

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 949**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2014** E 14182730 (3)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017** EP 2990491

54 Título: **Oligonucleótidos para controlar la amplificación de ácidos nucleicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FISS, ELLEN H. y
NEWTON, NICOLAS

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 644 949 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

Oligonucleótidos para controlar la amplificación de ácidos nucleicos

5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo del diagnóstico *in vitro*. Dentro de este campo, se refiere particularmente a la amplificación y detección de un ácido nucleico de control para propósitos cualitativos y/o cuantitativos.

10 Antecedentes

En el campo del diagnóstico molecular, la amplificación de ácidos nucleicos a partir de numerosas fuentes ha sido de considerable importancia. Los ejemplos de aplicaciones de diagnóstico de amplificación y detección 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). Además, dichas técnicas de amplificación son adecuadas para dianas bacterianas, tales como micobacterias, o el análisis de marcadores oncológicos.

La técnica de amplificación más destacada y ampliamente usada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otras reacciones de amplificación comprenden, entre otras, la reacción en cadena de la ligasa, reacción en cadena de la polimerasa-ligasa, Gap-PCR, reacción en cadena de reparación, 3SR, NASBA, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación por Q β .

Los sistemas automatizados para el análisis basado en PCR a menudo hacen uso de la detección en tiempo real del producto de amplificación durante el procedimiento de PCR en el mismo recipiente de reacción. La clave de dichos procedimientos es el uso de oligonucleótidos modificados que portan marcadores o grupos indicadores.

Se ha demostrado que es posible la amplificación y detección de más de un ácido nucleico diana en el mismo recipiente. Este procedimiento se llama comúnmente amplificación "múltiple" y requiere marcadores diferentes para la distinción si se realiza la detección en tiempo real.

En el campo del diagnóstico clínico con ácidos nucleicos es generalmente deseable o incluso obligatorio controlar la amplificación respectiva usando ácidos nucleicos de control con una secuencia conocida, para propósitos cualitativos (control del rendimiento) y/o cuantitativos (determinación de la cantidad de un ácido nucleico diana usando el control como referencia). Dada la diversidad especialmente de las dianas de diagnóstico, que comprenden ácidos nucleicos procariontes, eucariotas, así como víricos, y dada la diversidad entre los tipos diferentes de ácidos nucleicos, tales como ARN y ADN, los ácidos nucleicos de control se diseñan normalmente de una manera específica.

El documento EP 2759604 divulga un procedimiento para la detección de un conjunto de ácidos nucleicos de control interno no competitivos.

En el presente documento se describen oligonucleótidos mejorados y procedimientos para este propósito.

45 Descripción

Un primer aspecto descrito en el presente documento es un oligonucleótido aislado con la secuencia de SEQ ID NO 1. Este oligonucleótido se puede usar como una sonda para la detección mejorada de un ácido nucleico de control que comprende la secuencia de SEQ ID NO 4.

De esta manera, otro aspecto descrito en el presente documento es un uso de una sonda con la SEQ ID NO 1 para la detección de un ácido nucleico de control que comprende la SEQ ID NO 4.

La secuencia de SEQ ID NO 4 es una secuencia permutada de manera aleatoria que no muestra ninguna homología significativa con respecto a ninguna secuencia natural, de manera que pueda servir como una secuencia de ácido nucleico de control interno no competitivo para la detección cualitativa y/o cuantitativa de múltiples ácidos nucleicos diana, como se describe en el documento EP 2759604.

En los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, ensayos de PCR, como los ensayos de PCR en tiempo real, la SEQ ID NO 4 se puede amplificar eficazmente con un conjunto específico de cebadores que comprende un primer cebador con la SEQ ID NO 2 y un segundo cebador con la SEQ ID NO 3.

De ahí que un aspecto descrito en el presente documento sea una composición que comprende los oligonucleótidos con las SEQ ID NO 1, 2 y 3.

Estos ácidos nucleicos se pueden proporcionar al experto en la técnica como un kit de partes, que comprende adicionalmente una diana de amplificación y detección adecuada, en concreto, un ácido nucleico de control con la

secuencia de SEQ ID NO 4.

Por lo tanto, un aspecto adicional descrito en el presente documento es un kit para controlar la detección de múltiples ácidos nucleicos diana, comprendiendo el kit una sonda de detección con la SEQ ID NO 1, un par de cebadores de amplificación con la SEQ ID NO 2 y la SEQ ID NO 3 y un ácido nucleico de control que comprende la SEQ ID NO 4.

El uso de un ácido nucleico de control que comprende la secuencia de SEQ ID NO 4 con la detección mejorada mediante una sonda con la SEQ ID NO 1 como se describe en el presente documento facilita el desarrollo de ensayos simultáneos mejorados frente a una pluralidad de parámetros y/o tipos de ácidos nucleicos a la par que se usa la misma secuencia de ácido nucleico de control interno para dichos diferentes parámetros y/o tipos de ácidos nucleicos. Por lo tanto, contribuye a reducir la complejidad global de los experimentos correspondientes en varios niveles: Por ejemplo, únicamente se ha de diseñar una secuencia de ácido nucleico de control interno y añadir a las mezclas de amplificación respectivas, ahorrando, de esta manera, tiempo y costes para diseñar y sintetizar o adquirir múltiples secuencias de ácido nucleico de control. El ensayo o ensayos se puede(n) optimizar y se reduce el riesgo de errores de manipulación. Además, cuantas más secuencias de ácido nucleico de control diferentes se empleen en un ensayo o ensayos paralelos que se pueden llevar a cabo de manera simultánea en las mismas condiciones, más complejo puede resultar ajustar las condiciones respectivas. Además, con un control individual adecuado para una pluralidad de ácidos nucleicos, dicho control se puede distribuir desde una fuente individual a recipientes diferentes que contengan dichos ácidos nucleicos diana diferentes. En algunos modos de realización, la secuencia de ácido nucleico de control individual también puede servir como un control cualitativo y como uno cuantitativo.

La mejora de la detección de un ácido nucleico de control que comprende la SEQ ID NO 4 usando una sonda con la secuencia de SEQ ID NO 1, como se muestra en el ejemplo en el presente documento, potencia la fiabilidad de las mediciones llevadas a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en el documento EP 2759604. La sonda con la secuencia de SEQ ID NO 1 no se solapa con ninguna secuencia oligonucleotídica divulgada en el documento EP 2759604, en particular, no con la sonda con la secuencia de SEQ ID NO 5 (divulgada como SEQ ID NO 52 en el documento EP 2759604) frente a la que se ha sometido a prueba la SEQ ID NO 1 en el ejemplo actual.

Un procedimiento en el que se puede aplicar ventajosamente el uso de un ácido nucleico de control que comprende la secuencia de SEQ ID NO 4 con la detección mejorada mediante una sonda con la SEQ ID NO 1 es el siguiente:

Un procedimiento para el aislamiento controlado de manera interna y amplificación de manera simultánea de un primer y un segundo ácido nucleico diana que pueden estar presentes en una o más muestras de fluido, comprendiendo dicho procedimiento las etapas automatizadas de:

- a. añadir un ácido nucleico de control interno que comprende la secuencia de SEQ ID NO 4 a cada una de dichas muestras de fluido
 - b. combinar entre sí un material de soporte sólido y dicha una o más muestras de fluido en uno o más recipientes durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para permitir que los ácidos nucleicos que comprenden los ácidos nucleicos diana, si están presentes en dicha una o más muestras de fluido, y el ácido nucleico de control interno se inmovilicen sobre el material de soporte sólido
 - c. aislar el material de soporte sólido del otro material presente en las muestras de fluido en una estación de separación
 - d. purificar los ácidos nucleicos en dicha estación de separación y lavar el material de soporte sólido una o más veces con un tampón de lavado
 - e. poner en contacto los ácidos nucleicos diana purificados y el ácido nucleico de control interno purificado con reactivos de amplificación que comprenden un conjunto distinto de cebadores y una sonda para cada uno de dichos ácidos nucleicos diana y un conjunto de cebadores que comprende un primer cebador con la SEQ ID NO 2 y un segundo cebador con la SEQ ID NO 3 y una sonda con la SEQ ID NO 1 para dicho ácido nucleico de control interno en al menos dos recipientes de reacción, en los que un primer recipiente de reacción comprende cebadores y una sonda para dicho primer ácido nucleico diana y al menos un segundo recipiente de reacción comprende cebadores y una sonda para dicho segundo ácido nucleico diana y en los que los cebadores y la sonda para el primer ácido nucleico diana están ausentes del segundo recipiente de reacción y los cebadores y la sonda para el segundo ácido nucleico diana están ausentes del primer recipiente de reacción
 - f. incubar en dichos recipientes de reacción dichos ácidos nucleicos diana purificados y dicho ácido nucleico de control interno purificado con dichos reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación indicativa de la presencia o ausencia de dichos ácidos nucleicos diana
 - g. detectar y medir las señales generadas por los productos de amplificación de dichos ácidos nucleicos diana y que son proporcionales a la concentración de dichos ácidos nucleicos diana, y detectar y medir una señal generada por dicho ácido nucleico de control interno,
- en el que las condiciones para la amplificación y detección en las etapas d. a g. son idénticas para el primer y el segundo recipiente de reacción y, de esta manera, para los ácidos nucleicos diana y el ácido nucleico de control interno.

Como una de las ventajas del procedimiento descrito en el presente documento, las pruebas de una muestra biológica particular para determinar otros ácidos nucleicos en posibles experimentos posteriores no necesitan implicar otro procedimiento de preparación de muestras con la adición de un ácido nucleico de control interno diferente, puesto que

se puede usar el control que comprende la SEQ ID NO 4 para controlar la amplificación de ácidos nucleicos diferentes. De esta manera, una vez que se haya añadido un ácido nucleico de control interno, se pueden someter a ensayo otros parámetros en la misma muestra en las mismas condiciones.

5 El ácido nucleico de control interno descrito anteriormente es no competitivo.

10 Un "ácido nucleico de control interno no competitivo" tiene diferentes sitios de unión al cebador que la diana y, de esta manera, se une a cebadores diferentes. Las ventajas de dicha configuración comprenden, entre otras, el hecho de que los acontecimientos de amplificación individuales de los ácidos nucleicos diferentes en la mezcla de reacción pueden tener lugar independientemente entre sí sin ningún efecto de competición. De esta manera, no se produce ningún efecto adverso en relación con el límite de detección del ensayo, como puede ser el caso en una configuración competitiva.

