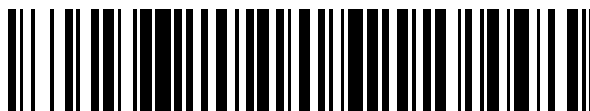


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 286**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2013 E 13189020 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2722403**

54 Título: **Procedimiento para prevenir productos de alto peso molecular durante la amplificación**

30 Prioridad:

18.10.2012 US 201261715464 P
18.10.2012 EP 12189009

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
02.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BABIEL, REINER;
BERGMANN, FRANK y
SIZMANN, DOROTHEA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 628 286 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

Procedimiento para prevenir productos de alto peso molecular durante la amplificación

5 Campo de la invención

La presente invención perteneciente al campo del diagnóstico *in vitro* se refiere a procedimientos mejorados para amplificar y detectar una diana de ácido nucleico que puede estar presente en una muestra biológica, que comprenden al menos un par de cebadores para generar un amplicón, en los que al menos un cebador está modificado en el extremo 5' con una secuencia de poliN que no es complementaria a la secuencia diana, y una sonda detectable específica para dicho amplicón. La mejora se basa en particular en el hecho de que se previene o suprime parcial o completamente la formación de productos secundarios distintos del amplicón diseñado, es decir, de productos de alto peso molecular durante la amplificación. Si se usa la presente invención en aplicaciones de tipo diagnóstico, se evitan resultados falsos negativos o falsos positivos. La invención proporciona adicionalmente el uso de cebadores apropiadamente modificados y un kit que comprende dichos cebadores para prevenir o suprimir la formación de productos de alto peso molecular durante la amplificación y detección de la diana de ácido nucleico.

Antecedentes de la invención

En el campo del diagnóstico molecular, la amplificación y detección de ácidos nucleicos es de considerable importancia. Los ejemplos de aplicaciones de diagnóstico de detección y amplificación de ácidos nucleicos son la detección de virus, tales como virus de los papilomas humanos (VPH), virus del Nilo Occidental (VNO) o el cribado ordinario de donaciones de sangre para detectar la presencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB) y/o C (VHC). Dichas técnicas de amplificación y detección también son adecuadas para dianas de ácido nucleico bacteriano o el análisis de marcadores oncológicos o similares.

El procedimiento más prominente y ampliamente usado para la amplificación y detección de dianas de ácido nucleico es la reacción en cadena de la polimerasa, que usa una enzima polimerasa (PCR, documentos US 4.683.195 y US 4.683.202). Las mejoras significativas relacionadas son, por ejemplo, la detección en tiempo real de productos amplificados durante la PCR usando oligonucleótidos modificados que portan grupos indicadores o marcadores conocidos como sondas 5'-nucleasa o de hidrolización, tal como se usa en ensayos comerciales en COBAS® TaqMan® (documentos US 5.210.015 y US 5.487.972). Otros procedimientos de amplificación y detección mejorados se conocen como tecnología de balizas moleculares (documento WO 95/13399) o procedimientos que utilizan un oligonucleótido que comprende una porción de ligando de unión al surco menor (MGB) (documentos WO 03/062445 y WO 2006/135765).

Se sabe adicionalmente que el uso de cebadores que contienen un oligonucleótido añadido con un contenido en GC alto en el extremo 5' de al menos uno de estos cebadores presenta una mejora en la eficiencia de amplificación (Q. Liu *et al.*, Genome Research vol. 7 (1997), p. 389-398; documento WO 01/94638; documento US 2004/0110182). La cantidad final del producto amplificado después de aproximadamente 12 a 40 ciclos de PCR es notablemente más alta para cebadores en los que, por ejemplo, se ha añadido una unidad GGAC a los extremos 5' que para los cebadores no modificados.

Afonina *et al.* (BioTechniques vol. 43(3) (2007), p. 1-3; documento WO 2006/135765) describen el incremento de la señal fluorescente de la PCR en tiempo real y/o el incremento de los valores de Ct y obtienen así una eficiencia de amplificación mejorada usando cebadores con solapas cortas ricas en adenina y timina, que se dispersan aleatoriamente, en las sondas de hibridación fluorescente del extremo 5' y ligando de unión al surco menor (MGB). También se usan cebadores que contienen una solapa rica en AT sin complemento en 5', que son de 12 nucleótidos de longitud, para incrementar la fluorescencia global en los ensayos de RT-PCR para la detección de diversos virus de la gripe (Hymas *et al.*, Journal of Virological Methods, Elsevier BV, NL, vol. 167/n.º 2 (2010), p. 113-118). El documento US 2009/0291475 también se dirige al objetivo de reducir la probabilidad de hibridación no específica de cebadores (tal como dímeros de cebadores) durante las etapas de amplificación posteriores proporcionando cebadores que contengan una región no complementaria en un segmento intermedio 5' flanqueado por una región de cebado universal adicional.

Además, en algunos ensayos de PCR, los productos secundarios como la formación de productos de alto peso molecular pueden tener un impacto sustancial en la eficiencia de amplificación, por ejemplo, crean resultados falsos positivos o falsos negativos. En particular, para muestras de valor cuantitativo bajo se espera una disminución o ausencia de las señales de detección debido a la formación de productos de amplificación de alto peso molecular que dan lugar a resultados falsos negativos. La eficiencia de amplificación es habitualmente más reducida cuantos más ciclos de PCR se lleven a cabo.

En las reacciones de PCR cuantitativa a menudo se añade un patrón de validación y cuantificación interno y se coamplifica. Controla los procedimientos de preparación y amplificación y compensa los efectos de la inhibición. La formación de productos de alto peso molecular durante la amplificación del patrón interno puede dar lugar a señales suprimidas y un patrón inválido de modo que se invalida la reacción de PCR que se controla por el patrón de

validación y cuantificación interno. Sin embargo, los cebadores que contienen la cola descritos en la técnica anterior, por ejemplo, en los documentos WO 2008/064687 o WO 2012/032510, no son adecuados para prevenir o suprimir la formación de productos de alto peso molecular de amplicones producidos, más, por cuanto más tiempo se realice la reacción de amplificación o cuantos más ciclos de PCR se lleven a cabo. Los cebadores que contienen la cola descritos pueden reducir bien la formación de productos de amplificación no específicos basados en los cebadores aplicados.

Una fuente de resultados falsos positivos es la "contaminación por arrastre", donde un producto de PCR (amplicón) de una reacción de PCR previa contamina ensayos de PCR posteriores. El contaminante se puede transmitir por un auxiliar de laboratorio, un instrumento o incluso por medio de un aerosol. Los productos de alto peso molecular son más resistentes que los amplicones únicos a las medidas de prevención de la contaminación, como las uracil-ADN glucosilasas (documento US 6.713.294) y, por lo tanto, incrementan significativamente el riesgo de contaminación por arrastre. En una muestra verdadera negativa, donde está ausente el ácido nucleico diana, el contaminante crea un resultado falso positivo. En una muestra verdadera positiva, donde está presente el ácido nucleico diana, el contaminante se coamplifica con la diana verdadera. Dicha coamplificación puede distorsionar un resultado de un ensayo cuantitativo, donde se debe determinar la cantidad exacta de la diana verdadera.

De esta manera, existe la necesidad en la técnica de proporcionar un procedimiento para la amplificación y detección simples y fiables de una diana de ácido nucleico. En particular, existe la necesidad de proporcionar un procedimiento mejorado apropiado que se centre en la supresión de los subproductos de alto peso molecular.

Descripción de la invención

La presente invención se refiere a nuevos procedimientos y usos para amplificar y detectar una diana de ácido nucleico que puede estar presente en una muestra biológica, que comprenden al menos un par de cebadores para generar un amplicón, en los que al menos un cebador está modificado en el extremo 5' con una secuencia de poliN que no es complementaria a la secuencia diana, y una sonda detectable específica para dicho amplicón o un tinte de unión a ADN. En particular, la mejora se basa en el hecho de que se previene o suprime parcial o completamente la formación de productos de alto peso molecular durante la amplificación y, de esta manera, por ejemplo, se evitan los resultados falsos negativos o falsos positivos. De esta manera, un objeto de la invención, como se define en la reivindicación 1, es:

Un procedimiento para amplificar y detectar una diana de ácido nucleico en una muestra biológica, en el que se previene o suprime la formación de productos de alto peso molecular durante la amplificación, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

a) poner en contacto los ácidos nucleicos en dicha muestra con reactivos de amplificación que comprendan al menos una polimerasa, nucleósidos trifosfato u otros monómeros de nucleósido, un cebador directo extendido o uno inverso extendido para generar un amplicón y una sonda detectable específica para dicho amplicón o un tinte de unión a ADN, en el que al menos uno de dicho cebador directo o dicho inverso extendido comprende una secuencia de poliN añadida al extremo 5' del cebador que no es complementaria a la secuencia diana, en el que dicha secuencia de poliN se selecciona de un grupo que consiste en una secuencia de poliA, una de poliT, una de poliAT, una de poliU, una de poliC y una de poliG y de 2 a 10 nucleótidos de longitud;

b) incubar dichos ácidos nucleicos con dichos reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación, en el que dicha reacción de amplificación no se finaliza antes de 50 ciclos; y

c) detectar dicho amplicón por medio de dicha sonda detectable o tinte de unión a ADN. La presente invención se refiere adicionalmente a nuevos procedimientos y usos para amplificar y detectar una diana de ácido nucleico que puede estar presente en una muestra biológica, que comprenden al menos un par de cebadores para generar un amplicón, en los que ambos cebadores están modificados en el extremo 5' con una secuencia de poliN que no es complementaria a la secuencia diana, y una sonda detectable específica para dicho amplicón o un tinte de unión a ADN. En particular, la mejora se basa en el hecho de que se previene o suprime parcial o completamente la formación de productos de alto peso molecular durante la amplificación y, de esta manera, por ejemplo, se evitan los resultados falsos negativos o falsos positivos.

Otro objeto de la, como se define en la reivindicación 8, es:

Un procedimiento para prevenir o suprimir la formación de productos de alto peso molecular durante la amplificación por PCR, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

a) poner en contacto los ácidos nucleicos en una muestra biológica con reactivos de amplificación que comprendan al menos una polimerasa, nucleósidos trifosfato u otros monómeros de nucleósido, un cebador directo extendido y/o uno inverso extendido para generar un amplicón y una sonda detectable específica para dicho amplicón o un tinte de unión a ADN, en el que al menos uno de dicho cebador directo y/o dicho inverso extendido comprende una secuencia de poliN añadida al extremo 5' del cebador que no es complementaria a la secuencia diana, en el que

dicha secuencia de poliN se selecciona de un grupo que consiste en una secuencia de poliA, una de poliT, una de poliAT, una de poliU, una de poliC y una de poliG y de 2 a 10 nucleótidos de longitud;

b) incubar dichos ácidos nucleicos con dichos reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación, en el que dicha reacción de amplificación no se finaliza antes de 50 ciclos; y

c) detectar dicho amplicón por medio de dicha sonda detectable o tinte de unión a ADN.

Los procedimientos de acuerdo con la invención añaden una serie de mejoras a la técnica: Al prevenir o suprimir la formación de productos de alto peso molecular durante la PCR, la detección posterior del amplicón es más fiable, ya que se evita la supresión de la fluorescencia. Esto se aplica a la amplificación de tanto la diana y/o de un estándar interno. Los productos de alto peso molecular, pero no los amplicones, dan lugar a la supresión de la fluorescencia en reacciones de PCR posteriores. Los procedimientos de la invención, en particular, son ventajosos para la detección de muestras en las que la diana de ácido nucleico está ausente o únicamente contenida en una cantidad de valor cuantitativo bajo cuando se aplican habitualmente al menos 20 ciclos de PCR. En algunos de dichos modos de realización, los ciclos de PCR se finalizan después de más de 30, a veces más de 40, preferentemente más de 50 y lo más preferentemente más de 60 ciclos. Para la mayoría de estas muestras, la reacción de amplificación no se finaliza antes de 50 ciclos. La supresión de dichas reacciones de PCR es incluso más pronunciada en condiciones de bajos niveles subyacentes de contaminación de reacciones de PCR previas.

Los procedimientos de acuerdo con la invención para prevenir o suprimir la formación de productos de alto peso molecular mediante el uso de cebadores extendidos también pueden ser útiles para procedimientos de amplificación en los que no se necesita ninguna sonda o tinte de unión a ADN para la detección.

La expresión "secuencia de poliN" de acuerdo con la presente invención se refiere a una secuencia polinucleotídica que puede contener las cinco bases naturales adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U) o únicamente cuatro, tres, dos o una de estas bases naturales. La secuencia de poliN de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos o múltiples bases idénticas, por ejemplo, (A)_m, (T)_m, (G)_m, (C)_m, (U)_m, en las que m es un número de 2 a 10, o (AT)_n, en la que n es un número de 1 a 5.

Preferentemente, la secuencia de poliN consiste en un tipo de nucleótido que deriva de adenosina (A), timidina (T), uridina (U), citidina (C) o guanosina (G). Se puede añadir la secuencia de poliN a al menos uno de los cebadores usados. La secuencia de poliN añadida a dos o más cebadores puede ser idéntica o diferente. En algunos modos de realización de la invención, los cebadores directo e inverso contienen secuencias de poliN idénticas.

La invención proporciona los procedimientos descritos anteriormente, en los que la secuencia de poliN descrita en la etapa a) comprende una secuencia de poliA, poliT, poliAT, poliU, poliC o poliG. Se usan secuencias de poliN que comprenden un 100 % de un tipo de nucleótido o dos nucleótidos diferentes, que derivan de adenosina (A), timidina (T), adenosina-timidina (AT), uridina (U), citidina (C) o guanosina (G), y en total de 2 a 10 nucleótidos o de 4 a 6 nucleótidos de longitud de acuerdo con la invención. En particular, se usan colas de secuencia de poliN que comprenden de cuatro a seis bases de adenina (A) consecutivas de acuerdo con la invención. La cola de poliN también puede contener nucleótidos modificados como nucleótidos alquilados, tales como N4-etil-dC, N6-metil-dA o 2'-O-metil-nucleótidos o similares, siempre y cuando el oligonucleótido modificado (cebador) tenga la capacidad de hibridarse con su complemento y sirva de molde en una reacción de amplificación.

