

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 592**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.07.2009 PCT/GB2009/001728**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010 WO10007355**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.07.2009 E 09784687 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2324130**

54 Título: **Amplificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

14.07.2008 GB 0812862

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

09.05.2017

73 Titular/es:

**LUMORA LIMITED (100.0%)
CPC1, Capital Park Fulbourn
Cambridge CB21 5XE, GB**

72 Inventor/es:

**TISI, LAURENCE, CARLO;
GANDELMAN, OLGA;
KIDDLE, GUY y
MCELGUNN, CATHAL**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 611 592 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).

Amplificación de ácidos nucleicos**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere al campo de la amplificación de ácidos nucleicos. En particular, se refiere a un método para la amplificación específica y detección de una muestra de prueba y un control interno en el mismo recipiente de reacción.

10

ANTECEDENTES

La tecnología de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT) es una herramienta inestimable y potente en muchas áreas de la investigación y el diagnóstico. Dichas técnicas de NAAT permiten la detección y cuantificación de un ácido nucleico en una muestra con sensibilidad y especificidad altas así como el análisis cuantitativo de ácidos nucleicos en una muestra.

15

La amplificación de ácidos nucleicos puede usarse para determinar la presencia de un ácido nucleico plantilla particular en una muestra, como se indica por la presencia de un producto de la amplificación después de la implementación de una NAAT particular. A la inversa, la ausencia de cualquier producto de la amplificación indica la ausencia de ácido nucleico plantilla en la muestra. Dichas técnicas son de gran importancia en aplicaciones de diagnóstico, por ejemplo, para determinar si un patógeno está presente en la muestra.

20

El estado de la técnica ha descrito una variedad de técnicas de termociclado e isotérmicas para la amplificación de ácidos nucleicos. Las técnicas de termociclado, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usan ciclado de temperatura para conducir ciclos repetidos de síntesis de ADN que llevan a que grandes cantidades de ADN nuevo sean sintetizadas en proporción a la cantidad original de ADN plantilla. También se han desarrollado una variedad de técnicas isotérmicas que no confían en el termociclado para conducir la reacción de amplificación. Se han desarrollado técnicas isotérmicas, que utilizan polimerasas de ADN con actividad de desplazamiento de cadenas para reacciones de amplificación que no implican un paso de síntesis de ARN. De manera similar, para las reacciones de amplificación que implican un paso de síntesis de ARN, se han desarrollado técnicas isotérmicas que pueden usar transcriptasa inversa, RNasa H y/o una polimerasa de ARN dependiente de ADN (ver por ejemplo, Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies - A Review. Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Volumen 27, Publicación 3 Marzo 2008, páginas 224 - 243).

25

30

35

Una cosa que todas las técnicas de NAAT tienen en común es que es a menudo esencial que la reacción se monitoree por controles adecuados para asegurar que un resultado negativo se debe realmente a la ausencia del ácido nucleico en lugar que a otros factores, por ejemplo la presencia de inhibidores en una muestra. El estado de la técnica describe varios métodos para lograr esto.

40

Un método es realizar dos reacciones de amplificación en recipientes separados en paralelo. Un recipiente contiene la muestra de prueba y la otra contiene un ácido nucleico de una secuencia conocida, que sirve como control positivo, además de la muestra de prueba. Si no se detecta amplificación en la muestra de prueba pero puede detectarse un producto de la amplificación en la muestra de control, la prueba puede considerarse verdadero negativo. De igual manera, si no hay producto de la amplificación en el control, debe haber presente un inhibidor en la muestra.

45

El uso de un control interno, es decir, un control que se amplifica en el mismo recipiente de reacción, tiene algunas ventajas sobre usar dos recipientes para establecer si hay inhibidores. En primer lugar, se requieren menos tubos y reactivos, reduciendo de esta manera el coste unitario por prueba donde se requiere absolutamente un control de inhibidores. En segundo lugar, se requieren menos manipulaciones. En tercer lugar, como se requieren menos tubos, pueden analizarse más muestras por capacidad unitaria del hardware usado para ejecutar la reacción. Por ejemplo, usando un sistema de detección de 96 pocillos estándar, pueden analizarse 96 muestras usando un control interno mientras que sólo pueden analizarse 48 muestras cuando se deben usar dos recipientes por prueba.

50

55

El método de control interno presenta el desafío técnico de diferenciar entre la señal resultante del polinucleótido objetivo en la muestra y la señal resultante del ácido nucleico de control. Para detectar las señales de una muestra y ácido nucleico de control en el mismo recipiente, es necesario que la secuencia del ácido nucleico de control tenga alguna diferencia asociada del ácido nucleico objetivo para permitir a un sistema de detección diferenciar entre los dos productos amplificados. Más aún, necesita haber algún medio de diferenciar las señales respectivas de los dos procesos de amplificación. Esto se ha logrado por el uso de sistemas indicadores separados para la muestra de prueba y el control respectivamente. Por ejemplo, pueden emplearse dos sondas fluorescentes de diferentes máximos de emisión (o lo suficientemente diferentes de sus señales respectivas para ser diferenciadas) una de las cuales solo da una señal en el enlace a los productos del proceso de amplificación de la muestra de prueba, y uno de los cuales solo da una señal cuando enlaza con los productos de los productos de lo

60

65

control. De este modo, detectando dos señales independientes de una muestra, es posible seguir los procesos de amplificación respectivos en el mismo recipiente de reacción.

5 Alternativamente, cuando sea apropiado, puede realizarse un análisis de curva de fusión de los resultados de una reacción de amplificación para evaluar si hay señal de la muestra de prueba y el control. Esto puede abarcar o no el uso de sondas fluorescentes (ver, por ejemplo EP1109934). La muestra de prueba y el control son de esta manera amplificados con las mismas cinéticas de reacción. La desventaja del análisis de curva de fusión es que requiere un paso adicional tras la reacción de amplificación para detectar el control que no solo alarga el proceso sino que también añade complejidad significativa al hardware que se requiere para detectar el control y el ácido nucleico amplificado. Cuando hay que emplear dos o más sistemas indicadores, el hardware usado para detectar el indicador debe ser lo suficientemente sofisticados para realizar mediciones y diferenciar al menos dos señales indicadoras. Además, para aplicaciones prácticas en diagnósticos, estas lecturas deben realizarse en una muestra pequeña, o múltiples muestras pequeñas: típicamente los volúmenes de reacción están entre 10-100 µl para evitar costes de reactivos altos por prueba. Esto requiere hardware muy sofisticado que es muy caro.

10 Por lo tanto, hay una necesidad en la técnica de métodos de detección mejorados para la detección de ácidos nucleicos y controles internos en el mismo recipiente de reacción. En particular, un método por el que un control interno pueda ser monitorizado sin la necesidad de que dos señales indicadoras separadas se midan independientemente, sería de gran beneficio ya que esto omitiría la necesidad de hardware caro que pueda medir señales múltiples tras la NAAT. Además, hay algunas técnicas de NAAT que utilizan tecnologías indicadoras por las que no es posible medir más de un tipo de señal de una muestra. Dichos métodos incluyen sistemas indicadores basados en bioluminiscencia (Solicitudes de Patente Internacional publicadas WO 2004/062338 y WO 2006/010948), turbidez (Solicitud de Patente Internacional Publicada WO 01/83817) o ciertas metodologías electroquímicas.

25 **SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

La invención proporciona un método para la amplificación específica y detección de un ácido polinucleico y un control interno en el mismo recipiente de reacción, como se define en las reivindicaciones.

30 Por lo tanto, en una realización la presente invención proporciona un método para determinar la presencia y/o cantidad de un primer ácido polinucleico en una muestra que comprende someter la muestra a la amplificación del ácido nucleico en la que el producto se puede detectar por la presencia de una señal generada por la formación del ácido polinucleico del primer polinucleótido caracterizado porque la reacción de amplificación del ácido nucleico se realiza, en el mismo recipiente de reacción, con una cantidad predeterminada de un segundo ácido polinucleico que se somete a amplificación del ácido nucleico, el producto del cual se puede detectar por la presencia de la misma señal generada por la formación del ácido nucleico a partir del segundo polinucleótido como la generada por la formación del ácido polinucleico a partir del primer polinucleótido en donde las señales de la amplificación del primer ácido polinucleico y el segundo ácido polinucleico se resuelven en base a un conjunto de lecturas de señal frente a tiempo y en donde el producto del segundo ácido polinucleico se produce con diferentes cinéticas de reacción a partir del producto del primer ácido polinucleico de tal manera que el segundo ácido polinucleico actúa como un control interno para el método.

45 En esta especificación el término "primer ácido polinucleico" se usa de manera intercambiable con "muestra de prueba" y "polinucleótido objetivo".

50 El producto de la amplificación del ácido nucleico se puede detectar por la presencia de una señal generada por la formación del ácido polinucleico. La señal puede generarse a partir del producto de la amplificación directamente (por ejemplo detectando producto polinucleico generado por la amplificación del ácido nucleico) o la señal puede generarse a partir de subproductos de la amplificación (por ejemplo detectando productos que se producen durante el proceso de amplificación).

55 El principio subyacente de la invención es el reconocimiento de que un control interno no necesita necesariamente implicarse en exactamente el mismo proceso de amplificación que el de la muestra de prueba. Más bien, tanto la muestra de prueba y el estándar necesitan solamente compartir el mismo recipiente y reactivos de amplificación pero no necesariamente procesos de amplificación exactamente equivalentes. Por lo tanto, es posible distinguir los productos de la amplificación del ácido nucleico objetivo y del control.

60 De esta manera es posible combinar en un único recipiente dos reacciones de amplificación que tienen diferentes cinéticas de amplificación. Cuando los dos métodos de amplificación tienen cinéticas de reacción lo suficientemente diferentes es posible, a partir de un conjunto de lecturas de señal frente a tiempo, resolver señales resultantes de la amplificación de la muestra de prueba, de la amplificación resultante del control interno. Las señales respectivas de los dos procesos de amplificación pueden variar, por ejemplo, respecto a su magnitud de señal máxima. De esta manera, se logra un control interno efectivo que puede analizarse en hardware más simple que el de los métodos fluorescentes que requieren medir dos señales del recipiente.

Un método de acuerdo con la invención puede ponerse en práctica con cualquier NAAT conocida en la técnica en la que el producto de la amplificación se pueda detectar por la presencia de una señal generada por la formación del ácido nucleico.

5 Algunas técnicas de NAAT requieren que la temperatura de la muestra se cicle entre diferentes temperaturas para lograr la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo. Ejemplos de tales métodos son Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR, US 4683202) y Reacción de Cadena de Ligasa (LCR, US5185243). Otras NAAT pueden funcionar sustancialmente a una temperatura individual. De estas algunas son dependientes de la transcripción como parte del proceso de amplificación, por ejemplo Amplificación Basada en Secuencia de Ácidos Nucleicos (NASBA, US5409818) y Amplificación Mediada por Transcripción (TMA; US5399491) mientras otras son dependientes de la acción de una Helicasa o Recombinasa por ejemplo Amplificación Dependiente de Helicasa (HDA; WO2004027025) y Amplificación de Polimerasa Recombinasa (RPA; WO03072805) respectivamente, otras son dependientes de la actividad de desplazamiento de la cadena de ciertas polimerasas de ADN, por ejemplo, Amplificación por Desplazamiento de la Cadena (SDA; US455166), Amplificación Isotérmica mediada por Bucle (LAMP; WO 00/28082, WO 01/34790), Reacción de Desplazamiento Quimérico (RDC) (WO9794126), Amplificación en Círculo Rodante (RCA; Lizardi, P. M. et al. Nature Genetics, (1998) 19:225-231), Amplificación Quimérica Isotérmica de Ácidos Nucleicos (ICAN; WO0216639, Proceso de Amplificación SMart (SMAP; WO2005063977).

