga, grupos de unión por afinidad y similares, es decir, oligonucleótidos poli T para purificación de ARNm. Como alternativa, los métodos de desalación pueden aprovechar en general la alta movilidad electroforética y carga negativa de ADN en comparación con otros elementos. También pueden utilizarse métodos electroforéticos en la purificación de ácidos nucleicos de otros contaminantes y residuos celulares. En un ejemplo, un canal de separación o cámara del dispositivo está conectado de forma fluida con dos canales separados de "campo" o cámaras que tienen electrodos, por ejemplo, electrodos de platino, dispuestos en los mismos. Los dos canales de campo se separan del canal de separación usando una barrera apropiada o "membrana de captura" que permite el paso de corriente sin permitir el paso de ácidos nucleicos u otras moléculas grandes. La barrera generalmente cumple dos funciones básicas: en primer lugar, la barrera actúa para retener los ácidos nucleicos que migran hacia el electrodo positivo dentro de la cámara de separación; y en segundo lugar, las barreras evitan que los efectos adversos asociados con la electrolisis en el electrodo entren en la cámara de reacción (por ejemplo, actuando como una unión salina). Dichas barreras pueden incluir, por ejemplo, membranas de diálisis, geles densos, filtros de PEI u otros materiales adecuados. Tras la aplicación de un campo eléctrico apropiado, los ácidos nucleicos presentes en la muestra migrarán hacia el electrodo positivo y se inmobilizarán en la membrana de captura. Las impurezas de muestras que permanecen fuera de la membrana se lavan después de la cámara aplicando un flujo de fluido apropiado. Tras la inversión de la tensión, los ácidos nucleicos se liberan de la membrana en una forma sustancialmente más pura. Los canales de campo pueden disponerse en los mismos lados o extremos o lados o extremos opuestos de una cámara o canal de separación, y pueden usarse junto con elementos de mezcla descritos en el presente documento, para asegurar la máxima eficacia de funcionamiento. Además, también pueden superponerse filtros rugosos en las barreras para evitar cualquier obstrucción de las barreras por materia en partículas, proteínas o ácidos nucleicos, permitiendo de este modo su uso repetido. En un aspecto similar, la alta movilidad electroforética de los ácidos nucleicos con sus cargas negativas, puede utilizarse para separar ácidos nucleicos de contaminantes utilizando una columna corta de un gel u otra matriz o gel apropiado que ralentizará o retardará el flujo de los contaminantes permitiendo a la vez que pasen los ácidos nucleicos más rápidos.

Para varias aplicaciones, puede ser deseable extraer y separar ARN mensajero de las células, residuos celulares y otros contaminantes. Como tal, un sistema de la presente invención puede, en algunos casos, incluir una cámara o canal de purificación de ARNm. En general, dicha purificación aprovecha las colas de poli A en el ARNm. En particular y como se ha observado anteriormente, pueden inmobilizarse oligonucleótidos poli T dentro de una cámara o canal del dispositivo para actuar como ligandos de afinidad para ARNm. Los oligonucleótidos poli T pueden inmunizarse sobre un soporte sólido incorporado dentro de la cámara o canal o, como alternativa, pueden inmobilizarse sobre la superficie o las superficies de la cámara o canal en sí mismo.

En algunas aplicaciones, tales como la medición de polinucleótidos diana en células metastásicas poco comunes de la sangre de un paciente, puede llevarse a cabo una etapa de enriquecimiento antes de realizar un ensayo, tal como por aislamiento inmunomagnético. Dicho aislamiento o enriquecimiento puede llevarse a cabo usando una diversidad de técnicas y materiales conocidos en este campo, como se revela en las siguientes referencias representativas: Terstappen *et al*, patente de Estados Unidos 6.365.362; Terstappen *et al*, patente de Estados

Unidos 5.646.001; Rohr *et al*, patente de Estados Unidos 5.998.224; Kausch *et al*, patente de Estados Unidos 5.665.582; Kresse *et al*, patente de Estados Unidos 6,048,515; Kausch *et al*, patente de Estados Unidos 5.508.164; Miltenyi *et al*, patente de Estados Unidos 5.691.208; Molday, patente de Estados Unidos 4.452.773; Kronick, patente de Estados Unidos 4.375.407; Radbruch *et al*, capítulo 23, en *Methods in Cell Biology*, Vol, 42 (Academic Press, Nueva York, 1994); Uhlen *et al*, *Advances in Biomagnetic Separation* (Eaton Publishing, Natick, 1994); Safarik *et al*, *J. Chromatography B*, 722: 33-53 (1999); Miltenyi *et al*, *Cytometry*, 11: 231-238 (1990); Nakamura *et al*, *Biotechnol. Prog.*, 17: 1145-1155 (2001); Moreno *et al*, *Urology*, 58: 386-392 (2001); Racila *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 4589-4594 (1998); Zigeuner *et al*, *J. Urology*, 169: 701-705 (2003); Ghossein *et al*, *Seminars in Surgical Oncology*, 20: 304-311 (2001).

Las partículas magnéticas preferidas para su uso al llevar a cabo la presente invención son partículas que se comportan como coloides. Dichas partículas se caracterizan por su tamaño de partícula submicrométrico, que generalmente es menor de aproximadamente 200 nanómetros (nm) (0,20 micrómetros) y su estabilidad frente a la separación gravitacional de la solución durante periodos de tiempo prolongados. Además de las muchas otras ventajas, este intervalo de tamaños las hace esencialmente invisibles a las técnicas analíticas aplicadas habitualmente al análisis celular. Se contemplan partículas dentro del intervalo de 90-150 nm y que tienen entre 70 y 90 % de masa magnética para su uso en la presente invención. Las partículas magnéticas adecuadas están compuestas de un núcleo cristalino de material superparamagnético rodeado de moléculas que están unidas, por ejemplo, físicamente absorbidas o unidas covalentemente, con el núcleo magnético y que confieren propiedades coloidales estabilizadoras. El material de recubrimiento se aplicaría preferentemente en una cantidad eficaz para evitar interacciones no específicas entre macromoléculas biológicas halladas en la muestra y los núcleos magnéticos. Dichas macromoléculas biológicas pueden incluir restos de ácido siálico en la superficie de células no diana, lectinas, glucoproteínas y otros componentes de membrana. Además, el material debería contener tanta masa magnética/nanopartículas como sea posible. El tamaño de los cristales magnéticos que comprenden el núcleo es suficientemente pequeño para no contener un dominio magnético completo. El tamaño de las nanopartículas es suficientemente pequeño de modo que su energía Browniana supera su momento magnético. En consecuencia, no parece que se produzca alineamiento de Polo Norte, Polo Sur y atracción/repulsión mutua posterior de estas partículas magnéticas coloidales incluso en campos magnéticos moderadamente fuertes, que contribuyen a su estabilidad en solución. Finalmente, las partículas magnéticas deberían ser separables en separadores de campo externo de alto gradiente magnético. Esta característica facilita la manipulación de muestras y proporciona ventajas económicas sobre las columnas de gradiente interno más complicadas cargadas con perlas ferromagnéticas o lana de acero. Las partículas magnéticas que tienen las propiedades anteriormente descritas pueden prepararse por modificación de materiales básicos descritos en las Patentes de Estados Unidos N° 4.795.698, 5.597.531 y 5.698.271.

Como se ha mencionado anteriormente, pueden tomarse muestras o muestras de ensayo de una amplia diversidad de fuentes para la detección o cuantificación de polinucleótidos diana con la presente invención. Los polinucleótidos diana ejemplares incluyen, pero sin limitación, ácidos nucleicos de virus, bacterias, hongos, protozoos y mamíferos. En particular, los ácidos nucleicos de mamífero incluyen genes de cáncer, tales como p53, ATP, Her1 (EGFR), BCR-ABL, PTEN, BRAF, BRCA1, Grb7, topoisomerasa II α , y similares. Se enumeran virus y bacterias ejemplares que contienen ácidos nucleicos susceptibles de detección y/o cuantificación en la Tabla II. Sería una elección de diseño rutinaria para un experto en la materia seleccionar polinucleótidos diana de los organismos de la Tabla II.

Tabla II.