Adicionalmente, la invención proporciona el uso de un kit para amplificar y detectar un ácido nucleico diana en una muestra biológica mediante cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. Dicho kit comprende al menos una polimerasa, por ejemplo, una polimerasa termoestable, al menos cuatro nucleósidos trifosfato diferentes u otros monómeros de nucleósido, al menos un cebador directo extendido y/o uno inverso extendido para generar al menos un amplicón, en el que al menos uno de dichos cebadores directo e inverso extendidos comprende una secuencia de poliN añadida al extremo 5' del cebador que no es complementaria a la secuencia diana, y al menos una sonda detectable específica para dicho amplicón o un tinte de unión a ADN. Los kits usados de acuerdo con la presente invención son aquellos, en los que dicha secuencia de poliN comprende una secuencia de poliA, una de poliT, una de poliAT, una de poliU, una de poliC, una de poliG que es de 2 a 10 nucleótidos de longitud. La secuencia de poliN se puede acoplar a al menos uno de los cebadores usados. La secuencia de poliN acoplada a dos o más de los cebadores puede ser idéntica o diferente. En algunos modos de realización de la invención, el kit usado comprende un cebador directo y un cebador inverso que contienen secuencias de poliN idénticas. El kit puede comprender adicionalmente cebadores y sondas, enzimas como uracil-N-glucosilasa, aptámero, componentes de tampón y detergentes adicionales o similares.

Para ayudar a la comprensión de la invención, a continuación, se definen varios términos.

Una "muestra biológica" puede ser cualquier muestra de origen natural. Por ejemplo, una "muestra biológica" deriva de un ser humano y es un líquido corporal o tejido del cuerpo. En un modo de realización de la invención, la "muestra biológica" es sangre.

El término “nucleósido” se refiere a un compuesto que consiste en una base enlazada al carbono C-1' de un azúcar, por ejemplo, ribosa o desoxirribosa. La porción de base del nucleósido es habitualmente una base heterocíclica, por ejemplo, una purina o pirimidina.

El término “nucleótido” se refiere a un éster fosfato de un nucleósido, como una unidad monomérica o en un polinucleótido. “Nucleósido 5'-trifosfato” se refiere a un nucleótido con un grupo éster trifosfato acoplado a la posición del 5'-carbono del azúcar, y a veces se denota “NTP” o “dNTP” y “ddNTP”. Un nucleótido modificado es cualquier nucleótido (por ejemplo, ATP, TTP, UTP, GTP o CTP) que se ha modificado químicamente, típicamente mediante modificación de la base, azúcar o resto de fosfato. Por ejemplo, los nucleótidos modificados incluyen, pero no se limitan a, restos de bases, tales como N4-etilcitosina, N6-metiladenina, N6-terc-butilbenciladenina o N4-terc-butilbencilcitosina, 5-metilcitosina, 6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo, 5-yodouracilo y 6-tioguanina o modificaciones de azúcares, tales como 2'-O-metil-ribosa y 2'-fluoro- o 2'-amino-2'-desoxirribosa o similares. Como se usa en el presente documento, el término “análogo de nucleótido” se refiere a cualquier nucleótido que no sea natural.

La expresión “otro monómero de nucleósido” se refiere a nucleósidos activados con fosfato distintos de nucleósidos trifosfato estándar que se puedan emplear en la síntesis de polinucleótidos enzimáticos, como, por ejemplo, nucleósidos tetrafosfato o similares.

Los términos “ácido nucleico diana” y “región diana” se refieren a una región de un ácido nucleico que se ha de amplificar, detectar o de otro modo analizar. La secuencia con la que se hibrida un cebador o sonda se puede denominar una “secuencia diana”.

Los términos “ácido nucleico” y “oligonucleótido” se refieren a cebadores, sondas y fragmentos de oligómeros que se van a detectar, y son genéricos para polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), para polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa) y para cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N-glucósido de una base de purina o pirimidina, o base de purina o pirimidina modificada. No existe una distinción intencionada en la longitud entre los términos “ácido nucleico” y “oligonucleótido”, y estos términos se usan indistintamente. Estos términos se refieren únicamente a la estructura primaria de la molécula. De esta manera, estos términos incluyen ADN monocatenario y bicatenario, así como ARN monocatenario y bicatenario, así como una doble cadena de ARN y ADN.

El tamaño exacto de un oligonucleótido depende de muchos factores y el uso o función final del oligonucleótido. Se pueden preparar oligonucleótidos mediante cualquier procedimiento adecuado, incluyendo, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas y síntesis química directa mediante un procedimiento, tal como el procedimiento de fosfotriéster de Narang *et al.*, 1979, Meth. Enzymol. 68:90-99; el procedimiento de fosfodiéster de Brown *et al.*, 1979, Meth. Enzymol. 68:109-151; el procedimiento de fosforamidita de Beaucage *et al.*, 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862; y el procedimiento de soporte sólido descrito en el documento US 4.458.066. Se proporciona una revisión de los procedimientos de síntesis en Goodchild, 1990, Bioconjugate Chemistry 1(3):165-187.

Los términos “amplificación”, “amplificar” y similares se refieren generalmente a cualquier procedimiento que da como resultado un incremento en el número de copias de una molécula o conjunto de moléculas relacionadas. Puesto que se aplica a moléculas polinucleotídicas, amplificación significa la producción de múltiples copias de una molécula polinucleotídica, o una porción de una molécula polinucleotídica, partiendo típicamente de una pequeña cantidad de un polinucleótido (por ejemplo, un genoma vírico), donde el material amplificado (amplicón, amplicón de PCR) es detectable típicamente. La amplificación de polinucleótidos abarca una diversidad de procedimientos químicos y enzimáticos. La generación de múltiples copias de ADN a partir de una o unas copias de una molécula de ARN o ADN molde durante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR con transcripción inversa, PCR), una reacción de amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), una reacción de amplificación mediada por transcripción (TMA), una reacción de amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) o una reacción en cadena de la ligasa (LCR) son formas de amplificación. La amplificación no se limita a la duplicación estricta de la molécula de partida. Por ejemplo, la generación de múltiples moléculas de ADNc a partir de una cantidad limitada de ARN vírico en una muestra usando PCR con transcripción inversa es una forma de amplificación. Además, la generación de múltiples moléculas de ARN a partir de una única molécula de ADN durante el proceso de transcripción también es una forma de amplificación.

El término “amplicón” se refiere a una molécula polinucleotídica (o colectivamente la pluralidad de moléculas) producida después de la amplificación de un ácido nucleico diana particular. El procedimiento de amplificación usado para generar el amplicón puede ser cualquier procedimiento adecuado, lo más típicamente, por ejemplo, usando una metodología de PCR. Un amplicón es típicamente, pero no exclusivamente, un amplicón de ADN. Un amplicón puede ser monocatenario o bicatenario, o en una mezcla de los mismos en cualquier proporción de concentración.

El término “productos de alto peso molecular” se refiere a oligómeros (o polímeros o concatémicos) de amplicones y, de esta manera, que contienen múltiples sitios de unión para cebadores, sondas y tintes de unión a ADN. Dichos productos de alto peso molecular que tienen aproximadamente de 1000 pares de bases a 10.000 pares de bases se

forman en incremento a medida que se llevan a cabo más ciclos de PCR, en particular, porque los amplicones no actúan específicamente como cebadores.

El término “hibridación” se refiere a la formación de una estructura de dúplex mediante dos ácidos nucleicos monocatenarios debida al apareamiento de bases complementarias. Se puede producir hibridación entre cadenas de ácido nucleico totalmente complementarias o entre cadenas de ácido nucleico “sustancialmente complementarias” que contienen regiones menores de emparejamiento erróneo. Las condiciones en las que únicamente las cadenas de ácido nucleico totalmente complementarias se hibridan se denominan “condiciones de hibridación rigurosas” o “condiciones de hibridación específicas de secuencia”. Se pueden lograr dúplex estables de secuencias sustancialmente complementarias en condiciones de hibridación menos rigurosas. Los expertos en la técnica de la tecnología de ácidos nucleicos pueden determinar empíricamente la estabilidad del dúplex considerando una serie de variables que incluyen, por ejemplo, la longitud y la concentración de pares de bases de los oligonucleótidos, fuerza iónica e incidencia de pares de bases emparejadas erróneamente, siguiendo los consejos proporcionados en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2.^ª edición 1989, parte 1-3, Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York).

Generalmente, se seleccionan las condiciones rigurosas para que sean aproximadamente 5 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_f) para la secuencia específica a una fuerza iónica y valor de pH definidos. El T_f es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) en la que se han disociado un 50 % de los dúplex. Relajar la rigurosidad de las condiciones de hibridación permite tolerar los emparejamientos erróneos de secuencia; se puede controlar el grado de emparejamiento erróneo tolerado mediante un ajuste adecuado de las condiciones de hibridación.

El término “cebador” se refiere a un oligonucleótido, natural o bien sintético, que puede actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ARN o ADN en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador complementario a una cadena de ácido nucleico, es decir, en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato diferentes y un agente para la polimerización (es decir, ADN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Un cebador es preferentemente un oligodesoxirribonucleótido monocatenario. La longitud apropiada de un cebador depende del uso pretendido del cebador, pero típicamente varía desde 15 a 35 nucleótidos. Las moléculas de cebador cortas generalmente requieren temperaturas más frías para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. Un cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del ácido nucleico molde, pero debe ser suficientemente complementaria para hibridarse con el molde. Los cebadores pueden incorporar características adicionales que incrementen la especificidad de unión a la secuencia diana (tal como un nucleótido modificado como los nucleótidos alquilados de extremo 3' descritos en los documentos EP 0 866 071 y en EP 1 201 768) o permiten la detección o inmovilización del cebador, pero no alteran la propiedad básica del cebador, la de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ARN o ADN. Por ejemplo, los cebadores pueden contener una secuencia de ácido nucleico adicional en el extremo 5' que no se hibride con el ácido nucleico diana, pero que facilite la clonación del producto amplificado y/o de acuerdo con la invención la supresión o prevención de la formación de productos de alto peso molecular. La región del cebador que es suficientemente complementaria para que se hibride el molde se denomina en el presente documento región de hibridación.

El término “cebador extendido” o “cebador extendido de poliN” como se usa en la presente invención se refiere a un cebador que contiene una secuencia polinucleotídica adicional (poliN) en el extremo 5', comprende (A)_m, (T)_m, (G)_m, (C)_m o (U)_m, en las que m es un número de 2 a 10, o bases diferentes, (AT)_n, en la que n es un número de 1 a 5. La secuencia de poliN comprende una secuencia de poliA, poliT, poliAT, poliU, poliC o poliG.

De acuerdo con la invención, se usa al menos un cebador apropiadamente extendido. La secuencia de poliN añadida a cada uno de al menos dos cebadores extendidos puede ser idéntica o diferente.

En un modo de realización particular de la invención, los cebadores directo e inverso contienen secuencias de poliN, dichas secuencias de poliN pueden ser idénticas o diferentes. La cola de poliN también puede contener nucleótidos modificados como nucleótidos alquilados, tales como N4-etil-dC, N6-metil-dA o 2'-O-metil-nucleótidos o similares, siempre y cuando el oligonucleótido modificado (cebador) tenga la capacidad de hibridarse con su complemento y sirva de molde en una reacción de amplificación. En algunos modos de realización, puede ser útil que únicamente un cebador, cebador directo o bien inverso, comprenda dicha cola de poliN. En un modo de realización, la invención proporciona los procedimientos descritos anteriormente, en los que la secuencia de poliN descrita en la etapa a) comprende una secuencia de poliA, poliT, poliAT, poliU, poliC o poliG. Se usan secuencias de poliN que comprenden en total de 2 a 10 nucleótidos de longitud en la presente invención. También se usan secuencias de poliN que comprenden de 4 a 6 nucleótidos de longitud de acuerdo con la invención. En particular se usan colas de secuencia que comprenden de cuatro a seis bases de adenina (A) consecutivas de acuerdo con la invención.

Como se usa en el presente documento, el cebador “en dirección 5'” se refiere al cebador cuyo producto de extensión es una subsecuencia de la cadena codificante. El cebador “en dirección 3'” se refiere al cebador cuyo producto de extensión es una subsecuencia de la cadena complementaria no codificante.

Como se usa en el presente documento, el cebador “directo” se refiere a un cebador que se extiende en la PCR desde el codón iniciador en el extremo 3’ de la cadena antisentido hacia el codón finalizador en el extremo 5’ del ADN molde (diana de ácido nucleico), mientras que el cebador “inverso” se refiere a un cebador que se extiende desde el codón finalizador en el extremo 5’ de la cadena sentido hacia el codón iniciador en el extremo 3’ del ADN molde. El cebador directo se diseña habitualmente para hibridarse con el ADN molde en dirección 5’ del codón iniciador, mientras que el cebador inverso se diseña para hibridarse con a una región del ADN molde en dirección 3’ del codón finalizador.

El término “sonda”, como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido que forma una estructura de dúplex con una secuencia de un ácido nucleico diana debida al apareamiento de bases complementarias. Se usan sondas para la detección o captura del ácido nucleico diana. Una sonda es preferentemente un oligodesoxirribonucleótido monocatenario. La sonda típicamente consiste en, o contiene, una “región de hibridación” que consiste preferentemente en de 10 a 50 nucleótidos, más preferentemente de 15 a 35 nucleótidos, correspondiente a una región de la secuencia diana.

“Correspondiente” significa al menos sustancialmente complementaria al ácido nucleico designado o bien su complemento. Una sonda no necesita reflejar la secuencia exacta del ácido nucleico diana, pero debe ser suficientemente complementaria para hibridarse con la diana en las condiciones de hibridación elegidas. Un oligonucleótido de sonda puede contener o estar unido a características adicionales que permitan la detección o inmovilización de la sonda, pero no alteren significativamente las características de hibridación de la región de hibridación. Por ejemplo, se pueden marcar las sondas mediante la incorporación de uno o más nucleótidos marcados o uniéndose a uno o más restos detectables separados. Por ejemplo, los nucleótidos marcados o restos detectables comprenden, pero no se limitan a, tintes fluorescentes, como fluoresceína, rodamina, cumarina y cianina, o tintes extintores, como Black Hole Quenchers, tales como BHQ-2 de Biosearch Technologies Inc., Novato, CA. Por ejemplo, la sonda puede ser una sonda 5’-nucleasa o de hidrolización, una sonda de baliza molecular, una sonda que contiene un ligando de unión al surco menor o una sonda de hibridación y similares, como se conoce por el experto en la técnica.

Como se usa en el presente documento, una sonda o cebador oligonucleotídico es “específico” para una secuencia diana si el número de emparejamientos erróneos presentes entre el oligonucleótido y la secuencia diana es más bajo que el número de emparejamientos erróneos presentes entre el oligonucleótido y las secuencias no diana. Se pueden elegir condiciones de hibridación en las que se formen dúplex estables únicamente si el número de emparejamientos erróneos presentes no es más que el número de emparejamientos erróneos presentes entre la secuencia oligonucleotídica y no diana. En dichas condiciones, el oligonucleótido específico para diana puede formar un dúplex estable únicamente con una secuencia diana. De esta manera, el uso de sondas específicas para diana en condiciones de hibridación adecuadamente rigurosas posibilita la detección de una secuencia diana específica. De forma similar, el uso de cebadores específicos para diana en condiciones de amplificación adecuadamente rigurosas posibilita la amplificación específica de las secuencias diana que contienen los sitios de unión a cebador de diana.