15 El hecho de que el procedimiento descrito en el presente documento implique un conjunto distinto de cebadores para cada uno de dichos ácidos nucleicos diana y para dicho ácido nucleico de control interno hace que el procedimiento sea considerablemente flexible. En esta configuración no competitiva no es necesario introducir sitios de unión específicos de diana en el ácido nucleico de control, como en el caso de una configuración competitiva, y se evitan los inconvenientes de una configuración competitiva, tal como la competencia por reactivos de amplificación. En una configuración no competitiva, el ácido nucleico de control interno tiene una secuencia diferente de cualquier secuencia diana, a fin de no competir por sus cebadores y/o sondas. La secuencia del ácido nucleico de control interno es diferente de las demás secuencias de ácido nucleico en la muestra de fluido. Como un ejemplo, si la muestra de fluido deriva de un ser humano, el ácido nucleico de control interno no tiene una secuencia que también se produzca de manera endógena en seres humanos. De esta manera, la diferencia en la secuencia es al menos lo suficientemente significativa para no permitir la unión de cebadores y/o sondas al ácido o ácidos nucleico(s) endógeno(s) respectivo(s)

20 en condiciones rigurosas y, de esta manera, hace que la configuración sea competitiva. La SEQ ID NO 4 es una secuencia permutada de manera aleatoria basada originalmente en un genoma natural. Como se conoce en la técnica, "permutar de manera aleatoria" significa introducir un número de mutaciones de bases en una secuencia. En el caso de la SEQ ID NO 4, la secuencia del ácido nucleico de control interno usada en la invención se altera sustancialmente con respecto al gen natural del que deriva.

25

30

El procedimiento que comprende las etapas automatizadas como se describe en el presente documento también presenta diversas ventajas adicionales:

35 Ha sido un obstáculo en la técnica anterior que el número de ácidos nucleicos diana diferentes en un ensayo múltiple llevado a cabo en un recipiente de reacción individual esté limitado por el número de marcadores apropiados. En un ensayo de PCR en tiempo real, por ejemplo, el solapamiento potencial de los espectros de los fluorocromos tiene un gran impacto en el rendimiento del ensayo (riesgo de resultados falsos positivos, menor precisión, etc.), por lo tanto, los fluoróforos respectivos se tienen que seleccionar cuidadosamente y separar espectralmente bien a fin de asegurar el rendimiento deseado de una prueba de diagnóstico. Típicamente, el número de fluoróforos utilizables diferentes

40 corresponde a un número de un solo dígito de canales de fluorescencia en instrumentos de PCR.

Por el contrario, en el procedimiento descrito en el presente documento, la amplificación controlada de manera interna de al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana tiene lugar en al menos dos recipientes de reacción diferentes, permitiendo la amplificación simultánea de un número más alto de ácidos nucleicos diana diferentes, puesto que las señales en recipientes de reacción diferentes se pueden detectar independientemente entre sí. En el presente documento todavía se incluyen modos de realización en los que se realizan reacciones múltiples en uno o más de los múltiples recipientes de reacción, multiplicando así el número de dianas que se pueden amplificar de manera simultánea y en las mismas condiciones. En dichos modos de realización, el ácido nucleico de control interno sirve como un control para los ácidos nucleicos diana diferentes en un recipiente, así como ácidos nucleicos diana diferentes

45

50 en un recipiente diferente.

De esta manera, en algunos modos de realización del procedimiento descrito en el presente documento, al menos dos ácidos nucleicos diana se amplifican en el mismo recipiente de reacción.

55 Especialmente si se sospecha que una muestra de fluido contiene ácidos nucleicos diana de organismos diferentes, o incluso los organismos diferentes como tales, o si no está claro cuáles de los ácidos nucleicos u organismos diferentes pueden estar presentes en dicha muestra, un modo de realización es el procedimiento descrito en el presente documento, en el que el primer ácido nucleico diana y el segundo ácido nucleico diana son de organismos diferentes.

60

En un modo de realización del procedimiento descrito en el presente documento, el primer y/o el segundo ácido nucleico diana es un ácido nucleico vírico.

65 En un modo de realización adicional del procedimiento descrito en el presente documento, el primer y/o el segundo ácido nucleico diana es un ácido nucleico no vírico.

En aún un modo de realización adicional del procedimiento descrito en el presente documento, el primer y/o el segundo ácido nucleico diana es un ácido nucleico bacteriano.

5 Como se describe anteriormente, el procedimiento descrito en el presente documento es útil para controlar cualitativa o cuantitativamente la amplificación de al menos un primer y un segundo ácido nucleico diana.

10 La detección cualitativa de un ácido nucleico en una muestra biológica es, por ejemplo, fundamental para reconocer una infección de una persona. Así, un requisito importante para un ensayo para la detección de una infección microbiana es que se eviten resultados falsos negativos o falsos positivos, puesto que dichos resultados darían lugar prácticamente de manera inevitable a consecuencias graves con respecto al tratamiento del paciente respectivo. De esta manera, especialmente en procedimientos basados en PCR, se añade un ácido nucleico de control interno cualitativo a la mezcla de detección. Dicho control es particularmente importante para confirmar la validez de un resultado de prueba. Al menos en el caso de un resultado negativo con respecto al ácido nucleico diana respectivo, la reacción de control interno cualitativo ha de ser reactiva en un entorno dado, es decir, se debe detectar el control interno cualitativo, de lo contrario se considera que la propia prueba no funciona. Sin embargo, en una configuración cualitativa, dicho control interno cualitativo no se tiene que detectar necesariamente en caso de un resultado positivo. Para las pruebas cualitativas, es especialmente importante que la sensibilidad de la reacción esté garantizada y, por lo tanto, estrictamente controlada. Como consecuencia, la concentración del control interno cualitativo debe ser relativamente baja, de modo que incluso en una situación de inhibición leve no se detecte el control interno cualitativo y, por lo tanto, la prueba se invalide.

20 De esta manera, en algunos modos de realización del procedimiento descrito en el presente documento, la presencia de un producto de amplificación de dicho ácido nucleico de control interno es indicativa de una amplificación que se produce en la mezcla de reacción incluso en ausencia de productos de amplificación para uno o más de dichos ácidos nucleicos diana.

30 Por otra parte, y además de detectar meramente la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana en una muestra, a menudo es importante determinar la cantidad de dicho ácido nucleico. Como un ejemplo, se pueden evaluar la fase y gravedad de una enfermedad vírica basándose en la carga vírica. Adicionalmente, la supervisión de cualquier tratamiento requiere información sobre la cantidad de un patógeno presente en una persona a fin de evaluar el éxito del tratamiento. Para un ensayo cuantitativo, es necesario introducir un ácido nucleico patrón cuantitativo que sirva como referencia para determinar la cantidad absoluta de un ácido nucleico diana. La cuantificación se puede efectuar haciendo referencia a una calibración externa o bien implementando un patrón cuantitativo interno.

35 En el caso de una calibración externa, en reacciones separadas se crean curvas de calibrado usando cantidades conocidas de ácidos nucleicos idénticos o comparables. La cantidad absoluta de un ácido nucleico diana se determina posteriormente mediante comparación del resultado obtenido con la muestra analizada con dicha función patrón. Sin embargo, la calibración externa tiene la desventaja de que no se reflejan un posible procedimiento de extracción, su eficacia variada y la posible y a menudo no predecible presencia de agentes que inhiben la reacción de amplificación y/o detección en el control.

45 Esta circunstancia se aplica a cualquier efecto relacionado con la muestra. Por lo tanto, puede ser el caso de que una muestra se evalúe como negativa debido a un procedimiento de extracción sin éxito u otros factores basados en la muestra, aunque el ácido nucleico diana que se va a detectar y cuantificar esté realmente presente en la muestra.

Por estos y otros motivos, es ventajoso un ácido nucleico de control interno añadido a la propia reacción de prueba. Cuando sirve como patrón cuantitativo, dicho ácido nucleico de control interno tiene al menos las dos funciones siguientes en una prueba cuantitativa:

50 i) Supervisa la validez de la reacción.

55 ii) Sirve como referencia en el cálculo de valores, compensando, de esta manera los efectos de la inhibición y controlando los procedimientos de preparación y amplificación para permitir una cuantificación más precisa. Por lo tanto, a diferencia del ácido nucleico de control interno cualitativo en una prueba cualitativa que únicamente debe ser positivo en una reacción negativa para diana, el ácido nucleico de control cuantitativo en una prueba cuantitativa tiene dos funciones: control de reacción y calibración de reacción. Por lo tanto, debe ser positivo y válido tanto en reacciones positivas para diana como reacciones negativas para diana.

60 Adicionalmente, ha de ser adecuado para proporcionar un valor de referencia fiable para el cálculo de concentraciones de ácido nucleico altas. De esta manera, la concentración de un ácido nucleico de control cuantitativo interno necesita ser relativamente alta.

65 Por lo tanto, en algunos modos de realización, el procedimiento descrito en el presente documento comprende adicionalmente la siguiente etapa:

h. determinar la cantidad de uno o más de dichos ácidos nucleicos diana.

El procedimiento controlado de manera interna descrito en el presente documento requiere considerablemente menos tiempo práctico y las pruebas son mucho más simples de realizar que, por ejemplo, los procedimientos de PCR en tiempo real usados en la técnica anterior. El procedimiento ofrece una ventaja principal en el campo de la virología clínica, ya que permite la amplificación paralela de ácidos nucleicos de varios virus, como virus ADN y ARN, bacterias y/u otros patógenos en experimentos paralelos. El procedimiento es particularmente útil en el tratamiento de pacientes postrasplante, en quienes se requiere supervisión vírica frecuente. Así, dicho procedimiento facilita un diagnóstico rentable y contribuye a una disminución del uso de agentes antivíricos y hospitalizaciones y complicaciones víricas. Esto se aplica igualmente al campo de la microbiología clínica. En general, se logran eficacias en un tiempo de respuesta más rápido y se mejora la flexibilidad de las pruebas. En consecuencia, esto da lugar a una disminución en el número de pruebas requeridas sobre un paciente para establecer un diagnóstico y, potencialmente, a estancias hospitalarias más cortas (por ejemplo, si un diagnóstico se puede proporcionar antes, los pacientes que requieran tratamiento antimicrobiano lo recibirán antes y, de esta manera, se recuperarán más temprano). Además, los pacientes muestran menos procesos patológicos y, por lo tanto, generan menos costes relacionados con el tratamiento de apoyo (por ejemplo, cuidados intensivos relacionados con un retraso en el diagnóstico del síndrome séptico). Proporcionar antes un resultado negativo puede tener implicaciones importantes para la prescripción excesiva de antibióticos. Por ejemplo, si un resultado de prueba obtenido mediante el procedimiento de acuerdo con la invención puede descartar el patógeno más rápidamente que con un procedimiento de PCR en tiempo real estándar, entonces el médico no se verá obligado a usar antibióticos empíricos. De manera alternativa, si se usan antibióticos empíricos, la duración del tratamiento respectivo se puede acortar.

Con respecto a diseñar una prueba específica basada en el procedimiento descrito en el presente documento, el experto en la técnica se beneficiará de las siguientes ventajas:

- una reducción de la complejidad de los programas informáticos (lo que da lugar a un riesgo reducido de errores de programación)
- enfoque de los esfuerzos de desarrollo del ensayo en la optimización de la química en lugar de la química más los parámetros de control del instrumento
- sistema mucho más fiable, puesto que siempre se usa un procedimiento individual y el equipo informático se puede diseñar óptimamente para realizar este protocolo
- el experto en la técnica que realiza el procedimiento controlado de manera interna descrito anteriormente está provisto de la flexibilidad para ejecutar múltiples ensayos diferentes en paralelo como parte del mismo procedimiento
- reducción de costes.