Virus y Bacterias Ejemplares	
Virus	Bacterias
Citomegalovirus humano (CMV)	<i>Bacillus anthracis</i>
Virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1)	<i>Legionella pneumophila</i>
ARN de enterovirus de líquido cefalorraquídeo	<i>Listeria monocytogenes</i>
Virus de la Hepatitis C (VHC)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
Virus de varicela zóster	<i>Neisseria meningitidis</i>
flavivirus	<i>Staphylococcus aureus</i>
hepadnavirus	<i>Helicobacter pylori</i>
herpesvirus	<i>Enterococcus faecalis</i>
ortomixovirus	
parvovirus	

ES 2 502 815 T3

<u>Virus y Bacterias Ejemplares</u>	
Virus	Bacterias
papovavirus	
paramixovirus	
pestivirus	
picornavirus	

REIVINDICACIONES

1. Un método para realizar una reacción de amplificación anidada, comprendiendo el método las etapas de:
 - a) realizar una reacción de amplificación de primer estadio en una cámara de reacción de un sistema cerrado de forma fluida, comprendiendo la reacción de amplificación de primer estadio uno o más polinucleótidos diana de una muestra usando reactivos de amplificación de primer estadio en una primera mezcla de reacción para formar uno o más primeros amplicones, incluyendo los reactivos de amplificación de primer estadio cebadores iniciales para cada polinucleótido diana, en donde el o los primeros amplicones se amplifican en presencia de un indicador fluorescente capaz de generar una señal óptica relacionada con una cantidad de un amplicón en la reacción de amplificación de primer estadio;
 - b) controlar la señal óptica del indicador fluorescente en la reacción de amplificación de primer estadio en la cámara de reacción;
 - c) retener automáticamente una parte efectiva de la mezcla de reacción de la reacción de amplificación de primer estadio cuando la señal óptica alcanza o supera un nivel umbral;
 - d) amplificar en la cámara de reacción el o los primeros amplicones en la parte efectiva usando reactivos de amplificación de segundo estadio en una segunda mezcla de reacción para formar uno o más segundos amplicones, incluyendo los reactivos de amplificación de segundo estadio al menos un cebador secundario para cada uno del o los primeros amplicones, de modo que cada cebador secundario esté anidado en dicho primer amplicón en relación con un cebador inicial de dicho primer amplicón; y
 - e) detectar el o los segundos amplicones para determinar la presencia o ausencia del o los polinucleótidos diana en la muestra.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la cámara de reacción comprende un volumen muerto, que retiene la parte efectiva de la mezcla de reacción de la reacción de amplificación de primer estadio en la etapa c).
3. El método de la reivindicación 1, en donde la cámara de reacción comprende un miembro de retención situado en la cámara de reacción para retener un volumen definido del líquido en la cámara de reacción siempre que el resto del líquido se retire de la cámara de reacción, y en donde la etapa c) comprende retener la parte efectiva de la mezcla de reacción de la reacción de amplificación de primer estadio por el miembro de retención.
4. El método de la reivindicación 1, en donde dicha mezcla de reacción de dicha reacción de amplificación de primer estadio es en una primera cámara de reacción del sistema de reacción cerrado de forma fluida y en donde la etapa c) comprende además transferir de forma fluida dicha parte efectiva de dicha mezcla de reacción de primer estadio a una segunda cámara de reacción.
5. El método de la reivindicación 1, en donde dicha mezcla de reacción de dicha reacción de amplificación de primer estadio está en la cámara de reacción del sistema de reacción cerrado de forma fluida y en donde la etapa c) comprende además transferir de forma fluida dicha mezcla de reacción de primer estadio a un depósito de residuos, excepto por una parte efectiva que se queda en la primera cámara de reacción.
6. El método de la reivindicación 5, en donde dicha primera cámara de reacción tiene un fondo y un orificio de salida situado por encima del fondo de modo que siempre que dicha mezcla de reacción de primer estadio se transfiera de forma fluida a dicho depósito de residuos a través del orificio de salida se retiene un volumen de dicha mezcla de reacción de primer estadio en dicha primera cámara de reacción por debajo del orificio de salida.
7. El método de la reivindicación 6, en donde dicho volumen retenido en dicha primera cámara de reacción incluye dicha parte efectiva.
8. El método de la reivindicación 1, en donde dicha parte efectiva es un volumen de dicha mezcla de reacción suficiente para contener al menos 100 moléculas de dichos uno o más primeros amplicones.
9. El método de la reivindicación 1, en donde dicha mezcla de reacción tiene un volumen y en donde dicha parte efectiva es un porcentaje del volumen de dicha mezcla de reacción, seleccionándose el porcentaje del intervalo de 0,5 a 10 por ciento.
10. El método de la reivindicación 1, en donde dicho nivel umbral es un múltiplo de un nivel de señal de línea basal, seleccionándose el múltiplo del intervalo de 1,5 a 25.
11. El método de la reivindicación 1, en donde dicho nivel umbral se corresponde con un máximo, mínimo o valor cero de una curva de crecimiento definida por la señal óptica.
12. El método de la reivindicación 1, en donde dicho indicador fluorescente se selecciona de un colorante de intercalación que se une específicamente con ADN bicatenario o comprende un resto oligonucleotídico que se une específicamente con un producto de amplificación.

13. El método de la reivindicación 1, en donde dichos uno o más primeros amplicones se producen por amplificación de una secuencia de referencia en dicha reacción de amplificación de primer estadio.
- 5 14. El método de la reivindicación 1, en donde dichos uno o más primeros amplicones se producen por amplificación de un polinucleótido diana en dicha reacción de amplificación de primer estadio.
15. El método de la reivindicación 1, en donde dicho sistema de reacción cerrado de forma fluida comprende:
- 10 dicha cámara de reacción de forma seleccionable en comunicación fluida con un depósito de muestras que contiene dicha muestra, un primer depósito de reactivos que contiene reactivos de amplificación de primer estadio, y un segundo depósito de reactivos que contiene reactivos de amplificación de segundo estadio, estando cada uno de dichos depósitos cerrado de forma fluida; y
- 15 una bomba asociada operativamente con una válvula rotatoria para transferir de forma fluida dicha muestra y dichos reactivos de amplificación de primer estadio a la cámara de reacción, para retener automáticamente dicha parte efectiva de dicha primera mezcla de reacción siempre que dicha señal óptica sea igual o mayor que dicho nivel predeterminado; y para transferir de forma fluida dichos reactivos de amplificación de segundo estadio a la cámara de reacción para amplificar dichos uno o más primeros amplicones en dicha parte efectiva.
- 20 16. El método de la reivindicación 15, en donde dicha válvula rotatoria comprende un pistón, retirando el impulso hacia abajo del pistón dicha primera mezcla de reacción de la cámara de reacción, y en donde se consigue retener automáticamente dicha parte efectiva de dicha primera mezcla de reacción llevando a cabo el impulso hacia abajo del pistón bajo control predeterminado.
- 25 17. El método de la reivindicación 1, en donde cada una de dichas reacciones de amplificación es una reacción en cadena de la polimerasa o una reacción de NASBA.

