

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 279**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.04.2015 PCT/IB2015/052578**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2015 WO15155723**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.04.2015 E 15727065 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3129499**

54 Título: **Controles universales para ensayos de secuenciación**

30 Prioridad:

**10.04.2014 GB 201406485**

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

**13.11.2018**

73 Titular/es:

**VELA OPERATIONS SINGAPORE PTE. LTD.  
(100.0%)  
50 Science Park Road, No. 05-07 The Kendall  
117406 Singapore, SG**

72 Inventor/es:

**LEE, CHARLIE WAH HENG y  
ARIYARATNE, PRAMILA NUWANTHA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 689 279 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

Controles universales para ensayos de secuenciación.

### 5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a controles universales para ensayos de secuenciación, que pueden servir como controles positivo y negativo y como control de extracción, respectivamente. La presente solicitud describe los plásmidos correspondientes, kits, sus utilidades y un método de detección de un ácido nucleico específico que utiliza los controles de la presente invención.

### **Antecedentes de la invención**

La utilización de secuenciación de ácidos nucleicos se ha convertido en una herramienta esencial en muchas áreas diagnósticas en la medicina normal. Un ejemplo de dicha área es la oncología, en la que se utiliza la secuenciación de ácidos nucleicos para identificar si, por ejemplo, las mutaciones oncogénicas se encuentran presentes en un gen o si se encuentran presentes translocaciones inductoras y/o indicadoras de cáncer. Además, la secuenciación de ácidos nucleicos se utiliza para detectar si un microorganismo patógeno (tal como, por ejemplo, una bacteria o un virus) se encuentra presente en una muestra clínica, tal como, por ejemplo, una muestra de tejido o una muestra de sangre de un paciente humano. En el último método, se detectan las secuencias de ácidos nucleicos, las cuales no se encuentran en un sujeto humano sino únicamente en el microorganismo.

Típicamente, la etapa de secuenciación misma viene precedida por una reacción de amplificación para amplificar el ácido nucleico que debe secuenciarse. Dicha reacción de amplificación habitualmente se lleva a cabo mediante una reacción de PCR; de esta manera, se utilizan cebadores específicos en la reacción de PCR, que se hibridan con secuencias cadena arriba y cadena abajo de la secuencia que debe amplificarse (es decir, los cebadores flanquean la secuencia que debe amplificarse).

Debido a los avances de las últimas décadas, se han automatizado muchas etapas de los métodos diagnósticos. Un ejemplo de dicha etapa es la extracción de los ácidos nucleicos a partir de una muestra clínica. De esta manera, ahora resulta posible proporcionar una muestra clínica más o menos en un estado "tal como se ha extraído" de un paciente y llevar a cabo, entre otras, la etapa de extracción de una manera totalmente automatizada. La patente EP 2 465 945 da a conocer la utilización de plásmidos de control en reacciones de amplificación. Según lo anteriormente expuesto, un ensayo diagnóstico típico puede dirigirse a responder a la pregunta de si se encuentra presente un patógeno específico en una muestra clínica de un sujeto humano, por ejemplo una muestra derivada del tracto respiratorio. Con este objetivo, se obtiene una muestra clínica del sujeto humano (tal como, por ejemplo, de esputo), en el que se lleva a cabo esta etapa bajo condiciones tan estériles como resulte posible. A continuación, la muestra se transfiere a un vial de reacción, que típicamente es parte de un sistema multivial, tal como, por ejemplo, un anillo de muestras de 36 viales. Evidentemente también pueden analizarse en paralelo muestras clínicas adicionales de otros pacientes. Los ácidos nucleicos de estas muestras seguidamente se extraen, entre otros, de una manera automatizada. En la etapa automática siguiente, se llevan a cabo reacciones de PCR en los viales, en los que se utilizan cebadores específicos, resultando en la amplificación de una secuencia diana, que sólo se encuentra en el patógeno y es característica del patógeno específico que debe detectarse. En la etapa siguiente, el ácido nucleico amplificado se secuencia con el fin de identificar la secuencia diana.

El ensayo puede resultar en ella en que se identifique la secuencia diana, lo que indicaría la presencia del patógeno en la muestra clínica, o en que no se detecta la secuencia diana, lo que indicaría la ausencia del patógeno en la muestra clínica.

Sin embargo, no puede excluirse en un ensayo tal como se ha indicado anteriormente que determinadas etapas del ensayo se han llevado a cabo de manera incorrecta.

Un ejemplo típico de un ensayo llevado a cabo incorrectamente es que la secuencia diana no se detecta debido a que no se ha llevado a cabo correctamente la etapa de extracción. De esta manera, el patógeno efectivamente podría encontrarse presente en la muestra aunque el resultado sea negativo (un resultado "falso negativo"). Con el fin de excluir una etapa de extracción incorrecta, típicamente se lleva a cabo un control de extracción; el control de extracción habitualmente corresponde a un ácido nucleico con una secuencia que difiere de la secuencia que debe detectarse. Dicho ácido nucleico típicamente se añade a la muestra antes de iniciar la etapa de extracción automatizada (habitualmente mediante la adición del ácido nucleico al tampón de lisis utilizado durante la extracción). Debido a que la secuencia de dicho ácido nucleico difiere de la secuencia que debe detectarse, se utiliza una segunda pareja de cebadores durante la reacción de amplificación con el fin de amplificar la secuencia del control de extracción. La presencia de la secuencia del control de extracción tras completar el ensayo indica que la etapa de extracción efectivamente se ha llevado a cabo correctamente.

De esta manera, se requiere una pareja adicional de cebadores para el control de extracción, comportando el riesgo de reactividad cruzada con los cebadores utilizados para la amplificación de la diana e incrementando el coste.

- 5 Debe garantizarse además que la reacción de PCR para amplificar la secuencia diana funciona bajo las condiciones aplicadas. Con este fin, se aplica un control positivo; el control positivo habitualmente consiste en un plásmido que porta exactamente la secuencia vírica que debe amplificarse, incluyendo las regiones flanqueantes de dicha secuencia, las cuales son idénticas a las secuencias con las que se hibridan los cebadores utilizados para las reacciones de amplificación de la muestra. En el caso de que la secuencia pueda detectarse en dicho control positivo utilizando los reactivos y condiciones utilizados para las muestras, la reacción de amplificación efectivamente ha funcionado correctamente. Con el fin de garantizar que, sin embargo, no se ha producido contaminación de todas las muestras con el control positivo o con el patógeno, debe llevarse a cabo un control negativo.
- 10
- 15 Típicamente se lleva a cabo una reacción de control negativo en un vial separado, en el que sólo se añade tampón a este vial específico en lugar de una muestra. La presencia de la secuencia diana en el control negativo indica que las muestras han sido contaminadas.

De esta manera, necesita llevarse a cabo a modo de control negativo una reacción de control adicional que requiere material y espacio.

20

En resumen de lo anterior, los controles tal como se utilizan actualmente en un ensayo de detección requieren espacio y material adicionales e incrementan la posibilidad de reactividad cruzada. De esta manera, existe la necesidad de mejorar los controles experimentales utilizados en los ensayos de secuenciación diagnósticos.

25

### Objetivos y sumario de la invención

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención proporciona un nuevo método de detección de la presencia de un ácido nucleico que comprende una secuencia diana en una muestra, un plásmido, la utilización de dicho plásmido y un kit para la detección de un ácido nucleico que comprende una secuencia diana en una muestra.

