

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 016**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2006 E 06013329 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 1746172**

54 Título: **PCR asimétrica junto con caracterización post-PCR para la identificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

30.06.2005 US 696293 P

30.06.2005 US 695991 P

30.06.2005 US 696303 P

30.06.2005 US 696253 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

NEWTON, NICOLAS y
WILL, STEPHEN GORDON

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 605 016 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

PCR asimétrica junto con caracterización post-PCR para la identificación de ácidos nucleicos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a los campos de la química de ácidos nucleicos y la identificación de ácidos nucleicos. Más específicamente, la invención se refiere a métodos y composiciones para amplificar y clasificar secuencias de ácidos nucleicos específicas, las cuales se pueden usar para tales fines como diagnóstico.

10

Antecedentes de la invención

Existen numerosos ejemplos de la necesidad de una clasificación/identificación de ácido nucleico rápida y fiable, especialmente en campos como la medicina. Por ejemplo, muchas enfermedades e infecciones están causadas por, con frecuencia relacionadas con, un número de patógenos. Aunque los síntomas de la enfermedad pueden presentarse como similares, puede ser de suma importancia determinar el patógeno exacto causante para presentar un tratamiento eficaz. No solamente es esto cierto en términos de diferenciación entre diferentes especies infecciosas, sino también es cierto, e incluso puede ser más difícil de resolver, cuando se trata de discriminar entre agentes estrechamente relacionados, por ejemplo, diferentes cepas de un patógeno tal como los subtipos del virus de la hepatitis C (VHC).

20

Además, los medios rápidos y fiables de genotipificación pueden ser útiles en la determinación de la composición de alelo dentro y entre individuos. Por ejemplo, la clasificación fiable de alelos particulares en un individuo puede ayudar en la terapia genética en humanos e incluso puede ayudar en la planificación del tratamiento profiláctico, por ejemplo, cuando se detectan alelos específicos. La identificación de alelos particulares es también extremadamente útil en la realización de la selección asistida por marcador, por ejemplo, programas de cultivo o cría animal, identificación o genotipificación de patógenos y otros organismos.

25

Actualmente existen un número de diferentes métodos para detectar, identificar, genotipificar o cuantificar diversos ácidos nucleicos. Muchos de estos dependen de técnicas que implican diversas acciones de unión entre sondas de ácido nucleico y el ácido nucleico que se examina tal como el análisis de polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, secuenciación, escisión de sondas que solamente se da cuando están presentes las secuencias diana específicas, y similares.

30

Sin embargo, hay una constante necesidad de herramientas de análisis más rápidas, más sencillas y más flexibles. Los métodos ideales para la clasificación o genotipificación de secuencias de ácidos nucleicos serían fáciles de usar e implicarían las menores manipulaciones de los componentes necesarios, disminuyendo así los casos de error y reduciendo los costes. La presente invención proporciona estos y otros beneficios que estarán claros tras el examen de la presente memoria, reivindicaciones y figuras.

35

40

Compendio de la invención

En diversos aspectos en el presente documento, la invención comprende métodos para clasificar, identificar, cuantificar y/o genotipificar una o más dianas de ácido nucleico en una muestra (por ejemplo, una muestra sanguínea o muestra de orina de un sujeto y/o una muestra mezclada de aislado(s) biológico(s) tal como muestra(s) de ácidos nucleicos en solución de un sujeto). Tales métodos comprenden: la realización de PCR cinética asimétrica en una mezcla de reacción que contiene una o más sondas 5'-nucleasa marcadas y una o más sondas de hibridación marcadas, en la que tales sondas 5'-nucleasa pueden ser la misma en secuencia que las sondas de hibridación o en la que las sondas pueden ser diferentes en secuencia una de otras; el seguimiento de una o más curvas de crecimiento de la PCR cinética (kPCR), por ejemplo, rastreando indicadores como la fluorescencia, para construir tales curvas de crecimiento de la kPCR para calcular un valor C_t (umbral de ciclo) y de ese modo determinar el número de copia, el genotipo o la identidad de diana; la modificación de la temperatura de la mezcla de reacción después de la kPCR (por ejemplo, sobre un intervalo de temperaturas, o bien incrementando o disminuyendo y o bien sobre un intervalo continuo o sobre un número de temperaturas distintas) para causar un cambio en la asociación entre la una o más sondas de hibridación marcadas y la una o más dianas de ácido nucleico (por ejemplo, fusión o hibridación); el seguimiento de una o más señales fluorescentes (o, en algunas realizaciones, señales tales como radiación, etc.) generadas a partir de la una o más sondas de hibridación marcadas unidas al exceso de cadena generado en la kPCR asimétrica, produciendo de ese modo una curva de fusión o curva de hibridación; y la correlación de la curva de fusión o curva de hibridación, producida así, con una curva de fusión o hibridación de una sonda completamente complementaria de una o más dianas de ácido nucleico conocidas, identificando así la una o más dianas de ácido nucleico en la muestra. En el presente documento, la kPCR asimétrica comprende un primer cebador y al menos un segundo cebador (*primer*), en la que la cantidad del primer cebador es mayor que la cantidad del segundo cebador y en la que la sonda de hibridación está presente en mayor cantidad que el segundo cebador. Las curvas de fusión o hibridación patrones opcionalmente se pueden determinar a partir de la concreta realización de las curvas bajo condiciones fijadas o se pueden predecir en base a las

50

55

60

65

composiciones de ácido nucleico de las sondas de hibridación y las dianas bajo condiciones fijadas sin la concreta realización de la curva.

En algunas realizaciones de tales métodos "la identificación de la una o más dianas de ácido nucleico" puede implicar la identificación de organismos o cepas de organismo que tienen el ácido nucleico diana. Por ejemplo, en diversas realizaciones, la identificación puede suponer la identificación de (o la presencia de) bacterias o cepas bacterianas particulares (por ejemplo, especies de estafilococos, especies de micobacterias, especies de *Borrelia*, diversas especies de *Enterococcus*, diversas cepas de *E. coli* y similares), virus o cepas víricas particulares (por ejemplo, VHC, VIH, influenza, VPH, VHB), hongos o cepas fúngicas particulares, o la presencia de alelos particulares o halotipos (por ejemplo, como se usa en la terapia genética para detectar la presencia y/o tipo de alelos particulares).

En las diversas realizaciones en la PCR cinética asimétrica en el presente documento, la relación del primer cebador y el segundo cebador se puede manipular selectivamente. En el presente documento, la kPCR asimétrica comprende un primer cebador y al menos un segundo cebador, en la que la cantidad del primer cebador es mayor que la cantidad del segundo cebador (es decir, el cebador limitante). También, la una o más sondas de hibridación (que es complementaria a la cadena producida por el primer cebador, o no limitante, en la kPCR asimétrica) existe en la mezcla de reacción en una cantidad mayor que el segundo cebador, o limitante. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la relación (de primer y segundo cebador) puede comprender al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 50:1, al menos 100:1 o al menos 200:1 o más, dependiendo de, por ejemplo, la relación final deseada de las cadenas de ácido nucleico diana (por ejemplo, la relación de una cadena con la otra tras la amplificación).

En algunas realizaciones, los métodos comprenden la realización de una kPCR asimétrica, seguido de una etapa de fusión/hibridación térmico, en presencia de un indicador de amplificación (por ejemplo, un indicador de amplificación por PCR cinética de las secuencias diana) que comprende una sonda 5'-nucleasa fluorescentemente marcada o de lo contrario sonda 5'-nucleasa marcada. Tales sondas pueden ser al menos básicamente complementarias a, e hibridar con, las secuencias de ácidos nucleicos diana. En diversas realizaciones, la amplificación está indicada por un incremento en la fluorescencia, mientras que, en otras realizaciones más, la amplificación está indicada por un descenso en la fluorescencia.

En ciertas realizaciones, la(s) misma(s) sonda(s) se usa(n) como sondas 5'-nucleasa y como sondas de hibridación, simplificando de ese modo y racionalizando las etapas del método. Por tanto, por ejemplo, las sondas 5'-nucleasa pueden ser las mismas sondas que las sondas de hibridación usadas para generar también las curvas de fusión/hibridación térmico. Sin embargo, en otras realizaciones más, las sondas 5'-nucleasa fluorescentemente marcadas pueden ser sonda(s) diferente(s) que las sondas de hibridación, por ejemplo, en secuencia, en marcación, etc.

En ciertas realizaciones, las sondas (por ejemplo, las sondas de hibridación y/o las sondas 5'-nucleasa) pueden ser completamente complementarias a una región de una diana de ácido nucleico. En otras realizaciones, las sondas pueden ser parcialmente complementarias a una región de una diana de ácido nucleico. Por tanto, por ejemplo, si una muestra contuviera un número de diferentes especies bacterianas todas las cuales tendrían una región diana amplificada, pero dicha región diana comprendería una secuencia diferente en cada especie, una sonda de hibridación (sea la misma o no que la sonda 5'-nucleasa) puede ser completamente complementaria a una de las regiones de especie y parcialmente o en absoluto complementaria a cualquiera de las otras secuencias de especie; o la sonda no puede ser completamente complementaria a ninguna de las secuencias de especie mientras que parcialmente o en absoluto complementaria a cada una de las otras secuencias de especie, etc.

En ciertas realizaciones de la invención, el cambio en la asociación entre la sonda de hibridación y la diana de ácido nucleico puede causar un cambio (por ejemplo, incremento) en la fluorescencia (que, a continuación, opcionalmente se puede detectar y cuantificar). En otras realizaciones más, el cambio en la asociación entre una sonda de hibridación y una diana de ácido nucleico puede causar un descenso en la fluorescencia, lo cual también se puede detectar y cuantificar.

También se describe que las sondas de hibridación opcionalmente pueden estar presentes en la mezcla de reacción durante la amplificación del ácido nucleico diana (por ejemplo, como cuando las sondas de hibridación son las mismas sondas que las sondas 5'-nucleasa o como cuando las sondas son diferentes, pero ambas están presentes en la mezcla de reacción antes de la amplificación), o las sondas de hibridación pueden no estar presentes durante la amplificación del ácido nucleico diana, por ejemplo, como cuando las sondas de hibridación no comprenden las mismas sondas que las sondas 5'-nucleasa y se añaden después de la kPCR.

El seguimiento en el presente documento se puede dar sobre un intervalo de temperaturas, por ejemplo, sobre un intervalo continuo, o en puntos de temperatura separados dentro de un intervalo.

En la detección y cuantificación de la amplificación por PCR cinética de los ácidos nucleicos diana por las sondas 5'-nucleasa, se puede hacer un seguimiento de un cambio en al menos una primera fluorescencia, mientras que se puede hacer un seguimiento de la detección y cuantificación del cambio en la asociación de la sonda de hibridación con el ácido nucleico diana mediante el cambio en diferente(s) fluorescencia(s). Tal(es) diferente(s) fluorescencia(s) opcionalmente pueden surgir de sondas diferentes. En las realizaciones en las que hay sondas diferentes (es decir, en las que la sonda 5'-nucleasa es diferente de la sonda de hibridación), cada una opcionalmente se puede medir mediante una fluorescencia diferente (por ejemplo, a partir de diferentes tintes fluorescentes) u otro indicador. Otras realizaciones pueden implicar la medición de la misma fluorescencia para la curva de crecimiento de la PCR cinética y para el cambio en la asociación en la curva de hibridación/fusión puesto que tales curvas producen la fluorescencia en diferentes momentos en la secuencia de reacción.

En algunos aspectos, en el presente documento, la invención comprende métodos en los que la una o más dianas de ácido nucleico comprenden un ácido nucleico del virus de la hepatitis C (VHC) (por ejemplo, un ácido nucleico de cualquier VHC, tal como VHC 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5, 6 o cualquier otro tipo, subtipo y/o genotipo). Por tanto, en tales realizaciones, la identificación de la diana de ácido nucleico de VHC identifica una cepa de VHC en la muestra. Además, en tales realizaciones, la(s) sonda(s) de hibridación es(son) básicamente complementaria(s) a un genotipo de la cepa de VHC (o con más de un genotipo de cepa de VHC). Tales realizaciones pueden comprender un único tipo de sonda de hibridación que muestra diferente complementariedad a diferentes cepas de VHC, o sondas múltiples de hibridación en las que una primera sonda es básicamente complementaria a un primer genotipo de cepa de VHC y una al menos segunda sonda es básicamente complementaria a un segundo genotipo de cepa de VHC, etc. o múltiples sondas de hibridación que son básicamente complementarias a múltiples áreas de aquellos genotipos de cepa de VHC. En ciertas realizaciones la sonda de hibridación comprende una secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: 3.

También se describen kits para la identificación de una o más dianas de ácido nucleico en una muestra. Tales kits pueden comprender: cebadores que están presentes en cantidades distintas que son específicos para la amplificación de una o más dianas; una o más sondas de hibridación marcadas (opcionalmente fluorescentemente marcadas) que son completamente o parcialmente complementarias a al menos una región de la diana de ácido nucleico en la que las sondas de hibridación forman complejos de hibridación con las dianas y dichos complejos tienen T_m; una o más sondas 5'-nucleasa marcadas (opcionalmente fluorescentemente marcadas); e instrucciones para la amplificación por PCR asimétrica en tiempo real de las dianas, para medir las T_m de los complejos de hibridación, y para identificar los ácidos nucleicos basados en las T_m de los complejos de hibridación. También se describen kits, en los que la sonda 5'-nucleasa y la sonda de hibridación son la misma sonda. También se describe, que la sonda 5'-nucleasa y la sonda de hibridación no son la misma sonda, por ejemplo, pueden diferir en secuencia, marca, etc.

También se describe un sistema, que tiene una o más sondas de hibridación marcadas (opcionalmente fluorescentemente marcadas); una o más sondas 5'-nucleasa marcadas (opcionalmente fluorescentemente marcadas); dos o más cebadores de PCR que están presentes en cantidades distintas y que son específicos para la amplificación de uno o más ácidos nucleicos diana; uno o más recipientes que comprenden las sondas y los cebadores (así como constituyentes de la PCR cinética tal como tampones, sales y similares); uno o más moduladores térmicos que están operativamente conectados al recipiente y que pueden manipular la temperatura en el recipiente; uno o más detectores que se configuran para detectar señales a partir de las sondas de hibridación y/o 5'-nucleasa (por ejemplo, señales fluorescentes); y uno o más controladores que están operativamente conectados al detector y al modulador térmico y que pueden comprender uno o más conjuntos de instrucciones para controlar el modulador térmico y el detector y que también pueden comprender uno o más conjuntos de instrucciones para correlacionar las señales fluorescentes y la temperatura en el recipiente con la presencia de uno o más ácidos nucleicos diana. También se describe que la sonda 5'-nucleasa en dichos kits es la misma sonda que la sonda de hibridación, mientras que en algunas realizaciones la sonda 5'-nucleasa y la sonda de hibridación son diferentes una de otra. También se describe que el sistema además puede comprender una fuente de luz eficaz para excitar la sonda fluorescentemente marcada. También se describe que el sistema puede comprender además uno o más dispositivos o subsistemas para visualizar o procesar los datos obtenidos por el sistema.

También se describe una mezcla de reacción que comprende cebadores de la PCR cinética presentes en cantidades distintas específicas para la amplificación de al menos una diana de ácido nucleico, una o más sondas 5'-nucleasa marcadas y una o más sondas de hibridación marcadas en la que las sondas 5'-nucleasa y las sondas de hibridación pueden ser o bien la misma sonda o sondas diferentes. En el presente documento, los cebadores están presentes en diferentes cantidades y las sondas de hibridación están presentes en una cantidad mayor que la cantidad del cebador limitante (es decir, el cebador presente en la cantidad menor).

También se describe sondas adecuadas para la genotipificación de VHC, por ejemplo, un ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótido de SEQ ID NO: 3.

Estos y otros objetos y características de la invención llegarán a estar completamente claros cuando se lea la siguiente detallada descripción junto con las figuras adjuntas.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el frecuentemente entendido por el experto en la técnica a la que pertenece la invención. Las siguientes definiciones complementan aquellas de la técnica y están dirigidas a la presente solicitud y no son necesariamente para ser imputadas a cualquier caso relacionado o no relacionado, por ejemplo, a cualquier patente o solicitud a la que comúnmente pertenece. Aunque algún método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica para el ensayo de la presente invención, los materiales y métodos preferidos están descritos en el presente documento. Por consiguiente, la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir solamente realizaciones particulares.

Tal como se usa en esta memoria y las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "una", "uno" y "el", "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un oligonucleótido" incluye una pluralidad de oligonucleótidos; la referencia a una "sonda" incluye mezclas de tales sondas, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, una "muestra" se refiere a cualquier sustancia que contiene o presume de contener ácido nucleico (por ejemplo, de una bacteria, virus, etc.). La muestra puede ser de origen natural o sintético y se puede obtener por algún medio conocido por los expertos en la técnica. Tal muestra puede ser una cantidad de tejido o fluido aislado de un individuo o individuos, que incluye, pero no se limita a, por ejemplo, piel, plasma, suero, sangre total, fluido espinal, saliva, fluido peritoneal, fluido linfático, humor vítreo o acuoso, fluido sinovial, orina, lágrimas, células sanguíneas, productos sanguíneos, semen, fluido seminal, fluidos vaginales, derrame pulmonar, fluido seroso, órganos, lavado bronquio-alveolar, tumores, tejidos embebidos en parafina, etc. Las muestras también pueden incluir constituyentes y componentes de cultivos celulares *in vitro*, que incluyen, pero no se limitan a, medio acondicionado resultante del crecimiento de células en el medio de cultivo celular, células recombinantes, componentes celulares, etc. Un ácido nucleico se puede obtener a partir de una muestra biológica por procedimientos bien conocidos en la técnica.

