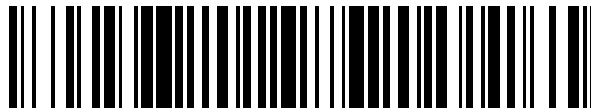


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 102**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2010 E 10002350 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2228454**

54 Título: **Ensayo cuantitativo de amplificación y fusión multiplex de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

10.03.2009 US 400966

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

10.11.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HIGUCHI, RUSSELL y
HOLCOMB, CHERIE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 589 102 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

Ensayo cuantitativo de amplificación y fusión multiplex de ácidos nucleicos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere de manera general a la amplificación in vitro, detección y cuantificación de ácidos nucleicos. Concretamente, la invención se refiere a un ensayo multiplex en un único tubo, capaz de amplificar, detectar y cuantificar simultáneamente múltiples dianas de ácidos nucleicos utilizando múltiples sondas de hibridación marcadas con el mismo marcaje informador fluorescente. El ensayo puede multiplexarse adicionalmente utilizando varios informadores fluorescentes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en una herramienta ubicua de la investigación biomédica, y el seguimiento y diagnóstico de enfermedades. La amplificación de las secuencias de ácidos nucleicos mediante PCR se describe en las patentes US nº 4.683.195, nº 4.683.202 y nº 4.965.188. La PCR actualmente es bien conocida de la técnica y ha sido extensamente descrita en la literatura científica (ver PCR Applications, Innis et al., editores, Academic press, San Diego, 1999; PCR Strategies, Innis et al., editores, Academic Press, San Diego, 1995; 20 PCR Protocols, Innis et al., editores, Academic Press, San Diego, 1990, y PCR Technology, Erlich, ed., Stockton Press, New York, 1989). Un ensayo de PCR "en tiempo real" es capaz de amplificar, detectar y cuantificar simultáneamente la cantidad inicial de la secuencia diana. El ensayo de PCR en tiempo real TaqMan básico, que utiliza la actividad de nucleasa de la ADN polimerasa, se describe en Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88:7276-7280, 1991, y en la patente US nº 5.210.015. La PCR en tiempo real sin la actividad de nucleasa (un ensayo sin nucleasa) ha sido descrito en la solicitud de patente US nº de serie 12/330.694, presentado el 9 de diciembre de 2008 (número de publicación nº US2010/0143901). La utilización de sondas fluorescentes en la PCR en tiempo real se describe en la 25 patente US nº 5.538.848.

Un protocolo de PCR en tiempo real típico implica la utilización de una sonda marcada específica para cada secuencia diana. La sonda preferentemente se marca con una o más fracciones fluorescentes, que emiten luz de una longitud de onda detectable. Tras hibridarse con la secuencia diana o su amplicón, la sonda muestra un cambio detectable de la emisión fluorescente.

35 Sin embargo, el reto principal del ensayo en tiempo real sigue siendo la capacidad de analizar numerosas dianas en un único tubo. Prácticamente en todos los campos de la medicina y el diagnóstico se está incrementando rápidamente el número de loci de interés. Por ejemplo, deben analizarse múltiples loci en el perfilado de ADN forense, en la detección de microorganismos patógenicos, en el cribado multi-locus de enfermedades genéticas y en los estudios de expresión multigénica, entre otros muchos.

40 Con los métodos actuales, la capacidad de multiplexar un ensayo se encuentra limitada por los instrumentos de detección. Concretamente, la utilización de múltiples sondas en la misma reacción requiere la utilización de diferentes marcajes fluorescentes. Para detectar simultáneamente múltiples sondas, un instrumento debe poder discriminar las señales lumínicas emitidas por cada sonda. La tecnología actual no permite la detección de más de cuatro longitudes de ondas separadas en el mismo recipiente de reacción. Por ejemplo, Bell et al. ("Real-time quantitative PCR in parasitology", Trends in Parasitol. 18(8):337-342, 2002) han estudiado recientemente los cicladores térmicos de PCR cuantitativa en tiempo real disponibles y han informado de que ninguno presenta más de cuatro canales de detección óptica. Por lo tanto, utilizando una sonda con un único marcaje por cada diana no pueden detectarse más de cuatro 45 dianas separadas en el mismo recipiente. En la práctica por lo menos una diana es habitualmente un ácido nucleico de control. De acuerdo con lo anterior, en la práctica no pueden detectarse más de tres dianas experimentales en el mismo tubo. Debido a que el hardware óptico puede ofrecer como máximo una pequeña mejora marginal, la capacidad de multiplexar un ensayo no mantendrá el ritmo del crecimiento de las necesidades clínicas, a menos que se realicen cambios radicales en la estrategia de amplificación y detección.

Una capacidad adicional para multiplexar una reacción de amplificación en tiempo real es proporcionada por un ensayo de fusión post-PCR (ver el documento nº US2007-0072211, presentado el 23 de junio de 2006). En un ensayo de fusión se identifica el ácido nucleico amplificado por su perfil de fusión único. Un ensayo de fusión implica determinar la temperatura de fusión (punto de fusión) de una diana de doble cadena, o un dúplex entre la sonda 55 marcada y la diana. Tal como se indica en la patente US nº 5.871.908, para determinar la temperatura de fusión utilizando una sonda marcada fluorescentemente, un dúplex entre el ácido nucleico diana y la sonda se calienta (o se enfría) gradualmente en un programa de temperatura controlada. La disociación del dúplex cambia la distancia entre los fluoróforos interactuantes o entre fluoróforo e inhibidor. Los fluoróforos interactuantes pueden conjugarse a moléculas de sonda separadas, tal como se indica en la patente US nº 6.174.670. Alternativamente, un fluoróforo puede conjugarse con una sonda, mientras que el otro fluoróforo puede intercalarse en un dúplex de ácidos nucleicos, tal como se indica en la patente US nº 5.871.908. A modo de todavía otra alternativa, los fluoróforos pueden 60 conjugarse con un único oligonucleótido sonda. Tras la fusión del dúplex, la fluorescencia se inhibe al reunir el

floróforo del inhibidor en la sonda que ahora es de cadena sencilla.

La fusión del dúplex de ácidos nucleicos se monitoriza mediante la medición del cambio asociado de fluorescencia. El cambio de fluorescencia puede representarse en un gráfico denominado "perfil de fusión". Debido a que pueden diseñarse diferentes dúplex de sonda-diana para fusionar (o rehibridar) a temperaturas diferentes, cada sonda generará un perfil de fusión único. Las sondas correctamente diseñadas presentarían temperaturas de fusión que son claramente distinguibles de las de otras sondas en el mismo ensayo. Muchas herramientas de software actuales permiten diseñar sondas para un ensayo multiplex en un único tubo con estos objetivos en mente. Por ejemplo, el software Visual OMP" (DNA Software, Inc., Ann Arbor, Mich.) permite determinar las temperaturas de fusión de los dúplex de ácidos nucleicos bajo diversas condiciones de reacción.

El método de la PCR multiplex utilizando la detección de color y el posterior ensayo de fusión post-amplificación se describen en la patente US nº 6.472.156. El número de dianas detectables mediante dicho método es un producto del número de longitudes de onda detectables y el número de perfiles de fusión distinguibles. Por lo tanto, la adición de un ensayo de fusión a la detección de color fue un avance en la capacidad de detectar múltiples dianas.

El ensayo de fusión post-amplificación es el utilizado más comúnmente con fines cualitativos, es decir para identificar los ácidos nucleicos diana, ver las patentes US nº 6.174.670, nº 6.427.156 y nº 5.871.908. Es conocida la obtención de un pico de fusión mediante la diferenciación de la función de la curva de fusión. Ririe et al. ("Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerases chain reaction", Anal. Biochem. 245:154-160, 1997) observaron que la diferenciación ayuda a resolver curvas de fusión generadas por mezclas de productos. Tras la diferenciación, los picos de fusión generados por cada componente de la mezcla se tornan fácilmente distinguibles. También era conocido previamente que la señal de fusión post-amplificación, es decir, el pico de fusión, era más elevada en proporción a la cantidad de ácido nucleico en la muestra. Por ejemplo, la patente US nº 6.245.514 enseña un ensayo de fusión post-amplificación que utiliza un pigmento intercalante de dúplex para generar un pico de fusión de derivado, seguido de la integración del pico utilizando software propietario. La integración proporciona información sobre la eficiencia de la amplificación y la cantidad relativa del ácido nucleico amplificado.