20 Los métodos usados para la amplificación del ácido nucleico objetivo y el control pueden ser el mismo o diferentes.

25 En una realización de la invención el control interno se amplifica usando una amplificación del ácido nucleico exponencial mientras que la muestra de prueba se amplifica usando un proceso de amplificación no exponencial. Sin embargo, en una realización preferida es el control interno el que se amplifica usando una amplificación del ácido nucleico no exponencial y la muestra de prueba usando una amplificación del ácido nucleico exponencial. Esto se prefiere ya que hay menos posibilidades de que la amplificación asociada con el control interno deje fuera de la competencia la de la muestra de prueba.

30 Ejemplos de NAAT exponenciales que pueden usarse de acuerdo con las realizaciones de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, reacción de cadena de polimerasa, SDA, LAMP, ICAN, SMAP, RDC, (exponencial)-RCA, NASBA, TMA, HDA y RPA.

35 Ejemplos de NAAT no exponenciales que pueden usarse de acuerdo con las realizaciones de la presente invención incluyen, pero no están limitadas a, Amplificación en círculo rodante, PCR asimétrica, LAMP asimétrica (aislamiento de ADN monocatenario de productos de Amplificación Isotérmica mediada por Bucle (LAMP). Kentaro Nagamine, Yoko Kuzuhara et al. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.290, No.4, 1195-1198, 2002) o cualquiera de las NAAT exponenciales anteriormente mencionadas realizadas bajo condiciones que afectan a la capacidad del proceso de amplificación de copiar con éxito copias del ácido nucleico plantilla original.

40 La invención no requiere estrictamente que el control interno se amplifique por un proceso de amplificación no exponencial (por ejemplo lineal) y al muestra de prueba por un proceso exponencial. Más bien, es solamente necesario que las cinéticas y/o amplitudes de señal asociadas con las reacciones de amplificación respectivas difieran significativamente. Por lo tanto, en una realización adicional, la invención proporciona un método en el que el primer ácido nucleico y el control interno se amplifican usando amplificación del ácido nucleico exponencial y en el que dos reacciones de amplificación tienen cinéticas de reacción diferentes, es decir, cuando las dos reacciones tienen fundamentalmente diferente descripción cinética (es decir, cuando una descripción matemática diferente es necesaria para describir las cinéticas del control interno en comparación con la muestra de prueba, por ejemplo cuando un proceso es lineal y el otro es exponencial). En esta realización, es necesario ser capaz de cerciorarse, a partir de una muestra negativa, que la señal del control interno no es, de hecho, una señal de la muestra de prueba. Por ejemplo, estas cinéticas de reacción diferentes pueden lograrse en virtud de la señal del control interno

- 45 a) que tiene una amplitud menor o mayor que la de la muestra de prueba
 50 b) que tiene un tiempo de retardo más largo o más corto antes de la amplificación máxima
 55 c) que tiene una tasa intrínseca más lenta o más rápida de amplificación, o

Las características anteriores permiten que algoritmos matemáticos analicen un conjunto de lecturas de señales frente al tiempo para cerciorarse que la señal abarca la de la muestra positiva, una señal del control interno solamente o ninguna señal de o la muestra de prueba o el control interno (como ocurriría en presencia de un inhibidor).

60 Por ejemplo, con referencia al i) anterior, podría emplearse un algoritmo para comprobar si la señal alcanzó alguna vez una amplitud de A_{IS} , asociada con la amplitud esperada del control interno. Si la amplitud no logró alcanzar una amplitud de A_{IS} esto se asociaría entonces con la inhibición de la muestra. Si la amplitud fue mayor de A_{IS} , se esperará que la señal provenga de la muestra de prueba. "Mayor que X" por lo tanto significa que la amplitud

es al menos 1.2 veces, 1.5 veces, 1.8 veces, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8, veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o incluso 100 veces mayor que la amplitud del control interno. El valor de A_{IS} puede por lo tanto determinarse fácilmente realizando el método de la invención sin el primer ácido polinucleico.

De manera similar, con referencia al ii) anterior, podría emplearse un algoritmo para comprobar si se logró una señal de amplitud particular se logró en el momento T_{IS} , que se asociaría exclusivamente con una señal del control interno, o si una señal de una amplitud particular no se alcanzó hasta después del momento T_{IS} , que se asociaría con una muestra inhibida. Si una señal de una amplitud particular se alcanzó antes del momento T_{IS} , esto se asociaría con una señal de la muestra de prueba.

Además, con referencia al iii) anterior, podría emplearse un algoritmo para comprobar si la tasa de cambio de una señal alcanzó una cantidad predeterminada ΔS_{IS} asociada exclusivamente con la señal de un control interno, si la tasa de cambio de la señal no excedió la ΔS_{IS} asociada con una muestra inhibida o si la señal fue mayor que ΔS_{IS} , que se asociaría entonces con una señal de una muestra positiva. "Mayor que ΔS_{IS} " significa de este modo que la tasa de cambio de una señal es al menos 1.2 veces, 1.5 veces, 1.8 veces, 2 veces, 2.5 veces, 3 veces, 3.5 veces, 4 veces, 4.5 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8, veces, 9 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces o incluso 100 veces mayor que la tasa de cambio del control interno. El valor de ΔS_{IS} puede de este modo determinarse fácilmente realizando el método de la invención sin el primer ácido polinucleico.

Además, podría emplearse un algoritmo para ajustar la señal generada de una muestra con modelos cinéticos particulares para cerciorarse que descripción cinética encaja mejor con los datos. Por ejemplo, si la tasa de cambio de la señal encajó con una ecuación de tasa exponencial con un ajuste mejor que una ecuación de tasa lineal entonces la señal puede asignarse a la amplificación del ácido polinucleico objetivo en la muestra de prueba en lugar que al control interno, mientras que si la señal se ha ajustado mejor a una ecuación de tasa lineal entonces la señal podría asignarse al control interno, si la señal se aproxima a una línea recta de gradiente cero, entonces la señal podría asignarse para ser la de una muestra inhibida. Los algoritmos adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica.

Hay una variedad de maneras en la que las cinéticas de los procesos de amplificación pueden variar. Por ejemplo, las cinéticas de amplificación pueden describirse por a) la tasa constante de amplificación b) el tiempo para alcanzar la amplificación máxima c) las amplitudes de partida y finales del parámetro medido (es decir, las asíntotas superior e inferior de la curva) y d) si la amplitud de la señal en el momento de amplificación máxima es más cercana a la asíntota superior o inferior. Dicha descripción de una curva cinética se conoce como Curva de Richards (ver Figura 1). Sin embargo, también pueden preverse una variedad de otros medios para describir y diferenciar entre dos procesos cinéticos diferentes distintos de los descritos en la Curva de Richards.

Pueden lograrse diferentes cinéticas de amplificación de varias maneras. En una realización de la invención, se proporciona un control interno en el que los sitios de enlace de cebadores usados para amplificar exponencialmente la secuencia de polinucleótidos de interés están o parcialmente ausentes o son no óptimos en el control. Varios ejemplos de cómo puede diseñarse dicho control interno se muestran en la Figura 10. Por ejemplo en métodos que requieren dos sitios de enlace de cebadores (A y B) para la amplificación exponencial (por ejemplo reacción de cadena de polimerasa, amplificación por desplazamiento de cadena y Amplificación Quimérica Isotérmica de Ácidos Nucleicos) se pueden lograr diferentes cinéticas por los siguientes medios:

- sólo uno de los sitios de enlace de cebadores (A o B) está presente en el control interno
- ambos sitios de enlace de cebadores están presentes pero más separados en la secuencia en comparación con el polinucleótido objetivo. "Más separados" significa de este modo que la distancia entre los dos cebadores es mayor por al menos 10 nucleótidos, 50 nucleótidos, 100 nucleótidos, 500 nucleótidos, 1000 nucleótidos o incluso 5000 nucleótidos
- ambos sitios de enlace están presentes pero separados por una región que es más lenta de copiar para una polimerasa en comparación con el polinucleótido objetivo
- ambos sitios de enlace de cebadores están presente pero uno o ambos de los sitios de cebadores contienen desajustes que provocan que la amplificación tenga lugar menos eficientemente
- uno o ambos sitios de enlace de cebadores están presentes en una molécula de ácido polinucleico circular pero en una orientación que evita la amplificación exponencial

Todos estos ejemplos podrían resultar en cinéticas de amplificación para el control interno que son distinguibles del proceso exponencial que amplifica el ácido polinucleico objetivo y son por lo tanto una realización de la presente invención. Este enfoque no requiere que haya presente ningún reactivo adicional en la mezcla de amplificación distinto que el ácido polinucleico del control interno; por lo tanto es fácil prever cómo es posible acomodar tanto la amplificación de la muestra de prueba como la amplificación del control interno en la misma mezcla de reacción en la que ambos procesos están sometidos a las mismas concentraciones de polimerasa, precursores de polinucleótidos, pH, sales y otros aditivos.

5 Cuando un método de amplificación usa más de dos sitios de enlace de cebadores para permitir la amplificación exponencial de un ácido polinucleico objetivo (por ejemplo Amplificación Isotérmica mediada por Bucle (LAMP)), algunos de estos sitios de cebadores se requieren absolutamente para la amplificación exponencial, por lo que algunos meramente afectan la tasa de amplificación. Como tal, variando que sitios de cebadores hay presentes en el control interno, se pueden modular las cinéticas de amplificación. Este método forma una realización de la invención.

10 La generación de secuencias de polinucleótidos del control interno que contienen sólo un subconjunto de sitios de enlace de cebadores deseados e intercaladas con secuencias de elección es fácil usando tecnologías de ADN recombinantes modernas. Además la generación de plantillas circulares es conocida en la técnica a través del uso de ligasas de ADN.

15 En una realización adicional el control interno se amplifica por cebadores diferentes, o cebadores parcialmente diferentes, en comparación con la secuencia de polinucleótidos objetivo de interés ofreciendo así más medios para amplificar el polinucleótido del control interno a través de un perfil cinético significativamente diferente (Figura 11). La palabra "diferente" de este modo significa que los cebadores usados para la amplificación del ácido polinucleico objetivo y el control interno tienen menos del 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30% o incluso menos del 25% de homología. Además, limitando la cantidad de los cebadores usados para la amplificación del control interno, es posible limitar la cantidad total de amplicón producido del ácido polinucleico del control interno, esto significaría que la señal del control interno sería de menor amplitud que la de la muestra de prueba. "Limitar la cantidad" de este modo significa que los cebadores usados para la amplificación del control interno se añaden en concentraciones que son menores del 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o incluso del 5% que las concentraciones de cebadores usados para la amplificación del polinucleótido objetivo. Sólo es necesario que el mecanismo de amplificación proporcionado por estos cebadores diferentes sea compatible con el proceso de amplificación asociado con la amplificación de la muestra de prueba para que los dos procesos tengan lugar en el mismo recipiente. El experto en la técnica, provisto con las enseñanzas de la presente invención, será capaz de cerciorarse de si los cebadores son adecuados para su uso en el proceso de amplificación elegido.