El término "ácido nucleico" se refiere a un polímero de monómeros que se pueden corresponder a un polímero de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN), o análogo de los mismos. Esto incluye polímeros de nucleótidos tales como ARN y ADN, así como formas modificadas de los mismos, ácidos peptidonucleicos (PNA), ácidos nucleicos cerrados (LNATM), y similares. En ciertas aplicaciones, el ácido nucleico puede ser un polímero que incluye múltiples tipos de monómero, por ejemplo, tanto subunidades de ARN como ADN. Un ácido nucleico puede ser o incluir, por ejemplo, un cromosoma o segmento cromosómico, un vector (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de ADN o ARN desnudo, un amplicón, un oligonucleótido, un cebador, una sonda, etc. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, de cadena sencilla o de doble cadena, o híbridos ADN:ARN, estructuras quiméricas de ADN y ARN. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácidos nucleicos particular opcionalmente comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia explícitamente indicada. No hay intención de distinción en longitud entre el término "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" y los términos se pueden usar intercambiabilmente en el presente documento a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Tales términos se refieren solamente a la estructura primaria de la molécula.

Un ácido nucleico generalmente es de cadena sencilla o de doble cadena y generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se perfila en el presente documento, se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener cadenas principales alternas, incluyendo, por ejemplo, fosforamida (Beaucage y col. (1993) *Tetrahedron* 49(10):1.925 y las referencias en el mismo; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3.800; Sprinzl y col. (1977) *Eur. J. Biochem.* 81:579; Letsinger y col. (1986) *Nucl. Acids. Res.* 14:3.847; Sawai y col. (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger y col. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4.470; y Pauwels y col. (1986) *Chemica Scripta* 26:1.419), fosforotioato (Mag y col. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1.437 y la Patente U.S. N° 5.644.048), fosforoditioato (Briu y col. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2.321), enlaces de O-metilfosforoamidita (Eckstein, "Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach", Oxford University Press (1992)), y cadenas principales de ácido nucleico peptídico y enlaces (Egholm (1992) *L. A. Chem. Soc.* 114:1.895; Meier y col. (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1.008; Nielsen (1993) *Nature* 365:566; y Carlsson y col. (1996) *Nature* 380:207). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales positivamente cargadas (Denpcy y col. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6.097); cadenas principales no iónicas (Patente U.S. N° 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Angew (1991) *Chem. Intl. Ed. English* 13:1.597; Letsinger y col. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4.470; Letsinger y col. (1994) *Nucleoside & Nucleotide* 13:1.597; Capítulos 2 and 3, *ASC Symposium Series 580*, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y. S. Sanghvi and P. Dan Cook; Mesmaeker y col. (1994) *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett.* 4: 395; Jeffs y col. (1994) *L. Biomolecular NMR* 34:17; *Tetrahedron Lett.* 37:743 (1996)) y cadenas principales de no ribosa, incluyendo las descritas en la Patente U.S. N° 5.235.033 y 5.034,506 y Capítulos 6 y 7, *ASC Symposium Series 580*, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghvi and P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también están incluidos dentro de la definición de ácidos nucleicos (Jenkins y col. (1995) *Chem. Soc. Rev.* pp 169-176). Diversos análogos de ácido nucleico están también descritos en, por ejemplo, Rawls, *C & E News* 2 de junio de 1997, página 35. Estas modificaciones de la cadena principal de ribosa-fosfato se pueden hacer para facilitar la adición de restos

adicionales tales como los restos de marcaje, o para alterar la estabilidad y la semivida de tales moléculas en ambientes fisiológicos.

Además de las bases heterocíclicas que se dan de manera natural que se encuentran generalmente en ácidos nucleicos (por ejemplo, adenina, guanina, timina, citosina y uracilo), los análogos de ácido nucleico también incluyen aquellos que tienen bases heterocíclicas que no se dan de manera natural u otras bases modificadas, muchos de los cuales están descritos, o de lo contrario referidos, en el presente documento. En particular, muchas bases que no se dan de manera natural están descritas además en, por ejemplo, Seela y col. (1991) *Helv. Chim. Acta* 74:1.790, Grein y col. (1994) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:971-976, y Seela y col. (1999) *Helv. Chim. Acta* 82:1.640. Para ilustrar más, opcionalmente se incluyen ciertas bases usadas en los nucleótidos que actúan como modificadores de la temperatura de fusión (T_m). Por ejemplo, algunas de estas incluyen 7-deazapurinas (por ejemplo, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, etc.), pirazol[3,4-d]pirimidinas, propinil-dN (por ejemplo, propinil-dU, propinil-dC, etc.) y similares. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. Nº 5.990.303, titulada "Synthesis of 7-deaza-2'-deoxyguanosine Nucleotides", expedida el 23 de noviembre de 1999 a Seela. Otras bases heterocíclicas representativas 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-azacitosina; 5-fluorocitosina; 5-clorocitosina; 5-iodocitosina; 5-bromocitosina; 5-metilcitosina; 5-propinilcitosina; 5-bromoviniluracilo; 5-fluorouracilo; 5-clorouracilo; 5-iodouracilo; 5-bromouracilo; 5-trifluorometiluracilo; 5-metoximetiluracilo; 5-etiniluracilo; 5-propiniluracilo, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 7-deazaadenina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 7-deazaguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina, y similares.

Ejemplos adicionales de bases y nucleótidos modificados también están descritos en, por ejemplo, la Patente U.S. Nº 5.484.908, titulada "Oligonucleotides Containing 5-Propynyl Pyrimidines", expedida el 16 de Enero de 1996 a Froehler y col., la Patente U.S. Nº 5.645.985, titulada "Enhanced Triple-Helix and Double-Helix Formation with Oligomers containing Modified Pyrimides", expedida el 8 de julio de 1997 a Froehler y col., la Patente U.S. Nº 5.830.653, titulada "Methods of Using Oligomers Containing Modified Pyrimidines", expedida el 3 de noviembre de 1998 a Froehler y col., la Patente U.S. Nº 6.639.059, titulada "Synthesis of [2.2.1]Bicyclo Nucleosides", expedida el 28 de octubre de 2003 a Kochkine y col., la Patente U.S. Nº 6.303.315, titulada "One Step Sample Preparation and Detection of Nucleic Acids in Complex Biological Samples", expedida el 16 de octubre de 2001 a Skouv, y la publicación de Solicitud de Patente U.S. 2003/0092905, titulada "Synthesis of [2.2.1]Bicyclo Nucleosides" de Kochkine y col. que se publicó el 15 de mayo de 2003.

Tal ácido nucleico puede ser de un mamífero humano o no humano, o cualquier otro organismo (por ejemplo, planta, anfibio, bacteria, virus, micoplasma, etc.), tejido o línea celular, o derivado de cualquier fuente recombinante, sintetizado *in vitro* o por síntesis química. De nuevo, el ácido nucleico puede ser ADN, ARN, ADNc, ADN-ARN, ácido nucleico cerrado (LNA), ácido peptidonucleico (PNA), un híbrido o cualquier mezcla de lo anterior. El ácido nucleico puede existir en una forma de doble cadena, de cadena sencilla o parcialmente de doble cadena. Los ácidos nucleicos de la invención incluyen tanto ácidos nucleicos como fragmentos de los mismos, en formas purificadas o no purificadas, incluyendo genes, cromosomas, plásmidos, los genomas del material biológico tal como microorganismos, por ejemplo, bacterias, levaduras, virus, viroides, mohos, hongos, plantas, animales, humanos, micoplasmas y similares.

"Correspondiente" como se usa en el presente documento, se debería tomar que significa idéntico a, o complementario a, una secuencia diseñada de nucleótidos en un ácido nucleico. El significado preciso del término será evidente al experto en la técnica a partir del contexto en el cual se use.

Un "complemento" de un ácido nucleico (o un ácido nucleico que es "específico" en relación con otro ácido nucleico) se refiere a al menos un segmento de ácido nucleico que puede combinar en una asociación antiparalela o hibridar con al menos uno posterior a ese ácido nucleico. La asociación antiparalela puede ser intramolecular, por ejemplo, en forma de bucle en horquilla dentro de un ácido nucleico, o intermolecular, tal como cuando dos o más ácidos nucleicos de cadena sencilla hibridan uno con otro. Ciertas bases no encontradas frecuentemente en ácidos nucleicos naturales pueden estar incluidas en los ácidos nucleicos de la presente invención e incluir, por ejemplo, inosina, 7-deazaguanina y las anteriormente discutidas. La complementariedad no necesita ser perfecta (es decir, los ácidos nucleicos pueden ser "parcialmente complementarios"). Dúplex adecuados, por ejemplo, pueden contener pares de bases mal emparejadas o bases no emparejadas. Los expertos en la técnica de la tecnología de ácido nucleico pueden determinar la estabilidad del dúplex considerando empíricamente un número de variables que incluyen, por ejemplo, la longitud de una región de complementariedad, la composición de base y la secuencia de nucleótidos en una región de complementariedad, fuerza iónica e incidencia de pares de bases mal emparejados.

Un "sujeto" se refiere a un organismo. Generalmente, el organismo es un mamífero, particularmente un humano. En ciertas realizaciones, por ejemplo, un sujeto es un paciente sospechoso de tener un trastorno genético, enfermedad u otra afección.

5 Debido a que los mononucleótidos se pueden disponer para crear oligonucleótidos de una manera tal que el 5'-fosfato de un anillo de pentosa de mononucleótido está acoplado al oxígeno 3' de su vecino en una dirección vía un enlace fosfodiéster, un extremo de un oligonucleótido se refiere como "extremo 5'" si su fosfato 5' no está unido al oxígeno 3' de un anillo de pentosa de mononucleótido y un extremo se refiere como "extremo 3'" si su oxígeno 3' no está unido a un fosfato 5' de un anillo de pentosa de mononucleótido posterior. Tal como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico, incluso si es interna a un oligonucleótido mayor, también se puede decir que tienen extremos 5' y 3'.

15 Un "ácido nucleico cebador" o "cebador" es un ácido nucleico que puede hibridar con un ácido nucleico diana o plantilla y permitir la elongación o alargamiento de cadena usando, por ejemplo, un biocatalizador que incorpora nucleótido, tal como una polimerasa bajo condiciones apropiadas de reacción. Tales condiciones generalmente incluyen la presencia de uno o más desoxirribonucleósido trifosfatos y el biocatalizador que incorpora nucleótido, en un tampón adecuado ("tampón" incluye sustituyentes que son cofactores, o que afectan al pH, fuerza iónica, etc.), y en a una temperatura adecuada. Un ácido nucleico cebador es generalmente un oligonucleótido natural o sintético (por ejemplo, un oligodesoxirribonucleótido de cadena sencilla, etc.). Aunque se utilizan opcionalmente otras longitudes de ácido nucleico cebador, generalmente comprenden regiones de hibridación que oscilan entre aproximadamente 6 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos cebadores cortos generalmente utilizan temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con ácidos nucleicos plantillas. Un ácido nucleico cebador que es al menos parcialmente complementario a uno posterior de un ácido nucleico plantilla es generalmente suficiente para hibridar con la plantilla para que se dé la elongación. El diseño de cebadores adecuados para, por ejemplo, la amplificación de una secuencia diana dada se conoce bien en la técnica y se describe en la bibliografía citada en el presente documento. Un ácido nucleico cebador se puede marcar, si se desea, incorporando un marcador detectable por, por ejemplo, técnicas espectroscópicas, fotoquímicas, bioquímicas, inmunoquímicas, químicas u otras. Para ilustrar, marcadores útiles incluyen radioisótopos, tintes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas (como las frecuentemente usadas en ELISA), biotina, o haptenos y proteínas para las que están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales. Muchos de estos y otros marcadores están más descritos en el presente documento y/o de lo contrario se conocen en la técnica. Un experto en la técnica reconocerá que, en ciertas realizaciones, se pueden usar también ácidos nucleicos cebadores como ácidos nucleicos sondas. Véase, más adelante.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido (u otra secuencia de ácidos nucleicos) que puede formar una estructura dúplex con una región de un ácido nucleico diana (o amplicón derivado de dicho ácido nucleico diana), debido a la complementariedad parcial o completa de al menos una secuencia en la sonda a una secuencia en el ácido nucleico diana bajo condiciones adecuadas. La sonda, en ciertas realizaciones, no contiene una secuencia complementaria a secuencia(s) de un cebador en una reacción de la 5'-nucleasa. Tal como se discute en el presente documento, la sonda puede estar marcada o no marcada. El terminal 3' de la sonda opcionalmente se puede "bloquear" para prohibir la incorporación de la sonda en un producto de elongación de cebador. El "bloqueo" se puede alcanzar usando bases no complementarias o añadiendo un resto químico tal como biotina o un grupo fosfato al 3'-hidroxilo del último nucleótido, que puede, dependiendo del resto seleccionado, servir a un fin doble actuando también como un marcador para la posterior detección o captura del ácido nucleico acoplado al marcador. El bloqueo también se puede alcanzar eliminando el 3'-OH o usando un nucleótido que carezca de un 3'-OH tal como didesoxinucleótido, o añadiendo un grupo voluminoso que bloquee la elongación por obstáculo estérico.

50 El término "región de hibridación" se refiere a esa región de un ácido nucleico que es exactamente o básicamente complementaria a y, por lo tanto, hibrida con, la secuencia diana. Para su uso en un ensayo de hibridación, por ejemplo, para la discriminación de las diferencias de nucleótido sencillo en secuencia, la región de hibridación generalmente es de aproximadamente 8 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Aunque la región de hibridación generalmente se refiere al oligonucleótido entero, la sonda puede incluir secuencias de nucleótidos adicionales que funcionan, por ejemplo, como conector que se une a sitios para proporcionar un sitio para acoplar la secuencia sonda a un soporte sólido o similares. Las sondas en el presente documento pueden comprender sondas "5'-nucleasa" (comprendiendo generalmente un marcador(es) fluorescente(s) y generalmente también un desactivador (*quencher*)) una sonda de FRET, o una baliza molecular, o similares, que también se pueden utilizar para detectar la hibridación entre la sonda y los ácidos nucleicos diana en una muestra. En algunas realizaciones, la región de hibridación de la sonda es completamente complementaria a la secuencia diana. Sin embargo, en general, no es necesaria la completa complementariedad (es decir, los ácidos nucleicos pueden ser parcialmente complementarios uno a otro); los dúplex estables pueden contener bases mal emparejadas o bases no emparejadas. La modificación de las condiciones estrictas puede ser necesaria para permitir un dúplex de hibridación estable con uno o más mal emparejamientos de bases o bases no emparejadas. Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3^o Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), proporciona la guía para la modificación adecuada. La estabilidad del dúplex diana/sonda depende de un número de variables que incluyen la longitud del oligonucleótido, composición de base y secuencia del

oligonucleótido, temperatura y condiciones iónicas. Un experto en la técnica reconocerá que, en general, el complemento exacto de una sonda dada es igualmente útil como sonda. Un experto en la técnica reconocerá también que, en ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos sondas también se pueden usar como ácidos nucleicos cebadores.

5 Una "sonda 5'-nucleasa" se refiere a un oligonucleótido que comprende al menos un resto de marcación emisor de luz y que se usa en una reacción de la 5'-nucleasa para efectuar la detección del ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, por ejemplo, una sonda 5'-nucleasa incluye solamente un único resto emisor de luz (por ejemplo, un tinte fluorescente, etc.). En ciertas realizaciones, las sondas 5'-nucleasa incluyen regiones de auto-complementariedad de modo que las sondas son capaces de formar estructuras en horquilla bajo condiciones seleccionadas. Para ilustrar más, en algunas realizaciones una sonda 5'-nucleasa comprende al menos dos restos de marcación y emite radiación de intensidad aumentada después de que uno de los dos marcadores se escinda o de lo contrario se separe del oligonucleótido. En ciertas realizaciones, una sonda 5'-nucleasa está marcada con dos tintes fluorescentes diferentes, por ejemplo, un tinte indicador terminal 5' y el tinte o resto desactivador terminal 3'.
10 En algunas realizaciones, las sondas 5'-nucleasa están marcadas en una o más posiciones aparte de, o además de, las posiciones terminales. Cuando la sonda está intacta, generalmente se da transferencia de energía entre los dos fluoróforos de modo que la emisión fluorescente del tinte indicador se apaga al menos en parte. Durante una etapa de elongación de una reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo, una sonda 5'-nucleasa unida a un ácido nucleico plantilla se escinde por la actividad 5' a 3'-nucleasa de, por ejemplo, una Taq polimerasa u otra polimerasa que tiene esta actividad de modo que la emisión fluorescente del tinte indicador no se apaga más. Las sondas 5'-nucleasa como ejemplo también están descritas en, por ejemplo, la Patente U.S. Nº 5.210.015, titulada "Homogeneous assay system using the nuclease activity of a nucleic acid polymerase," expedida el 11 de mayo de 1993 a Gelfand y col., la Patente U.S. Nº. 5.994.056, titulada "Homogeneous methods for nucleic acid amplification and detection," expedida el 30 de noviembre de 1999 a Higuchi, y la Patente U.S. Nº. 6.171.785, titulada "Methods and devices for homogeneous nucleic acid amplification and detector," expedida el 9 de enero de 2001 a Higuchi. En otras realizaciones, una sonda 5'-nucleasa puede estar marcada con dos o más tintes indicadores diferentes y un tinte o resto desactivador de terminal 3'.

