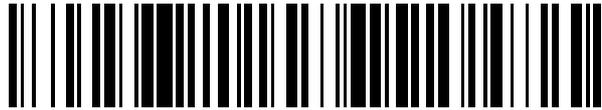


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 410**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2006 E 06841022 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 1966395**

54 Título: **Controles para ensayos con ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**21.12.2005 EP 05028004**

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

**27.10.2015**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**EMRICH, THOMAS;  
HABERHAUSEN, GERD y  
MOCZKO, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 549 410 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

Controles para ensayos con ácidos nucleicos

## 5 Campo de la invención

La presente invención se relaciona con un método para detectar una biomolécula diana en muestras para ensayos mediante la adición de una biomolécula de control interno a la muestra de ensayo; a una muestra de control negativo, a una muestra de control positivo y para una muestra de control de reactivo o añadiendo una biomolécula de control interno a la muestra de ensayo, a una muestra de control negativo, a una muestra de control positivo que comprende la biomolécula diana y proporcionar una muestra de control de reactivo que comprende la biomolécula diana, determinando en cada muestra una señal, y la verificación de la señal para detectar de esta manera la biomolécula diana. La invención también se relaciona con un método para verificar la determinación de una señal que indica la presencia de una biomolécula diana. La invención se refiere además a un método para detectar la presencia o la ausencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana en una muestra y un método para verificar la determinación de una señal que indica la presencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana. Del mismo modo se consideran los usos y los equipos.

## 20 Antecedentes de la invención

La determinación de ácidos nucleicos se ha convertido en una herramienta importante en la química analítica, sobre todo en la atención sanitaria. Por ejemplo, las enfermedades infecciosas y el estado genético pueden determinarse fácilmente sobre la base de la presencia o la cantidad de un ácido nucleico indicativa de dicha enfermedad o estado en muestras recibidas de un individuo. Por esta razón se establecieron métodos utilizando hibridación específica de secuencia de un ácido nucleico, preferiblemente un oligonucleótido, con un ácido nucleico diana indicativa de la enfermedad o el estado genético. Muchos ácidos nucleicos diana están presentes en un organismo a una concentración tan baja, que no es posible una detección directa en una muestra derivada de ese organismo. Estas dianas deben ser amplificadas antes de la detección. Los métodos de amplificación adecuados son, por ejemplo LCR (patentes US nº 5.185.243, 5.679.524 y 5.573.907; PE 0 320 308; WO 90/01069; WO 89/12696; y WO 89/09835). La tecnología de ciclación de sondas (patentes US nº 5.011.769, 5,403,711, 5,660,988, y 4,876,187, y las solicitudes publicadas PCT WO 95/05480, WO 95/14106, WO 95/00667 y), la tecnología Invader™ (patentes US nº 5.846.717; 5.614.402; 5.719.028; 5.541.311; y 5.843.669), la tecnología de la replicasa Q-Beta (patente US nº 4.786.600), NASBA (patentes US nº 5.409.818; PE- 0 329 822), TMA (patentes US nº 5.399.491, 5.888.779, 5.705.365, 5.710.029), SDA (patentes US nº 5.455.166 y 5.130.238) y PCR (US-A-4.683.202).

Con el fin de minimizar los falsos resultados en las determinaciones de ácidos nucleicos, las autoridades de varios países requieren el uso de ácidos nucleicos control. Especialmente cuando se utilizan métodos de amplificación de ácidos nucleicos tales controles son muy importantes, ya que el proceso de amplificación puede ser fuertemente influenciado por las condiciones de reacción, lo que podría conducir a resultados engañosos. A veces en una muestra están contenidas sustancias inhibitoras, que podrían conducir a resultados falsos negativos. Una revisión de los conceptos de control se proporciona en Valentine-Thon, E., J. Clinical Virol. 25 (2002) S13-S21.

En general se puede distinguir entre controles externos e internos. Los controles externos, como controles positivos y negativos clásicos imitan muestras positivas y negativas y, normalmente, se utilizan para comprobar si el ensayo se ejecuta correctamente o si contiene contaminantes. Un control interno, por ejemplo, es útil para reconocer sustancias inhibitoras contenidas posiblemente en una muestra o se pueden utilizar como un estándar de cuantificación en un ensayo cuantitativo. En contraste con el control externo, que normalmente se prueba en una cámara de reacción separada, un control interno se incuba preferiblemente en la misma cámara de reacción junto con el analito a analizar. Por lo tanto, el control o el producto amplificado de este control tiene que ser distinguible del analito o del producto amplificado de ese analito. Cuando se utiliza un método de amplificación, un ácido nucleico de control interno está siendo coamplificado esencialmente bajo las mismas condiciones de reacción que el ácido nucleico diana. Estas condiciones incluyen las concentraciones de reactivos, la temperatura, la concentración de inhibidor o actividades enzimáticas. Las secuencias de uso frecuente para los controles derivan de genes de mantenimiento (véase Chelly, J., et al., Eur J. Biochem 187 (1990) 691-69; Mallet, F., et al., J. Clin. Microbiol. 33 (1995) 3201-3208), y también de secuencias no naturales (véase, por ejemplo PE 1 236 805).

El ácido nucleico amplificado derivado del control interno se pueden distinguir a partir del ácido nucleico amplificado derivado del ácido nucleico diana, por ejemplo, por su longitud o diferente capacidad de hibridación a una sonda distinta (para revisiones véase: Clementi, M., et al., PCR Methods Applic. 2 (1993) 191-196; Clementi, M., et al., Arch. Virol. 140 (1995) 1523 - 1539). En todos los casos la secuencia de nucleótidos del control interno es parcial o totalmente diferente de la secuencia de ácido nucleico diana (véase también Haentjens-Herwegh, S., et al., Recent Res. Devel. Microbiology 4 (2000) 547-556).

Uno de los aspectos más críticos en una reacción de amplificación es la unión del cebador al ácido nucleico diana. Por lo tanto están siendo utilizados controles internos, que tienen los mismos sitios de unión a cebador que el ácido nucleico diana (véase, por ejemplo Gilliland, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 2725 - 2729).

Los documentos WO 02/18635 y WO 99/06594 describen el uso de secuencias de control interno encapsuladas que imitan los ácidos nucleicos encapsulados en una cubierta de virus.

5 PE 1.319.716 describe el uso de varios ácidos nucleicos de control interno discriminables para el ensayo de aislamiento y amplificación de ácidos nucleicos.

10 El documento WO 2004/055205 describe la adición de secuencias de control interno a una muestra que se somete a la preparación de muestras. A continuación, la señal de la IC se compara con controles externos que no se sometieron a la preparación de muestras a fin de verificar la eficiencia de la lisis celular y de preparación de la muestra, así como el rendimiento de amplificación y/o detección del ácido nucleico.

15 El documento US 6.277.560 describe el uso del DNA de un microorganismo externo como estándar externo para la cuantificación y el uso de un control interno para evaluar la eficiencia de amplificación de ácidos nucleicos.

Gilliland, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 2725-2729 describe el uso de controles negativos y controles internos para la cuantificación.

20 Brakenhoff, R., et al., Clin. Cancer Res. 5 (1999) 725-732, describe un ensayo de PCR con un estándar interno para el control de la calidad del RNA, un estándar externo para el control de sensibilidad y un control negativo. El documento WO 2005/061737 describe un equipo con un control interno, un control positivo y un control negativo.

25 Leushner y Kelly, Qiagennews, Nº 4, 2000, página 21, describen un método para la detección de bacterias entéricas patógenas en heces mediante PCR multiplex utilizando un control interno y un control positivo.

El equipo de detección "LightCycler® foodproof E. coli 0157" fabricado por Roche, Mannheim, Alemania, describe en su manual un método de PCR para la detección cualitativa de E. coli serotipo 0157 utilizando un control interno y un molde de control.

30 El documento US2003/077622 se refiere a métodos y composiciones que proporcionan un control positivo para identificar la inhibición durante una reacción de amplificación de señales.

35 El ensayo "CT/NG Test para Chlamydia trachomatis" fabricado por Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EE.UU., describe en su manual un método de PCR para la detección de Chlamydia trachomatis utilizando un control interno y el DNA diana de C. trachomatis.

El manual para el equipo de identificación de especies de carne CycleavePCRTM fabricado por Takara, Japón, describe un método para la diferenciación de diferentes especies de carne incluyendo un control.

40 Resumen de la invención

Es un objeto de la invención proporcionar nuevos conceptos para el control de métodos para la detección de biomoléculas.

45 En una realización de la invención, se proporciona un método para detectar la presencia o la ausencia de una biomolécula diana en una muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana que comprende los siguientes pasos:

50 a) en el que este paso consiste del paso a1) o a2)

a1) la adición de una biomolécula de control interno

- a la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana, y
- a una muestra de control negativo que no comprende la biomolécula diana,
- 55 - a una muestra de control positivo que comprende la biomolécula diana, y
- a una segunda muestra de control positivo que comprende la biomolécula diana

a2) añadiendo una biomolécula de control interno

- 60 - a la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana, y
- a una muestra de control negativo que no comprende la biomolécula diana, y
- a una muestra de control positivo que comprende la biomolécula diana,

y proporcionar una segunda muestra de control positivo que comprende la biomolécula diana

65

b) purificar las biomoléculas a partir de las muestras del paso a) para obtener muestras que comprenden las biomoléculas purificadas, en el que la muestra de control positivo, pero no la segunda muestra de control positivo se somete a dicha purificación,

5 c) determinar en cada muestra obtenida en el paso a) o b) la presencia o la ausencia de una señal de la biomolécula de control interno y de la biomolécula diana,

d) verificar la presencia o ausencia de la señal de la biomolécula diana en la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana mediante:

10 - la comprobación de la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana para la presencia de una señal para la biomolécula diana independientemente de la presencia de una señal de la biomolécula de control interno o comprobación de la presencia de una señal de la biomolécula de control interno en el caso de una ausencia de una señal para la biomolécula diana,

15 - la comprobación de la muestra de control negativo para la presencia de una señal de la biomolécula de control interno y por la ausencia de una señal de la biomolécula diana,

- la comprobación de la muestra de control positivo para la presencia de una señal de la biomolécula diana y por la presencia de una señal de la biomolécula de control interno, y

20 - la comprobación de la segunda muestra de control positivo para la presencia de una señal para la biomolécula diana en el paso d) del método o comprobación de la segunda muestra de control positivo para la presencia de una señal para la biomolécula diana y, opcionalmente, para la biomolécula de control interno,

e) detectar la presencia o la ausencia de la biomolécula diana mediante la cual la presencia o ausencia de las señales para la biomolécula diana y la biomolécula de control interno determinadas en el paso c) y verificadas en el paso d) indican la presencia o la ausencia de la biomolécula diana en la muestra de ensayo.

25 En otra realización un método para verificar la determinación de una señal que indica la presencia de una biomolécula diana que comprende los pasos de

30 a) proporcionar

- una muestra que se sospecha que comprende la biomolécula diana y que comprende una biomolécula de control interno, y

35 - una muestra de control negativo que comprende una biomolécula de control interno y no comprende la biomolécula diana, y

- una muestra de control positivo que comprende la biomolécula diana y que comprende una biomolécula de control interno

- una muestra de control de reactivo que comprende la biomolécula diana y que comprende opcionalmente una biomolécula de control interno,

40 b) determinar en cada muestra la señal de la biomolécula de control interno y de la biomolécula diana,

c) verificar la presencia de la señal de la biomolécula diana en la muestra de ensayo que indica la presencia de la biomolécula diana en la muestra de ensayo mediante:

45 - la comprobación de la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana para la presencia de una señal para la biomolécula diana independientemente de la presencia de una señal de la biomolécula de control interno o comprobación de la presencia de una señal de la biomolécula de control interno en el caso de la ausencia de una señal para la biomolécula diana,

50 - la comprobación de la muestra de control negativo para la presencia de una señal de la biomolécula de control interno y por la ausencia de una señal de la biomolécula diana,

- la comprobación de la muestra de control positivo para la presencia de una señal de la biomolécula diana y por la presencia de una señal de la biomolécula de control interno, y

55 - la comprobación de la muestra de control de reactivo para la presencia de una señal para la biomolécula diana y, opcionalmente, para la biomolécula de control interno.