En el contexto descrito en el presente documento, el término “soporte sólido” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tipo de soporte sólido al que se puede unir el analito, directa y no específicamente mediante adsorción, o bien indirecta y específicamente. La unión indirecta puede ser mediante unión a una sonda de ácido nucleico de captura que sea homóloga a una secuencia diana del ácido nucleico de interés. De esta manera, usando sondas de captura acopladas sobre un soporte sólido, se puede separar un ácido nucleico diana del material no diana, o ácido nucleico no diana. Dicha sonda de captura se inmoviliza sobre el soporte sólido. El material de soporte sólido puede ser un polímero o una composición de polímeros. Otros tipos de material de soporte sólido incluyen partículas de sílice magnéticas, partículas de metal, partículas de vidrio magnéticas, fibras de vidrio, filtros de fibra de vidrio, papel de filtro, etc., aunque el material de soporte sólido no está limitado a estos materiales.

“Inmovilizar”, como se usa en el presente documento, significa capturar objetos, tales como ácidos nucleicos, de una manera reversible o irreversible. Particularmente, “inmovilizado sobre el material de soporte sólido” significa que el objeto u objetos se asocian con el material de soporte sólido con el propósito de separarlos de cualquier medio circundante, y se pueden recuperar, por ejemplo, mediante separación del material de soporte sólido en un punto posterior. En este contexto, la “inmovilización” puede comprender la adsorción de ácidos nucleicos en vidrio u otras superficies adecuadas de materiales sólidos como se describe arriba. Además, los ácidos nucleicos se pueden inmovilizar específicamente mediante unión a sondas de captura, en las que los ácidos nucleicos se unen a ácidos nucleicos esencialmente complementarios acoplados a un soporte sólido mediante apareamiento de bases. En este último caso, dicha inmovilización específica da lugar a la unión predominante de ácidos nucleicos diana.

Como se usa en el presente documento, “purificación”, “aislamiento” o “extracción” de ácidos nucleicos se refiere a lo siguiente: antes de que los ácidos nucleicos se puedan analizar en un ensayo de diagnóstico mediante amplificación, típicamente se tienen que purificar, aislar o extraer de muestras biológicas que contengan mezclas complejas de diferentes componentes. Para las primeras etapas, se pueden usar procedimientos que permitan el enriquecimiento de los ácidos nucleicos. Después de la purificación o aislamiento de los ácidos nucleicos que incluyen los ácidos nucleicos diana de su entorno natural, se puede realizar el análisis por medio de la detección y amplificación simultánea descritas en el presente documento.

“De manera simultánea”, como se usa en el presente documento, significa que dos acciones, tales como amplificar un primer y un segundo o más ácidos nucleicos, se realizan al mismo tiempo y en las mismas condiciones físicas. En un modo de realización, la amplificación simultánea de los al menos primer y segundo ácidos nucleicos diana se realiza en un recipiente. En otro modo de realización, la amplificación simultánea se realiza con al menos un ácido nucleico en un recipiente y al menos un segundo ácido nucleico en un segundo recipiente, al mismo tiempo y en las mismas

condiciones físicas, particularmente con respecto a la temperatura y el tiempo de incubación, en la que el ácido nucleico de control interno mencionado anteriormente está presente en cada uno de dichos recipientes.

5 En el presente documento se usa “ácido nucleico diana” para designar un ácido nucleico en una muestra que se debe analizar, es decir, se debe determinar la presencia, no presencia y/o cantidad del mismo en una muestra.

El “primer ácido nucleico diana” y el “segundo ácido nucleico diana” son ácidos nucleicos diferentes.

10 El término “muestra de fluido” se refiere a un material que potencialmente puede contener un analito de interés. La muestra puede derivar de cualquier fuente, en particular, cualquier fuente biológica, tal como un fluido fisiológico, incluyendo sangre, saliva, líquido ocular del cristalino, líquido cefalorraquídeo, sudor, orina, heces, semen, leche, líquido ascítico, mucosa, líquido sinovial, líquido peritoneal, líquido amniótico, tejido, células cultivadas o similares. La muestra de fluido sometida al procedimiento descrito en el presente documento se puede pretratar antes de su uso, tal como preparar plasma a partir de sangre, diluir fluidos viscosos, lisis o similares. Los procedimientos de tratamiento
15 pueden implicar la filtración, destilación, concentración, inactivación de componentes interferentes, la adición de reactivos y similares. Se puede usar directamente una muestra de fluido según se obtiene de la fuente o usarse tras un pretratamiento para modificar el carácter de la muestra. En algunos modos de realización, un material inicialmente sólido o semisólido se vuelve líquido disolviéndolo o suspendiéndolo con un medio líquido adecuado. Se sospecha que la muestra de fluido contiene un determinado ácido nucleico diana.

20 El término “recipiente de reacción” comprende, pero no está limitado a, tubos o los pocillos de placas, tales como micropocillo, pocillo profundo u otros tipos de placas multipocillo, en los que tiene lugar una reacción para el análisis de la muestra de fluido tal como, por ejemplo, transcripción inversa o una reacción en cadena de la polimerasa. Las paredes o límites exteriores de dichos recipientes son químicamente inertes de tal manera que no interfieran con la
25 reacción analítica que tiene lugar dentro. Preferentemente, el aislamiento de los ácidos nucleicos como se describe anteriormente también se lleva a cabo en una placa multipocillo.

30 En este contexto, las placas multipocillo en sistemas analíticos permiten la separación paralela y el análisis o almacenamiento de múltiples muestras. Las placas multipocillo se pueden optimizar para su máxima absorción de líquido o para su máxima transferencia de calor. Una placa multipocillo preferente para su uso en el contexto de la presente invención se optimiza para incubar o separar un analito en un analizador automatizado. Preferentemente, la placa multipocillo está construida y dispuesta para poner en contacto un dispositivo magnético y/o un dispositivo de calentamiento.

35 Una “estación de separación” es un dispositivo o un componente de un sistema analítico que permite el aislamiento del material de soporte sólido del otro material presente en la muestra de fluido. Dicha estación de separación puede comprender, por ejemplo, pero no está limitada a, una centrifugadora, una gradilla con tubos de filtro, un imán u otros componentes adecuados. En un modo de realización preferente de la invención, la estación de separación comprende uno o más imanes. Preferentemente, se usan uno o más imanes para la separación de partículas magnéticas,
40 preferentemente partículas de vidrio magnéticas, como soporte sólido. Si, por ejemplo, la muestra de fluido y el material de soporte sólido se combinan entre sí en los pocillos de una placa multipocillo, entonces uno o más imanes que comprende la estación de separación se puede poner en contacto, por ejemplo, con la propia muestra de fluido introduciendo los imanes en los pocillos, o dicho uno o más imanes se pueden aproximar a las paredes exteriores de los pocillos a fin de atraer las partículas magnéticas y posteriormente separarlas del líquido circundante.

45 Un “tampón de lavado” es un fluido que está diseñado para eliminar los componentes no deseados, especialmente en un procedimiento de purificación. Dichos tampones se conocen bien en la técnica. En el contexto de la purificación de ácidos nucleicos, el tampón de lavado es adecuado para lavar el material de soporte sólido a fin de separar el ácido nucleico inmovilizado de cualquier componente indeseable. El tampón de lavado puede contener, por ejemplo, etanol
50 y/o agentes caotrópicos en una solución o soluciones tamponadas con un pH ácido sin etanol y/o agentes caotrópicos. A menudo, la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan como soluciones madre que se tienen que diluir antes de su uso.

55 Para el tratamiento posterior de los ácidos nucleicos aislados, puede ser ventajoso separarlos del material de soporte sólido antes de someterlos a amplificación.

60 Un “tampón de elución” como se usa en el presente documento es un líquido adecuado para separar los ácidos nucleicos del soporte sólido. Dicho líquido puede ser agua destilada o soluciones salinas acuosas, tales como tampones Tris, como Tris HCl, o HEPES, u otros tampones adecuados conocidos por el experto en la técnica. En algunos modos de realización, el valor de pH de dicho tampón de elución es alcalino o neutro. Dicho tampón de elución puede contener componentes adicionales, tales como quelantes, como EDTA, que estabiliza los ácidos nucleicos aislados mediante inactivación de las enzimas de degradación.

65 Los “reactivos de amplificación”, en el contexto de la invención, son componentes químicos o bioquímicos que posibilitan la amplificación de ácidos nucleicos. Dichos reactivos comprenden, pero no están limitados a, ácido nucleico-polimerasas, tampones, mononucleótidos, tales como nucleósidos trifosfato, oligonucleótidos, por ejemplo,

como cebadores oligonucleotídicos, sales y sus respectivas soluciones, sondas de detección, tintes y más.

5 “Oligonucleótidos” y “oligonucleótidos modificados” son componentes formados a partir de una pluralidad de nucleótidos como sus unidades monoméricas. Comúnmente se hace referencia a los grupos fosfato como que forman la cadena principal internucleosídica del oligonucleótido. El enlace o cadena principal normal de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'. Se conocen en la técnica procedimientos para preparar compuestos oligoméricos de secuencias específicas e incluyen, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias apropiadas y síntesis química directa. En el procedimiento descrito anteriormente, los oligonucleótidos se pueden modificar químicamente, es decir, el cebador y/o la sonda comprenden un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. Entonces, la sonda o el cebador es un oligonucleótido modificado.

15 El término “cebador” se usa en el presente documento como se conoce por el experto en la técnica y se refiere a compuestos oligoméricos, principalmente a oligonucleótidos, pero también a oligonucleótidos modificados que pueden iniciar la síntesis de ADN mediante una ADN polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3' del cebador proporciona un grupo 3'-OH libre al que se pueden acoplar nucleótidos adicionales mediante una ADN polimerasa dependiente de molde que establece un enlace fosfodiéster 3' a 5', con lo que se usan desoxinucleósidos trifosfato y con lo que se libera pirofosfato.

20 Una “sonda” también designa un oligonucleótido natural o modificado. Como se conoce en la técnica, una sonda sirve el propósito de detectar un analito o amplificado. En el caso del procedimiento descrito anteriormente, se pueden usar sondas para detectar los amplificados de los ácidos nucleicos diana. Para este propósito, las sondas típicamente portan marcadores.

25 Los “marcadores”, a menudo denominados “grupos indicadores”, generalmente son grupos que hacen que un ácido nucleico, en particular oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados, así como cualquier ácido nucleico unido a los mismos, sea distinguible del resto de la muestra (los ácidos nucleicos que tienen acoplado un marcador también se pueden llamar compuestos de unión a ácido nucleico marcado, sondas marcadas o simplemente sondas). En algunos modos de realización, los marcadores son marcadores fluorescentes, que pueden ser tintes fluorescentes, tales como un tinte de fluoresceína, un tinte de rodamina, un tinte de cianina y un tinte de cumarina. Los tintes fluorescentes útiles incluyen FAM, HEX, JA270, CAL635, Coumarin343, Quasar705, Cyan500, CY5.5, LC-Red 640, LC-Red705.

30 Cualquier cebador y/o sonda se puede modificar químicamente, es decir, el cebador y/o la sonda comprenden un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. Entonces, la sonda o el cebador es un oligonucleótido modificado.

35 Un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se conoce bien por el experto en la técnica y se divulga, entre otras referencias, en la patente de EE. UU. n.º 4.683.202.