Una "sonda de hibridación" en el presente documento se refiere a una sonda marcada usada en la determinación de Tm. En ciertas realizaciones, la sonda 5'-nucleasa y la sonda de hibridación son la misma. En otras realizaciones, la sonda 5'-nucleasa y la sonda de hibridación son sondas separadas y cada una opcionalmente puede comprender diferentes marcadores y/o activadores y cada una opcionalmente puede hibridar con áreas diferentes del ácido nucleico diana. Las sondas de hibridación en el presente documento opcionalmente son sondas marcadas duales o apagadas, en las que los desactivadores pueden o no ser fluorescentes. En las sondas, la transferencia de energía se da entre el resto indicador y el desactivador. Tales sondas pueden incluir, por ejemplo, desactivadores oscuros o similares. En algunos aspectos, la sonda de hibridación se usa como una sonda de genotipificación, donde la sonda se usa para asignar una diana de hibridación a un genotipo particular, por ejemplo, un genotipo vírico.

Un "marcador" se refiere a un resto acoplado (covalentemente o no covalentemente), o capaz de estar acoplado, a una molécula, dicho resto proporciona o es capaz de proporcionar información sobre la molécula (por ejemplo, información descriptiva o de identificación sobre la molécula) u otra molécula con la que la molécula marcada interactúa (por ejemplo, hibrida). Marcadores como ejemplos incluyen marcadores fluorescentes (incluyendo, por ejemplo, desactivadores o absorbentes), marcadores no fluorescentes, marcadores colorimétricos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, marcadores radioactivos, grupos modificadores de masa, anticuerpos, antígenos, biotina, haptenos, enzimas (incluyendo, por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa) y similares. Los marcadores pueden proporcionar señales detectables por fluorescencia, radioactividad, colorimetría, gravimetría, difracción o absorción de rayos X, magnetismo, actividad enzimática y similares. Los marcadores se pueden usar para proporcionar una señal detectable (y opcionalmente cuantificable), y que se puede acoplar a un ácido nucleico o proteína.

En ciertas realizaciones de la invención, un marcador es un tinte fluorescente o fluoróforo. Generalmente, un fluoróforo particular puede emitir luz de una longitud de onda particular seguido de absorción de luz de longitud de onda más corta. La longitud de onda de la luz emitida por un fluoróforo particular es característica de ese fluoróforo. Por tanto, un fluoróforo particular se puede detectar por luz de detección de una apropiada longitud de onda seguido de excitación del fluoróforo con luz de longitud de onda más corta. Los marcadores fluorescentes pueden incluir tintes que están negativamente cargados, tales como tintes de la familia de la fluoresceína, o tintes que son neutros en carga, tales como tintes de la familia de la carboxirodamina, o tintes que están cargados positivamente, tales como tintes de la familia de la cianina o la familia de la rodamina. Otras familias de tintes que se pueden usar en la invención incluyen, por ejemplo, tintes de la familia de la polihalofluoresceína, tintes de la familia de la hexaclorofluoresceína, tintes de la familia de la cumarina, tintes de la familia de la oxazina, tintes de la familia de la tiazina, tintes de la familia de la escuaraina, tintes de la familia de la lantánida quelada, tintes Alexa Fluor®, y tintes de la familia de Bodipy®. Tintes de la familia de la fluoresceína incluyen, por ejemplo, FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Tintes de la familia de la carboxirodamina incluyen Rojo Texas, ROX, R110, R6G y TAMRA. FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G y TAMRA están comercializados por Perkin-Elmer (Foster City, CA), mientras que el Rojo Texas está comercializado por Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Tintes de la familia de la cianina

incluyen Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7 y están comercializados por Amersham GE Healthcare (Piscataway, NJ).

El término “desactivador” tal como se usa en el presente documento se refiere a un resto químico que absorbe energía emitida a partir un tinte fluorescente, o de lo contrario que interfiere con la capacidad del tinte fluorescente para emitir luz. En una realización, el desactivador y el tinte fluorescente están ambos unidos a un polinucleótido común. Un desactivador puede volver a emitir la energía absorbida de un tinte fluorescente en una señal característica para ese desactivador y, por tanto, un desactivador también puede ser un “marcador”. Este fenómeno generalmente se conoce como transferencia de energía por resonancia fluorescente o FRET. Alternativamente, un desactivador puede disipar la energía absorbida de un tinte fluorescente como calor (es decir, un desactivador no fluorescente). Las moléculas frecuentemente usadas en FRET incluyen, por ejemplo, fluoresceína, FAM, JOE, rodamina, R6G, TAMRA, ROX, DABCYL y EDANS. Si un tinte fluorescente es un marcador o un desactivador está definido por sus espectros de excitación y emisión, y el tinte fluorescente con el que se empareja. Por ejemplo, FAM es el más eficientemente excitado por luz con una longitud de onda de 494 nm, y emite luz con un espectro de 500 a 650 nm, y un máximo de emisión de 525 nm. FAM es un marcador donante adecuado para su uso con, por ejemplo, TAMRA como desactivador que tiene su máximo de excitación a 544 nm. Desactivadores no fluorescentes como ejemplos que disipan energía absorbida de un tinte fluorescente incluyen los *Black Hole Quenchers*[™] comercializados por Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA), *Eclipse Dark Quenchers* de Epoch Biosciences (Bothell, WA) y *Iowa Black* (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA).

Tal como se define en el presente documento, “actividad 5’ a 3’-nucleasa” se refiere a esa actividad de una polimerasa de ácido nucleico específica a plantilla que incluye o bien una actividad 5’ a 3’-exonucleasa (tradicionalmente asociada con algunas ADN polimerasas por la cual se separan los nucleótidos del extremo 5’ de un oligonucleótido de una manera secuencial, por ejemplo, la ADN polimerasa I de *E. coli* tiene esta actividad mientras que el fragmento *Klenow* no), o una actividad 5’ a 3’-endonucleasa (en la que la escisión se da en más de un enlace fosfodiéster (nucleótido) a partir del extremo 5’), o ambas. Aunque sin intención de estar ligado a ninguna teoría particular de funcionamiento, el sustrato preferido para la escisión dependiente de la actividad 5’-3’-endonucleasa sobre un complejo de hibridación sonda-plantilla es un ácido nucleico de cadena sencilla desplazada, una estructura tipo tenedor. La hidrólisis generalmente se da en el enlace de fosfodiéster que se une a la región desplazada con la porción emparejada por base de la cadena, como se discute en Holland y col., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7.276-80.

Tal como se usa en el presente documento, el término polimerasa de ácido nucleico “termoestable” y/o “termoactiva” se refiere a una enzima que es relativamente estable y/o activa cuando se calienta en comparación, por ejemplo, con polimerasas de nucleótido de *E. coli*, que cataliza la polimerización de nucleósido trifosfatos. Generalmente, la enzima iniciará la síntesis en el extremo 3’ del cebador anillado a una secuencia diana, y continuará la síntesis de una nueva cadena hacia el extremo 5’ de la plantilla, y si posee una actividad 5’ a 3’-nucleasa, hidrolizará cualquier sonda anillada que intervenga, por tanto, liberando opcionalmente tanto los fragmentos sonda marcados como no marcados. Tal acción continuará hasta que la síntesis termine o los fragmentos sonda salgan de la secuencia diana. Una enzima termoestable representativa aislada de *Thermus aquaticus* (Taq) está descrita en la Patente U.S. N° 4.889.818 y un método para usarla en PCR convencional está descrito en Saiki y col., 1988, *Science* 239:487-91. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con otras enzimas similares. La Taq ADN polimerasa tiene una actividad 5’-3’ exonucleasa de sustitución de cadena, dependiente de síntesis de ADN. Véase Gelfand, ““Taq DNA Polymerase” in PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification”, Erlich, Ed., Stockton Press, N.Y. (1989), Capítulo 2. En solución generalmente hay poca, si hay alguna, degradación de sondas por tales polimerasas.

Una “reacción de 5’-nucleasa” o “ensayo de 5’-nucleasa” de ácidos nucleicos diana o plantilla, cebador y sonda (por ejemplo, sondas 5’-nucleasa, etc.) se refiere a la degradación de una sonda hibridada con el ácido nucleico plantilla cuando el cebador se alarga por biocatalizador que incorpora nucleótido que tiene actividad 5’ a 3’-nucleasa. Las PCR con 5’-nucleasa, también referidas como reacciones de TaqMan, son un tipo de PCR o RT-PCR que utilizan una sonda de oligonucleótido marcada que se une a una diana de ácido nucleico de cadena sencilla. En la PCR con 5’-nucleasa, las sondas con complementarias (al menos en parte) a una o más regiones de la diana o dianas. Las sondas opcionalmente se pueden marcar con cualquiera de un número de restos, pero están generalmente marcadas con un marcador fluorescente y un desactivador. La disposición de los restos dentro de la sonda también se puede variar en realizaciones diferentes. Debido a que el resto fluorescente está en proximidad cercana al desactivador en la sonda de oligonucleótido, su fluorescencia está inhibida.

Además de la sonda unida sobre el ácido nucleico diana, los ensayos de 5’-nucleasa generalmente comprenden los cebadores de amplificación para permitir la amplificación de la región del ácido nucleico diana que comprende la sonda unida. La enzima (generalmente una ADN polimerasa o similares) que tiene una actividad 5’-exonucleasa, escinde la sonda marcada cuando se alarga el polímero complementario creciente sobre el ácido nucleico diana. Una vez que se escinde la sonda, el marcador sobre la sonda no es más largo en proximidad cercana a su desactivador y, por tanto, se puede observar un cambio discernible y cuantificable en la fluorescencia. Las observaciones se pueden hacer en tiempo real mientras procede la amplificación.

De nuevo, por su puesto, son posibles muchas variaciones opcionales dentro del esquema básico de la 5'-nucleasa. Por ejemplo, se pueden usar diversas permutaciones y aplicaciones de los ensayos 5'-nucleasa para, por ejemplo, determinar el número de copia, genotipo, composición alélica, etc. Ejemplos adicionales de tales variaciones se pueden encontrar en, por ejemplo, la Patente U.S. Nº 5.210.015 titulada "Homogeneous Assay System Using the Nuclease Activity of a Nucleic Acid Polymerase" a Gelfand, y col. expedida el 11 de mayo de 1993; la Patente U.S. Nº 5.487.972 titulada "Nucleic Acid Detection by the 5'-3' Exonuclease Activity of Polymerases Acting on Adjacently Hybridized Oligonucleotides", a Gelfand y col., expedida el 30 de enero, 1996; la Patente U.S. Nº 5.804.375 titulada "Reaction Mixtures for Detection of Target Nucleic Acids," a Gelfand y col. expedida el 8 de septiembre de 1998; y la Patente U.S. Nº 6.214-979 titulada "Homogeneous Assay System," a Gelfand y col., expedida el 10 de abril de 2001.

Una medida de los datos del ensayo 5'-nucleasa (por ejemplo, TaqMan®) generalmente se expresa como el ciclo umbral (C_t). Los niveles de fluorescencia se registran durante cada ciclo de PCR y son proporcionales a la cantidad de producto amplificado para ese punto en la reacción de amplificación. El ciclo de PCR cuando la señal de fluorescencia se registra primero como estadísticamente significativa, o donde la señal de fluorescencia está por encima de otro nivel arbitrario (por ejemplo, nivel de fluorescencia arbitrario, o AFL), es el ciclo umbral (C_t).

En la práctica, un valor C_t es el punto de cruce entre la curva cinética y un umbral arbitrario de fluorescencia. El valor C_t es inversamente proporcional al logaritmo del número inicial de las copias de plantilla. Los valores C_t son inversamente proporcionales al logaritmo de la concentración de plantilla de ácido nucleico inicial y, por tanto, se puede usar para calcular el número de copia de diana.

Un "ácido nucleico diana" se refiere a un ácido nucleico que se amplifica y/o identifica por la presente invención (por ejemplo, un amplicón). Generalmente, un ácido nucleico diana, o "diana", es uno al que se une una sonda y/o cebador(es) (por ejemplo, una diana opcionalmente comprende una o más secuencias de complementariedad completa a un cebador y/o sonda o comprende una secuencia(s) con suficiente complementariedad a uno o más cebadores y/o sondas para que tal cebador y/o sonda se una a la diana bajo condiciones de ambiente o reacción apropiadas). Generalmente, la identidad, genotipo, secuencia, etc., de la diana es para ser identificados por los métodos de la presente invención. Un "cebador diana" y una "sonda diana" se refiere a un cebador y sonda, respectivamente, que pueden hibridar con el ácido nucleico diana.

Un "polimorfismo" se refiere a un sitio o sitios de un ácido nucleico que puede comprender uno de una pluralidad de genotipos. El polimorfismo puede ser cualquier polimorfismo conocido por los expertos en la técnica incluyendo posibles mutaciones, inserciones o deleciones. El polimorfismo puede estar en un sitio dentro del ácido nucleico o en múltiples sitios dentro del ácido nucleico, y puede abarcar una nucleobase, tal como un SNP, o más de una nucleobase. Para los fines de la presente invención un "polimorfismo" puede referirse a un polimorfismo que está en un sitio de un ácido nucleico o a un sitio particular de un polimorfismo de sitio múltiple. En ciertas realizaciones, el polimorfismo no necesita ser bien conocido o ni siquiera conocido por los expertos en la técnica. El polimorfismo puede ser simplemente cualquier diferencia en la secuencia de ácidos nucleicos entre un ácido nucleico conocido (por ejemplo, un control) y un ácido nucleico diana.

Para determinar "porcentaje de complementariedad" o "porcentaje de identidad" de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en la secuencia de una primera secuencia de ácidos nucleicos para el alineamiento óptimo con una segunda secuencia de ácido nucleico). A continuación, se comparan los nucleótidos en las correspondientes posiciones de nucleótido. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por un nucleótido complementario a la correspondiente posición en la segunda secuencia, entonces las moléculas son complementarias en esa posición. Así mismo, cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo nucleótido que la correspondiente posición en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de complementariedad (o porcentaje de identidad) entre las dos secuencias es una función del número de posiciones complementarias (o posiciones idénticas) compartidas por las secuencias dividida por el número total de posiciones comparadas (es decir, porcentaje de complementariedad = número de posiciones superpuestas complementarias/total de número de posiciones del nucleótido más corto x 100; y porcentaje de identidad = número de posiciones superpuestas idénticas/número total de posiciones del nucleótido más corto x 100).

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias también se puede conseguir usando un algoritmo matemático. Una muestra preferida de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2.264-2.268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5.873-5.877. Tal algoritmo se incorpora en el programa NBLAST de Altschul y col., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403.

Tal como se usa en el presente documento, el término "Tm" se usa en referencia a la "temperatura de fusión". La temperatura de fusión es la temperatura a la cual la mitad de una población de los polinucleótidos de doble cadena u oligómeros de nucleobase (por ejemplo, complejos de hibridación), en homodúplex o heterodúplex (es decir, dúplex que son completamente o parcialmente complementarios), llega a estar disociada en cadenas sencillas (bajo fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos). La predicción de una Tm de un polinucleótido dúplex tiene en cuenta la secuencia base, así como otros factores incluyendo las características estructurales y de secuencia y la

naturaleza de los enlaces oligoméricos. Los métodos para predecir y determinar experimentalmente la T_m son bien conocidos en la técnica.

Por ejemplo, una T_m tradicionalmente se determina por una curva de fusión, en la que una molécula de ácido nucleico dúplex se calienta en un programa de temperatura controlada, y se hace un seguimiento del estado de asociación/disociación de las dos cadenas sencillas en el dúplex y se traza hasta llegar a una temperatura en la que las dos cadenas están completamente disociadas. La T_m se lee a partir de esta curva de fusión. Alternativamente, una T_m se puede determinar por una curva de hibridación, en la que una molécula de ácido nucleico dúplex se calienta a una temperatura en la que las dos cadenas se disocian completamente. A continuación, se baja la temperatura en un programa de temperatura controlada, y se hace un seguimiento del estado de asociación/disociación de las dos cadenas sencillas en el dúplex y se traza hasta alcanzar una temperatura en la que las dos cadenas están completamente anilladas. La T_m se lee a partir de la curva de hibridación.