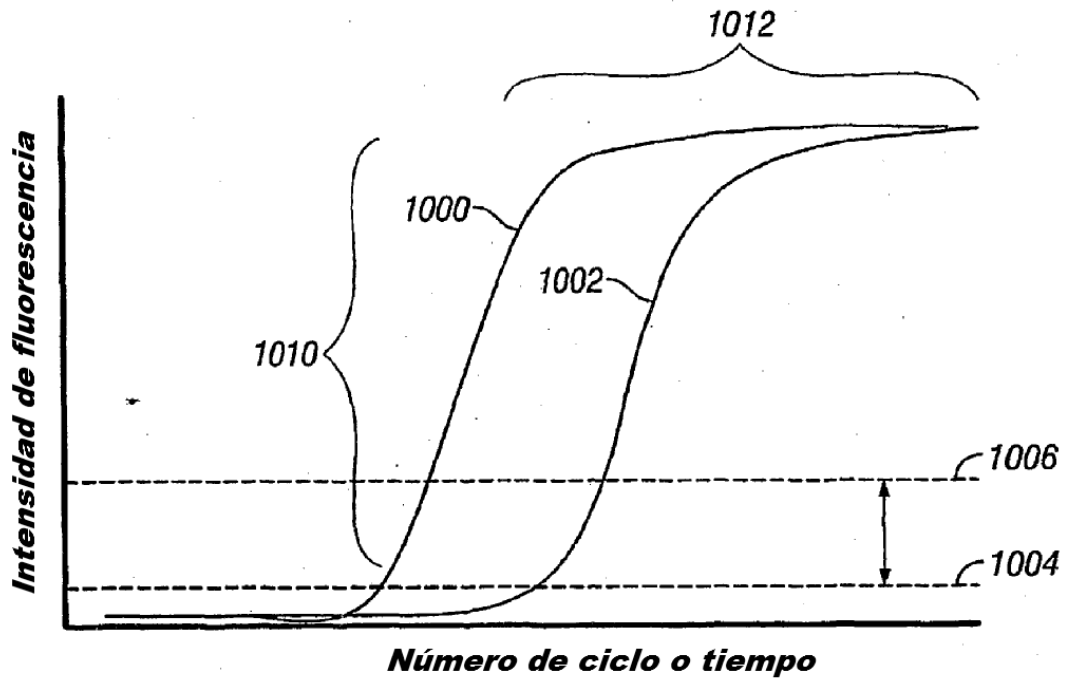


FIG. 1A

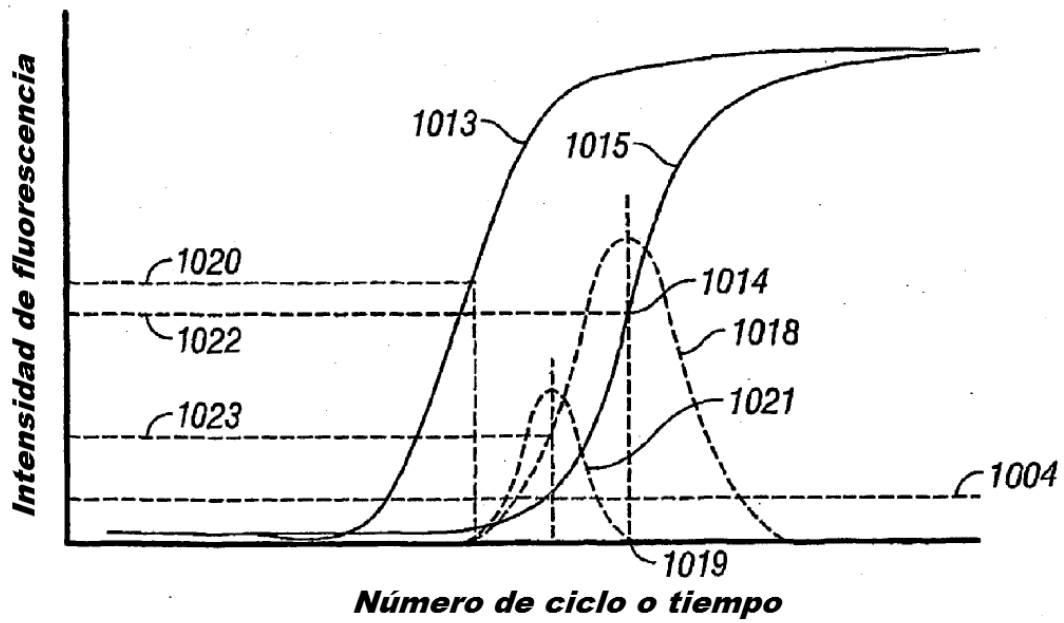


FIG. 1B

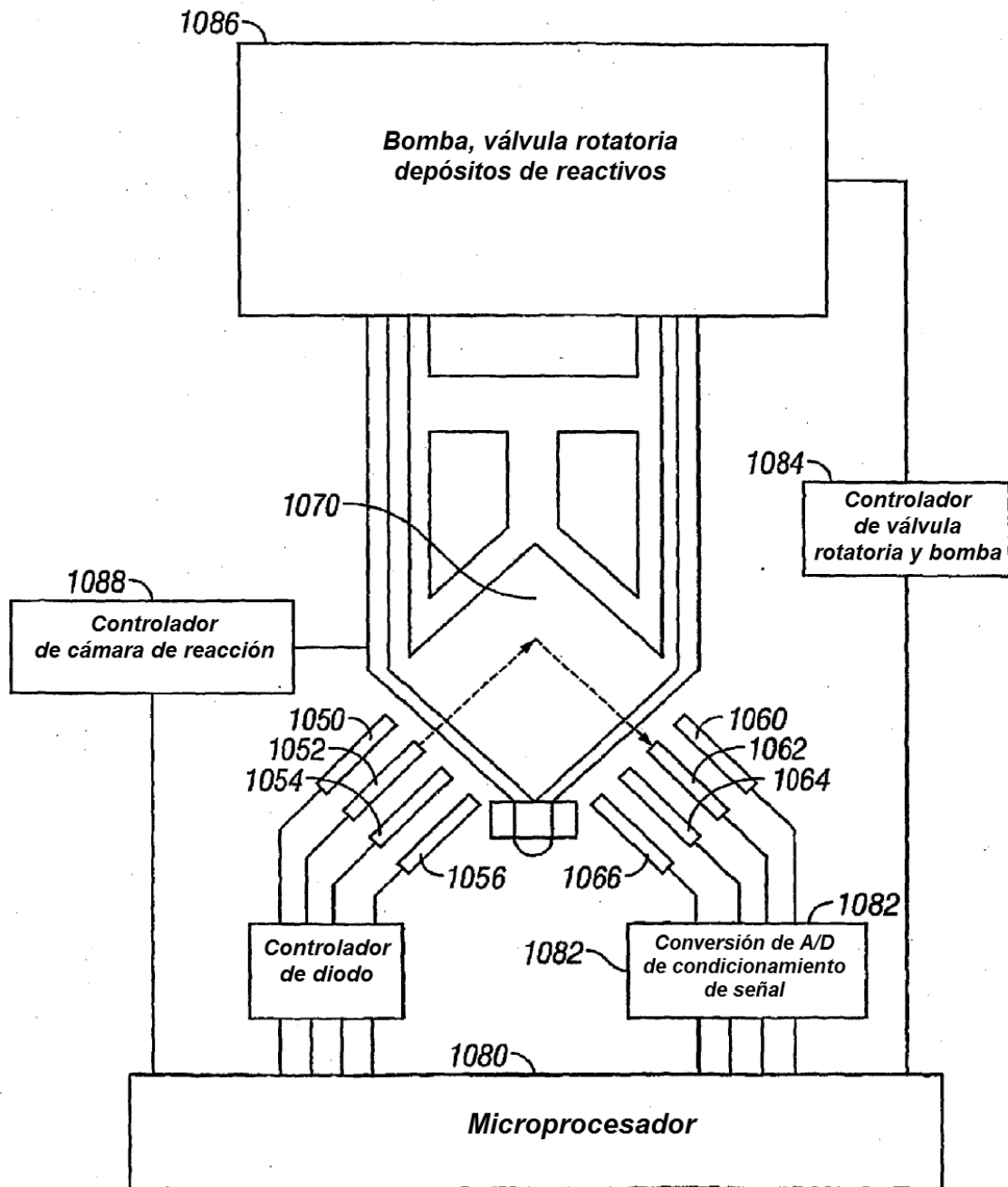


FIG. 1C

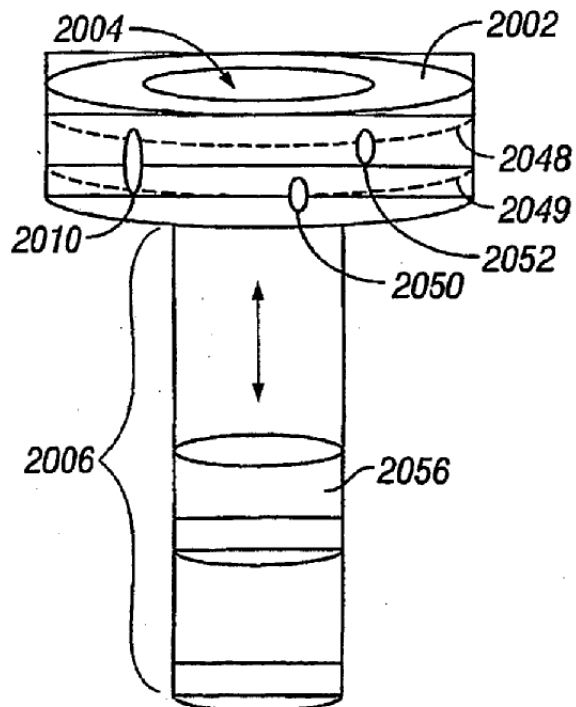
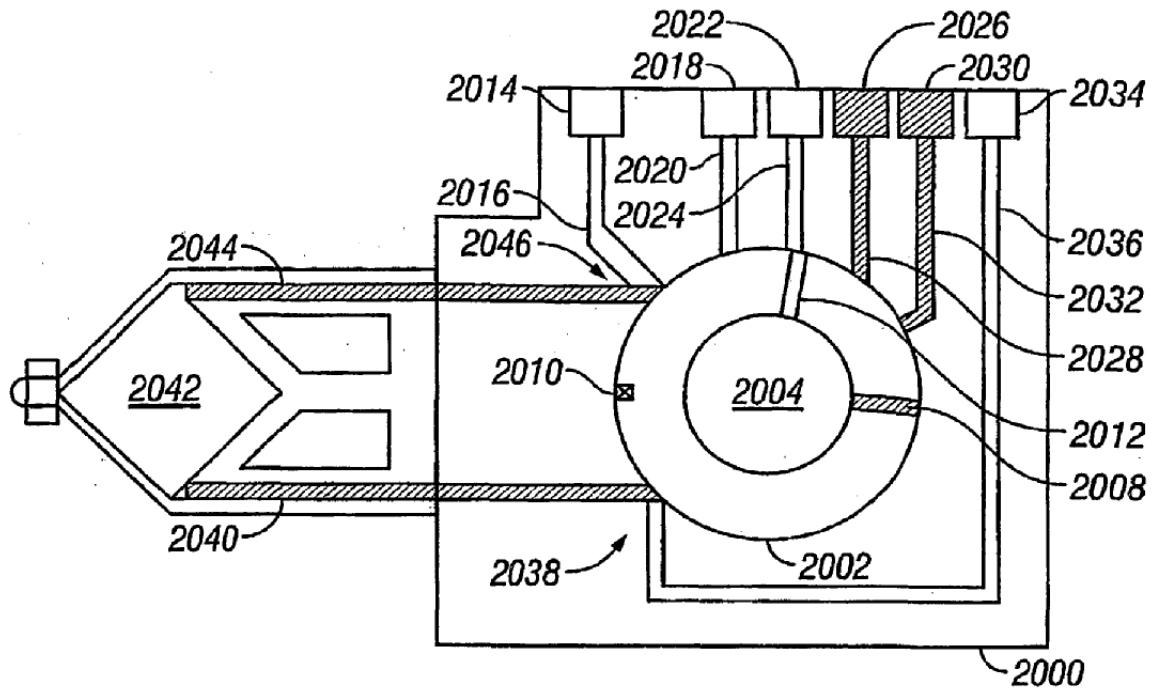