30 En una realización adicional, se efectúa un control interno tomando ventaja de la actividad de ciertas proteínas que actúan en las secuencias de polinucleótidos usadas como el control interno, por lo que la proteína genera sitios de cebado para la polimerasa usada dentro del polinucleótido de control, sin la necesidad de enlazar cebadores extraños en el proceso de amplificación de tal manera que los polinucleótidos *de novo* resultantes de copiar el polinucleótido suministrado se genera a una tasa lineal (o más lenta) que la del polinucleótido de interés de la muestra de prueba. Siempre que dicha proteína pueda funcionar bajo las condiciones de amplificación es posible combinar ambas reacciones de amplificación en el mismo recipiente. Ejemplos de dichas proteínas incluyen RNasa, Hs, Nickasas, endonucleasa de restricción, y proteínas de cebado (por ejemplo proteína de cebado de adenovirus pTP). Una manera de lograr esto (Figura 12a) es añadir a la mezcla de la reacción un ácido polinucleico (que no es similar a la secuencia del ácido polinucleico objetivo) que puede ser accionado por algún aditivo para generar sitios de cebado para la síntesis de ácidos nucleicos. Preferiblemente el aditivo es una proteína que genera sitios de cebado o a través de acción enzimática en el polinucleótido de control interno o a través de alguna capacidad de actuar como un cebador por sí mismo. Por ejemplo, los inventores han descubierto que la Tli RNasaH puede provocar amplificación lineal de polinucleótidos de una manera de tipo lineal bajo condiciones usadas para realizar métodos como Amplificación Isotérmica mediada por Bucle (LAMP) o RDC. De este modo se puede lograr un control interno añadiendo a la mezcla de amplificación el polinucleótido del control interno (definido como un polinucleótido que no tiene homología con el polinucleótido objetivo y sitios de enlace de cebadores deliberados para cualquiera de los cebadores usados que puedan ser accionados por el aditivo) y por ejemplo Tli RNasaH.

50 Alternativamente, un medio adicional de provocar la amplificación del control interno sin sitios de enlace de cebadores o reactivos/proteínas/enzimas adicionales, es usar como un control interno un ácido polinucleico capaz de auto-replicación bajo las condiciones de amplificación usadas para amplificar cualquier ácido nucleico objetivo de la muestra de prueba (Figura 12b). Ejemplos de secuencias de ácidos polinucleicos capaces de auto-replicación incluyen plantillas circulares de experimentar amplificación en círculo rodante (como en RCA lineal) o plantillas lineales por lo que las estructuras de horquilla generadas en el extremo 3' provocan que la plantilla se recopie a sí misma (esto es una característica inherente de la tecnología LAMP por ejemplo). Esto forma una realización adicional de la invención.

60 Algunos procesos de amplificación de ácidos nucleicos han sido descritos como "lineales" en lugar de "exponenciales" en la técnica, debido al hecho de que las cinéticas de producción de amplicones parecen ajustarse a una ecuación de línea recta. En muchos casos, cinéticas "lineales" o "cercanas a lineales" han demostrado mejorar, por ejemplo, los métodos de cuantificación o medios para amplificar varios objetivos de ácidos nucleicos sin desplazar el amplicón a una población particular de secuencias (algunos métodos de amplificación exponencial son más proclives a hacerlo). Ejemplos de métodos de amplificación "lineales" o "cercanos a lineales" incluyen el RCA anteriormente mencionado (donde sólo se usa un cebador individual), PCR asimétrico (WO03040397) y también "Amplificación lineal de secuencias de ácidos nucleicos específicas" (US 6743605), también el nuevo método

isotérmico descrito en la WO/2007/030505, por nombrar unos pocos. En general, dichos métodos "lineales" describen procesos de amplificación por los que la molécula de ácido nucleico objetivo se copia (quizás repetidamente) pero las copias no se copian a ellas mismas.

5 Sin embargo, es posible para un proceso de amplificación diferir de otro en virtud de que las copias se copian sólo parcialmente, o se copian con menos eficiencia o se copian sólo bajo ciertas condiciones.

10 En otra realización de la presente invención, se logran diferentes cinéticas de reacción amplificando el primer ácido polinucleico y el control interno con el mismo o dos procesos de amplificación similares pero de tal forma que cada proceso de amplificación pueda controlarse independientemente como para afectar a las cinéticas de amplificación. Los inventores han reconocido que dentro de un único recipiente donde los reactivos para dos procesos de amplificación distintos se mezclan, uno de los procesos de amplificación puede favorecerse en virtud de las condiciones elegidas. De esta manera es posible afectar al "tiempo para la amplificación máxima" como se describe en la curva de Richards, en particular. Esto puede permitir la diferenciación cinética de dos procesos de amplificación y por lo tanto permitir la presente invención. Por lo tanto, en una realización la amplificación del primer ácido polinucleico y el control interno se realiza con la misma técnica de amplificación, en la que la amplificación del primer ácido polinucleico y el control interno puede controlarse por condiciones extrínsecas.

20 En una realización, las dos reacciones de amplificación se realizan a temperaturas diferentes. En cualquier reacción de amplificación en la que la temperatura se cicle repetidamente o amplificaciones que se realizan mayormente de manera isotérmica, la temperatura por lo tanto se refiere a la temperatura a la que el ácido polinucleico se amplifica y/o la temperatura a la que los cebadores enlazan con los sitios de enlace de cebadores en el ácido polinucleico. En esta realización es posible realizar la reacción de amplificación a una temperatura mediante la que se favorece uno de los dos procesos de amplificación y por lo tanto tiene lugar a una tasa más rápida que el otro proceso de amplificación luego para cambiar más tarde la temperatura de tal forma que el proceso de amplificación pueda tener lugar a una tasa más alta que antes del cambio de temperatura. Esto podría lograrse por la selección cuidadosa de cebadores de tal manera que la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores asociados con los procesos respectivos siendo significativamente diferentes. Se considera por lo tanto que dos cebadores que tienen T_m diferentes cuando la T_m de los cebadores difiere por al menos 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C o 10°C. Un método en el que se usan cebadores con valores de T_m diferentes para amplificar el primer ácido polinucleico y el control interno es una realización de la presente invención.

35 Otra manera de lograr esto, más aplicable a PCR, es elegir dos procesos de amplificación por los que el tiempo de extensión requerido para la amplificación es sustancialmente diferente. La reacción puede comenzarse bajo condiciones en las que una de las reacciones de amplificación puede tener lugar dado un tiempo de extensión particular pero la otra se inhibe completa o sustancialmente; tras un periodo apropiado de tiempo el tiempo de extensión podría, por ejemplo aumentarse para adaptarse mejor al otro proceso de amplificación. De esta manera sería posible cerciorarse si se observó la amplificación (a través de un tipo de señal individual) de dos procesos de amplificación separados. Por lo tanto, un método en el que se varía el tiempo de amplificación para lograr diferentes cinéticas de reacción forma una realización de la invención.

45 Un ejemplo de un medio para producir la amplificación de un control interno de cinéticas notablemente diferentes a las usadas en la muestra de prueba se muestra en la Figura 5A. La técnica BART-LAMP (Ensayo Bioluminiscente en Tiempo Real-Amplificación Isotérmica mediada por Bucle) que se usa en este ejemplo se describe con más detalle a continuación. Aquí se muestra la salida BART de la amplificación de una molécula de ácido nucleico objetivo donde dos de los seis cebadores usados normalmente en el LAMP se omiten de la mezcla de amplificación. Como consecuencia, para una cantidad dada de ADN objetivo, el tiempo de retardo para alcanzar la amplificación máxima es mucho más largo que el de la mezcla de amplificación completa que contiene seis cebadores. Además, la amplitud del pico de luz de BART (un reflejo de la tasa de amplificación intrínseca) es mucho más amplio que el observado normalmente con la mezcla de amplificación completa que contiene los seis cebadores. Por lo tanto un medio de implementar la presente invención es tener el control interno amplificado a través del método LAMP pero omitiendo, por ejemplo, dos de los seis cebadores empleados normalmente para la amplificación.

55 Un ejemplo adicional de un medio para producir amplificación de un control interno de cinéticas notablemente diferentes al usado en la muestra de prueba se muestra en la Figura 5b. En este caso, un proceso de amplificación que depende de la Tli RNasaH y Bst Polimerasa se muestra actuando en un objetivo de ADN que consiste de ADN co-purificado con Tli RNasaH durante la purificación de la Tli RNasa H de E.Coli recombinante. La amplificación produce amplicón de muy alto peso molecular de una forma cercana a lineal. Como resultado, el pico de luz BART parece muy diferente (más amplio) que los picos de luz resultantes de, por ejemplo LAMP. Como tal, el tipo de proceso de amplificación demostrado aquí ejemplifica la presente invención.

60 La verificación de que la amplificación dependiente de la Tli RNasa H puede actuar como un control interno se muestra en la Figura 6. Aquí el LAMP y el proceso de amplificación dependiente de Tli RNasa se combinan en el mismo tubo. Cuando la prueba es positiva se ve un fuerte pico de luz de el LAMP a aproximadamente 30 minutos,

cuando la prueba es negativa, se observa en su lugar la amplificación lenta del proceso de amplificación dependiente de Tli RNasa. Esto refleja los datos del modelo mostrado en las figuras 3a y 3b (recordando que el BART indica la tasa instantánea de amplificación mientras que la figura 3 muestra la acumulación de ácido nucleico). Como tal, es posible cerciorarse a partir de una muestra de si una muestra es o no positiva, negativa o está inhibida combinando la reacción LAMP con el proceso de amplificación dependiente de Tli RNasa.

Otra ventaja importante de la presente invención es que ambas reacciones de amplificación pueden detectarse con la misma señal. Por lo tanto, el método de la presente invención obvia la necesidad de adquirir y mantener equipamiento especializado que sería necesario si se necesitase detectar más de una señal.

Varias señales que pueden usarse para detectar la amplificación de ácidos nucleicos son conocidas en la técnica. Estas incluyen señales electroquímicas, turbidez, señales de bioluminiscencia y señales fluorescentes. La detección por la misma señal por lo tanto significa que ambas reacciones de amplificación se detectan con el mismo tipo de señal, por ejemplo bioluminiscencia.

En una realización, se usa el sistema indicador BART-LAMP para detectar las señales. Este sistema se ha explicado con detalle en la WO2004/062338 y la WO2006/010948. El BART es un ejemplo de un sistema indicador diseñado para NAAT isotérmicas que da un único tipo de señal de una muestra: una señal bioluminiscente. El BART utiliza la detección dependiente de luciferasa de luciérnaga de pirofosfato inorgánico: este se produce en grandes cantidades cuando las secuencias 'objetivo' se detectan usando NAAT. Como tal, los diagnósticos moleculares pueden lograrse con BART simplemente midiendo la luz emitida de los tubos cerrados, en un ensayo de fase homogéneo. El BART está probado con varias NAAT diferentes, funcionando entre 50-63° C. El indicador BART es un medio particularmente efectivo de seguir la tasa de amplificación de una NAAT ya que la salida de luz representa una medida de la tasa instantánea de amplificación (mientras que las salidas fluorescentes muestran la acumulación de una señal y por lo tanto las mediciones tienen que diferenciarse para obtener las tasas de amplificación). A modo de ejemplo, la Figura 4 muestra el BART siendo usado en conjunción con LAMP para detectar una serie de dilución de una molécula de ADN objetivo particular. Observar que a medida que la cantidad de ADN objetivo en la muestra disminuye, la fase de retardo para alcanzar el tiempo de incremento de luz máxima aumenta (Que es proporcional a la fase de retardo para alcanzar la amplificación máxima). Dicho de otra manera, el tiempo para alcanzar el pico de luz característico asociado con muestras positivas en BART aumenta en proporción inversa a la cantidad de ácido nucleico objetivo en la muestra. Se hace hincapié en que aunque ejemplos adicionales hacen uso del sistema indicador BART, la presente invención no está limitada al uso del BART y es igualmente aplicable a métodos como fluorescencia, turbidez, otras técnicas espectroscópicas o métodos de medición electroquímicos.