30

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* de detección de la presencia de un ácido nucleico que comprende una secuencia diana (T) en una muestra, en el que dicho método comprende las etapas a continuación:

35

- a) proporcionar una muestra que potencialmente comprende un ácido nucleico que comprende T, en la que T está flanqueada por una secuencia que hibrida con un cebador directo (FOR) y una secuencia que hibrida con un cebador inverso (REV);
- 40 b) transferir dicha muestra a un vial V1;
- c) proporcionar un plásmido que comprende una secuencia de control 1 (S1), en la que S1 está flanqueada por una secuencia que hibrida con FOR y una secuencia que hibrida con REV, en la que T y S1 no son idénticos.
- 45 d) transferir dicho plásmido de la etapa c) a un vial V2;
- e) proporcionar un plásmido que comprende una secuencia de control 2 (S2), en la que S2 está flanqueada por una secuencia que hibrida con FOR y una secuencia que hibrida con REV, en la que T, S1 y S2 no son idénticos;
- 50 f) transferir dicho plásmido de la etapa e) al interior de dichos viales;
- 55 g) extraer los ácidos nucleicos dentro de dichos viales;
- h) llevar a cabo reacciones de PCR en dichos viales utilizando los cebadores FOR y REV;
- i) secuenciar los ácidos nucleicos amplificados en dichos viales,
- 60

en el que la presencia de T en el vial V1 indica la presencia de dicho ácido nucleico que comprende T en dicha muestra en el caso de que la secuenciación en el vial V2 haya resultado en la presencia de S1 y S2 y en el caso de que la secuenciación en el vial V1 haya resultado en la presencia de T y S2.

Debe apreciarse que los resultados anteriores de secuenciación se proporcionan de una manera exclusiva, es decir, no se identifican secuencia adicionales; de acuerdo con ello, el párrafo anterior también puede formularse

65

- del modo siguiente: en donde la presencia de T en el vial V1 indica la presencia de dicho ácido nucleico que comprende T en dicha muestra en el caso de que la secuenciación en el vial V2 haya resultado únicamente en la presencia de dos secuencias: S1 y S2 y en el caso de que la secuenciación en el vial V1 haya resultado únicamente en la presencia de dos secuencias: T y S2. En el caso de que se detecten varias secuencias diana en el ácido nucleico, la secuenciación en el vial V1 debería resultar en la presencia de dichas secuencias diana y S2.
- En una forma de realización preferida, dicha muestra es una muestra clínica, en la que dicha muestra clínica preferentemente es de un sujeto humano. Puede resultar preferente que dicha muestra clínica sea una muestra de tejido o una muestra de líquido corporal. Dicha muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de tejido obtenida del tracto respiratorio, el tracto gastrointestinal o de un trasplante después de la operación de trasplante. Además, dicha muestra puede ser en particular una muestra de líquido corporal seleccionada del grupo que consiste en sangre, plasma, suero, líquido linfático y saliva.
- En otra forma de realización preferida, dicho ácido nucleico que comprende T es un ácido nucleico de un microorganismo. Preferentemente, dicho microorganismo se selecciona del grupo que consiste en bacterias, arqueas, protozoos, hongos y virus. En una forma de realización particularmente preferida, dicho microorganismo es una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus* de grupo A, elementos del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canetti* y *Mycobacterium microti*, *Salmonella enterica* spp., *Clostridium difficile*, enterococcus resistente a Vancomicina y *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina. En otra forma de realización particularmente preferida, dicho microorganismo es un virus seleccionado del grupo que consiste en adenovirus, virus de la influenza aviar A (H7N9), coronavirus del síndrome respiratorio del Oriente Medio, norovirus, virus BK, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus de herpes simplex 1, virus de herpes simplex 2, virus varicela-zóster, enterovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en particular VIH-1, virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus Dengue y virus Chikungunya. En la forma de realización más preferida, dicho microorganismo es un virus seleccionado del grupo que consiste en VIH (en particular VIH-1), VHB y VHC.
- Dentro de una especie específica, pueden seleccionarse y detectarse diferentes genotipos de un microorganismo, tales como, por ejemplo, los genotipos GI y GII de un norovirus; los subtipos A a K del VIH; los genotipos A a H del VHB y los genotipos 1 a 4 del VHC.
- En una forma de realización particularmente preferida, dicho ácido nucleico que comprende una secuencia diana (T) es ADN de doble cadena.
- En una forma de realización particularmente preferida, el método de la presente invención puede utilizarse de esta manera para detectar la presencia de un microorganismo en una muestra, en particular los microorganismos indicados anteriormente.
- En todavía otra forma de realización preferida, dicho ácido nucleico que comprende T es un oncogén, preferentemente un oncogén humano. Preferentemente, dicho oncogén humano se selecciona del grupo que consiste en BCR-ABL mayor, BCR-ABL menor, BCR-AML1 ETO, PML-RARA, mutantes BRAF V600, mutantes KRAS y mutantes NRAS.
- En una forma de realización particularmente preferida, el método de la presente invención puede utilizarse de esta manera para detectar la presencia de un oncogén en una muestra, en particular los oncogenes indicados anteriormente.
- En todavía otra forma de realización preferida, S1 y S2 no presentan homología respecto a T y se seleccionan de manera que se amplifican utilizando los reactivos y condiciones de amplificación de T (lo anterior se aplica, por ejemplo, al contenido de G/C de S1 y S2). S1 y S2 pueden derivarse, por ejemplo, del genoma de una planta, en particular del virus del mosaico de tabaco (TMV). Sin embargo, S1 y S2 también pueden ser secuencias artificiales, las cuales no se encuentran presentes en la naturaleza.
- Puede resultar particularmente preferente que T, S1 y S2 presenten una longitud inferior o igual a aproximadamente 2000 pares de bases. Resulta particularmente preferente una longitud inferior o igual a aproximadamente 1000 bases, preferentemente de aproximadamente 600 bases o de aproximadamente 400 bases.
- En otra forma de realización relacionada con el primer aspecto, dichos plásmidos de las etapas c) y e) son plásmidos procarióticos o eucarióticos. Puede resultar particularmente preferente utilizar un plásmido procariótico, en particular un plásmido de *E. coli* utilizado comúnmente.
- En otra forma de realización preferida, dicho plásmido de la etapa e) se transfiere al interior de dichos viales mediante la adición de dichos plásmidos al tampón de lisis, que se utiliza durante la extracción de ácidos

nucleicos en todos los viales y añadiendo después dicho tampón de lisis que comprende dicho plásmido para la etapa de extracción.

5 En todavía otra forma de realización preferida, dichas reacciones de PCR llevadas a cabo en la etapa h) son reacciones de RT-PCR. Evidentemente lo anterior se aplica en particular en el caso de que el ácido nucleico que comprende una secuencia diana (T) sea un ARN de cadena sencilla o de doble cadena.

10 En otra forma de realización preferida, dicha etapa de extracción g), dicha reacción de PCR de la etapa h) y dicha secuenciación de la etapa i) se llevan a cabo de una manera opcionalmente totalmente automatizada. Puede resultar particularmente preferente que se utilicen los dispositivos siguientes: un dispositivo Sentosa SX101 (Vela Diagnostics) o un sistema epMotion (Eppendorf) para la etapa g), un dispositivo Rotor-Gene Q (Qiagen) en la etapa h) y un dispositivo de secuenciación en semiconductor Ion Torrent (Life Technologies) en la etapa i).

15 En todavía otra forma de realización preferida, dicha secuenciación de la etapa i) se lleva a cabo mediante secuenciación en tiempo real de molécula única, secuenciación mediante ion semiconductor, pirosecuenciación, secuenciación mediante síntesis, secuenciación mediante ligación y secuenciación por terminación de cadena. Resulta particularmente preferente la secuenciación mediante ion semiconductor.

20 En todavía otra forma de realización preferente del primer aspecto de la invención, la presencia de un ácido nucleico que comprende una secuencia diana (T) se detecta en por lo menos dos muestras en paralelo. De esta manera, la presente invención se refiere además a un método *in vitro* de detección de la presencia de un ácido nucleico que comprende una secuencia diana (T) en por lo menos dos muestras, SA1 y SA2, en el que dicho método comprende las etapas a continuación:

25 a) proporcionar muestras SA1 y SA2 que potencialmente comprenden un ácido nucleico que comprende T, en las que T está flanqueada por una secuencia que hibrida con un cebador directo (FOR) y una secuencia que hibrida con un cebador inverso (REV);

30 b) transferir SA1 al interior de un vial V1 y SA2 al interior de un vial V3;

c) proporcionar un plásmido que comprende una secuencia de control 1 (S1), en la que S1 está flanqueada por una secuencia que hibrida con FOR y una secuencia que hibrida con REV, en la que T y S1 no son idénticos.