Los términos “estricto” o “condiciones estrictas”, como se usa en el presente documento, indican las condiciones de hibridación de baja fuerza iónica y alta temperatura, como es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., 2001, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; “Current Protocols in Molecular Biology” (Ausubel y col., ed., J. Wiley & Sons Inc., Nueva York, 1988); Tijssen, 1993, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays in Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: Hybridization with nucleic acid probes” (Elsevier). Generalmente, las condiciones estrictas se seleccionan para ser aproximadamente 5 a 30 °C inferiores que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia especificada a una fuerza iónica y pH definidos. Alternativamente, las condiciones estrictas se seleccionan para ser aproximadamente 5 a 15 °C inferiores que la T_m para la secuencia especificada a una fuerza iónica y pH definidos. Por ejemplo, las condiciones de hibridación estrictas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que la concentración de ion de sodio (u otras sales) aproximadamente 1,0 M, generalmente ion de sodio aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1 M a aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente 25 °C para sondas cortas (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente 55 °C para sondas largas (por ejemplo, mayor que 50 nucleótidos). Las condiciones estrictas también se pueden modificar con la adición de agentes desestabilizadores de hibridación tales como formamida. Una condición no estricta o de baja astringencia como ejemplo para una sonda larga (por ejemplo, mayor que 50 nucleótidos) comprendería un tampón de Tris 20 mM, pH 8,5, KCl 50 mM y $MgCl_2$ 2 mM, y una temperatura de reacción de 25 °C.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “tipo virus de la hepatitis C” se refiere a la categorización de un virus de la hepatitis C (VHC) basado en su organización genómica. La categorización de un aislado de VHC en una categoría de tipo particular refleja su parentesco genómico a otros aislados de VHC y su parentesco relativamente menor con otros aislados de VHC. Tal como se usa en el presente documento, la nomenclatura de tipificación de VHC es coherente con la nomenclatura ampliamente adoptada propuesta por Simmonds y col., (1994) *Letter, Hepatology* 19:1.321-1.324. Véase, también, Zein (2000) “Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes”, *Clinical Microbiol. Reviews* 13(2):223-235; Maertens y Stuyver (1997) “Genotypes and Genetic Variation of Hepatitis C Virus,” p. 182-233, en Harrison, y Zuckerman (eds.), “The Molecular Medicine of Viral Hepatitis”, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, Inglaterra). El sistema de Simmonds y col (1994) coloca los aislados de VHC conocidos en uno de los once (11) genotipos de VHC, concretamente genotipos 1 a 11. Cada genotipo se subdivide más en agrupamientos denominados subtipos que reflejan el parentesco entre las cepas del mismo genotipo. Un subtipo de VHC está escrito por una letra romana minúscula después del genotipo, por ejemplo, subtipo 1a, subtipo 1c, subtipo 6a, etc. Las variantes genéticas encontradas dentro de un aislado individual se denominan cuasiespecies. Aproximadamente 78 subtipos de VHC que abarcan todos los 11 genotipos son mundialmente conocidos; el número de subtipos no es estático; ya que se estudian y se secuencian más aislados de VHC, es probable que se puedan reconocer subtipos adicionales (y posiblemente genotipos).

Tal como se usa en el presente documento, el término “tipo virus de VHC” se puede referir o bien a genotipos de VHC o subtipos de VHC. Tal como se usa en el presente documento, el término “tipificación de VHC” significa asignar el VHC experimental (por ejemplo, tipo desconocido) a un genotipo conocido (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 o un subconjunto de los mismos) o asignar el HVC experimental a un subtipo conocido (por ejemplo, 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, etc., o un subconjunto del mismo).

Algunos informes (véase, por ejemplo, Robertson y col., (1998) *Arch. Virol.* 143(12):2.493-2.503) sugieren que la organización genómica vírica está mejor representada por la creación de clados víricos, que refleja la observación de que algunos genotipos de VHC están más estrechamente relacionados uno a otro que con otros genotipos de VHC. En este sistema, los clados 1, 2, 4 y 5 corresponden a los genotipos 1, 2, 4 y 5, mientras que el clado 3 comprende los genotipos 3 y 10, y el clado 6 comprende los genotipos 6, 7, 8, 9 y 11. La descripción de la presente invención no usa la nomenclatura de clado.

Tal como se usa en el presente documento, el término “kit” se usa en referencia a una combinación de artículos que facilitan un proceso, método, ensayo, análisis o manipulación de una muestra. Los kits pueden contener instrucciones escritas que describen cómo usar el kit (por ejemplo, instrucciones que describen los métodos para la genotipificación de VHC), los reactivos químicos o enzimas requeridas para el método, cebadores y sondas, así

como algún otro componente. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona kits para la tipificación de VHC empleando RT-PCR. Estos kits pueden incluir, por ejemplo, reactivos para la recogida de muestra (por ejemplo, la recogida de una muestra sanguínea), reactivos para la recogida y purificación de ARN de sangre, una transcriptasa inversa, cebadores adecuados para la transcripción inversa y la síntesis de ADNc de primera cadena y segunda cadena para producir un amplicón de VHC, una ADN polimerasa dependiente de ADN termoestable y desoxirribonucleótido trifosfatos libres. En algunas realizaciones, la enzima que comprende actividad de transcriptasa inversa y actividad de ADN polimerasa dependiente de ADN termoestable son la misma enzima, por ejemplo, polimerasa Z05 de *Thermus sp.* o polimerasa de *Thermus thermophilus*.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de la biología molecular, técnicas de microbiología y de ADN recombinante, que están dentro de la especialidad de la técnica. Tales técnicas están completamente explicadas en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Tercera Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York; "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Nucleic Acid Hybridization" (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds., 1984); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (B. Perbal, 1984); y una serie, "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.), etc. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con miles de referencias similares.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 proporciona un diagrama que ilustra la colocación de los cebadores y la sonda sobre las cadenas de ácido nucleico durante la PCR asimétrica.

La Figura 2 proporciona un gel de agarosa teñido que compara la amplificación de ácido nucleico en PCR asimétrica frente a PCR simétrica, usando diferentes proporciones de cebador con 2×10^5 copias de ADN de citomegalovirus (CMV) como ácido nucleico diana.

La Figura 3 proporciona curvas de crecimiento generadas durante una kPCR asimétrica.

La Figura 4 proporciona la primera derivada de las curvas de fusión usando diferentes relaciones de cebador en una kPCR asimétrica.

La Figura 5 proporciona un alineamiento de una región variable a partir de seis genotipos de VHC diferentes y una correspondiente sonda de hibridación como ejemplo.

La Figura 6 proporciona datos de la curva de crecimiento generados en kPCR asimétricas de seis genotipos diferentes de VHC, usando una sonda marcada con HEX dirigida a una región conservada del genoma de VHC.

La Figura 7 proporciona datos de la curva de crecimiento en kPCR asimétricas de seis genotipos diferentes de VHC, usando una sonda marcada con FAM dirigida a una región variable del genoma de VHC.

La Figura 8 proporciona la segunda gráfica de derivada de las curvas de hibridación generadas en kPCR asimétricas de seis genotipos diferentes de VHC usando una sonda dirigida a una región variable del genoma de VHC.

Descripción detallada

La presente invención comprende métodos, composiciones, kits, sistemas y mezclas de reacción útiles para la detección, clasificación y cuantificación de secuencias particulares de ácidos nucleicos dentro de las muestras (por ejemplo, dentro de muestras clínicas tales como sangre o esputo o dentro de muestras de ADN o ARN aisladas, etc.). La presente invención se puede usar para, por ejemplo, clasificar, identificar, cuantificar y/o genotipificar ácidos nucleicos a partir de diversas cepas de bacterias, virus, hongos, etc., especialmente aquellas implicadas en infecciones y enfermedades (por ejemplo, de humanos, ganado, plantas, etc.).

Los métodos de la invención utilizan amplificación por reacción en cadena de la polimerasa, en tiempo real, o cinética, de las secuencias de ácidos nucleicos diana realizada de una manera asimétrica en presencia de una sonda de oligonucleótido marcada (una sonda 5'-nucleasa). Los resultados de la PCR cinética asimétrica en una mezcla de productos de amplificación de cadena sencilla y cadena doble que tiene un exceso de una cadena sobre la otra. Cuando se completa la PCR cinética, se crean las curvas de fusión/hibridación usando una o más sondas de hibridación. Estas curvas de fusión/hibridación se usan para generar una T_m para la sonda de hibridación, la cual se puede usar para identificar el ácido nucleico diana en la muestra. En algunas realizaciones, la sonda de hibridación está presente en la PCR cinética; en otras realizaciones, la sonda de hibridación se añade después de la finalización de la reacción de amplificación. En ciertas realizaciones las sondas 5'-nucleasa y las sondas de hibridación (por ejemplo, sondas que se usan en la construcción de las curvas térmicas), comprenden diferentes sondas (por ejemplo, diferentes en secuencia y/o en sitio de unión, etc.) mientras que en ciertas otras realizaciones, las sondas 5'-nucleasa también pueden actuar como sondas de hibridación.

Como resultado de las realizaciones en las que la PCR cinética asimétrica comprende una cantidad de la sonda 5'-nucleasa mayor que la cantidad del cebador de PCR limitante, una porción de una sonda 5'-nucleasa que hibrida con la cadena en exceso se queda sin escindir en el final de la reacción de amplificación. A continuación, esta sonda "resto" se puede usar para crear las curvas de hibridación o fusión para determinar las T_m , las cuales pueden ayudar en la determinación de la identidad del ácido nucleico diana que se amplificó.

Incorporar una etapa de fusión o hibridación en una PCR cinética asimétrica requiere diversas consideraciones. Primero, en una PCR cinética convencional la sonda diana generalmente es un amplicón de doble cadena (en lugar de solo un complemento de cadena sencilla), por tanto, hay efectos competitivos significativos que surgen de la hibridación de cadena, especialmente cuando la concentración de amplicón sube en ciclos de PCR tardíos. Segundo, puesto que en cualquier PCR cinética la sonda se degrada por la actividad 5' a 3'-nucleasa de la ADN polimerasa, se debe asegurar un suministro de tal sonda al final de la PCR para generar la curva de fusión/hibridación. Ambos de estos retos se pueden encontrar en la invención al realizar la PCR cinética asimétrica. En la PCR cinética asimétrica la concentración del cebador usado para generar la cadena a la cual se une la sonda 5'-nucleasa (por ejemplo, la sonda usada en la reacción 5'-nucleasa) está en exceso por encima de la concentración del otro cebador. Por tanto, esto produce una cantidad mayor de una cadena del amplicón (o ácido nucleico diana amplificado) que la otra cadena. Esto, de uno en uno, permite que la sonda 5'-nucleasa se una a su diana (sobre la cadena que está en exceso) sin que la otra cadena de amplicón compita con ella. El segundo, o limitante, cebador también limita la cantidad de la sonda escindida durante la PCR, asegurando así que quede sonda para realizar la etapa de fusión post-PCR (en realizaciones en las que la sonda de hibridación adicional no se añade post-PCR y/o en las que se usa una sonda de hibridación diferente). Véase la Figura 1. Es sorprendente cómo se pierde la señal de la curva de crecimiento pequeña (es decir, escindida) durante la PCR bajo condiciones asimétricas. Por solamente una modesta caída en la señal de la curva de crecimiento, se puede dejar suficiente sonda para dar datos de fusión adicional.

Las sondas 5'-nucleasa generalmente se han usado para generar señal fluorescente durante la PCR en tiempo real o cinética en la forma de una curva de crecimiento. A partir de tales curvas de crecimiento se calcula y se usa un valor de C_t (ciclo umbral), en o bien un algoritmo cuantitativo o cualitativo, para dar un resultado deseado tal como un número de copia, genotipo, o identidad de diana. Durante este proceso, la sonda 5'-nucleasa se escinde por una enzima con actividad 5'-nucleasa, generando así una diversidad de fragmentos de ADN, algunos de los cuales se marcarán con el indicador fluorescente. Una vez que se generan estos fragmentos no pueden participar más en generación adicional de señal. Sin embargo, usando PCR cinética asimétrica, se puede dejar sonda 5'-nucleasa intacta de longitud completa después de que se complete la PCR, por ejemplo, cuando se realiza la PCR asimétrica, y/o cuando se añade un exceso de sonda por encima del cebador limitante. De nuevo, al disponer para que se quede suficiente sonda después de que se genere la curva de crecimiento, se puede proporcionar información adicional sobre la diana que se ha amplificado realizando una etapa de fusión o una etapa de hibridación. Una T_m particular podría indicar que la sonda y la diana combinan perfectamente y, por lo tanto, el ácido nucleico diana pertenece a un cierto grupo de virus o es un cierto virus, tipo de virus o subtipo de virus, etc. Alternativamente, la T_m podría ser menor que la que resultaría de una sonda y diana perfectamente combinadas. El grado de descenso en la T_m puede indicar (o puede permitir que se calcule) que los mal emparejamientos están presentes, y por tanto, que la secuencia diana pertenece a un grupo de virus diferente.

Por lo tanto, las T_m generadas a partir de la presente invención pueden proporcionar información adicional a la obtenida a partir de los datos de la curva de crecimiento. Por ejemplo, la identidad vírica en una muestra positiva en un ensayo de cribado de sangre; identidad bacteriana o fúngica en un ensayo microbiológico; o genotipificación, por ejemplo, en una muestra VHC positiva todo se puede realizar con diversas realizaciones de la presente invención. En ciertas realizaciones, las etapas de la invención se alcanzan en un ensayo homogéneo en tubo sencillo, sin eliminación de la tapa. Esto mayormente se añade al valor de tanto los ensayos existentes como futuros que requieren solamente cambios menores en concentraciones de cebador y sonda y que usan plataformas de reacción de 5'-nucleasa comercialmente disponibles existentes.

Durante el transcurso de los ensayos 5'-nucleasa típicos, la sonda se escinde por una enzima que tiene actividad 5'-nucleasa (frecuentemente una ADN polimerasa tal como polimerasa *Taq*, etc.). La escisión de la sonda crea una señal fluorescente durante la PCR en tiempo real o cinética. Tales señales se usan para crear una curva de crecimiento (o curva de amplificación) que se puede usar para calcular un C_t y para determinar, por ejemplo, la presencia o ausencia, número de copia, genotipo, identidad de diana, etc. del ácido nucleico a partir de un algoritmo cuantitativo o cualitativo. Después de que se escinda la sonda, generalmente no puede participar más en la generación de señal adicional. La presente invención proporciona un ensayo 5'-nucleasa en el que se deja una cierta cantidad de sonda después de que se realice el ensayo 5'-nucleasa, de modo que la sonda restante se puede usar para generar curvas de fusión térmica (o hibridación térmica) debido al cambio en la fluorescencia cuando la sonda marcada hibrida o se fusiona a partir del ácido nucleico diana. La información sobre el ácido nucleico diana (por ejemplo, secuencia, y, por tanto, genotipo, identidad, etc.) se puede determinar a partir de las T_m generadas, distintas y a parte de la información generada por la curva de crecimiento. Para asegurarse que queda suficiente sonda, se realiza PCR asimétrica con un exceso de un cebador en comparación con el otro.

PCR asimétrica

La presente invención utiliza PCR asimétrica para asegurarse que se queda suficiente sonda después de la amplificación por PCR cinética y que el ADN de cadena sencilla está presente para que la sonda se una (o bien sonda 5'-nucleasa o una sonda de hibridación no-5'-nucleasa). La Figura 1 ilustra esquemáticamente la PCR asimétrica como se utiliza en el presente documento. Tal como se puede ver en la Figura 1, la sonda se une a la cadena de ácido nucleico diana en exceso, es decir, la cadena que se genera por el cebador en exceso. La PCR se da después de que los cebadores se unan, y se sintetiza la diana de doble cadena hasta que se agote el cebador limitante. Después de que se agote el cebador limitante, la amplificación lineal continúa para generar la cadena sencilla en exceso. Tal cadena en exceso (es decir, la cadena que está en exceso en relación con la otra) es la cadena a la cual se une la sonda. La cadena que tiene la sonda unida, es decir, la cadena en exceso, es la implicada en la generación de señal a partir de la liberación 5'-nucleasa del marcador durante la amplificación de la PCR cinética y es la implicada en la generación de señal que implica la hibridación en las etapas de fusión/hibridación post-PCR.

Un factor en el uso de la PCR asimétrica afecta a los efectos de la baja concentración del cebador limitante sobre la generación del ácido nucleico diana y sobre la generación de la señal durante la PCR. Para asegurar que la PCR asimétrica no influye excesivamente en la presente invención, se evaluaron diferentes relaciones de cebador desde 1:1 a 5:1 en un ensayo 5'-nucleasa de CMV. La Figura 2 muestra una fotografía de un gel teñido que muestra que la cantidad total del ácido nucleico diana producido se reducía cuando la PCR iba desde PCR asimétrica (en la presente con 30 pmol de cada cebador) a PCR simétrica (en la presente 50 pmol de un cebador y 10 pmol del otro cebador). Sin embargo, las curvas de crecimiento producidas a partir de la PCR asimétrica, mostradas en la Figura 3, mostraron efecto muy mínimo sobre la generación de la señal fluorescente a partir de las cantidades variantes del cebador. Este resultado demuestra que la escisión de la sonda en la PCR asimétrica es suficiente para generar una curva de crecimiento útil. En ciertas realizaciones, opcionalmente se usan diferentes relaciones de cebador. Por ejemplo, algunas realizaciones pueden tener relaciones de cebador que oscilan desde al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 6:1, al menos 7:1, al menos 8:1, al menos 9:1, al menos 10:1, al menos 15:1, al menos 20:1, al menos 50:1, al menos 100:1 o al menos 200:1 o más.