El documento nº WO 00/18965 da a conocer métodos de genotipado múltiple utilizando juegos de sondas de hibridación fluorescente (FRET), en los que cada juego de sondas se hibrida con diferentes loci genéticos y presenta una temperatura de fusión diferente y en el que los juegos de sondas se marcan con la misma pareja de resonancia fluorescente. Se llevó a cabo un análisis de las curvas de fusión para determinar cualitativamente el ácido nucleico diana, mientras que no puede llevarse a cabo ninguna cuantificación del ácido nucleico diana. En el documento nº WO 2004/074447 se dan a conocer métodos para el análisis multiplex de muestras polinucleótidas que utilizan parejas de sondas inhibidoras de señal específicas de secuencia que presentan temperaturas de fusión relativa diferentes que no requieren la utilización de diferentes marcajes distinguibles. Se llevó a cabo un análisis de las curvas de fusión para determinar cualitativamente el ácido nucleico diana, mientras que no puede llevarse a cabo ninguna cuantificación del ácido nucleico diana. El documento nº US 2006/0177841 da a conocer un método no simétrico de amplificación y detección (LATE-PCR) para el análisis de múltiples amplicones, en el que en la reacción se encuentran presentes una o más sondas de detección de baja temperatura marcadas con el mismo fluoróforo y que presentan temperaturas de fusión diferentes para cada diana. Se llevó a cabo un análisis de las curvas de fusión para determinar cualitativamente el ácido nucleico diana, mientras que no puede llevarse a cabo ninguna cuantificación de cada ácido nucleico diana en el caso de que se encuentren presentes múltiples dianas.

Zhang et al. (J. Pharmacol. Exp. Ther. 311(1):373-81, 2004) dan a conocer un método para la medición de la expresión e identificación alélicas relativas que comprende llevar a cabo una síntesis de ADNc de primera cadena, una primera RT-PCR, una PCR anidada seguida de un análisis de curvas de fusión utilizando sondas marcadas fluorescentemente específicas de alelo. Se calcula la proporción de altura de picos de los dos alelos para obtener la proporción de moldes basándose en curvas estándares. Sin embargo, el método no resulta adecuado para aplicaciones múltiples y podría detectar únicamente la proporción entre dos alelos de un ácido nucleico diana.

En la práctica resultaría deseable avanzar más allá de un ensayo cualitativo y poder cuantificar múltiples dianas en la misma muestra (ver, por ejemplo, Sparano et al., "Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials", J. Clin. Oncol. 26(5):721-728, 2008). La capacidad de cuantificar la cantidad de diana resulta útil en aplicaciones clínicas, tales como la determinación de la carga vírica en el suero del paciente, la medición del nivel de expresión de un gen en respuesta a la terapia farmacológica o la determinación de la firma molecular de un tumor para predecir su respuesta a la terapia.

En un ensayo de PCR en tiempo real, la señal generada por la sonda marcada es proporcional a la cantidad de ácido nucleico diana de entrada. Cuanto mayor es la entrada, antes cruza la señal fluorescente un valor umbral (Ct) predeterminado. Por lo tanto, pueden determinarse cantidades relativas o absolutas del ácido nucleico diana mediante la comparación de las muestras entre sí o respecto a una muestra de control con una cantidad conocida de ácido nucleico. Sin embargo, los métodos actuales son limitados en su capacidad de cuantificar simultáneamente múltiples dianas. Al igual que con la detección cualitativa de múltiples dianas, el factor limitante es el detector óptico. Tal como se ha explicado anteriormente, la tecnología óptica del estado de la técnica no puede obtener señales diferentes de

más de cuatro sondas marcadas fluorescentemente separadas en el mismo tubo. La tecnología que ahora se desarrolla promete la detección de no más de seis marcajes separados. Por lo tanto, se requiere un enfoque experimental radicalmente diferente que permita tanto la amplificación, la detección y la cuantificación de numerosas dianas de ácidos nucleicos durante la PCR en tiempo real.

5

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para la amplificación mediante PCR en tiempo real multiplex, la detección y la cuantificación simultáneas de uno o más ácidos nucleicos diana en un único recipiente de muestra, que comprende las etapas de poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene uno o más ácidos nucleicos diana, con por lo menos un juego de sondas oligonucleótidas, en el que cada sonda oligonucleótida dentro del juego está marcada con la misma fracción o fracciones informadoras, en el que cada una de dichas sondas oligonucleótidas marcadas es suficientemente complementaria respecto a por lo menos una subsecuencia de por lo menos un ácido nucleico diana y es capaz de unirse al ácido nucleico diana correspondiente con una temperatura de fusión diferente de las temperaturas de fusión de las otras sondas oligonucleótidas marcadas en el mismo juego; amplificar los ácidos nucleicos diana en la muestra en un ciclo de reacción de amplificación que incluye un intervalo de cambio de temperatura, y representar en un gráfico la primera derivada de dicha emisión lumínica a lo largo de por lo menos dicha porción del intervalo de cambio de temperatura; determinar el valor máximo de dicha derivada; repetir las etapas anteriormente indicadas múltiples veces y representar en un gráfico los valores máximos de dicha derivada frente al número de ciclos o el número de repeticiones, y determinar el número de ciclos o el número de repeticiones en el que se alcanza un valor umbral predeterminado de dicho valor máximo determinado de la derivada, cuantificando de esta manera la cantidad relativa de dicho ácido nucleico diana, en el que dicha reacción de amplificación mediante PCR en tiempo real multiplex, detección y cuantificación simultáneas comprende la detección de por lo menos dos secuencias diana diferentes, comprendiendo la amplificación con parejas separadas de cebadores de amplificación para cada secuencia diana y la detección utilizando una sonda oligonucleótida separada para cada secuencia diana o la amplificación utilizando una pareja de cebadores de amplificación y la detección utilizando más de una sonda oligonucleótida para cada secuencia amplificada. En determinadas realizaciones del método, un ácido nucleico de control de concentración conocida se somete a las etapas anteriormente indicadas simultáneamente con dichos ácidos nucleicos diana y el valor determinado para cada ácido nucleico diana se compara con el valor determinado para el ácido nucleico de control, determinando de esta manera la cantidad absoluta de cada uno de dichos ácidos nucleicos diana. En determinados aspectos, cada uno de dichos oligonucleótidos se marca con una única fracción informadora, en la que en aspectos particulares dicha fracción informadora es fluorescente. En otras realizaciones, cada uno de dichos oligonucleótidos se marca con una fracción informadora y una fracción inhibidora, en el que dicha fracción informadora y dicha fracción inhibidora en aspectos particulares son fluoróforos. En otra realización, dicha fracción informadora es un fluoróforo y dicha fracción inhibidora es un inhibidor oscuro. En todavía otra realización, la fracción informadora y la inhibidora están separadas por un sitio de corte de nucleasa. En otro aspecto, el método puede multiplexarse adicionalmente mediante la utilización de varios juegos de oligonucleótidos, estando marcado cada juego de oligonucleótidos con una fracción informadora separada, hasta el número de fracciones distinguibles por el instrumento de detección.

40

Se da a conocer además una mezcla de reacción para la amplificación, detección y cuantificación de uno o más ácidos nucleicos diana en un único recipiente para muestras que comprende por lo menos un juego de oligonucleótidos, estando marcado cada oligonucleótido con la misma o mismas fracciones informadoras, en el que cada uno de dichos oligonucleótidos marcados es suficientemente complementario a por lo menos una subsecuencia de por lo menos un ácido nucleico diana y es capaz de unirse al ácido nucleico diana correspondiente con una temperatura de fusión diferente de las temperaturas de fusión de los demás oligonucleótidos marcados en el mismo juego y por lo menos un reactivo necesario para la amplificación de los ácidos nucleicos diana. En determinados aspectos, cada uno de dichos oligonucleótidos se marca con una única fracción informadora. En otro aspecto, cada uno de dichos oligonucleótidos se marca con una fracción informadora y una fracción inhibidora, en el que en determinados aspectos dicha fracción informadora es un fluoróforo y dicha fracción inhibidora es un inhibidor oscuro. En todavía otro aspecto, la mezcla de reacción comprende además un ácido nucleico de control de concentración conocida.