35 d) transferir dicho plásmido de la etapa c) a un vial V2;

40 e) proporcionar un plásmido que comprende una secuencia de control 2 (S2), en la que S2 está flanqueada por una secuencia que hibrida con FOR y una secuencia que hibrida con REV, en la que T, S1 y S2 no son idénticos;

f) transferir dicho plásmido de la etapa e) al interior de dichos viales;

45 g) extraer los ácidos nucleicos dentro de dichos viales;

h) llevar a cabo reacciones de PCR en dichos viales utilizando los cebadores FOR y REV;

i) secuenciar los ácidos nucleicos amplificados en dichos viales,

50 en donde la presencia de T en los viales V1 y V3 indica la presencia de dicho ácido nucleico que comprende T en las muestras SA1 y SA2 en el caso de que la secuenciación en el vial V2 haya resultado en la presencia de S1 y S2 y en el caso de que la secuenciación en los viales V1 y V3 haya resultado en la presencia de T y S2.

55 La configuración indicada anteriormente puede utilizarse de esta manera para analizar muestras en paralelo, preferentemente hasta 15 muestras (en donde el análisis de 7 o 15 muestras en paralelo resulta particularmente preferente); lo anterior también puede denominarse método multiplex. Puede resultar preferente llevar a cabo el análisis de 7 muestras en paralelo (más una muestra adicional de control 8) en el caso de que el ácido nucleico que comprende T sea un oncogén; en el caso de que el ácido nucleico que comprende T sea un ácido nucleico de un microorganismo, puede resultar particularmente preferente llevar a cabo el análisis de 15 muestras en paralelo (más una muestra adicional de control 16). En general, un ácido nucleico que comprende T se encuentra presente en una muestra en el caso de que la secuenciación en el vial V2 resulte en la presencia de S1 y S2 y en el caso de que la secuenciación en el vial de muestra correspondiente resulte en la presencia de T y S2.

65 Debe apreciarse que, en algunas formas de realización de la presente invención, se analizan por lo menos dos secuencias diana comprendidas en el ácido nucleico. De esta manera, la presente invención se refiere además a un método *in vitro* de detección de la presencia de un ácido nucleico que comprende por lo menos dos

secuencias diana (T1 y T2) en una muestra, en el que dicho método comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar una muestra que comprende potencialmente un ácido nucleico que comprende T1 y T2, en el que T1 está flanqueada por una secuencia que hibrida con un cebador directo (FOR) y una secuencia que hibrida con un cebador inverso (REV) y en la que T2 está flanqueada por una secuencia que hibrida con un cebador directo (FOR1) y una secuencia que hibrida con un cebador inverso (REV1), en la que T1 y T2 no son idénticos, en la que FOR y FOR1 no son idénticos y en la que REV y REV1 no son idénticos;
- b) transferir dicha muestra a un vial V1;
- c) proporcionar un plásmido que comprende una secuencia de control 1 (S1) y una secuencia de control 3 (S3), en el que S1 está flanqueado por una secuencia que hibrida con FOR y una secuencia que hibrida con REV, en el que S3 está flanqueado por una secuencia que hibrida con FOR1 y una secuencia que hibrida con REV1, y en el que T1, T2, S1 y S3 no son idénticos.
- d) transferir dicho plásmido de la etapa c) a un vial V2;
- e) proporcionar un plásmido que comprende una secuencia de control 2 (S2), en la que S2 está flanqueada por una secuencia que hibrida con FOR y una secuencia que hibrida con REV, en la que T, S1 y S2 no son idénticos;
- f) transferir dicho plásmido de la etapa e) al interior de dichos viales;
- g) extraer los ácidos nucleicos dentro de dichos viales;
- h) llevar a cabo reacciones de PCR en dichos viales utilizando los cebadores FOR, REV, FOR1 y REV1;
- i) secuenciar los ácidos nucleicos amplificados en dichos viales,

en el que la presencia de T1 y T2 en el vial V1 indica la presencia de dicho ácido nucleico que comprende T1 y T2 en dicha muestra en el caso de que la secuenciación en el vial V2 haya resultado en la presencia de S1, S2 y S3, y en el caso de que la secuenciación en el vial V1 haya resultado en la presencia de T1, T2 y S2.

La configuración indicada anteriormente puede utilizarse de esta manera para caracterizar un ácido nucleico específico mediante la detección de la presencia de por lo menos dos secuencias diana en dicho ácido nucleico. Esta configuración puede utilizarse particularmente para incrementar la especificidad del método.

Se da a conocer además un plásmido que comprende una secuencia de control (S), en la que S está flanqueada por una secuencia que hibrida con un cebador directo (FOR) y una secuencia que hibrida con un cebador inverso (REV), en el que dichas secuencias que se hibridan con FOR y REV son secuencias derivadas de un ácido nucleico que comprende dicha secuencia que hibrida con FOR, seguido de una secuencia diana (T), seguido de dicha secuencia que hibrida con REV, y en el que S y T no son idénticos.

En una forma de realización preferida, la hibridación de FOR y REV con dicho plásmido durante una reacción de amplificación resulta en la amplificación de S.

Dicho ácido nucleico que comprende dicha secuencia que hibrida con FOR seguido de T, seguido de dicha secuencia que hibrida con REV, puede ser un ácido nucleico procedente de un microorganismo.

Preferentemente, dicho microorganismo se selecciona del grupo que consiste en bacterias, arqueas, protozoos, hongos y virus. En una forma de realización particularmente preferida, dicho microorganismo es una bacteria seleccionada del grupo que consiste en *Streptococcus* de grupo A, elementos del complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canetti* y *Mycobacterium microti*, *Salmonella enterica* spp., *Clostridium difficile*, enterococcus resistente a Vancomicina y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. En otra forma de realización particularmente preferida, dicho microorganismo es un virus seleccionado del grupo que consiste en adenovirus, virus de la influenza aviar A (H7N9), coronavirus del síndrome respiratorio del Oriente Medio, norovirus, virus BK, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus de herpes simplex 1, virus de herpes simplex 2, virus varicela-zóster, enterovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en particular VIH-1, virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus Dengue y virus Chikungunya. En la forma de realización más preferida, dicho microorganismo es un virus seleccionado del grupo que consiste en VIH (en particular VIH-1), VHB y VHC.

Dicho ácido nucleico que comprende T puede ser un oncogén, preferentemente un oncogén humano. Preferentemente, dicho oncogén humano se selecciona del grupo que consiste en BCR-ABL mayor, BCR-ABL menor, BCR-AML1 ETO, PML-RARA, mutantes BRAF V600, mutantes KRAS y mutantes NRAS.

En dicho plásmido, S no presenta homología respecto a T y se selecciona de manera que la secuencia se amplifica utilizando los reactivos y condiciones para la amplificación de T (ello se aplica, por ejemplo, al contenido de G/C de S). S puede derivarse, por ejemplo, del genoma de un virus vegetal, en particular del virus del mosaico de tabaco (TMV). Sin embargo, S también puede ser una secuencia artificial, que no se encuentra presente en la naturaleza.

T y S pueden presentar una longitud inferior o igual a aproximadamente 2000 bases. Resulta particularmente preferente una longitud inferior o igual a aproximadamente 1000 bases, preferentemente de aproximadamente 600 bases o de aproximadamente 400 bases.

Dicho plásmido puede ser un plásmido procariótico o eucariótico. Puede resultar particularmente preferido utilizar un plásmido procariótico, en particular un plásmido de *E. coli* utilizado comúnmente.

Dicho plásmido puede utilizarse en la etapa c) del método según el primer aspecto de la invención y sirve como control positivo y negativo.

Dicho plásmido puede utilizarse en la etapa e) del método según el primer aspecto de la invención y sirve de control de extracción.

Se da a conocer además la utilización de un plásmido en un ensayo de secuenciación diseñado para detectar la presencia de T en un amuestra, en una reacción en la muestra (SR), en la que dicho plásmido se utiliza en una reacción de control (CR) y en la que SR y CR son reacciones separadas.

Se da a conocer además la utilización de un plásmido en un ensayo de secuenciación diseñado para detectar la presencia de T en una muestra en una reacción en la muestra (SR), en la que dicho plásmido se añade a dicha SR antes de la extracción de los ácidos nucleicos de la misma.