FIG. 2A

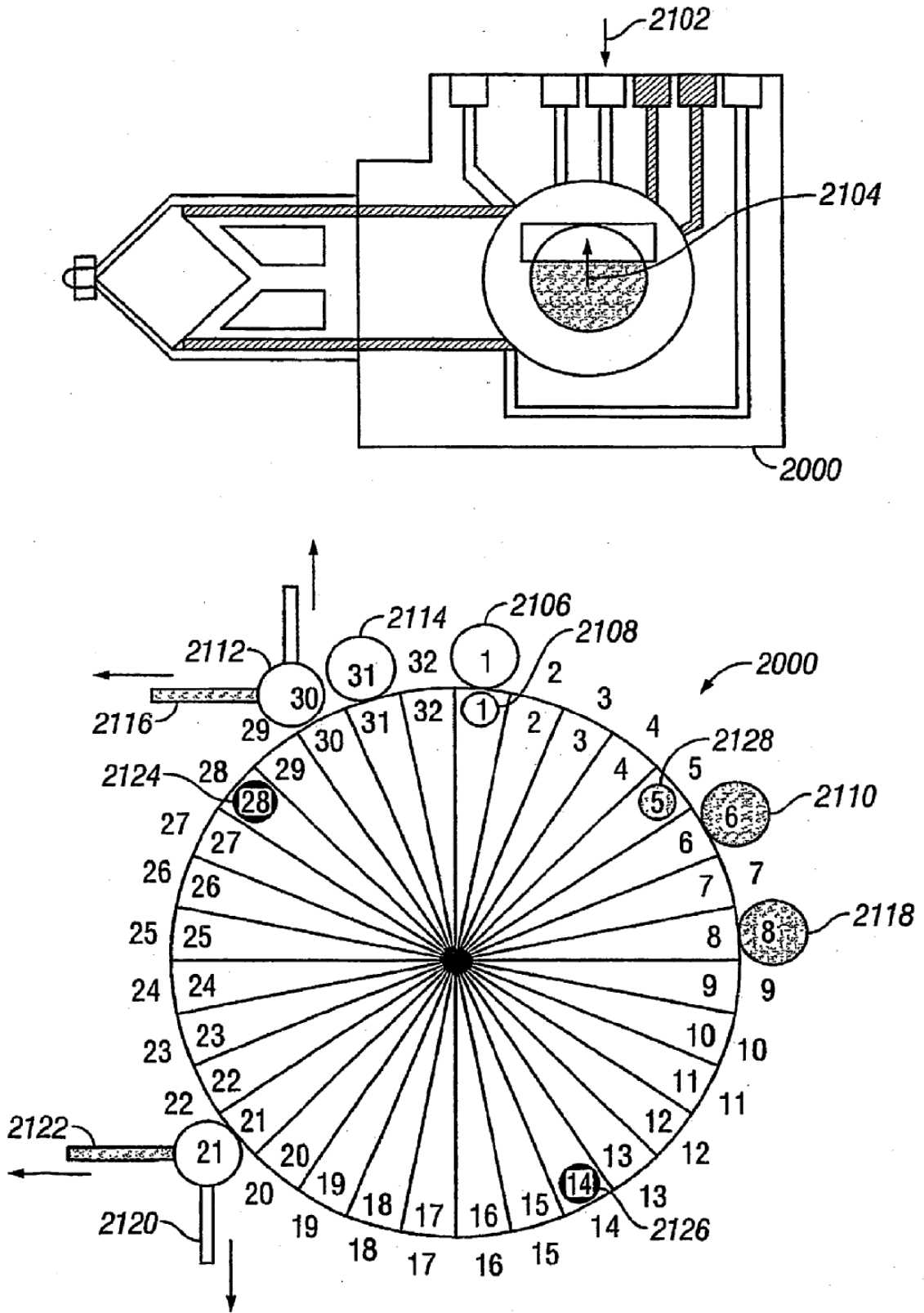


FIG. 2B

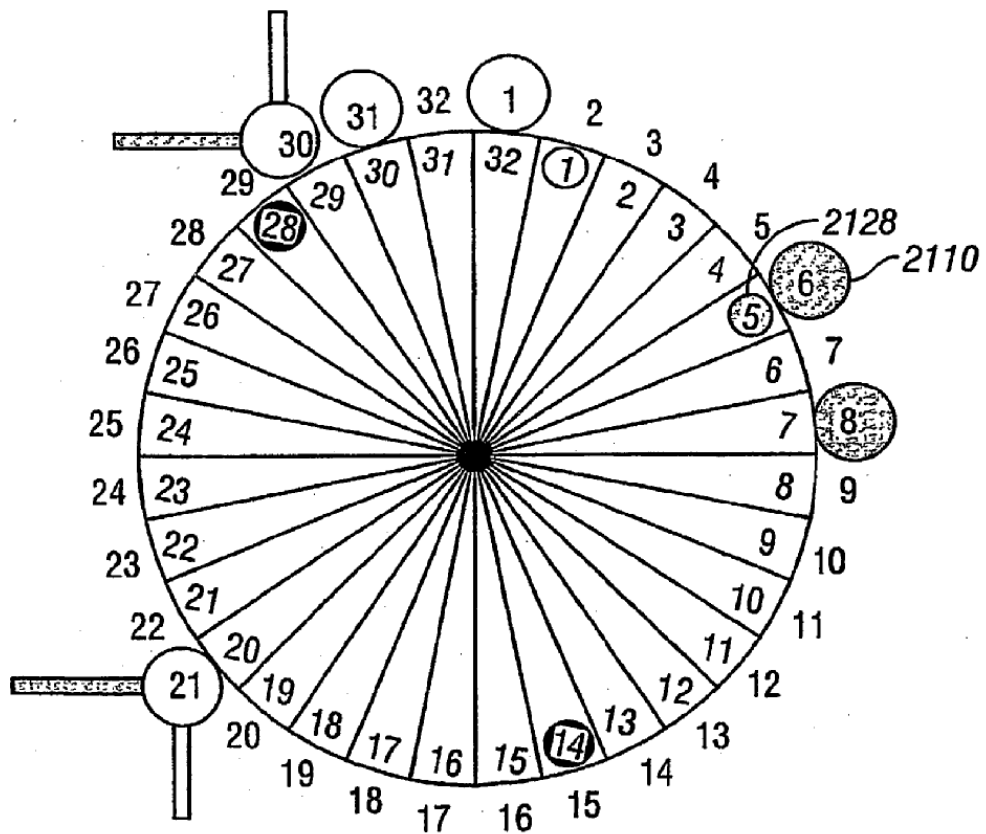
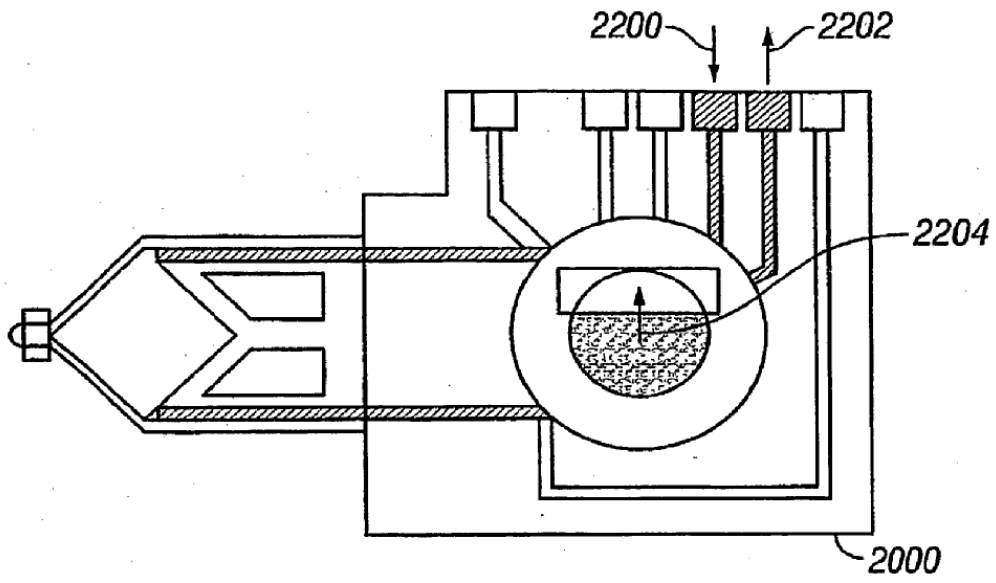


FIG. 2C

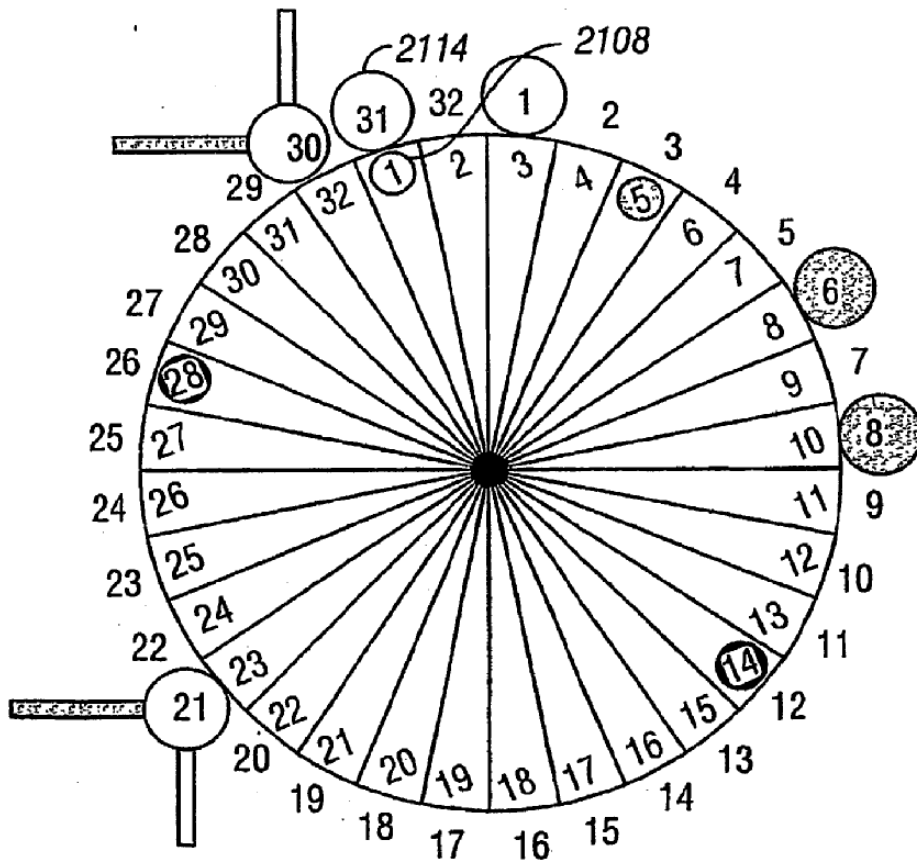
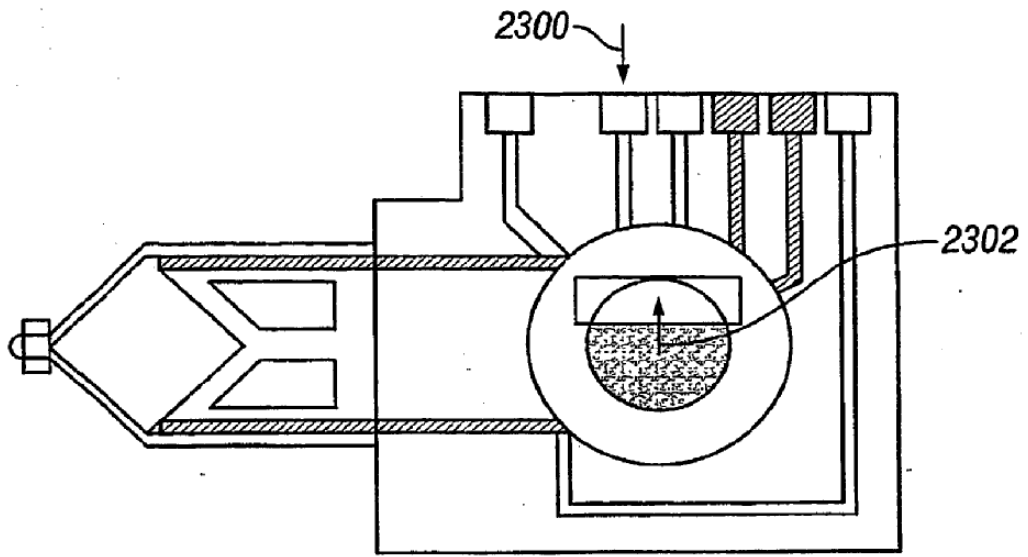