Se da a conocer además un kit para la amplificación, detección y cuantificación de uno o más ácidos nucleicos diana en un único recipiente para muestras que comprende por lo menos un juego de oligonucleótidos, estando marcado cada oligonucleótido con la misma o mismas fracciones informadoras, en el que cada uno de dichos oligonucleótidos marcados es suficientemente complementario a por lo menos una subsecuencia de por lo menos un ácido nucleico diana y es capaz de unirse al ácido nucleico diana correspondiente con una temperatura de fusión diferente de las temperaturas de fusión de los demás oligonucleótidos marcados en el mismo juego y por lo menos un reactivo necesario para la amplificación de los ácidos nucleicos diana. En determinados aspectos, el kit comprende además reactivos para la prevención de la contaminación cruzada de reacciones de amplificación. En todavía otro aspecto, el kit comprende además un ácido nucleico de control de concentración conocida.

60

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama de etapas del método de la presente invención.

5 La figura 2 muestra los resultados del método de la presente invención tal como se aplica a la secuencia diana de ácidos nucleicos SENP1 y descrita en el Ejemplo 1.

La figura 3 muestra los resultados del método de la presente invención tal como se aplica a la secuencia diana de ácidos nucleicos PPP1CA y descrita en el Ejemplo 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

10

Definiciones

Las definiciones siguientes se aplican a los términos utilizados en toda la solicitud.

15 Una "PCR asimétrica" es una PCR en la que las cantidades de los dos cebadores de amplificación no son iguales. El cebador presente en una cantidad superior se denomina "cebador en exceso" y el cebador presente en una cantidad inferior se denomina "cebador limitante". La cadena resultante de la extensión del cebador en exceso se acumula en exceso y se denomina "la cadena en exceso". La otra cadena, resultante de la extensión del cebador limitante, se acumula en cantidades inferior y se denomina "la cadena limitante".

20 Un "cromóforo" es un compuesto o una fracción unida, por ejemplo, a un ácido nucleico, que es capaz de una absorción selectiva de la luz, resultando en coloración. Un cromóforo puede emitir o no radiación lumínica al ser excitado.

25 Un "pigmento fluorescente" o un "fluoróforo" es un compuesto o una fracción unida, por ejemplo, a un ácido nucleico, que es capaz de emitir radiación lumínica al excitarlo con una luz de una longitud de onda adecuada. Entre los pigmentos fluorescentes típicos se incluyen los pigmentos de rodamina, los pigmentos de cianina, los pigmentos de fluoresceína y los pigmentos BODIPY®. Un fluoróforo es un cromóforo fluorescente.

30 El término "FRET" o "transferencia de energía de resonancia fluorescente" o "transferencia de energía de resonancia de Foerster" se refiere a una transferencia de energía entre por lo menos dos cromóforos, un cromóforo donante y un cromóforo aceptor (denominado inhibidor). El donante típicamente transfiere la energía al aceptor cuando el donante es excitado por radiación lumínica de una longitud de onda adecuada. El aceptor típicamente reemite la energía transferida en forma de radiación lumínica con una longitud de onda diferente. En el caso de que el aceptor sea un inhibidor "oscuro", disipa la energía transferida en una forma que no es luz. Que un fluoróforo particular actúe como donante o aceptor depende de las propiedades del otro elemento de la pareja FRET. Entre las parejas de donante-aceptor utilizadas comúnmente se incluyen la pareja FAM-TAMRA. Son inhibidores utilizados comúnmente, DABCIL0 y TAMRA. Entre los inhibidores oscuros utilizados comúnmente se incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ), Biosearch Technologies, Inc. (Novato, Cal.), Iowa Black™, Integrated DNA Tech., Inc. (Coralville, Iowa), BlackBerry™

40 Quencher 650 (BBQ-650), Berry & Assoc. (Dexter, Mich.). Entre las parejas de donante-aceptor utilizadas comúnmente se incluyen la pareja FAM-BHQ.

Una "curva de crecimiento" en el contexto de un ensayo de amplificación de ácidos nucleicos es un gráfico de una función en el que una variable independiente es el número de ciclos de amplificación y una variable dependiente es un parámetro medible dependiente de la amplificación medido en cada ciclo de amplificación. Típicamente, el parámetro medible dependiente de la amplificación es la cantidad de fluorescencia emitida por la sonda con la hibridación, o con la hidrólisis de la sonda por la actividad de nucleasa de la ácido nucleico polimerasa; ver Holland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88:7276-7280, 1991, y la patente US nº 5.210.015. En una reacción en cadena de la polimerasa típica, una curva de crecimiento comprende un segmento de crecimiento exponencial seguido de una meseta. Una curva de crecimiento típicamente se caracteriza por un valor de "ciclos hasta umbral" o valor "C_t", que es el número de ciclos con los que se alcanza una magnitud predeterminada del parámetro medible. Un valor de C_t más bajo representa un completado más rápido de la amplificación, mientras que un valor de C_t más alto representa un completado más lento de la amplificación. En el caso de que la eficiencia de amplificación sea similar, el valor de C_t más bajo refleja la cantidad inicial más alta del ácido nucleico diana, mientras que el valor de C_t más alto refleja la cantidad inicial más baja del ácido nucleico diana. En el caso de que se utilice un ácido nucleico de control de concentración conocida, resulta posible determinar la cantidad absoluta del ácido nucleico diana mediante la comparación de los valores de C_t de los ácidos nucleicos diana y de control.

Un "inicio en caliente" en el contexto de una reacción de amplificación de ácidos nucleicos es un protocolo en el que se omite de la mezcla de reacción por lo menos un reactivo crítico (o, en caso de hallarse presente en la mezcla de reacción, el reactivo se mantiene inactivo) hasta que la temperatura se eleva suficientemente para proporcionar la especificidad de hibridación necesaria del cebador o cebadores. Un "enzima de inicio en caliente" es un enzima, típicamente una polimerasa de ácidos nucleicos, capaz de actuar como el reactivo "omitido" o inactivo en un protocolo de inicio en caliente.

65

La "hibridación" es una interacción entre dos ácidos nucleicos habitualmente de cadena sencilla o por lo menos parcialmente de cadena sencilla. La hibridación se produce como resultado del apareamiento de bases entre nucleobases e implica procesos fisicoquímicos tales como la formación de enlaces de hidrógeno, la exclusión de solvente, el apilamiento de bases y similares. La hibridación puede producirse entre cadenas de ácidos nucleicos totalmente complementarias o parcialmente complementarias. La capacidad de ácidos nucleicos de hibridarse está influida por la temperatura y otras condiciones de hibridación, las cuales pueden manipularse con el fin de que se produzca la hibridación de ácidos nucleicos incluso parcialmente complementarios. La hibridación de ácidos nucleicos es bien conocida de la técnica y ha sido extensamente descrita en Ausubel (editores) Current Protocols in Molecular Biology, v. I, II y III, 1997.

Un "marcaje" se refiere a una fracción unida (covalente o no covalentemente) a una molécula, la cual es capaz de proporcionar información sobre la molécula. Entre los marcajes ejemplares se incluyen marcajes fluorescentes, marcajes radioactivos y grupos modificadores de la masa.

La expresión "ácido nucleico" se refiere a polímeros de nucleótidos (por ejemplo ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos, tanto naturales como no naturales), siendo dichos polímeros de ADN, ARN y sus subcategorías, tales como ADNc, ARNm, etc. Un ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de doble cadena y generalmente contiene enlaces fosfodiéster 5'-3', aunque en algunos casos, los análogos de nucleótido pueden presentar otros enlaces. Los ácidos nucleicos pueden incluir bases naturales (adenosina, guanosina, citosina, uracilo y timidina), así como bases no naturales. El ejemplo de bases no naturales incluye las indicadas en, por ejemplo, Seela et al. Helv. Chim. Acta 82:1640, 1999. Determinadas bases utilizadas en análogos de nucleótidos actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_f). Por ejemplo, entre algunas de ellas se incluyen las 7-deazapurinas (por ejemplo 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, etc.), pirazolo[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo propinil-dU, propinil-dC, etc.) y similares (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.990.303). Entre otras bases heterocíclicas representativas se incluyen, por ejemplo, hipoxantina, inosina, xantina, derivados 8-aza de 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina, derivados 7-deaza-8-aza de adenina, guanina, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina, 2-amino-6-cloropurina, hipoxantina, inosina y xantina, 6-azacitidina, 5-fluorocitidina, 5-clorocitidina, 5-yodocitidina, 5-bromocitidina, 5-metilcitidina, 5-propinilcitidina, 5-bromoviniluracilo, 5-fluorouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, 5-bromouracilo, 5-trifluorometiluracilo, 5-metoximetiluracilo, 5-etiniluracilo, 5-propiniluracilo y similares.

