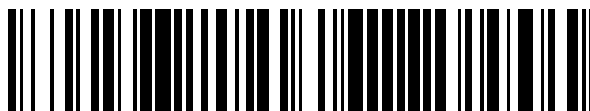


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 747**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2012 E 12188987 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2722397**

54 Título: **Ensayo de doble sonda para la detección de poblaciones heterogéneas de amplicón**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.03.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BERGMANN, FRANK;  
SIZMANN, DOROTHEA y  
ZITZER, HEIKE**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 659 747 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Ensayo de doble sonda para la detección de poblaciones heterogéneas de amplicón

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo del diagnóstico *in vitro*. Dentro de este campo, se refiere a la amplificación y detección de un ácido nucleico diana que puede estar presente en una muestra y, particularmente, a la amplificación y detección de un ácido nucleico diana que comprende subgrupos con variaciones de secuencia y/o mutaciones individuales, usando al menos dos sondas específicas para diferentes porciones de secuencia de un amplicón. La invención proporciona además usos y kits que contienen al menos dos sondas específicas para diferentes porciones de secuencia de un amplicón.

15 **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 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) y similares. Además, dichas técnicas de amplificación son adecuadas para dianas bacterianas, o para el análisis de marcadores oncológicos u otras dianas.

Dentro de una especie, un microorganismo o un patógeno se clasifica a menudo de acuerdo con distintos grupos, genotipos o subtipos basados en la variación de la secuencia de ácido nucleico (es decir, VHC, VIH, VPH, etc.). Sin embargo, en un dispositivo de diagnóstico *in vitro*, todos los grupos, genotipos o subtipos se deben detectar y/o cuantificar correctamente para evitar un diagnóstico falso negativo o la determinación errónea del título. Esto plantea un desafío considerable para los ensayos de diagnóstico molecular para, por ejemplo, la detección del VIH y VHC. Además, la constante mutación y recombinación de dichos patógenos generan, dentro de sus ácidos nucleicos diana, una diversidad creciente que también se debe cubrir por el ensayo de diagnóstico molecular.

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-LCR, reacción en cadena de reparación, 3SR, NASBA, amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación por Q $\beta$ .

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

La detección de un ácido nucleico microbiano en una muestra biológica es crucial, por ejemplo, para reconocer una infección de un individuo. De este modo, un requisito importante, por ejemplo, para un ensayo para la detección de una infección vírica, es la inclusividad, definida de tal manera que se deben evitar los resultados falsos negativos o la subcuantificación de los títulos debidos a regiones de secuencia variable en un genoma vírico causadas por mutaciones. Las secuencias mutadas o parcialmente mutadas dentro del genoma respectivo que posiblemente no se amplifican y/o no se detectan, en combinación con la baja carga vírica, potencian la posibilidad de obtener resultados falsos negativos o falsamente cuantificados.

Se han publicado varias opciones para incrementar la inclusividad de un ensayo molecular. Recientemente, se estableció la coamplificación de dos secuencias diana diferentes y no solapantes dentro del genoma de un patógeno (documento US 2010/0041040). Sin embargo, esta estrategia puede no ser aplicable en general si no se pueden identificar dos regiones diana razonablemente conservadas dentro del genoma de un patógeno o si los oligonucleótidos para la amplificación y detección de dos regiones diana independientes interfieren entre sí en la mezcla maestra.

En este contexto, la técnica anterior ha proporcionado, por ejemplo, procedimientos para la amplificación y detección que implican más de una sonda basada en una secuencia homogénea de amplicón con el objetivo de aumentar la sensibilidad del ensayo (Yip *et al.*, 2005, Clin. Chem. 51 (10)).

60 **Breve resumen de la invención**

Un aspecto de la presente invención es un procedimiento para amplificar y detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho ácido nucleico diana subgrupos con variaciones de secuencia y/o mutaciones individuales, en el que se lleva a cabo una amplificación de los ácidos nucleicos de dicha muestra. Esta amplificación implica una polimerasa, monómeros de nucleótidos, cebadores para generar un amplicón y al menos dos sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón. La detección del amplicón obtenido se consigue detectando la hibridación de las sondas mencionadas anteriormente con dichas

porciones de secuencia diferentes del amplicón.

La invención también se refiere al uso de al menos dos sondas de ácido nucleico detectables no solapantes específicas para diferentes porciones de secuencia del mismo amplicón.

5 Además, se proporciona un kit para amplificar y detectar un ácido nucleico diana que puede estar presente en una muestra, comprendiendo dicho ácido nucleico diana subgrupos con variaciones de secuencia y/o mutaciones individuales. El kit comprende reactivos de amplificación que comprenden una polimerasa, monómeros de nucleótidos, cebadores para generar un amplicón y al menos dos sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón.

**Descripción de la invención**

15 En un primer modo de realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para amplificar y detectar un ácido nucleico diana que puede estar presente en una muestra, comprendiendo dicho ácido nucleico diana subgrupos con variaciones de secuencia y/o mutaciones individuales, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

20 a) poner en contacto los ácidos nucleicos de dicha muestra con reactivos de amplificación que comprenden una polimerasa, monómeros de nucleótidos, cebadores para generar un amplicón y al menos dos sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón.

25 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;

c) detectar la presencia o ausencia de dicho amplicón detectando la hibridación de dichas sondas detectables con dichas porciones de secuencia diferentes de dicho amplicón,

30 en el que la presencia de dicho amplicón es indicativa de la presencia de dicho ácido nucleico diana que comprende subgrupos con variaciones de secuencia y/o mutaciones individuales en dicha muestra.

35 En algunos modos de realización de la invención, una o más etapas del procedimiento descrito anteriormente se automatizan. En otros modos de realización, todas las etapas se automatizan. Los sistemas automatizados proporcionan varias ventajas en comparación con los procedimientos manuales, particularmente en el campo del diagnóstico *in vitro*. El experto en la técnica puede abandonar el sistema después de iniciar el procedimiento, reduciendo, por tanto, el tiempo de intervención y proporcionando la base para un alto rendimiento de la muestra en un periodo de tiempo relativamente corto, pero al mismo tiempo aumentando la reproducibilidad del resultado. Esta es una característica especialmente importante, pero no la única, en situaciones en las que un número elevado de muestras clínicas se deben cribar lo más rápidamente posible, tal como, por ejemplo, en bancos de sangre.

40 En el contexto de la presente invención, el término "amplificar" o "amplificación" se refiere, en general, a la producción de una pluralidad de moléculas de ácido nucleico a partir de un ácido nucleico diana en el que los cebadores hibridan con sitios específicos sobre las moléculas de ácido nucleico diana para proporcionar un sitio de inicio para la extensión por una polimerasa. La amplificación se puede llevar a cabo por cualquier procedimiento conocido en general en la técnica, tal como, pero no limitado a: PCR estándar, PCR en tiempo real, PCR larga, PCR de inicio en caliente, qPCR, PCR con transcripción inversa y amplificación isotérmica.

45 Puede ser favorable realizar un seguimiento de la reacción de amplificación en tiempo real, es decir, detectar los ácidos nucleicos diana y/o sus amplificados durante la propia amplificación.

50 El término "detectar" o "detección", como se usa en el presente documento, se refiere a una prueba destinada a evaluar la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana en una muestra.

55 Un "ácido nucleico diana" es un compuesto polimérico de nucleótidos como es conocido por el experto en la técnica. 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 ácido nucleico diana puede ser una secuencia genómica, por ejemplo, parte de un gen específico o ARN. En otros modos de realización, el ácido nucleico diana puede ser vírico o bacteriano. Los ácidos nucleicos diana pueden comprender subgrupos con variaciones de secuencia distintas o mutaciones individuales distintas en la región del amplicón. Este es especialmente el caso de los ácidos nucleicos de patógenos como los virus que muestran una variación genética significativa debido a altas tasas de mutación o recombinación y que carecen de mecanismos de reparación.

65 El término "amplicón" se refiere a una molécula polinucleotídica (o conjuntamente 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, una

metodología de PCR. Un amplicón es típicamente, pero no exclusivamente, un amplicón de ADN. Un amplicón puede ser monocatenario o bicatenario, o una mezcla de los mismos en cualquier proporción de concentraciones. En un modo de realización de la invención, el amplicón consiste en subpoblaciones con secuencias heterogéneas entre las secuencias de los cebadores.

5 El procedimiento expuesto anteriormente se basa, en algunos modos de realización, en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre un resto fluorescente donante y un resto fluorescente aceptor. En estos modos de realización, las sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia del amplicón son sondas FRET. 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  
10 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 descrito anteriormente, la detección va seguida, en algunos modos de realización, por la cuantificación de la FRET. En el contexto de la invención, los términos "FRET" o "transferencia de energía por resonancia de fluorescencia" o "transferencia de energía por resonancia de Förster" se pueden usar de manera intercambiable y se refieren a una  
15 transferencia de energía entre al menos dos cromóforos, un cromóforo donante y un cromóforo aceptor (denominado extintor). El donante transfiere típicamente la energía al aceptor cuando se excita el donante mediante radiación de luz con una longitud de onda adecuada. El aceptor reemite típicamente la energía transferida en forma de radiación de luz con una longitud de onda diferente. Cuando el aceptor es un extintor "oscuro", disipa la energía transferida en una forma distinta de la luz. Si un fluoróforo particular actúa como un donante o como un aceptor depende de las propiedades del otro miembro del par de FRET. Los pares donante-aceptor usados comúnmente incluyen el par  
20 FAM-TAMRA. Los donantes usados comúnmente son, por ejemplo, fluoresceínas, cumarinas, cianinas y rodaminas. Los extintores usados comúnmente son DABCYL y TAMRA. Los extintores oscuros usados comúnmente incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ), (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™ (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa) y BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

Un formato común de la tecnología FRET utiliza dos sondas de hibridación que forman un par HybProbe. Cada sonda se puede marcar con un resto fluorescente diferente. Las sondas se diseñan, en general, para hibridar en estrecha proximidad entre sí en una molécula de ADN diana (por ejemplo, un producto de amplificación). Un resto  
30 fluorescente donante como, por ejemplo, la fluoresceína se excita a 470 nm por la fuente de luz, por ejemplo, de un instrumento LIGHTCYCLER®. Durante la FRET, la fluoresceína transfiere su energía a un resto fluorescente aceptor tal como, por ejemplo, LIGHTCYCLER®-Red 640 (LC®-Red 640) o LIGHTCYCLER®-Red 705 (LC®-Red 705). El resto fluorescente aceptor emite entonces luz de una longitud de onda más larga, que se detecta por el sistema de detección óptica del instrumento LIGHTCYCLER®. La FRET eficiente solo puede tener lugar cuando los restos fluorescentes están en proximidad local directa (normalmente de aproximadamente 1 a 5 nucleótidos de distancia) y cuando el espectro de emisión del resto fluorescente donante se solapa con el espectro de absorción del resto fluorescente aceptor. La intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ácido nucleico diana originales. En el contexto de la presente invención, como también apreciará el experto en la técnica, un par HybProbe se debe entender como una unidad funcional y, por tanto, una única sonda, ya que los dos miembros de dicho par se tienen que usar juntos. Por lo tanto, las distintas sondas de un par HybProbe no forman "sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia" de un amplicón aunque no solapen cuando se unen al amplicón. Sin embargo, por ejemplo, dos o más pares HybProbe son "sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón" en el sentido de la invención, ya que, como se describe anteriormente, un par HybProbe se debe entender como una única sonda.

45 En un modo de realización del procedimiento descrito anteriormente, las sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón son pares HybProbe.

Este modo de realización confiere varias ventajas. Por ejemplo, como las sondas en este formato de detección no se degradan, se pueden realizar análisis de la curva de fusión sobre cada uno de los pares HybProbe realizando un seguimiento de la dependencia de la temperatura de su hibridación. Como conoce el experto en la técnica, el análisis de la curva de fusión es adecuado para la verificación de resultados o incluso para proporcionar información más detallada, por ejemplo, sobre la identidad de un ácido nucleico diana que la que se puede obtener realizando un seguimiento de la hibridación a una única temperatura.

55 La detección de la formación de amplicones en sistemas cobas® TaqMan® utiliza una sonda de hibridación monocatenaria (también denominada "sonda de 5'-nucleasa"). El término "sonda de 5'-nucleasa" se refiere a un oligonucleótido que comprende al menos un resto de marcaje emisor de luz y que se usa en una reacción de 5'-nucleasa para lograr la detección de ácidos nucleicos diana. En algunos modos de realización, por ejemplo, una sonda de 5'-nucleasa incluye solamente un único resto emisor de luz (por ejemplo, un tinte fluorescente, etc.). En determinados modos de realización, las sondas de 5'-nucleasa incluyen regiones de autocomplementariedad, de tal manera que las sondas pueden formar estructuras de horquilla en condiciones seleccionadas. Para ilustrar adicionalmente, en algunos modos de realización una sonda de 5'-nucleasa comprende al menos dos restos de marcaje y emite radiación de intensidad incrementada, después de que una de las dos marcas se escinde o, de otro modo, se separa del oligonucleótido. En determinados modos de realización, se marca una sonda de 5'-nucleasa con dos tintes fluorescentes diferentes, por ejemplo, un tinte indicador del extremo 5' y un tinte o resto extintor del

extremo 3'. En algunos modos de realización, se marcan las sondas de 5'-nucleasa en una o más posiciones distintas de, o además de, posiciones de extremo. Cuando la sonda está intacta, la transferencia de energía se produce típicamente entre los dos fluoróforos, de tal manera que la emisión fluorescente del tinte indicador se extingue al menos en parte. Durante una etapa de extensión de una reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo, una sonda de 5'-nucleasa unida a un ácido nucleico molde se escinde mediante la actividad nucleasa de 5' a 3' de, por ejemplo, una Taq polimerasa u otra polimerasa que tenga esta actividad como, por ejemplo, la polimerasa Z05, de tal manera que la emisión fluorescente del tinte indicador ya no se extingue. Las sondas de 5'-nucleasa ejemplares se describen, por ejemplo, en el documento US 5.210.015. En algunos modos de realización, una sonda de 5'-nucleasa se puede marcar con dos o más tintes indicadores diferentes y un tinte o resto extintor del extremo 3'. Los tintes fluorescentes típicos usados en este formato son, por ejemplo, entre otros, FAM, HEX, CY5, JA270, Cyan500 y CY5.5.