El término “enzima polimerasa termoestable” se refiere a una enzima que es relativamente estable frente al calor y cataliza la polimerización de nucleósidos trifosfato para formar productos de extensión del cebador que sean complementarios a una de las cadenas de ácido nucleico de la secuencia diana. En particular, el término “termoestable” aplicado a una enzima se refiere a una enzima que conserva su actividad biológica a temperaturas elevadas (por ejemplo, a 55 °C o más altas), o conserva su actividad biológica después de ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento. La enzima polimerasa inicia la síntesis en el extremo 3’ del cebador y procede en la dirección hacia el extremo 5’ del molde hasta que finaliza la síntesis. Se describe una enzima polimerasa termoestable purificada más completamente, por ejemplo, en el documento US 4.889.818, y está disponible comercialmente, por ejemplo, de Roche Diagnostics GmbH/Alemania.

El término “el complemento de” un ácido nucleico dado se refiere específicamente a la cadena polinucleotídica antiparalela, es decir, al ácido nucleico que tiene tanto la misma longitud que, y es exactamente complementario al ácido nucleico dado. Por ejemplo, la secuencia 5’- AGTTC-3’ es complementaria a la secuencia 5’-GAACT-3’. Los términos “completamente complementaria” o “un 100 % complementaria” y similares se refieren a secuencias complementarias que tienen apareamiento de bases de Watson-Crick perfecto entre las cadenas antiparalelas (sin emparejamientos erróneos en el dúplex polinucleotídico). Sin embargo, la complementariedad no necesita ser perfecta; los dúplex estables, por ejemplo, pueden contener pares de bases emparejadas erróneamente o bases no emparejadas. Los términos “complementariedad parcial”, “parcialmente complementaria”, “complementariedad incompleta” o “incompletamente complementaria” y similares se refieren a cualquier alineación de bases entre cadenas polinucleotídicas antiparalelas, es decir, más baja de un 100 % perfecta (por ejemplo, existe al menos una base con emparejamiento erróneo o no emparejada en el dúplex polinucleotídico). De esta manera, el complemento de un ácido nucleico se refiere a una única secuencia definida de manera única.

Los términos “detectable”, “marcador” o “indicador”, en su sentido más amplio, se refieren a cualquier resto o propiedad que sea detectable o permita la detección de lo que se asocia con ello. Por ejemplo, un polinucleótido que comprende un marcador es detectable (y en algunos aspectos se denomina sonda). Idealmente, un polinucleótido

marcado permite la detección de un complejo de hibridación que comprende el polinucleótido. Por ejemplo, en algunos aspectos se acopla un marcador (covalente o no covalentemente) a un polinucleótido. En diversos aspectos, un marcador puede, de manera alternativa o en combinación: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el segundo marcador, por ejemplo, FRET; (iii) estabilizar la hibridación, por ejemplo, formación de dúplex; (iv) conferir una función de captura, por ejemplo, afinidad hidrófoba, anticuerpo/antígeno, formación de complejos iónicos, o (v) cambiar una propiedad física, tal como movilidad electroforética, hidrofobicidad, hidrofiliidad, solubilidad o comportamiento cromatográfico. Los marcadores varían ampliamente en sus estructuras y sus mecanismos de acción.

Los ejemplos de marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores fluorescentes (incluyendo, por ejemplo, extintores o absorbentes), marcadores no fluorescentes, marcadores colorimétricos, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes, marcadores radiactivos, grupos modificadores de masa, anticuerpos, antígenos, biotina, haptenos, enzimas (incluyendo, por ejemplo, peroxidasa, fosfatasa, etc.) y similares. Para ilustrar adicionalmente, los marcadores fluorescentes pueden incluir tintes que estén cargados negativamente, tales como tintes de la familia de la fluoresceína, o tintes que son de carga neutra, tales como tintes de la familia de la rodamina, o tintes que estén cargados positivamente, tales como tintes de la familia de la cianina. Por ejemplo, los tintes de la familia de la fluoresceína incluyen FAM, HEX, TET, JOE, NAN y ZOE. Por ejemplo, los tintes de la familia de la rodamina incluyen Texas Red, ROX, R110, R6G y TAMRA. Por ejemplo, FAM, HEX, TET, JOE, NAN, ZOE, ROX, R110, R6G y TAMRA están disponibles comercialmente de Perkin-Elmer, Inc. (Wellesley, MA, EE. UU.), por ejemplo, Texas Red está disponible comercialmente de Life Technologies (Molecular Probes, Inc.) (Grand Island, NY). Por ejemplo, los tintes de la familia de la cianina incluyen CY2, CY3, CY5, CY5.5 y CY7 y están disponibles comercialmente de, por ejemplo, GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, EE. UU.).

El término "tinte de unión a ADN" o "tinte de intercalación de ADN" se refiere a moléculas de tinte que se pueden unir a ácidos nucleicos bicatenarios y emitir una señal de fluorescencia tras la unión, tal como SYBRGREEN I y SYBRGOLD, disponibles de Life Technologies (Grand Island, NY) o Lightcycler 480 Resolight de Roche Diagnostics (Alemania).

El término "FRET" (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) y términos equivalentes se refieren generalmente a una interacción dinámica dependiente de la distancia entre estados de electrones de dos moléculas de tinte en las que se transfiere la energía desde una molécula donante a una molécula aceptora sin emisión de un fotón desde la molécula donante. La eficiencia de FRET es dependiente de la inversa de la separación intermolecular entre los tintes, convirtiéndose en útil a distancias comparables con las dimensiones de las macromoléculas biológicas. Generalmente, FRET permite la obtención de imágenes, análisis cinético y/o cuantificación de moléculas colocalizadoras o cambios conformacionales en una única molécula con resolución espacial más allá de los límites de la microscopía óptica convencional. En general, FRET requiere que (a) las moléculas donante y aceptora deban estar en estrecha proximidad (típicamente, por ejemplo, 10-100 Å), (b) el espectro de absorción del aceptor deba superponerse al espectro de emisión de fluorescencia del donante y (c) las orientaciones del dipolo de transición del donante y aceptor deban ser aproximadamente paralelas.

En la mayoría de las aplicaciones de FRET, los tintes de donante y aceptor son diferentes, en cuyo caso se puede detectar FRET mediante la aparición de fluorescencia sensibilizada del aceptor o mediante extinción de la fluorescencia del donante. En algunos casos, el donante y aceptor son los mismos, y se puede detectar FRET mediante la despolarización de fluorescencia resultante. Por ejemplo, se describe el uso de una única molécula donante/aceptora en un sistema de FRET en el documento US 7.312.302, de Packard y Komoriya.

FRET se ha convertido en una técnica importante para investigar una diversidad de fenómenos biológicos que se caracterizan por cambios en la proximidad molecular. Las técnicas de FRET son ahora generalizadas en muchos laboratorios biológicos y se han adaptado para su uso en una diversidad de sistemas biológicos, incluyendo pero sin limitarse a, detección de hibridación de ácidos nucleicos, ensayos de PCR en tiempo real y detección de SNP, estructura y conformación de proteínas, distribución espacial y ensamblaje de complejos de proteínas, interacciones receptor/ligando, inmunoensayos, interacciones de sonda de moléculas únicas, estructura y conformación de ácidos nucleicos, ensayos de extensión del cebador para detectar mutaciones, secuenciación de ADN automatizada, distribución y transporte de lípidos, ensayos de fusión de membranas (ensayos de mezcla de lípidos de fusión de membranas), detección del potencial de membrana, sustratos de proteasa fluorogénicos e indicadores para AMP cíclico y cinc.

El término "sonda de hidrolización" o "sonda 5'-nucleasa" denota sondas usadas para la mayoría de las aplicaciones de acuerdo con la presente invención y usadas en reacciones de PCR, es decir, en los sistemas COBAS[®] TaqMan[®]. Dichas sondas 5'-nucleasa o de hidrolización consisten en una sonda de hibridación monocatenaria que está normalmente marcada con dos restos fluorescentes. Cuando se excita un primer resto fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a un segundo resto fluorescente de acuerdo con el principio de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). El segundo resto de fluorescencia es generalmente una molécula extintora que también puede ser un extintor no fluorescente como BHQ-2. Los tintes fluorescentes típicos usados en este formato son, por ejemplo, entre otros, FAM, HEX, CY5, JA270, Cyan 500 y CY5.5. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ácido

nucleico diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada por la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la Taq ADN polimerasa u otra polimerasa adecuada como se conoce por el experto en la técnica, tal como polimerasa de ZO5, durante la fase de elongación posterior. Como resultado, el resto fluorescente excitado y el resto extintor se separan espacialmente entre sí. Como consecuencia, tras la excitación del primer resto fluorescente en ausencia del extintor, se puede detectar la emisión de fluorescencia del primer resto de fluorescencia. En ambos formatos de detección, la tecnología LightCycler® y la TaqMan®, la intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ácido nucleico diana originales.

La expresión "tipo de virus de la hepatitis C" se refiere a la categorización de un virus de la hepatitis C (VHC) basado en su organización genómica (por ejemplo, análisis filogénico). La categorización de una cepa aislada del VHC en una categoría de tipo particular refleja su relación genómica con otras cepas aisladas del VHC y su relativamente menor relación con otras cepas aisladas del VHC. La nomenclatura del tipado del VHC usada en el presente documento es consistente con la nomenclatura ampliamente adoptada revisada y propuesta por Simmonds *et al* (2005) "Consensus Proposals for an Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes", *Hepatology* 42, n.º 4: 962-973. El sistema de Simmonds *et al* (2005) dispone cepas aisladas del VHC conocidas en uno de seis (6) genotipos del VHC, en concreto, los genotipos 1 a 6. Cada genotipo se subdivide adicionalmente en grupos denominados subtipos que reflejan la relación entre cepas del mismo genotipo. Un subtipo del VHC se escribe mediante una letra redonda en minúscula seguida del genotipo, por ejemplo, subtipo 1a, subtipo 1c, subtipo 6a, etc. Las variantes genéticas encontradas en una cepa aislada individual se denominan cuasiespecies. Aproximadamente se conocen 100 subtipos del VHC que abarcan todos los 6 genotipos en todo el mundo; el número de subtipos no es estático; a medida que se estudian y secuencian más cepas aisladas del VHC, es probable que se puedan reconocer subtipos adicionales (y posiblemente genotipos).

El término "tipos de virus" se puede referir a genotipos o bien subtipos. Se advierte que, como se usa en el presente documento, el término "tipo de VHC" puede significar genotipo del VHC o subtipo del VHC. El término "tipado del VHC" significa asignar el VHC experimental (por ejemplo, de tipo no conocido) a un genotipo conocido (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 o un subconjunto de los mismos) o asignar el VHC experimental a un subtipo conocido (por ejemplo, 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, etc., o un subconjunto de los mismos). Por el contrario, también se advierte que, como se usa comúnmente en la técnica, el término "genotipado del VHC" se refiere lo más frecuentemente a asignar un VHC a uno de cualquier subtipo de VHC, por ejemplo, lo más típicamente, 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, etc. Sin embargo, como se usa en el presente documento, el término "genotipado" se refiere a la únicamente a 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

El término "kit" se usa en referencia a una combinación de artículos que facilitan un proceso, procedimiento, ensayo, análisis o manipulación de una muestra. Los kits pueden contener instrucciones escritas que describen cómo usar el kit, reactivos químicos o enzimas requeridos para el procedimiento, cebadores y sondas, así como cualquier otro componente. En algunos modos de realización, la presente invención proporciona kits para la detección "en tubo cerrado" que emplea (RT)-PCR en tiempo real. Por ejemplo, estos kits pueden incluir, pero no se limitan a, reactivos para la recogida de muestras (por ejemplo, la recogida de una muestra de sangre), reactivos para la recogida y purificación de ARN y/o ADN, por ejemplo, de sangre, reactivos para amplificación y detección, que incluyen opcionalmente una actividad de enzima transcriptasa inversa, cebadores adecuados para transcripción inversa y síntesis de primera cadena y segunda cadena de ADNc para producir uno o más amplicones, pero al menos un cebador extendido directo y/o uno inverso, uracil-ADN glucosilasa, una ADN polimerasa termoestable dependiente de ADN y (desoxirribonucleósidos trifosfato). En algunos modos de realización, la enzima que comprende la actividad de transcriptasa inversa y la actividad de ADN polimerasa termoestable dependiente de ADN son la misma enzima, por ejemplo, polimerasa de *Thermus sp.* ZO5 o polimerasa de *Thermus thermophilus*.

Las técnicas convencionales de biología molecular y química de ácidos nucleicos, que están dentro de la técnica, se explican totalmente en la bibliografía, véase, por ejemplo, Sambrook *et al*, 2.ª edición 1989, parte 1-3, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames and S.J. Higgins. eds., 1984); y una serie, Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.).

En principio, se pueden amplificar y detectar todas las clases de dianas de ácido nucleico con los procedimientos de la invención. Sin embargo, los procedimientos se aplican, en particular, para someter a prueba controles o muestras que contienen alta cantidad de diana, en los que se generan productos de alto peso molecular en reacciones de PCR mediante polimerización de amplicones formados en ciclos de PCR anteriores. Los ejemplos de ácidos nucleicos de alta cantidad de diana de acuerdo con la invención son ácidos nucleicos de virus, tales como, por ejemplo, virus de los papilomas humanos (VPH), virus del Nilo Occidental (VNO) o los usados para el cribado ordinario de donaciones de sangre para detectar la presencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis B (VHB) y/o hepatitis C (VHC). Sin embargo, también son adecuados los procedimientos de la invención para dianas bacterianas o el análisis de marcadores oncológicos o similares.

En particular, la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es una preocupación creciente en todo el mundo. Las infecciones por el VHC a menudo son persistentes e inducen una hepatopatía crónica, manifestada en cirrosis del hígado y carcinoma hepatocelular. El VHC es la causa principal del trasplante de hígado en los Estados Unidos. En todo el mundo, anualmente se notifican aproximadamente un millón de nuevas infecciones por el VHC; tan solo en

los Estados Unidos, se estima que cuatro millones de personas están infectadas y anualmente se producen 30.000 nuevas infecciones.

Actualmente, el VHC es responsable de unas 8.000 a 10.000 muertes anualmente en los Estados Unidos. Sin el desarrollo de diagnósticos y tratamientos mejorados, se espera que ese número se incremente drásticamente en todo el mundo en los próximos años.