40 Otras reacciones de amplificación comprenden, entre otras, la reacción en cadena de la ligasa, reacción en cadena de la polimerasa-ligasa, Gap-LCR, reacción en cadena de reparación, 3SR, NASBA, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación por Q β .

45 Los sistemas automatizados para el análisis basado en PCR a menudo hacen uso de la detección en tiempo real del producto de amplificación durante el procedimiento de PCR en el mismo recipiente de reacción. La clave de dichos procedimientos es el uso de oligonucleótidos modificados que portan grupos indicadores o marcadores, como se describe anteriormente.

50 El ácido nucleico de control interno descrito en el presente documento y que comprende la secuencia de SEQ ID NO 4 preferentemente presenta las siguientes propiedades en relación con su secuencia:

-una temperatura de fusión desde 55 °C a 90 °C, más preferentemente desde 65 °C a 85 °C, más preferentemente desde 70 °C a 80 °C, lo más preferentemente aproximadamente 75 °C

55 -una longitud de hasta 500 bases o pares de bases, más preferentemente desde 50 a 300 bases o pares de bases, más preferentemente desde 100 a 200 bases o pares de bases, lo más preferentemente aproximadamente 180 bases o pares de bases

60 -un contenido de GC desde un 30 % a un 70 %, más preferentemente desde un 40 % a un 60 %, lo más preferentemente aproximadamente un 50 %.

65 En algunos modos de realización, el ácido nucleico de control interno consiste en la SEQ ID NO 4 o su complemento. Como se usa en el presente documento, una “secuencia” es la estructura primaria de un ácido nucleico, es decir, la disposición específica de las nucleobases individuales de las que consisten los ácidos nucleicos respectivos. Se ha de entender que el término “secuencia” no designa un tipo específico de ácido nucleico, tal como ARN o ADN, sino que se aplica a ambos, así como a otros tipos de ácidos nucleicos, tales como APN u otros. Cuando las nucleobases se corresponden entre sí, particularmente en el caso de uracilo (presente en ARN) y timina (presente en ADN), estas

bases se pueden considerar equivalentes entre las secuencias de ARN y ADN, como se conoce bien en la técnica pertinente.

Los ácidos nucleicos clínicamente aplicables a menudo son ADN, que puede derivar de virus ADN, como virus de la hepatitis B (VHB), citomegalovirus (CMV) y otros, o bacterias como *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y otros. En dichos casos, puede ser ventajoso usar un ácido nucleico de control interno que consista en ADN, a fin de reflejar las propiedades de los ácidos nucleicos diana.

Por lo tanto, en algunos modos de realización, dicho ácido nucleico de control interno es ADN.

Por otra parte, numerosos ácidos nucleicos aplicables para el diagnóstico clínico son ácidos ribonucleicos, como los ácidos nucleicos de virus ARN, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis C (VHC), virus del Nilo Occidental (VNO), virus de los papilomas humanos (VPH), virus de la encefalitis japonesa (VEJ), virus de la encefalitis de San Luis (VESL) y otros. El procedimiento descrito en el presente documento se puede aplicar fácilmente a dichos ácidos nucleicos. En este caso, puede ser ventajoso usar un ácido nucleico de control interno que consista en ARN, a fin de reflejar las propiedades de los ácidos nucleicos diana. Si se van a analizar tanto ARN como ADN en el procedimiento descrito arriba, ventajosamente el ácido nucleico de control interno puede ser ARN, puesto que el ácido nucleico de control interno idealmente debe imitar a la diana más sensible de un ensayo que implique múltiples dianas, y normalmente las dianas de ARN se tienen que controlar más estrechamente.

De esta manera, en algunos modos de realización el ácido nucleico de control interno descrito en el presente documento es ARN.

Puesto que el ARN es más propenso a la degradación que el ADN debido a influencias tales como pH alcalino, ribonucleasas, etc., los ácidos nucleicos de control interno constituidos de ARN se proporcionan preferentemente como partículas blindadas. Las partículas blindadas, tales como ARN especialmente blindado, se describen en el documento EP 910643. En resumen, el ARN, que se puede producir químicamente o, preferentemente, de manera heterógena, por bacterias, tales como *E. coli*, está al menos parcialmente encapsulado en una proteína de la cubierta vírica. Esto último confiere resistencia del ARN hacia influencias externas, en particular, ribonucleasas. Se debe entender que el ADN de control interno también se puede proporcionar como una partícula empaquetada en fagos y, de esta manera, protegida. Tanto el ADN como el ARN encapsulado son útiles como ácidos nucleicos de control interno en el contexto descrito en el presente documento. En algunos modos de realización, los ácidos nucleicos de control de ARN se blindan con la proteína de la cubierta MS2 en *E. coli*. En un modo de realización adicional, los ácidos nucleicos de control de ADN se blindan usando el fago lambda GT11.

Típicamente, en el diagnóstico con ácidos nucleicos basado en amplificación, los moldes de ARN se transcriben en ADN antes de la amplificación y detección.

De ahí que en algunos modos de realización del procedimiento descrito en el presente documento, dichos reactivos de amplificación comprendan una polimerasa con actividad de transcriptasa inversa, comprendiendo adicionalmente el procedimiento entre la etapa e. y la etapa f. la etapa de incubar en dichos recipientes de reacción dichos ácidos nucleicos purificados con dichos uno o más reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y en condiciones adecuadas para que se produzca la transcripción de ARN por dicha polimerasa con actividad de transcriptasa inversa.

Una "polimerasa con actividad de transcriptasa inversa" es un ácido nucleico-polimerasa que puede sintetizar ADN basándose en un molde de ARN. También puede formar un ADN bicatenario una vez que el ARN se haya transcrito de manera inversa en un ADNc monocatenario. En algunos modos de realización, la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa es termoestable.

En la amplificación de una molécula de ARN mediante una ADN polimerasa, la primera reacción de extensión es la transcripción inversa usando un molde de ARN, y se produce una cadena de ADN. La segunda reacción de extensión, que usa el molde de ADN, produce una molécula de ADN bicatenario. De esta manera, la síntesis de una cadena de ADN complementario a partir de un molde de ARN mediante una ADN polimerasa proporciona el material de partida para la amplificación.

Se pueden usar ADN polimerasas termoestables en una reacción de amplificación/transcripción inversa de una enzima acoplada. El término "homogénea", en este contexto, se refiere a una reacción de adición individual de dos etapas para la transcripción inversa y amplificación de un ARN diana. Por homogénea significa que tras la etapa de transcripción inversa (RT), no hay necesidad de abrir el recipiente de reacción o de otro modo ajustar los componentes de reacción antes de la etapa de amplificación. En una reacción de RT/PCR no homogénea, tras la transcripción inversa y antes de la amplificación, uno o más de los componentes de reacción, tales como los reactivos de amplificación, se pueden ajustar, añadir o diluir, para lo que se ha de abrir el recipiente de reacción o al menos su contenido se tiene que manipular.

La transcripción inversa es una etapa importante en una RT/PCR. Por ejemplo, en la técnica se conoce que los moldes de ARN muestran una tendencia hacia la formación de estructuras secundarias que pueden dificultar la unión al

- cebador y/o la elongación de la cadena de ADNc mediante la transcriptasa inversa respectiva. De esta manera, las temperaturas relativamente altas para una reacción de RT son ventajosas con respecto a la eficacia de la transcripción. Por otra parte, elevar la temperatura de incubación también implica una especificidad más alta, es decir, los cebadores de RT no se hibridan a secuencias que presentan emparejamientos erróneos con la secuencia o secuencias esperadas. Particularmente en el caso de múltiples ARN diana diferentes, también puede ser deseable transcribir y posteriormente amplificar y detectar secuencias con emparejamientos erróneos individuales, por ejemplo, en el caso de la posible presencia de subcepas o subespecies desconocidas o infrecuentes de organismos en la muestra de fluido.
- 5
- 10 A fin de beneficiarse de ambas ventajas descritas anteriormente, es decir, la reducción de estructuras secundarias y la transcripción inversa de moldes con emparejamientos erróneos, en algunos modos de realización la incubación de RT se lleva a cabo a más de una temperatura distinta.
- 15 Por lo tanto, en algunos modos de realización, dicha incubación de la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa se lleva a cabo a diferentes temperaturas desde 30 °C a 75 °C, desde 45 °C a 70 °C o desde 55 °C a 65 °C.
- 20 Como un aspecto adicional importante de la transcripción inversa, las etapas largas de RT pueden dañar los moldes de ADN que pueden estar presentes en la muestra de fluido. Si la muestra de fluido contiene tanto especies de ARN como de ADN, de esta manera, puede ser favorable mantener la duración de las etapas de RT lo más corta posible, pero al mismo tiempo asegurar la síntesis de cantidades suficientes de ADNc para la posterior amplificación y detección opcional de los amplificados.
- 25 De esta manera, en algunos modos de realización el periodo de tiempo para la incubación de la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa es de hasta 30 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 12,5 minutos, 10 minutos, 5 minutos o 1 minuto.
- En un modo de realización adicional, la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa y que comprende una mutación se selecciona del grupo que consiste en
- 30 a) una ADN polimerasa de CS5
 b) una ADN polimerasa de CS6
 c) una ADN polimerasa de *Thermotoga marítima*
 35 d) una ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*
 e) una ADN polimerasa de *Thermus thermophilus*
 40 f) una ADN polimerasa de *Thermus flavus*
 g) una ADN polimerasa de *Thermus filiformis*
 45 h) una ADN polimerasa de sps17 de *Thermus sp.*
 i) una ADN polimerasa de Z05 de *Thermus sp.*
 j) una ADN polimerasa de *Thermotoga neapolitana*
 50 k) una ADN polimerasa de *Termosipho africanus*
 l) una ADN polimerasa *Thermus caldophilus*
- 55 Son particularmente adecuadas para estos requisitos las enzimas que portan una mutación en el dominio de la polimerasa que potencia su eficacia de transcripción inversa en términos de una velocidad de extensión más rápida.
- Por lo tanto, en algunos modos de realización la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa es una polimerasa que comprende una mutación que confiere una velocidad de extensión de ácidos nucleicos mejorada y/o una actividad de transcriptasa inversa mejorada en relación con la polimerasa natural respectiva.
- 60 En algunos modos de realización, la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa es una polimerasa que comprende una mutación que confiere una actividad de transcriptasa inversa mejorada en relación con la polimerasa natural respectiva.
- 65 Las polimerasas que portan mutaciones puntuales que las hacen particularmente útiles en el contexto de la invención se divulgan en el documento WO 2008/046612. En particular, en algunos modos de realización, las polimerasas que

se van a usar en el contexto de la presente invención son ADN polimerasa mutadas que comprenden al menos el siguiente motivo en el dominio de la polimerasa:

5 T-G-R-L-S-S-X_{b7}-X_{b8}-P-N-L-Q-N (SEQ ID NO 15); en el que X_{b7} es un aminoácido seleccionado de S o T y en el que X_{b8} es un aminoácido seleccionado de G, T, R, K o L, en los que la polimerasa comprende actividad de exonucleasa 3'-5' y tiene una velocidad de extensión de ácidos nucleicos mejorada y/o una eficacia de transcripción inversa mejorada en relación con la ADN polimerasa natural, en los que en dicha ADN polimerasa natural X_{b8} es un aminoácido seleccionado de D, E o N.