En un modo de realización del procedimiento descrito anteriormente, las sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón son sondas de 5'-nucleasa.

Las sondas detectables pueden hibridar con la misma hebra o con diferentes hebras de un amplicón bicatenario.

En algunos modos de realización del procedimiento descrito anteriormente, al menos dos sondas detectables hibridan con diferentes hebras de dicho amplicón.

En este caso, se proporciona al experto en la técnica una mayor flexibilidad con respecto a la selección de las secuencias del cebador y de la sonda y, por tanto, de los sitios de unión en el amplicón respectivo. Por ejemplo, en el caso de la formación de estructura secundaria debida a una secuencia específica dentro de un oligonucleótido, puede ser importante poder cambiar a una secuencia diferente y, por tanto, a un sitio de unión diferente en dicho amplicón. Además, si las sondas detectables se unen a diferentes hebras, tal como una primera sonda a la hebra codificante y una segunda sonda a la hebra no codificante de un amplicón bicatenario, se reduce el riesgo de que dichas sondas interfieran entre sí en sus respectivos sitios de unión.

En otros modos de realización del procedimiento descrito anteriormente, al menos dos sondas detectables hibridan con la misma hebra de dicho amplicón.

En este último modo de realización, es posible hibridar múltiples sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia del amplicón en estrecha proximidad entre sí. Esto se debe sorprendente a la circunstancia de que la exonucleasa respectiva requiere cierto espacio para unirse y escindir las sondas de 5'-nucleasa. Sin embargo, los autores de la presente invención han demostrado que incluso dichas sondas pueden hibridar con un amplicón únicamente a unas pocas bases de distancia entre sí. Esto permite que el experto en la técnica use más de una sonda detectable específica para porciones de secuencia distintas, cada una a amplicones de longitud relativamente corta. De acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, incluso tramos cortos de ácidos nucleicos diana pueden servir como dianas adecuadas para múltiples sondas, confiriendo, por tanto, los beneficios descritos *supra* tales como, por ejemplo, potenciación de la señal e incremento de la tolerancia frente a variaciones genéticas como, por ejemplo, mutaciones puntuales.

Por tanto, en un modo de realización del procedimiento descrito anteriormente, las sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón hibridan con el amplicón con no más de 100 bases de distancia entre sí, en algunos modos de realización de 1, 5, 10, 20, 30, 40 o 50 bases, a 60, 70, 80, 90 o 100 bases de distancia entre sí. En algunos modos de realización, la distancia es de 40 a 80, o de 50 a 70 o de 55 a 60 bases, o es 58 bases. En este contexto, "distancia" significa el número de bases del amplicón que se encuentran entre las bases del amplicón con el que hibridan las sondas detectables en caso de que hibriden con la misma hebra. Si hibridan con diferentes hebras, la distancia se calcula en consecuencia, en la que cada base de una hebra de un amplicón bicatenario tiene una base correspondiente en la otra hebra con la que forma un par de bases.

En algunos modos de realización, la detección se realiza después de cada etapa de realización de ciclo de una técnica de amplificación basada en ciclos, tal como PCR. En algunos modos de realización, la detección se realiza en tiempo real. Usando instrumentación de PCR en tiempo real disponible comercialmente (por ejemplo, LightCycler® o TaqMan®), la amplificación por PCR y la detección del producto de amplificación se pueden combinar en una única cubeta cerrada con un tiempo de ciclo considerablemente reducido. Puesto que la detección se produce simultáneamente a 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. En ambos formatos de detección descritos anteriormente, la intensidad de la señal emitida se puede correlacionar principalmente con el número de moléculas de ácido nucleico diana originales.

Una "muestra" es cualquier material que se puede someter a un ensayo de diagnóstico y se refiere, en general, al medio que posiblemente contiene el ácido nucleico diana. La "muestra" procede, en algunos modos de realización, de una fuente biológica. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra clínica. En algunos modos de realización, dicha muestra procede de un ser humano y es un líquido corporal. En algunos modos de realización de la invención, la muestra es sangre completa o suero, plasma sanguíneo, orina, esputo, sudor, muestras genitales o bucales o

nasales obtenidas con hisopo, heces que se pueden pipetear, muestras de tejido solubilizadas o líquido cefalorraquídeo o similares, de ser humano. Una muestra se puede pipetear o convertir en una forma pipeteable, de manera que el término "muestra" comprende líquidos homogéneos u homogeneizados, pero también emulsiones, suspensiones y similares. Una muestra también puede ser, por ejemplo, una muestra originalmente sólida (es decir, una muestra de tejido) que se somete a un tratamiento de solubilización para la extracción y purificación de ácidos nucleicos.

Una "polimerasa", como se usa en el presente documento, es una enzima que puede sintetizar ácidos nucleicos a partir de elementos más pequeños tales como nucleótidos. En algunos modos de realización, la polimerasa es una polimerasa termoestable. La expresión "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima que es estable al calor, es termorresistente y mantiene suficiente actividad para lograr reacciones de extensión de polinucleótidos posteriores y no se desnaturaliza (inactiva) irreversiblemente cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para lograr la desnaturalización de los ácidos nucleicos bicatenarios. Las condiciones de calentamiento necesarias para la desnaturalización de ácidos nucleicos son bien conocidas en la técnica y se ejemplifican, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 4.683.202, 4.683.195 y 4.965.188. Como se usa en el presente documento, una polimerasa termoestable es adecuada para su uso en una reacción de ciclos de temperatura, tal como la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"). La desnaturalización irreversible para los propósitos del presente documento se refiere a la pérdida permanente y completa de actividad enzimática. Para una polimerasa termoestable, la actividad enzimática se refiere a la catálisis de la combinación de los nucleótidos de manera apropiada para formar productos de extensión de polinucleótidos que son complementarios a una hebra de ácido nucleico molde. Para propósitos de amplificación, dichos nucleótidos están presentes en forma monomérica, por lo tanto, también se denominan "monómeros de nucleótidos" en el contexto de la presente invención. A menudo, dichos monómeros de nucleótidos usados por polimerasas tales como, por ejemplo, ADN polimerasas termoestables son, por ejemplo, trifosfatos de nucleósidos o tetrafosfatos de nucleósidos, o similares. Las ADN polimerasas termoestables de bacterias termófilas incluyen, por ejemplo, ADN polimerasas de *Thermotoga maritima*, *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus filiformis*, especie Sps17 de *Thermus*, especie Z05 de *Thermus*, *Thermus caldophilus*, *Bacillus caldotenax*, *Thermotoga neopolitana* y *Thermosipho africanus*.

El término "cebador" se usa en el presente documento como es conocido por el experto en la técnica y se refiere a compuestos oligoméricos, principalmente a oligonucleótidos, pero también a oligonucleótidos modificados que pueden cebar 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 unir nucleótidos adicionales mediante una ADN polimerasa dependiente de molde para establecer un enlace fosfodiéster 3' a 5' por la que se usan trifosfatos de desoxinucleósidos y por la que se libera pirofosfato.

Una "sonda" o "sonda detectable" también designa un oligonucleótido natural o modificado. Como es conocido en la técnica, una sonda sirve para detectar un analito o un amplificado. En el contexto de la invención, se pueden usar sondas, por ejemplo, para detectar los amplificados del ácido nucleico diana y/o un ácido nucleico de control. Para el propósito de detectabilidad, típicamente las sondas portan marcadores.

En algunos modos de realización del procedimiento, las al menos dos sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón portan el mismo tipo de marcador y, por tanto, la señal que se origina de la sonda individual no se puede distinguir. También en el presente documento se divulgan procedimientos en los que las dos sondas detectables portan marcadores diferentes que emiten señales de diferentes longitudes de onda de tal manera que las señales de las al menos dos sondas se pueden distinguir con la instrumentación apropiada.

Los "marcadores", a menudo denominados "grupos indicadores", son en general grupos que hacen que un ácido nucleico, en particular oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados, así como cualquier ácido nucleico unido a los mismos, sean distinguibles del resto de la muestra. Los marcadores útiles en el contexto de la invención son, por ejemplo, marcadores fluorescentes, que pueden ser tintes fluorescentes tales como, por ejemplo, un tinte de fluoresceína, un tinte de rodamina, un tinte de cianina o un tinte de cumarina. Los tintes fluorescentes útiles en el contexto de la invención son, por ejemplo, FAM, HEX, JA270, CAL635, Coumarin343, Quasar705, Cyan500, CY5.5, LC-Red 640, LC-Red 705, TAMRA o CY5.

En el contexto de la invención, 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. La sonda o el cebador es entonces un oligonucleótido modificado.

Como es conocido por el experto en la técnica, el término "específico", en el contexto de cebadores y sondas, implica que un cebador o sonda "específico" para un ácido nucleico distintivo se une a dicho ácido nucleico en condiciones rigurosas. En algunos modos de realización, las sondas usadas en el contexto de la invención son idénticas al menos en un 80 % a las diferentes porciones de secuencia del amplicón. En otro modo de realización, las secuencias de sonda comprenden al menos 12 nucleótidos contiguos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a 8 o las correspondientes secuencias de ácido nucleico complementarias de los mismos, y los cebadores comprenden al menos 12 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 9 a 15. En algunos modos

de realización, las secuencias de sonda y/o cebador seleccionadas consisten en de 12 a 60 nucleótidos, o en de 20 a 60 nucleótidos, o en las secuencias exactas seleccionadas de dichas SEQ ID NO o sus secuencias de ácido nucleico complementarias. El experto en la técnica entiende que, en el sentido de la invención, un par de sondas que forman una entidad funcional tal como, por ejemplo, un par Hybprobe usado en el formato LightCycler® no es "al menos dos sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón". Las dos Hybprobes de un par se consideran una unidad y se pueden detectar solamente de forma conjunta, mientras que cada una de las al menos dos sondas en el contexto de la invención es detectable en solitario.

Además, en el contexto de la invención, el término "solapar" significa que dos o más oligonucleótidos, en particular las al menos dos sondas detectables mencionadas *supra*, comprenden tramos de secuencia idénticos (cuando se unen a la misma hebra) o complementarios (cuando se unen a diferentes hebras). Las sondas usadas en el procedimiento descrito anteriormente en algunos modos de realización no se solapan y, por tanto, no compiten en la unión a un sitio específico en el amplicón. Cuando se unen, dichas dos o más sondas hibridan con diferentes tramos de secuencia de dicho amplicón. Las sondas detectables usadas en el contexto de la invención son ventajosas en comparación con sondas solapantes.

El término "hibridar" o "hibridación" en general se refiere a la formación de pares de bases entre diferentes moléculas de ácido nucleico coherente con sus secuencias de nucleótidos. Los términos "hibridar" y "reasociar" se pueden usar de manera intercambiable.

Dirigir dos o más sondas a diferentes porciones de secuencia del mismo amplicón, como se realiza en el procedimiento descrito *supra*, da lugar a un riesgo significativamente reducido de obtener resultados falsos negativos en ensayos cualitativos. Además, en ensayos cuantitativos, se reduce el riesgo de subcuantificación de los títulos, por ejemplo, de un virus. Una diversidad de diferentes genotipos, subtipos y mutantes dentro de un organismo dado se puede detectar y cuantificar fácilmente usando un número mínimo de oligonucleótidos como resultado de la incrementada inclusividad y solidez del ensayo. A este respecto, puede darse el caso de que un determinado genotipo, subtipo o mutante no hibride con todas las al menos dos sondas detectables. Por ejemplo, en el caso de dos sondas, una podría no unirse al amplicón diana debido a la variante de secuencia específica de este último, mientras que la otra sonda específica para una porción de secuencia diferente de dicho amplicón aún puede hibridar con su respectiva secuencia diana. De esta manera, la detección del amplicón seguiría siendo posible. En modos de realización en los que las diferentes sondas portan marcadores diferentes, también puede ser posible determinar las sondas que hibridaron y las que no.

El ciclo vital de las pruebas basadas en el procedimiento descrito anteriormente es prolongado, ya que puede tratar incluso con nuevas variantes generadas por microorganismos tales como, por ejemplo, virus, a través de la presión selectiva, por ejemplo, como consecuencia de nuevos fármacos antirretrovíricos. En vista del alto grado de mutaciones dentro de los genomas víricos, en un modo de realización del procedimiento descrito anteriormente dicho ácido nucleico diana es un ácido nucleico vírico.

La inclusividad global de los ensayos cualitativos se incrementa significativamente y la variabilidad de las determinaciones de los títulos en ensayos cuantitativos se minimiza aplicando el procedimiento descrito anteriormente.

Como es conocido por el experto en la técnica, una medida para la inclusividad es la detección de subgrupos y aislados víricos que portan mutaciones con sensibilidad equivalente ya que los aislados estándar que no se desvían significativamente de la secuencia consenso. La sensibilidad de un ensayo es el LDD (límite de detección), que se refiere a la cantidad o concentración más baja detectable de un ácido nucleico en una muestra. Un bajo "LDD" corresponde a alta sensibilidad y viceversa. El "LDD" se expresa normalmente por medio de la unidad "cp/ml", particularmente si el ácido nucleico es un ácido nucleico vírico, o como UI/ml. "cp/ml" significa "copias por mililitro", en el 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. Las normas de la OMS, en general, se desarrollan a partir de un aislado estándar con un genoma parecido a la secuencia consenso.