El genoma del VHC es altamente polimórfico, y se han caracterizado una serie de cepas (denominadas genotipos y subtipos). Los diferentes tipos víricos se correlacionan con diferentes evoluciones de la enfermedad y diferentes grados de respuesta a las pautas terapéuticas.

La organización/estructura genómica del VHC es más similar a la de la familia *Flaviviridae*. De manera consistente con las funciones conocidas de la mayoría de las proteínas de flavivirus, las proteínas del VHC de extremo N son similarmente estructurales (incluyendo la C (cápside/núcleo), proteínas de la envoltura E1 y E2) y se cree que las proteínas no estructurales de extremo C incluyendo NS2 (metaloproteasa), NS3 (serina-proteasa/helicasa), NS4 y NS5 (ARN polimerasa NS5B) funcionan en la replicación vírica.

Después de la identificación y caracterización de la cepa aislada del VHC prototípica (ahora denominada VHC 1a), se identificaron (y se siguen identificando) otras cepas aisladas por todo el mundo. Las comparaciones de secuencias revelan que estas cepas aisladas únicas pueden diferir entre sí en, como mucho, un 35 % de no identidad de nucleótidos en la longitud completa del genoma del VHC (Okamoto *et al.* (1992) *Virology* 188:331-341). Se observa variabilidad de secuencia por todo el genoma vírico, mostrando algunas regiones más variabilidad que otras. Por ejemplo, se observa generalmente alta conservación de secuencia en la región 5'-UTR; en cambio, algunas regiones, incluyendo la región de la envoltura (E), muestran secuencias nucleotídicas hipervariables.

Conocer el genotipo vírico (y/o subtipo) presente en una infección proporciona al médico un indicador importante para determinar un tratamiento óptimo para un paciente infectado. Sin embargo, el desarrollo de procedimientos de diagnóstico simples que puedan diferenciar el número siempre creciente de tipos del VHC conocidos se ha convertido en un desafío.

Los procedimientos de la invención para amplificar y detectar un ácido nucleico diana, en los que el ácido nucleico diana es un ácido nucleico vírico, preferentemente VHC, son modos de realización preferentes de acuerdo con la invención.

La presente invención proporciona, de esta manera, cebadores oligonucleotídicos mejorados (cebadores extendidos) que posibilitan la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una región de alta conservación de secuencia, por ejemplo, la región 5' UTR, presente en el genoma de la mayoría de los tipos del VHC conocidos hasta la fecha. La presente invención también proporciona sondas oligonucleotídicas mejoradas que posibilitan la detección de ácido nucleico del VHC mediante hibridación.

Una ventaja importante de los cebadores usados en la presente invención es que posibilitan la amplificación de todos los tipos del VHC, sin la amplificación simultánea de secuencias no diana. De esta manera, los cebadores posibilitan un ensayo de detección del VHC que puede detectar todos los tipos del VHC a partir de muestras procedentes de todas las regiones del mundo.

De esta manera, un objeto de la presente invención es un procedimiento para amplificar y detectar una diana de ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico del VHC, en una muestra biológica, en el que se previene o suprime la formación de productos de alto peso molecular durante la amplificación, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

a) poner en contacto los ácidos nucleicos en dicha muestra con reactivos de amplificación que comprendan al menos una polimerasa, nucleósidos trifosfato u otros monómeros de nucleósido, un cebador directo extendido y/o uno inverso extendido para generar un amplicón y una sonda detectable específica para dicho amplicón o un tinte de unión a ADN, en el que dicho cebador directo extendido es un primer oligonucleótido específico para el VHC y dicho cebador inverso es un segundo oligonucleótido específico para el VHC, comprendiendo al menos uno de dichos cebadores una secuencia de poliN añadida al extremo 5' del cebador y que no es complementaria a la secuencia diana, en el que dicha secuencia de poliN se selecciona de un grupo que consiste en una secuencia de poliA, una de poliT, una de poliAT, una de poliU, una de poliC y una secuencia de poliG y de 2 a 10 nucleótidos de longitud;

b) incubar dichos ácidos nucleicos con dichos reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación, en el que dicha reacción de amplificación no se finaliza antes de 50 ciclos; y

c) detectar dicho amplicón por medio de dicha sonda detectable o tinte de unión a ADN. Las secuencias de poliN que comprenden de 4 a 6 nucleótidos de longitud se aplican en particular de acuerdo con la invención. Las secuencias de poliN que comprenden de 4 a 6 nucleótidos de adenina (A) consecutivos son las más particularmente

usadas de acuerdo con la invención.

Los cebadores específicos para VHC usados en la invención son, por ejemplo, oligonucleótidos como cebadores que contienen poliN de secuencia GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 1) usado como cebador directo y GCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 2) usado como cebador inverso. También se pueden usar cebadores que están modificados adicionalmente en el nucleótido en el extremo 3', por ejemplo, alquilados en el grupo amino exocíclico de adenosinas de acuerdo con la invención.

Otro objeto de la presente invención es un procedimiento para prevenir o suprimir la formación de productos de alto peso molecular durante la amplificación por PCR, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

a) poner en contacto los ácidos nucleicos en una muestra biológica con reactivos de amplificación que comprendan al menos una polimerasa, nucleósidos trifosfato u otros monómeros de nucleósido, un cebador directo extendido y/o uno inverso extendido para generar un amplicón y una sonda detectable específica para dicho amplicón o un tinte de unión a ADN, en el que dicho cebador directo y dicho cebador inverso extendido son ambos específicos para que se determine la diana de ácido nucleico, por ejemplo, VHC, comprendiendo al menos uno de dichos cebadores una secuencia de poliN añadida al extremo 5' del cebador y que no es complementaria a la secuencia diana, en el que dicha secuencia de poliN se selecciona de un grupo que consiste en una secuencia de poliA, una de poliT, una de poliAT, una de poliU, una de poliC y una de poliG y de 2 a 10 nucleótidos de longitud;

b) incubar dichos ácidos nucleicos con dichos reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación, en el que dicha reacción de amplificación no se finaliza antes de 50 ciclos; y

c) detectar dicho amplicón por medio de dicha sonda detectable o tinte de unión a ADN.

Las secuencias de poliN apropiadas que comprenden de 4 a 6 nucleótidos de longitud se aplican en particular de acuerdo con la invención. Las secuencias de poliN que comprenden de cuatro a seis bases de adenina (A) y/o timina (T) consecutivas son las más particularmente usadas de acuerdo con la invención.

Las secuencias de poliN que comprenden de cuatro a seis bases de adenina (A) y/o timina (T) consecutivas son las más particularmente usadas de acuerdo con la invención.

Los cebadores específicos para VHC usados en la invención son, por ejemplo, oligonucleótidos como cebadores que contienen poliN de secuencia GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 1) usado como cebador directo y GCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 2) usado como cebador inverso.

En particular, de acuerdo con la presente invención se usa un par de cebadores oligonucleotídicos para la amplificación de ácido nucleico del VHC, en los que dicho par de cebadores se selecciona del grupo que consiste en AAAAGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 3) y AAAAGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 4), AAAAAAGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 5) y AAAAAAGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 6), AAAAAAAGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 7) y AAAAAAAGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 8), TTTTGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 9) y TTTTGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 10), TTTTTCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 11) y TTTTTCAGAACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 12), GGGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 13) y GGGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 14), ATATGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 15) y ATATGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 16), AAAAAACCCACTCTATGTCCGGTC (SEQ ID NO: 19) y AAATGGCGTCTCCACGCGGCTGG (SEQ ID NO: 20), ATATATGTACGCCGAATTGCCGAAA (SEQ ID NO: 21) y ATATATCTTTCCCCAGGACCTGCCGGT (SEQ ID NO: 22), y cualquier combinación de cualquiera de dichos cebadores directos (SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 19 o 21) con cualquiera de los cebadores inversos (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20 o 22). De acuerdo con un modo de realización de la invención, se pueden añadir uno o más cebadores adicionales al par de cebadores que se van a usar para la amplificación del VHC, en particular, un segundo cebador inverso específico para diana, por ejemplo, de secuencia CTCGCAAGCACCCCTATCAGGCAGT (SEQ ID NO: 32).

En particular, se usa un par de cebadores que consiste al menos en el cebador de SEQ ID NO: 1 y el cebador de SEQ ID NO: 2, cebador de SEQ ID NO: 3 y el cebador de SEQ ID NO: 4, cebador de SEQ ID NO: 5 y el cebador de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 o el cebador de SEQ ID NO: 15 y el cebador de SEQ ID NO: 16 de acuerdo con la invención. Además, en particular, se usa un conjunto de cebadores que consiste en el cebador de

SEQ ID NO: 1 con los cebadores de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 32, de los cebadores de SEQ ID NO: 3 con los cebadores de SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 32, de los cebadores de SEQ ID NO: 5 con los cebadores de SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 32, de los cebadores de SEQ ID NO: 9 con el cebador de SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 32, o el cebador de SEQ ID NO: 15 con los cebadores de SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 32 de acuerdo con la invención.

Otro par de cebadores extendidos de 5'-poliN usados de acuerdo con la invención comprende cebadores que contienen poliN de secuencias **AAACCCACTCTATGTCCGGTC** (SEQ ID NO: 23) y **TGGCGTCTCCCACGCGGCTGG** (SEQ ID NO: 24). Todavía otro par de cebadores extendidos de 5'-poliN usados de acuerdo con la invención comprende cebadores que contienen poliN de secuencia **GTACGCCGGAATTGCCGAAA** (SEQ ID NO: 25) y **CTTTCGCCAGGACCTGCCGGT** (SEQ ID NO: 26). Los pares de cebadores usados en la invención pueden comprender al menos un cebador adicional, en particular, un segundo cebador inverso específico para diana. Los cebadores pueden contener nucleótidos modificados en la región de extremo 3', tales como nucleótidos alquilados como N4-etil-dC, N6-metil-dA, N4-t-butilbencil-dC y N6-terc-butilbencil-dA, así como 2'-O-metil-dU o similares.

Las sondas oligonucleotídicas usadas en la presente invención se hibridan con regiones del genoma del VHC contenidas en las regiones amplificadas usando los procedimientos de la presente invención.

Las sondas posibilitan la detección específica de ácido nucleico del VHC de todos los tipos en un único conjunto de condiciones de hibridación. Cuando se usan para detectar ácido nucleico del VHC amplificado con los cebadores usados en la invención, la especificidad de las sondas incrementa adicionalmente la especificidad de la detección del VHC, minimizando así la probabilidad de un falso positivo.

En un modo de realización, la presente invención emplea una sonda oligonucleotídica para la detección de ácido nucleico del VHC, en la que dicha sonda oligonucleotídica comprende una secuencia de ácido nucleico específica para VHC, un marcador detectable, por ejemplo, un resto fluorescente y opcionalmente un resto extintor. Por ejemplo, una sonda usada en la presente invención puede consistir en una subsecuencia de **FCGGAATTGCCAGGACGACCGGP** (SEQ ID NO: 27) o un complemento de la misma, en la que F es un tinte fluorescente, como, por ejemplo, una 6-carboxi-fluoresceína y P es un grupo fosfato terminal de extremo 3', o una subsecuencia de **CGGTGTACTCACC GTTCCGCAGACCACTATGGCTCT** (SEQ ID NO: 28) o el complemento de la misma, que comprende un tinte fluorescente de la familia de la cianina, como, por ejemplo, CY5, acoplado al extremo 5' y un grupo fosfato de extremo 3', o una subsecuencia de **FCGGTGTACTCACC GTTCCGCAGACC ACTATGP** (SEQ ID NO: 29) o el complemento de la misma, en la que F es un tinte fluorescente, como, por ejemplo, una 6-carboxi-fluoresceína, Q es un extintor no fluorescente como BHQ-2 y P es un grupo fosfato de extremo 3' o una subsecuencia de **GGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAG** (SEQ ID NO: 30) o el complemento de la misma, que comprende al menos un tinte fluorescente, como, por ejemplo, CY5 y/o fluoresceína, por ejemplo, FAM, y un grupo fosfato de extremo 3'. En un modo de realización de la invención, la sonda se selecciona del grupo que consiste en **GGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAG** (SEQ ID NO: 30), que comprende al menos un tinte fluorescente, como, por ejemplo, CY5 y/o fluoresceína, por ejemplo, FAM, y un grupo fosfato de extremo 3', **CGGTGTACTCACC GTTCCGCAGACCACTATGGCTCT** (SEQ ID NO: 28) o un complemento de la misma, que comprende al menos un tinte fluorescente, como, por ejemplo, CY5 y/o fluoresceína, por ejemplo, FAM, y un grupo fosfato de extremo 3', **FCGGAATTGCCAGGACGACCGGP** (SEQ ID NO: 27), en la que F es 6-carboxi-fluoresceína y P es un grupo fosfato de extremo 3', **FCGGTGTACTCACC GTTCCGCAGACCACTATGP** (SEQ ID NO: 29), en la que F es 6-carboxi-fluoresceína, Q es BHQ-2 y P es un grupo fosfato de extremo 3' y un complemento respectivo de estas secuencias sonda.

Se pueden marcar todas las secuencias sonda usadas en la invención con tintes alternativos conocidos por el experto en la técnica y se pueden marcar en diferentes posiciones de las sondas oligonucleotídicas. Otro aspecto de la invención se refiere a procedimientos para amplificar una región del gen de todos los tipos del VHC conocidos que comprenden llevar a cabo una PCR usando al menos un cebador directo extendido y/o inverso extendido, como se define anteriormente, y detectar el ADN amplificado usando las sondas, como se define anteriormente, o los complementos respectivos de las sondas. Los cebadores y sondas usados en la presente invención o los complementos respectivos de las sondas posibilitan procedimientos particularmente simples y rápidos para la detección específica de ácido nucleico del VHC.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de kits para amplificar y detectar un ácido nucleico del VHC que contienen al menos dos cebadores de amplificación extendidos específicos para VHC. Estos kits pueden incluir reactivos adicionales, tales como las sondas, como se define anteriormente. Los kits también pueden incluir uno o más reactivos de amplificación, por ejemplo, polimerasa, uracil-ADN glucosilasa, aptámero, sales de tampón, detergentes, nucleósidos trifosfato y otros componentes, como, por ejemplo, glicerina y/o DMSO.

La técnica de ácidos nucleicos habitualmente aplicada en los procedimientos de acuerdo con la invención es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un procedimiento para amplificar secuencias específicas de ácidos nucleicos, que hace posible la detección rápida de ácidos nucleicos presentes en una muestra en lo que

previamente era una cantidad baja indetectable (véase los documentos US 4.683.195; 4.683.202 y 4.965.188). Un procedimiento preferente de detección de ácido nucleico amplificado es mediante hibridación con una sonda oligonucleotídica específica de secuencia (véase Saiki *et al*, 1986, Nature 324:163-166).