En otra realización más de la invención, un método para detectar la presencia o la ausencia de un miembro (o ácido nucleico diana) de un grupo de ácidos nucleicos diana en una muestra sospechosa de comprender el miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana mediante:

60 a) la adición de un ácido nucleico de control interno

- a la muestra sospechosa de comprender un miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana, y

65 - a una muestra de control negativo que no comprende un miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana, y

## ES 2 549 410 T3

- a una muestra de control positivo que comprende un miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana,
- 5 b) proporcionar una segunda muestra de control positivo que comprende el grupo de los ácidos nucleicos diana y, opcionalmente, un ácido nucleico de control interno,
- 10 c) purificar los ácidos nucleicos de las muestras del paso a) y/o b) para obtener muestras que comprenden los ácidos nucleicos purificados, en el que la muestra de control positivo, pero no la segunda muestra de control positivo se somete a dicha purificación,
- 15 d) determinar en cada muestra obtenida en los pasos a) y b) o en los pasos b) y c) la presencia o ausencia de una señal del ácido nucleico de control interno y de una señal de un miembro (o diana de ácido nucleico) del grupo de los ácidos nucleicos diana,
- 20 e) verificar la presencia o la ausencia de la señal del miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana en la muestra sospechosa de comprender un miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana mediante:
- la comprobación de la muestra sospechosa de comprender un miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana para la presencia de una señal de un miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana independientemente de la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno o comprobación de la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno en el caso de la ausencia de una señal de un miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana,
  - 25 - la comprobación de la muestra de control negativo para la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno y por la ausencia de una señal del ácido nucleico diana,
  - la comprobación de la segunda muestra de control positivo para la presencia de una señal de cada miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana y, opcionalmente, del ácido nucleico de control interno, y
  - 30 - la comprobación de la muestra de control positivo para la presencia de una señal de un miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana y por la presencia de una señal del ácido nucleico o de control interno,
- 35 f) detectar la presencia o la ausencia de un miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana mediante el cual la presencia y/o la ausencia de las señales para un miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana y el ácido nucleico de control interno determinado en el paso d), y verificada en el paso e) indican la presencia o la ausencia de un miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana en la muestra que se sospecha que comprende un miembro (o ácido nucleico diana) del grupo de los ácidos nucleicos diana.
- 40 A lo largo de la solicitud, los términos miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana o ácido nucleico diana de un grupo de ácidos nucleicos diana o se selecciona de un grupo de ácidos nucleicos diana, se utilizan indistintamente.
- En otra realización, se proporciona un método para verificar la determinación de una señal que indica la presencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana que comprende los pasos de
- 45 a) proporcionar
- una muestra sospechosa de comprender un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y que comprende un ácido nucleico de control interno,
  - 50 - una muestra de control de reactivo que comprende el grupo de los ácidos nucleicos diana y, opcionalmente, un ácido nucleico de control interno,
  - una muestra de control negativo que no comprende un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y que comprende un ácido nucleico de control interno, y
  - 55 - una muestra de control positivo que comprende un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y un ácido nucleico de control interno,
- b) determinar en cada muestra de la señal del ácido nucleico de control interno y de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,
- 60 c) verificar la presencia de la señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana en la muestra sospechosa de comprender un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana mediante:
- la comprobación de la muestra sospechosa de comprender un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana para la presencia de una señal de un miembro de los ácidos nucleicos diana independientemente de la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno o control de la muestra para la presencia de una
  - 65

señal del ácido nucleico de control interno en el caso de la ausencia de una señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,

- la comprobación de la muestra de control de reactivo para la presencia de una señal de cada miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,

5 - la comprobación de la muestra de control negativo para la ausencia de una señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y por la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno, y

- la comprobación de la muestra de control positivo para la presencia de una señal de la biomolécula diana y por la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno.

10 En otra realización de la invención, una segunda muestra positiva que comprende opcionalmente una biomolécula de control interno y una muestra de control positivo que comprende una biomolécula de control interno, las dos muestras que comprenden la biomolécula diana, se utilizan para detectar la presencia o la ausencia de una biomolécula diana en una muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana o para la verificación de la determinación de una señal que indica la presencia de una biomolécula diana.

15 En otra realización, se proporciona un equipo para la detección de un ácido nucleico diana o un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana que comprende

20 a) una muestra de control de reactivo que comprende el ácido nucleico diana o el miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana,

b) una muestra de control negativo no comprende el ácido nucleico diana o el miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana,

25 c) una muestra de control positivo que comprende el ácido nucleico objetivo o el miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,

d) un ácido nucleico de control interno, y

30 e) los reactivos para detectar el ácido nucleico diana o el miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana.

35 Como es conocido en la técnica, un "nucleósido" es una combinación de base-azúcar. La parte de base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas, en más detalle la base adenina (A), guanina (G), timina (T) o citosina (C). La base uracilo está contenida de forma natural en el ácido ribonucleico. Otra base de origen natural es 5-metil-citosina o metil-citosina, que es la citosina que está sustituida con un grupo metilo en la posición 5 del anillo aromático de la base.

40 Los "nucleótidos" son "nucleósidos" que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción azúcar del nucleósido. Para esos "nucleósidos" que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido ya sea la fracción hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Un "nucleótido" es la "unidad monomérica" de un "oligonucleótido", más generalmente denominado en el presente documento como un "compuesto oligomérico", o un "polinucleótido", más generalmente denominado como un "compuesto polimérico". Otra expresión general para ello es el ácido desoxirribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA).

45 Un "ácido nucleico" es un compuesto polimérico de "nucleótidos" como es conocido por el experto en la técnica. Se utiliza en el presente documento para describir un "ácido nucleico" en una muestra que debe analizarse, es decir, se debe determinar la presencia, ausencia o cantidad de los mismos en una muestra. Por lo tanto, en otras palabras, el "ácido nucleico" es la diana y por lo tanto puede también indicarse como "ácido nucleico diana". Por ejemplo, si debe determinarse si la sangre contiene el virus de la inmunodeficiencia humana, el "ácido nucleico diana" es el ácido nucleico del virus de la inmunodeficiencia humana o más específicamente la secuencia de ácido nucleico, es decir, el orden de las bases adenina, guanina, citosina o timina, que se determina. Más específicamente en el contexto de la invención, el "ácido nucleico diana" es preferiblemente un ácido nucleico o más precisamente o preferiblemente una parte del ácido nucleico contenido en un microorganismo, célula o virus ("microorganismo diana", "célula diana" o "virus diana") tal como se especifica más adelante. El "ácido nucleico diana" tiene una secuencia de ácido nucleico específica para el microorganismo, célula o un virus y es parte del ácido nucleico (total) contenido en un microorganismo, célula o virus.

60 De acuerdo con la invención, un "compuesto oligomérico" es un compuesto que consiste en "unidades monoméricas" que pueden ser "nucleótidos", solo o "compuestos no naturales", más específicamente "nucleótidos modificados" (o "análogos de nucleótidos") o "compuestos no nucleótidos", solo o combinaciones de los mismos. "Oligonucleótidos" y "oligonucleótidos modificados" (o "análogos de oligonucleótidos") son subgrupos de "compuestos oligoméricos" en el contexto de la invención.

65 En el contexto de esta invención, el término "oligonucleótido" se refiere a "polinucleótidos" formados a partir de una pluralidad de "nucleótidos" como la "unidad monomérica", es decir, un "oligonucleótido" pertenece a un subgrupo

específico de un "compuesto oligomérico" o "compuesto polimérico" de ácido ribonucleico (RNA) o ácido desoxirribonucleico (DNA) con "unidades monoméricas". Los grupos fosfato están referidos comúnmente como la parte formante de la columna vertebral internucleosídica del "oligonucleótido". El enlace normal o cadena principal de RNA y DNA es un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

Los "oligonucleótidos" y "oligonucleótidos modificados", de acuerdo con la invención se pueden sintetizar como se describe principalmente en la técnica y son conocidos por el experto en la materia. Los métodos para preparar compuestos oligoméricos de secuencias específicas son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y síntesis química directa. Los métodos de síntesis química pueden incluir, por ejemplo, el método fosfotriéster descrito por Narang, S.A., et al., *Methods Enzymol.* 68 (1979) el 90-98, el método fosfodiéster descrito por Brown, E.L., et al., *Methods Enzymol.* 68 (1979) 109-151, el método de la fosforamida descrito en Beaucage, S.L. y Caruthers, M.H., *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 1859-1862, el método de H-fosfonato descrito en Garegg, P.J., et al., *Chem. Scr.* 25 (1985) 280-282 y el método de soporte sólido descrito en US 4.458.066.

Como se dijo anteriormente, un "ácido nucleico", así como el "ácido nucleico diana" es un compuesto polimérico de "nucleótidos" como es conocido por el experto en la técnica. Se utiliza en el presente documento para indicar un "ácido nucleico" en una muestra que debe analizarse, es decir, se debe determinar la presencia, ausencia o cantidad de los mismos en una muestra.

El término "cebador" se utiliza aquí como es conocido por el experto en la materia y se refiere a los "compuestos oligómeros" principalmente a los "oligonucleótidos", pero también a los "oligonucleótidos modificados" para que sean capaces de "cebar" la síntesis de DNA por una DNA polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3' de por ejemplo, un oligonucleótido proporciona un grupo -OH libre en 3' al que se le pueden unir "nucleótidos" adicionales estar mediante una DNA polimerasa dependiente de molde estableciendo un enlace fosfodiéster 3' a 5' mediante el cual se utilizan desoxinucleósidos trifosfato y con lo cual se libera pirofosfato. Por lo tanto, no existe - a excepción de la función prevista - una diferencia fundamental entre un "cebador", un "oligonucleótido" o una "sonda", de acuerdo con la invención.

El término "sonda" se refiere a ácidos nucleicos (DNA o RNA) sintéticamente o biológicamente producidos que, por diseño o selección, contienen secuencias de nucleótidos específicas que les permiten hibridar bajo condiciones predeterminadas definidas específicamente (es decir, preferentemente) para "ácidos nucleicos dianas". Una "sonda" se puede identificar como una "sonda de captura" lo que significa que "captura" el ácido nucleico diana de modo que pueda ser separado de materiales indeseables que pueden oscurecer su detección. Una vez que la separación se lleva a cabo, la detección del "ácido nucleico diana" capturado se puede lograr utilizando un procedimiento adecuado. Las "sondas de captura" a menudo ya están unidas a una fase sólida. Un ejemplo específico para ello es la situación de un microarray en el que una multitud de "sondas de captura" se unen a una "fase sólida", que "captura" cRNA marcado o cDNA.

Los "marcadores", a menudo denominados "grupos indicadores", son por lo general los grupos que hacen que un ácido nucleico, en particular, el "compuesto oligomérico" o el "oligonucleótido modificado", de acuerdo con la invención, así como los ácidos nucleicos unidos al mismo sean distinguibles del resto del líquido, es decir, la muestra (los ácidos nucleicos que tienen unidos un "marcador" también puede denominarse compuestos de unión a ácidos nucleicos marcados, sondas marcadas o sólo sondas). Los "haptenos" (tales como biotina o digoxigenina), enzimas (tales como fosfatasa alcalina o peroxidasa) o colorantes fluorescentes (tales como fluoresceína o rodamina) han demostrado principalmente, entre otros, ser adecuados como moléculas indicadoras no radiactivas o en otras palabras como "marcadores" no radiactivos. Estos "grupos de señales" o "marcadores" pueden estar unidos a o incorporados en los ácidos nucleicos mediante diversos métodos. Los "marcadores" preferidos según la invención son colorantes como un colorante de fluoresceína, un colorante rodamina, un colorante de cianina, y un colorante cumarina o haptenos como biotina. Por definición general, un "hapteno" es una molécula pequeña que no es por sí misma un inmunógeno (puede causar una respuesta inmune), pero tiene al menos un elemento de un antígeno y se pueden combinar con un anticuerpo u otra molécula portadora más grande para convertirse en inmunogénica.

Tal como se utiliza en este documento, la "relación de transferencia de energía por resonancia fluorescente" y términos similares se refieren a la hibridación adyacente de un "compuesto oligomérico" marcado con un "marcador fluorescente donador" y otro "compuesto oligomérico" marcado con un "marcador fluorescente aceptor" para un "ácido nucleico diana" de forma que el "marcador fluorescente donador" puede transferir energía de resonancia con el "marcador fluorescente aceptor" de forma que el "marcador fluorescente aceptor" produce una emisión de fluorescencia medible. Si el "marcador fluorescente donador" y "marcador fluorescente aceptor" están separados por una distancia demasiado grande, entonces el "marcador fluorescente donador" no puede transferir energía de resonancia con el "marcador fluorescente aceptor" de forma que el "marcador fluorescente aceptor" emite medible fluorescencia, y de ahí que el "marcador fluorescente donador" y el "marcador fluorescente aceptor" no están en relación de transferencia de energía de resonancia.

En el contexto de esta invención, la "hibridación" se entenderá por enlace de hidrógeno, que puede ser enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido, entre los nucleótidos complementarios. Por ejemplo,

la adenina y la timina son nucleobases complementarias que se emparejan mediante la formación de enlaces de hidrógeno. "Complementaria", como se usa aquí, se refiere también a la secuencia de complementariedad entre dos nucleótidos. Por ejemplo, si un nucleótido en una cierta posición de un oligonucleótido es capaz de formar enlaces de hidrógeno con un nucleótido en la misma posición de una molécula de DNA o RNA, entonces el oligonucleótido y el DNA o RNA se consideran complementarios entre sí en esa posición. El oligonucleótido y el DNA o RNA son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Por lo tanto, "hibridar específicamente" y "complementario" son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de complementariedad tal que se produce una unión estable y específica entre el oligonucleótido y la diana de DNA o RNA. Se entiende que un oligonucleótido no necesita ser 100% complementario a su secuencia de DNA diana para ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido es hibridable específicamente cuando la unión del oligonucleótido con la molécula de DNA o RNA diana interfiere con la función normal del DNA o RNA diana, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido a secuencias no diana bajo condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, o en el caso de ensayos in vitro, en condiciones en que se realizan los ensayos.

El término "biomolécula" se refiere a cualquier molécula que se puede encontrar en una muestra biológica. Estos son preferiblemente péptidos, proteínas, azúcares como oligosacáridos, lípidos, esteroides, prostaglandinas, prostaciclina, y ácidos nucleicos (incluyendo DNA y RNA). El término "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra sólida o líquida obtenida a partir de microorganismos, virus y organismos pluricelulares como las plantas, los animales y los seres humanos, en particular los pacientes humanos afectados por una enfermedad. Ejemplos son fluidos biológicos como sangre, plasma, suero, orina, bilis, líquido cefalorraquídeo, o cualquier secreción corporal. Una "muestra biológica" puede ser también una muestra obtenida de un órgano o tejido, preferiblemente una biopsia, y se compone de células. El término "biomolécula diana" debe denotar una "biomolécula" en una muestra que debe ser analizada y es el blanco (de análisis), es decir, debe determinarse la presencia, ausencia o cantidad de los mismos en una muestra. Por ejemplo, si se tiene que determinar si la sangre contiene el virus de la inmunodeficiencia humana, la "biomolécula diana" puede ser una biomolécula del virus de la inmunodeficiencia humana o más específicamente una proteína de este virus que puede ser reconocida por los anticuerpos en un ensayo inmunológico y que tiene una secuencia de aminoácidos específica para el virus en cuestión.