Un procedimiento ampliamente usado para calcular un LDD es el "análisis de Probit", que es un procedimiento que analiza la relación entre un estímulo (dosis) y la respuesta cuántica (todo o nada). En un experimento típico de respuesta cuántica, a los grupos de animales se les administran diferentes dosis de un fármaco. Se registra el porcentaje de muerte a cada nivel de dosis. Estos datos se pueden analizar después usando el análisis Probit. El modelo Probit asume que el porcentaje de respuesta está relacionado con la dosis logarítmica como la distribución normal acumulada. Es decir, las dosis logarítmicas se pueden usar como variables para leer el porcentaje de muerte a partir de la normal acumulada. El uso de la distribución normal, en lugar de otras distribuciones de probabilidad, influye en la tasa de respuesta prevista en los extremos alto y bajo de las dosis posibles, pero tiene poca influencia en la zona intermedia.

El análisis de Probit se puede aplicar a distintas "tasas de acierto". Como se conoce en la técnica, una "tasa de acierto" se expresa comúnmente en porcentaje [%] e indica el porcentaje de resultados positivos a una concentración específica de un analito. Por tanto, por ejemplo, un LDD se puede determinar a una tasa de acierto de

un 95 %, lo que significa que el LDD se calcula para una situación en la que un 95 % de los resultados válidos para una muestra positiva verdadera se determinan como positivos.

5 El procedimiento descrito anteriormente es particularmente ventajoso en los ensayos para detectar el virus de la hepatitis C (VHC). Por tanto, en un modo de realización del procedimiento descrito *supra*, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico del VHC.

10 La expresión "tipo de virus de la hepatitis C" se refiere a la clasificación de un virus de la hepatitis C (VHC) basándose en su organización genómica (por ejemplo, análisis filogénico). La clasificación de una cepa aislada del VHC en una categoría de tipo particular refleja su relación genómica con otras cepas aisladas del VHC y su relación relativamente menor con otras cepas aisladas del VHC. La nomenclatura del tipado del VHC usada en el presente documento es coherente con la nomenclatura ampliamente adoptada revisada y propuesta por Simmonds *et al.* (2005) "Consensus Proposals for a 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) 15 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 latina en minúsculas siguiendo al genotipo, por ejemplo, subtipo 1a, subtipo 1c, subtipo 6a, etc. Las variantes genéticas encontradas en una cepa aislada individual se denominan cuasiespecies. En todo el mundo se conocen aproximadamente 100 subtipos del VHC que engloban los seis genotipos. El número de subtipos no es 20 estático, es decir, a medida que se estudian y secuencian más cepas aisladas del VHC, es probable que se puedan reconocer subtipos (y posiblemente genotipos) adicionales.

25 Dado que el VHC es un virus de ARN, el experto en la técnica habitualmente transcribe de forma inversa el ARN vírico en ADN antes de la amplificación real. En dicho caso, los reactivos de amplificación comprenden una transcriptasa inversa o una polimerasa con actividad transcriptasa inversa.

30 Un cebador adecuado para la reasociación a un molde de ARN también puede ser adecuado para la amplificación por PCR. Para la PCR, un segundo cebador, complementario a la hebra de ADNc transcrita de forma inversa, proporciona un sitio de inicio para la síntesis de un producto de extensión.

35 En la amplificación de una molécula de ARN por una ADN polimerasa, la primera reacción de extensión es la transcripción inversa usando un molde de ARN, y se produce una hebra de ADN. La segunda reacción de extensión, usando el molde de ADN, produce una molécula de ADN bicatenario. Por tanto, la síntesis de una hebra de ADN complementaria a partir de un molde de ARN mediante una ADN polimerasa proporciona el material de partida para la amplificación.

40 Las ADN polimerasas termoestables se pueden usar en una reacción combinada de transcripción inversa y amplificación con una sola enzima. La expresión "PCR en tiempo real en una etapa", en este contexto, se puede referir a una reacción sin la etapa de transcripción inversa si el ácido nucleico diana es ADN o una reacción que incluye una etapa de transcripción inversa si el ácido nucleico diana es ARN. Por "PCR en tiempo real en una etapa" se entiende que, después de la etapa de transcripción inversa (RT), no hay necesidad de abrir el recipiente de reacción o de ajustar de otro modo los componentes de reacción antes de realizar la etapa de amplificación. En una 45 reacción de PCR en tiempo real que no es en una etapa, después de la transcripción inversa y antes de la amplificación, uno o más de los componentes de reacción, tales como los reactivos de amplificación, se ajustan, añaden o diluyen, por ejemplo, para ello se ha de abrir el recipiente de reacción o, al menos, se ha de manipular su contenido. Ambos modos de realización, PCR en tiempo real en una etapa y PCR en tiempo real que no es en una etapa, están comprendidos en el alcance de la invención.

50 En un modo de realización de la invención, se previene la contaminación por arrastre de productos de amplificación, tales como amplicones y productos de alto peso molecular (amplicón polimerizado) que se originan de reacciones de PCR anteriores. Una forma popular y eficaz de prevenir la contaminación por arrastre implica el uso de uracil-ADN glucosilasas o uracil-*N*-glucosilasas, abreviadas como "UDG" o "UNG" (EC 3.2.2.3). Estas enzimas que comprenden actividad uracil-ADN glucosilasa reconocen el uracilo presente en el ADN monocatenario o bicatenario y escinden el enlace N-glicosídico entre la base de uracilo y la desoxirribosa que abandona un sitio abásico, véase, por ejemplo, 55 el documento US 6.713.294.

60 Como se muestra por los ejemplos en el presente documento, se logra un rendimiento particularmente bueno en la detección de un ácido nucleico del VHC cuando se emplean sondas que comprenden o que consisten en al menos dos secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 8 o los complementos respectivos de las mismas.

Por lo tanto, un aspecto de la invención es un procedimiento para amplificar y detectar un ácido nucleico diana del VHC que puede estar presente en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

65 a) poner en contacto los ácidos nucleicos de dicha muestra con reactivos de amplificación que comprenden una polimerasa, monómeros de nucleótidos, cebadores para generar un amplicón y al menos dos sondas detectables



específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón, en el que dichas al menos dos sondas detectables comprenden al menos dos secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 8 o los complementos respectivos de las mismas;

5 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;

c) detectar la presencia o ausencia de dicho amplicón detectando la hibridación de dichas sondas detectables con dichas porciones de secuencia diferentes de dicho amplicón;

10

en el que la presencia de dicho amplicón es indicativa de la presencia del VHC en dicha muestra.

En otro modo de realización del procedimiento descrito anteriormente, dichas al menos dos sondas detectables comprenden las SEQ ID NO: 6 y 8; aún en otro modo de realización, los reactivos de amplificación no contienen más sondas específicas del VHC aparte de las SEQ ID NO: 6 y 8.

15

En un modo de realización de la invención, los cebadores en el procedimiento mencionado anteriormente comprenden al menos una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9 a 15. Dichos cebadores son particularmente útiles para crear un amplicón detectable con las sondas mencionadas anteriormente. En otro modo de realización, los cebadores en el procedimiento mencionado anteriormente consisten en las SEQ ID NO: 9, 10 y 11.

20

Un aspecto de la invención también es el procedimiento descrito anteriormente, en el que dichos cebadores comprenden más de un cebador directo y/o inverso. solapantes variables detectables por las sondas mencionadas anteriormente. En el caso de más de un cebador directo y/o inverso, los cebadores directos y/o inversos respectivos se escalonan en algunos modos de realización, es decir, se solapan con respecto a la secuencia del molde con la que hibridan. Dicho conjunto escalonado contribuye además a una cobertura incrementada de variantes genéticas tales como genotipos y/o subtipos del VHC.

25

La combinación de los cebadores y sondas mencionados anteriormente en el procedimiento expuesto *supra* es particularmente útil para detectar una diversidad considerable de genotipos del VHC. En un modo de realización, el procedimiento descrito anteriormente es un procedimiento para detectar simultáneamente los genotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 6 del VHC que pueden estar presentes en una muestra. En otro modo de realización, el procedimiento descrito anteriormente es un procedimiento para detectar los genotipos 1, 2, 3 y 5 (subconjunto 1) con una primera sonda completamente coincidente y los genotipos 1, 2, 4 y 6 (subconjunto 2) con una segunda sonda completamente coincidente. En otro modo de realización, el procedimiento es un procedimiento para detectar los subtipos 1a, 1b, 2a, 2b y, en algunos modos de realización, otros subtipos. Aún en otro modo de realización, el procedimiento descrito anteriormente es un procedimiento para detectar simultáneamente los genotipos 1, 2, 3, 4, 5 y 6, así como los subtipos 1a, 1b, 2a, 2b y, en algunos modos de realización, otros subtipos del VHC que pueden estar presentes en una muestra.

30

35

40

Otro aspecto de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, que comprende además, antes de la etapa a), las etapas de:

45

i) combinar conjuntamente un soporte sólido y dicha muestra durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para permitir que los ácidos nucleicos que comprenden dicho ácido nucleico diana queden inmovilizados sobre dicho soporte sólido;

50

ii) aislar dicho soporte sólido del resto del material presente en la muestra en una estación de separación;

iii) purificar los ácidos nucleicos en la estación de separación separando la muestra del soporte sólido y lavando el soporte sólido una o más veces con un tampón de lavado.

55

En el contexto de la invención, la expresión "soporte sólido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tipo de soporte sólido al que el analito se puede unir, directamente y de forma no específica por adsorción, o bien indirectamente y de forma específica. La unión indirecta puede ser la unión de un analito a un anticuerpo inmovilizado sobre el soporte sólido, o la unión de un marcador a un compuesto de unión al marcador, por ejemplo, unión de los marcadores 6xHis a quelato de Ni. Cuando el analito es un ácido nucleico, dicha unión indirecta puede ser mediante la unión a una sonda de ácido nucleico de captura que es homóloga a una secuencia diana del ácido nucleico de interés. Por tanto, usando sondas de captura unidas a un soporte sólido, se puede separar un analito diana o 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 se limita a estos materiales.

60

65

"Inmovilizar", en el contexto de la invención, significa capturar objetos tales como ácidos nucleicos de manera reversible o irreversible. Particularmente, "inmovilizado sobre el material de soporte sólido" significa que el objeto u objetos se asocian al material de soporte sólido con el fin de conseguir su separación de cualquier medio circundante, y se pueden recuperar, por ejemplo, mediante separación del material de soporte sólido posteriormente.

5 En este contexto, "inmovilización" puede comprender, por ejemplo, la adsorción de ácidos nucleicos en vidrio u otras superficies adecuadas de materiales sólidos como se ha descrito *supra*. 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 unidos a un soporte sólido mediante emparejamiento de bases. En este último caso, dicha inmovilización específica da lugar a la unión predominante de los ácidos nucleicos diana.

10 Una "estación de separación" es un dispositivo o componente de un sistema analítico que permite el aislamiento del soporte sólido del resto del material presente en la muestra. Dicha estación de separación puede comprender, por ejemplo, aunque no esté limitada a, estos componentes, una centrifuga, una gradilla con tubos de filtro, un imán u otros componentes adecuados. En algunos modos de realización, la estación de separación comprende uno o más imanes. En ciertos modos de realización, se usan uno o más imanes para la separación de partículas magnéticas, tales como, por ejemplo, partículas de vidrio magnéticas, como soporte sólido. Si, por ejemplo, la muestra y el material de soporte sólido se combinan entre sí en los pocillos de una placa de múltiples pocillos, entonces uno o más imanes comprendidos en la estación de separación se pueden poner en contacto, por ejemplo, con la propia muestra introduciendo los imanes en los pocillos, o dichos uno o más imanes se pueden acercar a las paredes exteriores de los pocillos para atraer las partículas magnéticas y posteriormente separarlas del líquido circundante.

15 En el sentido de la invención, "purificación", "aislamiento" o "extracción" de ácidos nucleicos se refieren a lo siguiente: Antes de que los ácidos nucleicos se puedan analizar en un ensayo diagnóstico, por ejemplo, por amplificación, típicamente se tienen que purificar, aislar o extraer de muestras biológicas que contienen mezclas complejas de diferentes componentes. Para las primeras etapas, se pueden usar procedimientos que permitan el enriquecimiento de los ácidos nucleicos.

20 Un "tampón de lavado" es un fluido que se diseña para eliminar componentes no deseados, especialmente en un procedimiento de purificación. Dichos tampones son bien conocidos 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 con el fin de separar el ácido nucleico inmovilizado de cualquier componente no deseado. El tampón de lavado puede contener, por ejemplo, etanol y/o agentes caotrópicos en una solución tamponada o soluciones con un pH ácido sin etanol y/o agentes caotrópicos como se ha descrito anteriormente. A menudo, la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan como soluciones madre que se tienen que diluir antes de su uso.

25 Resumiendo, aplicando las etapas i) a iii) del procedimiento descrito anteriormente, los ácidos nucleicos que incluyen el ácido nucleico diana que puede estar presente en la muestra se separan del resto de la muestra, de tal manera que se reduce el riesgo de inhibición de las etapas posteriores por cualquier sustancia potencialmente interferente en dicha muestra.