Los procedimientos de detección pueden incluir, pero no se limitan a, la unión o intercalación de tintes específicos como bromuro de etidio, SYBRGREEN o Lightcycler 480 Resolight que se intercalan en el ADN bicatenario y luego cambian su fluorescencia. En particular, la etapa de detección se realiza en tiempo real. Mediante el uso de instrumentación de PCR en tiempo real disponible comercialmente (por ejemplo, LightCycler[®] o COBAS[®] TaqMan[®]), se pueden combinar la detección y amplificación por PCR del producto de amplificación en una única cubeta cerrada con un tiempo de ciclado drásticamente reducido (por ejemplo, los documentos EP 0 912 760, EP 1 033 411; EP 0 543 942, EP 0 919 565). Puesto que la detección se produce simultáneamente con la amplificación, los procedimientos de PCR en tiempo real obvian la necesidad de manipulación del producto de amplificación y disminuyen el riesgo de contaminación cruzada entre los productos de amplificación. La PCR en tiempo real reduce en gran medida el tiempo de respuesta y es una alternativa atractiva frente a las técnicas de PCR convencionales en el laboratorio clínico. Como alternativa a la PCR en tiempo real, como se usa en la tecnología LightCycler[®] (por ejemplo, los documentos EP 0 912 760, EP 1 033 411), se aplica preferentemente la tecnología de sonda 5'-nucleasa o de hidrolización de acuerdo con la presente invención. Esta tecnología, como se realiza usando el COBAS[®] TaqMan[®] utiliza una sonda de hibridación monocatenaria marcada con dos restos fluorescentes. Cuando se excita un primer resto fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere a un segundo resto fluorescente de acuerdo con el principio de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). El segundo resto de fluorescencia es generalmente una molécula extintora que también puede ser un extintor no fluorescente como BHQ-2. Los tintes fluorescentes típicos usados en este formato son, por ejemplo, entre otros, FAM, HEX, CY5, JA270, Cyan 500 y CY5.5. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ácido nucleico diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada por la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la Taq ADN polimerasa u otra polimerasa adecuada como se conoce por el experto en la técnica, tal como polimerasa de ZO5, durante la fase de elongación posterior. Como resultado, el resto fluorescente excitado y el resto extintor se separan espacialmente entre sí. Como consecuencia, tras la excitación del primer resto fluorescente en ausencia del extintor, se puede detectar la emisión de fluorescencia del primer resto de fluorescencia. En ambos formatos de detección, al usar los analizadores LightCycler[®] y el COBAS[®] TaqMan[®], la intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ácido nucleico diana originales. En particular, de acuerdo con la invención se usan sondas 5'-nucleasa o de hidrolización.

Como alternativa a FRET, se puede detectar un producto de amplificación usando un tinte de unión a ADN bicatenario, tal como un tinte de unión a ADN fluorescente (por ejemplo, SYBRGREEN I[®] o SYBRGOLD[®], disponible de Life Technologies (Molecular Probes) o Lightcycler 480 Resolight, disponible de Roche Diagnostics GmbH, Alemania). Tras la interacción con el ácido nucleico bicatenario, dichos tintes de unión a ADN fluorescentes emiten una señal fluorescente después de la excitación con luz a una longitud de onda adecuada. También se puede usar un tinte de unión a ADN bicatenario, tal como un tinte de intercalación de ácido nucleico (como se describe anteriormente). Cuando se usan tintes de unión a ADN bicatenario, habitualmente se realiza una curva de fusión para la confirmación de la presencia del producto de amplificación.

En un modo de realización particular de la invención, se previenen la contaminación por arrastre de productos de amplificación, tales como amplicones y productos de alto peso molecular (amplicón polimerizado) procedentes de reacciones de PCR anteriores. Una forma popular y eficaz de prevenir la contaminación por arrastre implica el uso de uracil-ADN glucosilasa, abreviada como "UDG" o "UNG" (EC 3.2.2.3). Estas enzimas que comprenden actividad de uracil-ADN glucosilasa reconocen el uracilo presente en ADN monocatenario o bicatenario y escinden el enlace N-glucosídico entre la base de uracilo y la desoxirribosa que abandona un sitio abásico, véase, por ejemplo, el documento US 6.713.294. Estas enzimas degradan bien los amplicones que contienen uracilo de pequeño tamaño, pero menos eficazmente productos de alto peso molecular de gran tamaño que contienen uracilo (amplicón polimerizado). De esta manera, tras la contaminación, los productos de alto peso molecular pueden servir como diana en reacciones de PCR posteriores, potencialmente dando lugar a resultados de prueba falsos positivos en una muestra negativa o valor cuantitativo incorrecto en una muestra positiva. Además, la contaminación y degradación incompleta mediante las uracil-ADN glucosilasas puede dar lugar a la supresión de señales en reacciones de PCR posteriores y, de esta manera, a resultados falsos negativos o resultados de prueba inválidos, puesto que los amplicones polimerizados con sus múltiples secuencias de unión a sonda y cebador drenan la mezcla de reacción del cebador y las sondas. Por lo tanto, la prevención de productos de alto peso molecular en la PCR es crucial para obtener resultados de pruebas correctos en muestras negativas y positivas diana.

Sin embargo, el procedimiento de la invención para amplificar y detectar un ácido nucleico diana en una muestra biológica se realiza en particular en presencia de una uracil-ADN glucosilasa. En presencia de uracil-ADN-glucosilasa, se mejora adicionalmente la prevención o supresión mediante contaminación de productos de alto peso molecular de reacciones de PCR previas durante la amplificación. De acuerdo con la presente invención, es particularmente adecuado el uso de una uracil-ADN glucosilasa en combinación con al menos un cebador que comprende una cola de poliN que contiene múltiples nucleótidos de adenosina (A) y/o timidina (T).

Se ha divulgado la preparación de uracil-N-ADN glucosilasa (UNG) optimizada para el control de la contaminación por arrastre en las reacciones de amplificación, por ejemplo, en el documento US 6.187.575. También se ha descrito el uso de UNG para prevenir la contaminación por arrastre, véase Longo *et al.* "Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reaction" (1990) Gene, 93:125-128. Se describe el procedimiento del estado de la técnica de controlar la contaminación por arrastre usando UNG en los documentos US 6.287.823 y 6.518.026 y US 2003/0077637.

Generalmente, el procedimiento implica dos etapas. En primer lugar, los ensayos de PCR deben incluir dUTP, de modo que los amplicones, que son potenciales contaminantes por arrastre, contengan uracilo. El procedimiento implica sustituir dUTP por parte o todo el dTTP en la reacción de amplificación. De manera alternativa (o además), se pueden incorporar una o más bases de uracilo en los cebadores de amplificación. Sin embargo, se debe advertir que si un uracilo en el cebador está demasiado próximo al extremo 5', el procedimiento es menos eficiente en la prevención de la amplificación posterior. El uso de dUTP no interfiere con los ensayos de PCR. Después de que se genera un amplicón que contiene uracilo, se puede detectar y analizar mediante procedimientos estándar a pesar de la presencia de uracilo en lugar de timina.

A continuación, se añade uracil-N-ADN glucosilasa a una PCR posterior. Convenientemente, UNG es activa en una mezcla de reacción estándar que contiene todos los componentes de la PCR. Esto posibilita añadir UNG a reacciones de PCR ensambladas o incluso a la mezcla maestra de PCR. Antes del inicio del ciclado térmico, la mezcla de reacción se incuba a una temperatura óptima para la actividad de UNG en el contexto de la mezcla maestra de PCR (aproximadamente de 40 °C a 50 °C) o en el intervalo de temperaturas donde UNG es activa. Si está presente un contaminante que contiene uracilo de una reacción previa, UNG escinde el uracilo, dejando un sitio abásico. Se sabe que el ADN con sitios abásicos es lábil a temperatura alta en condiciones de pH alto. Cuando comienza el ciclado térmico, dicho ADN se degrada. La temperatura alta también inactiva la enzima UNG, permitiendo generar nuevos amplicones de ADN que contienen uracilo.

De acuerdo con la presente invención, el uso de una enzima que comprende actividad de uracil-ADN glucosilasa se aplica particularmente en combinación con cebadores de los que al menos un cebador directo y/o uno inverso comprende una cola de poliN en el extremo 3', conteniendo dicha cola múltiples nucleótidos de adenosina (A) y/o timidina (T) y es de 2 a 10 nucleótidos de longitud.

Otro objeto de la presente invención se dirige al uso de un kit para amplificar y detectar un ácido nucleico diana en una muestra biológica mediante cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. Dicho kit comprende al menos una enzima que comprende actividad de ADN polimerasa, en particular, una ADN polimerasa termoestable, al menos una enzima que comprende actividad de uracil-ADN glucosilasa, opcionalmente una enzima que comprende actividad de transcriptasa inversa, al menos cuatro nucleósidos trifosfato diferentes u otros monómeros de nucleósido, al menos un cebador directo extendido de secuencia de poliN y/o al menos uno inverso extendido de secuencia de poliN para generar al menos un amplicón, en el que dicho cebador directo extendido y/o cebador inverso extendido es como se define en las reivindicaciones y no es complementario a la secuencia diana, y al menos una sonda detectable específica para dicho amplicón o un tinte de unión a ADN, así como un tampón respectivo. El kit puede comprender adicionalmente reactivos para la preparación de muestras, control interno, cebadores y sondas adicionales, aptámero, detergente y componentes de tampón o similares. Los aptámeros que se van a usar de acuerdo con la invención son oligonucleótidos de ADN o ARN monocatenario cortos (25-70 bases), que se unen a una molécula específica (es decir, proteína, ADN polimerasa de ϕ 29) a través de su estructura 3D (véase, por ejemplo, C. Tuerk and L. Gold: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, Science, volumen 249, 1990, p. 505-510).

De acuerdo con la invención, son adecuados kits, en los que dicha secuencia de poliN comprende una secuencia de poliA, una de poliT, una de poliAT, una de poliU, una de poliC, una de poliG que es de 2 a 10 nucleótidos de longitud. La secuencia de poliN puede estar acoplada al menos a uno de los cebadores en el extremo 5' y puede ser idéntica o diferente en el caso de que se usen dos o más cebadores extendidos en el extremo 5'. Los modos de realización particulares de acuerdo con la invención usan cebadores que comprenden secuencias de poliN idénticas en el extremo 5'. En particular, se usan secuencias de poliN que comprenden de cuatro a seis bases de adenina (A) consecutivas de acuerdo con la invención.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Resultado para los cebadores de referencia no extendidos: formación de productos de alto peso molecular (PAPM, amplicón polimerizado, poca o ninguna migración en gel de agarosa al 4 %) en reacciones de PCR para control positivo alto (CPA) después de 60 y 30 a 60 ciclos de PCR; el análisis en gel de agarosa se llevó a cabo en reacciones de PCR que analizaron 12 replicados de CPA después de 60 ciclos o 3 replicados cada una después de 30, 40, 50 y 60 ciclos; cebadores usados: SEQ ID NO: 1 y 2 (geles de agarosa al 4 %).

Figura 2: Resultado para cebadores extendidos en 5' con 2 G: PAMP significativamente reducidos en las reacciones de PCR para control positivo alto después de 30, 40, 50 y 60 ciclos; cebadores usados: SEQ ID NO: 13 y 14, modificado cada uno con terc-butilbencilo (tBu-Bn) en el extremo 3' (geles de agarosa al 4 %).

Figura 3: Resultado para cebadores extendidos en 5' con 4 T: PAMP significativamente reducidos en las reacciones de PCR para control positivo alto después de 30, 40, 50 y 60 ciclos; cebadores usados: SEQ ID NO: 9 y 10, modificado cada uno con terc-butilbencilo (tBu-Bn) en el extremo 3' (geles de agarosa al 4 %).

Figura 4: Resultado para cebadores extendidos en 5' con 4 A: ningún PAMP en las reacciones de PCR para control positivo alto después de 30, 40, 50 y 60 ciclos; cebadores usados: SEQ ID NO: 3 y 4, modificado cada uno con terc-butilbencilo (tBu-Bn) en el extremo 3' (geles de agarosa al 4 %).

Figura 5: Resultado para cebadores extendidos en 5' con 6 A: ningún PAMP en las reacciones de PCR para control positivo alto después de 30, 40, 40 y 60 ciclos; cebadores usados: SEQ ID NO: 5 y 6, modificado cada uno con terc-butilbencilo (tBu-Bn) en el extremo 3' (geles de agarosa al 4 %).

Figura 6: Resultado para cebadores extendidos en 5' con 8 A: ningún PAMP en las reacciones de PCR para control positivo alto después de 30, 40, 50 y 60 ciclos (pero una ligera formación de dímeros de cebadores); cebadores usados: SEQ ID NO: 7 y 8, modificado cada uno con terc-butilbencilo (tBu-Bn) en el extremo 3' (geles de agarosa al 4 %).

Figura 7: Resultado para cebadores extendidos en 5' con 2 AT: ningún PAMP en las reacciones de PCR para control positivo alto después de 30, 40, 50 y 60 ciclos; cebadores usados: SEQ ID NO: 15 y 16, modificado cada uno con terc-butilbencilo (tBu-Bn) en el extremo 3' (geles de agarosa al 4 %).

Figura 8: Resultado para cebadores extendidos en el extremo 5' con tres o cuatro bases diferentes, denominadas variantes protuberantes mixtas, por ejemplo, GACTTA y CTCTAA, respectivamente: formación moderada de PAMP en reacciones de PCR para control positivo alto después de 50 y 60 ciclos de PCR; se llevó a cabo el análisis en gel de agarosa en reacciones de PCR después de 30, 40, 50 y 60 ciclos; cebadores usados: SEQ ID NO: 17 y 18, modificado cada uno con terc-butilbencilo (tBu-Bn) en el extremo 3' (geles de agarosa al 4 %).

Ejemplos

Se realizaron todos los experimentos en condiciones experimentales equivalentes (es decir, se usaron las mismas composiciones de mezcla maestra, las mismas concentraciones de cebador, los mismos perfiles de preparación de muestras, se usaron los mismos perfiles de termociclado y se analizó la misma cantidad de amplicones por gel). Por lo tanto, se realizaron los experimentos como sigue: En la mezcla maestra, se sustituyeron los cebadores de referencia con los cebadores modificados de acuerdo con la presente invención. Generalmente se sometió a prueba el CPA en 5 replicados a menos que se indique de otro modo en las figuras y se finalizaron los ciclos de PCR después de 30, 40, 50, 60 ciclos; se analizaron los productos de amplificación en geles de agarosa al 4 %.