10 Son particularmente útiles los mutantes de la ADN polimerasa termoestable de Z05 de la especie *Thermus* (descrita, por ejemplo, en el documento US 5.455.170), comprendiendo dichas variaciones mutaciones en el dominio de la polimerasa en comparación con la enzima Z05 natural respectiva. Es especialmente útil una ADN polimerasa de Z05 mutante en la que el aminoácido en la posición 580 se selecciona del grupo que consiste en G, T, R, K y L.

15 Para la transcripción inversa usando una polimerasa termoestable, se puede usar Mn²⁺ como catión divalente y se incluye típicamente como una sal, por ejemplo, cloruro de manganeso (MnCl₂), acetato de manganeso (Mn(OAc)₂) o sulfato de manganeso (MnSO₄). Si se incluye MnCl₂ en una reacción que contiene tampón tricina 50 mM, por ejemplo, el MnCl₂ está generalmente presente a una concentración de 0,5-7,0 mM; puede estar presente a 0,8-1,4 mM cuando se utilizan 200 mM de cada uno de dGTP, dATP, dUTP y dCTP; y puede estar presente MnCl₂ 2,5-3,5 mM.

20 Adicionalmente, en algunos modos de realización se usa Mg²⁺ como un catión divalente para la transcripción inversa.

Puesto que en algunos modos de realización se incluye transcribir de manera inversa ácidos nucleicos diana de ARN en ADNc a la par que se preservan los ácidos nucleicos diana de ADN de modo que se puedan usar tanto ADNc como ADN para la posterior amplificación, el procedimiento controlado de manera interna descrito en el presente documento es particularmente útil para la detección y amplificación simultánea de ácidos nucleicos diana derivados tanto de organismos que tienen un genoma de ARN u organismos que tienen uno de ADN. Esta ventaja incrementa considerablemente el espectro de organismos diferentes, especialmente patógenos, que se pueden analizar en condiciones físicas idénticas.

30 Por lo tanto, en algunos modos de realización, los primer y segundo ácidos nucleicos diana comprenden ARN y ADN.

La diana de la etapa de amplificación puede ser una molécula híbrida de ARN/ADN. La diana puede ser un ácido nucleico monocatenario o bicatenario. Aunque el procedimiento de PCR más ampliamente usado usa una diana bicatenaria, esto no supone una necesidad. Después del primer ciclo de amplificación de una diana de ADN monocatenario, la mezcla de reacción contiene una molécula de ADN bicatenario que consiste en la diana monocatenaria y una cadena complementaria recién sintetizada. De manera similar, tras el primer ciclo de amplificación de una diana de ARN/ADNc, la mezcla de reacción contiene una molécula de ADNc bicatenario. En este punto, prosiguen sucesivos ciclos de amplificación como se describe anteriormente.

40 En algunos modos de realización, los ácidos nucleicos diana amplificados y el ácido nucleico de control interno amplificado se detectan durante o después de la reacción de amplificación a fin de evaluar el resultado del análisis.

Puede ser favorable supervisar la reacción de amplificación en tiempo real, es decir, detectar los ácidos nucleicos diana amplificados y el ácido nucleico de control interno amplificado durante la propia amplificación.

45 Por lo tanto, en algunos modos de realización, las sondas, y, en particular, la sonda con la SEQ ID NO 1, se marcan con un resto fluorescente donante y un resto fluorescente aceptor correspondiente.

Los procedimientos expuestos anteriormente se basan preferentemente en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre un resto fluorescente donante y un resto fluorescente aceptor. Un resto fluorescente donante representativo es fluoresceína, y los restos fluorescentes aceptores correspondientes representativos incluyen LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5 y Cy5.5. Típicamente, la detección incluye excitar la muestra a una longitud de onda absorbida por el resto fluorescente donante y visualizar y/o medir la longitud de onda emitida por el resto fluorescente aceptor correspondiente. En el procedimiento de acuerdo con la invención, se sigue preferentemente la detección cuantificando la FRET. Preferentemente, la detección se realiza después de cada etapa de ciclado. Más preferentemente, la detección se realiza en tiempo real. Usando instrumental de PCR en tiempo real disponible comercialmente (por ejemplo, LightCycler™ o TaqMan®) se pueden combinar la amplificación por PCR y la detección del producto de amplificación en una cubeta cerrada individual con un tiempo de ciclado drásticamente reducido. Puesto que la detección se produce de manera coincidente 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.

60 El instrumento LightCycler™ es un ciclador térmico rápido combinado con un fluorómetro para microvolúmenes que utiliza óptica de alta calidad. Esta técnica de termociclado rápida usa cubetas de vidrio finas como recipientes de reacción. El calentamiento y enfriamiento de la cámara de reacción se controlan alternando aire ambiente y caliente.

Debido a la baja masa de aire y la alta proporción de área superficial con respecto al volumen de las cubetas, se pueden alcanzar velocidades de intercambio de temperatura muy rápidas en la cámara térmica.

La tecnología 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 los principios de FRET. El segundo resto fluorescente es generalmente una molécula extintora. Los tintes fluorescentes típicos usados en este formato son, por ejemplo, entre otros, FAM, HEX, CY5, JA270, Cyan 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 mediante la actividad de la exonucleasa 5' a 3' de la Taq u otra polimerasa adecuada 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 desde el primer resto fluorescente.

En ambos formatos de detección descritos anteriormente, la intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ácido nucleico diana originales.

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® (Molecular Probes)). Tras la interacción con el ácido nucleico bicatenario, dichos tintes de unión a ADN fluorescentes emiten una señal fluorescente después de su 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, normalmente se realiza un análisis de curvas de fusión para la confirmación de la presencia del producto de amplificación.

También se pueden usar balizas moleculares junto con FRET para detectar la presencia de un producto de amplificación usando los procedimientos de PCR en tiempo real de la invención. La tecnología de balizas moleculares usa una sonda de hibridación marcada con un primer resto fluorescente y un segundo resto fluorescente. El segundo resto fluorescente generalmente es un extintor y los marcadores fluorescentes se localizan típicamente en cada extremo de la sonda. La tecnología de balizas moleculares usa un oligonucleótido de sonda que tiene secuencias que permiten la formación de estructuras secundarias (por ejemplo, una horquilla). Como resultado de la formación de estructuras secundarias en la sonda, ambos restos fluorescentes están en proximidad espacial cuando la sonda está en solución. Después de la hibridación a los productos de amplificación, se rompe la estructura secundaria de la sonda y los restos fluorescentes se separan entre sí de tal manera que después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada se puede detectar la emisión del primer resto fluorescente.

De esta manera, en algún modo de realización, el procedimiento descrito en el presente documento usa FRET, en el que las sondas comprenden una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de estructuras secundarias, en el que dicha formación de estructuras secundarias da como resultado una proximidad espacial entre dicho primer y segundo resto fluorescente.

La FRET eficaz únicamente puede tener lugar cuando los restos fluorescentes están en proximidad local directa y cuando el espectro de emisión del resto fluorescente donante se solapa con el espectro de absorción del resto fluorescente aceptor.

De esta manera, en algunos modos de realización, dichos restos fluorescentes donante y aceptor están separados en no más de 5 nucleótidos entre sí en dicha sonda.

En un modo de realización adicional, dicho resto fluorescente aceptor es un extintor.

Es adicionalmente ventajoso seleccionar cuidadosamente la longitud del amplicón que se produce como resultado del procedimiento descrito anteriormente. Generalmente, los amplicones relativamente cortos incrementan la eficacia de la reacción de amplificación. De esta manera, un aspecto preferente de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que los fragmentos amplificados comprenden hasta 450 bases, preferentemente hasta 300 bases, adicionalmente preferentemente hasta 200 bases y adicionalmente preferentemente hasta 150 bases.

El ácido nucleico de control interno descrito en el presente documento puede servir como un "ácido nucleico patrón cuantitativo" que sea apto para ser y usarse como una referencia a fin de cuantificar, es decir, determinar la cantidad de los ácidos nucleicos diana. Para este propósito, uno o más ácidos nucleicos patrón cuantitativos experimentan todas las posibles etapas de preparación de muestras junto con los ácidos nucleicos diana. Además, en todo el procedimiento se procesa un ácido nucleico patrón cuantitativo en la misma mezcla de reacción. Debe generar, directa o indirectamente, una señal detectable tanto en presencia como en ausencia del ácido nucleico diana. Para este propósito, se ha de optimizar cuidadosamente la concentración del ácido nucleico patrón cuantitativo en cada prueba a fin de no interferir con la sensibilidad, sino también a fin de generar una señal detectable a concentraciones de diana muy altas. En términos del límite de detección (LOD, véase a continuación) del ensayo respectivo, el intervalo de concentraciones para el "ácido nucleico patrón cuantitativo" en algunos modos de realización es 20-5000x LOD, en

modos de realización adicionales 20-1000x LOD y en aún modos de realización adicionales 20-5000x LOD. La concentración final del ácido nucleico patrón cuantitativo en la mezcla de reacción es dependiente del intervalo de medición cuantitativa conseguido.

5 “Límite de detección” o “LOD” significa la cantidad o concentración detectable más baja de un ácido nucleico en una muestra. Un “LOD” bajo corresponde a sensibilidad alta y viceversa. El “LOD” se expresa normalmente por medio de la unidad “cp/ml”, particularmente si el ácido nucleico es un ácido nucleico vírico, o bien como UI/ml. “Cp/ml” significa “copias por mililitro”, en la que una “copia” es una copia del ácido nucleico respectivo. UI/ml quiere decir “unidades internacionales/ml”, haciendo referencia a las normas de la OMS.

10 Un procedimiento ampliamente usado para calcular un LOD es el “análisis probit”, que es un procedimiento de análisis de la relación entre un estímulo (dosis) y la respuesta cuántica (todo o nada). En un experimento de respuesta cuántica típico, se administra a grupos de animales diferentes dosis de un fármaco. Se registra el porcentaje que muere a cada nivel de dosis. Entonces, se pueden analizar estos datos usando el análisis probit. El modelo probit asume que la respuesta en porcentaje se relaciona con la dosis logarítmica como la distribución normal acumulada. Es decir, se pueden usar las dosis logarítmicas como variables para interpretar el porcentaje que muere a partir de la normal acumulada. Usando la distribución normal, en lugar de otras distribuciones de probabilidad, se influye en la tasa de respuesta predicha en los extremos alto y bajo de las posibles dosis, pero tiene poca influencia cerca del centro.

15 Se puede aplicar el análisis probit a distintas “tasas de aciertos”. Como se conoce en la técnica, una “tasa de aciertos” se expresa comúnmente en porcentaje [%] e indica el porcentaje de resultados positivos a una concentración específica de un analito. De esta manera, por ejemplo, se puede determinar un LOD a una tasa de aciertos de un 95 %, lo que significa que se calcula el LOD para un entorno en el que un 95 % de los resultados válidos son positivos.