FIG. 2D

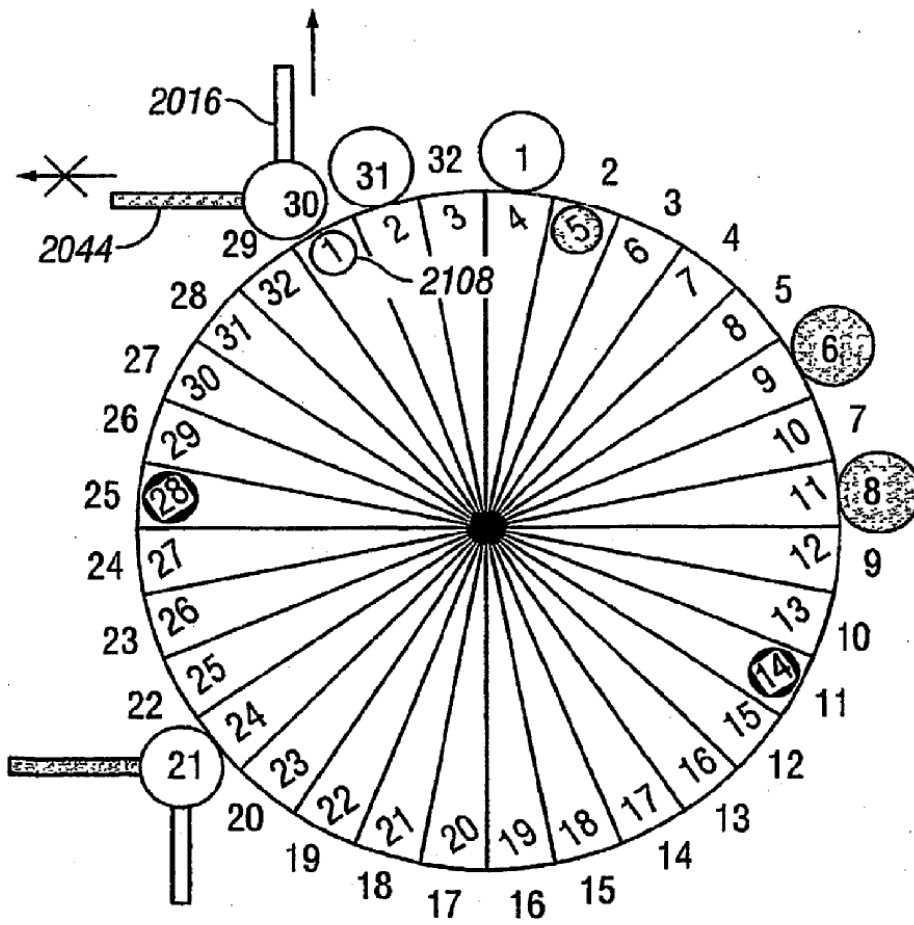
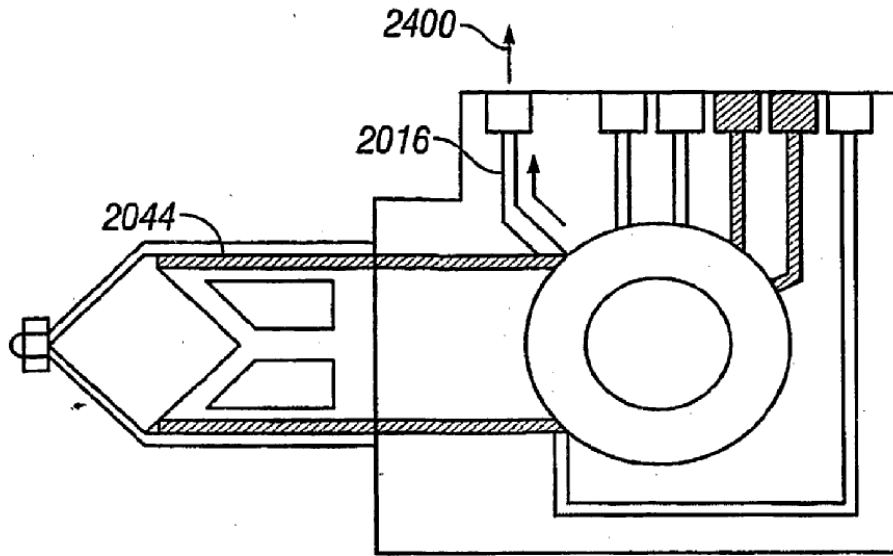