La expresión "polimerasas de ácidos nucleicos" o simplemente "polimerasas" se refiere a enzimas, por ejemplo ADN polimerasas, que catalizan la incorporación de nucleótidos en un ácido nucleico. Entre las ADN polimerasas termoestables ejemplares se incluyen las propias de *Thermus thermophilus*, *Thermus caldophilus*, *Thermus sp. Z05* (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.674.738), *Thermus aquaticus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, *Thermus sp. sps17*, *Deinococcus radiodurans*, *Hot Spring family B1clone 7*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus caldopenax*, *Escheria coli*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana* y *Thermosipho africanus*. Se encuentran disponibles las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos completas para numerosas ADN polimerasas termoestables en las bases de datos públicas.

La expresión "actividad de nucleasa 5' a 3'" o "actividad de nucleasa 5'-3'" se refiere a una actividad de un ácido nucleico polimerasa, típicamente asociada a la síntesis de cadenas de ácidos nucleicos, en la que se extraen nucleótidos del extremo 5' de la cadena de ácidos nucleicos, por ejemplo la ADN polimerasa I de *E. coli* presenta esta actividad, mientras que el fragmento Klenow no la presenta.

Las expresiones "ácido nucleico polimerasa que no presenta sustancialmente la actividad de nucleasa 5'-3'" o el "enzima deficiente en nucleasa 5'-3'" o, en aras de la simplicidad, "enzima deficiente en nucleasa" se refieren a una polimerasa que presenta 50% o menos de la actividad 5'-3' de la ADN polimerasa Taq. Los métodos para medir la actividad de nucleasa 5'-3' y las condiciones para la medición han sido descritas en la patente US nº 5.466.591. Entre los ejemplos de polimerasas que no presentan actividad de nucleasa 5'-3' se incluyen el fragmento Stoffel de la ADN polimerasa Taq (patente US nº 5.466.591), mutantes de ADN polimerasa de *Thermus africanus* (patente US nº 5.968.799), mutantes de la ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (patentes US nº 5.624.833 y nº 5.420.029), mutantes de las ADN polimerasas de *Thermus* especie sps17 y *Thermus* especie Z05 (patentes US nº 5.466.591 y 5.405.774). Los enzimas deficientes en nucleasa 5'-3' también pueden ser quimeras, es decir, proteínas quiméricas, compuestas de dominios derivados de más de una especie y que presentan mutaciones que eliminan la actividad de nucleasa 5'-3' (patentes US nº 5.795.762 y 6.228.628).

Un "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico corto, típicamente de diez o más nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos se preparan mediante cualquier método adecuado de la técnica, por ejemplo, síntesis química directa tal como se indica en Narang et al., Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979; Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979; Beaucage et al., Tetrahedron Lett. 22:1859-1862, 1981; Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103:3185-3191, 1981, o cualquier otro método conocido de la técnica.

Un "cebador" es un oligonucleótido que es capaz de actuar como punto de inicio de la extensión conjuntamente con una cadena complementaria de un ácido nucleico molde. Un cebador que es por lo menos parcialmente

complementario a una subsecuencia de un ácido nucleico molde típicamente resulta suficiente para hibridarse con el ácido nucleico molde para que pueda producirse la extensión.

5 Una "extensión de cebador" se refiere a una reacción química en la que se han añadido uno o más nucleótidos al cebador.

Una "sonda" se refiere a un oligonucleótido marcado que forma una estructura dúplex con una secuencia en la secuencia diana, debido a una complementariedad por lo menos parcial de la sonda y la secuencia diana.

10 Un "molde" o "diana" se refiere a un ácido nucleico que debe amplificarse, detectarse y cuantificarse. La diana o molde es una secuencia con la que puede hibridarse un cebador o una sonda. Los ácidos nucleicos diana pueden obtenerse de esencialmente cualquier fuente, incluyendo microorganismos, mezclas biológicas complejas, tejidos, líquidos corporales, sueros, muestras biológicas conservadas, aislados ambientales, preparaciones in vitro o similares. El molde o diana puede constituir la totalidad o una parte de una molécula de ácidos nucleicos.

15 Una "ácido nucleico polimerasa termoestable" o "polimerasa termoestable" es un enzima polimerasa que es relativamente estable a temperaturas elevadas al compararse con, por ejemplo, enzimas de *E. coli*. Tal como se utiliza en la presente memoria, una polimerasa termoestable resulta adecuada para la utilización bajo condiciones de ciclado térmico típicas de la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR").

20 Una "temperatura de fusión" o " T_f " se refiere a la temperatura a la que la mitad de una población de moléculas de ácidos nucleicos de doble cadena (dúplex), en homodúplex o heterodúplex, se disocia en cadenas sencillas. La T_f de un ácido nucleico dúplex resulta afectada por la fuerza iónica y el pH de la solución, así como la concentración, composición de bases y estructura secundaria del ácido nucleico mismo. La T_f de un dúplex bajo unas condiciones dadas puede determinarse experimentalmente o predecirse con ayuda de software comercial, tal como Visual OMP™ (DNA Software, Inc., Ann Arbor, Mich.). Un "ensayo de fusión" o simplemente "fusión" es un ensayo en el que puede determinarse la temperatura de fusión (T_f). En dicho ensayo, se calienta una molécula dúplex de ácidos nucleicos en un programa de temperatura controlada y se monitoriza la disociación del dúplex en cadenas sencillas mediante la medición de un parámetro, tal como la fluorescencia, que cambia con la disociación del dúplex. Los datos de fusión pueden representarse como una "curva de fusión", es decir, un gráfico de la fluorescencia como función de la temperatura (F vs. T). Los datos de fusión también pueden representarse como un "pico de fusión", es decir, un gráfico de la tasa de cambio de la fluorescencia en un intervalo de temperaturas como función de la temperatura (dF/dT vs. T) o ($-dF/dT$ vs. T), que típicamente presenta una forma parabólica. La T_f del dúplex se representa en un pico de fusión como el valor de temperatura (T) en el máximo de la parábola (dF/dT vs. T) o ($-dF/dT$ vs. T).

35 Entre los "reactivos necesarios para la amplificación de los ácidos nucleicos diana" se incluyen, aunque sin limitación, los materiales para la amplificación del ácido nucleico diana, tales como por lo menos un ácido nucleico cebador, una solución tamponadora, nucleótidos, sales, ácido nucleico polimerasas, etc. Cada uno de dichos reactivos puede encontrarse presente separadamente en un único vial o como solución madre premezclada o liofilizado.

40 La presente invención es un método de amplificación, detección y cuantificación multiplex simultáneas de ácidos nucleicos diana. El método comprende PCR en tiempo real, en combinación con análisis de fusión. El método utiliza múltiples sondas marcadas con la misma fracción informadora, aunque cada una presenta una única temperatura de fusión de dúplex. Debido a que pueden identificarse las sondas por su temperatura de fusión y no sólo por su marcaje fluorescente, pueden marcarse varias sondas en el mismo recipiente de reacción con la misma fracción de marcaje. El ensayo puede multiplexarse adicionalmente mediante la utilización de varios juegos de sondas, estando marcado cada juego con una fracción informadora separada, hasta el número de fracciones distinguibles por el instrumento de detección.