Por lo tanto, se da a conocer además un plásmido que comprende una secuencia de control 1 (S1), en la que S1 está flanqueada por una secuencia que hibrida con un cebador directo (FOR) y una secuencia que hibrida con un cebador inverso (REV), una secuencia de control 2 (S2), en la que S2 está flanqueada por una secuencia que hibrida con un cebador directo (FOR1) y una secuencia que hibrida con un cebador inverso (REV1), en el que dichas secuencias que se hibridan con FOR, FOR1, REV y REV1 son secuencias derivadas de un ácido nucleico que comprende dicha secuencia que hibrida con FOR, seguido de una secuencia diana 1 (T1), seguido de dicha secuencia que hibrida con REV y dicha secuencia que hibrida con FOR1, seguido de una secuencia diana 2 (T2), seguido de dicha secuencia que hibrida con REV1, y en la que S1, S2, T1 y T2 no son idénticos. Dicho plásmido preferentemente sirve tanto de control positivo como de control negativo.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un kit para la detección de un ácido nucleico que comprende una secuencia diana (T) en una muestra, en la que dicho kit comprende:

- (a) los cebadores FOR y REV, en los que FOR y REV se hibridan con secuencias flanqueantes de T,
- (b) un plásmido que comprende una secuencia que hibrida con FOR, seguido de una secuencia de control 1 (S1), seguido de una secuencia que hibrida con REV,
- (c) un plásmido que comprende una secuencia que hibrida con FOR, seguido de una secuencia de control 2 (S2), seguido de una secuencia que hibrida con REV,

en la que T, S1 y S2 no son idénticas.

En una forma de realización de la misma, la presente invención se refiere a un kit para la detección de un ácido nucleico que comprende las secuencias diana 1 y 2 (T1 y T2) en una muestra, en la que dicho kit comprende:

- (a) los cebadores FOR y REV, en los que FOR y REV se hibridan con secuencias flanqueantes de T1,
- (b) cebadores FOR1 y REV1, en los que FOR1 y REV1 se hibridan con secuencias flanqueantes de T2,
- (c) un plásmido que comprende una secuencia que hibrida con FOR, seguido de una secuencia de control 1 (S1), seguido de una secuencia que hibrida con REV, y una secuencia que hibrida con FOR1, seguido de una secuencia de control 3 (S3), seguido de una secuencia que hibrida con REV1,
- (d) un plásmido que comprende una secuencia que hibrida con FOR, seguido de una secuencia de control 2 (S2), seguido de una secuencia que hibrida con REV,

en la que T1, T2, S1, S2 y S3 no son idénticas, en la que FOR y FOR1 no son idénticas y en la que REV y REV1 no son idénticas.

La presente invención da a conocer además el kit siguiente: un kit para la detección de un ácido nucleico que comprende una secuencia diana (T) en una muestra, en la que dicho kit comprende:

- 5 (a) cebadores FOR y REV, en los que FOR y REV se hibridan con secuencias flanqueantes de T,  
(b) un plásmido que comprende una secuencia que hibrida con FOR, seguido de una secuencia de control 1 (S1), seguido de una secuencia que hibrida con REV,  
10 en la que T y S1 no son idénticas.

En una forma de realización de la misma, la presente invención se refiere a un kit para la detección de un ácido nucleico que comprende las secuencias diana 1 y 2 (T1 y T2) en una muestra, en la que dicho kit comprende:

- 15 (a) los cebadores FOR y REV, en los que FOR y REV se hibridan con secuencias flanqueantes de T1,  
(b) cebadores FOR1 y REV1, en los que FOR1 y REV1 se hibridan con secuencias flanqueantes de T2,  
(c) un plásmido que comprende una secuencia que hibrida con FOR, seguido de una secuencia de control 1 (S1), seguido de una secuencia que hibrida con REV, y una secuencia que hibrida con FOR1, seguido de una secuencia de control 2 (S2), seguido de una secuencia que hibrida con REV1,  
20 en la que T1, T2, S1, S2 y S2 no son idénticas, en la que FOR y FOR1 no son idénticas y en la que REV y REV1 no son idénticas.

25 en la que T1, T2, S1, S2 y S2 no son idénticas, en la que FOR y FOR1 no son idénticas y en la que REV y REV1 no son idénticas.

En una forma de realización preferida, los kits indicados anteriormente comprenden instrucciones de utilización.

Finalmente, la presente invención se refiere a la utilización de los kits según el tercer aspecto de la presente invención en un método para la detección de un ácido nucleico que comprende una secuencia diana (T) o un ácido nucleico que comprende las secuencias diana 1 y 2 (T1 y T2), respectivamente, en una muestra.  
30

### Descripción de las figuras

35 La figura 1A representa una vista esquemática de las secuencias comprendidas en un plásmido según la presente invención en la dirección 5' a 3': una secuencia que hibrida con un cebador directo, seguido de una secuencia de control, seguido de una región que hibrida con un cebador inverso.

40 La figura 1B representa una vista esquemática de dos secuencias de control comprendidas en un plásmido utilizado como control positivo y negativo según la presente invención, nuevamente en la dirección 5' a 3'. El ejemplo específico se refiere a dos genes comprendidos en el ácido nucleico del VHC, es decir, las regiones NS3 y NS5B: una secuencia que hibrida con un cebador directo de NS3 (utilizado para la amplificación de NS3 en una muestra), una secuencia de control S1, seguido de una secuencia que hibrida con un cebador inverso de NS3 (utilizado para la amplificación de NS3 en una muestra), seguido de una secuencia que hibrida con un cebador directo de NS5B (utilizado para la amplificación de NS5B en una muestra), una secuencia de control S2, seguido de una secuencia que hibrida con un cebador inverso de NS5B (utilizado para la amplificación de NS5B en una muestra).  
45

50 La figura 1C representa una vista esquemática de las secuencias comprendidas en un plásmido utilizado como control de extracción según la presente invención, nuevamente en la dirección 5' a 3'. El ejemplo específico se refiere a un gen comprendido en el ácido nucleico del VHC, es decir, las regiones NS5B: una secuencia que hibrida con un cebador directo de NS5B (utilizado para la amplificación de NS5B en una muestra), una secuencia de control S3, seguido de una secuencia que hibrida con un cebador inverso de NS5B (utilizado para la amplificación de NS5B en una muestra).  
55

### Descripción detallada de la invención

En el contexto de la presente invención se ha tenido éxito, entre otros, para proporcionar controles de secuenciación universales, que pueden utilizarse como controles positivo y negativo, así como de extracción, en un ensayo de secuenciación.  
60

Antes de describir algunas de las formas de realización de la presente invención con mayor detalle, se introducen las definiciones a continuación.

### Definiciones

65 Tal como se utiliza en la memoria y en las reivindicaciones, las formas singulares "un" y "una" incluyen además

los plurales correspondientes, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "aproximadamente" en el contexto de la presente invención se refiere a un intervalo de precisión que entenderá el experto en la materia para seguir garantizando el efecto técnico del elemento en cuestión. El término típicamente indica una desviación del valor numérico indicado de  $\pm 10\%$  y preferentemente de  $\pm 5\%$ .

Debe apreciarse que la expresión "que comprende" no es limitativa. En el contexto de la presente invención, la expresión "que consiste en" se considera que es una forma de realización preferente de la expresión "que comprende". En el caso de que en adelante en la presente memoria se defina que un grupo comprende por lo menos un número determinado de formas de realización, ello indica además que comprende un grupo que preferentemente consiste en dichas formas de realización únicamente.

La expresión "detectar la presencia" tal como se utiliza en la presente memoria debe entenderse en el significado de "detectar la presencia o la ausencia". Tal como se menciona en el método según se reivindica en la presente solicitud, la muestra que debe analizarse *potencialmente* comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia diana. De esta manera, pueden existir, por ejemplo, indicaciones de que un paciente se halla infectado por un virus de la hepatitis C y una muestra de sangre correspondiente que comprende potencialmente un ácido nucleico del VHC sea analizada mediante un método según la presente invención. Suponiendo que todos los controles indiquen que el ensayo se ha llevado a cabo correctamente, el resultado es que la secuencia o secuencias diana (y, de esta manera, el virus) se encuentran presentes o ausentes; por consiguiente, se detecta la presencia o ausencia de la secuencia diana en dicha muestra.