FIG. 2E

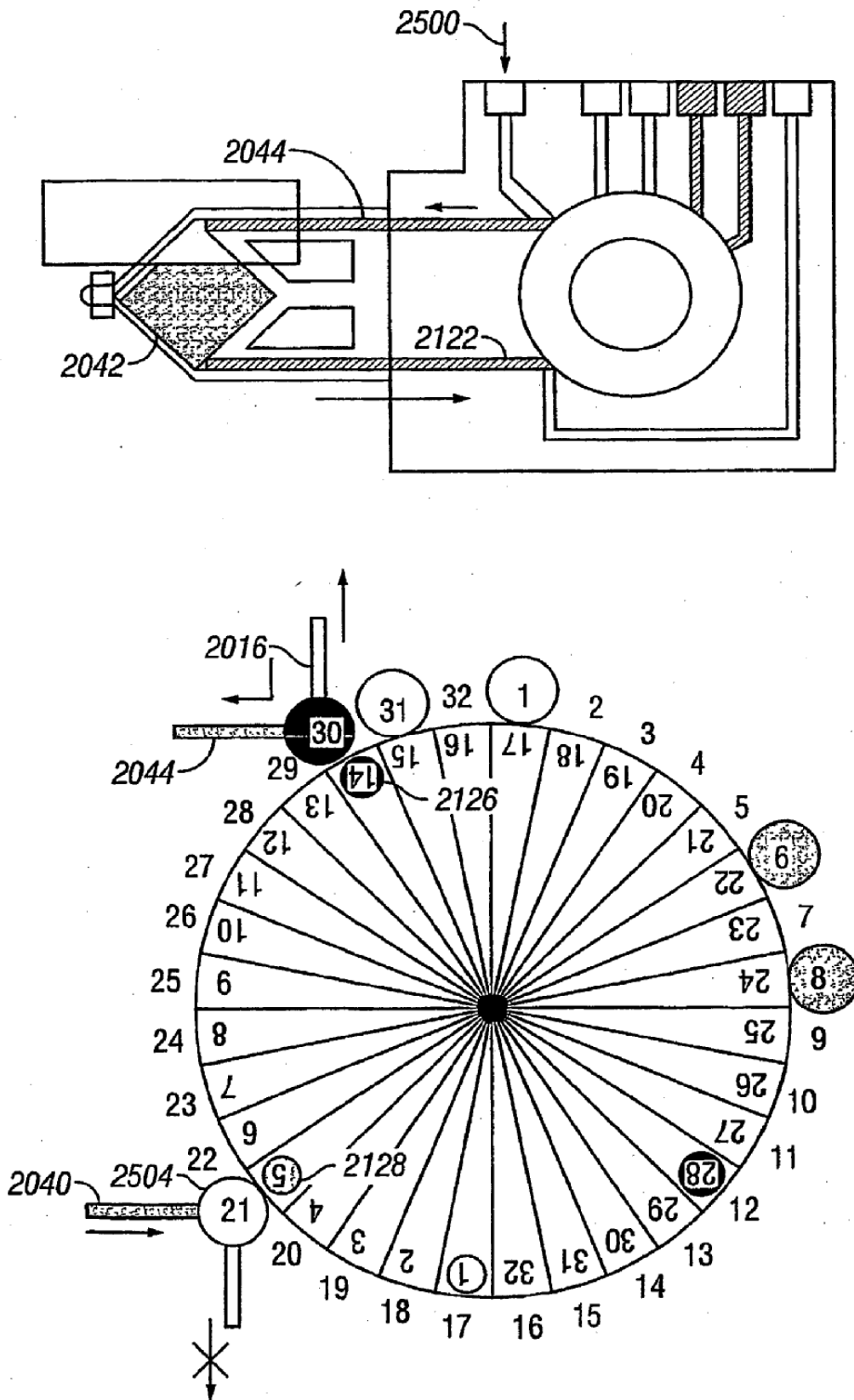


FIG. 2F

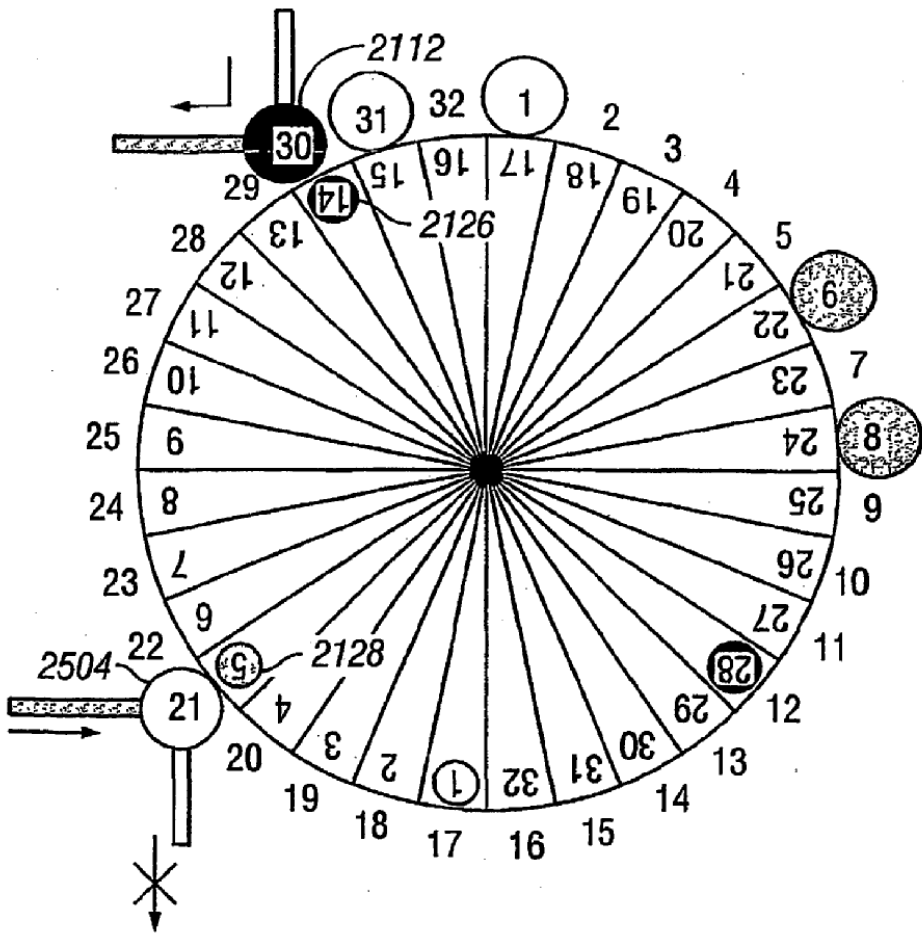
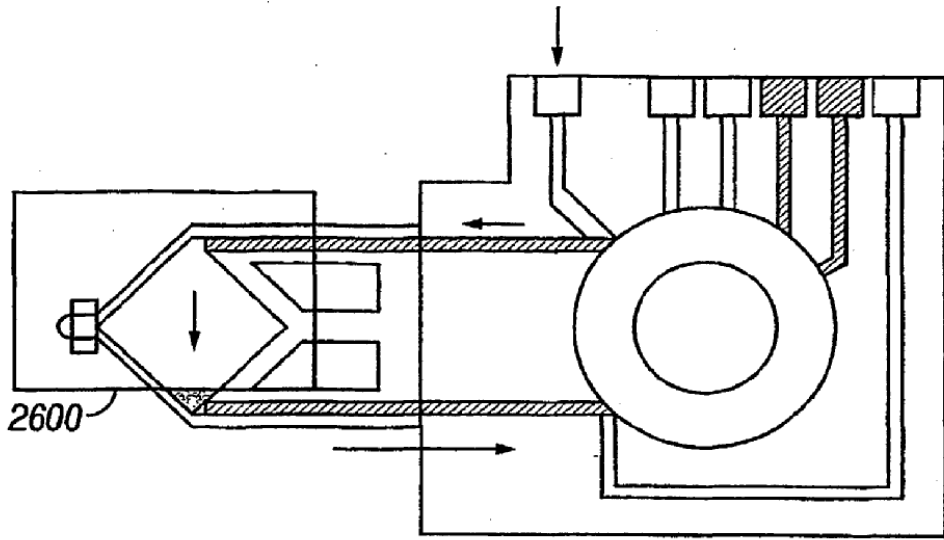