30 Para el análisis posterior, los ácidos nucleicos se pueden eluir posteriormente del soporte sólido, por ejemplo, mediante un tampón de elución apropiado. Dicho tampón de elución puede ser, por ejemplo, agua destilada o desionizada o soluciones salinas acuosas tales como, por ejemplo, tampones Tris como Tris HCl o HEPES u otros tampones adecuados conocidos por el experto en la técnica.

35 En algunos modos de realización, el soporte sólido está presente en la mezcla de reacción de amplificación durante la amplificación y, en algunos modos de realización, también durante la detección.

40 En algunos modos de realización del procedimiento descrito *supra*, se añade un ácido nucleico de control a la muestra y/o a los ácidos nucleicos purificados.

45 Dicho ácido nucleico de control es, en algunos modos de realización, un ácido nucleico de control cualitativo y, en otros modos de realización, un ácido nucleico de control cuantitativo, o ambos.

50 La detección cualitativa de un ácido nucleico en una muestra es crucial, por ejemplo, para reconocer una infección de un individuo. De este modo, un requisito importante para un ensayo para la detección, por ejemplo, de una infección vírica, es que se eviten los resultados falsos negativos o falsos positivos, ya que dichos resultados darían lugar casi inevitablemente a consecuencias graves con respecto al tratamiento del paciente respectivo. Por tanto, 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 la prueba: al menos en el caso de un resultado negativo con respecto al ácido nucleico diana respectivo, la reacción del control interno cualitativo tiene que ser reactiva dentro de unos ajustes determinados, es decir, se debe detectar el control interno cualitativo o, de lo contrario, se considera que la propia prueba es inoperante. Sin embargo, en una configuración cualitativa, dicho control interno cualitativo no tiene necesariamente que detectarse en caso de un resultado positivo. En las pruebas cualitativas, es especialmente importante que la sensibilidad de la reacción esté garantizada y, por lo tanto, estrictamente controlada. En consecuencia, la concentración del control interno

cualitativo debe ser relativamente baja, de modo que incluso en una situación, por ejemplo, de ligera inhibición, no se detecte el control interno cualitativo y, por lo tanto, la prueba se invalide.

Por tanto, en un modo de realización del procedimiento descrito anteriormente, la presencia de un producto de amplificación de dicho ácido nucleico de control es indicativa de una amplificación que se produce en la mezcla de reacción incluso en ausencia de productos de amplificación para dicho ácido nucleico diana.

Por otra parte y además de la mera detección de la presencia o ausencia de un ácido nucleico en una muestra, a menudo es importante determinar la cantidad de dicho ácido nucleico. Como ejemplo, el estadio y la gravedad de una enfermedad vírica se pueden evaluar en base a la carga vírica. Adicionalmente, el seguimiento de cualquier tratamiento requiere información sobre la cantidad de un patógeno presente en un individuo con el fin de evaluar el éxito del tratamiento.

Por lo tanto, un aspecto de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, que comprende además la etapa de determinar la cantidad del ácido nucleico diana que comprende subgrupos con variaciones de secuencia y/o mutaciones individuales después de y/o durante la etapa c).

Por ejemplo, se usan pruebas de carga vírica de ARN del VHC como ayuda en la atención a los pacientes con hepatitis C crónica evaluando la respuesta al tratamiento y tomando decisiones clínicas, por ejemplo, con respecto a la duración del tratamiento. El objetivo principal de un tratamiento para la hepatitis C crónica es erradicar el VHC logrando una respuesta virológica mantenida, por ejemplo, en el caso del tratamiento con medicamentos como peginterferón alfa-2, solo o en combinación con otros fármacos tales como ribavirina y/o boceprevir o telaprevir. El procedimiento descrito anteriormente proporciona un ensayo de carga vírica que detecta y cuantifica con fiabilidad el ARN del VHC, dando lugar a una mejora en el seguimiento del tratamiento.

En un ensayo cuantitativo, es necesario introducir un ácido nucleico patrón cuantitativo que sirva de referencia para determinar la cantidad absoluta de un ácido nucleico diana. Por tanto, se añade un ácido nucleico de control interno cuantitativo a la mezcla de detección. Dicho control es particularmente importante para la cuantificación del resultado de la prueba, pero también para confirmar la validez de un resultado de la prueba: el ácido nucleico de control interno cuantitativo se debe detectar en el caso de un resultado negativo y positivo con respecto al ácido nucleico diana respectivo. La reacción del control interno cuantitativo tiene que ser reactiva dentro de los ajustes dados o, de lo contrario, la propia prueba se considera inoperante. La cuantificación se puede lograr ya sea tomando como referencia una calibración externa o implementando un patrón cuantitativo interno.

Un ejemplo de cómo realizar el cálculo de resultados cuantitativos para señales generadas en un sistema cobas® TaqMan® basado en un ácido nucleico de control interno que sirve como ácido nucleico cuantitativo estándar se describe a continuación: se calcula un título a partir de los datos de entrada de los valores de fluorescencia corregidos para el instrumento de una tanda de PCR completa. Un conjunto de muestras que contienen un ácido nucleico diana y un ácido nucleico de control interno que sirve como ácido nucleico patrón cuantitativo se someten a PCR en un termociclador usando un perfil de temperatura especificado. A temperaturas y tiempos seleccionados durante el perfil de PCR, las muestras se iluminan por luz filtrada y los datos de fluorescencia filtrados se recogen para cada muestra para el ácido nucleico diana y para el ácido nucleico de control interno. Una vez completada la tanda de PCR, las lecturas de fluorescencia se procesan 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 inflexión (CT) para el ácido nucleico de control interno y para el ácido nucleico diana. El valor de inflexión se define como el punto en el que la fluorescencia del ácido nucleico diana o del ácido nucleico de control interno cruza un umbral predefinido (concentración de fluorescencia). La determinación de los títulos se basa en los supuestos de que el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno se amplifican con la misma eficacia y de que, en el valor de inflexión calculado, se amplifican y detectan cantidades iguales de copias de amplicón de ácido nucleico diana y ácido nucleico de control interno. Por lo tanto, el (ctQS – ctDiana) es lineal con respecto al log (conc. diana/conc. QS). En este contexto, QS designa el ácido nucleico de control interno que sirve como ácido nucleico patrón cuantitativo. El título T se puede calcular entonces, por ejemplo, usando una fórmula de calibración polinómica como en la siguiente ecuación:

$$conc_{Diana} = conc_{QS} \cdot 10^{(a \cdot (ctQS - ctDiana)^2 + b \cdot (ctQS - ctDiana) + c)}$$

Las constantes polinómicas y la concentración del ácido nucleico estándar cuantitativo son conocidas, por lo que la única variable en la ecuación es la diferencia (ctQS – ctDiana).

Como es conocido por el experto en la técnica, los valores importantes para caracterizar un buen ensayo cuantitativo son, por ejemplo, la linealidad o el intervalo lineal del ensayo (determinado mediante la cuantificación de una serie de diluciones del material diana con la regresión lineal posterior de la curva resultante), exactitud (correlación entre los valores nominales y determinados/asignados experimentalmente), inclusividad (cuantificación equivalente y exacta de los genotipos/subtipos/mutantes/aislados) y precisión (desviación estándar del resultado de la concentración transformado a log 10 determinada por análisis de componentes de varianza usando datos generados

de estudios de linealidad).

5 Para pruebas tanto cuantitativas como cualitativas, propiedades como la sensibilidad analítica (descrita anteriormente en el contexto de LDD) o la especificidad (eliminación de resultados falsos positivos debidos a una detección inespecífica) también son parámetros importantes. En los ejemplos en el presente documento se muestra que el procedimiento descrito anteriormente presenta propiedades mejoradas con respecto a la inclusividad como se analiza anteriormente.

10 En consonancia con las ventajas del procedimiento analizado anteriormente, otro aspecto de la invención es el uso de al menos dos sondas de ácido nucleico detectables para amplificar y detectar un ácido nucleico diana que puede estar presente en una muestra, comprendiendo dicho ácido nucleico diana subgrupos con variaciones de secuencia y/o mutaciones individuales, en el que dichas sondas de ácido nucleico detectables son específicas para diferentes porciones de secuencia del mismo amplicón.

15 En algunos modos de realización del uso descrito anteriormente, dichas sondas detectables no se solapan.

20 En otros modos de realización, el uso descrito anteriormente es un uso de al menos dos sondas de ácido nucleico detectables para amplificar y detectar un ácido nucleico diana del VHC que puede estar presente en una muestra, en el que dichas sondas de ácido nucleico detectables son específicas para diferentes porciones de secuencia del mismo amplicón, y en el que dichas sondas detectables comprenden al menos dos secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 8 o los complementos respectivos de las mismas.

25 En otro modo de realización del uso descrito anteriormente, dichas al menos dos sondas detectables comprenden las SEQ ID NO: 6 y 8; aún en otro modo de realización, el kit no contiene más sondas específicas del VHC aparte de las SEQ ID NO: 6 y 8.

30 La invención proporciona además un kit para amplificar y detectar un ácido nucleico diana que puede estar presente en una muestra, comprendiendo dicho ácido nucleico diana subgrupos con variaciones de secuencia y/o mutaciones individuales, comprendiendo dicho kit reactivos de amplificación que comprenden una polimerasa, monómeros de nucleótidos, cebadores para generar un amplicón y al menos dos sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón.

En algunos modos de realización del kit descrito anteriormente, dichas sondas detectables no se solapan.

35 En un modo de realización, el kit mencionado *supra* es un kit para amplificar y detectar un ácido nucleico diana del VHC que puede estar presente en una muestra, comprendiendo dicho kit reactivos de amplificación que comprenden una polimerasa, monómeros de nucleótidos, cebadores para generar un amplicón y al menos dos sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón, en el que dichas sondas detectables comprenden al menos dos secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 8 o los complementos respectivos de las mismas.

40 En otro modo de realización del kit descrito anteriormente, dichas al menos dos sondas detectables comprenden las SEQ ID NO: 6 y 8; aún en otro modo de realización, el kit no contiene más sondas específicas del VHC aparte de las SEQ ID NO: 6 y 8.

45 Las sondas detectables del kit descrito anteriormente pueden hibridar con la misma hebra o con diferentes hebras de un amplicón bicatenario.

50 En algunos modos de realización del procedimiento descrito anteriormente, al menos dos sondas detectables hibridan con diferentes hebras de dicho amplicón. En otros modos de realización, al menos dos sondas detectables hibridan con la misma hebra de dicho amplicón.

55 En otro modo de realización del kit descrito anteriormente, las sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón hibridan con el amplicón con no más de 100 bases de distancia entre sí, en algunos modos de realización de 1, 5, 10, 20, 30, 40 o 50 bases, a 60, 70, 80, 90 o 100 bases de distancia entre sí. En algunos modos de realización, la distancia es de 40 a 80, o de 50 a 70 o de 55 a 60 bases, o es de 58 bases. En este contexto, "distancia" significa el número de bases del amplicón que se encuentran entre las bases del amplicón con el que hibridan las sondas detectables en caso de que hibriden con la misma hebra. Si hibridan con diferentes hebras, la distancia se calcula en consecuencia, en la que cada base de una hebra de un amplicón bicatenario tiene una base correspondiente en la otra hebra con la que forma un par de bases.

60 En un modo de realización de la invención, los cebadores del kit descrito anteriormente comprenden más de un cebador directo y/o inverso.

65 En un modo de realización de la invención, los cebadores del kit mencionado anteriormente comprenden al menos un elemento seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9 a 15. Dichos cebadores son particularmente

útiles para crear un amplicón detectable con las sondas mencionadas anteriormente. En otro modo de realización, los cebadores en el kit mencionado anteriormente son las SEQ ID NO: 9, 10 y 11.

5 Las ventajas de dicho uso y de dicho kit son análogas a las descritas *supra* de forma adicional en el contexto del procedimiento de acuerdo con la invención.

**Breve descripción de las figuras**

- 10 FIG. 1: resumen de las sondas probadas
- FIG. 2: evaluación de las sondas de las SEQ ID NO: 1 a 5 usando transcritos de ARN del VHC para el genotipo 1a del VHC y para un aislado mutante natural (Lindauer)
- 15 FIG. 3: evaluación de las sondas no solapantes de las SEQ ID NO: 3, 4, 7 y 8 usando muestras de plasma del genotipo 1a y 4a del VHC
- FIG. 4: evaluación de las sondas no solapantes de las SEQ ID NO: 3, 4, 7 y 8 usando transcrito de ARN para el genotipo 1a del VHC (consenso) y para dos aislados mutantes natural (Jody, Lindauer)
- 20 FIG. 5: evaluación final de la sonda de la SEQ ID NO: 8 frente a la mezcla maestra sin segunda sonda (RL1.1) usando transcritos de ARN del VHC para el genotipo 1a del VHC y para siete aislados mutantes naturales diferentes.
- FIG. 6: optimización de la concentración para la sonda de la SEQ ID NO: 8 (adición de un 35 %, 50 % y 65 %) frente a la mezcla maestra de referencia RL1.1 usando una muestra de GT1a y tres muestras de GT4a del VHC de
- 25 pacientes.