La abreviatura plural "spp." se utiliza para referirse a todas las especies individuales dentro de un género, por ejemplo, *Cornus* spp. se refiere a todas las plantas del género cornejo. Especies es una categoría fundamental de la clasificación taxonómica que se ubica por debajo de un género y, por encima de las subespecies, una población o una serie de poblaciones cuyos individuos tienen el potencial para reproducirse libremente entre sí y que es discontinua en la variación de otras poblaciones o serie de poblaciones.

#### Descripción detallada de la invención

Las técnicas convencionales de biología molecular y química de ácidos nucleicos, que están dentro de la experiencia de la técnica, se explican en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989; Gait, M.J., *Oligonucleotide Synthesis, a practical approach*, ed. 1984, IRL Press, Oxford, Inglaterra; Hames, B.D., y Higgins, S.J., *Nucleic Acid Hybridisation, a practical approach*, ed. 1985, IRL Press, Oxford, Inglaterra; y una serie, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc., todos los cuales se incorporan aquí por referencia. Todas las patentes, solicitudes de patentes, y publicaciones mencionadas en el presente documento, tanto supra e infra, se incorporan aquí por referencia.

En una realización de la invención, se proporciona un método para detectar la presencia o la ausencia de una biomolécula diana en una muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana que comprende los siguientes pasos:

a) en el que este paso consiste en el paso a1) o a2)

a1) la adición de una biomolécula de control interno

- a la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana,
  - a una muestra de control negativo que no comprende la biomolécula diana,
  - a una muestra de control positivo que comprende la biomolécula diana, y
  - a una muestra de control de reactivo que comprende la biomolécula diana a2) añadiendo una biomolécula de control interno
  - a la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana,
  - a una muestra de control negativo que no comprende la biomolécula diana, y
  - a una muestra de control positivo que comprende la biomolécula diana,
- y proporcionar una muestra de control de reactivo que comprende la biomolécula diana,

b) purificar opcionalmente las biomoléculas a partir de las muestras del paso a) para obtener muestras que comprenden las biomoléculas purificadas,

5 c) determinar en cada muestra obtenida del paso a) o b) la presencia o la ausencia de una señal de la biomolécula de control interno y de la biomolécula diana,

d) verificar la presencia o ausencia de la señal de la biomolécula diana en la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana mediante:

10 - la comprobación de la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana para la presencia de una señal para la biomolécula diana independientemente de la presencia de una señal de la biomolécula de control interno o comprobación de la presencia de una señal de la biomolécula de control interno en el caso de una ausencia de una señal para la biomolécula diana,

15 - la comprobación de la muestra de control negativo para la presencia de una señal de la biomolécula de control interno y por la ausencia de una señal de la biomolécula diana,

- la comprobación de la muestra de control positivo para la presencia de una señal de la biomolécula diana y por la presencia de una señal de la biomolécula de control interno, y

20 - la comprobación de la muestra de control de reactivo para la presencia de una señal para la biomolécula diana en el paso d) del método o control de la muestra de control de reactivo para la presencia de una señal para la biomolécula diana y, opcionalmente, para la biomolécula de control interno,

e) detectar la presencia o la ausencia de la biomolécula diana mediante el cual la presencia o ausencia de las señales para la biomolécula diana y la biomolécula de control interno determinado en el paso c) y verificado en el paso d) indican la presencia o la ausencia de la biomolécula diana en la muestra de ensayo.

25 El método de acuerdo con la invención hace uso de los diversos controles que permiten verificar si todos los pasos de la reacción funcionaban correctamente y si la señal obtenida es confiable y se puede utilizar de forma fiable para detectar la presencia o la ausencia de una biomolécula diana en una muestra. Por ejemplo, el uso de dos controles positivos, es decir, el control positivo y el control de reactivos de acuerdo con la invención, introducidos preferiblemente en diferentes pasos del proceso, preferiblemente antes y después de la purificación de las biomoléculas, permitirá comprobar qué etapas del método, en particular, la purificación de las biomoléculas, puede no funcionar correctamente y cual puede ser el origen de los errores. Mediante el uso de un control interno en la muestra de control negativo, la ausencia de la señal de la biomolécula diana en la muestra de control negativo se puede comprobar si resulta en una correcta ausencia de la biomolécula diana o una introducción inadvertida de una sustancia inhibidora en la muestra de control negativo. Mediante el uso de un control interno en la muestra de control positivo y la muestra de control de reactivo, la ausencia potencial y no intencionada de la señal de la biomolécula diana en estas muestras puede ser comprobado si resulta en una introducción inadvertida de una sustancia inhibidora en estas muestras. En resumen, el método de acuerdo con la invención permite el control y la verificación de varios pasos en un método para detectar la presencia o la ausencia de una biomolécula diana en una muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana. Esto es particularmente ventajoso para los ensayos multiplex, en particular, en relación con el análisis de curva de fusión en el caso de ácidos nucleicos que permiten la separación adicional de las señales derivadas de diferentes ácidos nucleicos diana.

45 La biomolécula de control interno (o biomolécula control o biomolécula) es un patrón interno para servir como un control para la detección de la biomolécula diana. El uso del control interno permite el control de la purificación, la determinación de la señal y detección permitiendo así el seguimiento de rendimiento del ensayo e incluso la cuantificación de la biomolécula diana. Se añade a la muestra de prueba y otras muestras para controlar las reacciones realizadas con el mismo y deberá permitir detectar la presencia de inhibidores de las reacciones. Como la biomolécula de control interno también está presente en las muestras que comprenden la biomolécula diana y se espera que proporcione una señal, la biomolécula de control interno o la señal de la misma tiene que ser diferenciable de la biomolécula diana y/o la señal de la misma.

55 Para este propósito, en una realización preferida de la invención, la biomolécula de control interno comprende una parte de la biomolécula diana. La biomolécula de control interno también puede comprender una parte de la biomolécula diana y una parte que no está en la biomolécula diana. La biomolécula de control interno o la parte de la biomolécula de control interno que no es una parte de la biomolécula diana puede ser muy similar a la biomolécula diana, es decir, debe tener propiedades similares a las biomoléculas diana. Esto significa que si la biomolécula diana es una proteína, la biomolécula de control interno debe ser una proteína con una secuencia de aminoácidos similar a la proteína diana, es decir, debe tener preferentemente una secuencia de aminoácidos que es entre un 60% y un 80% idéntico a la secuencia de aminoácidos de la proteína diana y por lo tanto deben tener propiedades moleculares similares, es decir, debe comportarse de forma similar a la biomolécula diana o la proteína, pero todavía debe producir una señal diferente a la biomolécula diana. Por lo tanto, un sitio antigénico diferente debe permitir la creación de una señal diferente en comparación con la proteína diana.

65 Preferiblemente, de acuerdo con la invención, la biomolécula de control interno es una mezcla o un grupo de biomoléculas de control interno, es decir, más de una biomolécula de control interno. La biomolécula de control

interno o mezclas de las mismas normalmente se proporcionan en una solución que comprende un tampón y una sal, es decir, en forma de una muestra. Por lo tanto, se añade una muestra que comprende un ácido nucleico de control interno a la correspondiente muestra de acuerdo con la invención.

5 En el caso de un ácido nucleico como la biomolécula diana, el ácido nucleico de control interno incluye una secuencia de ácido nucleico que difiere de la secuencia de ácido nucleico diana, pero preferiblemente es similar al mismo, es capaz de hibridarse con una sonda específica de secuencia y es capaz de amplificación. Para ello, el amplicón derivado del ácido nucleico de control interno tiene una longitud y contenido de bases G y C similar al del ácido nucleico diana y puede comprender un sitio de unión a sonda única. Para ello, el ácido nucleico de control interno debe ser un ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico similar a la del ácido nucleico diana, es decir, debería tener preferentemente una secuencia de ácido nucleico que es un 60% o 80% idéntica a la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico diana y debe por lo tanto tener propiedades moleculares similares. El ácido nucleico de control interno es generalmente un ácido nucleico clonado en un plásmido y comprende una parte del ácido nucleico diana y una parte que no es una parte del ácido nucleico diana, es decir, una parte que se utiliza para la detección del ácido nucleico diana y que se puede utilizar para la diferenciación de la señal del ácido nucleico de control interno y la señal del ácido nucleico diana. Preferentemente según la invención, el ácido nucleico de control interno contiene los mismos sitios de cebador que el ácido nucleico diana de unión, es decir, pueden usarse los mismos cebadores para la amplificación del ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno, y el ácido nucleico de control interno tiene un sitio de unión a sondas que tiene una secuencia de ácido nucleico diferente a la del sitio de unión a la sonda del ácido nucleico diana permitiendo así la diferenciación. Preferiblemente, según la invención, el ácido nucleico de control interno es una mezcla o un grupo de ácidos nucleicos de control interno, es decir, más de un ácido nucleico de control interno. El ácido nucleico de control interno o mezclas de los mismos normalmente se proporcionan en una solución que comprende un tampón y una sal. Por lo tanto, se añade una muestra que comprende un ácido nucleico de control interno para otra muestra. La solución que comprende el ácido nucleico de control interno está libre de ácido nucleico diana contaminante y proporciona los ácidos nucleicos de control interno a baja concentración para permitir la monitorización de la inhibición de la amplificación por PCR. Los detalles sobre la construcción y la metodología general para utilizar los ácidos nucleicos de control interno se pueden encontrar por ejemplo, en el documento PE 1 236 805, WO 02/18635, Gilliland, G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 2725-2729 y las referencias descritas en el mismo y supra.

La muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana puede también denominarse muestra de ensayo y es la muestra a analizar. Además de la biomolécula diana, puede comprender otros biomoléculas, además de la biomolécula diana. Estas otras biomoléculas son aquellas que están típicamente presentes en una muestra biológica y son las conocidas por un experto en la técnica, por ejemplo, péptidos, proteínas, azúcares como oligosacáridos, lípidos, esteroides, prostaglandinas, prostaciclina, y ácidos nucleicos (incluyendo DNA y RNA). La muestra biológica se refiere a cualquier muestra sólida o líquida obtenido a partir de microorganismos, virus y organismos multicelulares, particularmente los pacientes humanos afectados con una enfermedad. Son ejemplos los fluidos biológicos como sangre, plasma, suero, orina, bilis, líquido cefalorraquídeo, o cualquier secreción corporal. Una muestra biológica también puede ser una muestra obtenida de un órgano o tejido, preferiblemente una biopsia, y se compone de células.

La muestra de control negativo es una muestra de que no comprende la biomolécula diana. Sin embargo, puede comprender otros biomoléculas, pero no la biomolécula diana. Estas otras biomoléculas son las descritas anteriormente. En una realización preferida, la muestra de control negativo es una solución que comprende una sal y una sustancia tampón (y no comprende la biomolécula diana).

La muestra de control positivo es una muestra que comprende la biomolécula diana, es decir, que debe servir como control positivo lo que significa que debe proporcionar la misma señal que la muestra de ensayo si contiene la biomolécula diana. Preferiblemente, la muestra de control positivo es una solución que comprende la biomolécula diana o una parte de la misma. Preferiblemente, la muestra es una muestra que se trató de la misma manera que la muestra de ensayo, es decir, pasos de purificación para la obtención de la biomolécula diana contenida en ella. En el caso de un ácido nucleico como biomolécula diana, la muestra de control positivo se procesa a través del flujo de trabajo completo, incluyendo la lisis y el aislamiento de ácido nucleico como los pasos de purificación y (PCR) de amplificación y detección. Por lo tanto, la muestra de control positivo es una muestra que contiene la biomolécula diana en el mismo entorno que la muestra de ensayo. A menudo, la biomolécula diana es una biomolécula contenida en un virus, una célula o un microorganismo, preferentemente un ácido nucleico. A continuación, la muestra de ensayo, así como la muestra de control positivo comprende preferentemente un virus, una célula o un microorganismo que comprende la biomolécula diana. Preferentemente, la muestra de control positivo comprende un microorganismo obtenido de un hemocultivo positivo que se incluyó en una matriz de sangre humana negativa. Por lo tanto, preferiblemente, la muestra de control positivo es un ejemplo que comprende un virus, una célula o un microorganismo, más preferiblemente un microorganismo, que comprende la biomolécula diana y en el que la muestra comprende además el mismo o casi las mismas biomoléculas adicionales (es decir, ambientales) que las que contiene la muestra sospechosa de contener las biomoléculas diana. Si la biomolécula diana es un grupo de biomoléculas diana, cada una de las biomoléculas diana está contenida en un virus, célula o correspondiente microorganismo. A continuación, la muestra de control positivo puede contener uno o más o todos los miembros del grupo de biomoléculas diana, ya que es suficiente para ver que el tratamiento de la muestra funcionó al menos para

5 uno de ellos. Esto es de particular importancia si los virus, células o microorganismos son patógenos ya que no pueden venderse y entregarse a un cliente una muestra de control positivo que comprende una mezcla completa de los diferentes virus, células o microorganismos patogénicos y tal vez causantes de diferentes enfermedades potenciales. Por lo tanto, la muestra de control positiva sólo puede comprender una biomolécula diana en el caso de un grupo de biomoléculas diana a ensayar.