25 Un ejemplo de cómo realizar el cálculo de resultados cuantitativos en el formato TaqMan basado en un ácido nucleico de control interno que sirve como ácido nucleico patrón cuantitativo se describe en lo siguiente: Se calcula un valor a partir de los datos de entrada de los valores de fluorescencia corregidos por el instrumento a partir de una tanda de PCR completa. Se somete a PCR un conjunto de muestras que contienen un ácido nucleico diana y un ácido nucleico de control interno que sirve como un ácido nucleico patrón cuantitativo en un termociclador usando un perfil de temperaturas especificadas. A temperaturas y tiempos seleccionados durante el perfil de PCR, las muestras se iluminan mediante luz filtrada y se recogen datos de fluorescencia filtrada para cada muestra para el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno. Después de que una tanda de PCR se haya completado, se procesan las lecturas de fluorescencia para producir un conjunto de datos de concentración de tinte para el ácido nucleico de control interno y un conjunto de datos de concentración de tinte para el ácido nucleico diana. Cada conjunto de datos de concentración de tinte se procesa de la misma manera. Después de varias verificaciones de verosimilitud, se calculan los valores de codo (CT) para el ácido nucleico de control interno y el ácido nucleico diana. El valor de codo se define como el punto donde la fluorescencia del ácido nucleico diana o el ácido nucleico de control interno atraviesa un umbral predefinido (concentración de fluorescencia). La determinación de valores se basa en las suposiciones de que el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno se amplifican con la misma eficacia y que en el valor de codo calculado se amplifican y detectan cantidades iguales de copias de amplicón de ácido nucleico diana y ácido nucleico de control interno. Por lo tanto, la $(CT_{QS} - CT_{diana})$ es lineal con respecto a $\log(\text{conc. de diana}/\text{conc. de QS})$. En este contexto, QS designa el ácido nucleico de control interno que sirve como ácido nucleico patrón cuantitativo. Entonces, se puede calcular el valor T, por ejemplo, usando una fórmula de calibración polinómica, como en la siguiente ecuación:

$$45 \quad T' = 10 (a(CT_{QS} - CT_{diana})^2 + b(CT_{QS} - CT_{diana}) + c)$$

Se conocen las constantes polinómicas y la concentración del ácido nucleico patrón cuantitativo, por lo tanto, la única variable en la ecuación es la diferencia $(CT_{QS} - CT_{diana})$.

50 Adicionalmente, el ácido nucleico de control interno puede servir, en algunos modos de realización, como “ácido nucleico de control interno cualitativo”. Un “ácido nucleico de control interno cualitativo” es particularmente útil para confirmar la validez del resultado de prueba de un ensayo de detección cualitativa: Incluso en el caso de un resultado negativo, se debe detectar el control interno cualitativo, de lo contrario se considera que la propia prueba no funciona. Sin embargo, en una configuración cualitativa, necesariamente no se tiene que detectar en caso de un resultado positivo. Como consecuencia, su concentración debe ser relativamente baja. Se ha de adaptar cuidadosamente al ensayo respectivo y su sensibilidad. En algunos modos de realización, la concentración para el ácido nucleico interno cualitativo está en un intervalo de 1 copia por reacción a 1000 copias por reacción. En relación con el límite de detección (LOD) del ensayo respectivo, en algunos modos de realización su concentración está entre el LOD de un ensayo y 25 veces el valor del LOD, en modos de realización adicionales entre el LOD y 10x LOD. En aún modos de realización adicionales, está entre 2x y 10x LOD. En otros modos de realización, está entre 5x y 10x LOD, o es 5x o 10x LOD.

65 En algunos modos de realización, puede ser ventajoso añadir ácidos nucleicos de control interno diferentes a muestras de fluido, pero usar únicamente uno de ellos, –al menos uno que comprenda la secuencia de SEQ ID NO 4,– para la amplificación y detección añadiendo únicamente los cebadores con la SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3 y la sonda con la SEQ ID NO 1.

En algunos modos de realización del procedimiento descrito en el presente documento, todas las etapas son automatizadas. "Automatizadas" significa que las etapas de un procedimiento son adecuadas para llevarse a cabo con un aparato o máquina que pueda funcionar con poca o ninguna influencia o control externo por una persona. Únicamente las etapas de preparación para el procedimiento se pueden tener que hacer a mano, por ejemplo, los recipientes de almacenamiento se han de llenar y poner en su lugar, la elección de las muestras se ha de realizar por un ser humano y etapas adicionales conocidas por el experto en el campo, tal como el funcionamiento de un ordenador de control. El aparato o máquina puede añadir automáticamente líquidos, mezclar las muestras o llevar a cabo etapas de incubación a temperaturas específicas. Típicamente, dicha máquina o aparato es un robot controlado por un ordenador que lleva a cabo un programa en el que se especifican las etapas y comandos individuales.

Descripción de las figuras

Figura 1:

Representación esquemática del flujo de trabajo de preparación de muestras como se usa en un modo de realización de la invención.

Las flechas que apuntan hacia abajo designan la adición de un componente o reactivo a cada pocillo respectivo de la placa de pocillos profundos mencionada anteriormente, las flechas que apuntan hacia arriba su eliminación respectiva. Estas acciones se realizaron manualmente en las etapas 2, 3, 4, 21 y 22, mediante el cabezal de procedimiento del aparato en las etapas 10, 14, 16, 18 y 24 y mediante el cabezal de reactivo del aparato en las etapas 5, 6, 7, 11, 15 y 19.

Se ha de entender que los volúmenes usados se pueden ajustar de manera flexible, preferentemente al menos aproximadamente hasta un 30 % de los valores divulgados. En particular, en el caso de la etapa 2, el volumen de muestra es preferentemente variable a fin de tener en cuenta los tipos diferentes de muestras de fluido que pueden requerir más o menos material de partida para obtener resultados apropiados, como se conoce por el técnico. Preferentemente, el intervalo es desde aproximadamente 100 µl a aproximadamente 850 µl. Más preferentemente, es de aproximadamente 100 µl, aproximadamente 500 o aproximadamente 850 µl. Preferentemente, el volumen en los recipientes respectivos se ajusta a un volumen total idéntico con el diluyente en la etapa 3. Preferentemente, como en el esquema mostrado en la fig. 1, el volumen total se añade hasta aproximadamente 850 µl.

Ejemplo

Este ejemplo describe la comparación del rendimiento de dos conjuntos de oligonucleótidos diferentes que seleccionan como diana la SEQ ID NO 4 (conjunto 2 que contiene las SEQ ID NO 2, 3 y 5 (en MMx R2-SEQ ID NO 5) y el conjunto 3 que contiene las SEQ ID NO 2, 3 y 1 (en MMx R2-SEQ ID NO 1), y un conjunto de referencia 1 que contiene las SEQ ID NO 6, 7 y 8 (en MMx R2-referencia/SEQ ID NO 6) que selecciona como diana la SEQ ID NO 9.

En resumen, en el modo de realización representado, se lleva a cabo una PCR en tiempo real en un virus ARN (VHC) usando un ácido nucleico de control interno que comprende las secuencias de tanto SEQ ID NO 4 como SEQ ID NO 9. Todas las muestras se procesaron y analizaron en el mismo experimento, es decir, en la misma placa multipocillo.

Las siguientes muestras se prepararon y posteriormente se analizaron:

Reactivo	Fabricante:
Patrón secundario de VHC, 18000 UI/ml	Roche
Plásmido que comprende las SEQ ID NO 4 y 9 3E11 partes/ml	Roche

Se conocen otros tipos adecuados de patrones o dianas y están disponibles para el experto en la técnica.

Los instrumentos enumerados en la siguiente tabla se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante respectivo:

Instrumento	Fabricante
Célula de procesamiento cobas® 6800/8800	Roche Diagnostics AG (Rotkreuz, CH)
Ciclador analítico cobas® 6800/8800	Roche Diagnostics AG (Rotkreuz, CH)

Para la preparación de muestras se usaron los siguientes reactivos como diluyentes:

ES 2 644 949 T3

Reactivo	Fabricante:
DILUYENTE DE MUESTRAS MP EN MASA PMC (MPSD) (MPSD)–Tampón de almacenamiento de IC/IQS	Roche
K3 EDTA plasma, PCR neg.	Roche

Las siguientes diluciones se prepararon de antemano y se almacenaron durante la noche (diluciones de plasma a -60 °C a -90 °C, diluciones de DILUYENTE DE MUESTRAS MP EN MASA PMC (MPSD) a 2-8 °C):

Diana	Concentración		Matriz
VHC	10	UI/ml	K3 EDTA plasma
SEQ ID NO 4	6,0E+04	partes/ml	DILUYENTE DE MUESTRAS MP EN MASA PMC (MPSD) (MPSD)

- 5 Cada muestra respectiva (500 µl) y cada diluyente de muestras respectivo (350 µl) se pipetearon manualmente en una placa de pocillos profundos. A cada pocillo que contenía una muestra de VHC, se añadieron manualmente 50 µl del ácido nucleico de control cuantitativo mencionado anteriormente (3000 partículas/muestra).
- 10 El ácido nucleico de control respectivo se almacenó en el siguiente tampón:

Tampón de almacenamiento de IC/IQS, MPSD	Conc. o pH
Tris (mM)	10
EDTA (mM)	0,1
Acida de sodio (p/v, %)	0,05
Poli rA ARN (mg/l)	20
pH	8

- 15 La preparación de muestras se realizó en una célula de procesamiento cobas®6800/8800 (Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, CH), siguiendo el flujo de trabajo de acuerdo con el esquema representado en la fig. 1 y usando los siguientes reactivos:

Reactivo de proteasa	Conc. o pH
Tris (mM)	10
EDTA (mM)	1
Cloruro de calcio (mM)	5
Acetato de calcio (mM)	5
Esperasa (mg/ml)	80
Glicerina (p/v,%)	50
pH	5,5

Reactivo de MGP	Conc. o pH
MPG en polvo (mg/ml)	60
Tris (mM)	30
Metilparabeno (p/v,%)	0,1
Acida de sodio (p/v, %)	0,095
pH	8,5

Reactivo de lisis	Conc. o pH
Tiocianato de guanidina (M)	4
Citrato de sodio (mM)	50
Polidocanol (p/v,%)	5
Ditiotreitol (p/v,%)	2
pH	5,8

Tampón de lavado	Conc. o pH
Citrato de sodio (mM)	7,5
Metilparabeno (p/v,%)	0,1
pH	4,1

Tampón de elución	Conc. o pH
Tris (mM)	30
Metilparabeno (p/v,%)	0,09
pH	9,1

5 Durante la etapa de preparación de muestras final (enfriamiento del eluato) se añadieron manualmente las mezclas maestras (MMx) de trabajo, que contenían los reactivos de amplificación MMx R1 y MMx R2, a cada pocillo de una placa micropocillo. Entonces, los eluatos (que contenían los ácidos nucleicos aislados) se transfirieron mediante el instrumento desde la placa p a la placa micropocillo y se mezclaron con la MMx. Entonces, las placas micropocillo se sellaron automáticamente y se transfirieron manualmente al ciclador analítico autónomo para la amplificación y

10

Se usaron las siguientes mezclas maestras (consistiendo cada una en los dos reactivos R1 y R2):

Para MMx R2-referencia/SEQ ID NO 6:

Reactivo R1	Concentración/50 µl-PCR [µM]
Agua (calidad de PCR)	
Mn(Ac) ₂ * 4H ₂ O (pH 6,1 ajustado con ácido acético)	3300
NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7 [%]	0,018