El segundo ácido polinucleico, que actúa como un control interno, es necesario que sea elegido de tal manera que su secuencia sea lo suficientemente diferente de la secuencia del primer polinucleótido. Dos ácidos polinucleicos son considerados suficientemente diferentes cuando son menos del 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, o incluso 5% homólogos. La cantidad de ácido nucleico que es necesario añadir a la reacción será evidente para el experto en la técnica y puede determinarse fácilmente, por ejemplo probando varias concentraciones de ácido polinucleico en la NAAT que se va a usar. Sin embargo, se espera que la cantidad de ácido polinucleico que será necesario añadir se encuentra entre 10 µg y 100 ag, 100 ng y 100 fg o incluso 100 pg y 100 fg.

El término "control interno", como se usa en la presente, se refiere a cualquier ácido nucleico que se sabe se amplifica bajo ciertas condiciones proporcionadas en el método de la invención. El control interno no está por lo tanto restringido a ácidos polinucleicos que se obtuvieron de la misma fuente que el ácido polinucleico de prueba, sino que más bien abarca cualquier ácido polinucleico teniendo en cuenta que tal ácido polinucleico satisfaga los criterios establecidos para el segundo ácido polinucleico. El control interno puede usarse como un control de la misma reacción y también puede usarse como un estándar para cuantificar la muestra de prueba. Es importante destacar que los inventores han demostrado que la amplificación de un control interno se inhibe por la presencia de inhibidores en una muestra, confirmando de este modo la idoneidad del control interno como un control para la amplificación de la muestra de prueba (ver figura 7).

Preferiblemente, el método de la invención se realiza en un recipiente sellado. Esto es de gran utilidad ya que reduce o incluso evita la posibilidad de que la muestra se contamine. Además, reduce o incluso evita la posibilidad de que se contamine el laboratorio. Esto es particularmente importante ya que si incluso una copia del ácido nucleico plantilla escapase al laboratorio, podría potencialmente contaminar otras muestras a ser probadas y dar resultados de falsos positivos. Por lo tanto, la capacidad de evitar la contaminación es de particular importancia cuando un método de la invención se usa en una aplicación diagnóstica. Los métodos para sellar el recipiente de reacción serán evidentes para el experto en la técnica e incluyen, pero no están limitados a, películas de plástico, cera, aceite y coberturas de papel de aluminio.

Un método de acuerdo con la invención puede usarse en aplicaciones de diagnóstico. En particular el método permite la identificación de organismos en una muestra de un paciente y otras muestras. El organismo puede ser cualquier microorganismos como virus, bacterias y hongos. El microorganismo puede ser patógeno pero

también puede ser un microorganismo no patógeno.

"Muestra de paciente" se refiere a cualquier muestra tomada de un paciente y puede incluir sangre, heces, hisopos, muestras de tejido, orina o líquidos espinales. Otras muestras de pacientes adecuadas y métodos para extraerlas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Un "paciente" o "sujeto" del que se toma la muestra puede ser un humano o un animal no humano. Cuando una muestra no es referida específicamente como una muestra de paciente, el término también comprende muestras tomadas de otras fuentes. Ejemplos incluyen hisopos de superficies, muestras de agua (por ejemplo aguas residuales, agua marina, agua del lago, agua potable) cualquier otra muestra ambiental (por ejemplo aire) muestras alimenticias, productos cosméticos, productos farmacéuticos, productos de fermentación, cultivos celulares y de microorganismos y otras muestras en la que es deseable la detección de un microorganismo.

En un aspecto adicional, se proporciona un kit como se define en las reivindicaciones para su uso en un método de acuerdo con la invención.

Preferiblemente dicho kit comprende todos los componentes necesarios para poner en práctica el método de la invención, excepto el ácido polinucleico objetivo que se va a probar, excepto cuando el ácido polinucleico objetivo forma parte de un control positivo suministrado o en pruebas cuantitativas en las que la cantidad conocida del objetivo se añade por referencia.

Un kit para su uso en un método de acuerdo con la invención comprende un ácido polinucleico para su uso como un control interno; cebadores para la amplificación del ácido polinucleico objetivo y el control interno con diferentes cinéticas de reacción; y componentes para detectar una señal electroquímica, turbidez, señal bioluminiscente o señal fluorescente de tal manera que los productos de la amplificación de dicho primer ácido polinucleico y dicho control interno se pueden detectar por la misma señal y las señales de la amplificación del primer ácido polinucleico y el control interno pueden resolverse en base a un conjunto de lecturas de señal frente a tiempo; y preferiblemente comprende una polimerasa de ácido nucleico y los sustratos para la polimerasa de ácido nucleico. Más preferiblemente, el kit comprende además reactivos de tamponamiento, como una fuente de iones de magnesio. Alternativamente, un kit para su uso en un método de acuerdo con la invención, como se define en las reivindicaciones, puede comprender sólo algunos de estos componentes y/o componentes adicionales. La muestra y cualquier otro componente que se haya omitido del kit puede después añadirse al kit durante el uso.

Cuando se usa la BART para la detección de ácidos polinucleicos se pueden incluir en el kit una luciferasa termoestable, luciferina y un enzima que convierte PPI a ATP, como ATP sulfurilasa, y cualquier otro sustrato o cofactor requerido del enzima que convierte PPI a ATP, como adenosina 5' fosfosulfato. Por lo tanto en una realización un kit para el uso con BART comprende polimerasa de ácido nucleico, b) el estándar interno, c) al menos dos cebadores adecuados para la amplificación de la muestra de prueba y el estándar interno, d) una luciferasa termoestable, e) luciferina, f) ATP sulfurilasa y g) adenosina 5' fosfosulfato.

Preferiblemente, al menos uno de los componentes del kit se liofiliza o está en otra forma que es adecuada para su almacenamiento en el kit. Más preferiblemente, todos los componentes del kit se liofilizan o están en una o más formas adecuadas para su almacenamiento. Dichas otras formas incluyen componentes a los que se les han añadido factores estabilizantes y/o una mezcla maestra refrigerada o congelada que contiene los componentes del kit.

Una aplicación adicional de un método de acuerdo con la invención es para determinar si una secuencia de ácidos nucleicos particular está presente en un código genético del organismo. Por ejemplo, podría usarse para determinar si el ácido nucleico del que el ácido nucleico plantilla se origina ha sido modificado genéticamente, para la detección del ADN asociado con una raza de planta no modificada genéticamente particular o una planta modificada genéticamente, para la detección de ADN asociado con razas con pedigrí de animales o para aplicaciones de diagnóstico médico o veterinario como pruebas genéticas o forenses.

Se describirán ahora varios aspectos y realizaciones de la presente invención con más detalle a modo de ejemplo. Se apreciará que se puede hacer modificación del detalle sin salirse del alcance de las reivindicaciones.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de un modelo matemático para una curva de crecimiento/amplificación conocida como Curva de Richards. a) versión de la ecuación de la curva de Richards adaptada para la amplificación del ácido nucleico; b) dos procesos de amplificación con cinéticas idénticas; c) dos procesos de amplificación que difieren en la cantidad de amplificación que pueden producir finalmente; d) dos procesos de amplificación que difieren en el tiempo que les toma alcanzar la amplificación máxima; e) dos procesos de amplificación con diferentes tasas de amplificación; f) dos procesos de amplificación en done, en el momento de alcanzar la amplificación máxima, la señal difiere entre como están de cerca de las asintotas respectivas; g) dos procesos de amplificación que se describen ambos por la curva de Richards: N.B. uno de los procesos aparece en una primera inspección que es lineal (es decir una línea recta). Como tal, en la práctica, no es

siempre fácil (o necesario) estar seguro de si un proceso es verdaderamente exponencial o lineal a partir de un conjunto particular de mediciones; la cuestión con respecto a la presente invención es si los procesos separados pueden desconvolucionar inequívocamente de la señal compartida.

5 Figura 2. Modelo matemático. Esto demuestra el principio general de que es posible seguir dos procesos separado, en un tubo cerrado, usando una única señal siempre que los dos procesos den salidas de señales que sean lo suficientemente diferentes por medio de su descripción cinética o amplitud.

10 Figura 3. Modelo matemático que demuestra que, incluso cuando los dos proceso tienen lugar simultáneamente, en oposición a secuencialmente, como se muestra en la Figura 1, sigue siendo posible diferenciar la amplificación de la muestra de prueba en comparación con la amplificación del control en virtud de las diferencias en la tasa intrínseca de amplificación.

15 Figura 4. Amplificación exponencial de una serie de dilución de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo usando la tecnología de amplificación LAMP en combinación con la tecnología indicadora BART. La tecnología BART es un sistema indicador bioluminiscente por el que sólo se puede emitir un tipo de señal de la muestra. El BART, a diferencia de otros sistemas indicadores, da tanto un aumento como una disminución rápida durante la amplificación: el tiempo hasta el pico de luz es inversamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico objetivo en la muestra. Además, la anchura del pico de luz es una función de la tasa inherente de amplificación de la NAAT que se está monitorizando.

Figura 5a. Amplificación exponencial retardada de un ácido nucleico objetivo;

25 Figura 5b. Tasa reducida de cambio de salida bioluminiscente observada en la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos a través de un proceso dependiente de la Tli-RNasaH que muestra una tasa inherente mucho más lenta de amplificación en comparación con, por ejemplo, LAMP. De hecho el proceso parece estar cercano a una tasa lineal de amplificación. El mecanismo preciso de este proceso dependiente de la Tli-RNasaH no está claro pero parece estar provocado por la acción de la Tli-RNasaH en ADN que contiene pequeñas cantidades de heterodúplex de ARN-ADN originados de cualquiera o ambas de la transcripción o ADN Primasa.

Figura 6. Amplificación exponencial y no exponencial registrada de un único tubo de ensayo en presencia (1) o ausencia (2) del ácido nucleico objetivo.

35 Figura 7. Inhibición de amplificación de ADN genómico en Lamp-BART con concentraciones diferentes de Agua de Peptona Tamponada (BPW), un inhibidor conocido para las NAAT, o CTP. 7a. Inhibición de muestra que contiene el objetivo (1 - sin BPW, 2 BPW diluida 5x, 3 - diluida 2x, 4 - BPW no diluida); 7b. Inhibición de control no plantilla (1 - sin BPW, 2 BPW diluida 5x, 3 - diluida 2x, 4 - BPW no diluida); 7c. Inhibición de muestra que contiene el objetivo (1-3) y control no plantilla con diferentes concentraciones de CTP (1 y 4 - sin CTP, 2 y 5 2 mM de CTP, 3 y 6 - 3 mM de CTP).

Figura 8. Modelo matemático que demuestra dos procesos que tienen lugar simultáneamente en ausencia y presencia de inhibidores. a) Dos tipos de cinéticas en ausencia de inhibidores; b) Monitorización en tiempo real de muestras positivas y negativas con control de inhibición interno.

45 Figura 9. Amplificación de una molécula de ADN objetivo, a través de la NAAT conocida como RDC, en presencia de un control interno basado en amplificación basada en RNasaH Tli seguido por BART. En el gris claro punteado se muestra la amplificación exitosa de la molécula de ADN objetivo como se evidencia por el rápido aumento y después la más rápida todavía disminución en la luz de la muestra. Esta amplificación tiene lugar en presencia del control interno. En negro sólido se muestra el resultado de la amplificación cuando no hay presente ADN objetivo y la única amplificación detectada es del control interno. En este caso, el pico de luz del sistema indicador BART es visiblemente más ancho que el de la molécula de ADN objetivo, en particular, carece de la disminución rápida en la luz después de las emisiones de luz máximas, asociadas con los procesos de amplificación exponenciales. Como tal, respecto al trazo negro, es fácil para un observador establecer que a) los reactivos de amplificación no están inhibidos, ya que ha tenido lugar la amplificación, pero que b) la amplificación es del control interno y no de la muestra de prueba ya que la forma de la salida del BART no es la asociada con la amplificación exponencial rápida. Un algoritmo informático sería capaz de distinguir entre las dos curvas sobre la base de que el resultado positivo tienen una tasa negativa mucho más rápida tras el pico de luz en comparación con la del control interno.