10 La muestra de control de reactivo es también una muestra de control positivo, es decir, que debe servir como control positivo lo que significa que debe proporcionar la misma señal que la muestra de ensayo si contiene la biomolécula diana. Preferiblemente, la muestra de control de reactivo es una solución que comprende la biomolécula diana o una parte de la misma. Sin embargo, es un control positivo que no se trata en absoluto de la misma manera que la muestra de ensayo ni la muestra de control positivo, es decir, no hay, por ejemplo pasos de purificación para la obtención de la biomolécula diana contenida en él. En el caso de un ácido nucleico como biomolécula diana, la muestra de control positivo se procesa a través del flujo de trabajo completo, incluyendo la lisis y el aislamiento de ácido nucleico como las etapas de purificación y de amplificación y detección (PCR), pero la muestra de control de reactivo solamente se somete a amplificación y detección (PCR). Por lo tanto, aunque la muestra de control positivo puede ser una muestra que contiene la biomolécula diana en el mismo entorno que la muestra de ensayo, a menudo puede que no sea el caso. A menudo, la biomolécula diana es una biomolécula contenida en un virus, una célula o un microorganismo, preferentemente un ácido nucleico. A continuación, la muestra de ensayo, así como la muestra de control positivo comprende preferentemente un virus, una célula o un microorganismo que comprende la biomolécula diana, pero la muestra de control de reactivo solamente comprende la biomolécula diana. Por lo tanto, preferiblemente, la muestra de control de reactivo es una muestra que comprende la biomolécula diana que no está contenida en un virus, una célula o un microorganismo y por lo cual la muestra puede o no puede comprender además otras biomoléculas. En el caso de un ácido nucleico como la biomolécula diana, el ácido nucleico diana puede estar vinculado o conectado a otros ácidos nucleicos como es el caso por ejemplo en un plásmido, donde el ácido nucleico a amplificar, el amplicón, se clona en un plásmido que permite la propagación de este ácido nucleico diana. Si la biomolécula diana es grupo de biomoléculas diana, cada una de las biomoléculas diana está contenida en la muestra de control reactivo, es decir, en el caso de un grupo de ácidos nucleicos diana, por ejemplo, para la detección de diversos virus o microorganismos, la muestra de control de reactivo comprende preferentemente el grupo de ácidos nucleicos diana, es decir, preferentemente un grupo de plásmidos que comprenden el grupo de los ácidos nucleicos diana. Preferiblemente, la muestra de control de reactivo comprende en el caso de un grupo de ácidos nucleicos diana de una mezcla de secuencias individuales de ácidos nucleicos diana clonadas que cubren la región amplificada de cada par de sondas de hibridación utilizada.

35 De acuerdo con la invención, la biomolécula de control interno puede añadirse o estar contenida dentro de la muestra de control de reactivo. Las muestras se pueden comprobar para la presencia de las correspondientes señales mediante métodos conocidos para el experto en la técnica. La muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana se comprueba para la presencia de una señal para la biomolécula diana independientemente de la presencia de una señal de la biomolécula de control interno o para detectar la presencia de una señal de la biomolécula de control interno en el caso de una ausencia de una señal para la biomolécula diana. En el caso de un ácido nucleico y la presencia de una señal para el ácido nucleico diana no existe necesariamente una señal del ácido nucleico de control interno presente ya que se utilizan los mismos cebadores para la amplificación y el ácido nucleico diana puede estar presentes en cantidades más altas que no permiten la amplificación y detección del ácido nucleico de control interno.

45 En una realización opcional de la invención, las biomoléculas o los ácidos nucleicos se purifican a partir de las muestras usando por ejemplo, fases sólidas y métodos conocidos por el experto en la materia. Las muestras pueden comprender células de organismos multicelulares como por ejemplo, las células humanas y animales tales como leucocitos, y compuestos químicos inmunológicamente activos de bajo y alto peso molecular tales como haptenos, antígenos, anticuerpos y ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, fluido cerebral, esputo, heces, muestras de biopsia, médula ósea, enjuagues orales, suero sanguíneo, tejidos, orina o mezclas de los mismos. En una realización preferida de la invención, la muestra es un fluido del cuerpo humano o animal. Preferiblemente, la muestra es sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina. El plasma sanguíneo es preferiblemente plasma de sangre tratada con EDTA, heparina o citrato. La muestra biológica que comprende los ácidos nucleicos se lisa para crear una mezcla de compuestos biológicos que comprenden ácidos nucleicos y otros componentes. Los procedimientos para la lisis de muestras son conocidos por los expertos y pueden ser procedimientos químicos, enzimáticos o de naturaleza física. También es aplicable una combinación de estos procedimientos. Por ejemplo, la lisis se puede realizar utilizando ultrasónicos, alta presión, fuerzas de cizallamiento, álcali, detergentes o soluciones salinas caotrópicas, o proteasas o lipasas. Para el procedimiento de lisis para obtener ácidos nucleicos, se hace especial referencia a Sambrook et al: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY y Ausubel, F., et al.: Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Wiley and Sons, NY. A continuación, los ácidos nucleicos se aíslan de la mezcla de lisis utilizando los métodos y fases sólidas según la invención y luego se pueden someter a los métodos de acuerdo con la invención. Los agentes caotrópicos también se utilizan para lisar células para preparar una mezcla entre ácidos nucleicos y otras sustancias biológicas (véase, por ejemplo Sambrook, J., et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o PE 0 389 063). Después se añade material que comprende vidrio o sílice y un efecto de purificación resulta del comportamiento del DNA o RNA para unirse a este

material en una superficie de vidrio bajo estas condiciones, es decir, en presencia de ciertas concentraciones de un agente caotrópico, altas concentraciones de disolventes orgánicos o bajo condiciones ácidas. También se pueden utilizar partículas de vidrio magnéticas como se describe en el documento WO 01/37291.

5 En otra realización más preferida, la biomolécula diana es un grupo de biomoléculas diana.

En otra realización más preferida, la biomolécula es un ácido nucleico.

10 En otra realización más preferida, el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno se amplifica antes del paso c). En una realización preferida de la invención, los ácidos nucleicos se amplifican con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; PE 0 201 184, PE 0 200 362, US 4.683.202). El método de amplificación puede ser también la reacción en cadena de la ligasa (LCR, Wu, D.Y., y Wallace, R.B., Genomics 4 (1989) 560-9 y Barany, F., Proc Natl Acad Sci USA 88 (1991) 189-93; Reacción en cadena de la ligasa polimerasa (Barany, F., PCR Methods Appl 1 (1991) 5-16); Gap-LCR (publicación de patente PCT nº WO 90/01069); Reacción en cadena de reparación (Publicación de Patente Europea Nº PE 0 439 182 A2 ), 3SR (Kwoh, DY, et al., Proc Natl Acad Sci USA 86 (1989). 1173-7; Guatelli, J.C., et al., Proc Natl Acad Sci USA 87 (1990) 1874-8;. Publicación de Patente PCT nº WO 92/08808), y NASBA (Patente Estadounidense Nº US 5.130.238). Además, hay amplificación de desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación Q $\beta$  (para una revisión véase, por ejemplo Whelen, A.C., y Persing, D.H., Annu Rev Microbiol 50 (1996) 349-73; Abramson, R.D., y Myers, T.W., Curr Opin Biotechnol 4 (1993) 41-7).

25 En una realización, el método comprende el paso de detectar el ácido nucleico amplificado. El ácido nucleico amplificado puede ser determinado o detectado mediante métodos analíticos estándar conocidos por el experto en la técnica y se describe por ejemplo en Sambrook, et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor University Press (1989).; Lottspeich y Zorbas, Bioanalytik (1998), Eds. L. a. Zorbas, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlín, Alemania, o en Ausubel, F., et al., en "Current protocols in molecular biology" (1994), Eds. F. Ausubel, R. Brent y K.R.E., Wiley & Sons Verlag, New York. Puede haber también otros pasos de purificación antes de detectar el ácido nucleico diana por ejemplo, un paso de precipitación. Los métodos de detección pueden incluir, pero no están limitados a la unión o intercalación de colorantes específicos como bromuro de etidio que se intercala en el DNA de doble cadena y cambia su fluorescencia después. Los ácidos nucleicos purificados pueden también separarse mediante métodos electroforéticos opcionalmente después de una digestión de restricción y visualizarse después de eso. Hay también ensayos basados en sondas que explotan la hibridación de oligonucleótidos en secuencias específicas y la posterior detección del híbrido. También es posible secuenciar el ácido nucleico diana después de más pasos conocidos por el experto en la materia. Otros métodos son aplicables a una diversidad de secuencias de ácidos nucleicos a un chip de silicio al que están unidos sondas específicas y producen una señal cuando una secuencia complementaria se une.

40 En una realización particularmente preferida de la invención, el ácido nucleico se detecta midiendo la intensidad de la luz de fluorescencia como señal de fluorescencia durante la amplificación. Este método implica la monitorización de la fluorescencia en tiempo real. Por lo tanto, en otra realización preferida, la señal del ácido nucleico diana o del ácido nucleico de control interno es una señal de fluorescencia. La señal de fluorescencia se genera preferiblemente mediante un marcaje unido a una sonda que se hibrida con el ácido nucleico diana o el ácido nucleico de control interno.

45 Un método particularmente preferido que aprovecha de forma simultánea la amplificación y la detección mediante la medición de la intensidad de la luz fluorescente es el método realizado en el instrumento COBAS TaqMan® como se describe en el documento WO 92/02638 y las correspondientes patentes estadounidenses US 5.210.015, US 5.804.375, US 5.487.972. Este método aprovecha la actividad exonucleasa de una polimerasa para generar una señal. En detalle, el ácido nucleico es detectado por un proceso que comprende poner en contacto la muestra con un oligonucleótido que contiene una secuencia complementaria a una región del ácido nucleico diana y un oligonucleótido marcado que contiene una secuencia complementaria a una segunda región de la misma cadena del ácido nucleico diana, pero sin incluir la secuencia de ácido nucleico definida por el primer oligonucleótido, para crear una mezcla de dúplex durante las condiciones de hibridación, en el que los dúplex comprenden el ácido nucleico diana hibridado con el primer oligonucleótido y al oligonucleótido marcado de tal manera que el extremo 3' del primer oligonucleótido es adyacente al extremo 5' del oligonucleótido marcado. A continuación, esta mezcla se trata con una polimerasa de ácido nucleico dependiente del molde que tiene una nucleasa 5' a 3' en condiciones suficientes para permitir la actividad nucleasa 5' a 3' de la polimerasa para escindir el oligonucleótido marcado hibridado y liberar los fragmentos marcados. La señal generada por la hidrólisis del oligonucleótido marcado se detecta y/o se mide. El formato utilizado en el instrumento TaqMan® elimina la necesidad de una reacción de formación de un complejo unido a una fase sólida y hacerlo detectable. En términos más generales, la reacción de amplificación y/o detección del método de acuerdo con la invención es un ensayo en fase de solución homogénea.

65 Otro método preferido son los formatos utilizados en el instrumento LightCycler® (ver por ejemplo, US 6.174.670). Estos formatos se aplican a la tecnología de transferencia de energía de resonancia fluorescente (véase, por ejemplo, las Patentes US Nº 4.996.143, 5.565.322, 5.849.489, y 6.162.603) y se basan en el hecho de que cuando un marcador donador fluorescente y el correspondiente marcador aceptor fluorescente se posicionan dentro de una

cierta distancia el uno del otro, la transferencia de energía tiene lugar entre los dos marcadores fluorescentes que se puede visualizar o de otro modo detectar y/o cuantificar. Como se usa en este documento, dos sondas, cada una conteniendo un marcador fluorescente puede hibridar con un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas por la complementariedad de las sondas con el ácido nucleico diana. El marcador fluorescente de acuerdo con la invención de la sonda puede ser un marcador fluorescente donador o aceptor. Tras la hibridación de las sondas al producto de amplificación en las posiciones apropiadas, se genera una señal FRET. El análisis fluorescente se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, un sistema de microscopio de epifluorescencia de contaje de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para la monitorización de emisión fluorescente en el rango particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones, o un fluorómetro de excitación para iniciar la transferencia de energía puede llevarse a cabo con un láser de iones de argón, una lámpara de arco de mercurio de alta intensidad (Hg), una fuente de luz de fibra óptica, u otra fuente de luz de alta intensidad filtrada adecuadamente para la excitación en el rango deseado. Como se usa en este documento con respecto a los marcadores fluorescentes donadores y aceptores correspondientes, "correspondiente" se refiere a un marcador fluorescente aceptor que tiene un espectro de excitación que se solapa al espectro de emisión del marcador fluorescente donador. Por consiguiente, la transferencia de energía no radiactiva eficiente se puede producir entre los mismos. Los marcadores fluorescentes preferidos son, por ejemplo, fluoresceína como el marcador fluorescente donador, por lo que el marcador fluorescente aceptor es rodamina. Otros marcadores preferidos son colorantes de cianina o marcadores, preferentemente Cy5 como se describe en la patente de Estados Unidos 6.174.670. Por lo tanto, más preferiblemente, la señal de fluorescencia se genera por un par de sondas que hibridan con el ácido nucleico correspondiente en el que los miembros de dicho par de sondas hibridan con el ácido nucleico correspondiente dentro en no más de cinco nucleótidos entre sí, en el que la primera sonda de dicho par de sondas se marca con un marcador fluorescente donador y en el que la segunda sonda de dicho par de sondas se marca con el correspondiente marcador fluorescente aceptor y en el que la hibridación de la primera y segunda sonda con el ácido nucleico correspondiente les lleva a una relación de transferencia de energía de resonancia.