Ejemplo 1:

Material de muestra:

El CPA (control positivo alto) usado para los experimentos consistió en muestras de valor cuantitativo alto de aproximadamente $5E+06$ IU/ml que comprendían material de ARN del VHC blindado en plasma humano negativo. El ARN blindado consiste en ARN del VHC transcrito *in vitro* no infeccioso de la región diana que se encapsula en la proteína de la cápside del bacteriófago MS2 (proveedor, es decir, Ambion) y contiene las regiones de unión a la sonda y cebador del VHC. El plasma humano era no reactivo frente al ARN del VHC, ARN del VIH-1 y ADN del VHB. También se obtienen resultados similares si se usaron muestras de pacientes con VHC de valor cuantitativo alto positivo.

Extracción de ácido nucleico:

Por reacción se usó 1 ml de material de muestra para la extracción de ácido nucleico. Se sometieron a prueba generalmente 5 replicados de material de muestra por condición experimental a menos que se indicara de otro modo en las figuras. Los procedimientos de extracción de ácido nucleico son punteros y se conocen por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2.^ª edición 1989, parte 1-3, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984). De manera alternativa, se pueden usar kits de extracción de ácido nucleico disponibles comercialmente, es decir, el High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics) o el COBAS® AmpliPrep Total Nucleic Acid Isolation Kit (TNAI) (Roche Diagnostics).

En los experimentos descritos aquí la extracción de ácido nucleico se basó en el COBAS® AmpliPrep Total Nucleic

Acid Isolation Kit (TNAI) (Roche Diagnostics). Los reactivos para la preparación de muestras consisten en una suspensión de partículas magnéticas de vidrio, un reactivo de lisis, un reactivo de proteasa, un tampón de elución y un reactivo de lavado. Se añadió ARN del patrón de cuantificación a la muestra antes de la extracción nucleica. Las partículas del VHC blindadas y las partículas blindadas de ARN del patrón de cuantificación se lisan mediante incubación con una proteasa y un tampón de unión/lisis caotrópico que libera ácidos nucleicos y protege al ARN del VHC liberado de las ARNasas en suero o plasma. Posteriormente, el ARN del VHC y ARN del patrón de cuantificación se unen a partículas magnéticas de vidrio. Se eliminan las sustancias no unidas, tales como sales, proteínas y otras impurezas celulares lavando las partículas magnéticas. Se eluyen los ácidos nucleicos adsorbidos a temperatura elevada con un tampón acuoso.

Mezcla de reacción de PCR:

En la mezcla maestra, se sustituyeron los cebadores de referencia con los cebadores modificados de acuerdo con la presente invención. Se preparó la mezcla maestra sin los cebadores directo e inverso en un lote grande. Para cada experimento, se complementó esta mezcla maestra incompleta con los cebadores extendidos o los cebadores de referencia como se especifica en las figuras 1-8.

Tabla 1: Composición de la mezcla maestra

<u>Química</u>	<u>Concentración</u>
Tricina	157 mM
Acetato de potasio	314 mM
DMSO	15,8 %
Acido de sodio	0,09 %
Glicerol	14,4 %
Hidróxido de potasio	36,9 mM
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dUTP)	1,29 mM cada uno
Cebador directo (SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 13, 15 o 17) *	2,14 µM
Cebador inverso (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16 o 18) *	2,14 µM
Segundo cebador inverso (SEQ ID NO: 32)	1,07 µM
Sonda diana (SEQ ID NO: 27, 28, 29 y/o 30)	428 nM
Sonda de QS (SEQ ID NO: 31)	428 nM
Polimerasa de ZO5	1142 KU/l
UNG	114 KU/l
Aptámero	572 nM
pH	7,8

* diferente en cada experimento.

Se añadieron 50 µl de eluido que contenía ácido nucleico a 35 µl de mezcla maestra y 15 µl de acetato de manganeso 18 mM en tubos de PCR y se cargaron en el analizador COBAS® TaqMan® 48.

Reacción de PCR:

Tabla 2: Las etapas de ciclado térmico aplicadas

<u>Duración</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Repeticiones</u>
5 min	50 °C	1
30 min	66 °C	1
15 s	95 °C	30 a 60*
25 s	58 °C	30 a 60*
2 min	40 °C	1

* por experimento se terminó la PCR después de 30, 40, 50 y 60 ciclos como se muestra en las figuras 1-8, respectivamente.

Análisis en gel de agarosa:

Se realizó el análisis en gel de agarosa como se conoce por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2.ª edición 1989, parte 1-3, Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York; Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984). Se mezclaron 5 µl de amplicón con 5 µl

de tampón de carga en gel de agarosa y se aplicaron a geles de agarosa al 4 %. Se visualizó el ADN en UV después de tinción con bromuro de etidio. Las fotografías resultantes se muestran en las figuras 1 a 8 a continuación.

Ejemplo 2:

También se logran los resultados presentados mediante el siguiente procedimiento: Se usan ensayos disponibles comercialmente, por ejemplo, COBAS® AmpliPrep / COBAS® TaqMan® HCV Test (fabricado por Roche Diagnostics) para extraer ARN del VHC a partir del control del kit positivo alto. Se automatiza la preparación de muestras usando el instrumento COBAS® AmpliPrep y se automatiza la amplificación/detección usando, por ejemplo, el analizador COBAS® TaqMan® o el analizador COBAS® TaqMan® 48 . La prueba se basa en tres procesos principales: (1) preparación de muestras para aislar ARN de suero o plasma-EDTA humano y controles que se proporcionan en tubos secundarios en el instrumento COBAS® AmpliPrep; (2) transcripción inversa del ARN diana y el ARN del control interno/patrón de cuantificación para generar ADN complementario (ADNc) y (3) amplificación por PCR del ADNc diana y ADNc del control interno/patrón de cuantificación con detección simultánea de los amplicones generados en el analizador COBAS® TaqMan® mediante escisión de sondas de detección doblemente marcadas específicas para la diana y para el control interno/patrón de cuantificación.

Los reactivos para la preparación de muestras consisten en una suspensión de partículas magnéticas de vidrio, un reactivo de lisis, un reactivo de proteasa, un tampón de elución y un reactivo de lavado. Las partículas del VHC, así como las partículas del control interno/patrón de cuantificación, se lisan mediante incubación con una proteasa y un tampón de unión/lisis caotrópico que libera ácidos nucleicos y protege al ARN del VHC liberado de las ARNasas en suero o plasma. Posteriormente, el ARN del VHC y ARN del patrón de cuantificación se unen a partículas magnéticas de vidrio. Se eliminan las sustancias no unidas, tales como sales, proteínas y otras impurezas celulares lavando las partículas magnéticas. Se eluyen los ácidos nucleicos adsorbidos a temperatura elevada con un tampón acuoso. Se añade el eluido de control o muestra a la mezcla maestra y se transfiere al analizador COBAS® TaqMan® o al analizador COBAS® TaqMan® 48 para la amplificación y detección.

Para los experimentos presentados aquí, se modifica la mezcla maestra para la prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV con los cebadores extendidos de acuerdo con la información dada a continuación y se usa la caja de reactivo con la mezcla maestra modificada en el instrumento COBAS® AmpliPrep. La mezcla maestra contiene pares de sondas y cebadores específicos tanto para el ARN del VHC como para el ARN del control interno/patrón de cuantificación. Los sitios de unión a cebador están compartidos por la diana de VHC y el control interno/patrón de cuantificación. Los cebadores y la sonda diana se localizan en una parte altamente conservada de la región 5' no traducida del genoma del VHC. Se realiza la detección de la diana de VHC y patrón de cuantificación usando una sonda oligonucleotídica doblemente marcada específica para diana y una específica de patrón de cuantificación, lo que permite la identificación independiente del amplicón de diana de VHC y el amplicón del patrón de cuantificación del VHC. Se añade automáticamente el patrón de cuantificación del VHC a cada muestra a un número de copias conocido mediante el COBAS® AmpliPrep y se lleva durante toda la preparación de muestras, transcripción inversa, etapas de amplificación y detección junto con la diana de VHC. El patrón de cuantificación debe dar una señal positiva en muestras negativas y positivas para la diana de VHC a fin de posibilitar la determinación de valores cuantitativos. En reacciones parcialmente suprimidas o inhibidas, los patrones de cuantificación están afectados de manera similar a la diana y, de esta manera, permiten la correcta determinación de valores cuantitativos. Por último, el patrón de cuantificación comprueba las reacciones negativas de la diana de VHC frente a los efectos inhibidores, pero, debido a su concentración bastante alta, la comprobación no es rigurosa.

Tabla 3: Composición de la mezcla maestra

<u>Química</u>	<u>Concentración</u>
Tricina	157 mM
Acetato de potasio	314 mM
DMSO	15,8 %
Acida de sodio	0,09 %
Glicerol	14,4 %
Hidróxido de potasio	36,9 mM
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dUTP)	1,29 mM cada uno
Cebador directo (SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 13, 15 o 17)*	2,14 µM
Cebador inverso (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16 o 18)*	2,14 µM
Segundo cebador inverso (SEQ ID NO: 32)	1,07 µM
Sonda diana (SEQ ID NO: 27, 28, 29 y/o 30)	428 nM
Sonda de QS (SEQ ID NO: 31)	428 nM
Polimerasa de ZO5	1142 KU/l
UNG	114 KU/l

Aptámero	572 nM
pH	7,8

* diferente en cada experimento.

5 Se prepara la mezcla maestra sin los cebadores directo e inverso en un lote grande. Para cada experimento, se complementa esta mezcla maestra incompleta con los cebadores extendidos como se muestra en las gráficas. Se llenan estas variaciones de mezcla maestra complementada en cajas de reactivo y se cargan en el COBAS® AmpliPrep.

10 Se somete a prueba el CPA del kit de prueba COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HCV como muestra. Se inicia el procedimiento automatizado para la extracción y amplificación/detección el COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®. Según sea necesario, se finaliza la PCR después de 30, 40, 50 o 60 ciclos y se analizan 5 µl de producto de amplificación en geles de agarosa al 4 %.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG	
	<120> Procedimiento para prevenir productos de alto peso molecular durante la amplificación	
	<130> 31092 EP1-KOE	
10	<150> 12189009.9 <151> 10-08-2012	
	<160> 32	
15	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador sintético	
25	<400> 1	
	gcagaaagcg tctagccatg gcgtta	26
30	<210> 2 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 2	
40	gcaagcaccc tatcaggcag taccacaa	28
	<210> 3 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador sintético	
50	<400> 3	
	aaaagcagaa agcgtctagc catggcgta	30
55	<210> 4 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 4	
	aaaagcaagc accctatcag gcagtaccac aa	32

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para amplificar y detectar una diana de ácido nucleico en una muestra, en el que se previene o suprime la formación de productos de alto peso molecular durante la amplificación, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:
- a) poner en contacto los ácidos nucleicos en dicha muestra con reactivos de amplificación que comprendan al menos una polimerasa, nucleósidos trifosfato u otros monómeros de nucleósido, al menos un cebador directo extendido y/o al menos uno inverso extendido para generar al menos un amplicón y al menos una sonda detectable específica para dicho amplicón o un tinte de unión a ADN, en el que al menos uno de dicho cebador directo y/o cebador inverso extendido comprende una secuencia de poliN añadida al extremo 5' del cebador y que no es complementaria a la secuencia diana, en el que dicha secuencia de poliN se selecciona de un grupo que consiste en una secuencia de poliA, una de poliT, una de poliAT, una de poliU, una de poliC y una de poliG y es de 2 a 10 nucleótidos de longitud;
- b) incubar dichos ácidos nucleicos con dichos reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación, en el que dicha reacción de amplificación no se finaliza antes de 50 ciclos; y
- c) detectar dicho amplicón por medio de dicha sonda detectable o tinte de unión a ADN.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha secuencia de poliN consiste en de 4 a 6 nucleótidos de longitud.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico diana es un ácido nucleico vírico.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico vírico es un ácido nucleico del VHC.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se realiza la etapa b) en presencia de una enzima que comprende actividad de uracil-ADN glucosilasa.
6. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en el que al menos uno de dichos cebadores directos extendidos comprende una secuencia del grupo que consiste en AAAAGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 3), AAAAAAGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 5), AAAAAAAGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 7), TTTTGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 9), TTTTTGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 11), GGGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 13), ATATGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 15), AAAAAACCCACTCTATGTCCGGTC (SEQ ID NO: 19), ATATATGTACGCCGGAATTGCCGAAA (SEQ ID NO: 21) y AAACCCACTCTATGTCCGGTC (SEQ ID NO: 23) y/o al menos uno de dichos cebadores inversos extendidos comprende una secuencia del grupo que consiste en AAA-AGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 4), AAAAAAGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 6), AAAAAAAGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 8), TTTTGAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 10), TTTTTTGAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 12), GGGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACC-ACAA (SEQ ID NO: 14), ATATGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 16), AAATGGCGTCTCCACGCGGCTGG (SEQ ID NO: 20) y ATATATCTTTCCCCAGGACCTGCCGGT (SEQ ID NO: 22).
7. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1-6, en el que al menos una de dichas sondas detectables comprende una secuencia del grupo que consiste en (SEQ ID NO: 27), (SEQ ID NO: 28), (SEQ ID NO: 29), (SEQ ID NO: 30) y una complementaria o subsecuencia de cada una de estas secuencias.
8. Un procedimiento para prevenir o suprimir la formación de productos de alto peso molecular durante la amplificación por PCR, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:
- a) poner en contacto los ácidos nucleicos en una muestra con reactivos de amplificación que comprendan al menos una polimerasa, nucleósidos trifosfato u otros monómeros de nucleósido, al menos un cebador directo extendido y/o al menos uno inverso extendido para generar al menos un amplicón y al menos una sonda detectable específica para dicho amplicón o un tinte de unión a ADN, en el que dicho cebador directo y/o cebador inverso extendido comprende una secuencia de poliN añadida al extremo 5' del cebador y que no es complementaria a la secuencia

diana, en el que dicha secuencia de poliN se selecciona de un grupo que consiste en una secuencia de poliA, una de poliT, una de poliAT, una de poliU, una de poliC y una de poliG y es de 2 a 10 nucleótidos de longitud;

b) incubar dichos ácidos nucleicos con dichos reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación, en el que dicha reacción de amplificación no se finaliza antes de 50 ciclos; y

c) detectar dicho amplicón por medio de dicha sonda detectable o tinte de unión a ADN.

9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha secuencia de poliN consiste en de 4 a 6 nucleótidos de longitud.

10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en el que dicho ácido nucleico diana es un ácido nucleico vírico.

11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que dicho ácido nucleico vírico es un ácido nucleico del VHC.

12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en el que se realiza la etapa b) en presencia de una enzima que comprende actividad de uracil-ADN glucosilasa.