En el contexto de la presente invención, la expresión "ácido nucleico" se refiere a un polímero desoxirribonucleótido o ribonucleótido natural en forma de cadena sencilla o de doble cadena. El ácido nucleico puede ser particularmente ADN de doble cadena y ARN de cadena sencilla.

El término "secuencia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la aparición secuencial de las bases en un polímero desoxirribonucleótido o ribonucleótido, en el que una base observada en un polímero desoxirribonucleótido se selecciona del grupo que consiste en A, T, G y C y una base observada en un polímero ribonucleótido se selecciona del grupo que consiste en A, U, G y C. Una secuencia de bases en un polímero desoxirribonucleótido puede ser, de esta manera, por ejemplo, GGAAGCAAGCCT (SEC ID n° 14), mientras que una secuencia de bases en un polímero ribonucleótido puede ser, por ejemplo, GGAUCGAUUAU (SEC ID n° 15).

Una "secuencia diana" tal como se denomina en la presente memoria es una secuencia en el ácido nucleico la presencia de la cual se detecta en el método según la presente invención; una "secuencia diana" es característica para el ácido nucleico específico, la presencia del cual se detecta. En el caso de que, por ejemplo, se detecte un ácido nucleico del VHC, la secuencia diana puede comprender, por ejemplo, los genes NS3 y/o NS5A y/o NS5B del VHC (ver también los Ejemplos 1 y 2).

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "muestra" se refiere a cualquier muestra biológica de cualquier sujeto humano o veterinario que pueda someterse a ensayo para la presencia de un ácido nucleico que comprende una secuencia diana. Entre las muestras pueden incluirse tejidos obtenidos de cualquier órgano, tal como, por ejemplo, tejido pulmonar, y líquidos obtenidos de cualquier órgano, tal como, por ejemplo, sangre, plasma, suero, líquido linfático, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, sangre del cordón amniótico, lágrimas, saliva y lavados nasofaríngeos. Tal como se ha indicado anteriormente, las muestras también pueden derivarse de una región específica en el cuerpo, por ejemplo el tracto respiratorio; entre las muestras del tracto respiratorio se incluyen muestras faríngeas, muestras nasales y especímenes del tracto respiratorio inferior.

La muestra puede derivarse en particular de un sujeto humano o veterinario. De acuerdo con lo anterior, un "paciente" puede ser un sujeto humano o veterinario. En el caso de que se haga referencia a una "muestra clínica", ello indica que la muestra procede de un paciente que se sospecha que es portador de un ácido nucleico que comprende una secuencia diana.

El término "flanqueado" tal como se utiliza en la presente memoria en relación a secuencias se refiere a que las dos secuencias descritas como flanqueantes de una secuencia específica (por ejemplo, una secuencia que hibrida con un cebador directo y una secuencia que hibrida con un cebador inverso) se encuentran comprendidas cadena arriba y cadena abajo de dicha secuencia específica. En el caso de que se haga referencia en el presente contexto a una secuencia que hibrida con un cebador directo, esta región se encuentra cadena arriba, es decir, en el extremo 5' de dicha secuencia. Después de la secuencia diana, en este caso se encuentra presente una secuencia que hibrida con un cebador inverso, es decir, cadena abajo de dicha secuencia o en el extremo 3'. Esta configuración también puede derivarse de la figura 1A.

El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como punto de inicio para la síntesis 5' a 3' de un producto de extensión de cebadores que es complementario a una cadena de ácidos nucleicos. El producto de extensión de cebador se sintetiza en presencia de nucleótidos apropiados y un agente para la

- polimerización, tal como una ADN polimerasa en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Los cebadores pueden diseñarse utilizando, por ejemplo, un programa informático, tal como OLIGO (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, Colorado). Entre las características importantes al diseñar cebadores se incluyen un tamaño apropiado del producto de amplificación, preferentemente en los intervalos indicados anteriormente, para facilitar la detección, temperaturas de fusión similares de los elementos de una pareja de cebadores y la longitud de cada cebador (es decir, los cebadores necesitan ser suficientemente largos para hibridarse con especificidad de secuencia y para iniciar la síntesis pero no tan largos que su fidelidad se vea reducida durante la síntesis del oligonucleótido). Típicamente, los cebadores presentan una longitud de 15 a 30 nucleótidos.
- Un "cebador directo" que hibrida con una región cadena arriba de una secuencia específica y un "cebador inverso" que hibrida con una región cadena abajo de una secuencia específica se hibridará de manera que dicha secuencia específica resulte amplificada durante la reacción de amplificación por PCR. En el caso de que se encuentre presente un ADN o ADNc de doble cadena en la muestra, el cebador directo se hibridará con la región cadena arriba, de manera que su extremo 3' apunte hacia la secuencia que deba amplificarse; el extremo 3' del cebador inverso también apunta a la secuencia que debe amplificarse. Tal como en cada diseño de PCR, los cebadores se hibridarán de esta manera con diferentes cadenas: el cebador directo se hibrida con la región no codificante, mientras que el cebador inverso se hibrida con la cadena codificante.
- Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "amplificación" se refiere a procedimientos mediados enzimáticamente que son capaces de producir miles de millones de copias del ácido nucleico diana. Entre los ejemplos de procedimientos de amplificación mediados enzimáticamente que se conocen de la técnica se incluyen la PCR.
- Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "que se hibrida" se refiere al procedimiento de establecimiento de una interacción específica de secuencia no covalente entre dos o más cadenas complementarias de ácidos nucleicos de cadena sencilla en un complejo, preferentemente un dúplex en la presente invención.
- El término "vial" se refiere a un vial de reacción típicamente utilizado en los ensayos diagnósticos. El vial puede encontrarse comprendido en una multiplaca, por ejemplo, una placa de 96 pocillos y, de esta manera, puede hacerse referencia al mismo como "pocillo", o puede encontrarse comprendido en un anillo de muestras, por ejemplo, un anillo de muestras de 36 viales. En el caso de que un objeto se "transfiera" al interior de un vial, preferentemente se utilizan condiciones tan estériles como resulte posible en esta etapa; en algunos diseños, la etapa de transferencia puede llevarse a cabo mediante pipeteado del objeto en un vial; ello puede llevarse a cabo de una manera automatizada. Un "objeto" típico en el presente contexto es una muestra clínica, un plásmido comprendido en tampón, o células que comprenden un plásmido. En el caso de que las células que comprenden un plásmido se transfieran a un vial, ello también puede llevarse a cabo mediante la adición de dichas células a un tampón específico utilizado durante un procedimiento de extracción, por ejemplo, un tampón de lisis.
- El término "plásmido" se utiliza en la presente memoria según su significado estándar en biología molecular. Puede utilizarse cualquier tipo de vector procariótico o eucariótico para los fines de la presente invención, es decir, para el plásmido utilizado como control positivo y negativo, así como el control de extracción. Son ejemplos de dichos plásmidos, los plásmidos del TMV.
- El término "idéntico" tal como se utiliza en la presente memoria en relación a "secuencias no idénticas" se refiere a que las secuencias difieren en por lo menos una base entre ellas. Tal como se ha indicado anteriormente, sin embargo, resulta preferente que las secuencias no muestren homología en absoluto, por lo menos con respecto a la secuencia o secuencias diana y la secuencia o secuencias de control. Las diferentes secuencias de control pueden mostrar algún grado de homología aunque deben ser distinguibles entre sí. Lo anterior se consigue porque las secuencias de control también difieren entre sí en por lo menos una base. En una forma de realización preferida, de esta manera T no muestra homología respecto a S2 y S2, en donde S1 y S2 pueden compartir cierta homología aunque difieren en por lo menos una base, preferentemente en más de una base, entre sí.
- La expresión "extracción de ácidos nucleicos" se refiere a que cualesquiera ácidos nucleicos presentes en un vial se aíslan sustancialmente de cualquier fondo de células, en particular se aísla a partir de células intactas. Preferentemente, los ácidos nucleicos se lavan además durante el procedimiento y opcionalmente se concentran. Tras una extracción, sustancialmente la totalidad de las células intactas presentes en un vial han sido lisadas y sustancialmente todos los residuos celulares no relacionados con ácidos nucleicos han sido eliminados. Entre los métodos de extracción típicos pueden incluirse la utilización de tampón de lisis hipotónico, calor y/o detergentes y son conocidos por el experto en la materia. Un procedimiento de extracción particularmente preferente según la presente invención comprende las etapas a continuación:
- se añade proteinasa K a un tampón de lisis utilizado comúnmente; en el caso de que las etapas siguientes comprendan la etapa de llevar a cabo una transcripción inversa (mediante RT-PCR), también

puede añadirse ARN portador al tampón de lisis; además, tal como se ha indicado de manera general anteriormente, el plásmido de control de extracción también puede añadirse al tampón de lisis ("adición al tampón de lisis");