La Figura 10 muestra una variedad de métodos para lograr, en un único recipiente, dos procesos de amplificación de cinéticas diferentes.

La Figura 11 refleja todas las características mostradas en la figura 10 excepto que en este caso el polinucleótido del control interno puede contener sitios de enlace de cebadores para cebadores no usados

para amplificar el ácido polinucleico objetivo.

La Figura 12 muestra dos alternativas para usar polinucleótidos del control interno que tienen sitios de enlace de cebadores o para que los cebadores usados amplifiquen el ácido polinucleico objetivo o cualquier otro cebador ayude a amplificar el control interno.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Se amplificó LAMP-BART de ADN de Salmonella genómico purificado con el ChargeSwitch® direct gDNA Kit (Invitrogen) en Lamp-BART a 55° C en Lucy, con hardware de formación de imágenes a medida (Lumora). La mezcla de la reacción contenía: 0,8 μM de cebador de LampB (AACCTTGTGGAGCATATTCGTGGTTTTCCGCCATTGGCGAATTTATG), 0,8 μM de cebador de LampF (TCTCTTGCGGCCACAAATGTTTTAAGCGAACGTGTTCCG), 0,4 μM de cebador de LoopB (CAATGGCGCGTTATATTTG), 0,4 μM de cebador de LoopF (GAGCGCTCCATAATTAATTTTC), 0,2 μM de cebador de DisplB (CATTACTGCTCGTAATTC), 0,2 μM de cebador de DisplF (ATATCTGAAGTTTTGCAGC) (MWG), 1,6 mM de dNTPs (total) (Invitrogen), 0,16 U/μl Bst (NEW ENGLAND BIOLABS), 0,1 mg/ml de luciferina (Europa Bioproducts), 0,5 mM de adenosina 5'-fosfosulfato (Biolog), 5,6 μg/μl de luciferasa de luciérnaga (Ultra Glow, Promega), 0,125 U/ml ATP-sulfurilasa (Sigma) en 1x de tampón Thermopol (New England Biolabs) con algunos estabilizantes y aditivos. El volumen total de cada reacción fue de 20 μl. Las señales del BART observadas respondieron a la amplificación de ADN exponencial por un aumento de la luz seguido por una rápida disminución de la luz para la muestras positivas que contenían diferentes número de copias de objetivo de partida y por un decaimiento gradual constante para la muestra negativa que no contenía ningún ADN objetivo (Figura 4).

Ejemplo 2

Se observó la amplificación exponencial retardada de un ácido nucleico objetivo bajo condiciones idénticas a las del Ejemplo 1 pero omitiendo los cebadores LoopB y LoopF. El tiempo de retardo anterior a la señal flash se detectó incluso para alto número de copias del ácido nucleico objetivo y se volvió significativamente más largo; el aumento exponencial fue mucho más lento (Figura 5a). El ancho medio del flash observado en este ejemplo fue tres veces mayor que en la amplificación exponencial descrita en el Ejemplo 1.

Se demostró la tasa reducida de amplificación por una amplificación isotérmica tipo lineal no específica de los ácidos nucleicos a través de un proceso conducido por Tli-RNasaH a 55° C, en Lucy, hardware de formación de imagen a medida (Lumora). La mezcla de la reacción contenía: 0,32 U/μl Tli-RNasaH (Takara), 1,6 mM de dNTPs (total) (Invitrogen), 0,16 U/μl de Bst (New England Biolabs), 0,5 mM de adenosina 5'-fosfosulfato (Biolog), 5,6 μg/μl de luciferasa de luciérnaga (Ultra Glow, Promega), 0,125 U/ml de ATP-sulfurilasa (Sigma) en 1x de tampón Thermopol (New England Biolabs) con algunos estabilizantes y aditivos. El volumen total de cada reacción fue de 20 μl. Las señales del BART observadas respondieron a la amplificación del ácido nucleico en aumento gradual, casi lineal, significativamente ralentizado, seguido por una disminución en la salida de luz (Figura 5b). La anchura media de estas señales fue incluso mayor que en el caso anterior.

Ejemplo 3

Se combinó la amplificación exponencial de ADN de Salmonella genómico por LAMP en un único ensayo de tubo con la amplificación dependiente de Tli-RNasaH casi lineal anteriormente mencionada de ácidos nucleicos y se monitorizó por BART a 55° C en Lucy, hardware de formación de imágenes a medida (Lumora). La mezcla de la reacción contenía: 0,8 μM de cebador de LampB, 0,8 μM de cebador de LampF, 0,4 μM de cebador de LoopB, 0,4 μM de cebador de LoopF, 0,2 μM de cebador de DisplB, 0,2 μM de cebador de DisplF (MWG), 0,32 U/μl de Tli-RNasaH (Takara), 1,6 mM de dNTPs (total) (Invitrogen), 0,16 U/μl de Bst (New England Biolabs), 0,1 mg/ml de luciferina (Europa Bioproducts), 0,5 mM de adenosina 5'-fosfosulfato (Biolog), 5,6 μg/μl de luciferasa de luciérnaga (Ultra Glow, Promega), 0,125 U/ml ATP-sulfurilasa (Sigma) en 1x de tampón Thermopol (New England Biolabs) con algunos estabilizantes y aditivos, ADN objetivo para la amplificación conducida por Tli-RNasaH. El volumen total de cada reacción fue de 20 μl. La muestra que contenía la secuencia objetivo respondió con un flash fuerte reflejando la producción exponencial rápida de ADN. La muestra sin la secuencia objetivo pro con el ADN objetivo para la amplificación conducida por Tli-RNasaH respondió (es decir el control interno) con un aumento lento de la señal de luz (Figura 6).

Ejemplo 4

Se demostró la inhibición de la amplificación de ADN genómico de Salmonella (2 ng por ensayo) con agua de peptona tamponada (BPW) o CTP en LAMP-BART bajo las condiciones descritas en el Ejemplo 3. Se añadieron 3,5 μl de BPW o CTP pre-diluidos a diferentes concentraciones en 15 μl de la mezcla de ensayo conteniendo o ADN objetivo, o muestras positivas o muestras negativas de ADN no objetivo. Los resultados observados en las muestras

positivas y negativas con BPW se muestran en la Fig. 7a y la Fig. 7b y con CTP en la Fig. 7c, respectivamente. La adición de BPW no diluido y pre-diluido 2x inhibió completamente la amplificación no exponencial en muestras negativas y ralentizó significativamente la amplificación exponencial en las muestras positivas. El BPW diluido 5x tuvo sólo un efecto de ralentización leve en ambas amplificaciones. De manera similar, la adición de 3mM de CTP inhibió completamente la amplificación no exponencial en las muestras negativas y ralentizó significativamente la amplificación exponencial en las muestras positivas, mientras que 2mM de CTP sólo ralentizó ambas amplificaciones. Esto muestra que la amplificación conducida por Tli-RNasaH casi lineal actuó como un control interno efectivo para la detección de inhibidores.

10 Ejemplo 5

Los resultados del modelado matemático de las cinéticas exponenciales y no exponenciales lentas requeridas para el control de inhibición interno en NAAT en un único tubo de ensayo se muestran en la Figura 8a. Los resultados del modelado matemático del efecto del inhibidor en el único parámetro en la detección en tiempo real de la NAAT con un control de inhibición interno se muestran en la Figura 8b.

Ejemplo 6

Se hizo una mezcla de reacción de los siguientes constituyentes a 4° C: 20 mM de Tris-HCl pH 8,8, 10 mM de (NH₄)₂SO₄, 10 mM de KCl, 4,8 mM de MgSO₄, 0,1% de Triton X-100, 500 µM de cada uno de dNTP, 10 U de RNasaOut, 25 pmol Lm-InIA-RDCus3r2d (tgactgaaccagctaagcctgUAAaa), 25 pmol de Lm-InIA-RDCus3r2d (cgttgctgtgtagctgtaatacUAAat), 6,25 pmol de InIA Df-v2 (ataatctactgtttgagatg), 6,25pmol de InIA Db-v2 (taatgctaagttcatgtg), 0,1 mg/ml de LH2, 0,5 mM de APS, 140 µg de rLUC, 3,125 U de ATP sulfurilasa, 4 \$ U de fragmento grande de Bst polimerasa, 1 U de Tli RNasa H II. Se añadieron 20 µl de la mezcla anterior a dos tubos separados que contenían 5 µl de 0 10 ó 0 copias de un plásmido que alberga el gen InIA. Las reacciones se colocaron de 4° C a un sistema de formación de imágenes BART y se ejecutó durante 260 minutos a 60° C con 240 adquisiciones de imágenes.

En gris claro punteado se muestra la amplificación exitosa de la molécula de ADN objetivo como se evidencia por el rápido aumento y después la todavía más rápida disminución en la luz de la muestra. Esta amplificación tiene lugar en presencia del control interno. En negro sólido se muestra el resultado de la amplificación cuando no hay presente ADN objetivo y la única amplificación detectada es del control interno.

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para determinar la presencia y/o cantidad de un primer ácido polinucleico en una muestra que comprende someter a la muestra a amplificación de ácidos nucleicos en la que el producto se puede detectar por la presencia de una señal generada por la formación del ácido polinucleico a partir del primer polinucleótido **caracterizado porque** la reacción de amplificación de ácidos nucleicos se realiza, en el mismo recipiente de reacción, con una cantidad predeterminada de un segundo ácido polinucleico que se somete a amplificación de ácidos nucleicos, el producto de la cual se puede detectar por la presencia de la misma señal generada por la formación de ácidos polinucleicos a partir del segundo polinucleótido como la generada por la formación de ácidos polinucleicos a partir del primer polinucleótido en el que las señales de la amplificación del primer ácido polinucleico y el segundo ácido polinucleico se resuelven en base a un conjunto de lecturas de señal frente a tiempo y en el que el producto del segundo ácido polinucleico se produce con diferentes cinéticas de reacción del producto del primer ácido polinucleico de tal manera que el segundo ácido polinucleico actúa como un control interno para el método.
- 10
- 15 2. El método de la reivindicación 1 en el que
- (a) el primer ácido polinucleico se amplifica en amplificación de ácidos nucleicos exponencial y el control interno se amplifica en amplificación nucleica no exponencial;
- 20 (b) el primer ácido polinucleico se amplifica usando amplificación de ácidos nucleicos no exponencial y el control interno se amplifica usando amplificación nucleica exponencial; o
- (c) el primer ácido polinucleico se amplifica usando amplificación de ácidos nucleicos exponencial y el control interno también se amplifica usando amplificación de ácidos nucleicos exponencial, y en el que las dos amplificaciones de ácidos nucleicos tienen diferentes cinéticas de reacción.
- 25 3. El método de las reivindicaciones 1, 2a o 2b en el que la amplificación nucleica exponencial se selecciona del grupo consistente de reacción de cadena de polimerasa, Amplificación por Desplazamiento de la Cadena (SDA), Amplificación Isotérmica mediada por Bucle (LAMP), Amplificación Quimérica Isotérmica de Ácidos Nucleicos (ICAN), Proceso de Amplificación SMart (SMAP), Reacción de Desplazamiento Quimérico (RDC), Amplificación en círculo rodante (exponencial) (RCA-exponencial), Amplificación Basada en Secuencia de Ácidos Nucleicos (NASBA), Amplificación mediada mediante Transcripción (TMA), Amplificación Dependiente de Helicasa (HAD) y Amplificación de Polimerasa Recombinasa (RPA) y/o en el que la amplificación nucleica lineal se selecciona del grupo consistente de amplificación en círculo rodante, reacción de cadena de polimerasa asimétrica (PCR asimétrica), amplificación en círculo rodante, PCR asimétrica y LAMP asimétrica.
- 30
- 35 4. El método de la reivindicación 2c, en el que
- (a) la amplificación de ácidos nucleicos del primer ácido polinucleico y el control interno difieren en uno o más de los siguientes parámetros:
- 40 (i) amplitud
- (ii) tiempo de retardo antes de la amplificación máxima o
- (iii) tasa intrínseca de amplificación; o
- 45 (b) la amplificación de ácidos nucleicos implica el uso de cebadores que enlazan con los dos sitios de enlace de cebadores en el ácido polinucleico y en el que los sitios de enlace de cebadores están más separados en el control interno en comparación con el primer ácido polinucleico;
- (c) la amplificación de ácidos nucleicos implica el uso de cebadores que enlazan con los dos sitios de enlace de cebadores en el ácido polinucleico y en el que los sitios de enlace de cebadores están separados por una región que es más lenta de copiar para una polimerasa en comparación con el polinucleótido objetivo; o
- 50 (d) la amplificación de ácidos nucleicos implica el uso de cebadores que enlazan con los dos sitios de enlace de cebadores en el ácido polinucleico y en el que uno o ambos sitios de enlace en el control interno contienen desajustes que provocan que la amplificación tenga lugar menos eficientemente en el control interno en comparación con la amplificación del primer ácido polinucleico.
- 55 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4, en el que la amplificación de ácido nucleicos implica el uso de uno o más cebadores que enlazan con los sitios de enlaces de cebadores en el ácido polinucleico y al menos uno de los sitios de enlace de cebadores usados para amplificar exponencialmente la primera secuencia de polinucleótidos está o parcialmente ausente o es no óptimo en el control interno para lograr diferentes cinéticas de reacción.
- 60 6. El método de la reivindicación 4, en el que uno de los sitios de enlace de cebadores presentes en el primer ácido polinucleico está ausente en el control interno y en el que la amplificación de ácidos nucleicos requiere dos sitios de enlace de cebadores.
- 65 7. El método de la reivindicación 5, en el que uno o ambos sitios de enlace de cebadores están presentes en una