50 El método de la presente invención implica la generación de señales de fusión (curvas de fusión) producidas por cada sonda durante la amplificación. Las funciones de curva de fusión pueden diferenciarse en funciones derivadas o "picos de fusión". Para cada pico de fusión se mide el valor del máximo del pico de fusión. La magnitud del máximo del pico de fusión es proporcional a la cantidad de la secuencia diana y su amplicón en la mezcla de reacción. Al registrar los máximos de los picos de fusión durante los ciclos de la amplificación representados frente al número de ciclos, la serie de los valores de máximo de pico de fusión generan una curva de amplificación de apariencia similar a las curvas de amplificación generadas en los ensayos de PCR de tiempo real tradicionales. Cada sonda marcada es capaz de generar un perfil de fusión único distinguible de los perfiles de fusión de otras sondas. De esta manera, cada sonda proporciona datos cuantitativos independientes para cada diana. La cuantificación relativa se lleva a cabo mediante la determinación de C_m , el ciclo en el que un pico de fusión dado alcanza un umbral predeterminado. Una C_m anterior (inferior) indica una concentración de entrada superior del ácido nucleico diana, mientras que una C_m posterior (superior) indica una concentración de entrada más baja del ácido nucleico diana. El umbral predeterminado se fijó experimentalmente para cada ácido nucleico diana. Típicamente el umbral es el nivel fluorescente de un pico de fusión en el momento en que se hace detectable.

65 Al amplificar y detectar en el mismo ensayo un ácido nucleico de control de concentración conocida, resulta posible

determinar la cantidad de entrada absoluta del ácido nucleico diana mediante la comparación de los valores de C_m de los ácidos nucleicos diana y de control.

5 En comparación con la PCR en tiempo real multiplex tradicional que utiliza sondas marcadas fluorescentemente, el método de la presente invención presenta capacidades multiplex más amplias. Un ensayo de PCR en tiempo real tradicional se encuentra limitado por la incapacidad del detector de separar más de unas cuantas longitudes de onda. En la presente invención, la capacidad de multiplexar se expande mediante la medición de múltiples picos de fusión diferentes a cualquier longitud de onda dada.

10 En un aspecto, la presente invención utiliza un ensayo de fusión para expandir la capacidad de multiplexado de la PCR en tiempo real cuantitativa. Concretamente, el ensayo de la presente invención es una versión multiplex de la PCR en tiempo real que permite la amplificación, detección y cuantificación simultáneas de múltiples secuencias de ácidos nucleicos diana en el mismo tubo, utilizando múltiples sondas, marcadas con el mismo marcaje fluorescente. Las sondas se detectan dentro del mismo canal de longitud de onda pero se distinguen por su temperatura de fusión única.

15 Tal como se muestra en la figura 1, el método de la presente invención se inicia con la amplificación de varias secuencias diana de ácidos nucleicos en el mismo recipiente de reacción. Cada tubo contiene uno o más juegos de sondas oligonucleótidas, estando marcado cada juego de sondas oligonucleótidas con el mismo informador fluorescente. Sin embargo, dentro del juego de sondas oligonucleótidas, cada sonda oligonucleótida se caracteriza por una temperatura de fusión única con su ácido nucleico diana. Para la capacidad multiplex máxima, se encuentran presentes varios juegos de sondas en el mismo recipiente de reacción.

20 Tras una ronda de amplificación, el ácido nucleico diana puede someterse a la etapa de fusión tal como se indica posteriormente con el fin de generar una curva de fusión para cada dúplex de sonda-diana. Cada curva de fusión (fluorescencia en el intervalo de temperatura, o F vs. T) se diferencia y se convierte en una curva de pico de fusión en el intervalo de temperaturas (dF/dT), para el que se calcula un valor de "máximo de pico de fusión" (dF/dT en $T=T_f$). Tras ciclos repetidos de amplificación y fusión, se acumula un conjunto de valores de "max. de pico de fusión" para cada complejo de diana-sonda. Los valores de max. de pico de fusión se representan frente al número de ciclos para generar una curva de crecimiento para cada ácido nucleico diana. Se obtiene para cada diana una curva de crecimiento similar a las curvas de crecimiento típicas obtenidas en los ensayos de PCR en tiempo real.

25 En algunas realizaciones, pueden diseñarse una o más sondas para que presenten una temperatura de fusión inferior a la temperatura de hibridación utilizada en la amplificación. Dicha sonda no generaría una curva de crecimiento de PCR en tiempo real "tradicional". Sin embargo, dicha sonda resultaría útil para generar una curva de crecimiento según la presente invención.

30 La secuencia de ácidos nucleicos diana amplificada, detectada y cuantificada mediante el método de la presente invención puede presentar cualquier longitud. Típicamente, el ácido nucleico diana presenta una longitud de entre 100 y 1.000 nucleótidos. Sin embargo, también pueden utilizarse secuencias diana más largas (varios miles de nucleótidos) o más cortas (entre 50 y 100 nucleótidos) en algunas realizaciones de la presente invención. Una secuencia de ácidos nucleicos diana puede estar contenida dentro de una molécula de ácidos nucleicos de mayor tamaño, aislada a partir de una fuente de muestras natural o derivada de laboratorio.

35 Aunque la presente exposición generalmente comenta la invención como si hubiera múltiples dianas presentes en la muestra, se apreciará que en algunas realizaciones sólo se encuentra presente una secuencia diana en una muestra. En una realización típica de la presente invención, se lleva a cabo una reacción "multiplex" en la que se detectan por lo menos dos y hasta dieciséis o más secuencias diana diferentes. Estas realizaciones generalmente, aunque no siempre, implican la utilización de una pareja separada de cebadores de amplificación y una sonda separada para cada secuencia diana. Sin embargo, en algunas realizaciones, el mismo ácido nucleico, que se amplifica utilizando la misma pareja de cebadores, puede detectarse con más de una sonda. Lo anterior resulta ventajoso en el caso de que una única secuencia contenga varias dianas o loci de interés, por ejemplo varios sitios de mutación potenciales. Cada sonda podrá detectar y cuantificar la mutación en cada sitio.

40 Los cebadores de amplificación de la presente invención son oligonucleótidos por lo menos parcialmente complementarios a por lo menos una de las variantes existentes de la secuencia diana. La longitud del cebador puede estar comprendida entre 6 y 100 nucleótidos, aunque la mayoría de cebadores típicamente presenta entre 15 y 35 nucleótidos. Los métodos para optimizar los cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos se han descrito en, por ejemplo, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al., editores, 1990, Academic Press. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos sintéticos, compuestos de los nucleótidos A, C, G y T. Sin embargo, también pueden utilizarse en los cebadores nucleótidos bases no convencionales que pueden incorporarse en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, es conocido que determinadas bases modificadas incrementan la especificidad de la amplificación; ver la patente US nº 6.001.011.

45 Se conocen de la técnica diversas ácido nucleico polimerasas termoestables. Puede utilizarse cualquier ácido nucleico polimerasa termoestable en el método de la presente invención. En ocasiones resulta ventajoso utilizar una polimerasa