En una realización preferida de la invención, el paso c) del método de acuerdo con la invención comprende los siguientes subpasos

c1) añadir a las muestras obtenidas en el paso a) o b)

- Un par de cebadores que se hibridan con el ácido nucleico de control interno y el ácido nucleico diana o dos pares de cebadores el primero hibrida con el ácido nucleico de control interno y el segunda hibrida con el ácido nucleico diana,
- Un primer par de sondas que hibridan con el control interno de ácido nucleico en el que los miembros de dicho primer par de sondas hibridan con el ácido nucleico de control interno en una distancia de no más de cinco nucleótidos entre sí, en el que la primera sonda de dicho primer par de sondas está marcado con un primer marcador fluorescente donador y la segunda sonda de dicho primer par de sondas está marcado con el correspondiente marcador fluorescente aceptor y en el que la hibridación de la primera y segunda sonda con el ácido nucleico de control interno les lleva a una relación de transferencia de energía de resonancia;
- Un segundo par de sondas que hibridan con el ácido nucleico en el que los miembros del segundo par de sondas hibridan con el ácido nucleico diana en una distancia de no más de cinco nucleótidos entre sí, en el que la primera sonda de dicho segundo par de sondas está marcado con un segundo marcador fluorescente donador y en el que la segunda sonda de dicho segundo par de sondas está marcado con el correspondiente segundo marcador fluorescente aceptor y en el que la hibridación de la primera y segunda sonda con el ácido nucleico diana les lleva a una relación de transferencia de energía de resonancia; y
- una polimerasa de ácidos nucleicos termoestable y reactivos necesarios para amplificar el ácido nucleico de control interno y el ácido nucleico diana,

c2) amplificar en las muestras el ácido nucleico de control interno y el ácido nucleico diana si está presente en la correspondiente muestra,

c3) determinar en cada muestra de forma separada la presencia o ausencia de una señal de fluorescencia del ácido nucleico de control interno y del ácido nucleico diana como una función de la temperatura de la correspondiente muestra.

- en el que la señal de fluorescencia específica para el ácido nucleico de control interno se genera mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia entre el primer marcador fluorescente donador de dicha primera sonda del primer par de sondas y el primer marcador fluorescente aceptor de la segunda sonda del primer par de sondas, y
- en el que la señal de fluorescencia específica para el ácido nucleico diana se genera mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia entre el primer marcador fluorescente donador de dicha primera sonda del segundo par de sondas y el primer marcador fluorescente aceptor de la segunda sonda del segundo par de sondas.

La presencia o ausencia de una señal de fluorescencia del ácido nucleico de control interno y del ácido nucleico diana puede determinarse como una función de la temperatura de la muestra correspondiente ("análisis de la curva

de fusión"). Para un análisis tal, la temperatura de la muestra se incrementa de forma continua y la temperatura exacta de fusión se determina en el momento que el complejo de hibridación generado anteriormente entre el ácido nucleico diana (amplificado) y la sonda de hibridación se resuelve. Tal aproximación se puede utilizar incluso con el fin de detectar diferencias en las temperaturas de fusión de moléculas diana que sólo difieren entre sí por un único polimorfismo de nucleótido. En otras palabras, el análisis se puede utilizar incluso para la detección o identificación de mutaciones puntuales. Ejemplos de tales técnicas se describen en detalle en el documento WO 97/46707, WO 97/46712 y WO 97/46714, cuyas descripciones se incorporan por referencia.

Se han descrito varios formatos de detección basados en la señalización fluorescente dependiente de la diana, que permiten el control continuo de la generación de productos de amplificación por PCR o la identificación de mutaciones durante un posterior análisis de curva de fusión (revisado en Wittwer, Carl T., et al., *BioTechniques* 22 (1997) 130-138). Estos formatos de detección incluyen, pero no se limitan a:

- Aumento de la transferencia de energía de resonancia fluorescente tras la hibridación

Para este formato de detección, se utilizan dos sondas de hibridación de oligonucleótidos cada una marcada con una porción fluorescente que son capaces de hibridar con regiones adyacentes pero no superpuestas de una cadena del producto de amplificación. Preferiblemente, un oligonucleótido está marcado en el extremo 5' y el segundo oligonucleótido está marcado en el extremo 3'. Cuando se hibrida con el DNA diana, los dos marcajes fluorescentes se ponen en estrecho contacto, de tal manera que la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia entre las dos porciones fluorescentes puede tener lugar. Como consecuencia, la hibridación se puede controlar a través de la excitación de la porción donadora y la medición posterior de la emisión de fluorescencia de la segunda porción aceptora (WO 97/46714).

En una realización similar, sólo se utiliza una sonda marcada con fluorescencia, que junto con un cebador debidamente marcado también puede servir como un par FRET específico (Bernard, P.S., et al., *Analytical Biochemistry* 255 (1998) 101-107).

- Balizas moleculares

Un oligonucleótido de baliza molecular se marca con un compuesto fluorescente y un compuesto extintor, que debido a la estructura secundaria de la molécula están en estrecha proximidad entre sí. Tras la unión al DNA diana, el enlace de hidrógeno intramolecular se rompe, y el compuesto fluorescente unido por un extremo de la sonda se separa del compuesto extintor, que se une al extremo opuesto de la sonda (Lizardi et al., Patente de EE.UU. N° 5. 118.801).

La temperatura del punto de fusión se determina generalmente experimentalmente al someter la muestra a un aumento continuo de la temperatura midiendo la disociación del complejo de hibridación en cadenas sencillas. La disociación puede detectarse mediante una serie de métodos diferentes, por ejemplo por un cambio en la absorbancia UV, mediante resonancia de plasmón en superficie o preferiblemente mediante fluorescencia. En este último caso, la sonda de hibridación generalmente se marca con un marcador fluorescente, y la generación de una señal fluorescente depende de alguna manera en la formación del complejo de hibridación.

En una realización preferida, el ensayo se realiza en un formato de detección homogénea: Por ejemplo, el ácido nucleico diana puede amplificarse antes de la determinación de la temperatura de fusión en una reacción de PCR típica con cebadores de amplificación adecuados. Una sonda de hibridación adecuada ya está presente durante la reacción de amplificación. La sonda de hibridación lleva preferiblemente un marcador fluorescente que es detectable después de la excitación apropiada. Por ejemplo, la sonda de hibridación puede ser un faro molecular (Lizardi et al., US Pat. No. 5,118,801) o un par de oligonucleótidos marcados fluorescentemente que juntos son capaces de actuar de acuerdo con el llamado formato de FRET-HybProbe (WO 97/46714). Después de la finalización de la reacción de PCR la temperatura de la muestra se incrementa constitutivamente. La fluorescencia se puede detectar siempre y cuando la sonda de hibridación se une al DNA diana. Sin embargo, a temperatura de fusión, la sonda de hibridación es liberado de su objetivo, y la señal fluorescente disminuye inmediatamente hasta el nivel de fondo. Esta disminución se puede controlar con una trama de temperatura-tiempo apropiado, de tal manera que un valor exacto de la temperatura puede ser determinada, a la que se observó la disminución de temperatura.

Preferiblemente, el ácido nucleico diana es un grupo de ácidos nucleicos diana y la pareja de sondas es un grupo de pares de sondas con lo cual cada par de sondas se hibrida a un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana.

Preferiblemente, el marcador es un colorante de fluoresceína, un colorante rodamina, un colorante de cianina, un colorante de cumarina. Más preferiblemente, el marcador es fluoresceína, LC-Red 610, LC-Red 640, LC-Red 670 o LC-Red 705.

Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico específica para un microorganismo, una célula o un virus. Más preferiblemente, el microorganismo es un microorganismo gram-positivo o gram-negativo o un hongo. Incluso más preferiblemente,

5 a) el microorganismo gram-positivo es *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* o,

b) el microorganismo gram-negativo es un *Staphylococcus* spp., *Enterococcus faecium* o *faecalis* o *Streptococcus* spp., o

10 c) el hongo es *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, o *Candida tropicalis*.

15 En una realización preferida de la presente invención, el método está automatizado, es decir, el método lleva a cabo un proceso automatizable como, por ejemplo el que se describe en el documento WO 99/16781. Proceso automatizable significa que los pasos del proceso son adecuados para llevarse a cabo con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o ningún control o influencia externa de un ser humano. Método automatizado significa que los pasos del método automatizable se llevan a cabo con un aparato o máquina capaz de funcionar con poco o ningún control o influencia externa de un ser humano. Sólo los pasos de preparación para el método puede tener que realizarse a mano, por ejemplo, los recipientes de almacenamiento tienen que llenarse y ponerse en su lugar, la elección de las muestras tiene que realizarse por un ser humano y otras medidas conocidas por el experto en la materia, por ejemplo, el funcionamiento del ordenador de control. El aparato o máquina puede, por ejemplo agregar automáticamente líquidos, mezclar las muestras o llevar a cabo las etapas de incubación a temperaturas específicas. Normalmente, una máquina o aparato de este tipo es un robot controlado por un ordenador que lleva a cabo un programa en el que se especifican los pasos individuales y comandos. En una realización preferida de la invención, el método está en un formato de alto rendimiento, es decir, los métodos automatizados se lleva a cabo en un formato de alto rendimiento lo cual significa que los métodos y la máquina o aparato usado están optimizados para un alto rendimiento de muestras en un corto tiempo.

25 En otra realización preferida de la invención, un método para verificar la determinación de una señal que indica la presencia de una biomolécula diana que comprende los pasos de

30 a) proporcionar

- una muestra que se sospecha que comprende la biomolécula diana y que comprende una biomolécula de control interno, y
- 35 - una muestra de control negativo que comprende una biomolécula de control interno y no comprende la biomolécula diana, y
- una muestra de control positivo que comprende la biomolécula diana y que comprende una biomolécula de control interno
- 40 - una muestra de control de reactivo que comprende la biomolécula diana y que comprende opcionalmente una biomolécula de control interno,

b) determinar en cada muestra la señal de la biomolécula de control interno y de la biomolécula diana,

45 c) verificar la presencia de la señal de la biomolécula diana en la muestra de ensayo indicando la presencia de la biomolécula diana en la muestra de ensayo mediante:

- la comprobación de la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana para la presencia de una señal para la biomolécula diana independientemente de la presencia de una señal de la biomolécula de control interno o comprobación de la presencia de una señal de la biomolécula de control interno en el caso de una ausencia de una señal para la biomolécula diana,
- 50 - la comprobación de la muestra de control negativo para la presencia de una señal de la biomolécula de control interno y por la ausencia de una señal de la biomolécula diana,
- la comprobación de la muestra de control positivo para la presencia de una señal de la biomolécula diana y por la presencia de una señal de la biomolécula de control interno, y
- 55 - la comprobación de la muestra de control de reactivo para la presencia de una señal para la biomolécula diana y, opcionalmente, para la biomolécula de control interno.

60 En otra realización preferida de la invención, la biomolécula de control interno comprende una parte de la biomolécula diana, la muestra de control positivo comprende un virus, un microorganismo o una célula que contiene la biomolécula diana, o en el que la muestra de control positivo es una solución que comprende la biomolécula diana o una parte de la misma, o en el que la muestra de control de reactivo es una solución que comprende la biomolécula diana o una parte de la misma.

65 Preferiblemente, la biomolécula diana es un grupo de biomoléculas diana.

Más preferiblemente, la biomolécula es un ácido nucleico.

En una realización preferida, el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno se amplifican antes del paso b). Los pasos de amplificación preferidos se describen anteriormente.

5 Los métodos de amplificación y detección preferidos se describen anteriormente. En otra realización preferida, la señal del ácido nucleico diana o del ácido nucleico de control interno es una señal de fluorescencia. Más preferiblemente, la señal de fluorescencia se genera por un marcador unido a una sonda que se hibrida con el ácido nucleico diana o el ácido nucleico de control interno.

10 Todas las otras formas de realización preferidas y las descripciones específicas de realizaciones del procedimiento para la verificación de la determinación de una señal que indica la presencia de una biomolécula diana son los mencionados para los métodos de acuerdo con la invención, es decir, el método para detectar la presencia o la ausencia de una biomolécula diana en una muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana (supra), el método para detectar la presencia o la ausencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana en una muestra sospechosa de comprender el miembro de un grupo de nucleico diana ácidos (infra) y el método o el método para verificar la determinación de una señal que indica la presencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana (infra).

20 En otra realización más de la invención, se proporciona un método para detectar la presencia o la ausencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana en una muestra sospechosa de comprender el miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana que comprende los pasos de o mediante:

a) adición de un ácido nucleico de control interno

25 - a la muestra sospechosa de comprender un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana, y  
 - a una muestra de control negativo que no comprende un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana, y  
 - a una muestra de control positivo que comprende un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,

30 b) proporcionar una muestra de control de reactivo que comprende el grupo de los ácidos nucleicos diana y, opcionalmente, un ácido nucleico de control interno,

c) opcionalmente la purificación de los ácidos nucleicos de las muestras del paso a) y/o b) para obtener muestras que comprenden los ácidos nucleicos purificados,

35 d) determinar en cada muestra obtenida en los pasos a) y b) o en los pasos b) y c) la presencia o ausencia de una señal del ácido nucleico de control interno y de una señal de un miembro del grupo de los nucleico diana ácidos,

e) la verificación de la presencia o la ausencia de la señal del miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana en la muestra sospechosa de comprender un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana mediante:

40 - la comprobación de la muestra sospechosa de comprender un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana para la presencia de una señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana independientemente de la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno o la comprobación de la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno en el caso de una ausencia de una señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,

45 - la comprobación de la muestra de control negativo para la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno y por la ausencia de una señal del ácido nucleico diana,  
 - la comprobación de la muestra de control de reactivo para la presencia de una señal de cada miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y, opcionalmente, de la interna

50 - el ácido nucleico de control, y  
 - la comprobación de la muestra de control positivo para la presencia de una señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y por la presencia de una señal del ácido nucleico o de control interno,

55 f) detectar la presencia o la ausencia de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana mediante el cual la presencia y/o la ausencia de las señales para un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y el ácido nucleico de control interno determinado en el paso d) y verificado en el paso e) indica la presencia o la ausencia de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana en la muestra sospechosa de comprender un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana.

60 Este método tiene la ventaja de que el uso de la muestra de control de reactivo que comprende el grupo de los ácidos nucleicos diana y, opcionalmente, un ácido nucleico de control interno permitirá determinar si los reactivos, es decir, especialmente los cebadores y sondas para la detección de todos los miembros correspondientes del grupo de los ácidos nucleicos diana están trabajando adecuadamente, además de un control por el ácido nucleico de control interno.