**Descripción detallada de las figuras**

- 30 FIG. 1: resumen esquemático de las sondas sometidas a prueba para complementar la sonda original de la SEQ ID NO: 6. Los cebadores y la sonda con las SEQ ID NO: 6, 9, 10 y 11 pertenecen a la mezcla maestra de referencia RL1.1 y están presentes en todos los experimentos.
- FIG. 2: evaluación de los títulos (cp/ml) para dos transcritos de ARN del VHC, un transcrito de control para el genotipo 1a del VHC y un transcrito con dos mutaciones naturales en la región de unión a la sonda del amplicón (Lindauer) con mezclas maestras que contienen un 10 % adicional o un 50 % adicional de la segunda sonda (respecto a la concentración de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 en RL1.1). Para la mezcla maestra de referencia RL1.1, las barras 1 y 2 y las barras 3 y 4 representan experimentos idénticos, ya que la mezcla maestra no contiene ninguna sonda adicional. Una segunda referencia es RL1.1 con concentración de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 incrementada en un 10 % y un 50 %, pero sin segunda sonda. La adición de las SEQ ID NO: 2, 3, 4 y 5 incrementa la concentración determinada para el transcrito con emparejamientos erróneos. Obsérvese que las SEQ ID NO: 1 y 1\*, 2 y 2\*, 3 y 3\* y 5 y 5\*, respectivamente, son idénticas en cuanto a su secuencia pero contienen diferentes marcadores (véase también la figura 1).
- 35
- 40
- 45 FIG. 3a: evaluación de los valores de ct de la diana para una muestra de plasma de GT1a del VHC y una de GT4a del VHC con mezclas maestras que contienen un 50 % adicional de segunda sonda (respecto a la concentración de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 en RL1.1). La mezcla maestra de referencia RL1.1 contiene solamente una sonda de la SEQ ID NO: 6. Una segunda referencia es RL1.1 con una concentración de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 incrementada en un 50 %, pero sin segunda sonda. El bajo valor de ct de la diana indica el reconocimiento temprano de la muestra; un delta de 3,3 valores de Ct indica una diferencia en el título de 10 veces. La adición de las sondas de las SEQ ID NO: 3, 4 y 7 disminuye ligeramente el rendimiento en GT1a y/o GT4a a medida que se incrementan los valores de ct. El mejor rendimiento se observa para la SEQ ID NO: 8.
- 50
- FIG. 3b: evaluación de la señal de fluorescencia en el último ciclo de PCR para una muestra de plasma de GT1a del VHC y una de GT4a del VHC con mezclas maestras que contienen un 50 % adicional de segunda sonda (respecto a la concentración de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 en RL1.1). La mezcla maestra de referencia RL1.1 contiene solamente una sonda de la SEQ ID NO: 6. Una segunda referencia es RL1.1 con una concentración de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 incrementada en un 50 %, pero sin segunda sonda. El alto índice de fluorescencia relativa (IFR) indica una amplificación eficaz y la generación de señales. La adición de las SEQ ID NO: 4 y 7 disminuye el rendimiento en GT1a y GT4a a medida que disminuyen los IFR. El mejor rendimiento se observa para la SEQ ID NO: 8.
- 55
- 60
- FIG. 4a: evaluación de los valores de ct de la diana para tres transcritos de ARN del VHC, un transcrito de control para el genotipo 1a del VHC y dos transcritos con mutaciones naturales en la región de unión a la sonda del amplicón con mezclas maestras que contienen un 50 % adicional de la segunda sonda (respecto a la concentración de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 en RL1.1). La mezcla maestra de referencia RL1.1 contiene solamente una sonda de la SEQ ID NO: 6. Una segunda referencia es RL1.1 con una concentración de la sonda estándar de la
- 65

SEQ ID NO: 6 incrementada en un 50 %, pero sin segunda sonda. El bajo valor de ct de la diana indica el reconocimiento temprano de una muestra; una diferencia de 3,3 valores de Ct indica una diferencia en el título de 10 veces. La adición de las SEQ ID NO: 3, 4 y 7 muestra un ligero incremento en el rendimiento de los transcritos mutantes a medida que disminuyen los valores de ct. El mejor rendimiento se observa para la SEQ ID NO: 8.

5  
10  
15  
FIG. 4b: evaluación de la señal de fluorescencia en el último ciclo de PCR para tres transcritos de ARN del VHC, un transcrito de control para el genotipo 1a del VHC y dos transcritos con mutaciones naturales en la región de unión a la sonda del amplicón con mezclas maestras que contienen un 50 % adicional de la segunda sonda (respecto a la concentración de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 en RL1.1). La mezcla maestra de referencia RL1.1 contiene solamente una sonda de la SEQ ID NO: 6. Una segunda referencia es RL1.1 con una concentración de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 incrementada en un 50 %, pero sin segunda sonda. El alto índice de fluorescencia relativa (IFR) indica una amplificación eficaz y la generación de señales. La adición de las SEQ ID NO: 3, 4 y 7 no muestra ninguna mejora con respecto al IFR en los transcritos mutantes. Se observa una clara mejora para la SEQ ID NO: 8.

20  
25  
30  
FIG. 5: evaluación de los títulos (cp/ml) para nueve transcritos de ARN del VHC, un transcrito de control para el genotipo 1a del VHC y transcritos con mutaciones naturales en la región de unión a la sonda del amplicón con mezclas maestras que contienen un 50 % adicional de la segunda sonda (respecto a la concentración de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 en RL1.1). La mezcla maestra de referencia RL1.1 contiene solamente una sonda de la SEQ ID NO: 6. La adición de la SEQ ID NO: 8 incrementó la concentración para todos los transcritos con emparejamientos erróneos (con emparejamientos erróneos según la sonda estándar) en comparación con la referencia RL1.1 hasta > 100 veces.

35  
40  
45  
FIG. 6a: evaluación de los valores de ct de la diana para una muestra de plasma de GT1a del VHC y tres de GT4a del VHC con mezclas maestras que contienen un 35 %, 50 % y 65 % adicional de la sonda de la SEQ ID NO: 8 (respecto a la concentración de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 en RL1.1). La mezcla maestra de referencia RL1.1 contiene solamente una sonda de la SEQ ID NO: 6. El bajo valor de ct de la diana indica el reconocimiento temprano de la muestra; un delta de 3,3 valores de Ct indica una diferencia en el título de 10 veces. Las tres concentraciones de la SEQ ID NO: 8 se comportaron de manera similar.

50  
55  
60  
FIG. 6b: evaluación de la señal de fluorescencia en el último ciclo de PCR para una muestra de plasma de GT1a del VHC y tres de GT4a del VHC con mezclas maestras que contienen un 35 %, 50 % y 65 % de la sonda de la SEQ ID NO: 8 (respecto a la concentración de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 en RL1.1). La mezcla maestra de referencia RL1.1 contiene solamente una sonda de la SEQ ID NO: 6. El alto índice de fluorescencia relativa (IFR) indica una amplificación eficaz y la generación de señales. Los mejores resultados se obtuvieron para la adición de un 50 % de la segunda sonda de la SEQ ID NO: 8.

## Ejemplos

### 40 Diseño experimental general

45  
50  
55  
60  
65  
Todos los experimentos se realizaron en condiciones experimentales equivalentes. La composición de la mezcla maestra básica que incluía la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 fue la misma en todos los experimentos y se denominó mezcla maestra RL1.1. Se complementó RL1.1 con un 50 % adicional de la sonda original de la SEQ ID NO: 6 o bien con una de las sondas adicionales (SEQ ID NO: 1-5, 7 u 8) para la evaluación de una en una, de acuerdo con la presente invención. Cada sonda se añadió y se evaluó individualmente a la misma concentración (10 % o 50 % de la sonda original de la SEQ ID NO: 6). Las diferentes segundas sondas se solaparon parcialmente o no se solaparon con la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6. Algunas de las sondas se situaron en la misma hebra que la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6, algunas se situaron en la hebra opuesta.

En todos los experimentos, se sometió a prueba la mezcla maestra RL1.1 sin una segunda sonda como referencia (control 1), así como la mezcla maestra con una concentración de la sonda original de la SEQ ID NO: 6 (control 2) incrementada en un 10 % o un 50 %. Se usaron los mismos perfiles de preparación de muestras, perfiles de ciclos térmicos y parámetros de interpretación de resultados para la evaluación de las diferentes mezclas maestras. Como muestras, se usaron muestras de GT1a y GT4a del VHC naturales y se sometieron a prueba en 10 réplicas cada una o se sometieron a prueba los transcritos de la región 5' no traducida del VHC en de 4 a 6 réplicas. Los valores medios para las réplicas y la desviación estándar se presentan en los gráficos.

En los experimentos iniciales se evaluaron las sondas de las SEQ ID NO: 1-5, usando transcritos del VHC que representaban el GT1a estándar y transcritos que representaban un aislado de emparejamiento erróneo en la región de la sonda. Las SEQ ID NO: 2, 3, 4 y 5 mostraron los mejores rendimientos iniciales. Las SEQ ID NO: 3 y 4 se evaluaron adicionalmente junto con sondas diseñadas adicionalmente de las SEQ ID NO: 7 y 8. La SEQ ID NO: 8 mostró el mejor rendimiento en todos los experimentos. Una evaluación final usando nueve transcritos diferentes que representan un transcrito de control para el genotipo 1a del VHC y transcritos con mutaciones naturales en la región de unión a la sonda del amplicón demostró que la adición de una segunda sonda incrementó significativamente el título observado hasta > 100 veces para los transcritos que portaban emparejamientos

erróneos.

### Ejemplo 1:

#### 5 Material de muestra:

Se sometieron a prueba muestras de pacientes con VHC para el subtipo 1a del VHC, que representaban las muestras estándar del VHC, y el subtipo 4a del VHC, que representaban muestras del VHC con posible variación de secuencia en la región de unión a la sonda estándar, para verificar el efecto de añadir una segunda sonda a la mezcla maestra. Se usaron transcritos de ARN del VHC que representaban la secuencia consenso de GT1a del VHC y los transcritos de la región 5' no traducida de aislados del VHC naturales en la región del amplicón para evaluar las diferentes segundas sondas.

#### 15 Extracción de ácido nucleico:

Para cada reacción se usó 1 ml de material de muestra de plasma del paciente para la extracción de ácido nucleico. Si se usaron transcritos, se añadieron aproximadamente 500 cp/ml (para los experimentos mostrados en las figuras 2, 3a y 3b) o aproximadamente 50 000 cp/ml (para los experimentos mostrados en las figuras 4a, 4b y 5) a un tampón que contenía tiocianato de guanidinio para inactivar las RNasas y después se procesó 1 ml de la misma manera que una muestra normal. En cada uno de los experimentos se sometió a prueba un número de 5 a 10 réplicas de las muestras de los pacientes y de 4 a 6 réplicas de las muestras de transcritos.

Los procedimientos de extracción de ácido nucleico son punteros y son conocidos por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2.º 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 forma alternativa, se pueden usar kits de extracción de ácido nucleico disponibles comercialmente, a saber, 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 en este documento, 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 de vidrio magnéticas, un reactivo de lisis, un reactivo de proteasa, un tampón de elución y un reactivo de lavado. Se añadió ARN de patrón de cuantificación a las muestras antes de la extracción de ácido nucleico. Las partículas del VHC blindadas y las partículas blindadas de ARN de patrón de cuantificación se lisan por incubación con una proteasa y un tampón caotrópico de unión/lisis que libera los ácidos nucleicos y protege al ARN del VHC liberado de las RNasas en suero o plasma. Posteriormente, el ARN del VHC y el ARN de 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.

#### 40 Mezcla de reacción de PCR:

Las mezclas maestras evaluadas consistieron en la mezcla maestra de referencia RL1.1 que se suplementó con las diferentes sondas. Se preparó la mezcla maestra de referencia RL1.1 en un lote grande. Para cada experimento, se complementó esta mezcla maestra con un 10 % o un 50 % adicional de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 o con un 10 % o un 50 % adicional de las segundas sondas individuales para evaluarlas como se especifica en las figuras 2-6.

50 Composición de la mezcla maestra RL1.1:

Producto químico	Concentración
Tricina	157 mM
Acetato de potasio	314 mM
DMSO	15,8 %
Azida 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 de la SEQ ID NO: 9	2,14 µM

Cebador inverso de la SEQ ID NO: 10	1,07 µM
Cebador inverso de la SEQ ID NO: 11	1,07 µM
Sonda diana de la SEQ ID NO: 6	428 nM
Segunda sonda de las SEQ ID NO: 1-5, 7 u 8*	43 nM (10 %) o 214 nM (50 %)
Sonda de QS de la SEQ ID NO: 16	428 nM
Polimerasa ZO5	2280 KU/l
UNG	114 KU/l
Aptámero §	860 nM
pH	7,8

\* Segunda sonda diferente en cada experimento; diferentes concentraciones en experimentos para obtener los datos de la fig. 6.

- 5 § Los aptámeros son oligonucleótidos de ADN o ARN monocatenario cortos (25-70 bases), que se unen a una molécula específica (es decir, proteína, ZO5) a través de su estructura 3D (véase, por ejemplo, C. Tuerk y L. Gold: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, Science, volumen 249, 1990, p. 505-510).
- 10 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:

- 15 Se aplicaron las siguientes etapas de ciclos térmicos:

Duración	Temperatura	Repeticiones
5 min	50 °C	1
30 min	66 °C	1
15 s	95 °C	52
25 s	58 °C	52
2 min	40 °C	1

#### Análisis de los datos:

- 20 Se promediaron los títulos, valores de ct o índices de fluorescencia relativa (IFR) para las réplicas de una muestra, obtenidas como resultados del cobas® TaqMan®, y se representaron los valores medios con desviación estándar como gráficos de barras como se muestra en las figuras 2-5. El efecto positivo de una sonda se evaluó mediante i) el incremento del título frente a la mezcla maestra de referencia o ii) la disminución en el valor de ct junto con el incremento del IFR frente a la mezcla maestra de referencia.

- 25 **Ejemplo 2:**
- Los experimentos presentados en este documento también se pueden llevar a cabo como sigue: La prueba de VHC cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan® disponible comercialmente (fabricada por Roche) se usa para extraer el ARN del VHC del paciente y las muestras de transcrito. La preparación de las muestras se automatiza usando el instrumento cobas® AmpliPrep y la amplificación/detección se automatiza usando 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.