molécula del ácido polinucleico circular pero en una orientación que evita la amplificación exponencial y en el que la reacción de amplificación requiere dos sitios de enlace de cebadores.

- 5 **8.** El método de la reivindicación 1, en el que el primer ácido polinucleico y el control interno se amplifican por diferentes técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.
- 9.** El método de las reivindicaciones 1-7, en el que el primer ácido polinucleico y el control interno tienen menos de un 100% de homología.
- 10 **10.** El método de las reivindicaciones 1-9, en el que
- (a) la reacción se realiza en un recipiente sellado; y/o
 - (b) la señal usada para la detección de los productos de la amplificación se selecciona del grupo consistente de: una señal fluorescente, una señal electroquímica, una señal bioluminiscente y turbidez.
- 15 **11.** El método de la reivindicación 10b, en el que la señal bioluminiscente se detecta por ensayo bioluminiscente en tiempo real.
- 20 **12.** El método de las reivindicaciones 1-11, en el que
- (a) la amplificación del primer ácido polinucleico y el control interno se realiza con la misma técnica de amplificación pero en el que la amplificación del primer ácido polinucleico y el control interno pueden controlarse por condiciones extrínsecas; y/o
 - (b) la amplificación del primer ácido polinucleico y el control interno se realiza a temperaturas diferentes; y/o
 - (c) los cebadores usados para la amplificación del primer ácido polinucleico y el control interno tienen diferentes valores de T_m .
- 25 **13.** El método de las reivindicaciones 1-12 para
- (a) su uso en aplicaciones diagnósticas;
 - (b) detectar un organismo en una muestra; o
 - (c) detectar un microorganismo en una muestra.
- 30 **14.** Un kit para realizar el método de las reivindicaciones 1-13 que comprende un ácido polinucleico para su uso como un control interno y cebadores que permiten la amplificación del primer ácido polinucleico y el control interno con diferentes cinéticas de reacción, en el que el kit comprende componentes para detectar una señal electroquímica, turbidez, señal bioluminiscente o señal fluorescente de tal manera que los productos de la amplificación de dicho primer ácido polinucleico y dicho control interno pueden detectarse por la misma señal y las señales de la amplificación del primer ácido polinucleico y el control interno pueden resolverse en base a un conjunto de lecturas de señal frente a tiempo.
- 35 **15.** El kit de la reivindicación 14, que comprende:
- (a) un ácido polinucleico de control que contiene al menos dos sitios de enlace de cebadores que están separados por una región que es más lenta de copiar para una polimerasa en comparación con el polinucleótido objetivo y dos cebadores que pueden enlazar con dichos sitios de enlace de cebadores en el ácido polinucleico de control;
 - (b) al menos dos cebadores que enlazan con al menos dos sitios de enlace de cebadores en el ácido polinucleico objetivo y en el ácido polinucleico de control que contienen desajustes que provocan que la amplificación tenga lugar menos eficientemente en el control en comparación con la amplificación del primer ácido polinucleico;
 - (c) un ácido polinucleico de control y cebadores que dan lugar en el ácido polinucleico de control a ser amplificados por una técnica de amplificación de ácidos nucleicos diferente en comparación con el ácido polinucleico objetivo;
 - (d) un ácido polinucleico de control que es un ácido polinucleico circular y que contiene dos sitios de enlace de cebadores, y cebadores que enlazan con el ácido polinucleico de control en una orientación que evita la amplificación exponencial del ácido polinucleico de control;
 - (e) uno o más cebadores que enlazan con los sitios de enlace de cebadores en el ácido polinucleico, en donde al menos uno de los sitios de enlace de cebadores usados para amplificar exponencialmente la primera secuencia de polinucleótidos está o parcialmente ausente o no es óptima en el control interno para lograr diferentes cinéticas de reacción;
 - (f) uno o más cebadores que permiten la amplificación del primer ácido polinucleico y el control interno a diferentes temperaturas;
 - (g) cebadores para la amplificación del primer ácido polinucleico y para la amplificación del ácido nucleico de control, en donde la temperatura de fusión de los cebadores usados para la amplificación del primer ácido
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

polinucleico y el ácido nucleico de control tienen una temperatura de fusión diferente; o
(h) un ácido polinucleico de control que comprende sólo uno de los sitios de enlace de cebadores presentes en el primer ácido polinucleico.

5 **16.** El kit de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en el que el kit comprende una luciferasa termoestable, luciferina y un enzima que convierte PPi a ATP y cualquier otro sustrato o cofactor requerido del enzima que convierta PPi a ATP.

10 **17.** El kit de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que

(a) la amplificación de ácidos nucleicos es exponencial y requiere dos sitios de enlace de cebadores y uno de los sitios de enlace de cebadores presentes en la primera secuencia de polinucleótidos está ausente en el control interno, de tal manera que la amplificación de ácidos nucleicos del primer ácido polinucleico y el control interno difieren en uno o más de los siguientes parámetros:

- 15
- i. amplitud;
 - ii. tiempo de retardo antes de la amplificación máxima; o
 - iii. tasa intrínseca de amplificación

20 (b) en el que los cebadores enlazan con dos sitios de enlace de cebadores en el ácido polinucleico y en el que los sitios de enlace de cebadores están más separados en el control interno en comparación con el primer ácido polinucleico, de tal manera que las dos amplificaciones de ácidos nucleicos son exponenciales y tienen diferentes cinéticas de reacción.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

Ecuación para curva de Richard :
$$Y = A + \frac{C}{(1 + Te^{-B(X-M)})^{1/T}}$$

Y = Acido nucleico sintetizado durante la amplificación
 X = Tiempo
 A: asíntota inferior C: asíntota superior
 M: tiempo de tasa máxima de síntesis de ácidos nucleicos
 B: Tasa de amplificación T: estados cerca de cuya asíntota tiene lugar la tasa máxima de síntesis de ácidos nucleicos

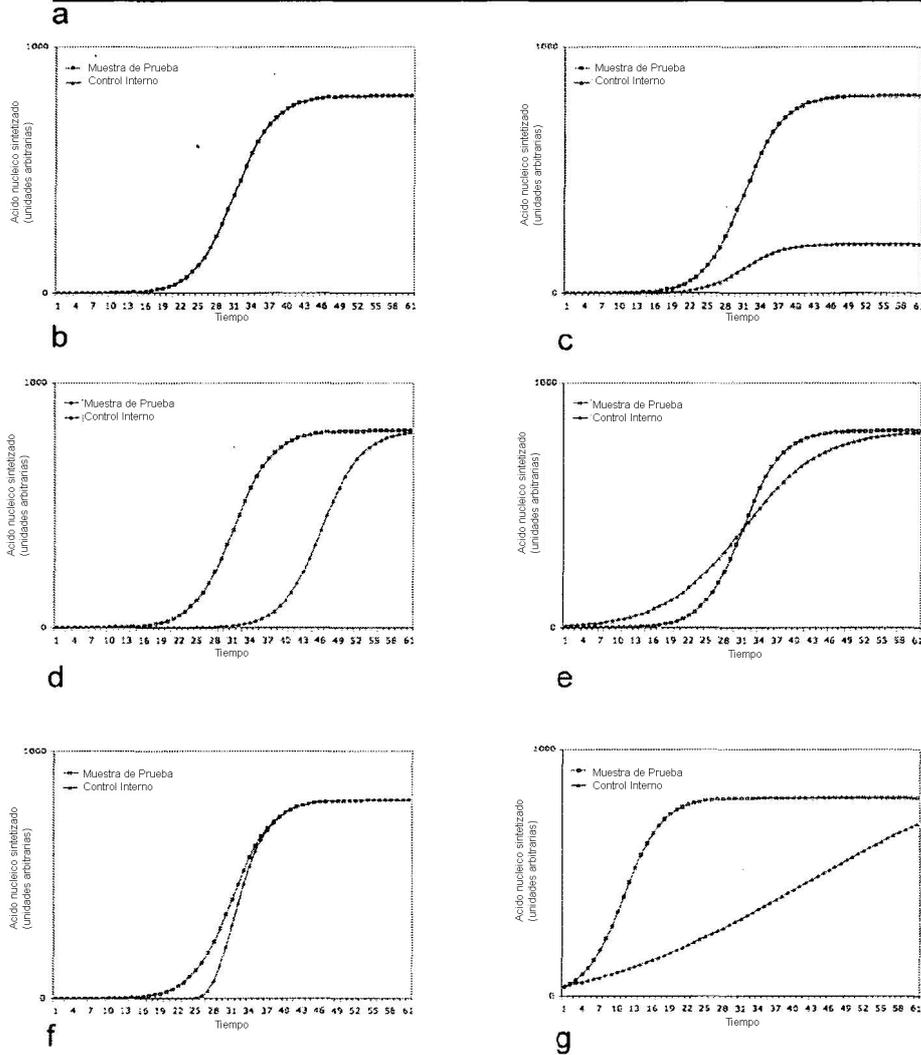
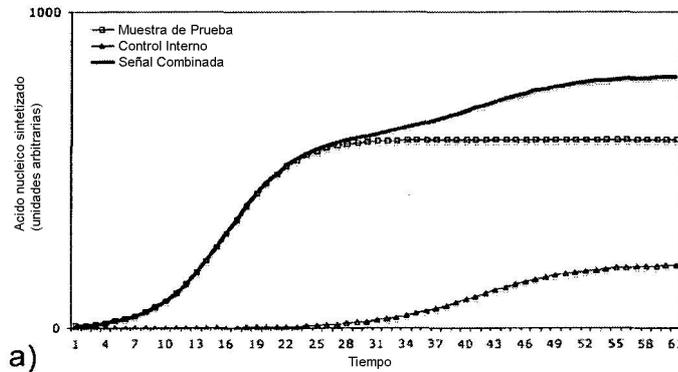