La Figura 4 muestra las curvas de fusión post-PCR, por ejemplo, como se haría para determinar la identidad o genotipo de una diana, etc. El efecto de las diferentes relaciones de cebador sobre la generación de señal se puede ver a partir de la figura. La PCR completamente simétrica (es decir, en la que los cebadores están presentes en cantidades iguales) no da en absoluto señal de fusión, lo más probable debido a que la mayoría de la sonda se ha escindido durante el proceso de amplificación o debido a la competición para volver a anillar la cadena del amplicón. PCR asimétrica por debajo de una relación de 2:1 tampoco da señal, probablemente por las mismas razones. Con relaciones de cebador desde 2:1 a 5:1, se observan cantidades diferentes de señal de fusión. La magnitud de la señal generada con los cebadores asimétricos es aproximadamente proporcional a la relación de cebador. Se apreciará que, en ciertas realizaciones, la cantidad de sonda añadida es mayor que la cantidad del cebador limitante en la PCR asimétrica. Además, se indicará que la T_m de la sonda también cambia dependiendo de la relación de cebador. Esto es lo más probable debido a las diferentes concentraciones de sonda dejadas después de la PCR puesto que T_m es dependiente de la concentración de oligonucleótido.

Se pueden ver diferentes concentraciones de sonda al correr las reacciones en electroforesis capilar fluorescente inducida por láser, que detectan fluorescencia de FAM. Cuando se aumenta la relación de cebador, se deja más sonda sin escindir de longitud completa después de que se complete la PCR.

Ácido nucleico diana

Tal como se explicó anteriormente, el(los) ácido(s) nucleico(s) diana en el presente documento puede(n) ser cualquier ácido nucleico de cualquier longitud para determinar su genotipo, identidad, secuencia o similares. En ciertas realizaciones, la identidad general del ácido nucleico diana es conocida, pero para el genotipo de uno o más polimorfismos. Por ejemplo, se puede saber que una muestra es de VHC, pero el tipo vírico exacto o subtipo es desconocido. En otras realizaciones más, incluso no se puede saber con seguridad la identidad general de la diana. Los métodos de la presente invención se pueden usar para identificar el genotipo de uno o más de los polimorfismos. Los polimorfismos o secuencias particulares a determinar pueden ser de cualquier tamaño y estar en cualquier localización en un ácido nucleico diana que está entre los sitios de unión a cebador. Generalmente, los polimorfismos no están en los extremos del ácido nucleico diana, pero incluso aquellos en los extremos se pueden genotipificar o determinar con los métodos de la presente invención.

El ácido nucleico diana se puede obtener a partir de cualquier fuente conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden obtener a partir de una muestra biológica, por ejemplo, las anteriormente descritas u otras. Puede ser un ácido nucleico de cualquier fuente natural, por ejemplo, incluyendo un ser humano o un patógeno de humano o cualquier otra fuente natural. También, en ciertas realizaciones el ácido nucleico diana se puede producir por técnicas sintéticas, semisintéticas o recombinantes.

En ciertas realizaciones de la invención, el ácido nucleico diana se puede amplificar por un número de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos están descritos, por ejemplo, en Saiki y col., 1988, *Science* 239:487-91. En ciertas realizaciones, las técnicas de amplificación ventajosamente se pueden emplear para introducir o alterar secuencias de nucleótidos en un ácido nucleico diana. Por ejemplo, si un polimorfismo a identificar o genotipificar está en o cerca de un extremo del ácido nucleico diana, se pueden añadir secuencias de nucleótidos adicionales al extremo del ácido nucleico diana para facilitar los métodos de la presente invención.

Sondas de oligonucleótido

La presente invención implica la selección y el uso de sondas marcadas para hibridar con regiones específicas del ácido nucleico diana. La elección de tales sondas, por ejemplo, no solamente su secuencia específica, sino el área diana al cual se deberían dirigir, depende en gran parte de la diana específica a ensayar. Actualmente, numerosos programas informáticos y otros protocolos existen para ayudar en la elección y diseño de las sondas 5'-nucleasa u otras sondas de hibridación para diversas aplicaciones. Tales programas y protocolos opcionalmente se pueden utilizar con la presente invención para elegir y diseñar sondas para los ensayos de curva de fusión/PCR cinética asimétrica en el presente documento. Por supuesto, el diseño visual y la colocación de las sondas es también bastante aplicable a la presente invención. Los parámetros para el diseño de no solamente sondas 5'-nucleasa, sino diversas sondas de hibridación para construir curvas de fusión /hibridación térmico son extremadamente familiares para los expertos en la técnica. Los programas que utilizan diferentes conjuntos de algoritmos y parámetros y que son útiles para tal diseño incluyen, por ejemplo, Visual OMP (DNA Software, Inc., Ann. Arbor, MI), Oligo 6 (Stratagene, La Jolla, CA), Sequencher (Gene Codes, Ann. Arbor, MI), y DNASTar (DNASTar, Inc., Madison, WI).

En ciertas realizaciones de la invención, la sonda 5'-nucleasa y/o la sonda de hibridación está marcada con un marcador que facilita la determinación de la identidad, genotipo, o secuencia de una diana. La secuencia de nucleótidos sonda puede ser de cualquier longitud suficiente para hibridar de manera apropiada con regiones diana sobre el ácido nucleico diana y que se puede usar para genotipificar o identificar el ácido nucleico diana. La longitud de la sonda diana generalmente será elegida para dar suficiente estabilidad termodinámica para asegurar la hibridación de la sonda con su diana a la temperatura de la etapa de hibridación de la PCR, etc. Por ejemplo, sondas con bases de ADN no convencionales opcionalmente pueden ser más largas o más cortas que aquellas con bases de ADN convencionales. Como otro ejemplo, sondas con secuencias ricas en A/T serán más largas que aquellas con secuencias ricas en G/C, en las que las T_m son idénticas. El sitio del polimorfismo o región diana puede estar en cualquier localización dentro de la secuencia de nucleótidos sonda. En algunas realizaciones, el sitio de tales regiones no está en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos sonda.

No importa el diseño de secuencia individual de las sondas usadas en el presente documento, existen un número de diferentes enfoques. Por ejemplo, la misma sonda se puede usar para tanto la curva de crecimiento de 5'-nucleasa como para la curva de fusión/hibridación. Tal sonda opcionalmente está dirigida a una región de ácido nucleico diana que es común (al menos en alguna variación) a todas las posibles muestras a ensayar. Por ejemplo, en la genotipificación de un subtipo de virus (por ejemplo, como lo ilustrado en el Ejemplo en el presente documento) de entre un número de diferentes posibilidades, la consideración generalmente se tomará en la elección de áreas polimórficas del ácido nucleico diana que contienen motivos de secuencia únicos a cada subtipo. Por tanto, la sonda hibridará diferencialmente con tal región diana dependiendo del genotipo del ácido nucleico diana. De nuevo, tal grado variante de emparejamiento entre la sonda y la diana en una muestra y/o entre los diferentes genotipos en una muestra, influye las curvas de T_m generadas en el ensayo y así puede permitir la identificación de la(s) muestra(s) de ácido nucleico.

Por tanto, en un ejemplo hipotético, una muestra puede contener una mezcla de cualquier número de tipos de ácido nucleico no identificados. Por ejemplo, la muestra puede contener posiblemente cepas víricas relacionadas (por ejemplo, tipos/subtipos de VHC). Las sondas (5'-nucleasa y/o 5'-nucleasa y otras sondas de hibridación separadas) pueden estar diseñadas para una región polimórfica particular en el ácido nucleico de VHC. Los mal emparejamientos entre la(s) sonda(s) y las diversas regiones diana polimórficas conduciría a diferentes T_m (bajo condiciones similares) entre la(s) sonda(s) y los diferentes ácidos nucleicos diana. En base a las secuencias de las supuestas dianas, se podrían calcular las esperadas T_m (bajo condiciones definidas).

A continuación, las concretas curvas de T_m generadas se pueden comparar frente a curvas previstas o curvas patrón previamente generadas. Por ejemplo, si se esperaba que los virus 1 produjeran una T_m de X bajo condiciones definidas y la muestra 1 no produjera una T_m de X bajo esas condiciones, entonces los virus 1 se podrían descartar como posible componente de la mezcla de muestra. Correspondientemente, si la T_m producida a partir de lo desconocido en una muestra producía una T_m de Y, la secuencia del área diana de hibridación se podría calcular en base a la secuencia sonda conocida, las condiciones de ensayo, etc. Entonces, se podría hacer la determinación de lo desconocido en la muestra (por ejemplo, a través de comparación de secuencias calculadas frente a bases de datos de secuencia de virus conocidos, etc.).

En ciertas realizaciones en el presente documento, la invención puede comprender sonda(s) usada(s) para la parte de la curva de crecimiento de 5'-nucleasa del análisis que son diferentes de la(s) sonda(s) usada(s) para la parte de generación de curva de T_m del análisis. Tal disposición podría ser útil en situaciones en las que, por ejemplo, la

región de polimorfismo sobre el ácido nucleico diana es tan diversa que la construcción de una sonda 5'-nucleasa estable que funcionara dentro de las condiciones de amplificación no es factible. Por tanto, por ejemplo, una pluralidad de sondas completamente complementarias o básicamente complementarias o sondas parcialmente complementarias, cada una específica para al menos uno de los ácidos nucleicos diana, se podría usar para el análisis 5'-nucleasa (asegurando así la medición de la amplificación de todas las dianas deseadas) mientras que se podrían usar una secuencia de sonda más generalizada (por ejemplo, una que hibridara con un número de secuencias relacionadas) para la generación de curvas de T_m a partir de un número de diferentes secuencias diana. También, se apreciará que mientras que ciertas realizaciones de la invención contienen sondas nucleasa-5' (por ejemplo, en la construcción de la curva de crecimiento de PCR cinética), en aquellas realizaciones en las que se usan sondas diferentes para la curva de crecimiento y la curva de fusión, las sondas usadas en la construcción de la curva de fusión no necesitan ser sondas 5'-nucleasa (es decir, tales sondas no necesariamente se hidrolizan en ciertas realizaciones). Si las sondas son o no hidrolizadas, puede influir su diseño. Por ejemplo, algunas sondas 5'-nucleasa pueden ser aproximadamente 30 pb de longitud y contener un tinte interno a los extremos de la sonda. Sin embargo, en las sondas que no se hidrolizan la longitud puede ser más corta, el tinte puede estar localizado en un terminal, etc.

En ciertas realizaciones de la invención, la sonda 5'-nucleasa y/o la sonda de hibridación está marcada con un marcador que facilita la determinación de la identidad, genotipo o secuencia de un fragmento de oligonucleótido. La secuencia de nucleótidos de sonda puede ser de cualquier longitud suficiente para hibridar apropiadamente con regiones diana sobre el ácido nucleico diana y que se puede usar para genotipificar o identificar el ácido nucleico diana. La longitud de la sonda diana generalmente se elegirá para dar suficiente estabilidad termodinámica para asegurar la hibridación de la sonda con su diana a la temperatura de la etapa de hibridación de PCR, etc. Por ejemplo, las sondas con bases de ADN no convencionales opcionalmente pueden ser más largas o más cortas que aquellas con bases de ADN convencionales. Como otro ejemplo, sondas con secuencias ricas en A/T serán más largas que aquellas con secuencias ricas en G/C. Por ejemplo, puesto que la presente invención utiliza reacciones de 5'-nucleasa, que escindirán las sondas 5'-nucleasa, se pueden utilizar sondas más largas que en las reacciones de no 5'-nucleasa. Tales sondas más largas pueden permitir discriminación más fina entre las secuencias en el análisis de T_m y una mayor ventana de diagnóstico. El sitio del polimorfismo o la región diana puede estar en cualquier localización dentro de la secuencia de nucleótidos sonda. En algunas realizaciones, el sitio de tales regiones no está en el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos sonda.

Además, en realizaciones en las que se usan sondas diferentes para las curvas de 5'-nucleasa y T_m, las sondas opcionalmente se añaden al mismo tiempo, generalmente al inicio del análisis. Otras realizaciones en el presente documento opcionalmente pueden comprender la adición de múltiples sondas en diferentes momentos dentro del análisis. Por ejemplo, la(s) sonda(s) de la curva de 5'-nucleasa se pueden añadir antes de que se añadan la(s) sonda(s) de hibridación.

En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos sonda (sea 5'-nucleasa o de hibridación) es idéntica o complementaria a la región diana. Sin embargo, en muchas realizaciones, la secuencia de nucleótidos sonda puede tener menos del 100 % de identidad o complementariedad a la región de nucleótidos diana. En ciertas realizaciones de la invención, la secuencia de nucleótidos sonda puede tener 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 90 %, 85 % u 80 % o menos de complementariedad o identidad a la región de nucleótidos diana. En ciertas realizaciones de la invención, la secuencia de nucleótidos sonda hibrida con la región de nucleótidos diana bajo condiciones estrictas o altamente estrictas. En otras realizaciones de la invención, la secuencia de nucleótidos sonda hibrida con la región de nucleótidos diana bajo condiciones de baja astringencia.

En ciertas realizaciones de la invención, la sonda puede comprender uno o más marcadores, y opcionalmente uno o más desactivadores. En realizaciones convenientes, el marcador puede ser un marcador que facilita la determinación de la curva de crecimiento cinético y/o la curva de T_m.

La sonda se puede marcar incorporando restos detectables por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. El método de unión o conjugación del marcador con la sonda de oligonucleótidos depende, por supuesto, del tipo de marcador(es) y/o desactivador(es) usado(s) y la posición de dichos en la sonda. Generalmente, los marcadores proporcionan señales que son detectables por fluorescencia, pero algunas realizaciones también pueden comprender marcadores detectables mediante, por ejemplo, radioactividad, colorimetría, gravimetría, difracción por rayos X o absorción, magnetismo, actividad enzimática y similares. Véase lo anterior.

Los marcadores fluorescentes pueden incluir tintes que están cargados negativamente, tales como tintes de la familia de la fluoresceína, o tintes que son neutros en carga, tales como tintes de la familia de la rodamina, o tintes que están cargados positivamente, tales como tintes de la familia de la cianina. Tintes de la familia de la fluoresceína incluyen, por ejemplo, FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Tintes de la familia de la rodamina incluyen Rojo Texas, ROX, R110, R6G, y TAMRA. FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G, y TAMRA están comercializados por Perkin-Elmer (Foster City, CA) y el Rojo Texas está comercializado por Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR). Tintes de la familia de la cianina incluyen Cy2, Cy3, Cy5, and Cy7 y están comercializados por Amersham (Piscataway, NJ). Otras familias de tintes que se pueden usar en la invención incluyen, por ejemplo, tintes de la

familia de la polihalofluoreceína, tintes de la familia de la hexaclorofluoreceína, tintes de la familia de la cumarina, tintes de la familia de la oxazina, tintes de la familia de la tiacina, tintes de la familia de la escuaraina, tintes de la familia de la lantánida quelada, tintes ALEXA FLUOR® (Molecular Probes, Inc., Eugene OR), y tintes de la familia de BODIPY® (Molecular Probes, Inc.).

Además del (de los) marcador(es) fluorescente(s), otras realizaciones pueden comprender sondas que tienen uno o más restos de desactivador. Un desactivador se refiere a un resto químico que absorbe energía emitida a partir de un tinte fluorescente, o de lo contrario que interfiere con la capacidad del tinte fluorescente para emitir luz. Un desactivador puede volver a emitir la energía absorbida a partir de un tinte fluorescente en una característica de señal para ese desactivador, por tanto, un desactivador también puede ser un marcador. Alternativamente, un desactivador puede disipar la energía absorbida a partir de un tinte fluorescente como calor. Moléculas frecuentemente usadas en FRET incluyen, por ejemplo, fluoresceína, FAM, JOE, rodamina, R6G, TAMRA, ROX, DABCYL, y EDANS. Desactivadores no fluorescentes como ejemplos que disipan la energía absorbida a partir de un tinte fluorescente incluyen los *Black Hole Quenchers*™ comercializados por Biosearch Technologies, Inc. (Novato, Calif), *Eclipse Dark Quenchers* de Epoch Biosciences (Bothell, WA) y *Iowa Black* (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA).

Los marcadores y/o desactivadores pueden estar acoplados a la sonda de oligonucleótidos directa o indirectamente por una diversidad de técnicas. Dependiendo del tipo preciso de marcador usado, el marcador podría estar localizado en el extremo 5' o 3' de la sonda, o estar internamente localizado en la secuencia de nucleótidos. Los marcadores y/o desactivadores pueden estar acoplados directamente a un nucleótido, o pueden estar acoplados indirectamente por conectores o secciones separadoras de diversos tamaños y composiciones para facilitar interacciones de señal. Usando reactivos de fosforamidita comercialmente disponibles, se puede producir sondas de oligómero que contienen grupos funcionales (por ejemplo, tioles o aminas primarias) en ambos terminales por una fosforamidita apropiadamente protegida, y se pueden marcar usando protocolos descritos en, por ejemplo, "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", ed. por Innis y col., Academic Press, Inc. 1990. También es posible acoplar un resto detectable en el terminal 3' de la sonda empleando, por ejemplo, transferasa terminal de polinucleótido para añadir un resto deseado, tal como, por ejemplo, cordicepina ³⁵S-dATP, y dUTP biotinilado.