- 40 Los reactivos para la preparación de muestras consisten en una suspensión de partículas de vidrio magnéticas, 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 por incubación con una proteasa y un tampón caotrópico de unión/lisis que libera los ácidos nucleicos y protege al ARN del VHC liberado de las RNAsas



en suero o plasma. Posteriormente, el ARN del VHC y el ARN de patrón de cuantificación se unen a partículas de vidrio magnéticas. 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 en este documento, la mezcla maestra para la prueba del VHC cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan® se sustituye por una mezcla maestra de acuerdo con la tabla mostrada a continuación y además añadiendo diferentes segundas sondas de acuerdo con la información dada a continuación. La bandeja de reactivos con la mezcla maestra modificada se usa 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 se comparten por la diana del VHC y el control interno/patrón de cuantificación. Los cebadores y las sondas diana se sitúan en una parte altamente conservada de la región 5' no traducida del genoma del VHC. La detección de la diana del VHC y del patrón de cuantificación se realiza usando una sonda oligonucleotídica doblemente marcada específica de la diana y una específica del patrón de cuantificación, lo que permite la identificación independiente del amplicón de la diana del VHC y del amplicón del patrón de cuantificación del VHC. El patrón de cuantificación del VHC se añade automáticamente a cada muestra en un número de copias conocido mediante el cobas® AmpliPrep y se llevan a cabo las etapas completas de preparación de muestras, transcripción inversa, amplificación y detección junto con la diana del VHC. El patrón de cuantificación debe dar una señal positiva en muestras negativas y positivas para la diana del VHC a fin de posibilitar la determinación de los títulos. En reacciones parcialmente suprimidas o inhibidas, el patrón de cuantificación se ve afectado de manera similar que la diana y, por tanto, permite la correcta determinación de los títulos. Por último, el patrón de cuantificación realiza un seguimiento de las reacciones negativas de la diana del VHC frente a los efectos inhibidores, pero, debido a su concentración bastante alta, este seguimiento no es riguroso.

Composición de la mezcla maestra RL1.1:

Producto químico	Concentración
Tricina	157 mM
Acetato de potasio	314 mM
DMSO	15,8 %
Azida 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 de la SEQ ID NO: 9	2,14 µM
Cebador inverso de la SEQ ID NO: 10	1,07 µM
Cebador inverso de la SEQ ID NO: 11	1,07 µM
Sonda diana de la SEQ ID NO: 6	428 nM
Segunda sonda de las SEQ ID NO: 1-5, 7 u 8*	43 nM (10 %) o 214 nM (50 %)
Sonda de QS de la SEQ ID NO: 16	428 nM
Polimerasa ZO5	2280 KU/l
UNG	114 KU/l
Aptámero	860 nM
pH	7,8

\* Segunda sonda diferente en cada experimento; diferentes concentraciones en experimentos para obtener los datos de la fig. 6.

§ Los aptámeros son oligonucleótidos de ADN o ARN monocatenario cortos (25–70 bases), que se unen a una molécula específica (es decir, proteína, ZO5) a través de su estructura 3D (véase, por ejemplo, C. Tuerk y L. Gold: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, Science, volumen 249, 1990, p. 505-510).

La mezcla maestra de referencia RL1.1 sin una segunda sonda se prepara en un lote grande. Para cada experimento, esta mezcla maestra de referencia se complementa con las sondas adicionales como se muestra en las figuras. Estas variaciones de mezcla maestra complementada se rellenan en bandejas de reactivos y se cargan

en el cobas® AmpliPrep.

**Análisis de los datos:**

5 Se promedian los títulos, valores de ct o índices de fluorescencia relativa (IFR) para las réplicas de una muestra, obtenidas como resultados del cobas® TaqMan® y se representan los valores medios con desviación estándar como gráficos de barras como se muestra en las figuras 2-5. El efecto positivo de una sonda se evalúa mediante i) el incremento del título frente a la mezcla maestra de referencia o ii) la disminución en el valor de ct junto con el incremento del IFR frente a la mezcla maestra de referencia.

10

**Resultados:**

15 1. La SEQ ID NO: 8 logró los mejores resultados. En una evaluación que usa nueve transcritos diferentes, un transcrito de referencia para GT1a y ocho transcritos con mutaciones en la región de unión a la sonda de la SEQ ID NO: 6, se observó un incremento del título para cada transcrito mutante de hasta 100 veces. La sonda de la SEQ ID NO: 8 no se solapa con la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 y se sitúa en la hebra opuesta.

20 2. Un experimento de optimización de la concentración para la adición de la SEQ ID NO: 8 mostró los mejores resultados en términos de bajos valores de ct y altos valores de IFR para una adición de un 50 % de la segunda sonda respecto a la concentración de la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 en RL1.1.

25 3. Las SEQ ID NO: 2, 3, 4 y 5 mostraron resultados iniciales prometedores. Por lo tanto, se puede obtener un incremento en el título de un transcrito mutante añadiendo segundas sondas que sean parcialmente solapantes, sondas que están muy próximas a la sonda estándar en la misma hebra o en la hebra opuesta o sondas no solapantes en la misma hebra o en la hebra opuesta:

- La SEQ ID NO: 2 se solapa con la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 y se sitúa en la hebra opuesta.
- 30 - La SEQ ID NO: 3 se sitúa en la misma hebra que la SEQ ID NO: 6 con una separación de una base con respecto a la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6.
- Las SEQ ID NO: 4, 7 y 8 no se solapan con la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 y se sitúan en la hebra opuesta.
- 35 - La SEQ ID NO: 5 es análoga a la sonda estándar de la SEQ ID NO: 6 pero porta mutaciones que no se cubren por la SEQ ID NO: 6.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110> F. Hoffmann-La Roche	
5	<120> Ensayo de doble sonda para la detección de poblaciones heterogéneas de amplicón	
	<130> 30908 EP	
	<160> 16	
10	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 35	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador/sonda	
20	<400> 1	
	<b>cggtgagtac accggaattg ccaggacgac cgggt</b>	<b>35</b>
	<210> 2	
25	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> cebador/sonda	
	<400> 2	
	<b>cggtgagtac accggaatcg ccgggatgac cgggt</b>	<b>35</b>
35	<210> 3	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador/sonda	
	<400> 3	
45	<b>ccgggagggg gggtcctgga ggctg</b>	<b>25</b>
	<210> 4	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> cebador/sonda	
	<400> 4	
55	<b>ctagccgagt agtgttgggt cgcgaaaggc c</b>	<b>31</b>
	<210> 5	
	<211> 38	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador/sonda	
65	<400> 5	

	<b>cggtgtactc accggttccg aagaccacta tggctctc</b>	<b>38</b>
	<210> 6 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5		
	<220> <223> cebador/sonda	
10		
	<400> 6 <b>cggtgtactc accggttccg agaccactat ggctct</b>	<b>36</b>
	<210> 7 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15		
	<220> <223> cebador/sonda	
20		
	<400> 7 <b>atttgggcgt gccccgcaa gactgctagc cgagtag</b>	<b>37</b>
25		
	<210> 8 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30		
	<220> <223> cebador/sonda	
	<400> 8 <b>gggcgtgccc ccgcaagact gctagccgag tag</b>	<b>33</b>
35		
	<210> 9 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40		
	<220> <223> cebador/sonda	
	<400> 9 <b>aaaagcagaa agcgtctagc catggcgta</b>	<b>30</b>
45		
	<210> 10 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50		
	<220> <223> cebador/sonda	
55		
	<400> 10 <b>aaaagcaagc accctatcag gcagtaccac aa</b>	<b>32</b>
	<210> 11 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60		
	<220> <223> cebador/sonda	

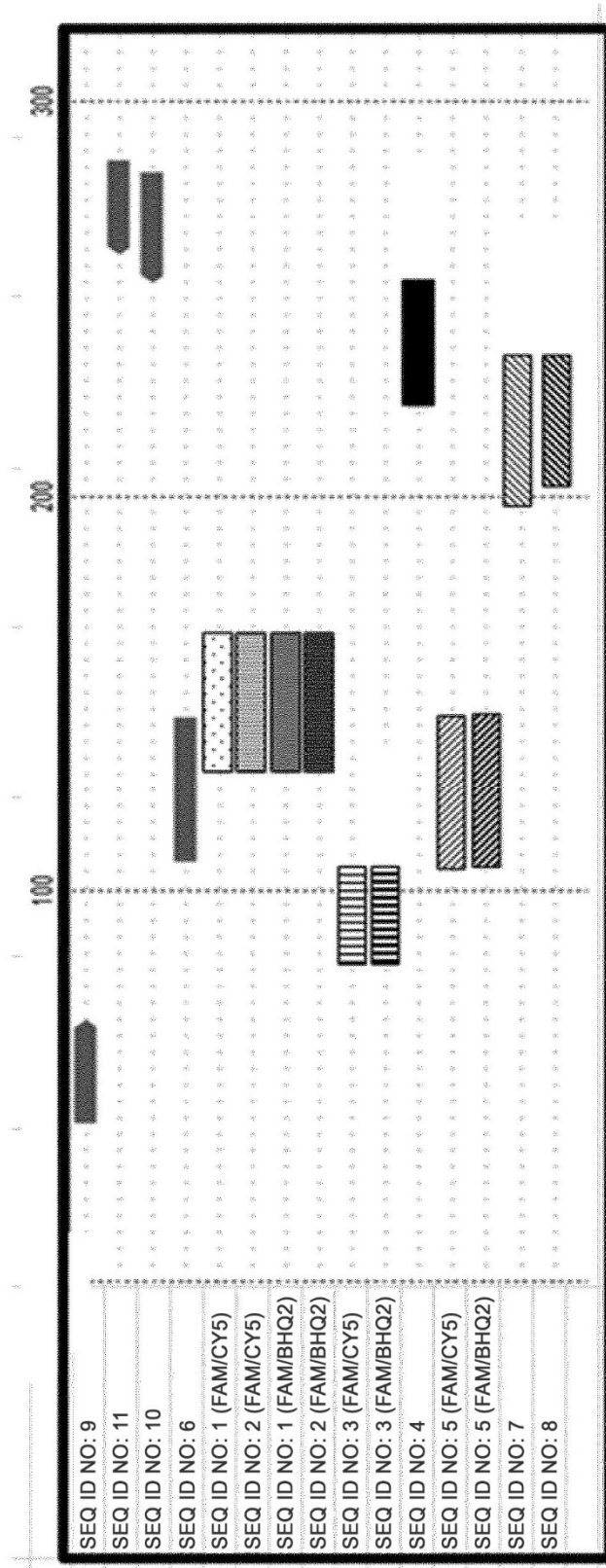
	<400> 11		
	<b>ctcgcaagca ccctatcagg cagt</b>		<b>24</b>
5	<210> 12		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
10	<220>		
	<223> cebador/sonda		
	<400> 12		
	<b>aaaccactc tatgtccggt c</b>		<b>21</b>
15	<210> 13		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> cebador/sonda		
	<400> 13		
25	<b>gtacgccgga attgccgga a</b>		<b>21</b>
	<210> 14		
	<211> 21		
	<212> ADN		
30	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador/sonda		
35	<400> 14		
	<b>tggcgtctcc cacgccgctg g</b>		<b>21</b>
	<210> 15		
	<211> 21		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador/sonda		
45	<400> 15		
	<b>ctttccccag gacctgccg t</b>		<b>21</b>
	<210> 16		
50	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
55	<223> cebador/sonda		
	<400> 16		
	<b>tggactcagt ccttggtcat ctcaccttct</b>		<b>30</b>
60			

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para amplificar y detectar un ácido nucleico diana que puede estar presente en una muestra, comprendiendo dicho ácido nucleico diana subgrupos con variaciones de secuencia y/o mutaciones individuales, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
  - a) poner en contacto los ácidos nucleicos de dicha muestra con reactivos de amplificación que comprenden una polimerasa, monómeros de nucleótidos, cebadores para generar un amplicón y al menos dos sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón, en el que las sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón portan el mismo marcador;
  - 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;
  - c) detectar la presencia o ausencia de dicho amplicón detectando la hibridación de dichas sondas detectables con dichas porciones de secuencia diferentes de dicho amplicón, en el que las señales que se originan de las sondas individuales no se distinguen;

y comprendiendo además la etapa de determinar la cantidad del ácido nucleico diana que comprende subgrupos con variaciones de secuencia y/o mutaciones individuales después de y/o durante la etapa c), en el que la presencia de dicho amplicón es indicativa de la presencia de dicho ácido nucleico diana que comprende subgrupos con variaciones de secuencia y/o mutaciones individuales en dicha muestra.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichas sondas detectables no se solapan.
3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se añade un ácido nucleico de control a la muestra y/o a los ácidos nucleicos purificados en cualquiera de las etapas.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón son sondas de 5'-nucleasa o pares HybProbe.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón hibridan con la misma hebra o con diferentes hebras de dicho amplicón.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón hibridan con el amplicón con una distancia de no más de 100 bases entre sí.
7. Uso de al menos dos sondas de ácido nucleico detectables para amplificar y detectar un ácido nucleico diana que puede estar presente en una muestra, comprendiendo dicho ácido nucleico diana subgrupos con variaciones de secuencia y/o mutaciones individuales, en el que dichas sondas de ácido nucleico detectables son específicas para diferentes porciones de secuencia del mismo amplicón y portan el mismo marcador y las señales que se originan de las sondas individuales no se distinguen.
8. Un kit para amplificar y detectar un ácido nucleico diana que puede estar presente en una muestra, comprendiendo dicho ácido nucleico diana subgrupos con variaciones de secuencia y/o mutaciones individuales, comprendiendo dicho kit reactivos de amplificación que comprenden una polimerasa, monómeros de nucleótidos, cebadores para generar un amplicón y al menos dos sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón, en el que las sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón son sondas de 5'-nucleasa y portan el mismo marcador.
9. El kit de la reivindicación 8, en el que dicho kit comprende además un soporte sólido y reactivos para unir ácidos nucleicos de dicha muestra a dicho soporte sólido.
10. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en el que las sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón hibridan con la misma hebra o con diferentes hebras de dicho amplicón.
11. El kit de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que las sondas detectables específicas para diferentes porciones de secuencia de dicho amplicón hibridan con el amplicón con una distancia de no más de 100 bases entre sí.