15

Reactivo R2	Concentración/50 µl-PCR [µM]
DMSO [%]	5,400 %
NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7 [%]	0,027 %
Acetato de potasio pH 7,0	120.000
Glicerol [%]	3,000 %
Tween 20 (%)	0,015 %
Tricina pH 8,0	60.000
NTQ21-46A-aptámero	0,2222
UNG (U/µl)	0,2

ES 2 644 949 T3

Reactivo R2	Concentración/50 µl-PCR [µM]
dGTP	400
dATP	400
dCTP	4000
dUTP	800
Tampón Tris 10 mM para cebador	1,800
SEQ ID NO 10 (cebador de VHC)	0,100
SEQ ID NO 11 (cebador de VHC)	0,100
SEQ ID NO 12 (cebador de VHC)	0,100
SEQ ID NO 7 (cebador de IC)	0,300
SEQ ID NO 8 (cebador de IC)	0,300
Tampón de almacenamiento de sonda FAM/HEX	0,550
SEQ ID NO 13 (sonda de VHC)	0,100
SEQ ID NO 14 (sonda de VHC)	0,100
SEQ ID NO 6 (sonda de IC)	0,100
Polimerasa de Z05-D (U/µl)	40 (U/reacción)
Agua	

Para en MMx R2-SEQ ID NO 5:

Reactivo R1	Concentración/50 µl-PCR [µM]
Agua (calidad de PCR)	
Mn(Ac) ₂ * 4H ₂ O (pH 6,1 ajustado con ácido acético)	3300
NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7 [%]	0,018

Reactivo R2	Concentración/50 µl-PCR [µM]
DMSO [%]	5,400 %
NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7 [%]	0,027 %
Acetato de potasio pH 7,0	120.000
Glicerol [%]	3,000 %
Tween 20 (%)	0,015 %

ES 2 644 949 T3

Reactivo R2	Concentración/50 µl-PCR [µM]
Tricina pH 8,0	60.000
NTQ21-46A-aptámero	0,2222
UNG (U/µl)	0,2
dGTP	400
dATP	400
dCTP	4000
dUTP	800
Tampón Tris 10 mM para cebador	1,800
SEQ ID NO 10 (cebador de VHC)	0,100
SEQ ID NO 11 (cebador de VHC)	0,100
SEQ ID NO 12 (cebador de VHC)	0,100
SEQ ID NO 2 (cebador de IC)	0,300
SEQ ID NO 3 (cebador de IC)	0,300
Tampón de almacenamiento de sonda FAM/HEX	0,550
SEQ ID NO 13 (sonda de VHC)	0,100
SEQ ID NO 14 (sonda de VHC)	0,100
SEQ ID NO 5 (sonda de IC)	0,100
Polimerasa de Z05-D (U/µl)	40 (U/reacción)
Agua	

Para en MMx R2-SEQ ID NO 1:

Reactivo R1	Concentración/50 µl-PCR [µM]
Agua (calidad de PCR)	
Mn(Ac) ₂ * 4H ₂ O (pH 6,1 ajustado con ácido acético)	3300
NaN ₃ /Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7 [%]	0,018

Reactivo R2	Concentración/50 µl-PCR [µM]
DMSO [%]	5,400 %
NaN3/Ri, tamponado con Tris 10 mM a pH 7 [%]	0,027 %
Acetato de potasio pH 7,0	120.000
Glicerol [%]	3,000 %
Tween 20 (%)	0,015 %
Tricina pH 8,0	60.00
NTQ21-46A-aptámero	0,2222
UNG (U/µl)	0,2
dGTP	400
dATP	400
dCTP	4000
dUTP	800
Tampón Tris 10 mM para cebador	1,800
SEQ ID NO 10 (cebador de VHC)	0,100
SEQ ID NO 11 (cebador de VHC)	0,100
SEQ ID NO 12 (cebador de VHC)	0,100
SEQ ID NO 2 (cebador de IC)	0,300
SEQ ID NO 3 (cebador de IC)	0,300
Tampón de almacenamiento de sonda FAM/HEX	0,550
SEQ ID NO 13 (sonda de VHC)	0,100
SEQ ID NO 14 (sonda de VHC)	0,100
SEQ ID NO 1 (sonda de IC)	0,100
Polimerasa de Z05-D (U/µl)	40 (U/reacción)
Agua	

5 Para la amplificación y detección, se selló la placa micropocillo con un sellador de placas automatizado en la célula de procesamiento cobas® 6800/8800 (véase anteriormente) y la placa se transfirió manualmente al ciclador analítico cobas® 6800/8800 (véase anteriormente).

10 La amplificación y detección (PCR en tiempo real) se llevó a cabo de manera simultánea y en condiciones idénticas para las tres mezclas maestras usando el perfil de PCR genérica mostrado en la tabla 1. En total, se efectuaron siete placas de detección-amplificación para obtener los replicados requeridos.

Tabla 1: Perfil de termociclado

		Diana [°C]	Modo de adquisición	Meseta [hh:mm:ss]	Medida [hh:mm:ss]	Velocidad de rampa [C/s]
Pre-PCR	Etapa de UNG	50	ninguno	00:02:00	00:00:00	2,2
	Desnaturalización de molde/UNG	94	ninguno	00:00:05	00:00:00	4,4
	Etapa de RT	55	ninguno	00:02:00	00:00:00	2,2
		60	ninguno	00:06:00	00:00:00	4,4
		65	ninguno	00:04:00	00:00:00	4,4
1.ª medición		95	ninguno	00:00:05	00:00:00	4,4
		55	individual	00:00:30	00:00:08	2,2
2.ª medición		91	ninguno	00:00:05	00:00:00	4,4
		58	individual	00:00:25	00:00:08	2,2
Enfriamiento		40	ninguno	00:02:00	00:00:00	2,2

Tabla 2: Visión general de los ciclos

5

Nombre	Ciclos
Pre-PCR	1
1.ª medición	5
2.ª medición	45
Enfriamiento	1

Tabla 3: Tiempos de integración

Combinación de filtros	Tiempo de integración (s)
435-470	0,30
495-525	0,50
540-580	0,50
610-645	0,20
680-700	1,00

- 10 El programa de pre-PCR comprendía la desnaturalización inicial y la incubación a 55, 60 y 65 °C para la transcripción inversa de moldes de ARN. Incubar a tres temperaturas combinó los efectos ventajosos de que a temperaturas más bajas también se transcriben secuencias diana ligeramente emparejadas erróneamente (tales como variantes

genéticas de un organismo), mientras que a temperaturas más altas se suprime la formación de estructuras secundarias de ARN, dando lugar, de esta manera, a una transcripción más eficaz.

5 El ciclado de PCR se dividió en dos mediciones, en el que ambas mediciones se aplicaron una configuración de una etapa (combinando hibridación y extensión). Los primeros 5 ciclos a 55 °C permitieron una inclusividad incrementada preamplificando secuencias diana ligeramente emparejadas erróneamente, mientras que los 45 ciclos de la segunda medición proporcionaron una especificidad incrementada usando una temperatura de hibridación/extensión de 58 °C.

10 Usando este perfil en todas las muestras comprendidas en la placa micropocillo mencionada anteriormente, se alcanzó la amplificación y detección en todas las muestras, como se representa en las curvas de crecimiento de la fig. 2. Esto demuestra que la preparación de muestras antes de la amplificación también se llevó a cabo con éxito.

15 Los resultados para los controles internos de VHC cuantitativos se representan por separado en la fig. 2 por motivos de claridad. Se puede observar que los controles también se amplificaron con éxito en todos los casos. La cuantificación de la diana de VHC en la configuración cuantitativa se calculó mediante comparación con el ácido nucleico de control interno respectivo que sirve como patrón cuantitativo.

Análisis de los datos

20 Los archivos de los datos brutos del ciclador analítico (archivo xml) se analizaron usando el programa informático PARTS. Para el cálculo de los datos se usó el molde de análisis de VHC cobas® 6800/8800 actual, así como la denominación positiva/negativa para las tres mezclas maestras en el canal 4/JA270 (señal para VHC) y el canal 5/Cy5.5 (señal de control cuantitativo). Para el control cuantitativo y la diana de VHC se calcularon las tasas de aciertos, los valores de CT, RFI y F con el molde de análisis de VHC cobas® 6800/8800 actual.

25 Resultados

Las tasas de aciertos, los valores de CT, RFI y F para las tres mezclas maestras se enumeran en las tablas 4 y 5. El molde de análisis usado no se optimizó para cada uno de los conjuntos de oligonucleótidos.

30 Tabla 4: Valores de CT y valores de RFI para la diana de VHC con un volumen de entrada de procesamiento de muestra de 500 µl para EDTA plasma

Comentario sobre muestra	Tasa de aciertos	Tasa de aciertos (%)		Valor de CT	RFI	Valor de F
10 UI/ml de MMx R2-ref./SEQ ID NO 6 de VHC	85 de 100	85,00 %	promedio	40,03	13,73	1172262
			DE	0,85	2,83	1122635
			CV	2,13 %	20,61 %	95,77 %
10 UI/ml de MMx R2-SEQ ID NO 5 de VHC	90 de 97	92,78 %	promedio	40,56	9,10	477216
			DE	1,16	2,19	626006
			CV	2,86 %	24,09 %	131,18 %
10 UI/ml de MMx R2-SEQ ID NO 1 de VHC	93 de 100	93,00 %	promedio	40,21	10,01	641844
			DE	0,88	2,16	749487
			CV	2,19 %	21,56 %	116,77 %

Tabla 5: Valores de CT y valores de RFI para el control interno con un volumen de entrada de procesamiento de muestra de 500 µl para EDTA plasma

Comentario sobre muestra	Tasa de aciertos de	Tasa de aciertos (%)		Valor de CT	RFI	Valor de F
MMxR2-referencia/SEQ ID NO 6	100 de 100	100,00 %	promedio	33,30	46,61	179536
			DE	0,67	8,57	69381
			CV	2,02 %	18,40 %	38,64 %
10 UI/ml de MMx R2-SEQ ID NO 5 de VHC	97 de 100	97,00 %	promedio	33,84	3,27	121976
			DE	0,46	0,18	70998
			CV	1,37 %	5,54 %	58,21 %
10 UI/ml de MMx R2-SEQ ID NO 1 de VHC	100 de 100	100,00 %	promedio	33,64	11,42	188650
			DE	0,31	0,86	145133
			CV	0,92 %	7,53 %	76,93 %

5 **Comparación de sondas sumario:**

Los tres conjuntos de oligonucleótidos de control interno, comparados en un estudio paralelo, no mostraron ninguna diferencia significativa en la tasa de aciertos. Se observó una tendencia hacia un mejor valor de RFI combinado con un valor de referencia más bajo con MMx R2-SEQ ID NO 1 (conjunto de oligonucleótidos 3). Esto permite una detección mejorada del ácido nucleico de control que comprende la SEQ ID NO 4. Usando la sonda con la SEQ ID NO 1 en lugar de la SEQ ID NO 5, los ensayos que usan un ácido nucleico de control interno que comprende la SEQ ID NO 4 se vuelven, de esta manera, más fiables y resistentes.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann La-Roche Ltd.