- que no presente actividad de nucleasa 5'-3'. En ocasiones resulta deseable utilizar una polimerasa sin actividad correctora de errores (exonucleasa 3'-5'). En ocasiones también puede resultar deseable disponer de un enzima con una capacidad de "inicio en caliente", tal como los enzimas reversiblemente modificados que se indican en las patentes US nº 5.677.152 y nº 5.773.528. El diseño de sondas de hibridación es conocido de la técnica. La misma sonda puede servir de sonda de hibridación o sonda de fusión, o ambas. Esté la sonda destinada a ser una sonda de fusión, una única sonda de hibridación o un miembro de una pareja de sondas de hibridación, el diseño de la sonda oligonucleótido está guiado por los mismos principios, conocidos de la técnica y descritos en la presente memoria. Estos principios pueden aplicarse manualmente o con ayuda de software.
- En la presente invención, se encuentra presente más de una sonda en la mezcla de reacción sometida a un ensayo de fusión. El experto en la materia reconocerá inmediatamente los criterios de diseño aplicables a las sondas de fusión útiles en los ensayos multiplex. Concretamente, las sondas capaces de ser utilizadas en la misma mezcla de reacción deberían diseñarse para que presenten una temperatura de fusión híbrida diferente con sus secuencias diana correspondientes.
- Las sondas oligonucleótidas pueden marcarse mediante la incorporación de uno o más cromóforos. Puede utilizarse un único cromóforo, que es un fluoróforo, tal como se indica en la solicitud de patente US nº de serie 12/330.694, presentada el 9 de diciembre de 2008. En el caso de que se utilicen dos cromóforos, uno típicamente es un cromóforo informador y el otro es un inhibidor. Ambos cromóforos pueden ser fluoróforos o uno de los cromóforos puede ser un inhibidor no fluorescente. Entre los ejemplos de fluoróforos adecuados se incluyen pigmentos de la familia de la fluoresceína (FAM, HEX, TET, JOE, NANA y ZOE), de la familia de la rodamina (rojo Texas, ROX, R110, R6G y TAMRA), de la familia de la cianina (Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7), de la familia de la coumarina, de la familia de la oxazina, de la familia de la tiazina, de la familia de la escuaraina y de otras familias de pigmentos fluorescentes adecuados para el marcaje y detección de ácidos nucleicos. El segundo cromóforo puede incorporarse en la misma sonda oligonucleótido o en una sonda oligonucleótida separada. Entre los inhibidores oscuros utilizados comúnmente se incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ), (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™ (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa) y BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).
- La presente invención implica la cuantificación del ácido nucleico diana en un ensayo de PCR en tiempo real. Tal como en el ensayo de PCR en tiempo real tradicional, se genera una curva de crecimiento de amplificación para cada diana. La curva se genera mediante la medición de una señal dependiente de la amplificación detectable durante cada ciclo de la amplificación. La presente invención puede medir una nueva señal dependiente de la amplificación, no utilizada previamente para generar curvas de crecimiento. Concretamente, el método de la presente invención mide una señal de fusión, es decir, una señal generada en un ensayo de fusión con el fin de generar curvas de crecimiento.
- En el ensayo de fusión del método de la presente invención, se forma un híbrido entre el ADN diana y una o más sondas marcadas. Típicamente, la sonda o sondas oligonucleótidas se marcan con una o más fracciones de cromóforo, de entre las que por lo menos un cromóforo es un fluoróforo. El cambio de temperatura que resulta en la fusión o en la formación del híbrido de molde-sonda se ve acompañado de un cambio medible de fluorescencia emitida por la sonda oligonucleótida al ser excitada por luz de longitud de onda apropiada.
- En algunas realizaciones, la sonda se marca con dos cromóforos, formando una pareja FRET. En algunas realizaciones ambos cromóforos son fluoróforos. En otras realizaciones, un cromóforo es un inhibidor no fluorescente. Los cromóforos que forman la pareja FRET pueden conjugarse con las mismas moléculas de sonda o moléculas separadas. La utilización de sondas FRET en un ensayo de fusión ha sido descrita en la patente US nº 6.174.670 y en De Silva et al., "Rapid genotyping and quantification on the LightCycler™ with hybridization probes," *Biochemica*, 2:12-15, 1998. En otras realizaciones, la sonda está marcada con un único cromóforo que interactúa con un segundo cromóforo conjugado o intercalado en el ácido nucleico diana (ver la patente US nº 5.871.908).
- Según los métodos existentes, se lleva a cabo un único ensayo de fusión tras completar todos los ciclos de amplificación. Esta tecnología se denomina comúnmente "fusión post-amplificación". Sin embargo, la presente invención enseña la incorporación de un ensayo de fusión en los ciclos de la PCR. Lo anterior implica añadir una etapa de fusión al perfil de temperaturas de un ciclo de PCR. Una etapa de fusión típica implica una incubación a 95°C (para desnaturalizar los amplicones de doble cadena), seguido de la reducción de la temperatura a 40°C (para permitir la hibridación de la sonda de fusión) e incrementar seguidamente la temperatura nuevamente (para la fusión del dúplex de sonda-molde). Se observó que la señal de fusión era pobre en las primeras rondas de amplificación. Este fenómeno probablemente se debe a las cantidades insuficientes de ácido nucleico diana presente en las etapas tempranas de la amplificación. Por lo tanto, resulta práctico incorporar etapas de fusión en los ciclos de amplificación una vez ha tenido lugar un número sustancial de ciclos de amplificación.
- En un ensayo de PCR en tiempo real tradicional con sondas oligonucleótidas fluorescentes, se detecta la fluorescencia en la etapa de hibridación de cada ciclo. En la presente invención, los datos fluorescentes se adquieren continuamente durante una parte seleccionada de la etapa de fusión. De esta manera, cada ronda de fusión del dúplex de sonda-diana rinde una curva de fusión y un pico de fusión. La diferenciación de las curvas de fusión para obtener picos de fusión ha sido descrita en, por ejemplo, la patente US nº 6.472.156. Para cada pico de fusión, la señal de fusión se

define como la altura del pico de fusión o "max. de pico de fusión", cuando la temperatura alcanza la temperatura de fusión del dúplex ($T=T_f$). La altura del pico de fusión es proporcional a la cantidad del dúplex formada entre la sonda de fusión y el amplicón diana y ésta es proporcional a la cantidad del amplicón diana en la muestra. Por lo tanto, el ciclo en el que un pico de fusión dado alcanza un umbral predeterminado (C_m) refleja la cantidad inicial de ácido nucleico diana. Las alturas de los picos de fusión (valores de max. de pico de fusión) medidos en cada ciclo se representan frente a los ciclos de amplificación. Tal como puede observarse en las figuras 2 y 3, el gráfico resultante es similar a la curva de crecimiento de PCR en tiempo real tradicional. En el caso de que se coamplifique un ácido nucleico de control de concentración de entrada conocida con el ácido nucleico diana, puede determinarse una cantidad de entrada absoluta del ácido nucleico diana mediante la comparación de los valores de C_m medidos para los ácidos nucleicos diana y de control.

En algunas realizaciones, la presente invención implica una PCR asimétrica. En una mezcla de PCR asimétrica, uno de los cebadores de amplificación se encuentra presente en mayor cantidad que el otro cebador. Los cebadores se denominan "cebador en exceso" y "cebador limitante", respectivamente. Las cadenas de ácido nucleico que resultan de la extensión de dichos cebadores se denominan "cadena en exceso" y "cadena limitante", respectivamente. La proporción entre el cebador en exceso y el cebador limitante puede manipularse selectivamente y ser de entre 200:1 y 2:1, aunque típicamente es de entre aproximadamente 9:1 y 5:1. Debido al exceso del cebador, la cadena en exceso se acumula de manera lineal en forma de cadena sencilla. En la presente invención, las sondas de fusión están diseñadas para hibridarse con la "cadena en exceso", es decir, la cadena de amplicón que resulta de la extensión del cebador en exceso, y se acumula en forma de cadena sencilla. La cadena sencilla en exceso resulta ventajosa en los ciclos posteriores de la PCR. En un ensayo de PCR no simétrica tradicional durante los ciclos posteriores, las cadenas del amplicón se acumulan y compiten eficazmente con la sonda de hibridación para la formación de un dúplex. Una PCR asimétrica está diseñada de manera que la cadena en exceso se hibrida con la sonda, eliminando de esta manera la desventaja cinética en ciclos posteriores de la PCR y permitiendo la detección de un pico de fusión.

En algunas realizaciones, puede resultar ventajoso utilizar un enzima que contenga actividad de nucleasa 5'-3'. Para evitar el agotamiento de la sonda de hibridación por dicho enzima, se selecciona una concentración de sonda que garantice una cantidad suficiente de sonda para el ensayo de fusión.

EJEMPLOS

A título meramente ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención, se aplicó el método a la detección de la presencia y cantidad de ARNm de los genes humanos PPP1CA y SENP1 en la misma muestra. PPP1CA es un gen codificante de una subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1-alfa y que presenta propiedades antioncogénicas (ver Castro et al., "PPP1CA contributes to the senescence program induced by oncogenic Ras", Carcinogenesis 29(3):491-499, 2008. SENP1 es una proteasa sentrina/SUMO-específica que pertenece a la familia de los modificadores pequeños similares a ubiquitina (SUMO, por sus siglas en inglés), revisado en Muller et al., "SUMO, ubiquitin's mysterious cousin", Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2(3):202-10, 2001, y Yeh et al., "Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles", Gene 248(1-2):1-14, 2000).

Ejemplo 1

Amplificación cuantitativa de diversas cantidades de las dianas SENP1 y PPP1CA en el mismo tubo utilizando curvas de crecimiento basadas en la fusión.

En el presente ejemplo se aplica el método a la detección y cuantificación de diversas cantidades de ARN de SENP1 y PPP1CA en una muestra de tejido.