65

En una realización preferida de la invención, la biomolécula de control interno comprende una parte de la biomolécula diana, la muestra de control positivo comprende un virus, un microorganismo o una célula que contiene la biomolécula diana o en el que la muestra de control positivo es una solución que comprende la biomolécula diana o una parte de la misma, o la muestra de control es una solución de reactivo que comprende la biomolécula diana o una parte de la misma.

En otra realización preferida de la invención, un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y el ácido nucleico de control interno se amplifica antes del paso d). Los pasos de amplificación preferidos se describen anteriormente.

Los métodos de amplificación y detección preferidos se describen anteriormente. En otra realización preferida de la invención, la señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana o del ácido nucleico de control interno es una señal de fluorescencia. Preferiblemente, la señal de fluorescencia se genera por un marcador unido a una sonda que se hibrida a un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana o el ácido nucleico de control interno. Más preferiblemente, la señal de fluorescencia se genera por un miembro de un grupo de pares de sondas de hibridación a un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana o de un par de sondas que hibridan con el ácido nucleico de control interno en el que los miembros de cada miembro del grupo de pares de sondas que hibridan con el miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana o los miembros del par de sondas que hibridan con el ácido nucleico de control interno hibridan con el correspondiente ácido nucleico a una distancia de no más de cinco nucleótidos el uno al otro, en el que la primera sonda de un par de sondas marcado con un marcador fluorescente donador y en el que la segunda sonda de un par de sondas se marca con el correspondiente marcador fluorescente aceptor y en el que la hibridación de la primera y segunda sonda al miembro del grupo de ácidos nucleicos diana o el ácido nucleico de control interno les pone en una relación de transferencia de energía de resonancia.

Preferiblemente, el paso d) del método de acuerdo con la invención comprende las siguientes subetapas

d1) añadir a las muestras obtenidas en la etapa a) y b) o los pasos b) y c)

- un par de cebadores que se hibridan con el ácido nucleico de control interno y a un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana o un par de cebadores que se hibridan con el ácido nucleico de control interno y un grupo de pares de cebadores cada miembro del misma hibrida con un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,
- un primer par de sondas que hibridan con el ácido nucleico de control interno en el que los miembros de dicho primer par de sondas hibridan con el ácido nucleico de control interno a una distancia de no más de cinco nucleótidos entre sí, en el que la primera sonda de dicho primer par de sondas se marca con un primer marcador fluorescente donador y en el que la segunda sonda de dicho primer par de sondas se marca con el correspondiente primer marcador fluorescente aceptor y en el que la hibridación de la primera y segunda sonda con el ácido nucleico de control interno les pone en una relación de resonancia de transferencia de energía;
- un grupo de pares de sondas de cada miembro que se hibridan a un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana en el que los miembros del grupo de pares de sondas hibridan con el correspondiente miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana en una distancia de no más de cinco nucleótidos entre sí, en el que la primera sonda de un miembro del grupo de pares de sondas se marca con un segundo marcador fluorescente donador y en el que la segunda sonda de un miembro del grupo de pares de sondas se marca con el correspondiente segundo marcador fluorescente aceptor y en el que la hibridación de la primera y segunda sonda al miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana les pone en una relación de transferencia de energía de resonancia; y
- una polimerasa de ácido nucleico termoestable y reactivos necesarios para amplificar el ácido nucleico de control interno y el grupo de los ácidos nucleicos diana,

d2) amplificar en las muestras de ácido nucleico de control interno y el grupo de los ácidos nucleicos diana si está presente en la correspondiente muestra,

d3) determinar en cada muestra por separado la presencia o ausencia de una señal de fluorescencia del ácido nucleico de control interno y/o de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana como una función de la temperatura de la correspondiente muestra

- en los que la señal de fluorescencia específica para el ácido nucleico de control interno se genera mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia entre el primer marcador fluorescente donador de dicha primera sonda del primer par de sondas y el primer marcador fluorescente aceptor de la segunda sonda del primer par de sondas, y
- en los que la fluorescencia específica para un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana se genera mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencia entre el primer marcador fluorescente donador de dicha primera sonda del miembro del grupo de pares de sondas y el primer marcador fluorescente aceptor de la segunda sonda del miembro del grupo de pares de sondas.

La presencia o ausencia de una señal de fluorescencia del ácido nucleico de control interno y/o de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana se determina como una función de la temperatura ("análisis de la curva de fusión"). La descripción exacta del análisis de la curva de fusión se puede encontrar anteriormente.

5 Preferiblemente, el marcador es un colorante de fluoresceína, un colorante rodamina, un colorante de cianina, un colorante de cumarina. Más preferiblemente, el marcador es fluoresceína, LC-Red-610, LC-Red 640, LC-Red 670 o LC-Red 705.

10 En otra realización preferida de la invención, un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana comprende una secuencia de ácido nucleico específica para un microorganismo, una célula o un virus. Preferiblemente, el microorganismo es un microorganismo gram-positivo o gram-negativo o un hongo. Más preferiblemente,

15 a) el microorganismo gram-positivo es *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* o,

b) el microorganismo gram-negativo es un *Staphylococcus* spp., *Enterococcus faecium* o *faecalis* o *Streptococcus* spp., o

20 c) el hongo es *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, o *Candida tropicalis*.

25 Todas las otras formas de realización preferidas y las descripciones específicas de realizaciones del método para detectar la presencia o la ausencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana en una muestra sospechosa de comprender el miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana son los mencionados para los métodos de acuerdo con la invención, es decir, el método para detectar la presencia o la ausencia de una biomolécula diana en una muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana (supra), el método para verificar la determinación de una señal que indica la presencia de una biomolécula diana (supra) y el método para verificar la determinación de una señal que indica la presencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana (infra).

30 En otra realización de la invención, se proporciona un método para verificar la determinación de una señal que indica la presencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana que comprende los pasos de

35 a) proporcionar

- una muestra sospechosa de comprender un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y que comprende un ácido nucleico de control interno,
- una muestra de control de reactivo que comprende el grupo de los ácidos nucleicos diana y, opcionalmente, un ácido nucleico de control interno,
- 40 - una muestra de control negativo que no comprende un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y que comprende un ácido nucleico de control interno, y
- una muestra de control positivo que comprende un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y un ácido nucleico de control interno,

45 b) determinar en cada muestra la señal del ácido nucleico de control interno y de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,

c) verificar la presencia de la señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana en la muestra sospechosa de comprender un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana mediante:

- 50 - la comprobación de la muestra sospechosa de comprender un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana para la presencia de una señal de un miembro de los ácidos nucleicos diana independientemente de la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno o control de la muestra para la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno en el caso de ausencia de una señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,
- 55 - la comprobación de la muestra de control de reactivo para la presencia de una señal de cada miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,
- la comprobación de la muestra de control negativo para la ausencia de una señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y por la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno, y
- 60 - la comprobación de la muestra de control positivo para la presencia de una señal de la biomolécula diana y para la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno.

65 En una realización preferida, el ácido nucleico de control interno comprende una parte de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana, la muestra de control positivo comprende un virus, un microorganismo o una célula que contiene el ácido nucleico diana o en el que la muestra de control positivo es una solución que comprende un

miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana o una parte del mismo, o la muestra de control de reactivo es una solución que comprende un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana o una parte del mismo.

5 Preferiblemente, el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno se amplifica antes del paso c). Los pasos de amplificación preferidos se describen anteriormente.

10 Los métodos de amplificación y detección preferidos se describen anteriormente. Preferiblemente, la señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana o del ácido nucleico de control interno es una señal de fluorescencia. Más preferiblemente, la señal de fluorescencia se genera por un marcador unido a una sonda que se hibrida a un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana o el ácido nucleico de control interno.

15 Todas las otras formas de realización preferidas y las descripciones específicas de realizaciones del procedimiento para la verificación de la determinación de una señal que indica la presencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana son los mencionados para los métodos de acuerdo con la invención, es decir, el método para detectar la presencia o la ausencia de una biomolécula diana en una muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana (supra), el método para verificar la determinación de una señal que indica la presencia de una biomolécula diana (supra) y el método para detectar la presencia o la ausencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana en una muestra sospechosa de comprender el miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana (supra).

20 En otra realización de la invención, una muestra de control de reactivo que comprende opcionalmente una biomolécula de control interno y una muestra de control positivo que comprende una biomolécula de control interno, las dos muestras que comprenden la biomolécula diana, se utilizan para detectar la presencia o la ausencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana en una muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana o para la verificación de la determinación de una señal que indica la presencia de una biomolécula diana. Todas las realizaciones preferidas para el método de acuerdo con la invención también son realizaciones preferidas de la utilización según la invención.

25 En otra realización preferida, se proporciona un equipo para la detección de un ácido nucleico diana o un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana que comprende

- 30 a) una muestra de control de reactivo que comprende el ácido nucleico diana o el miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana,
- 35 b) una muestra de control negativo no comprende el ácido nucleico diana o el miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana,
- c) una muestra de control positivo que comprende el ácido nucleico diana o el miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,
- 40 d) un ácido nucleico de control interno, y
- e) los reactivos para detectar el ácido nucleico diana o el miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana.

45 Preferiblemente, en el equipo de acuerdo con la invención, los reactivos para detectar el ácido nucleico diana o el miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana comprende

- 50 - un par de sondas y un par de cebadores,  
 - una polimerasa termoestable de ácidos nucleicos, y  
 - reactivos para la amplificación del ácido nucleico diana o el miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana.

55 Dichos equipos conocidos en la técnica comprenden además artículos de plástico que se pueden utilizar durante el procedimiento de preparación de la muestra como, por ejemplo, placas de microtitulación en el formato de 96 o 384 pocillos o simplemente tubos de reacción ordinarios fabricados por Eppendorf, Hamburgo, Alemania y todos los demás reactivos para llevar a cabo el método de acuerdo con la invención. Por lo tanto, el equipo puede contener adicionalmente un material con una afinidad para los ácidos nucleicos, preferiblemente el material con una afinidad a los ácidos nucleicos comprende un material con una superficie de sílice. Preferiblemente, el material con una superficie de sílice es un cristal. Lo más preferiblemente, el material con una afinidad para los ácidos nucleicos es una composición que comprende partículas de vidrio magnéticas. El equipo puede comprender además o adicionalmente un tampón de lisis que contiene por ejemplo, agentes caotrópicos, detergentes o alcoholes o mezclas de los mismos que permiten la lisis de las células. Estos componentes del equipo de acuerdo con la invención se pueden proporcionar por separado en tubos o recipientes de almacenamiento. Dependiendo de la naturaleza de los componentes, estos pueden incluso proporcionarse en un solo tubo o recipiente de almacenamiento. El equipo puede comprender además o adicionalmente una solución de lavado que es adecuada para el paso de lavado de las partículas de vidrio magnéticas cuando el DNA o RNA se une a las mismas. Esta solución de lavado puede contener etanol y/o agentes caotrópicos en una solución tamponada o soluciones con un

pH ácido y sin etanol y/o agentes caotrópicos como se ha descrito anteriormente. A menudo la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan como soluciones madre que tienen que diluirse antes de su uso.

5 El equipo puede comprender adicionalmente un tampón eluyente o elución, es decir, una solución o un tampón (por ejemplo Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) o agua pura para eluir el DNA o RNA unido a las partículas de vidrio magnéticas. Además, pueden estar presentes reactivos adicionales o soluciones tamponadas que se pueden utilizar para el proceso de purificación de un ácido nucleico, es decir, DNA o RNA.

10 Todas las otras formas de realización preferidas y las descripciones específicas de realizaciones de los usos y el equipo de acuerdo con la invención son los mencionados para los métodos de acuerdo con la invención, es decir, el método para detectar la presencia o la ausencia de una biomolécula diana en una muestra que se sospecha que comprende la biomolécula diana (supra), el método para verificar la determinación de una señal que indica la presencia de una biomolécula diana (supra), el método para detectar la presencia o la ausencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana en una muestra sospechosa de comprender el miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana (supra) y el método para verificar la determinación de una señal que indica la presencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana (supra).

15 Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

20 Descripción de las figuras

Todas las figuras muestran la temperatura en el eje x y la primera derivada negativa (-df/dT fluorescencia) de la gráfica de intensidad de fluorescencia en el eje y.

25 Figura 1: Se muestra en la Figura 1 el resultado de un análisis de la curva de fusión para RC G + (Control de Reacción G +). Para cada uno de los diferentes organismos diana representados en el reactivo RC G +, se pueden detectar los picos de la curva de fusión individuales (dF/dt; F = fluorescencia; T = temperatura) en los diferentes canales de detección y a diferentes picos de temperatura de fusión.

30 Figura 2: Se muestra en la Figura 2 el resultado de un análisis de la curva de fusión para RC G- (Control de Reacción G-). Para cada uno de los diferentes organismos diana representados en el reactivo RC G-, se pueden detectar los picos de la curva de fusión individuales (dF/dt; F = fluorescencia; T = temperatura) en los diferentes canales de detección y a diferentes picos de temperatura de fusión.

35 Figura 3: Se muestra en la Figura 3 el resultado de un análisis de la curva de fusión para RC F (Control de Reacción F). Para cada uno de los diferentes organismos diana representados en el reactivo RC F, se pueden detectar los picos de la curva de fusión individuales (dF/dt; F = fluorescencia; T = temperatura) en los diferentes canales de detección y a diferentes picos de temperatura de fusión.