FIG. 2G

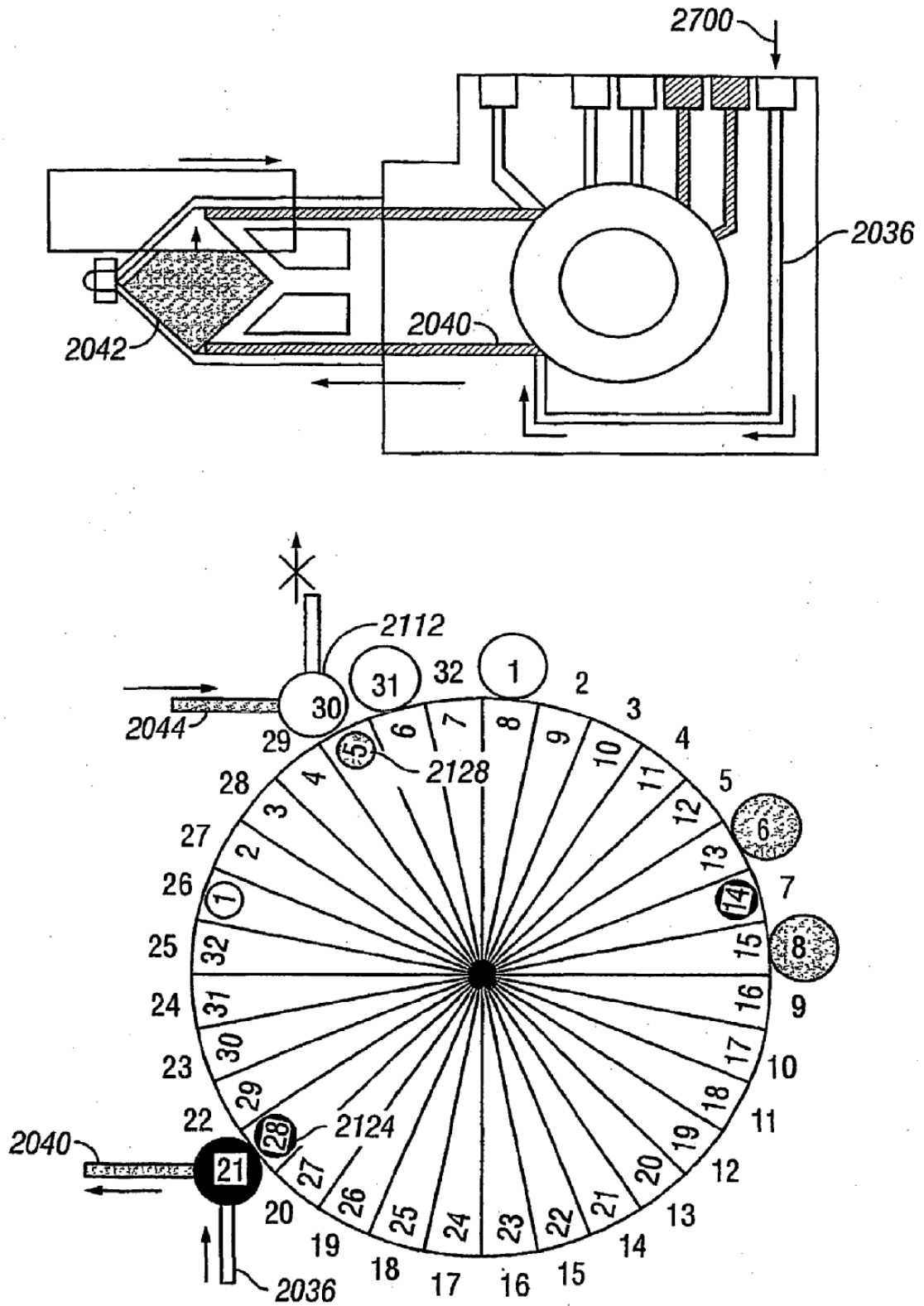


FIG. 2H

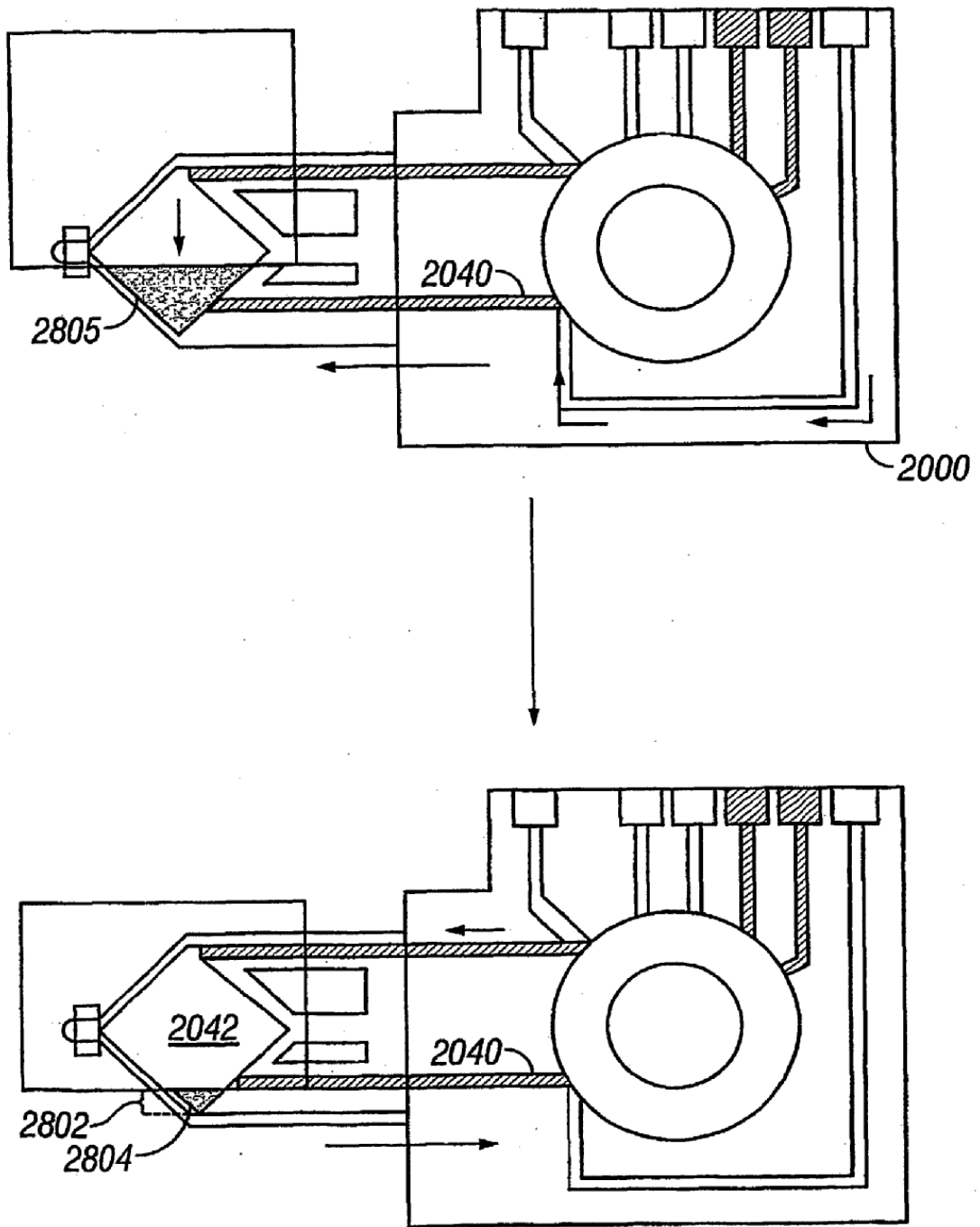