En la Patente U.S. N° 4.914.210 se describen métodos para introducir reactivos de funcionalización de oligonucleótidos para introducir uno o más restos de sulfhidrilo, amino o hidroxilo en la secuencia sonda de oligonucleótidos, generalmente en el terminal 5'. Un grupo fosfato radiactivo (por ejemplo, marcado con ³²P) se puede introducir en un terminal 5' de un oligonucleótido usando polinucleótido quinasa y [gamma-³²P]ATP. La biotina se puede añadir al extremo 5' haciendo reaccionar un residuo de aminotimidina o conector alquilamino, introducido durante la síntesis, con un éster de N-hidroxisuccinimida de biotina. Se pueden añadir marcadores en el terminal 3' de un oligonucleótido usando transferasa terminal de polinucleótido para añadir el resto deseado, tal como, por ejemplo, cordicepina ³⁵S-dATP, y dUTP biotinilado. Ciertos derivados de nucleótido también se pueden usar como marcadores. Por ejemplo, eteno-dA y eteno-A son nucleótidos de adenina fluorescente conocidos que se pueden incorporar en una sonda de oligonucleótidos. Igualmente, eteno-dC es otro análogo que se podría usar en síntesis de sonda.

En ciertas realizaciones de la invención, una sonda está múltiplemente marcada, con cada marcador individualmente acoplado a diferentes localizaciones de la sonda. En otra realización de la invención, una sonda sencilla está doblemente marcada con un tinte fluorescente (es decir, un marcador) y un desactivador. Cuando la sonda está intacta, la fluorescencia del marcador se apaga por el desactivador. Escindir la sonda entre el marcador y el desactivador da como resultado menos desactivación (*quenching*) de la fluorescencia emitida por el marcador. Una combinación como ejemplo para este aspecto de la invención es el tinte fluorescente FAM y el desactivador BHQ-2.

Sondas de genotipificación de VHC

La invención proporciona composiciones para la genotipificación de VHC, en la que las composiciones incluyen al menos una sonda de genotipificación de VHC que puede producir una asignación de genotipo de VHC. Por ejemplo, la invención proporciona una sonda de genotipificación de VHC, por ejemplo, la sonda de genotipificación de VHC HCGT27P5'3' de SEQ ID NO:3, que es capaz de diferenciar un gran número de genotipos de VHC basados en la discriminación de Tm, como se ilustra en el Ejemplo. Esta sonda tiene la secuencia:

EFFGGAALLGFFAGGAFGAFFGGGTCTJ (SEQ ID NO: 3) en la que E = BHQ2; J = cx-FAM; F = propinil dU; L = propinil dC.

Estará claro para un experto en la técnica que esta secuencia sonda fácilmente se puede modificar para obtener básicamente moléculas sonda funcionalmente equivalentes, es decir, moléculas funcionalmente equivalentes que también son capaces de discriminar múltiples genotipos de VHC. Por ejemplo, la sonda proporcionada en SEQ ID NO: 3 comprende diversos marcadores y/o desactivadores (por ejemplo, BHQ2 y cx-FAM). Inmediatamente estará claro para un experto en la técnica que estos restos se pueden sustituir por otros tipos de marcadores o sistemas marcadores, y donde la sonda conservará su propiedad crítica de unirse de manera diferencial a una multitud de genotipos de VHC y no desviarse de la característica básica de la invención. De hecho, incluso se puede eliminar

tales marcadores, y la sonda conserva aún su propiedad básica de discriminación de genotipo de VHC.

T_m e hibridación

5 Uno de los beneficios de la presente invención es que las curvas de fusión/hibridación se crean a partir de la misma muestra de reacción que las curvas de la PCR cinética, por ejemplo, dentro del mismo recipiente de muestra. En diversas realizaciones en el presente documento, el perfil de temperatura de las muestras bajo análisis
10 opcionalmente se puede manipular de diversas maneras para producir las curvas de fusión/hibridación. Por ejemplo, el calentamiento y/o enfriamiento de las muestras para construir las curvas de fusión/hibridación generalmente se hace sobre un intervalo determinado de temperaturas. El intervalo de temperatura específico generalmente se fija en base a, por ejemplo, las dianas/sondas específicas en estudio, sus secuencias (tanto como se conozca al menos), la longitud de la(s) sonda(s), etc. Además de los niveles de temperaturas en la presente invención, la velocidad de cambio de temperatura es también opcionalmente variable en diferentes realizaciones. Los cambios en la temperatura opcionalmente son continuos, pero en algunas realizaciones pueden ser discontinuos.

15 En la interpretación de la curva de T_m resultante para determinar el genotipo diana subyacente, secuencia, etc., la referencia opcionalmente se hace entre la curva de T_m de la(s) muestra(s) diana y una o más curvas de T_m control o entre la curva de T_m de las muestras y la curva de T_m prevista que se esperará que dé la secuencia sonda y que se sabe o se asume que es la secuencia diana, las condiciones de reacción, etc. Diversas realizaciones en el
20 presente documento pueden usar opcionalmente uno o ambos medios para interpretar cualquier curva de T_m para determinar genotipo, secuencia, identidad, etc. de un ácido nucleico diana en una muestra.

Usos a modo de ejemplo de la invención

25 La presente invención opcionalmente se utiliza en diagnóstico, por ejemplo, de enfermedades. Tales afecciones pueden incluir enfermedades infecciosas que implican diagnóstico, así como enfermedades no infecciosas tales como el cáncer, etc. En la determinación de un agente causante en una enfermedad en un sujeto, la presente invención puede distinguir entre agentes causantes de la enfermedad en situaciones en las que muchos agentes diversos
30 podrían posiblemente causar la enfermedad. Por ejemplo, las infecciones de las vías respiratorias superiores (URI) son muy peligrosas para los infectados con ellos y la diagnóstico correcta del agente de enfermedad subyacente es muy importante para el tratamiento apropiado. Si la URI es debida a un virus, bacteria, etc. influye enormemente en el curso apropiado del tratamiento del paciente. Además, las infecciones bacterianas gram positivas y gram negativas requieren diferentes tratamientos. Con cebadores y sondas apropiadamente seleccionadas, la presente invención puede determinar la presencia o ausencia de agentes particulares dentro de una muestra, así como
35 distinguir entre ciertos agentes presentes en una muestra.

Otros usos de diagnóstico de la presente invención implican la diferenciación entre agentes causantes que están cerca uno de otros en secuencia. Por ejemplo, como se ilustra en el Ejemplo en el presente documento, los subtipos de VHC se pueden distinguir uno de otro a través del uso de la presente invención. A través del uso de las sondas y los
40 cebadores apropiados, se puede diferenciar un hospedador de otros agentes de enfermedad relacionados y sujetos que tienen tales agentes de enfermedad se pueden tratar apropiadamente en base a tal diferenciación. Por ejemplo, subcepas de VIH, cepas/subcepas de VHC, tipos de flavivirus y similares todos se pueden distinguir apropiadamente por realizaciones de la presente invención.

45 En otras realizaciones, la presente invención opcionalmente se puede usar para la identificación de ácidos nucleicos en relación con el alelo que tipifica organismos superiores (por ejemplo, como en el cribado genético), la detección de ciertos cánceres, la tipificación de HLA, etc.

Kits, sistemas y mezclas de reacción

50 También se describen kits para la detección y/o cuantificación y/o identificación de ácidos nucleicos. Tales kits pueden comprender cualquier combinación de, por ejemplo, sondas 5'-nucleasa y de hibridación apropiadas (por ejemplo, basadas en los ácidos nucleicos específicos a ensayar, genotipificar, etc.), cebadores apropiados (por ejemplo, para amplificar el ácido nucleico diana), reactivos y materiales para la amplificación y la identificación del
55 ácido nucleico diana tal como tampones, nucleótidos, sales, etc. El kit opcionalmente comprende además un conjunto de instrucciones o manual del usuario que detalla métodos preferidos de uso de los componentes del kit para el descubrimiento o la aplicación de conjuntos de diagnóstico. Generalmente, el kit contiene, además de los anteriores componentes, materiales adicionales que pueden incluir, por ejemplo, instrucciones para realizar los métodos de la invención para la detección y/o cuantificación y/o identificación de ácidos nucleicos, material de
60 empaquetamiento, y uno o más recipientes.

También se describe un sistema para la detección y/o cuantificación y/o identificación de ácidos nucleicos. Tales sistemas pueden comprender, por ejemplo, una o más sondas de hibridación fluorescentemente marcadas; una o más sondas 5'-nucleasa marcadas (las cuales pueden ser la misma que las sondas de hibridación); dos o más
65 cebadores de la PCR cinética que son específicos para la amplificación de dianas de ácido nucleico y que están presentes en cantidades distintas para la PCR cinética asimétrica; uno o más recipientes para las sondas,

cebadores y otros constituyentes de la PCR; uno o más moduladores térmicos que están conectados operativamente (es decir, térmicamente conectados) al recipiente y que pueden cambiar controlablemente la temperatura en el recipiente; un detector configurado para detectar las señales fluorescentes de las diversas sondas en las reacciones (por ejemplo, sean sondas de hibridación, sondas 5'-nucleasa); una pantalla para la visualización de los datos; y un controlador que está operativamente conectado a la pantalla, el detector y/o el modulador térmico y que puede incluir conjuntos de instrucciones para controlar el modulador térmico y la pantalla, el detector y/o el modulador térmico, así como conjuntos de instrucciones para correlacionar las señales fluorescentes y la temperatura en el recipiente con la presencia de uno o más ácidos nucleicos diana. Si las sondas están marcadas por medios no fluorescentes (por ejemplo, radioactivos), los detectores en tales sistemas comprenden aquellos que detectan tal actividad no fluorescente.

También se describen mezclas de reacción que tienen cebadores específicos para la amplificación de al menos una diana de ácido nucleico, una o más sondas 5'-nucleasa marcadas y una o más sondas de hibridación marcadas en las que las sondas 5'-nucleasa y las sondas de hibridación pueden ser o bien la misma sonda o diferentes sondas. En el presente documento, los cebadores están presentes en diferentes cantidades y las sondas de hibridación están presentes en una cantidad mayor que la cantidad del cebador limitante (es decir, el cebador presente en la cantidad menor).

Los kits, etc., descritos en el presente documento pueden incluir los realizados en un tubo o recipiente sencillo, que permite que las reacciones se realicen sin apertura del tubo/recipiente.

Ejemplo

El siguiente ejemplo se ofrece para ilustrar la invención reivindicada. Un experto en la técnica reconocerá una diversidad de parámetros no críticos que se pueden alterar. Se entenderá que los ejemplos y las realizaciones descritas en el presente documento son solamente para fines ilustrativos y que los expertos en la técnica sugerirán diversas modificaciones o cambios en luz de los mismos.

Ejemplo

Uso de la invención para determinar el genotipo de VHC

Determinar el genotipo de una muestra VHC (virus de la hepatitis C) positiva tiene importante significancia y utilidad clínica. Conocer el genotipo del virus específico permite a los médicos seleccionar el correcto régimen de tratamiento. Tal como se explicó anteriormente, la presente invención se puede usar para discriminar entre un número de dianas de ácido nucleico (por ejemplo, incluso unas que están estrechamente relacionadas en la secuencia) tal como genotipos de VHC. Los métodos de la invención usan una sonda de oligonucleótidos que está específicamente diseñada para ser al menos parcialmente complementaria a una región de divergencia de secuencia diana (por ejemplo, una región que muestra divergencia entre diferentes cepas, alelos, especies, etc.) junto con el uso de las diferentes T_m obtenidas a partir del análisis de fusión y/o hibridación post-PCR para distinguir las dianas de ácido nucleico.

La Figura 5 muestra secuencias alineadas de 6 genotipos de VHC diferentes (concretamente tipos 1a, 2a, 3a, 4, 5, y 6) junto con una sonda de hibridación como ejemplo capaz de su uso en la presente invención para discriminar entre los diferentes genotipos de VHC.

Tal como se indicó previamente, la(s) sonda(s) 5'-nucleasa opcionalmente puede(n) usar un diferente canal de color que la(s) sonda(s) de hibridación. Por ejemplo, como se ve en las Figuras 6 a 8, se utilizaron una sonda de hibridación marcada con FAM (para distinguir entre diferentes genotipos de VHC) y una sonda 5'-nucleasa marcada con HEX con transcritos de ARN seleccionados de los genotipos de VHC 1a, 2a, 3a, 4, 5 y 6.

En el presente ejemplo, la mezcla maestra de la muestra de PCR asimétrica (es decir, los constituyentes de la PCR) consistía en: glicerol al 2,5 %, DMSO al 5 %; Tricina 50 mM, pH 8,3; acetato de potasio 90 mM; dATP 300 μM, dGTP 300 μM, dCTP 300 μM, dUTP 550 μM; cebador (limitante) corriente arriba (*upstream*) 0,1 μM; cebador (exceso) corriente abajo (*downstream*) 0,5 μM; sonda de hidrólisis 0,2 μM, sonda de hibridación 0,2 μM; 10 U de uracil-N-glicosilasa; 40 U de Z05 ADN polimerasa; y acetato de manganeso 2,7 mM.

Se obtuvo la ARN plantilla para generar amplicones de VHC por RT-PCR mediante transcripción *in vitro* a partir de plásmidos que llevan insertos de material genómico de VHC correspondientes a los tipos 1a, 2a, 3a, 4, 5 y 6. Las secuencias de estos insertos corresponden a secuencias consenso de cada uno de los respectivos tipos descritos en la Figura 5. Después de la transcripción *in vitro*, el ARN se purificó por cromatografía de oligo-dT-sefariosa.

En el ejemplo, la sonda de hibridación/genotipificación estaba presente en dos veces la concentración del cebador limitante para asegurar que no se escindía toda la sonda. El cebador en exceso estaba presente en 5 veces la concentración de cebador limitante para asegurar un exceso de amplicón de cadena sencilla para unirse a la sonda de hibridación. El perfil del ciclado térmico usado para el ejemplo era: 50 °C durante 5 minutos (etapa UNG); 59 °C

durante 30 minutos (etapa RT); 94 °C durante 20 segundos – 58 °C durante 40 segundos x 60 ciclos; 94 °C durante 60 segundos; y 40 °C a 90 °C en etapas de 1 °C – etapa de fusión. Los oligonucleótidos incluidos en la reacción eran los siguientes:

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
cebador corriente arriba	GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTE en la que E = t-butil bencil dA	1
cebador corriente abajo (el cebador RT)	GCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAE en la que E = t-butil bencil dA	2
Sonda de hibridación/genotipificación HCGT27P5'3'	EFFGGAALLGFFAGGAFGAFFGGGTCCTJ en la que E = BHQ2; J = cx-FAM; F = propinil dU; L = propinil dC	3
Sonda de hidrólisis (es decir, sonda 5'-nucleasa)	ECTCACCGGTJCCGCAGACCACTATGGCTCTCCCP en la que E = CY5; J = HEX; P = fosfato	4

5 Los datos de la curva de crecimiento de la sonda 5'-nucleasa marcada con HEX se muestra en la Figura 6. En ciertas realizaciones, tal sonda es una sonda conservada que no tiene mal emparejamientos entre la sonda y los transcritos de ácido nucleico seleccionados usados y, por lo tanto, debería detectar por igual todos los genotipos. Los datos de la curva de crecimiento de la sonda de hibridación marcada con FAM, sin embargo, como se muestra en la Figura 7, surgen de la sonda que no muestra completa complementariedad con todos los transcritos ensayados y, por lo tanto, muestra mucha más variabilidad. La reacción con los subtipos 2a y 3a, los cuales tienen la mayor cantidad de los mal emparejamientos entre la sonda y los transcritos, genera muy poca señal de 5'-nucleasa.

15 La Figura 8 muestra los datos de la hibridación post-PCR para cada transcripto y la sonda de hibridación/genotipificación. En el presente ejemplo, las curvas de fusión/hibridación se produjeron en un Cicladador Térmico ABI Prism 7700. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con protocolos básicos y parámetros asociados (por ejemplo, control de astringencia, cicladador térmico, etc.) para la construcción de las curvas de fusión/hibridación térmico entre ácidos nucleicos. Tal como se puede ver, un amplio intervalo de Tm existe entre los diferentes genotipos de VHC, por ejemplo, entre 50 °C y 78 °C. Tal como se explicó previamente, mayores Tm surgen de los emparejamientos entre la sonda de hibridación y los transcritos de los genotipos de VHC que están estrechamente emparejados en la secuencia, mientras que aquellos genotipos que tienen menos emparejamiento de secuencia con la sonda en tal región muestran menor Tm. El intervalo de diferentes Tm visto en la Figura 8 permite fácil diferenciación entre los diferentes genotipos. Aunque las Tm para el genotipo 2a y el genotipo 3a están más cerca una de otra que las otras lecturas, la selección de una diferente sonda de genotipificación (por ejemplo, diferente en secuencia, pero que se une a la misma región o que se une a una diferente región en los transcritos) opcionalmente se podría usar para aclarar más la diferencia entre los genotipos en la muestra. Además, también se podrían usar opcionalmente cambios en las condiciones de reacción (por ejemplo, temperatura, concentraciones de sal, etc.) para ayudar a diferenciarlos. La Figura 8 ilustra que, como con todos los ensayos basados en fusión/hibridación, la realización está muy afectada por mal emparejamientos nuevos o desconocidos en la región diana. Opcionalmente se pueden tener en cuenta diferentes realizaciones en el presente documento para tales mal emparejamientos nuevos o desconocidos en regiones de unión a sonda construyendo una diversidad de sondas de hibridación, etc.