40 Figura 4: Se muestra en la Figura 4 el análisis de la curva de fusión para RC G- (Reacción de Control G-; canal de detección 610) obtenido en 3 experimentos múltiplex diferentes. En el primer experimento se obtuvieron los picos de fusión (df/dt; F = fluorescencia; T = temperatura) para los 3 organismos diana representados en el RC G-, mientras que en el segundo y tercer experimento, el pico de fusión para la diana 2 y la diana 1, respectivamente están ausentes. Los picos de la curva de fusión que faltan indican claramente un fracaso de los reactivos y/o condiciones de reacción inadecuados usadas en el experimento 2 y 3 para la detección de la diana 2 y la diana 1, respectivamente.

45 Figura 5: La Figura 5 muestra el resultado de un análisis de la curva de fusión para muestras de sangre que contienen E. faecalis y C. albicans. Se añadió CI a las muestras de sangre antes de la preparación de la muestra y se copurificó junto con el ácido nucleico diana. Las señales individuales de la curva de fusión se obtuvieron para 2 organismos diana (E. faecalis, C. albicans) en el ensayo de G + y el ensayo F, pero no en el ensayo G-. Sin embargo, para los 3 ensayos (G+, G-, F) se detectó la señal de CI correspondiente a la temperatura de fusión máxima esperada (IC G+, IC G-, IC F). Las señales de CI observadas indican condiciones de reacción adecuadas utilizadas y por lo tanto demuestran la validez de los resultados obtenidos para los 3 ensayos.

## Ejemplos

### General

60 Todos los reactivos necesitan ser verificados para la contaminación por los organismos a detectar. Sólo los reactivos libres de estos organismos y los ácidos nucleicos procedentes del mismo puede dar lugar a una sensibilidad óptima.

### Controles

65

## ES 2 549 410 T3

Las mezclas de los DNA plasmídicos (aproximadamente  $10^4$  copias de DNA plásmido) que contienen la región ITS (ITS: espaciador transcrito interno) entre los rRNA 16S (ácido ribonucleico ribosomal) y los genes 23sRNA (dianas bacterianas) y entre el rRNA 18S y los genes 28sRNA (diana fúngica) se utilizaron para la preparación de RC G-, RC G+, RC F y reactivos de control CI (RC: reactivo control, G-: gramnegativos, G+: grampositivos, F: hongos, CI: control interno)

### a) RC G-:

PTE-Smar-1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *S.marcescens* 16S/23S-rRNA-región espaciadora

PTE-Abau-1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *A.baumannii* 16S/23S-rRNA-región espaciadora

PTE-Koxy-1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *K.oxytoca* 16S/23S-rRNA-región espaciadora

PTE-Eclo-1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *E.cloacae* 16S/23S-rRNA-región espaciadora

PTE-Ecol-1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *E. coli* 16S/23S-rRNA-región espaciadora

pTE- PMIR-1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *P.mirabilis* 16S/23S-rRNA-región espaciadora

PTE-Paer-2 plásmido basado en pT3T7BM que contienen *P.aeruginosa* 16S/23S-rRNA-región espaciadora

pTE- Smal-1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *S.maltophilia* 16S/23S-rRNA-región espaciadora

### b) RC G +:

pStaph\_wt: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *S. aureus* 16S/23S-rRNA-región espaciadora

pEnter\_1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *E. faecalis* 16S/23S-rRNA-región espaciadora

pEnter\_2: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *E. faecium* 16S/23S-rRNA-región espaciadora

pStrep\_wt plásmido basado en pT3T7BM que contiene *S. pneumoniae* 16S/23S-rRNA-región espaciadora

### RC F:

pAfum-PC-PF1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *A. fumigatus* 18S/28S-rRNA-región espaciadora

pCgla-PC-PF1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *C. glabrata* 18S/28S-rRNA-región espaciadora

pCalb-PC-PF1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *C. albicans* 18S/28S-rRNA-región espaciadora

pCkru-PC-PF1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *C. krusei* 18S/28S-rRNA-región espaciadora

pCtrop-PC-PF1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *C.tropicalis* 18S/28S-rRNA-región espaciadora

PCPARA-PC-PF1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *C.parapsilosis* 18S/28S-rRNA-región espaciadora

### c) CI:

PTE-Paer-IC/2: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *P.aeruginosa* 16S/23S-rRNA-región espaciadora y sitios de unión a sonda específica CI G-

pIC G+: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *E.faecium* 16S/23S-rRNA-región espaciadora y sitios de unión a sonda específica CI G+

pAfum (FP10/21) -ICv2-PF1: plásmido basado en pT3T7BM que contiene *C. albicans* 18S/28S-rRNA-región espaciadora y los sitios de unión a sondas específicas IC F

Si el vector adecuado es pT3T7BM utilizado en los ejemplos que lleva un sitio de clonación múltiple además del promotor para la polimerasa de RNA T3 y T7 y que está disponible de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania. Véase la base de datos del vector para la secuencia (<http://seq.yeastgenome.org> o [http://seq.yeastgenome.org/vectordb/vector\\_descrip/PT3T7BM.html](http://seq.yeastgenome.org/vectordb/vector_descrip/PT3T7BM.html)).

Programas/sopORTE físico

Se utilizó un instrumento LightCycler™ 2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania) con rotor capilar de 100 µl para la detección de la fluorescencia de las sondas de hibridación a 610 nm, 640 nm, 670 nm y 705 nm. La generación de datos brutos y el análisis de los datos se realizó utilizando el programa LightCycler 4.05 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania).

5

#### Reactivos

Todos los oligonucleótidos mencionados en este documento se prepararon mediante síntesis química. Los reactivos para la fijación de omarcadores se pueden comprar en Roche Diagnostics GmbH (Éster LightCycler Red 640 NHS N° de Cat. 2.015.161; LightCycler Red 705 fosforamidita N° de Cat. 2.157.594; LightCycler fluoresceína (abreviado 'F' en adelante) N° de Cat. CPG. 3.113.906). El uso de estos reactivos se describe en Biochemica N° 1 (2001), p. 8-13. se puede obtener éster Cy5-NHS de Amersham bajo petición. Éster LC-Red 610-NHS tiene un máximo de emisión a 610 nm y se sintetizó de acuerdo con los protocolos estándar utilizando un colorante fluorescente tal como se describe en el documento US 5.750.409.

15

La polimerasa de DNA FastStart y Master FastStart se utilizan generalmente como se recomienda en el equipo de sondas de hibridación LightCycler® FastStart® DNA Master Hybridization Probes Kit (Roche Diagnostics GmbH N° de Cat. 2239272). Siguiendo las instrucciones del fabricante del equipo, los cebadores se utilizan en una concentración final de 0,3 a 1 µM cada uno y las sondas de hibridación a una concentración final de aprox. 0,2 µM cada uno. La concentración de MgCl<sub>2</sub> utilizado fue de 3,5 mM.

20

Los reactivos y equipos están disponibles en Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania.

25

#### Método

Las muestras (en particular muestras clínicas) se sometieron a una preparación de la muestra en la que los ácidos nucleicos fueron liberados y purificados a partir de los otros componentes de la muestra. Esto se hizo utilizando MagNA Pure™ LC y el equipo de aislamiento de DNA MagNA Pure™ LC DNA isolation kit III (para bacterias y hongos) (Roche Diagnostics GmbH, Alemania, N° de Cat. 3.264.785). La preparación de la muestra produjo una muestra que contiene los ácidos nucleicos en tampón de elución.

30

El CI se procesó dentro de la preparación de la muestra (por ejemplo, en el instrumento MagNA Pure®) o se añadió a la mezcla maestra completado (véase más adelante) dependiendo de si se pretende ser un control durante el proceso, ya sea para el procedimiento de preparación de la muestra o para el rendimiento del ensayo en el instrumento LightCycler® en cada capilar. Con la preparación de ácidos nucleicos purificados y los reactivos de control correspondientes (RC G+, RC G-, RC F) como muestras, se realizó un experimento con el instrumento LightCycler® en 100 µl de volumen de reacción utilizando el siguiente perfil de ciclos térmicos y temperatura de fusión:

35

	Ciclos	tiempo (seg)	Temperatura (°C)	Pendiente (°C/s)	Modo de adquisición
Desnaturalización	1	600	95 °C	20	Ninguno
Amplificación	15	15	95	3	Ninguno
		50	58	20	Ninguno
		40	72	3	Ninguno
Amplificación	30	15	95	3	Ninguno
		50	50	20	Individual
		40	72	3	Ninguno
Curva de fusión	1	60	95	20	Ninguno
		60	40	20	Ninguno
		0	80	0,1	Continuo
Enfriamiento	1	30	40	20	Ninguno

40

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar la presencia o la ausencia de una biomolécula diana en una muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana que comprende los siguientes pasos:
- 5 a) en el que este paso consiste del paso a1) o a2)
- 10 a1) la adición de una biomolécula de control interno
- a la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana, y
  - a una muestra de control negativo que no comprende la biomolécula diana,
  - a una muestra de control positivo que comprende la biomolécula diana, y
  - a una segunda muestra de control positivo que comprende la biomolécula diana
- 15 a2) añadiendo una biomolécula de control interno
- a la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana, y
  - a una muestra de control negativo que no comprende la biomolécula diana, y
  - a una muestra de control positivo que comprende la biomolécula diana,
- 20 y proporcionar una segunda muestra de control positivo que comprende la biomolécula diana
- b) purificar las biomoléculas a partir de las muestras del paso a) para obtener muestras que comprenden las biomoléculas purificadas, en el que la muestra de control positivo, pero no la segunda muestra de control positivo se somete a dicha purificación,
- 25 c) determinar en cada muestra obtenida en el paso a) o b) la presencia o la ausencia de una señal de la biomolécula de control interno y de la biomolécula diana,
- 30 d) verificar la presencia o ausencia de la señal de la biomolécula diana en la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana mediante:
- la comprobación de la muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana para la presencia de una señal para la biomolécula diana independientemente de la presencia de una señal de la biomolécula de control interno o comprobación de la presencia de una señal de la biomolécula de control interno en el caso de una ausencia de una señal para la biomolécula diana,
  - la comprobación de la muestra de control negativo para la presencia de una señal de la biomolécula de control interno y por la ausencia de una señal de la biomolécula diana,
  - la comprobación de la muestra de control positivo para la presencia de una señal de la biomolécula diana y por la presencia de una señal de la biomolécula de control interno, y
  - la comprobación de la segunda muestra de control positivo para la presencia de una señal para la biomolécula diana en el paso d) del método o comprobación de la segunda muestra de control positivo para la presencia de una señal para la biomolécula diana y, opcionalmente, para la biomolécula de control interno,
- 35 e) detectar la presencia o la ausencia de la biomolécula diana mediante la cual la presencia o ausencia de las señales para la biomolécula diana y la biomolécula de control interno determinadas en en el paso c) y verificadas en el paso d) indican la presencia o la ausencia de la biomolécula diana en la muestra de ensayo.
- 45 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la muestra de control positivo comprende un virus, un microorganismo o una célula que comprende la biomolécula diana.
- 50 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en el que la biomolécula diana es un grupo de biomoléculas diana.
- 55 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la biomolécula es un ácido nucleico.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4 en el que el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno se amplifica antes del paso c).
- 60 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5 en el que la señal del ácido nucleico diana o del ácido nucleico de control interno es una señal de fluorescencia.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6 en el que la señal de fluorescencia se genera por un marcador unido a una sonda que se hibrida con el ácido nucleico diana o el ácido nucleico de control interno.
- 65

8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico específica para un microorganismo, una célula o un virus.

9. Un método para detectar la presencia o la ausencia de un miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana en una muestra sospechosa de comprender el miembro de un grupo de ácidos nucleicos diana mediante:

a) la adición de un ácido nucleico de control interno

- a la muestra sospechosa de comprender un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana, y
- a una muestra de control negativo que no comprende un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana, y
- a una muestra de control positivo que comprende un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,

b) proporcionar una segunda muestra de control positivo que comprende el grupo de los ácidos nucleicos diana y, opcionalmente, un ácido nucleico de control interno,

c) purificar los ácidos nucleicos de las muestras del paso a) y/o b) para obtener muestras que comprenden los ácidos nucleicos purificados, en el que la muestra de control positivo, pero no la segunda muestra de control positivo se somete a dicha purificación,

d) determinar en cada muestra obtenida en los pasos a) y b) o en los pasos b) y c) la presencia o ausencia de una señal del ácido nucleico de control interno y de una señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,

e) verificar la presencia o la ausencia de la señal del miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana en la muestra sospechosa de comprender un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana mediante:

- la comprobación de la muestra sospechosa de comprender un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana para la presencia de una señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana independientemente de la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno o comprobación de la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno en el caso de la ausencia de una señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana,
- la comprobación de la muestra de control negativo para la presencia de una señal del ácido nucleico de control interno y por la ausencia de una señal del ácido nucleico diana,
- la comprobación de la segunda muestra de control positivo para la presencia de una señal de cada miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y, opcionalmente, del ácido nucleico de control interno, y
- la comprobación de la muestra de control positivo para la presencia de una señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y por la presencia de una señal del ácido nucleico o de control interno,

f) detectar la presencia o la ausencia de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana mediante el cual la presencia y/o la ausencia de las señales para un miembro del grupo de los nucleico diana ácidos y el ácido nucleico de control interno determinado en el paso d), y verificada en el paso e) indican la presencia o la ausencia de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana en la muestra que se sospecha que comprende un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9

- en el que la biomolécula de control interno comprende una parte de la biomolécula diana,
- en el que la muestra de control positivo comprende un virus, un microorganismo o una célula que contiene la biomolécula diana o en el que la muestra de control positivo es una solución que comprende la biomolécula diana o una parte de la misma, o
- en el que la segunda muestra de control positivo es una solución que comprende la biomolécula diana o una parte de la misma.

11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10 en el que un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana y el ácido nucleico de control interno se amplifica antes del paso d).