FIG. 3A

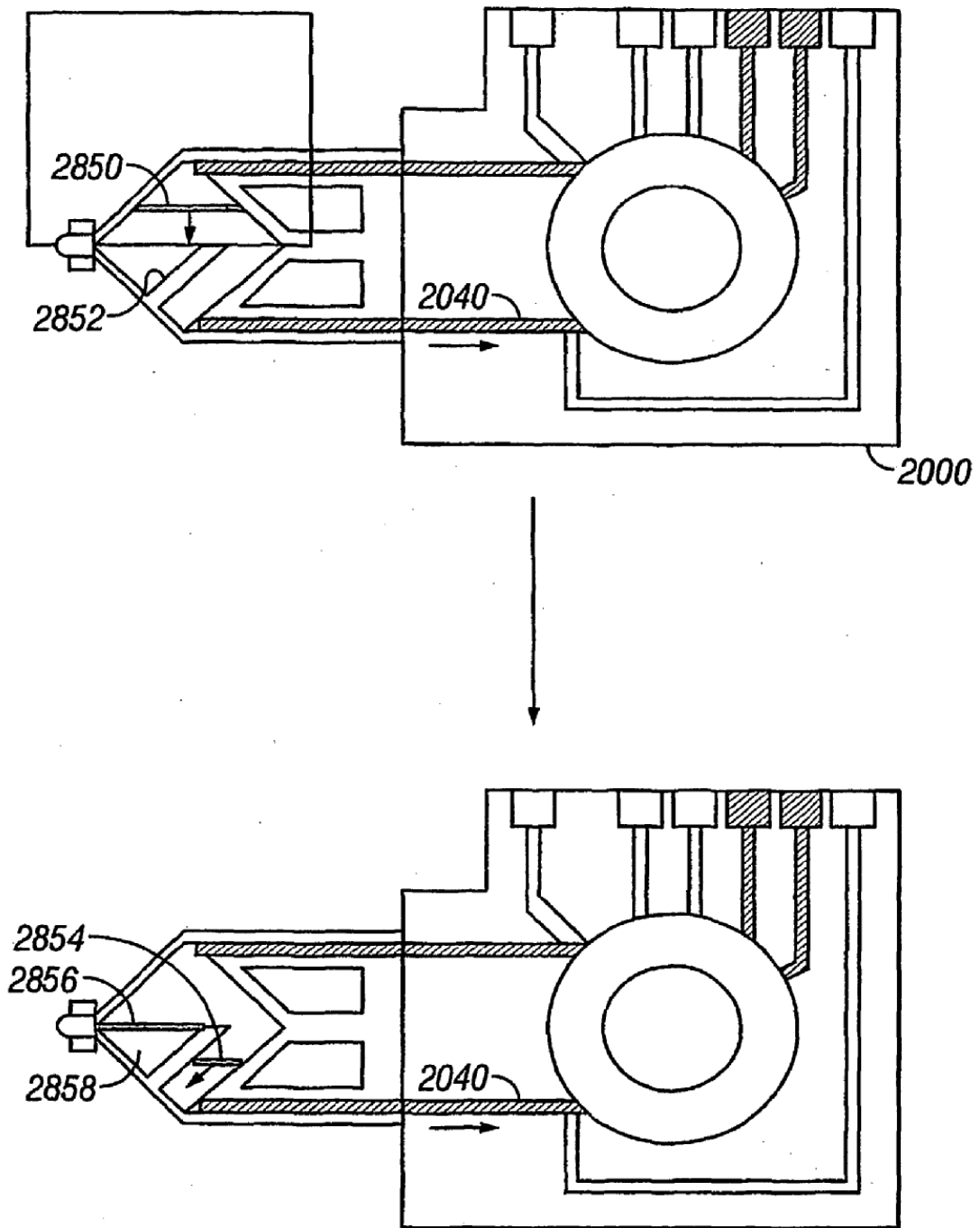


FIG. 3B

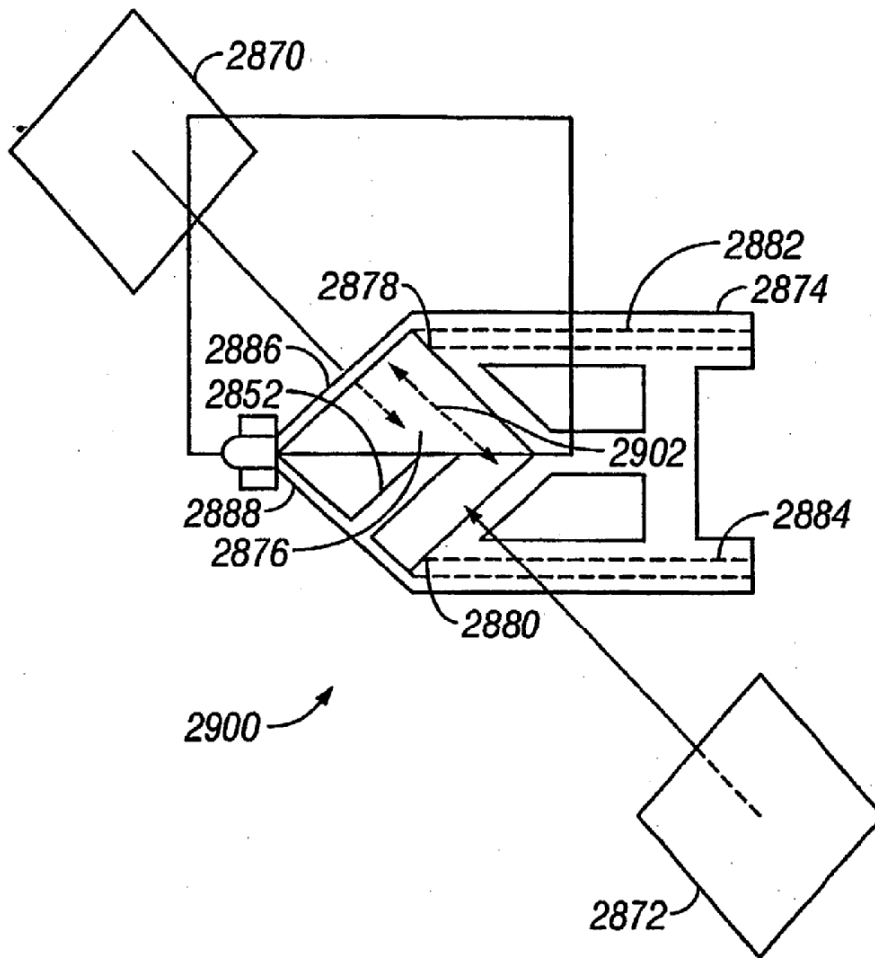


FIG. 3C