Figura 2

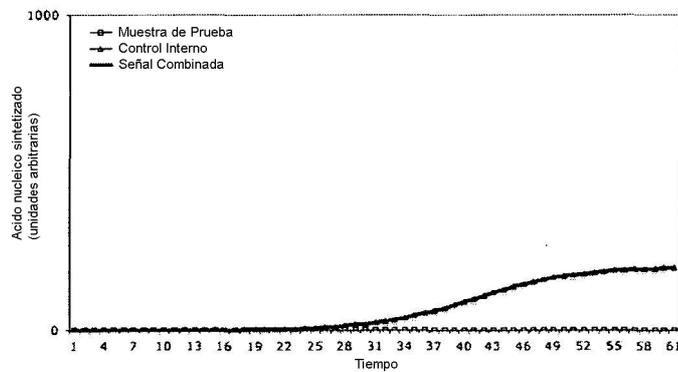


Ensayo positivo

La secuencia objetivo se amplifica rápidamente de la muestra de prueba; el control inhibitor también se amplifica, pero más lentamente

Puede observarse que en principio, la señal observada puede indicar la amplificación de tanto el objetivo como el control ya que es claramente un componente de los dos procesos

a)

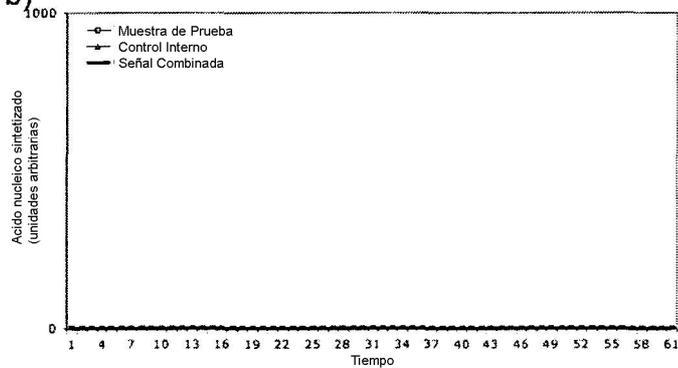


Ensayo negativo

La secuencia objetivo no se amplifica de la muestra de prueba; Se amplifica el control inhibitor.

N.B. como la señal del control muestra cinéticas más lentas, es posible a partir de la señal combinada observada realmente medida, deducir que esta señal debe ser del control y no de la muestra de prueba.

b)



Ensayo inhibido

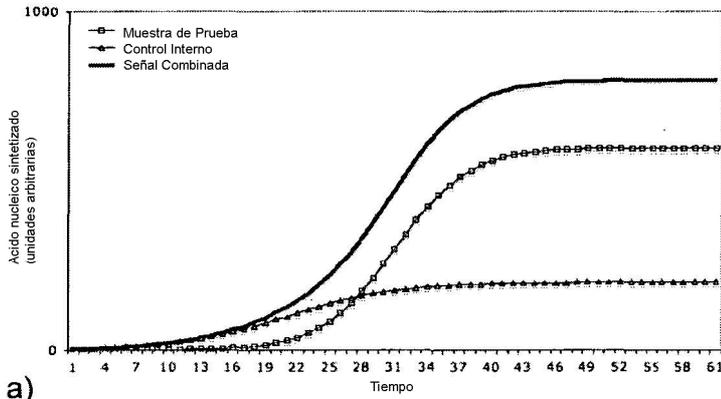
No se amplifican ni la muestra de prueba ni el control interno

No se puede sacar conclusión diagnóstica del ensayo

c)

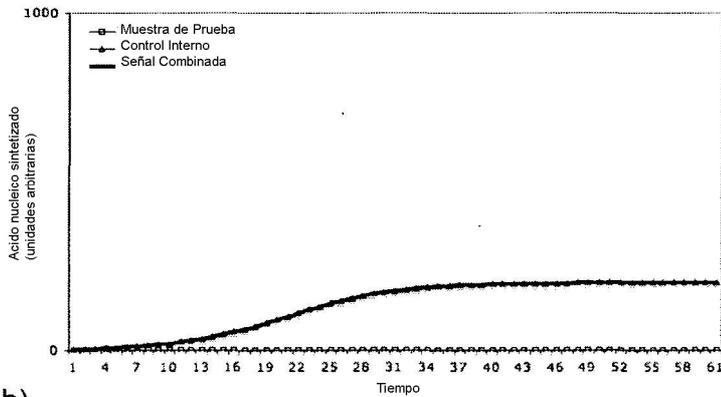
N.B. en todas las "Señales Combinadas" anteriores la señal se mide realmente durante el ensayo

Figura 3



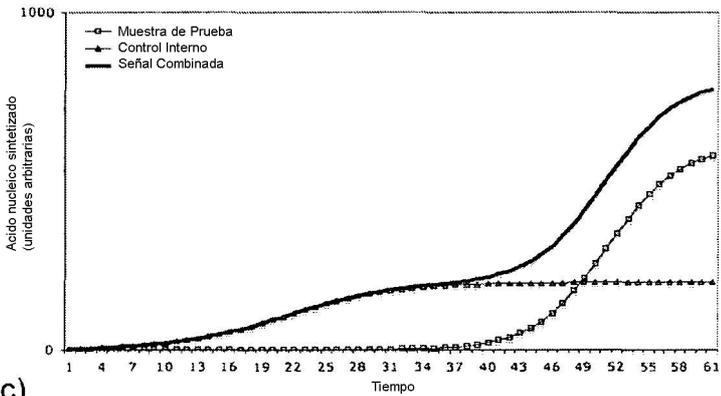
Como antes pero el control interno tiene un 'tiempo para la tasa de amplificación máxima' anterior que en la figura 2a, pero una tasa intrínseca más lenta de amplificación

a)



Idem

b)



En este ejemplo, la señal de la muestra positiva llega muy tarde en el ensayo, después de que la señal de control empieza a aparecer.

Sin embargo, es aún muy claro de la señal observada (es decir, la señal combinada) que la amplificación de la muestra de prueba ha tenido lugar

c)

Figura 4

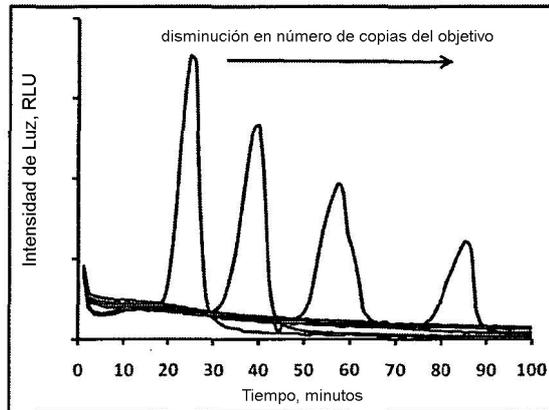


Figura 5

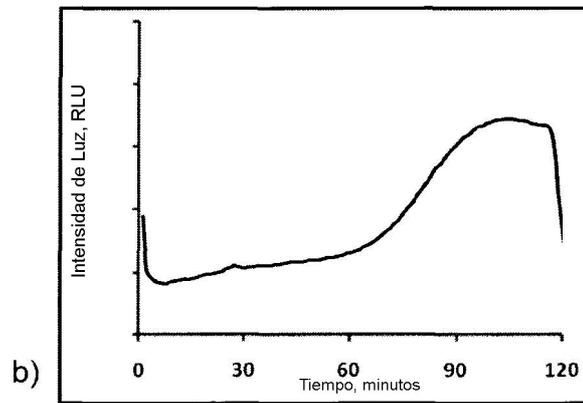
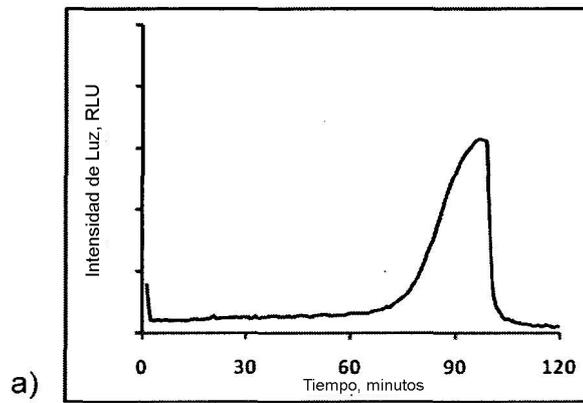


Figura 6

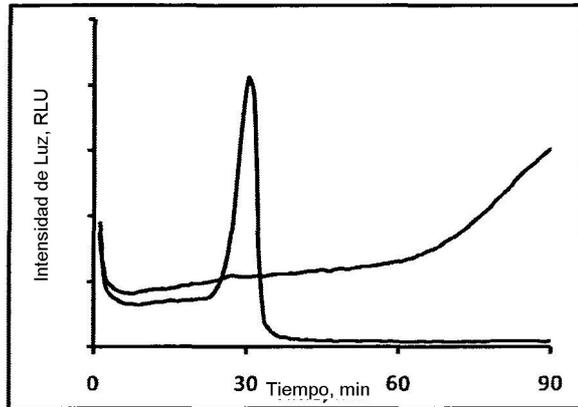


Figura 7

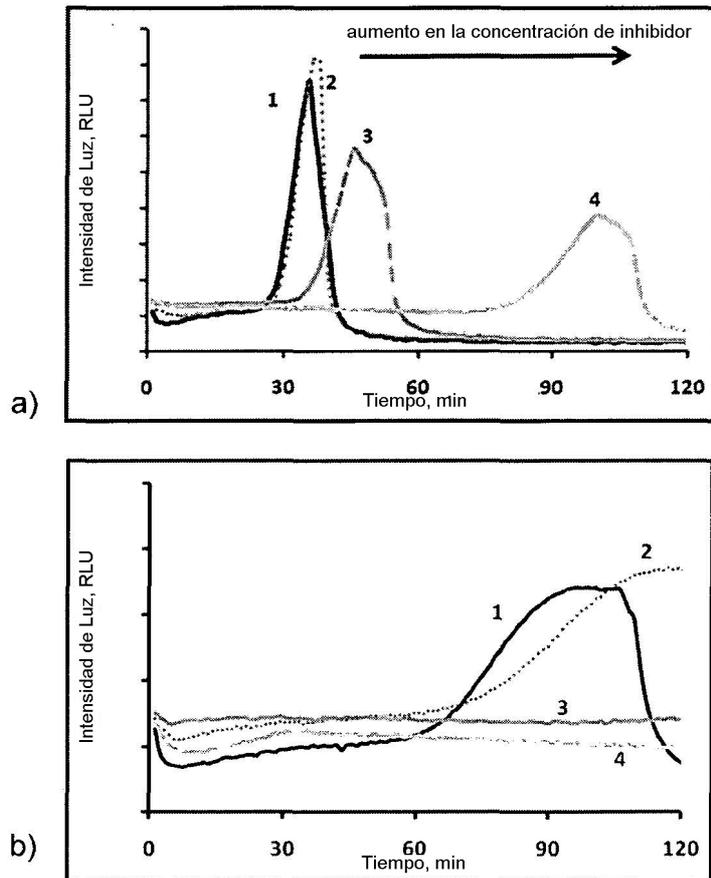


Figura 7

c)