**Figura 1**



**Figura 2**

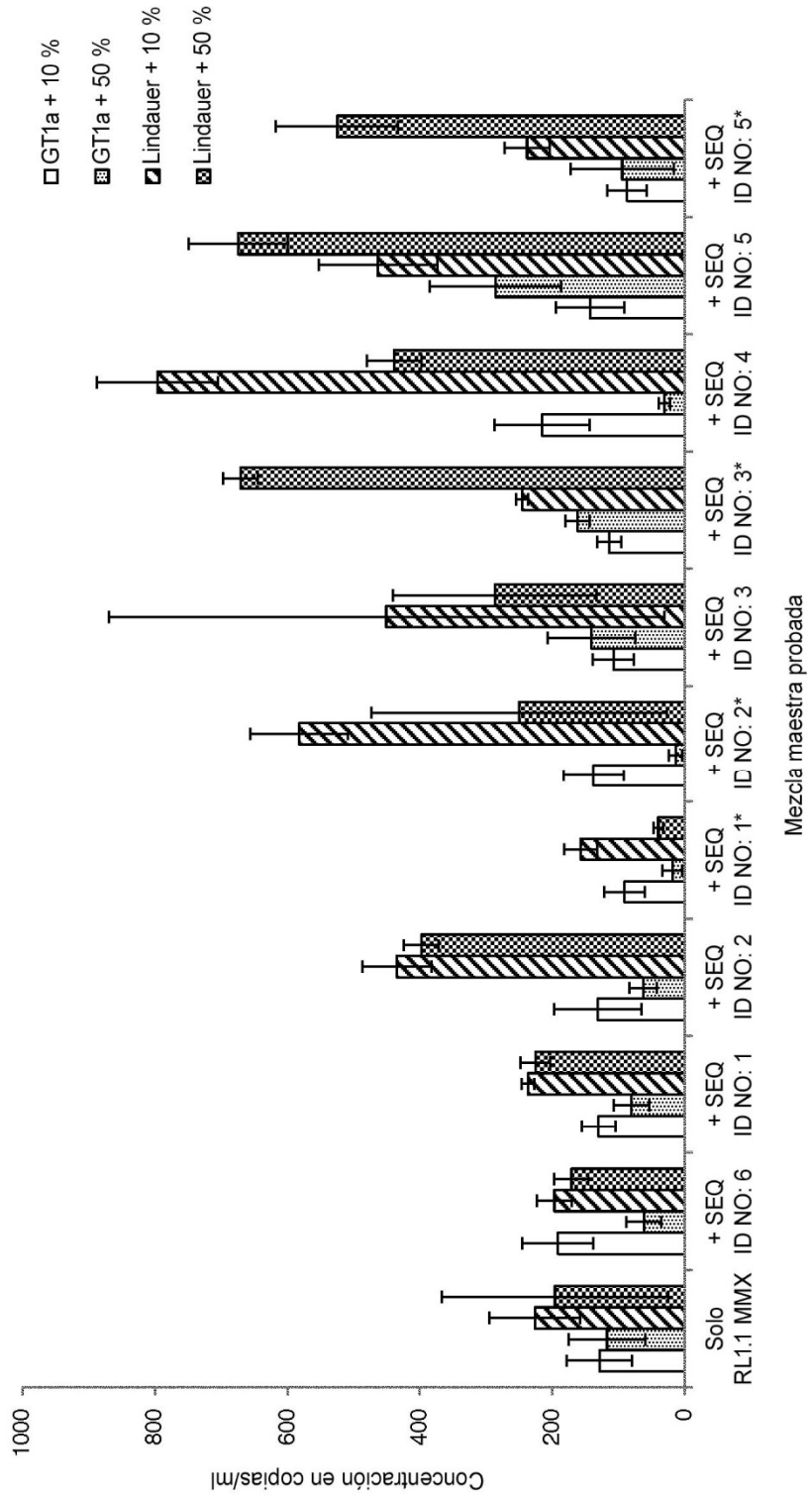




Figura 3a

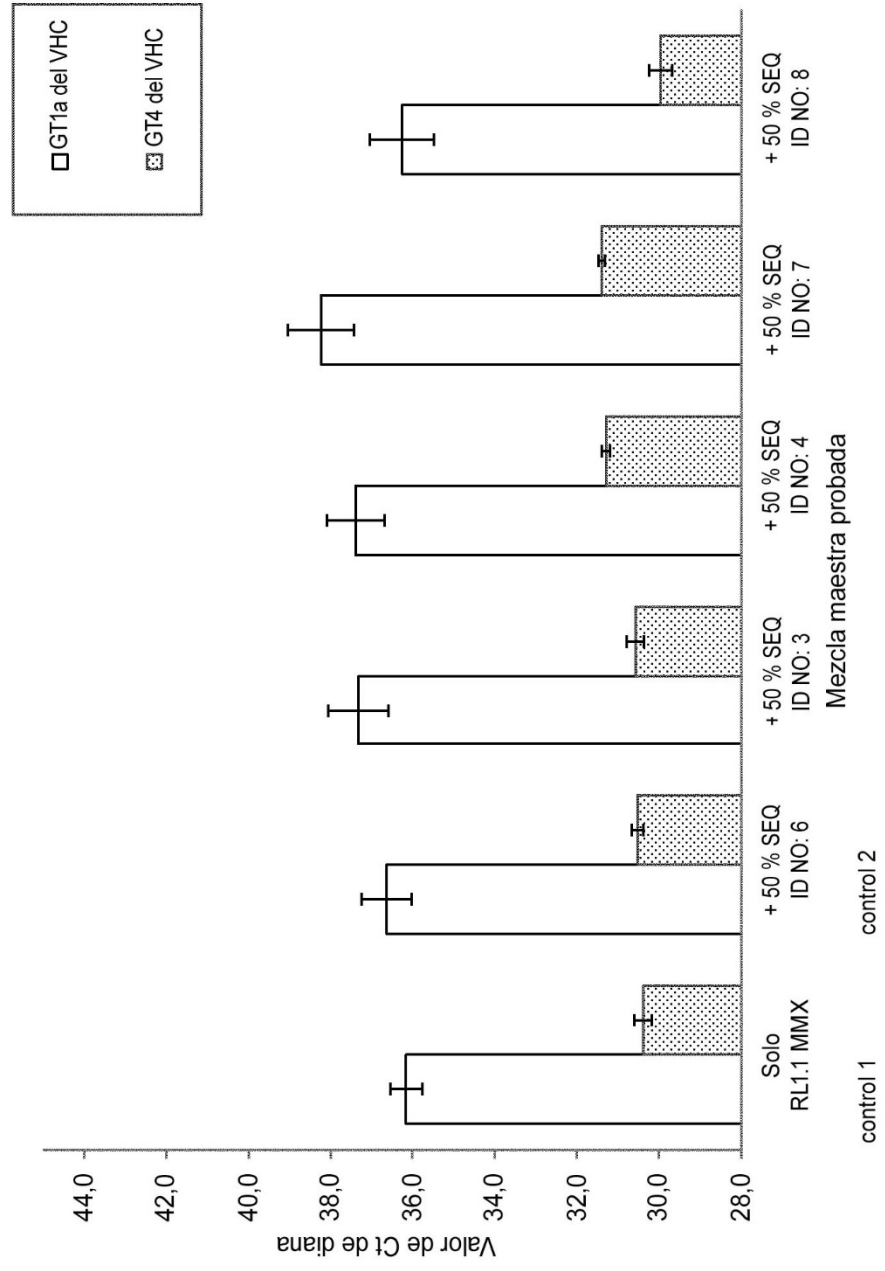
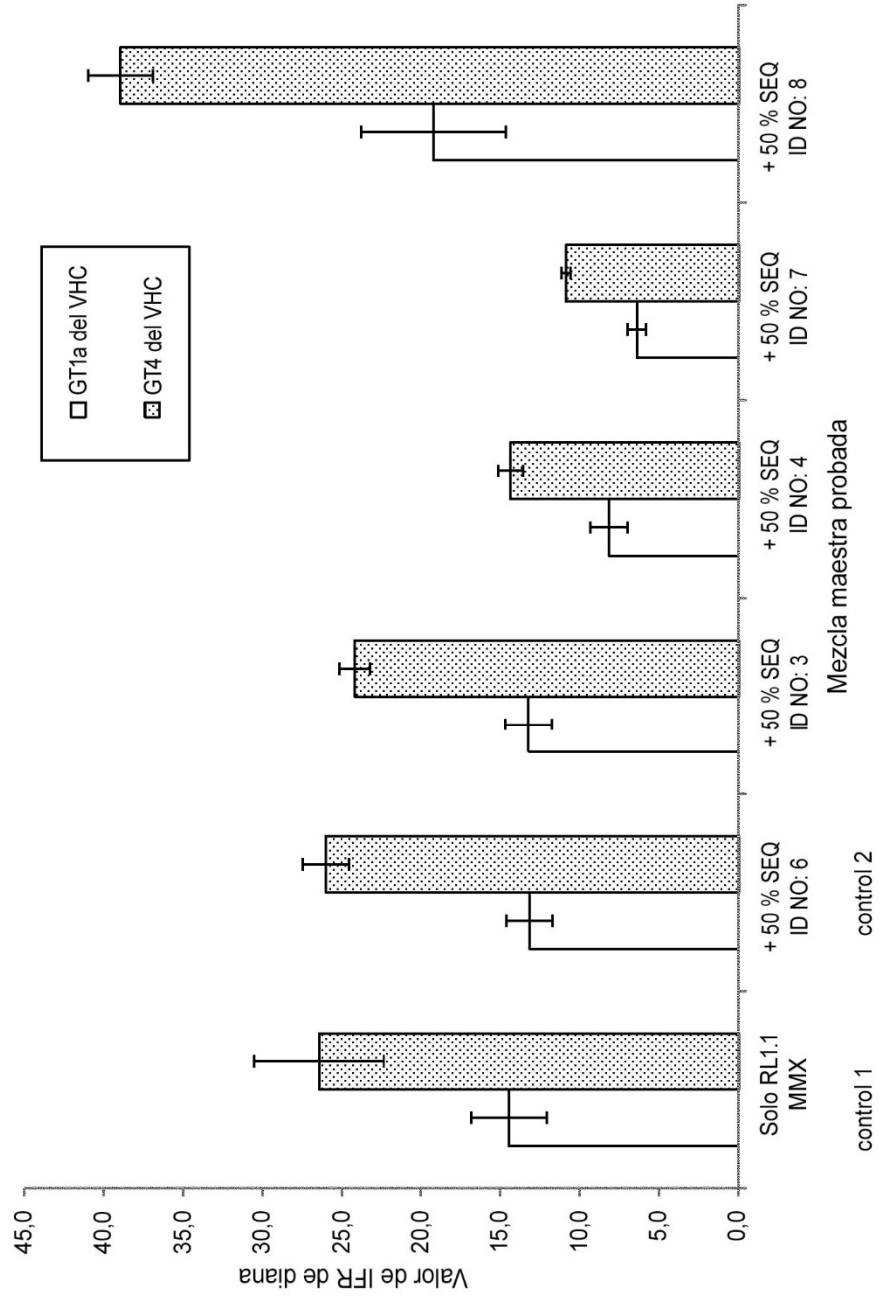
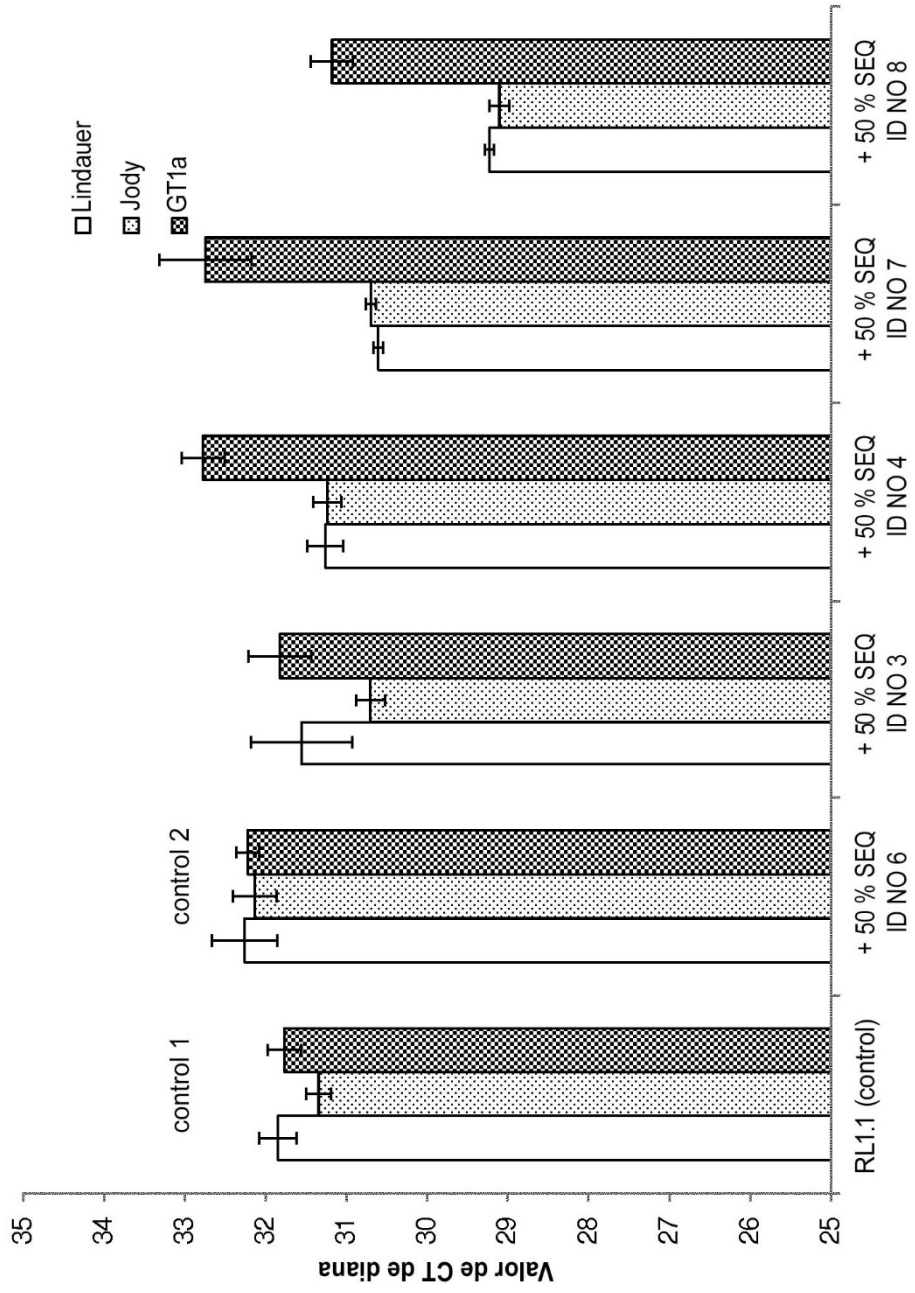