35 Aunque se ha descrito la anterior invención en algún detalle con fines de claridad y entendimiento, un experto en la técnica tendrá claro a partir de una lectura de esta descripción que se pueden hacer diversos cambios en forma y detalle. Por ejemplo, todas las técnicas y aparatos descritos anteriormente se pueden usar en diversas combinaciones.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Will, Stephen Newton, Nick

45 <120> PCR ASIMÉTRICA JUNTO CON CARACTERIZACIÓN POST-PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> 21801 EP-RA

<150> US 60/695.991

50 <151> 30-06-2005

<150> US 60/696.253

<151> 30-06-2005

ES 2 605 016 T3

<150> US 60/696.293
<151> 30-06-2005

<150> US 60/696.303
5 <151> 30-06-2005

<160> 10

<170> Patent In versión 3.3
10

<210> 1
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial
15

<220>
<223> HCV

<220>
20 <221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> E = t-butil bencil dA

<400> 1
25

gcagaaagcg tctagccatg gcgtte
26

<210> 2
30 <211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
35 <223> HCV

<220>
<221> misc_feature
<222> (28)..(28)
<223> E = t-butil bencil dA
40

<400> 2

gcaagcacc c tctcaggcag taccacae
28

<210> 3
45 <211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
50 <223> HCV

<220>
55 <221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> E = BHQ2

<220>
60 <221> misc_feature
<222> (2)..(3)
<223> F = propinil dU;

ES 2 605 016 T3

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(9)
<223> L = propinil dC

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(12)
<223> F = propinil dU;

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(17)
<223> F = propinil dU;

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(21)
<223> F = propinil dU;

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> J = cx-FAM;

<400> 3

**effggaallg ffaggafgaf fgggtcctj
29**

30 <210> 4
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> HCV

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> E = CY5;

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> J = HEX

50 <220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> P = fosfato

<400> 4

**ectcacgggt jccgcagacc actatggctc tcccp
35**

55 <210> 5
<211> 68
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

ES 2 605 016 T3

<223> HCV

<400> 5

ccggaattgc caggacgacc gggtcctttc ttggattaac ccgctcaatg cctggagatt
60

tgggcgtg
68

5

<210> 6

<211> 68

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> HCV

15

<400> 6

ccggaattgc tgggaagact gggtcctttc ttggataaac ccaactctatg cccagccatt
60

tgggcgtg
68

20

<210> 7

<211> 68

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> HCV

<400> 7

ccggaatcgc tggggtgacc gggtcctttc ttggagtaac ccgctcaata cccagaaatt
60

tgggcgtg
68

30

<210> 8

<211> 69

<212> ADN

35 <213> Artificial

<220>

<223> HCV

40

<400> 8

ccggaatcgc cgggatgacc gggtcctttc ttggattaaa cccgctcaat gcccggaat
60

ttgggtgtg
69

45

<210> 9

<211> 68

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 605 016 T3

<220>
<223> HCV

5

<400> 9

ccggaattgc cgggatgacc gggtcctttc ttggataaac ccgctcaatg cccggagatt
60

tgggcgtg
68

10
<210> 10
<211> 68
<212> ADN
<213> Artificial

15
<220>
<223> HCV

<400> 10

ccggaattgc caggatgacc gggtcctttc ttggataaac ccgctcaatg cccggagatt
60

tgggcgtg
68

REIVINDICACIONES

1. Un método para clasificar, identificar, cuantificar y/o genotipificar una o más dianas de ácido nucleico en una muestra, comprendiendo el método:

- 5 a) realizar una PCR cinética asimétrica en una mezcla de reacción que contiene una o más sondas 5'-nucleasa marcadas y una o más sondas de hibridación marcadas en la que dichas una o más sondas 5'-nucleasa y dichas una o más sondas de hibridación pueden ser la(s) misma(s) sonda(s) o diferentes sondas en secuencia;
- 10 b) hacer un seguimiento de las señales fluorescentes generadas a partir de la una o más sondas 5'-nucleasa marcadas para crear una o más curvas de crecimiento a partir de la PCR cinética para calcular un valor C_t (umbral de ciclo) y de ese modo determinar el número de copia, el genotipo o la identidad de diana;
- c) modificar la temperatura de la mezcla de reacción después de la PCR cinética para causar un cambio en la asociación entre la una o más sondas de hibridación marcadas y la una o más dianas de ácido nucleico;
- 15 d) hacer un seguimiento de una o más señales fluorescentes generadas a partir de la una o más sondas de hibridación marcadas unidas a la cadena en exceso generada en la PCR cinética asimétrica produciendo de ese modo una curva de fusión o curva de hibridación;
- e) correlacionar la curva de fusión o la curva de hibridación de la etapa d) con una curva de fusión o hibridación de una sonda completamente complementaria de una o más dianas de ácido nucleico conocidas, por tanto, identificar la una o más dianas de ácido nucleico en la muestra,

en el que la PCR cinética asimétrica comprende un primer cebador y al menos un segundo cebador, en el que la cantidad del primer cebador es mayor que la cantidad del segundo cebador y en el que la sonda de hibridación está presente en mayor cantidad que el segundo cebador.

- 25 2. El método de la reivindicación 1, en el que la identificación de la una o más dianas de ácido nucleico comprende la identificación de uno o más organismos o cepas de organismo que tienen dichos ácidos nucleicos.
- 30 3. El método de la reivindicación 1, en el que la PCR cinética asimétrica comprende un primer cebador y al menos un segundo cebador, y en el que la PCR comprende al menos una relación 2:1 de primer cebador y segundo cebador.
- 35 4. El método de la reivindicación 1, en el que la PCR cinética asimétrica comprende un primer cebador y al menos un segundo cebador, y en el que la PCR comprende al menos una relación 3:1 de primer cebador y segundo cebador.
- 40 5. El método de la reivindicación 1, en el que la PCR cinética asimétrica comprende un primer cebador y al menos un segundo cebador, y en el que la PCR comprende al menos una relación 4:1 de primer cebador y segundo cebador.
- 45 6. El método de la reivindicación 1, en el que la PCR cinética asimétrica comprende un primer cebador y al menos un segundo cebador, y en el que la PCR comprende al menos una relación 5:1 de primer cebador y segundo cebador.
- 7. El método de la reivindicación 1, en el que la secuencia de la una o más sondas 5'-nucleasa marcadas es la misma que la secuencia de la una o más sondas de hibridación marcadas.
- 8. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más sondas 5'-nucleasa son diferentes de la una o más sondas de hibridación marcadas.
- 50 9. El método de la reivindicación 1, en el que al menos una de la una o más sondas de hibridación es completamente complementaria a al menos una región de al menos una diana de ácido nucleico.
- 55 10. El método de la reivindicación 1, en el que al menos una de la una o más sondas de hibridación es parcialmente complementaria a al menos una región de al menos una diana de ácido nucleico.
- 60 11. El método de la reivindicación 1, en el que se hace un seguimiento de la PCR cinética asimétrica mediante una primera fluorescencia y en el que el seguimiento del cambio en la asociación de las sondas de hibridación se hace mediante una segunda fluorescencia, segunda fluorescencia que es diferente de dicha primera fluorescencia.
- 65 12. El método de la reivindicación 1, en el que se hace un seguimiento de la PCR cinética asimétrica mediante una primera fluorescencia y en el que el seguimiento del cambio en la asociación de las sondas de hibridación se hace mediante una segunda fluorescencia, segunda fluorescencia que es la misma que dicha primera fluorescencia.
- 13. El método de la reivindicación 1, en el que la una o más dianas de ácido nucleico comprende el ácido nucleico del virus de la hepatitis C (VHC).

14. El método de la reivindicación 17, en el que la identificación de la una o más dianas de ácido nucleico de VHC identifica una o más cepas de VHC en la muestra.

5 15. El método de la reivindicación 1, en el que al menos una de las sondas de hibridación es básicamente complementaria a un genotipo de la cepa de VHC.

10 16. El método de la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción comprende una primera sonda de hibridación y al menos una segunda sonda de hibridación, en el que la primera sonda de hibridación es básicamente complementaria a un primer genotipo de la cepa de VHC y la al menos una segunda sonda de hibridación es básicamente complementaria a un segundo genotipo de la cepa de VHC.

17. El método de la reivindicación 1, en el que la sonda de hibridación comprende una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 3.