13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en el que al menos uno de dichos cebadores directos extendidos comprende una secuencia del grupo que consiste en AAAAGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 3), AAAAAAGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 5), AAAAAAAGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 7), TTTTGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 9), TTTTTGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 11), GGGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 3), ATATGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA (SEQ ID NO: 15), AAAAAACCCACTCTATGTCCGGTC (SEQ ID NO: 19), ATATATGTACGCCGGAATTGCCGAAA (SEQ ID NO: 21) y AAACCACTCTATGTCCGGTC (SEQ ID NO: 23) y/o al menos uno de dichos cebadores inversos extendidos comprende una secuencia del grupo que consiste en AAA-AGCAAGCACCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 4), AAAAAAGCAAGCAACCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 6), AAAAAAAGCAAGCACCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 8), TTTTGAAGCACCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 10), TTTTTGAAGCACCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 12), GGGCAAGCACCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 14), ATATGCAAGCACCTATCAGGCAGTACCACAA (SEQ ID NO: 16), AAATGGCGTCTCCACGCGGCTGG (SEQ ID NO: 20) y ATATATCTTCCCAGGACCTGCCGGT (SEQ ID NO: 22).

14. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en el que al menos una de dichas sondas detectables comprende una secuencia del grupo que consiste en (SEQ ID NO: 27), (SEQ ID NO: 28), (SEQ ID NO: 29), (SEQ ID NO: 30) y una complementaria o subsecuencia de cada una de estas secuencias.

15. Uso de al menos un cebador directo extendido y/o al menos un cebador inverso extendido, comprendiendo cada uno una secuencia de poliN añadida al extremo 5' del cebador respectivo y que no es complementaria a la secuencia diana, en el que dicha secuencia de poliN se selecciona de un grupo que consiste en una secuencia de poliA, una de poliT, una de poliAT, una de poliU, una de poliC y una de poliG y es de 2 a 10 nucleótidos de longitud, para prevenir o suprimir la formación de productos de alto peso molecular durante la amplificación por PCR no finalizada antes de 50 ciclos.

16. Uso de un kit en un procedimiento o uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-15, comprendiendo dicho kit

(a) al menos una enzima que comprende actividad de ADN polimerasa,

(b) al menos una enzima que comprende actividad de uracil-ADN glucosilasa,

(c) nucleósidos trifosfato u otros monómeros de nucleósido,

(d) al menos un cebador directo extendido y/o al menos un cebador inverso extendido para generar al menos un amplicón, y

(e) al menos una sonda detectable específica para dicho amplicón o un tinte de unión a ADN, en el que al menos

uno de dicho cebador directo y/o cebador inverso extendido comprende una secuencia de poliN añadida al extremo 5' del cebador y que es no complementaria a la secuencia diana, en el que dicha secuencia de poliN se selecciona de un grupo que consiste en una secuencia de poliA, una de poliT, una de poliAT, una de poliU, una de poliC y una de poliG y es de 2 a 10 nucleótidos de longitud.

Figura 1:

Cebadores de referencia:

5' - GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA - 3' (SEQ ID NO: 1)

5' - GCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA - 3' (SEQ ID NO: 2)

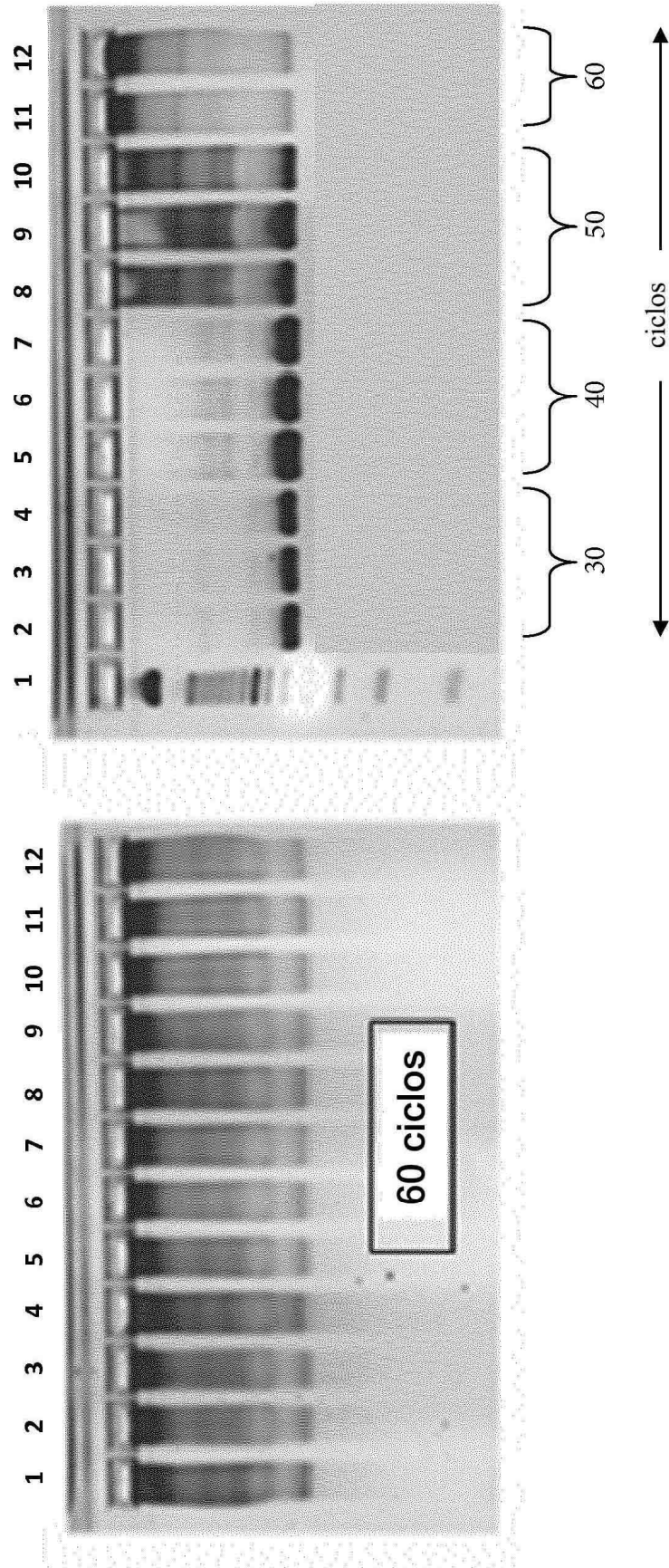


Figura 2:

Variantes protuberantes modG2:

5' - GGGCAGAAAGCGTCTTAGCCATGGCGTTA - 3' (SEQ ID NO: 13)

5' - GGGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA - 3' (SEQ ID NO: 14)

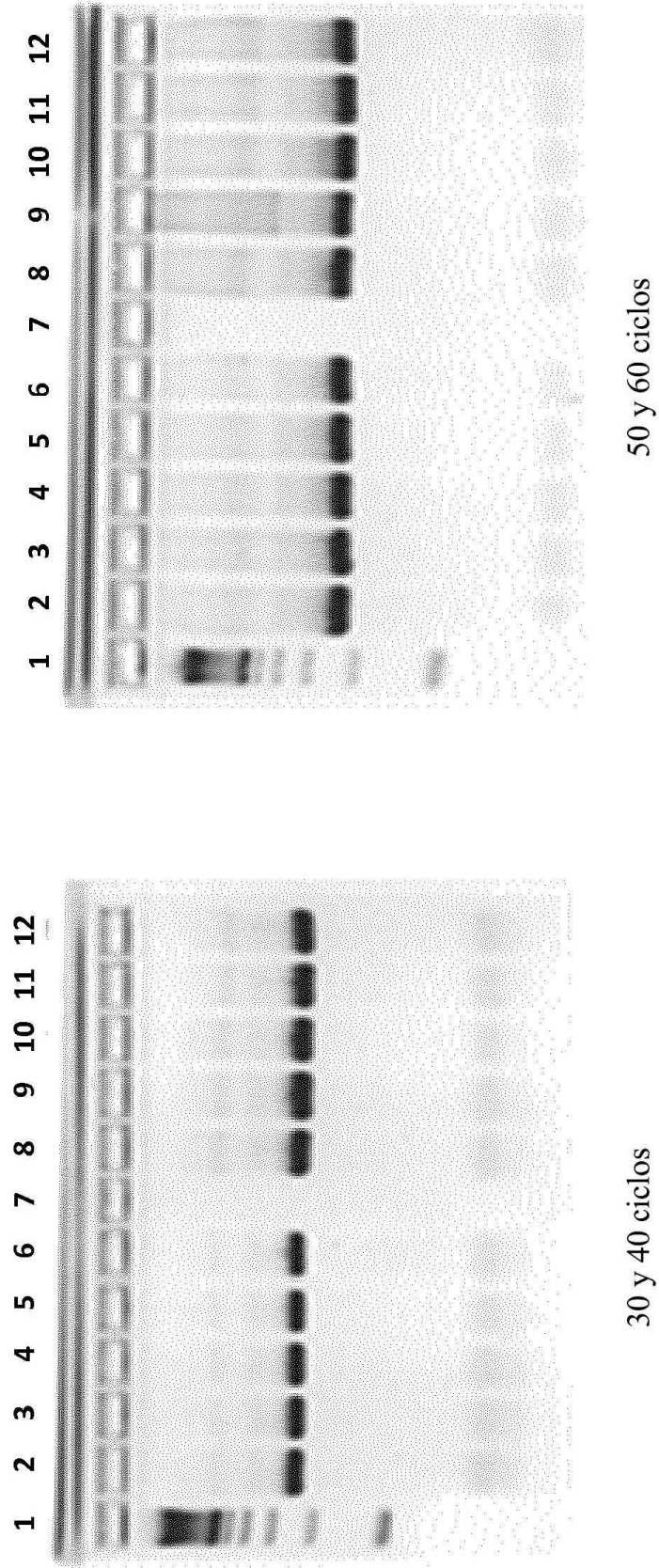
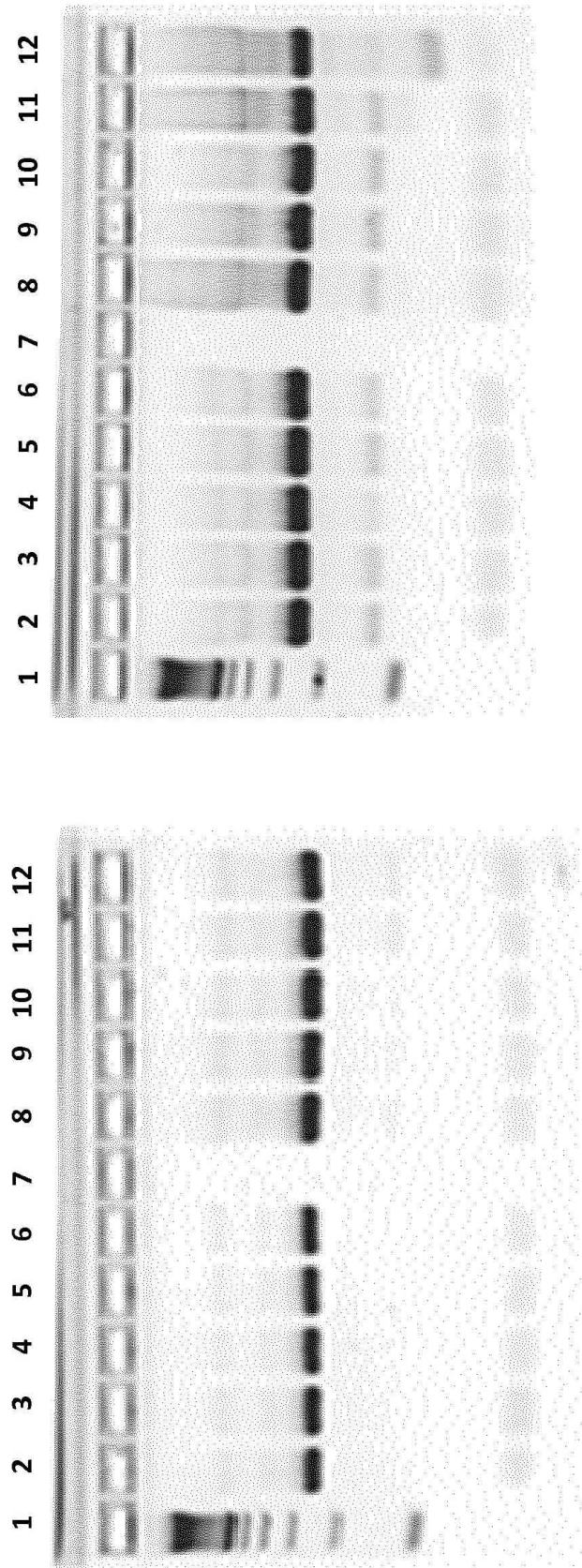


Figura 3:

Variantes protuberantes modT4:

5' - TTTTGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA - 3' (SEQ ID NO: 9)
 5' - TTTTGCAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA - 3' (SEQ ID NO: 10)



30 y 40 ciclos

50 y 60 ciclos

Figura 4:

Variantes protuberantes modA4:

5' - AAAAGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA - 3' (SEQ ID NO: 3)

5' - AAAAGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA - 3' (SEQ ID NO: 4)

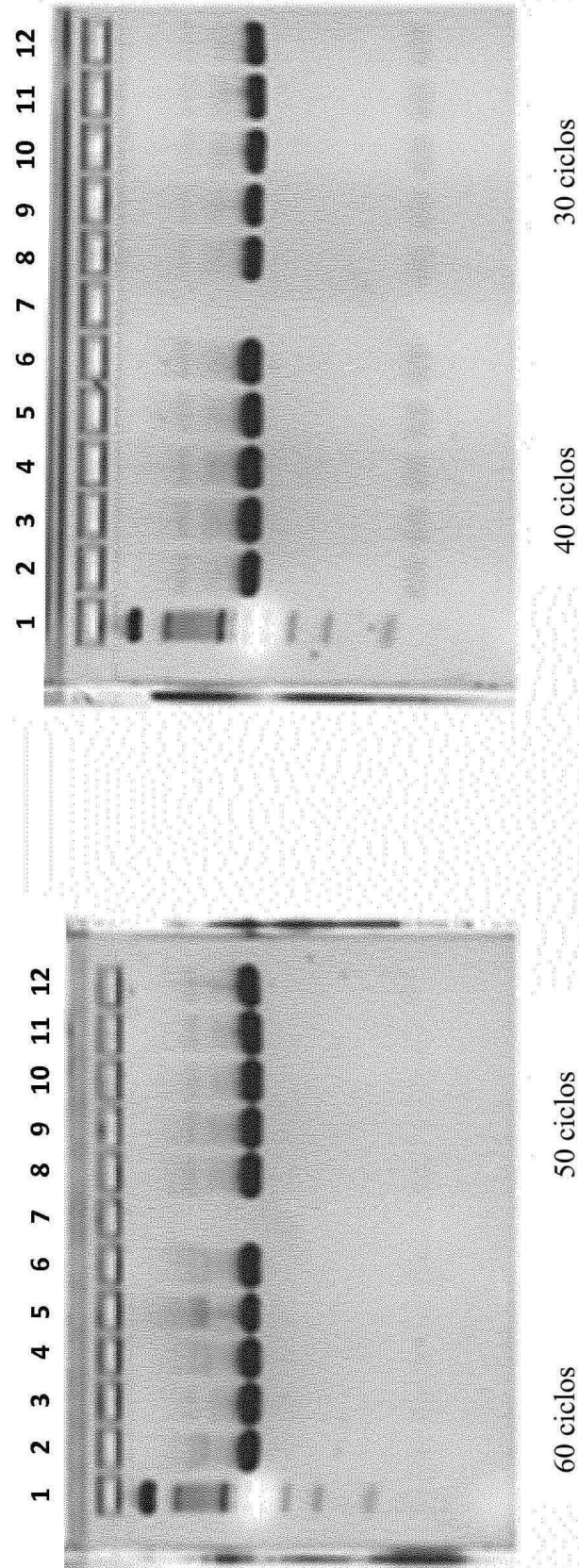


Figura 5:

Variantes protuberantes modA6:

5' - AAAAAAGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA - 3' (SEQ ID NO: 5)

5' - AAAAAAGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA - 3' (SEQ ID NO: 6)

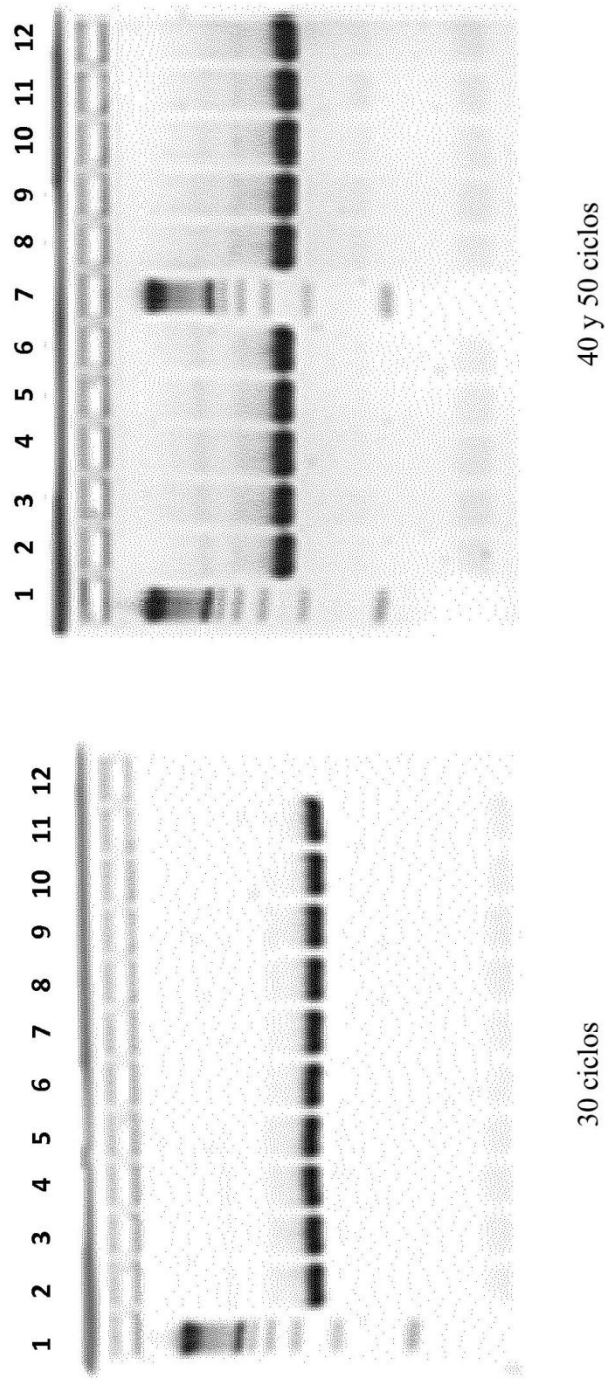


Figura 5 (cont.):

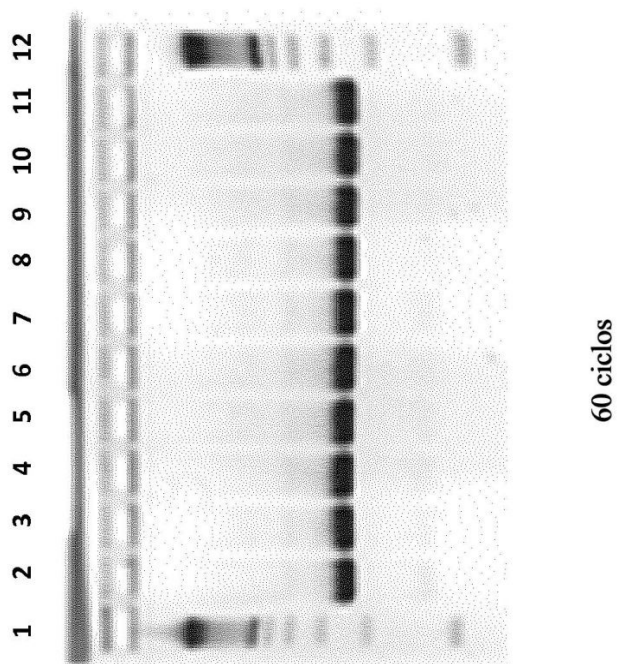
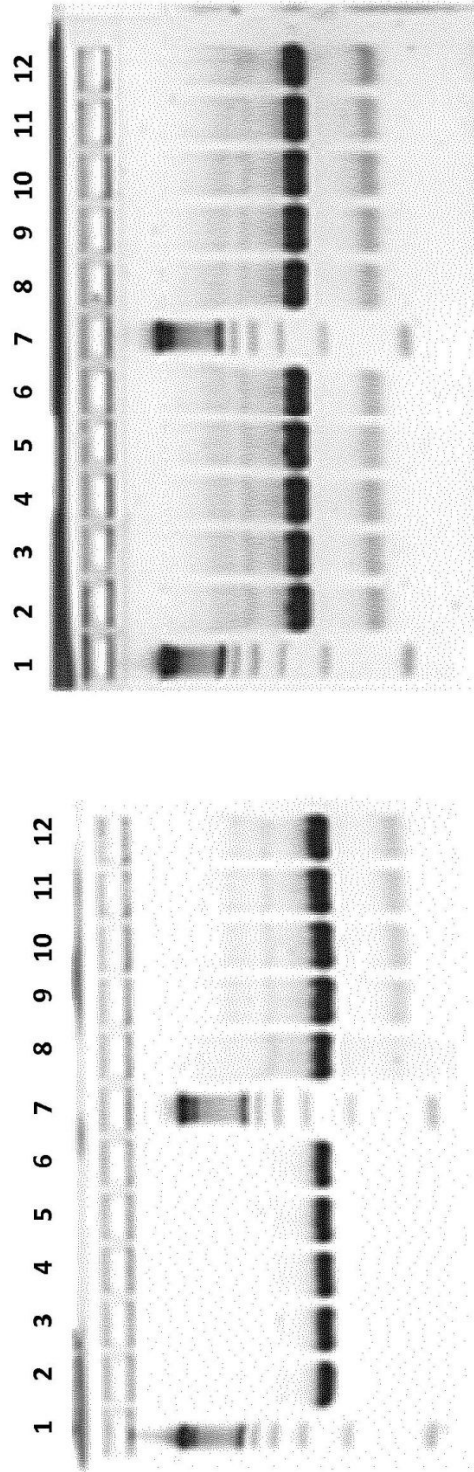


Figura 6:

Variantes protuberantes modA8:

5' - AAAAAAAAAAGCAGAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA - 3' (SEQ ID NO: 7)

5' - AAAAAAAAAAGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA - 3' (SEQ ID NO: 8)



30 y 40 ciclos

50 y 60 ciclos

Figura 7:

Variantes protuberantes mod(AT)2:

5' - ATATGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA - 3' (SEQ ID NO: 15)

5' - ATATGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA - 3' (SEQ ID NO: 16)

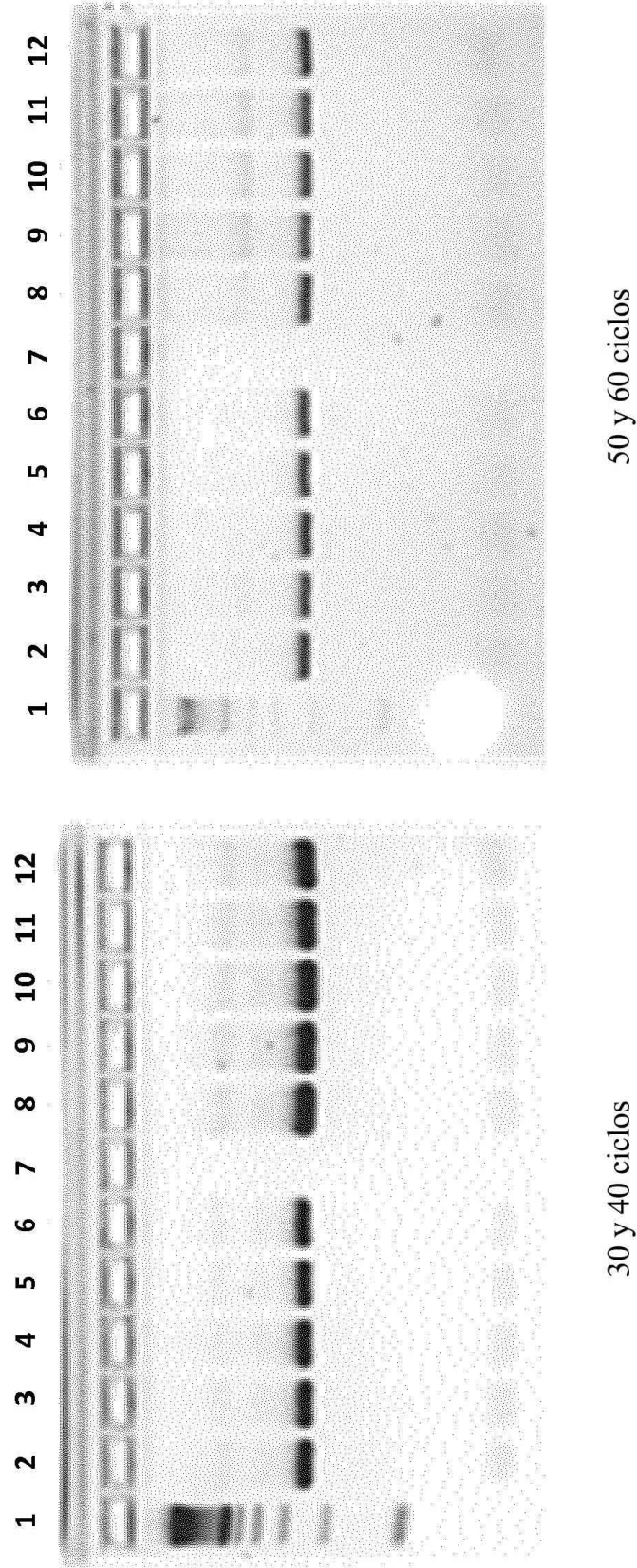
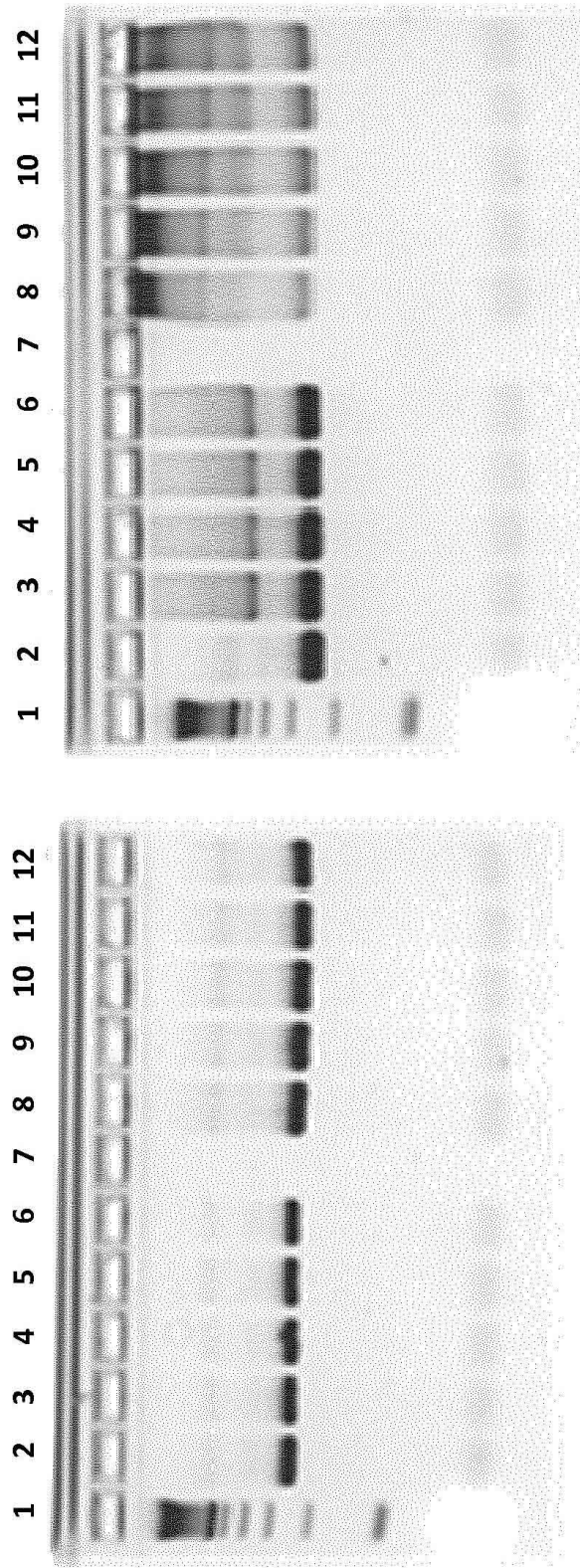


Figura 8:

Variantes protuberantes N6 mixtas:

5' - GACTTAGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTA - 3' (SEQ ID NO: 17)

5' - CTCTAAGCAAGCACCCCTATCAGGCAGTACCACAA - 3' (SEQ ID NO: 18)



30 y 40 ciclos

50 y 60 ciclos