Se llevó a cabo la PCR asimétrica con un exceso de siete veces del cebador en exceso sobre el cebador limitante. La detección se llevó a cabo con una única sonda de hibridación marcada con un pigmento de fluoresceína y un inhibidor BlackHole™. Las secuencias del cebador y de la sonda se muestran en la Tabla 1. Las sondas se diseñaron para hibridarse con la cadena en exceso.

Tabla 1

Cebadores y sondas utilizados en los ejemplos		
ID de secuencia	Función	Secuencia 5'-3'
SEC ID nº 1	Cebador directo para SENP1	CAGCTTCAAATACACAATCTGAAGGATCA
SEC ID nº 2	Cebador inverso para SENP1	TGCCTGGAAGAAAGTAGAACTGGGA
SEC ID nº 3	Sonda para SENP1	FGACTCTGTGATTTTACTGAAAGTGAAAGATTCCCAGACTCCQp
SEC ID nº 4	Cebador directo para PPP1CA	AACCGCATATATGGTTTCTACGATGE
SEC ID nº 5	Cebador inverso para	CGATGAGTGCAAGAGACGCTACAE

	PPP1CA	
SEC ID nº 6	Sonda para PPP1CA	FACTGTGGAAAACCTTQp
F - pigmento informador cx-FAM Q - pigmento inhibidor BHQ-2 E - terc-butil-bencil dA p - grupo de 3'-fosfato		

Cada reacción de 100 µl contenía una cantidad indicada de ARN de bazo fetal humano (entre 0,2 y 2.000 nanogramos, tal como se indica en las figuras 2 y 3), tricina 50 mM, pH 8,3; acetato potásico 120 mM, glicerol al 8%, 33,3 mM de cada uno de dATP, dGTP y dCTP, 100 mM de dUTP, 40 U de ADN polimerasa ZO5, 100 nM de aptámero 46A, 5 U de uracil-N-glucosilasa (UNG), acetato de manganeso 3 mM, 100 nM de cebadores directos (limitantes) (SEC ID nº 1 y SEC ID nº 4); 700 nM de cebadores inversos (en exceso) (SEC ID nº 2 y SEC ID nº 5), y 200 nM de sondas (SEC ID nº 3 y SEC ID nº 6).

La amplificación y la detección se llevaron a cabo utilizando el instrumento Roche LightCycler™ LC480. Las reacciones se sometieron al perfil de temperaturas siguientes: 50°C durante 2 min. (etapa de UNG); 95°C durante 1 min. (inactivación de UNG); 60°C durante 30 min. (transcripción inversa), seguido de 44 ciclos de amplificación de 90°C durante 15 s (desnaturalización) y 61°C durante 60 s (hibridación y extensión).

La etapa de fusión se incorporó tras los 15 ciclos iniciales de amplificación. Durante los ciclos 16 a 27 se llevó a cabo la fusión tras cada segundo ciclo. Durante los ciclos 28 a 39 se llevó a cabo la fusión tras cada ciclo. Durante los ciclos 40 a 44 se llevó a cabo la fusión tras cada segundo ciclo. La etapa de fusión se inició tras completar la etapa de hibridación y extensión a 61°C y consistía de 90°C durante 5 s a una tasa de incremento de 1,2°C por segundo; enfriamiento a 40°C a una tasa de 1,8°C por segundo, y calentamiento a 90°C a una tasa de 1,8°C por segundo, adquiriendo en continuo los datos de fluorescencia, a razón de dos veces por grado, leyendo en tres canales.

Por cada lectura de fluorescencia obtenida en la etapa de fusión se obtuvo una curva de fusión (función F/T). Para cada curva de fusión se obtuvo la función derivada o "pico de fusión" (dF/dT) y se determinó un valor del máximo de pico de fusión según el método de la presente invención (figura 1). Los valores de máximo de pico de fusión resultantes se representaron frente al número de ciclos de amplificación, rindiendo las curvas de crecimiento mostradas en la figura 2 (para SENP1) y en la figura 3 (para PPP1CA).

Se muestran los resultados cuantitativos en la Tabla 2. La tabla muestra el número de ciclos en los que se alcanza un "umbral de fusión" (C_m) predeterminado. Para SENP1, el umbral se fijó en 0,181. Para PPP1CA, el umbral se fijó en 0,055. Para cada diana el umbral se alcanzó antes con la entrada inicial más grande de ácidos nucleicos.

Tabla 2

Datos cuantitativos (ciclos hasta los valores de umbral de fusión (C_m))						
ARN de entrada (ng)	0	0.2	2	20	200	2000
SENP11	NC	35,3	32,1	31,1	30,3	29,4
PPPC1A	NC	32,3	31,2	30,8	30,1	29,8
NC: no calculado						

Tal como se muestra en las figuras 2 y 3, para cada cantidad del ácido nucleico diana se llevó a cabo el experimento por duplicado. Para cada diana, la totalidad de las doce reacciones (incluyendo dos reacciones de control sin molde) utilizaron la misma sonda marcada fluorescentemente.

Aunque la invención se ha descrito en detalle haciendo referencia a ejemplos específicos, resultará evidente para el experto en la materia que pueden llevarse a cabo diversas modificaciones dentro del alcance de la presente invención. De esta manera, el alcance de la invención no debería considerarse limitado a los ejemplos indicados en la presente memoria, sino a las reivindicaciones proporcionadas posteriormente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG Roche Diagnostics GmbH

<120> ENSAYO CUANTITATIVO DE AMPLIFICACIÓN Y FUSIÓN MULTIPLEX Y ENSAYO DE FUSIÓN

<130> 25659 EP-HS

<140> 12/400,966

<141> 2009-03-10

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

<400> 1
 cagcttcaaa tacacaatct gaaggatca 29

15 <210> 2
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

25 <400> 2
 tgcctggaag aaagtagaac tggga 25

30 <210> 3
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: sonda sintética

<400> 3
 gactctgtga ttttactgaa agtgaaagat tcccagactc c 41

40 <210> 4
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (26)..(26)
 <223> terc-butyl-bencil-dA

50 <400> 4
 aaccgcatat atggttcta cgatga 26

55 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: cebador sintético

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (24)..(24)
 <223> terc-butyl-bencil-dA

65

<400> 5
cgatgagtgc aagagacgct acaa 24

5 <210> 6
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: sonda sintética

<400> 6
actgtggaaa acctt 15

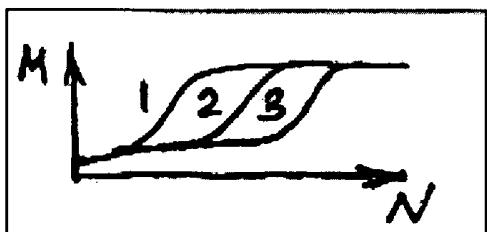
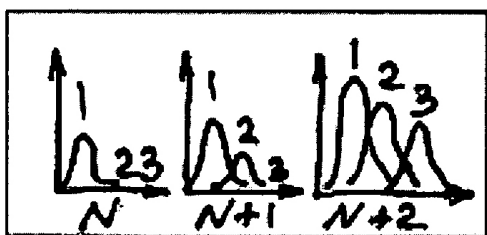
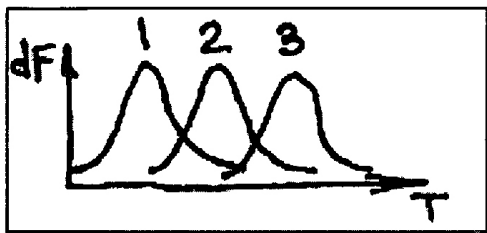
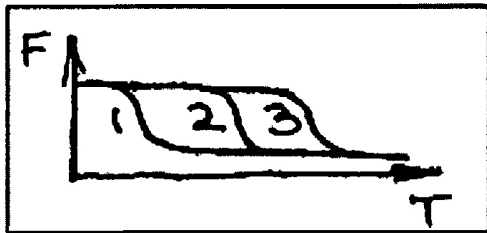
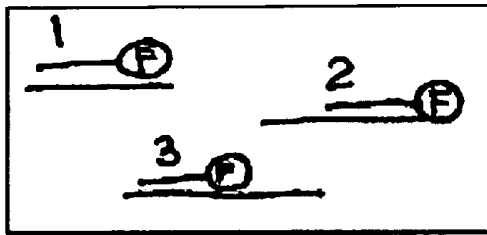
15