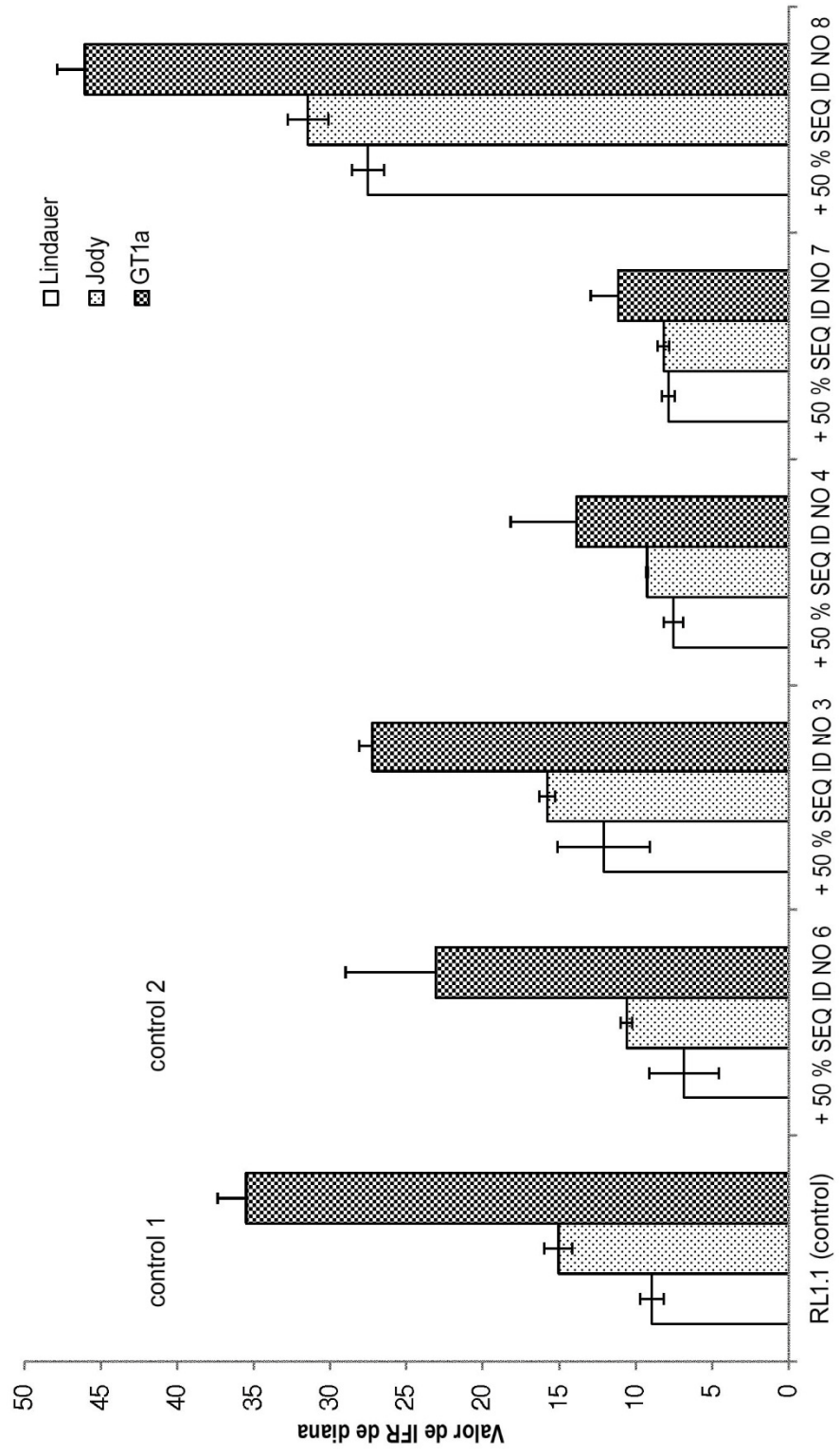
Figura 3b



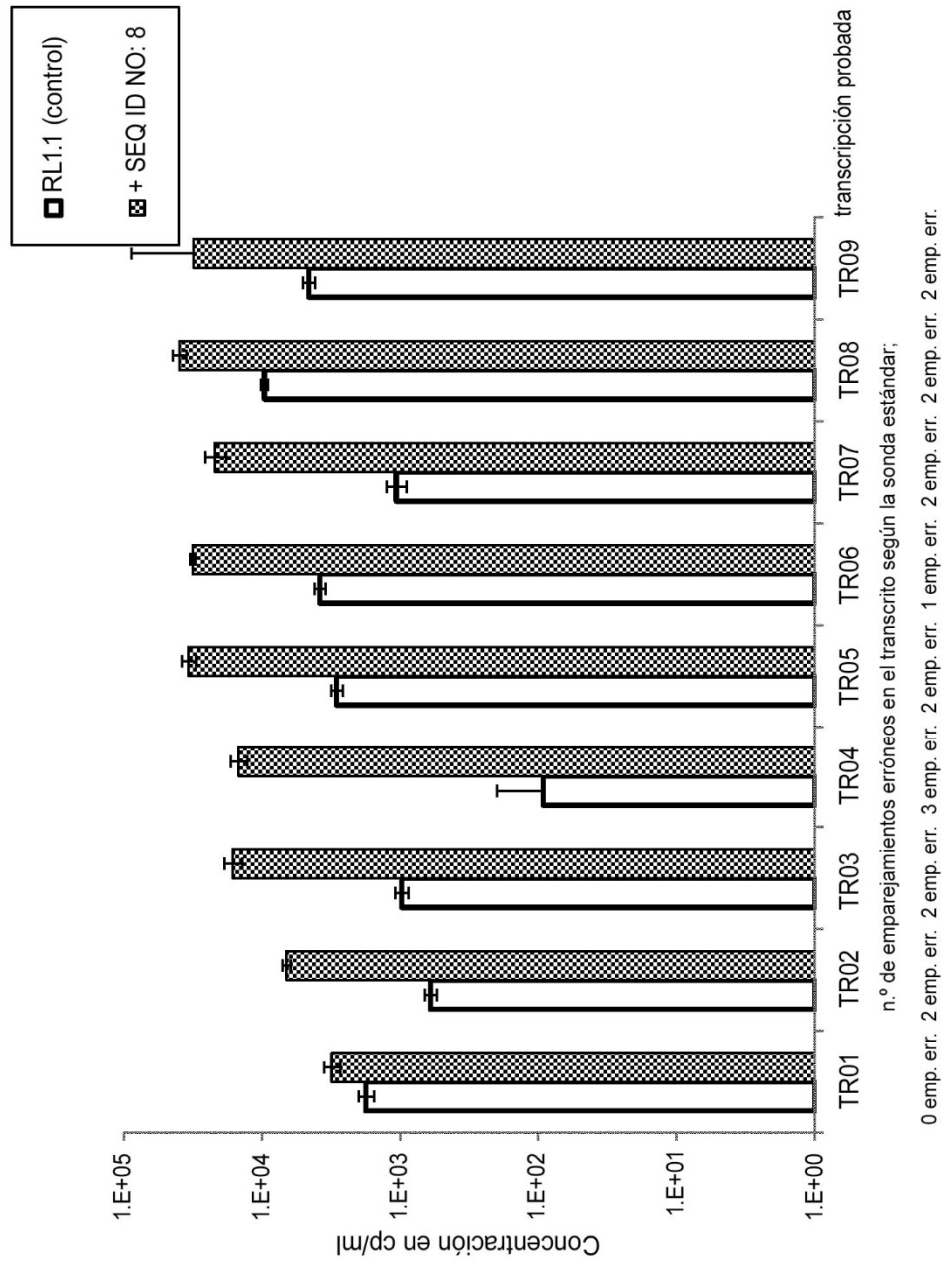
**Figura 4a**



**Figura 4b**



**Figura 5**



**Figura 6a**

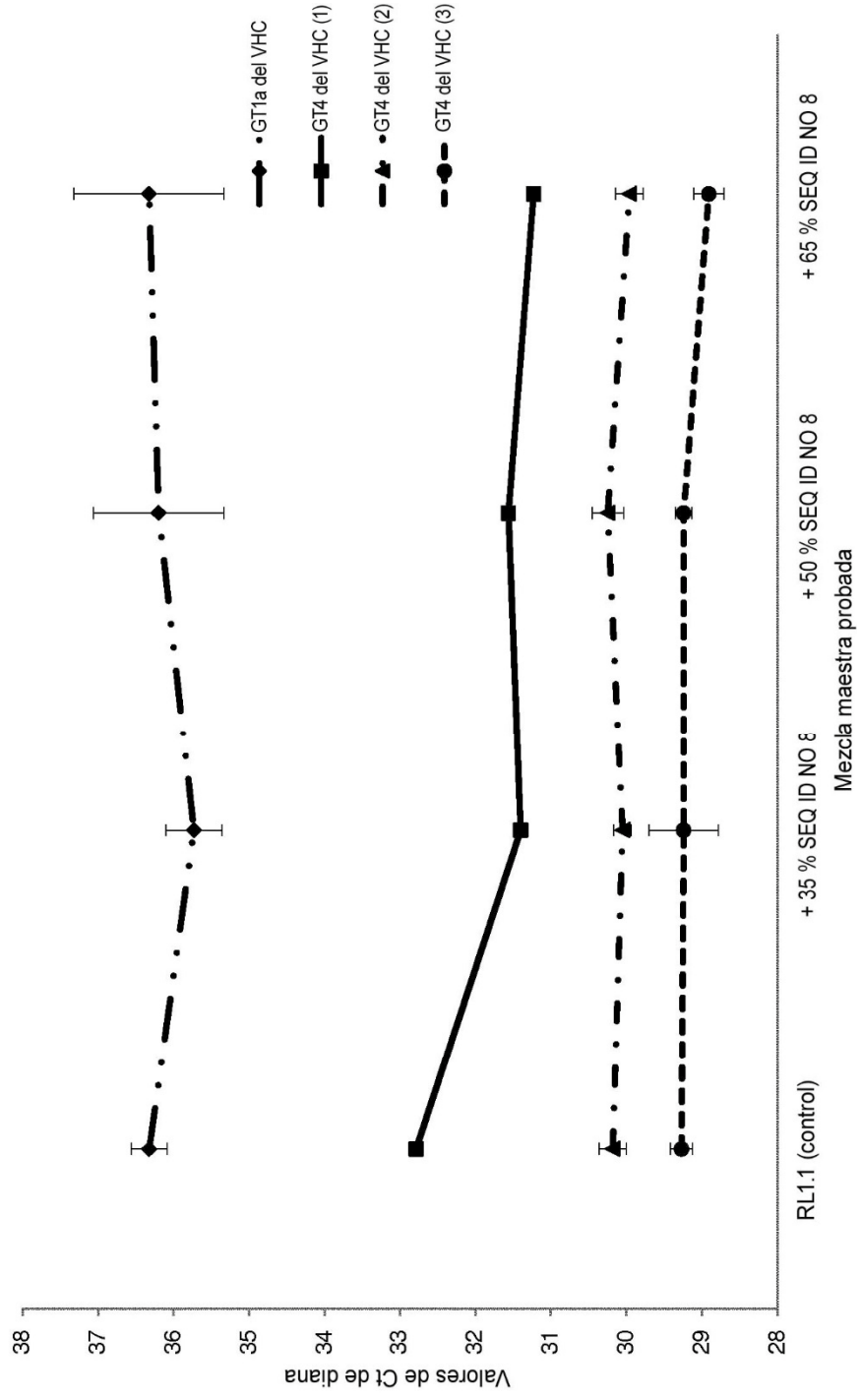


Figura 6b