- 5 • el tampón de lisis mencionado anteriormente se añade a las muestras y las muestras se incuban durante 10 minutos a 60°C, preferentemente mezclando simultáneamente las muestras;
- las perlas magnéticas utilizadas comúnmente para capturar ácidos nucleicos se utilizan preferentemente con el fin de aislar ácidos nucleicos de las muestras (según protocolos estándares); de esta manera, las etapas siguientes pueden comprender:
  - 10 ◦ se añade tampón de unión a las muestras después de la lisis de las células,
  - se añaden las perlas magnéticas para la captura de ácidos nucleicos,
  - 15 ◦ las perlas magnéticas se recolectan mediante un imán y se elimina el sobrenadante (preferentemente después de una corta incubación);
  - opcionalmente se añaden varios tampones de lavado diferentes (preferentemente dos) a las perlas y se llevan a cabo varias (preferentemente dos) etapas de lavado secuencialmente mediante el lavado de las perlas (mezclando y recogiendo las perlas con un imán y eliminando el sobrenadante; añadiendo el siguiente tampón de lavado);
  - 20 ◦ a continuación, típicamente se secan las perlas;
  - se añadió tampón de elución a las perlas y las muestras típicamente se mezclan, preferentemente después de una corta incubación;
  - 25 ◦ las perlas magnéticas se recolectan mediante un imán y se recolecta el sobrenadante que comprende los ácidos nucleicos eluidos;
  - 30 ◦ el sobrenadante que comprende los ácidos nucleicos eluidos (correspondiente a los "ácidos nucleicos extraídos") se utiliza en las etapas siguientes.

35 Una "reacción de PCR" ha sido descrita en primer lugar para la amplificación de ADN por Mullis *et al.*, patente US nº 4.683.195 y Mullis, patente US nº 4.683.202 y es bien conocida por el experto ordinario en la materia. En la técnica de PCR, se mezcla una muestra de ADN en una solución con un exceso molar de por lo menos dos cebadores oligonucleótidos que se preparan para que sean complementarios al extremo 3' de cada cadena del dúplex de ADN (ver anteriormente, un cebador directo y un cebador inverso); un exceso molar de bases nucleótidas (es decir, dNTP) y una ADN polimerasa termoestable (preferentemente la polimerasa Taq), que cataliza la formación de ADN a partir de los cebadores oligonucleótidos y los dNTP. De los cebadores, por lo menos uno es un cebador directo que se unirá en la dirección 5' a 3' al extremo 3' de una cadena (en la definición anteriormente indicada, la cadena de no sentido) del analito de ADN desnaturalizado y otro es un cebador inverso que se unirá en la dirección 3' a 5' al extremo 5' de la otra cadena (en la definición anterior, la cadena de sentido) del analito de ADN desnaturalizado. La solución se calienta a aproximadamente 94-96°C para desnaturalizar el ADN de doble cadena en ADN de cadena sencilla. Al enfriarse la solución y alcanzar la temperatura denominada de hibridación, los cebadores se unen a cadenas separadas y la ADN polimerasa cataliza una nueva cadena de analito mediante la unión de dNTP a los cebadores. Al repetir el procedimiento y sintetizarse los productos de extensión a partir de los cebadores, estos se separan de sus complementos y cada producto de extensión sirve de molde para un producto de extensión complementario sintetizado a partir del otro cebador. A medida que la secuencia que se amplifica se duplica tras cada ciclo, puede alcanzarse una amplificación teóricamente de un número enorme de copias tras repetir el procedimiento durante unas cuantas horas; de acuerdo con ello, pueden amplificarse cantidades extremadamente pequeñas de ADN utilizando la PCR en un periodo de tiempo relativamente corto.

55 En caso de que el material de partida para la reacción de PCR sea ADN complementario al ARN ("ADNc"), la síntesis se realiza a partir de ARN mediante transcripción inversa. En este caso el ADNc resultante se amplifica utilizando el protocolo de PCR descrito anteriormente. Las transcriptasas inversas son conocidas por el experto ordinario en la materia como enzimas presentes en retrovirus que pueden sintetizar cadenas sencillas complementarias de ADN a partir de una secuencia de ARNm como molde. Una PCR utilizada para amplificar productos de ARN se denomina PCR de transcriptasa inversa o "RT-PCR".

60 El término "complementario" y "sustancialmente complementario" tal como se utilizan en las definiciones anteriores se refieren al apareamiento de bases entre nucleótidos o ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, entre dos cadenas de una molécula de ADN de doble cadena o entre un cebador oligonucleótido y un sitio de

unión de cebador en un ácido nucleico de cadena sencilla que debe secuenciarse o amplificarse. Los nucleótidos complementarios son, generalmente, A y T (o A y U) y G y C.

5 El término "secuenciación" se utiliza en la presente memoria en su significado común en la biología molecular. De esta manera, se determina la incidencia secuencial exacta de bases en una secuencia de ácidos nucleicos.

10 El término "microorganismo" tal como se utiliza en la presente memoria se utiliza en su significado más amplio. De esta manera, un microorganismo puede ser cualquier tipo de bacteria, arqueas, protozoo, hongo y virus. Se menciona explícitamente que los virus se encuentran bajo la definición de "microorganismo" tal como se utiliza en la presente memoria.

15 El término "oncogén" se utiliza en la presente memoria en su significado común de la biología molecular y la oncología, respectivamente. De esta manera, existen, por ejemplo, mutaciones conocidas de los genes que convierten un gen "normal" o de "tipo salvaje" en oncogénico, es decir, en inductor de cáncer; son ejemplos a este respecto, las mutaciones que convierten una quinasa en constitucionalmente activa, tal como señales específicas (por ejemplo, señales inductoras de crecimiento) que se señalizan constantemente e inician los procesos correspondientes. Los "oncogenes" tal como se utiliza el término en la presente memoria puede referirse además a translocaciones intra- o intercromosómicas que resultan también en situaciones de inducción de cáncer.

20 El término "multiplex" se refiere a la detección de la presencia de un ácido nucleico específico en varias muestras, en las que se llevan a cabo los ensayos correspondientes simultáneamente, es decir, las etapas del presente método se llevan a cabo generalmente en paralelo.

25 Los ejemplos siguientes se explican con el fin de proporcionar al experto en la materia una exposición y descripción completas de cómo preparar y utilizar las composiciones de la invención. Los ejemplos se proporcionan a título de ejemplo no limitativo de la invención. Aunque se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a variables tales como cantidades, temperatura, etc., debería considerarse el error y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso; la temperatura se expresa en grados centígrados y la presión es igual o aproximadamente igual a la atmosférica. Todos los componentes se obtuvieron comercialmente, a menos que se indique lo contrario.

## Ejemplos

### 35 Ejemplo 1: un plásmido para la utilización como control positivo y negativo

El objetivo del presente ensayo (tal como se indica en el Ejemplo 3 en mayor detalle) es la detección de la presencia o ausencia de un ácido nucleico del virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra clínica. Existen dos secuencias diana que deben detectarse en el ácido nucleico del VHC; estas secuencias se encuentran comprendidas en los genes NS3 y NS5B del VHC.