5	<120> Oligonucleótidos para controlar la amplificación de ácidos nucleicos	
	<130> 32286 EP	
	<160> 15	
10	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 33	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de IC	
20		
	<400> 1	
	tgcgcgctccc gttttgatac ttcgtaacgg tgc	33
	<210> 2	
	<211> 25	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador de IC	
30		
	<400> 2	
	acaaccgcgc catacatgtc aagaa	25
	<210> 3	
	<211> 24	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
40		
	<400> 3	
	gtcggggcgc ttatacagta ccaa	24
	<210> 4	
	<211> 177	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Ácido nucleico de control	
50		
	<400> 4	
	acaaccgcgc catacatgtc aagaatgaag tggggcgaacg ctagaaaact gacgccagca	60
	attaagtgag tcggggcgtg gtgactccca cgtaaaaagc ccctaccccg caccgttacg	120
	aagtatcaaa acgggacgcg cacgaaccga cgattggtac tgtataagcg gcccgac	177
	<210> 5	
	<211> 32	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 644 949 T3

	<220>		
	<223> Sonda de IC		
	<400> 5		
5	gccagcaatt aagtgagtcg gggcgtggtg ac		32
	<210> 6		
	<211> 27		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sonda de IC		
	<400> 6		
15	tctctcgcca tctcctaccg cattggc		27
	<210> 7		
	<211> 25		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de IC		
	<400> 7		
25	ttgatagcaa tcggctatcg actaa		25
	<210> 8		
	<211> 28		
	<212> ADN		
30	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de IC		
	<400> 8		
35	gcttcgatac tcagtcattc cggataa		28
	<210> 9		
	<211> 166		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico de control		
	<400> 9		
	ttgatagcaa tcggctatcg actaatgact gtcctggcgg tctctcgcca tctcctaccg		60
	cattggctca taggtaagct cgctgtcacc cagtacggag gtgccagtag attattagag		120
45	acagtcgcca atcgatcgtt ataccgagat gactgagtat cgaagc		166
	<210> 10		
	<211> 26		
	<212> ADN		
50	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador de VHC		

	<400> 10 gcagaaagcg tctagccatg gcgtta	26
5	<210> 11 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador de VHC	
	<400> 11 gcaagcacc ccc tataggcagt accac	25
15	<210> 12 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador de VHC	
	<400> 12 ctcgcaagca ccctatcagg cagt	24
25	<210> 13 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sonda de VHC	
	<400> 13 ccgggagagc catagtggtc tgcggaaccg gtg	33
35	<210> 14 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sonda de VHC	
	<400> 14 tctctcgccc atctcctacc gcattggc	28
45	<210> 15 <211> 13 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Motivo de secuencia de polimerasa mutante	
55	<220> <221> VARIANTE <222> (7)..(7) <223> x = S o T	
	<220> <221> VARIANTE <222> (8)..(8)	

ES 2 644 949 T3

<223> x = G, T, R, K, o L

<400> 15

Thr	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Xaa	Xaa	Pro	Asn	Leu	Gln	Asn
1				5					10			

REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido aislado que consiste en la SEQ ID NO 1.
- 5 2. Una composición que comprende los oligonucleótidos que consisten en las SEQ ID NO 1, 2 y 3.
3. Un kit para controlar la detección de múltiples ácidos nucleicos diana, comprendiendo el kit una sonda de detección que consiste en la SEQ ID NO 1, un par de cebadores de amplificación que consisten en la SEQ ID NO 2 y la SEQ ID NO 3 y un ácido nucleico de control que comprende la SEQ ID NO. 4.
- 10 4. Uso de una sonda que consiste en la SEQ ID NO 1 para la detección de un ácido nucleico de control que comprende la SEQ ID NO 4.
- 15 5. Un procedimiento para el aislamiento controlado de manera interna y amplificación de manera simultánea de un primer y un segundo ácido nucleico diana que pueden estar presentes en una o más muestras de fluido, comprendiendo dicho procedimiento las etapas automatizadas de:
 - a. añadir un ácido nucleico de control interno que comprende la secuencia de SEQ ID NO 4 a cada una de dichas muestras de fluido
 - 20 b. combinar entre sí un material de soporte sólido y dicha una o más muestras de fluido en uno o más recipientes durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para permitir que los ácidos nucleicos que comprenden los ácidos nucleicos diana, si están presentes en dicha una o más muestras de fluido, y el ácido nucleico de control interno se inmovilicen sobre el material de soporte sólido
 - c. aislar el material de soporte sólido del otro material presente en las muestras de fluido en una estación de separación
 - 25 d. purificar los ácidos nucleicos en dicha estación de separación y lavar el material de soporte sólido una o más veces con un tampón de lavado
 - e. poner en contacto los ácidos nucleicos diana purificados y el ácido nucleico de control interno purificado con reactivos de amplificación que comprenden un conjunto distinto de cebadores y una sonda para cada uno de dichos ácidos nucleicos diana y un conjunto de cebadores que comprende un primer cebador que consiste en la SEQ ID NO 2 y un segundo cebador que consiste en la SEQ ID NO 3 y una sonda que consiste en la SEQ ID NO 1 para dicho ácido nucleico de control interno en al menos dos recipientes de reacción, en los que un primer recipiente de reacción comprende cebadores y una sonda para dicho primer ácido nucleico diana y al menos un segundo recipiente de reacción comprende cebadores y una sonda para dicho segundo ácido nucleico diana y en los que los cebadores y la sonda para el primer ácido nucleico diana están ausentes del segundo recipiente de reacción y los cebadores y la sonda para el segundo ácido nucleico diana están ausentes del primer recipiente de reacción
 - 30 f. incubar en dichos recipientes de reacción dichos ácidos nucleicos diana purificados y dicho ácido nucleico de control interno purificado con dichos reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación indicativa de la presencia o ausencia de dichos ácidos nucleicos diana
 - g. detectar y medir las señales generadas por los productos de amplificación de dichos ácidos nucleicos diana y que son proporcionales a la concentración de dichos ácidos nucleicos diana, y detectar y medir una señal generada por dicho ácido nucleico de control interno,
 - 35 en el que las condiciones para la amplificación y detección en las etapas d. a g. son idénticas para el primer y el segundo recipiente de reacción y, de esta manera, para los ácidos nucleicos diana y el ácido nucleico de control interno.
 - 40 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que dichos reactivos de amplificación comprenden una polimerasa con actividad de transcriptasa inversa, comprendiendo adicionalmente dicho procedimiento entre la etapa e. y la etapa f. la etapa de incubar en dichos recipientes de reacción dichos ácidos nucleicos purificados con dichos uno o más reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y en condiciones adecuadas para que se produzca la transcripción de ARN por dicha polimerasa con actividad de transcriptasa inversa.
 - 50 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, en el que dicho ácido nucleico de control interno es ARN o ADN.
 - 55 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que dicho ácido nucleico de control interno es un ARN blindado o un ADN empaquetada en fagos.
 9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que la temperatura de fusión de dicho ácido nucleico de control interno es desde 50 °C a 90 °C.
 - 60 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que el ácido nucleico de control interno tiene una longitud de hasta 500 bases.
 - 65 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que la secuencia del ácido nucleico de control interno tiene un contenido de GC de un 30 % a un 70 %.

12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en el que se añade más de un ácido nucleico de control interno en la etapa a., pero únicamente se amplifica uno de dichos ácidos nucleicos de control interno en la etapa f.

Fig. 1

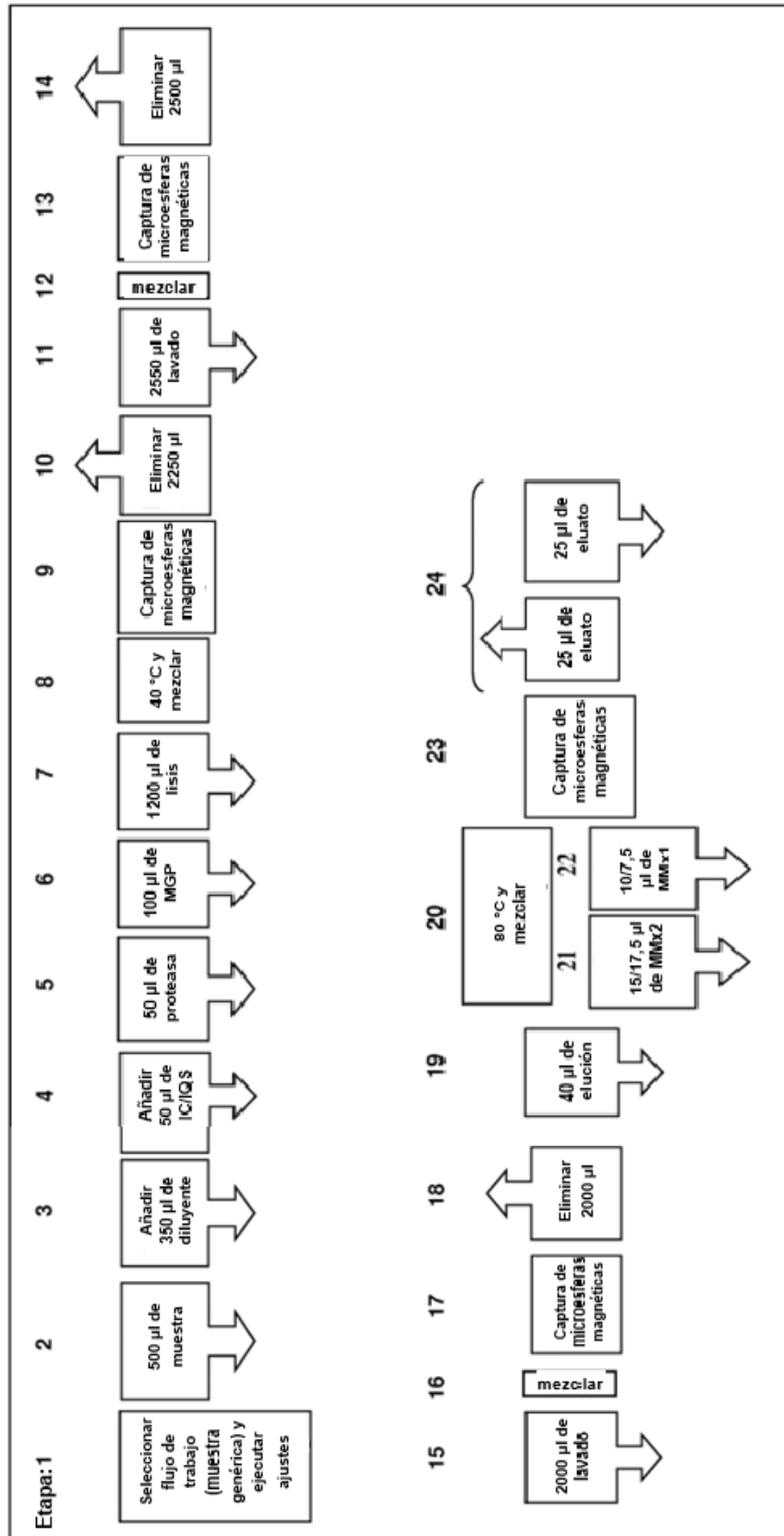


Fig. 2