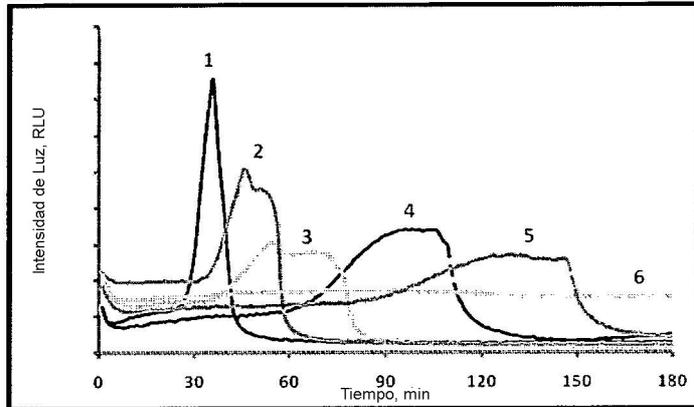


Figura 8

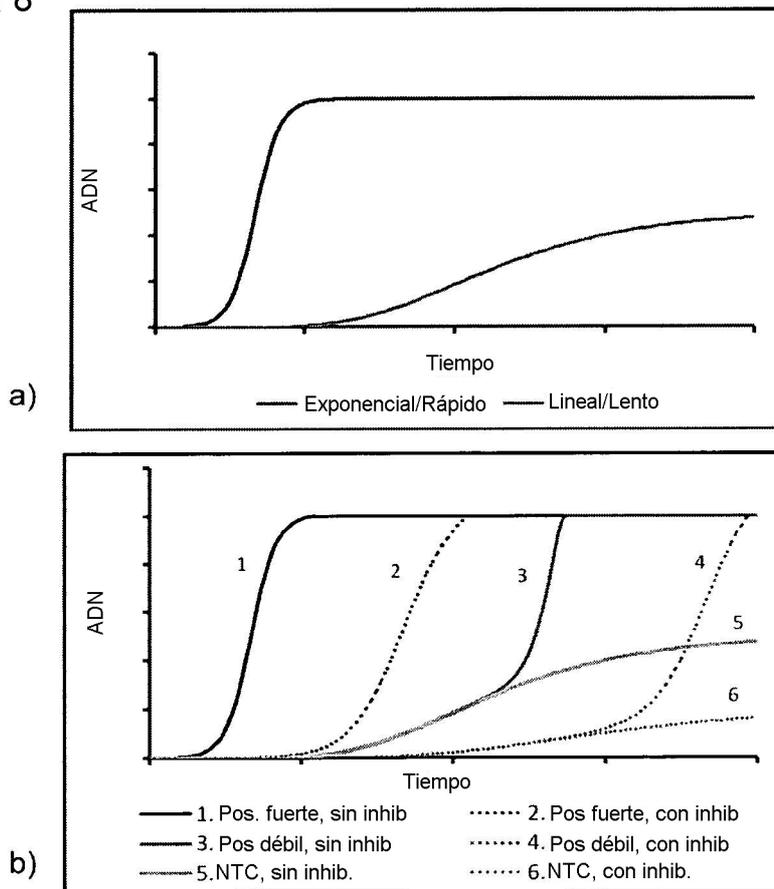


Figura 9

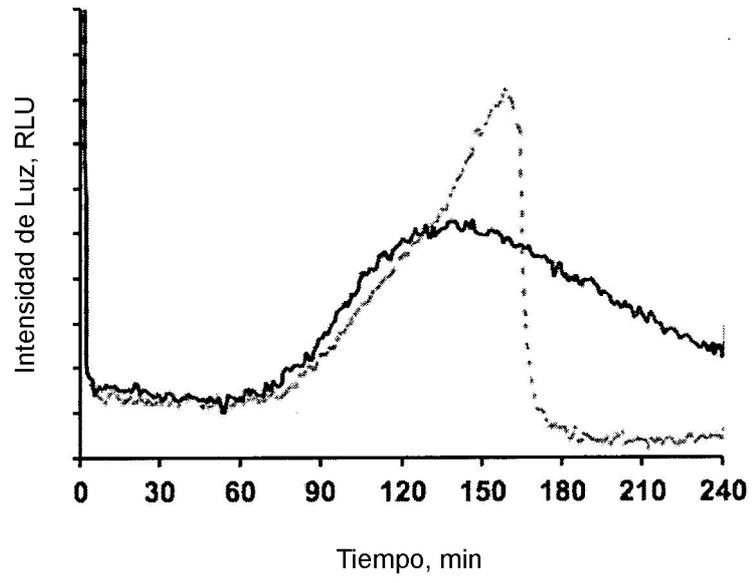


Figura 10

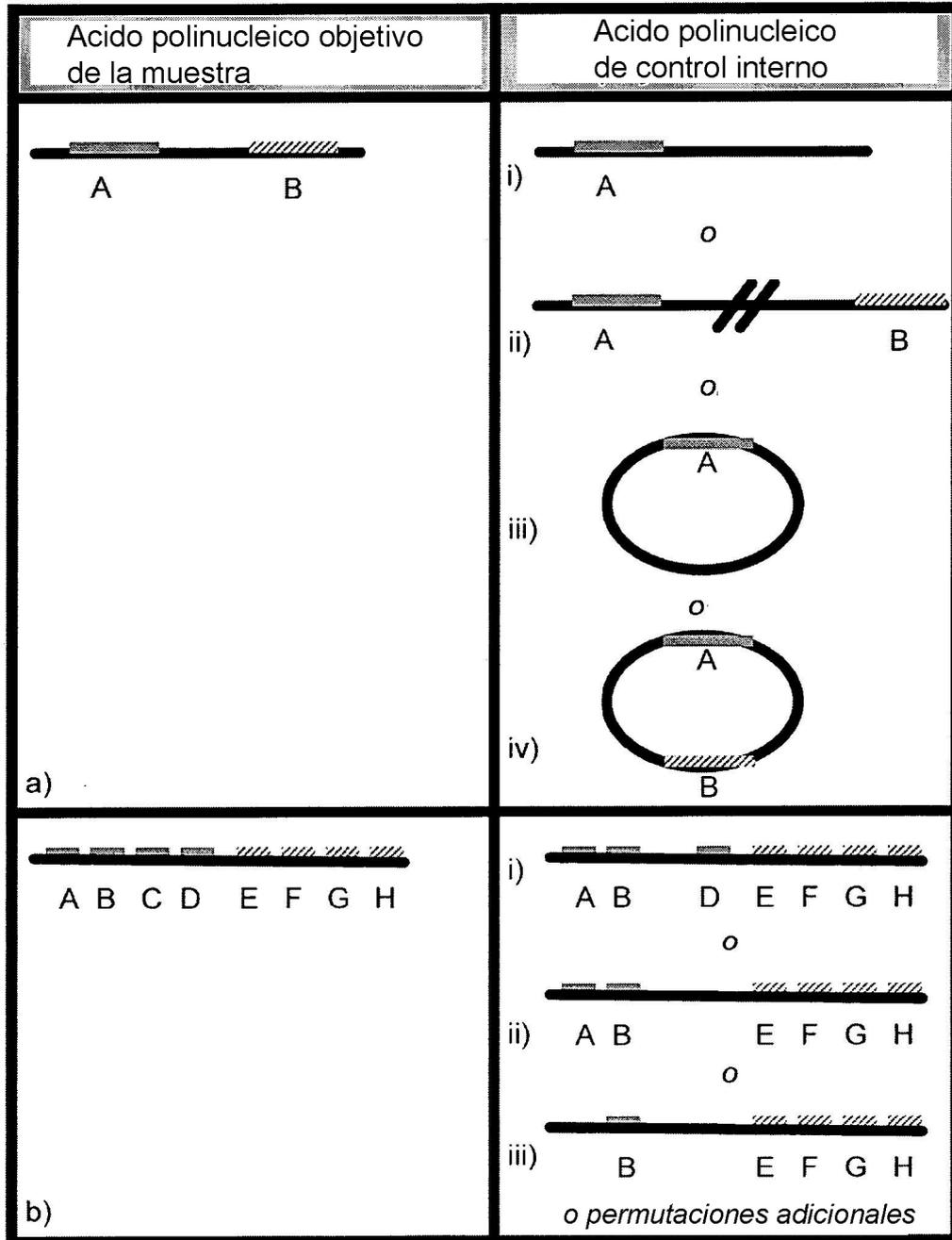


Figura 11

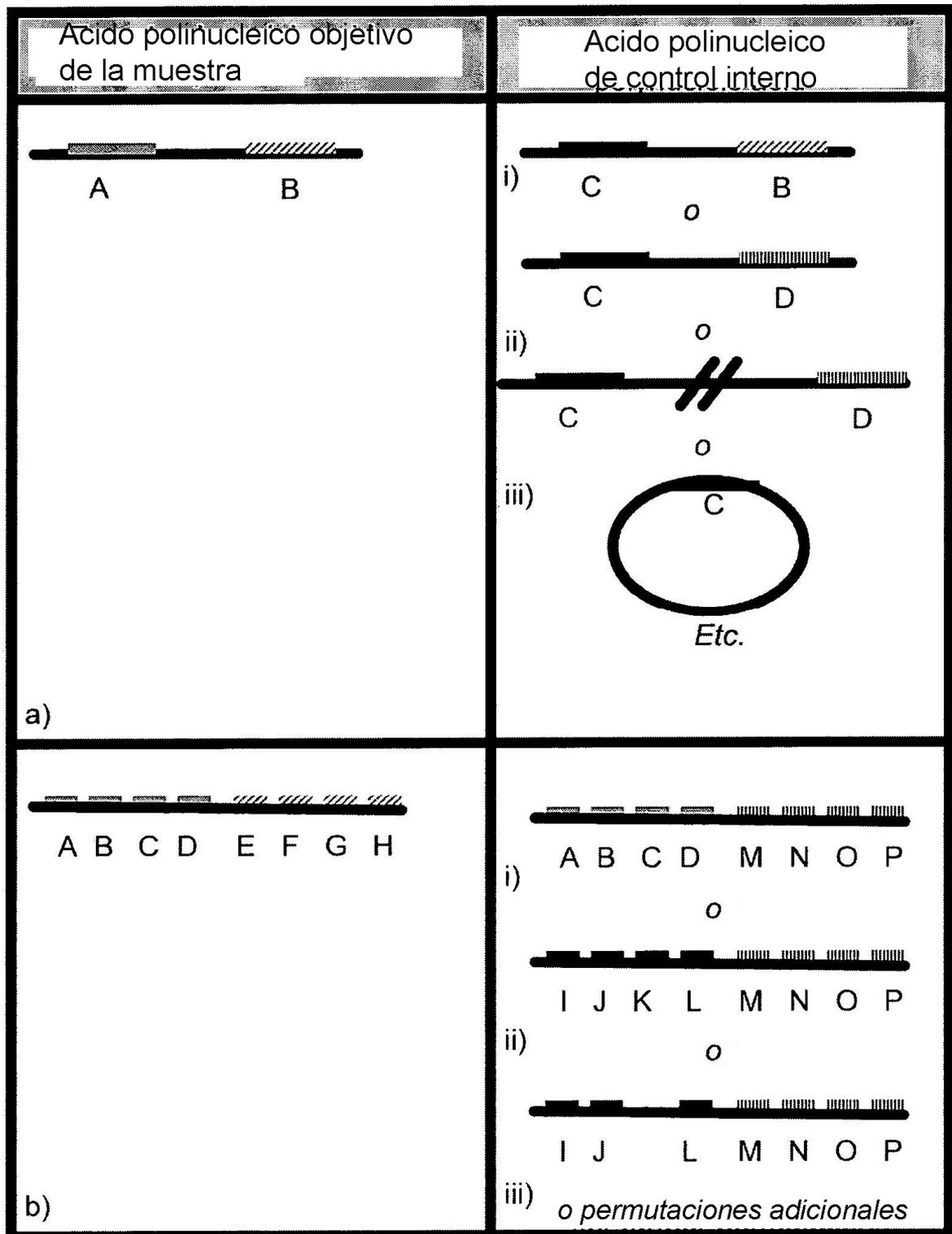


Figura 12