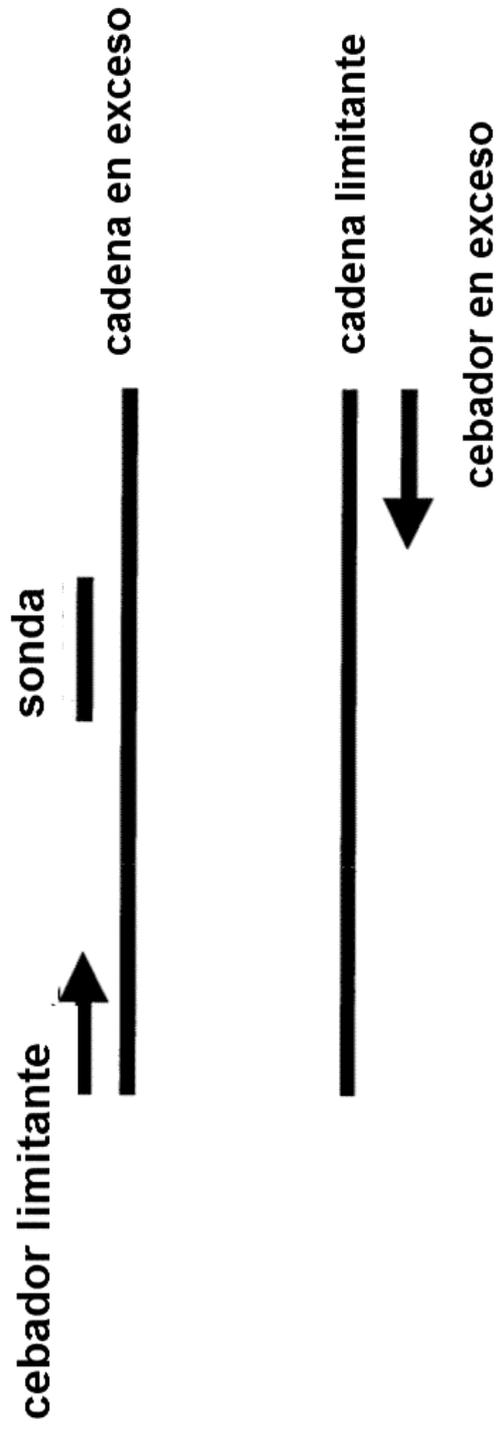


Fig. 1

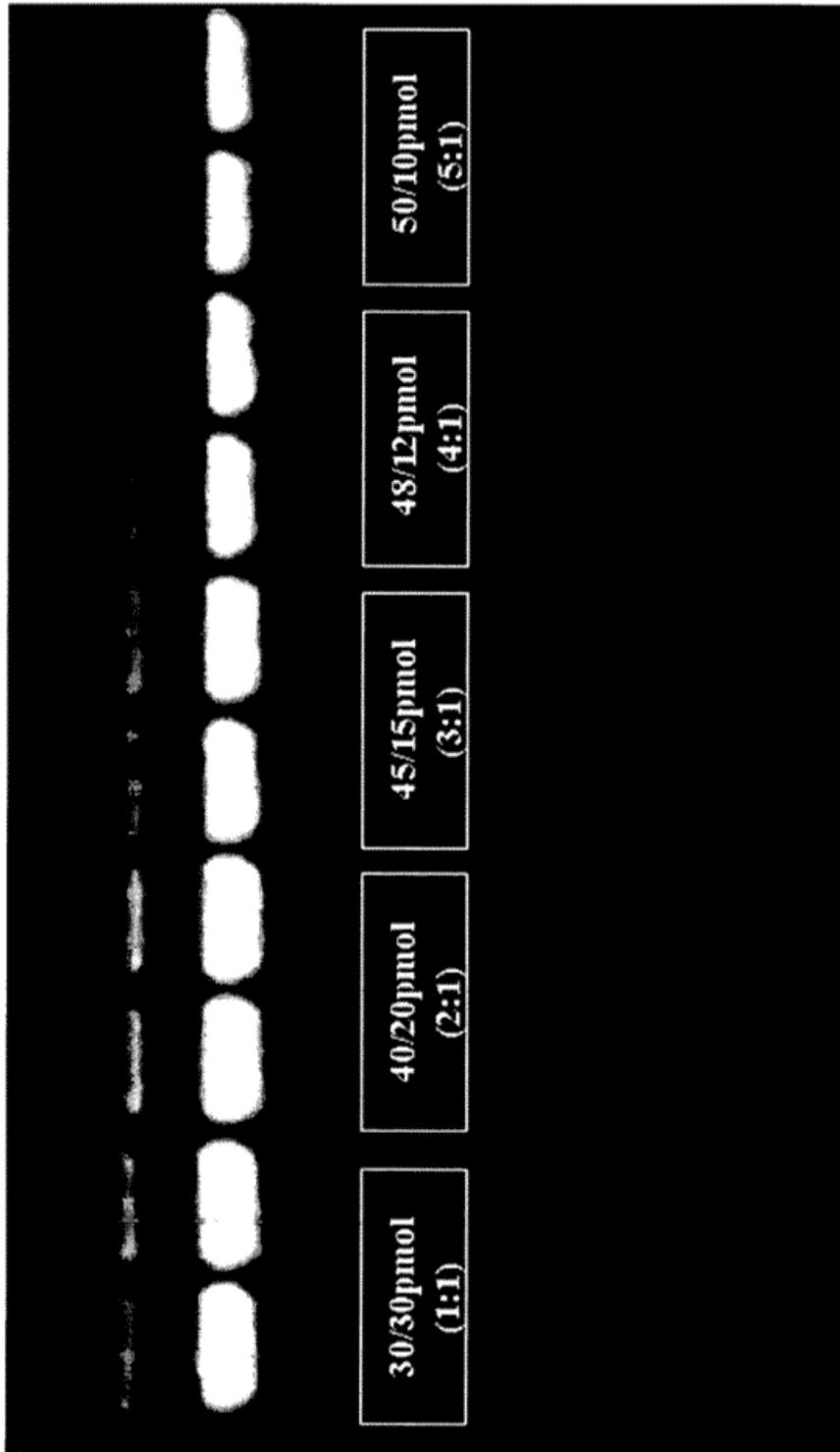


Fig. 2

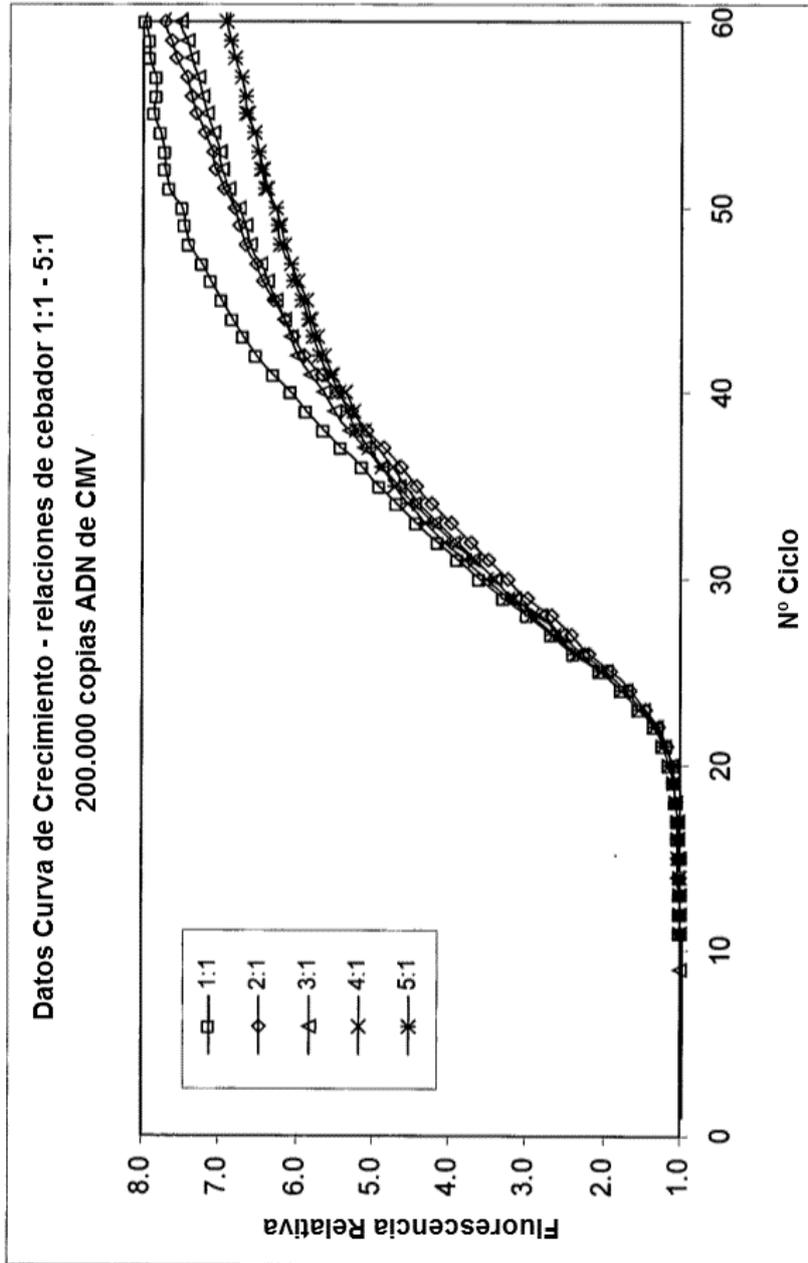


Fig. 3

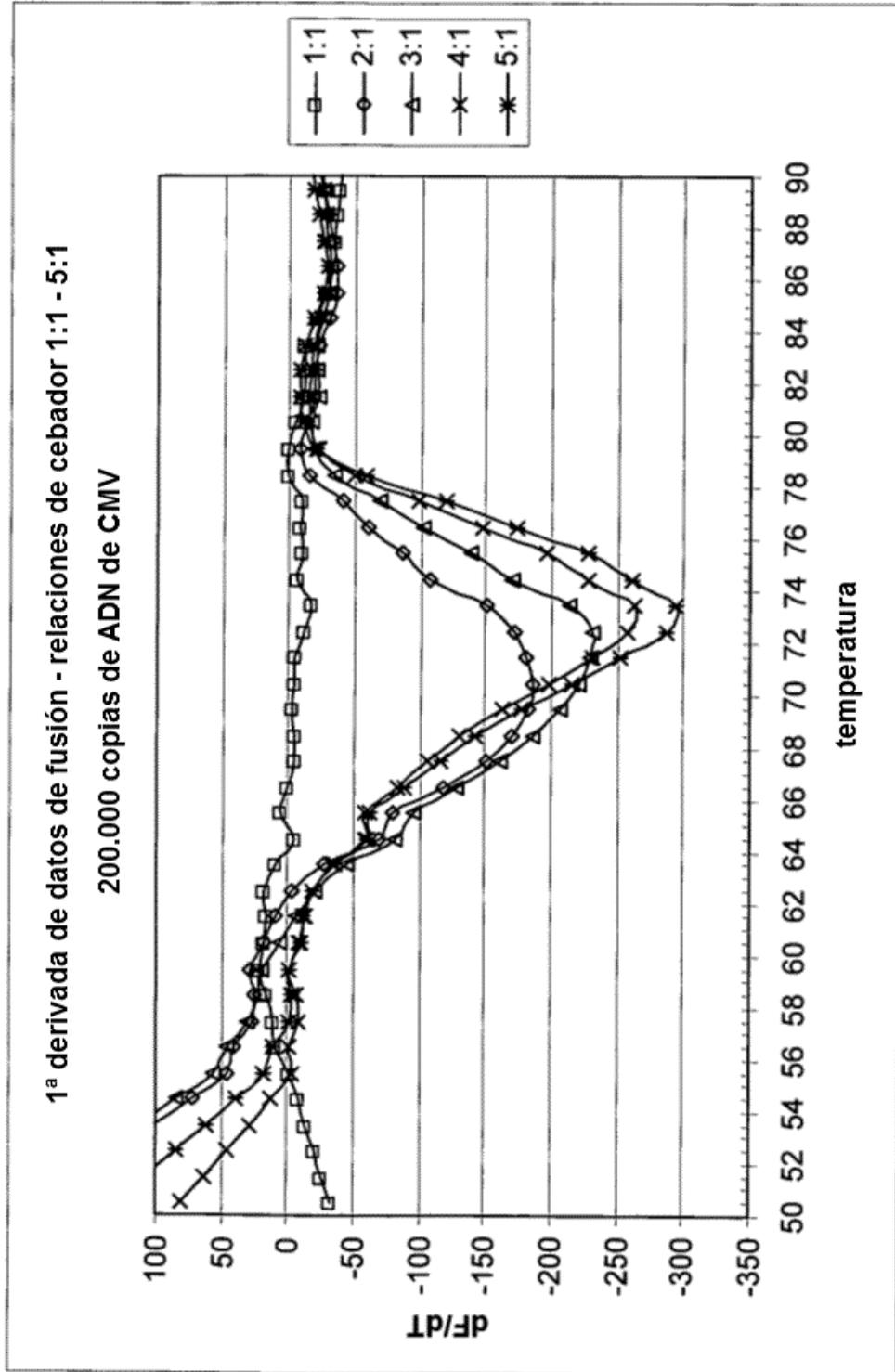


Fig. 4

Genotipos VHC	Secuencia	SEQ ID NO:
1a	CCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTCTTGGATTAA CCGCTCAATGCCCTGGAGATTGGGCGTG	5
2a variante	-----TG---A---T-----A---T-----A---T-----CA-CC-----	6
3a	-----C---TG--GT-----G-----A---CA--A-----	7
4	-----C---G---T-----A-----C---A-----T---	8
5	-----G---T-----A-----C-----	9
6	-----T-----A-----C-----	10
HCGT27P5' Sonda	EFFGGAALLGFFAGGAFGAFPGGGTCCTJ	
Hibridación/genotipificación	en la que E=BHQ2; J=FAM; F=propinil dC; L=propinil dU	3

Fig. 5

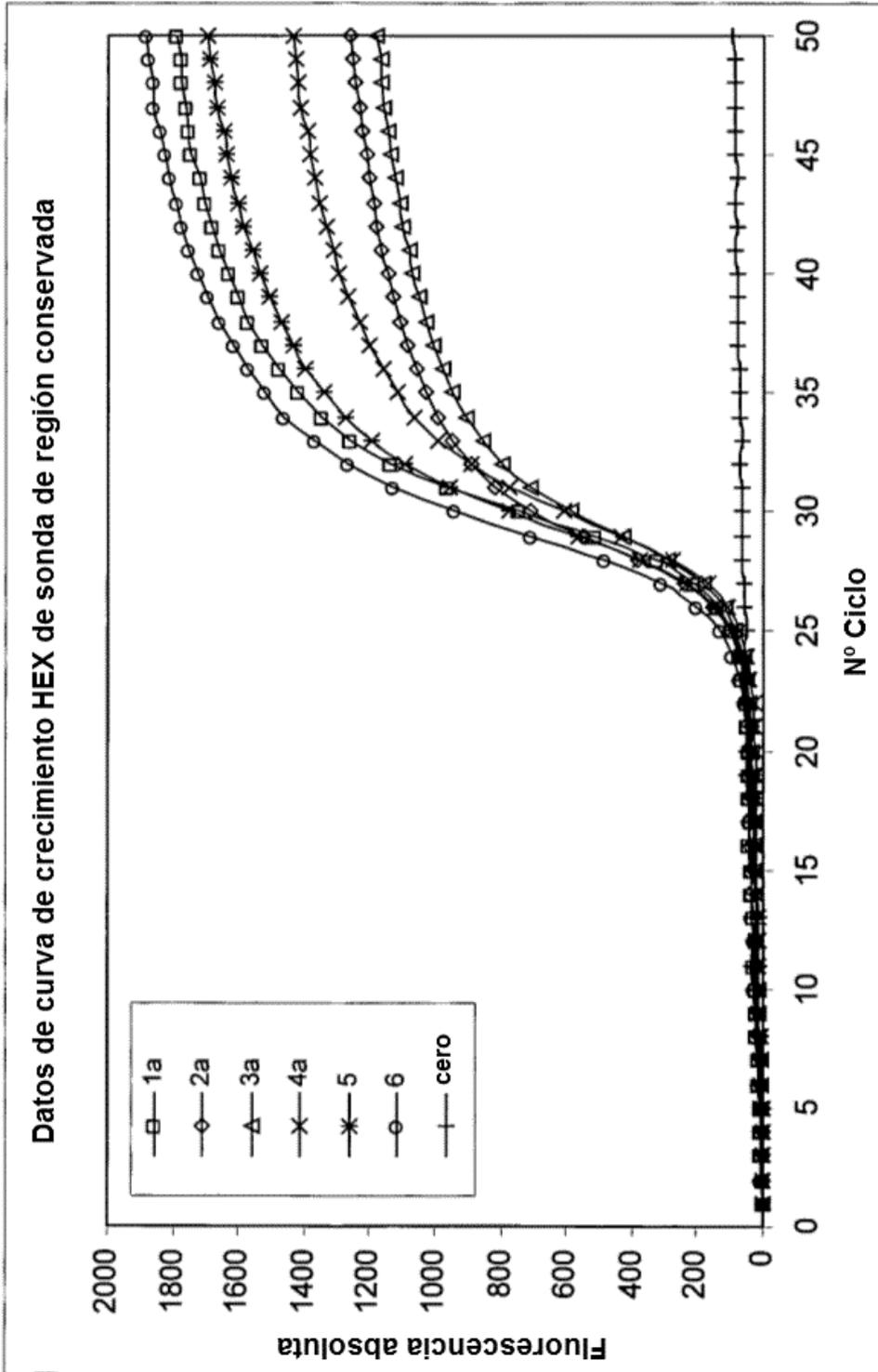


Fig. 6

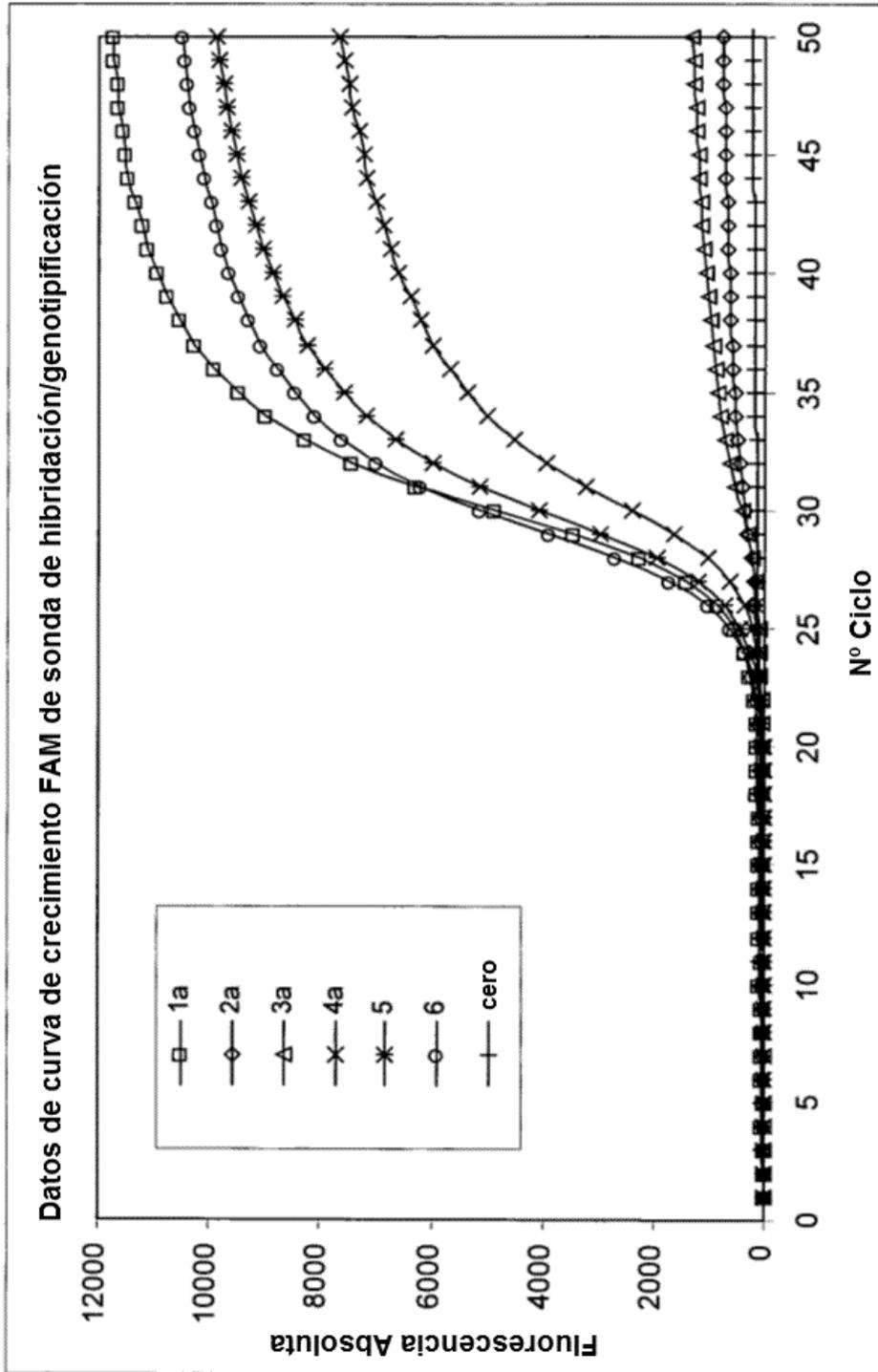


Fig. 7

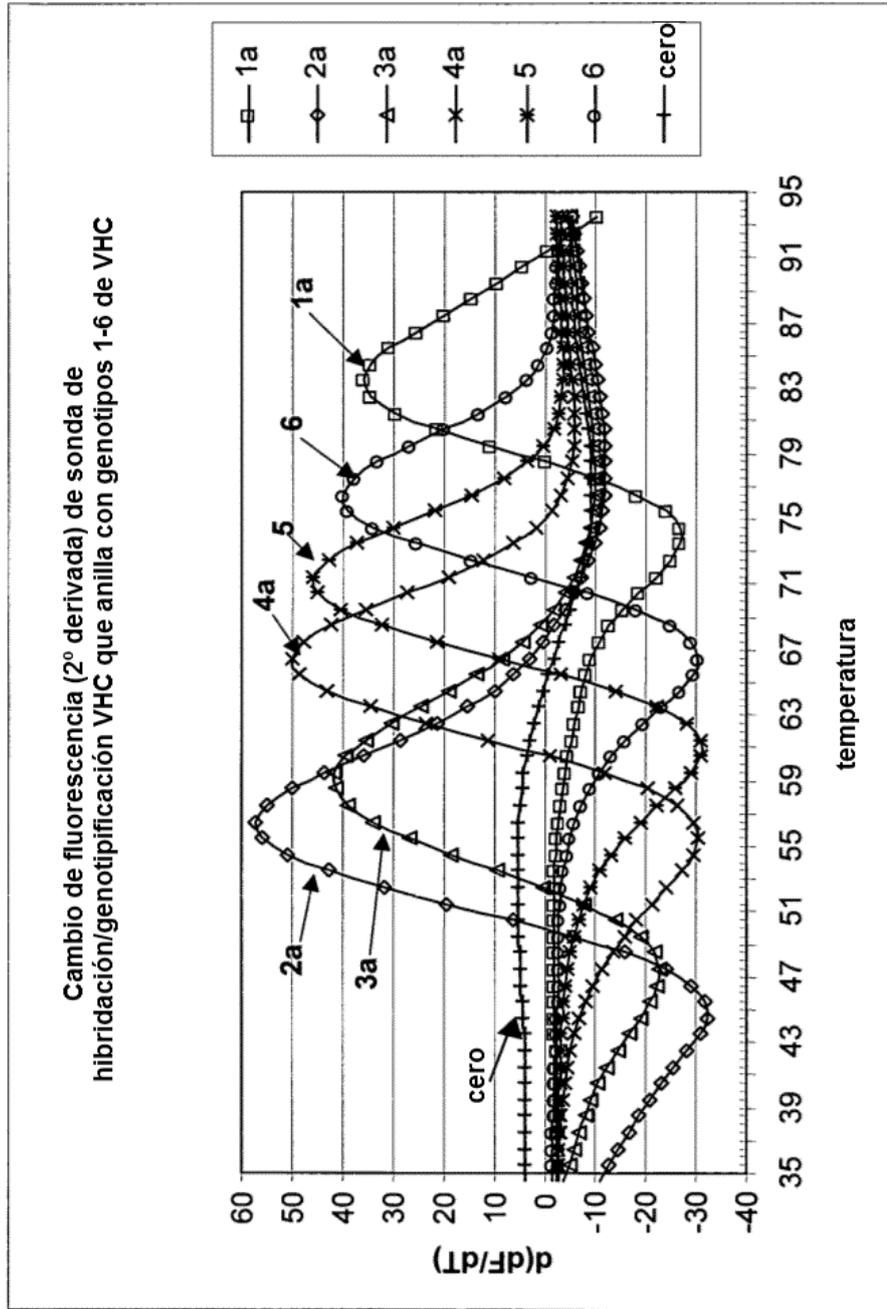


Fig. 8