REIVINDICACIONES

1. Método para la amplificación por PCR en tiempo real, detección y cuantificación multiplex simultáneas de uno o más ácidos nucleicos diana en un único recipiente para muestras, que comprende las etapas siguientes:
 - (a) poner en contacto una muestra, que se sospecha que contiene uno o más ácidos nucleicos diana, con por lo menos un juego de sondas oligonucleótidas, estando marcada cada sonda oligonucleótida en el juego con la misma o mismas fracciones informadoras, en el que cada una de dichas sondas oligonucleótidas marcadas
 - i. es suficientemente complementaria respecto a por lo menos una subsecuencia de por lo menos un ácido nucleico diana,
 - ii. es capaz de unirse al ácido nucleico diana correspondiente con una temperatura de fusión diferente de las temperaturas de fusión de las otras sondas oligonucleótidas marcadas en el mismo juego,
 - (b) amplificar los ácidos nucleicos diana en la muestra en un ciclo de una reacción de amplificación que incluye un intervalo de cambios de temperatura, en el que dichas sondas oligonucleótidas marcadas se disocia de los híbridos con los ácidos nucleicos diana correspondientes,
 - (c) detectar la emisión lumínica de dichas fracciones informadas en por lo menos una parte de dicho intervalo de cambio de temperatura, y
 - (d) representar la primera derivada de dicha emisión lumínica detectada en la etapa (c) en por lo menos dicha parte del intervalo de cambio de temperatura,
 - (e) determinar el valor del máximo de dicha derivada representada en la etapa (d),
 - (f) repetir las etapas (b) a (e) múltiples veces, y
 - (g) representar los valores de máximo de dicha derivada determinada en la etapa (e) frente al número de ciclos o el número de repeticiones de las etapas (b) a (e), y determinar el número de ciclos o el número de repeticiones a las que se alcanza un valor umbral predeterminado del valor determinado en la etapa (e), cuantificando de esta manera la cantidad relativa de dicho ácido nucleico diana,

en el que dicha reacción de amplificación por PCR en tiempo real, detección y cuantificación multiplex simultáneas comprenden la detección de por lo menos dos secuencias diana diferentes, comprendiendo cualquier amplificación la utilización de parejas separadas de cebadores de amplificación para cada secuencia diana y la detección utilizando una sonda oligonucleótida separada para cada secuencia diana o la amplificación utilizando una pareja de cebadores de amplificación y la detección utilizando más de una sonda oligonucleótida para cada secuencia amplificada.
2. Método según la reivindicación 1, en el que un ácido nucleico de control de concentración conocida se somete a las etapas (a) a (f) simultáneamente con dichos ácidos nucleicos diana y el valor determinado en la etapa (g) para cada ácido nucleico diana se compara con el valor determinado en la etapa (g) para el ácido nucleico de control, determinando de esta manera la cantidad absoluta de cada uno de dichos ácidos nucleicos diana.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que cada una de dichas sondas oligonucleótidas en la etapa (a) se marca con una única fracción informadora.
4. Método según la reivindicación 3, en el que dicha fracción informadora es fluorescente.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que cada una de dichas sondas oligonucleótidas en la etapa (a) se marca con una fracción informadora y una fracción inhibidora.
6. Método según la reivindicación 5, en el que dicha fracción informadora y dicha fracción inhibidora son fluoróforos.
7. Método según la reivindicación 5, en el que dicha fracción informadora es un fluoróforo y dicha fracción inhibidora es un inhibidor oscuro.
8. Método según la reivindicación 5, en el que dichas fracciones informadora e inhibidora están separadas por un sitio de corte de nucleasa.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además por lo menos un ciclo de amplificación para amplificar los ácidos nucleicos diana en la muestra antes de la etapa (b).

FIGURA 1



Amplificar múltiples dianas en presencia de juegos de sondas, con el mismo marcaje pero T_f diferente dentro del juego.



Generar curvas de fusión para cada diana durante los ciclos de amplificación seguido de análisis de fusión



Convertir las curvas de fusión en picos de fusión, determinar la altura de los picos en $T=T_f$ ("max. de pico de fusión")



Pasar al siguiente ciclo de amplificación. En los ciclos $N, N+1, N+2, \text{etc.}$, generar curvas de fusión y convertir en picos de fusión



Representar gráficamente los datos de máx. de picos de fusión frente al número de ciclos para generar curvas de crecimiento para cada diana

FIGURA 2

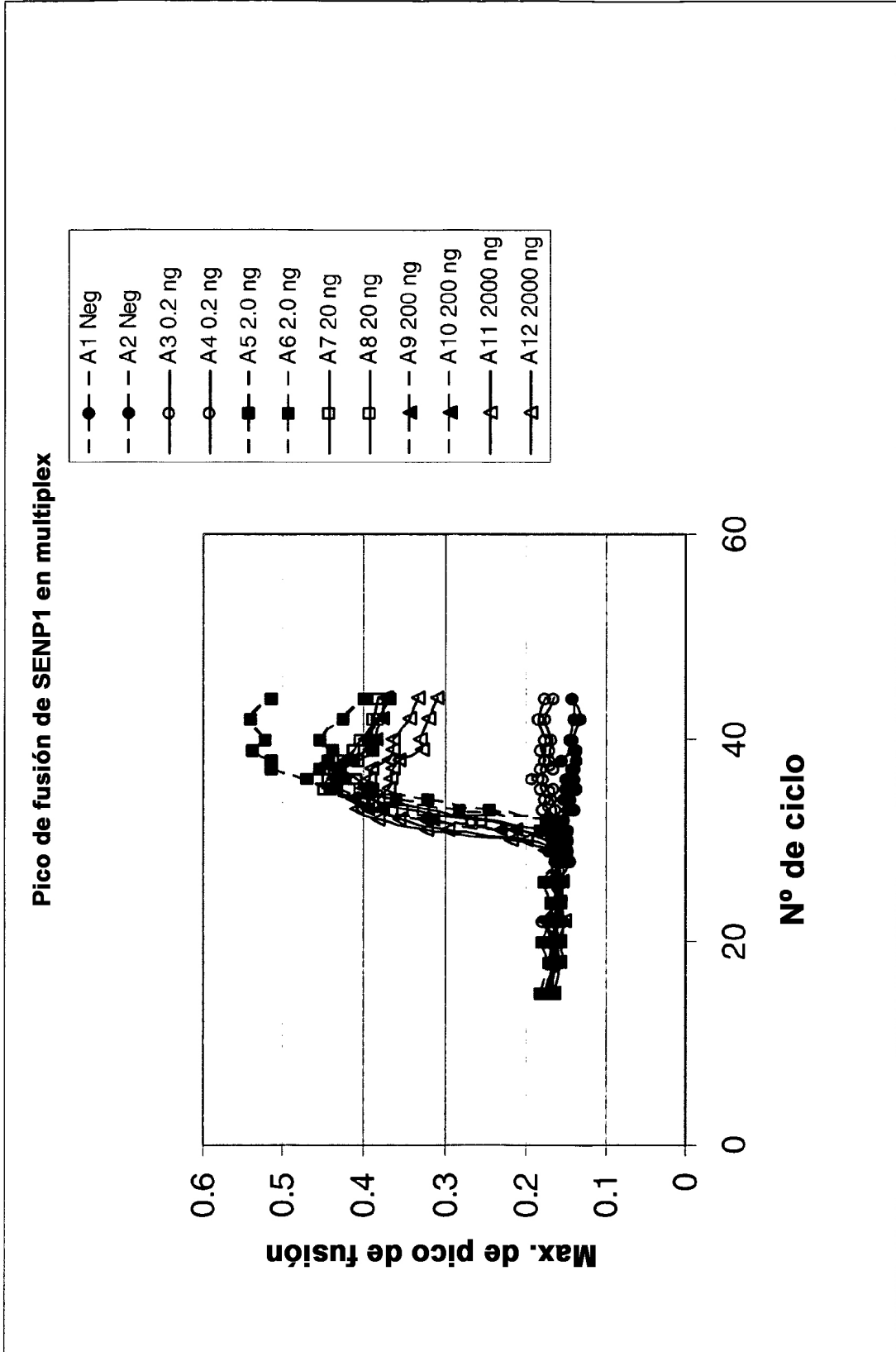


FIGURA 3