- Un plásmido para la utilización como control positivo y negativo comprende las secuencias siguientes (en dirección 5' a 3'; ver también la figura 1B):
- 45 - una región de cebador derivada del gen NS3 del VHC (subrayada en gris claro), en la que la secuencia que hibrida con el cebador directo de NS3 se encuentra subrayada (observación: el cebador directo se hibrida con la cadena complementaria de la cadena mostrada en la parte inferior durante una reacción de amplificación); SEC ID nº 1.
- 50 - Una secuencia derivada del virus del mosaico del tabaco (TMV), que no muestra homología con el gen NS3 del VHC (en lo sucesivo denominado S1); SEC ID nº 2.
- Una región de cebador derivada del gen NS3 del VHC (subrayada en gris claro), en la que la secuencia que hibrida con el cebador inverso de NS3 se encuentra subrayada (observación: el cebador inverso se hibrida con la cadena mostrada en la parte inferior durante una reacción de amplificación); SEC ID nº 3.
- 55 - Una región de cebador derivada del gen NS5B del VHC (subrayada en gris oscuro), en la que la secuencia que hibrida con el cebador directo de NS5B se encuentra subrayada (observación: el cebador directo se hibrida con la cadena complementaria de la cadena mostrada en la parte inferior durante una reacción de amplificación); SEC ID nº 4.
- 60 - Una segunda secuencia derivada de la TMV (S2) que no muestra homología con el gen NS5B del VHC y que difiere de S1; SEC ID nº 5.
- 65 - Una región de cebador derivada del gen NS5B del VHC (subrayada en gris oscuro), en la que la secuencia que hibrida con el cebador inverso de NS5B se encuentra subrayada (observación: el cebador

inverso se hibrida con la cadena mostrada en la parte inferior durante una reacción de amplificación); SEC ID nº 6.

5 Una secuencia ejemplificativa que comprende los elementos anteriormente indicados es la siguiente (SEC ID nº 7):

GCACAACGGCCTGCGAGATCTGGCCGTGGCTGTGGAACCAGTCGTCTTCT  
 CCCGAATGGAGACCAAGCTCATCACGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTG  
 CGGTGACATCATCAACGGCTTGCCCGTCTCTGCCCGTA  
 ggaagcaagccgcgaaatgatcagaagacgtgcgaattcctcagggattattgtgccca  
 cgaaggataacgttaaacccgttgattcttcatgatgaatttgggaaaagcacacgct  
 gtcagttcaagaggttattcattgatgaagggtgatgtgcatactggtgtgtaatt  
 ttcttggcgatgfcattgtcgaaatgcatatgtttacggagacacacagcagattc  
 catacatcaatagagttcaggattcccgtacccccccattttgccaattggaggtg  
 acgaggtggagacacgcagaactactctccgttgcagccgatgcacacattatctga  
 acaggagatatgagggtttgtcatgagcacttctcggttaaaaagtctgtttcaggg  
 agatggtcggcggagccgccgtgatcaatccgatctcaaacccttgcattgcaagatcc  
 tgactttaccaaatcgataaagaagctctgctttcaagaggtattcagatgttcaca  
 ctgtgcatgaagtgaagcgcagacatactctgatgtttactagttaggtaaccctca  
 CAGGACCGGGGTGAGAACAATTACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCC  
ACCTACGGCAAGTTCCCTTGCCGACGGCGGGTGCTCAGGAGGTGCTTATGA  
 CATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACAT  
 TGCACCATGCTCGTGTGTGGCGACGACTTAGTCGTTATCTGTGAAAGTGC  
 GGGGGTCCAGGAGGACGCGGCGAGCCTGAGAGCCTTCACGGAGGCTATG  
ACCAGGTACTCCGCCCCCCCCGGGGACCCCCACAACC  
 gcatattggatatgtctaagtctgttgcctgcgcctaaaggatcaaatcaaacactaatac  
 ctatggtacgaacggcggcagaaatgccacgccagactggactattggaaaatttagtgg  
 cgatgattaaaaagaaactttaaagcaccggagttgtctggcatcattgatattgaaaata  
 ctgcatctttggttgatataagttttgatagttattgtctaaagaaaaagaaaac  
 caaalaaaaatgittctttgtcagtagagagctctcaatagatggttagaaaagcagg  
 aacaggttaacaattggccagctcgcagattttgattttgtggatttccagcagttgatc  
 agtacagacacatgattaaagcacaacccaagcaaaaagttggacacttcaatccaacgg  
 agtaccggccttgcagacgattgtgtaccattcaaaaagatcaatgcaatattcggcc  
 cgttgttagcagcttactaggcaactactggacagtggtgattcagcagattttgt  
 tttcacaagaaagacaccagcagattgaggatttcttcggagatctcgacagtcag  
 GGCTGGACTTGTCCGGTTGGTTCACGGCTGGCTACAGCGGGGGAGACATT  
TATCACAGCGTGTCTCATGCCCGCCCCGCTGGTTCTGGTTTTGCCTACTC  
 CTGCTCGCTGCAGGGGTAGGCATCTACCTCCTCCCAACCGATGA

10 El ensayo se llevó a cabo tal como se indica en el Ejemplo 3. La detección con éxito de las secuencias S1 y S2 en el vial de control (que comprende el plásmido que comprende las secuencias mostradas anteriormente) indicará que las reacciones de PCR utilizando las parejas de cebadores NS3-for y NS3-rev y NS5B-for y NS5B-rev, respectivamente, funcionaron correctamente (control positivo). En el caso de que se detecten S1 y S2,

puede excluirse que las muestras han sido contaminadas (por ejemplo con una muestra que comprende el virus o con el virus mismo), ya que en este caso las secuencias de los genes NS3 y NS5B del VHC también habrían sido detectadas en este control (control negativo). No resulta necesario ningún control negativo adicional. Tal como se comenta en el Ejemplo 2, habitualmente también se añade al vial un plásmido de control de la extracción.

### Ejemplo 2: plásmido para la utilización como control de extracción

El diseño general es idéntico al diseño descrito de manera general anteriormente. De esta manera, el objetivo del ensayo es la detección de la presencia o ausencia de un ácido nucleico del virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra clínica, en la que se detectan las secuencias del VHC comprendidas en los genes NS3 y NS5B del VHC.

Un plásmido para la utilización como control de extracción comprende las secuencias siguientes (en dirección 5' a 3'; ver también la figura 1C):

- una región de cebador derivada del gen NS5B del VHC (subrayada en gris claro), en la que la secuencia que hibrida con el cebador directo de NS5B se encuentra subrayada (observación: el cebador directo se hibrida con la cadena complementaria de la cadena mostrada en la parte inferior durante una reacción de amplificación); SEC ID nº 1.
- Una segunda secuencia derivada del TMV (S3) que no muestra homología con el gen NS5B del VHC y que difiere de S1 y S2; SEC ID nº 8.
- Una región de cebador derivada del gen NS5B del VHC (subrayada en gris claro), en la que la secuencia que hibrida con el cebador inverso de NS5B se encuentra subrayada (observación: el cebador inverso se hibrida con la cadena mostrada en la parte inferior durante una reacción de amplificación); SEC ID nº 3.

Una secuencia ejemplificativa es la siguiente (SEC ID nº 9):

```
GCACAACGGCCTGCGAGATCTGGCCGTGGCTGTGGAACCAGTCGTCTTCT
CCCGAATGGAGACCAAGCTCATCACGTGGGGGGCAGATACCGCCGCGTG
CGGTGACATCATCAACGGCTTGCCCGTCTCTGCCCGTA
gcatctggtatcaaagaaagagcggggacgtcacgacgttcattgaaacactgtgatca
ttgctgcatgttggcctc gatgctccgatggagaaaataatcaaaggagcctttgtg
gtgacgatagctgctgactttccaaagggtgtgagttccggatgtgcaacactccg
cgaatcttatgtggaatttgaagcaaaactgttaaaaaacagtatggatactttgcg
gaagatatgtaatacatcacgacagaggatgcattgtgtattacgatcccctaaagttga
tctcgaaactggtgctaaacacatcaaggattgggaacacttgaggagttcagaaggt
ctctttgtgatgttctgttcgtgaacaattgtcgttattacacacagttggacgacg
ctgtatgggaggtcataaaaccgccctccaggttcgttgttataaaagtctggtga
agtattgtctgataaagtt
CAGGACCGGGGTGAGAACAATTACCACTGGCAGCCCCATCACGTACTCC
ACCTACGGCAAGTTCCTTGCCGACGGCGGGTGCTCAGGAGGTGCTTATGA
CATAATAATTTGTGACGAGTGCCACTCCACGGATGCCACAT
```

El ensayo se llevó a cabo tal como se indica en el Ejemplo 3, en el que se añade una cantidad estandarizada del plásmido de control de extracción al tampón de lisis utilizado en la etapa de extracción de todas las muestras, incluyendo el control del Ejemplo 2.