12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la señal de un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana o del ácido nucleico de control interno es una señal de fluorescencia.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12 en el que la señal de fluorescencia se genera por un marcador unido a una sonda que se hibrida a un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana o el ácido nucleico de control interno.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13 en el que un miembro del grupo de los ácidos nucleicos diana comprende una secuencia de ácido nucleico específica para un microorganismo, una célula o un virus.

- 5 15. El uso de una segunda muestra de control positivo que comprende opcionalmente una biomolécula de control interno y una muestra de control positivo que comprende una biomolécula de control interno, las dos muestras que comprenden la biomolécula diana, para detectar la presencia o la ausencia de una biomolécula diana en una muestra sospechosa de comprender la biomolécula diana o para la verificación de la determinación de una señal que indica la presencia de una biomolécula diana, en el que la muestra de control positivo, pero no la segunda muestra de control positivo se somete a pasos de purificación para la obtención de las moléculas diana contenidas en la misma.

Fig.1

RC G+

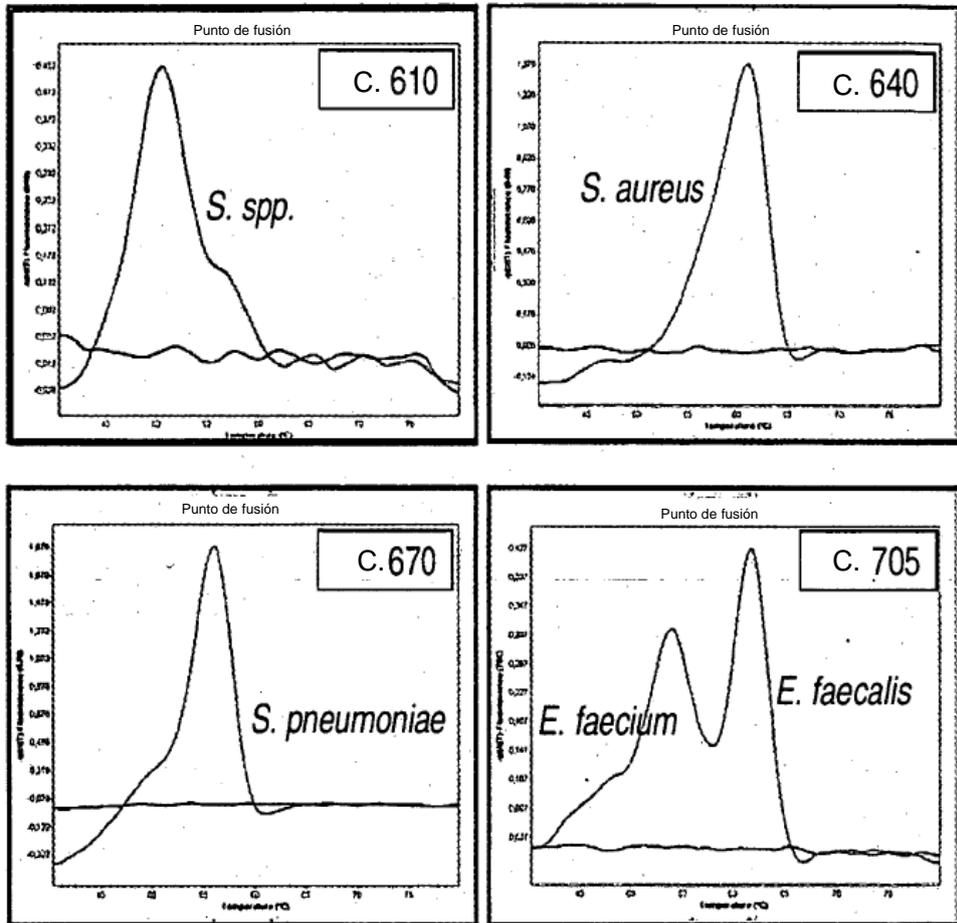


Fig.2

RC G-

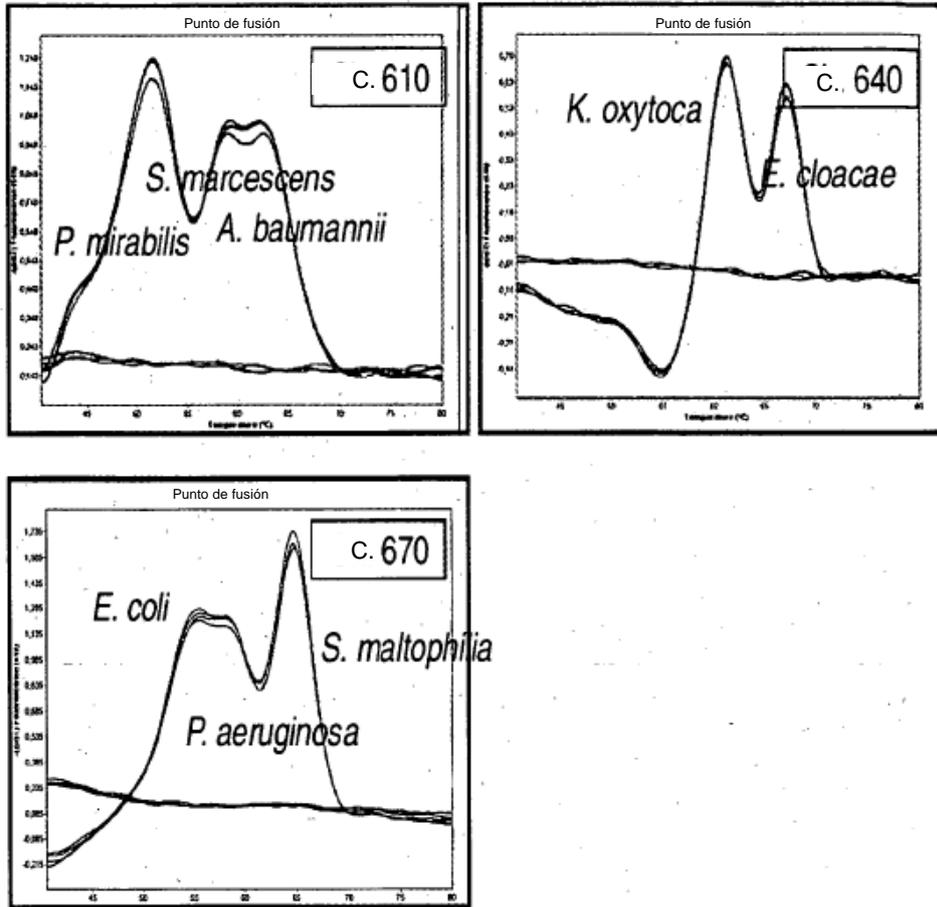


Fig.3

RC F

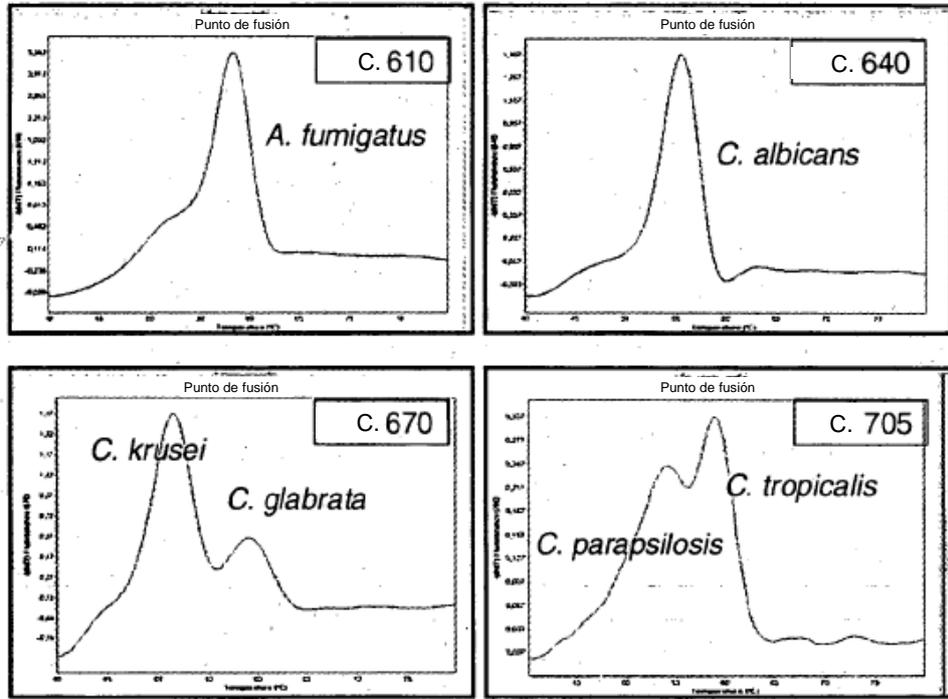


Fig.4

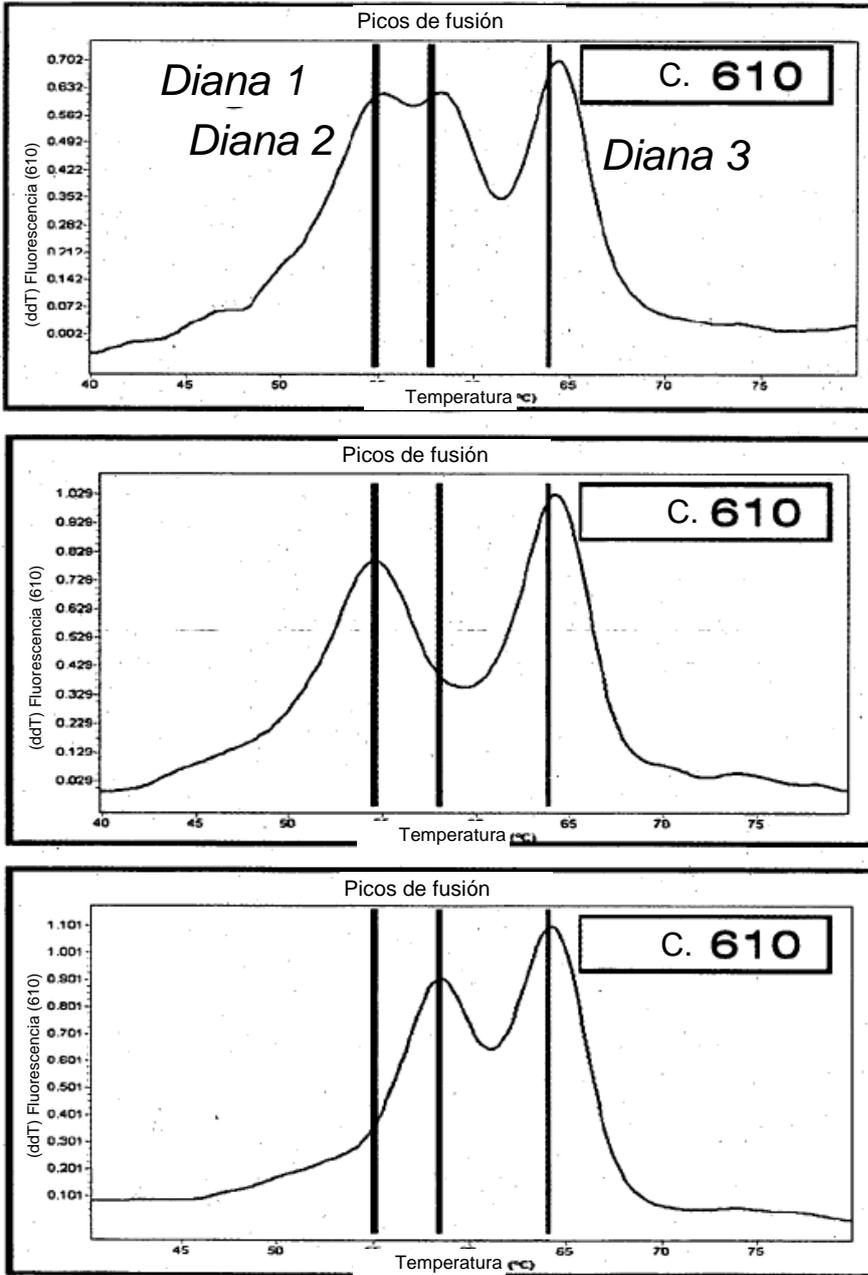
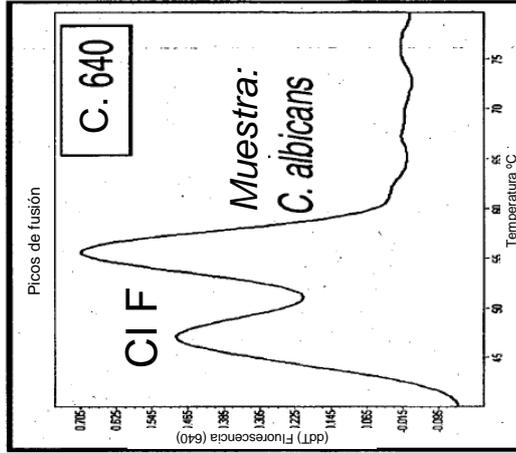
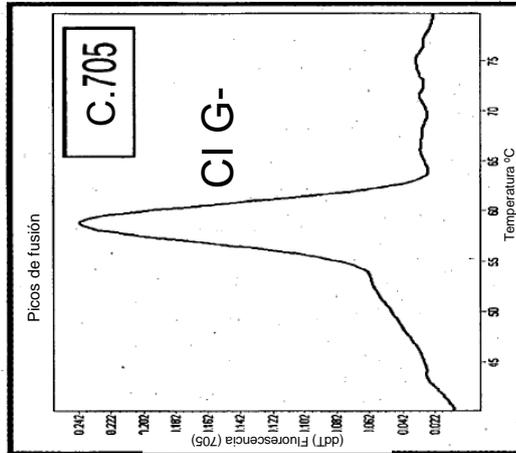


Fig.5

Ensayo F



Ensayo G-



Ensayo G+