La detección con éxito de las secuencias diana del VHC y de la secuencia S3 en un vial que comprende una muestra (y el plásmido anteriormente indicado) indicará por lo menos que la etapa de extracción ha funcionado correctamente (control de extracción). En el caso de que sólo se detecten secuencias diana del VHC, la etapa de extracción no se ha llevado a cabo correctamente; por el contrario, dicho resultado es indicativo de contaminación de las muestras con ADN vírico. No resulta necesaria ninguna pareja adicional de cebadores para la reacción de amplificación de la secuencia comprendida en las células del control de extracción.

**Ejemplo 3: ensayo utilizando los plásmidos de los Ejemplos 1 y 2**

5 El ensayo descrito a continuación se llevó a cabo con el fin de determinar la presencia o ausencia de un ácido nucleico del virus de la hepatitis C (VHC) en una muestra clínica, tal como sangre, de un sujeto humano.

El ensayo se llevó a cabo utilizando el dispositivo Sentosa SX101 de Vela Diagnostics, el dispositivo Rotor-Gene Q de Qiagen y un dispositivo de secuenciación en semiconductor Ion Torrent de Life Technologies.

10 La muestra clínica que debía analizarse se proporcionó en un vial o pocillo adecuado; también pueden proporcionarse muestras adicionales (evidentemente en viales diferentes), en el que todas las muestras pueden analizarse en paralelo. El plásmido del Ejemplo 1 se introduce en otro vial en una concentración y volumen apropiados. Las muestras en todos los viales/pocillos (incluyendo los viales que comprenden el plásmido del Ejemplo 1) se someten en una primera etapa al procedimiento de extracción automatizada del dispositivo Sentosa SX101. Este procedimiento utiliza el plásmido del Ejemplo 2 en el tampón de lisis; de esta manera, seguidamente se extraen los ácidos nucleicos en todos los viales.

20 En la etapa siguiente, las muestras se transfieren automáticamente a un anillo de muestras. Dicho anillo de muestras puede comprender hasta 72 viales, en el que el control positivo (es decir, el plásmido del Ejemplo 1) puede transferirse al vial 1 y las muestras pueden transferirse a los viales 2 a 72.

25 El dispositivo Sentosa SX101 también es capaz de cargar automáticamente las muestras con los componentes utilizados en la etapa siguiente; en el presente ejemplo, la etapa siguiente es una RT-PCR, ya que el VHC es un virus ARN. Por lo tanto, necesita llevarse a cabo una RT-PCR inicial en las regiones de los genes NS3 y NS5B que deben detectarse. Se añaden los componentes correspondientes a los ácidos nucleicos extraídos en todos los viales, es decir, los viales 1 a 72. Los componentes comprenden los enzimas transcriptasa inversa y polimerasa Taq, así como los cebadores siguientes:

NS3_fw:	TGGGGGGCAGATACCGC (SEC ID nº 10)
NS3_rev:	AGGAACTTGCCGTAGGTGGAGTA (SEC ID nº 11)
NS5B_fw:	CCTTCACGGAGGCTATGACCAGGTA (SEC ID nº 12)
NS5B_rev:	TGAGACACGCTGTGATAAATGTC (SEC ID nº 13)

30 El anillo de muestras que comprende los ácidos nucleicos extraídos junto con todos los componentes necesarios para una RT-PCR seguidamente se transfiere a un dispositivo Rotor-Gene Q, en el que se llevan a cabo las reacciones de RT-PCR según un protocolo estándar.

35 A continuación, las muestras se transfieren de los viales individuales a un micropocillo utilizando en un dispositivo de secuenciación en semiconductor Ion Torrent. La secuenciación (que opcionalmente incluye una etapa necesaria de fragmentación de los ácidos nucleicos amplificados) se lleva a cabo según un protocolo estándar.

40 El plásmido según el Ejemplo 1 se encontraba comprendido en el vial 1: tal como se ha indicado anteriormente, también se llevó a cabo una etapa de extracción para este vial; de esta manera, el tampón de lisis que comprendía el plásmido del Ejemplo 2 se añadió a este vial. Una detección con éxito de las secuencias S1 y S2 indica que las reacciones de PCR se han llevado a cabo correctamente. De esta manera, el plásmido según el Ejemplo 1 sirve de control positivo de la reacción de PCR. Debido a que también se añadió el plásmido del Ejemplo 2, la secuencia S2 también debería detectarse; en el caso de que no se detecten secuencias adicionales aparte de S1, S2 y S3 en el vial 1, puede excluirse una contaminación de las muestras. De esta manera, la reacción también sirve de control negativo. Tal como se ha indicado anteriormente, el plásmido según el Ejemplo 2 se añadió al tampón de lisis utilizado para la extracción de los ácidos nucleicos en todas las muestras. La extracción con éxito de los ácidos nucleicos está indicada por la presencia de secuencia S3 en todos los viales.

50 En el caso de que las secuencias que deben detectarse en el VHC, es decir, las regiones en los genes NS3 y NS5b también se encuentren presentes (además de la secuencia S3) en el vial 2 (y, en caso aplicable, en todos los demás viales de muestra), los ácidos nucleicos derivados del VHC efectivamente se encontraban presentes. Lo anterior es indicativo de la presencia del VHC en la muestra o muestras clínicas.

55 En el caso de que sólo se detecte la secuencia S3 en el vial 2, ningún ácido nucleico del VHC se encontraba presente en la muestra; de acuerdo con ello, puede excluirse una infección por el VHC.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método *in vitro* de detección de la presencia de un ácido nucleico que comprende una secuencia diana (T) en una muestra que comprende las etapas siguientes:
- 10 a) utilizar una muestra que comprende potencialmente un ácido nucleico que comprende T, en el que T está flanqueada por una secuencia que hibrida con un cebador directo (FOR) y una secuencia que hibrida con un cebador inverso (REV);
  - 15 b) transferir dicha muestra a un vial V1;
  - 20 c) proporcionar un plásmido que comprende una secuencia de control 1 (S1), en el que S1 está flanqueada por una secuencia que hibrida con FOR y una secuencia que hibrida con REV, en el que T y S1 no son idénticos;
  - 25 d) transferir dicho plásmido de la etapa c) a un vial V2;
  - e) proporcionar un plásmido que comprende una secuencia de control 2 (S2), en el que S2 está flanqueada por una secuencia que hibrida con FOR y una secuencia que hibrida con REV, en el que T, S1 y S2 no son idénticos;
  - f) transferir dicho plásmido de la etapa e) a dichos viales;
  - 30 g) extraer los ácidos nucleicos en dichos viales;
  - 35 h) llevar a cabo unas reacciones de PCR en dichos viales utilizando los cebadores FOR y REV;
  - i) secuenciar los ácidos nucleicos amplificados en dichos viales;
- 30 en el que la presencia de T en el vial V1 indica la presencia de dicho ácido nucleico que comprende T en dicha muestra si la secuenciación en el vial V2 da como resultado la presencia de S1 y S2 y si la secuenciación en el vial V1 da como resultado la presencia de T y S2.
- 35 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una muestra clínica.
3. Método según la reivindicación 2, en el que dicha muestra clínica es una muestra de tejido o una muestra de líquido corporal, preferentemente de un sujeto humano.
- 40 4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico que comprende T es un ácido nucleico de un microorganismo.
5. Método según la reivindicación 3, en el que dicho microorganismo se selecciona de entre el grupo que consiste en bacterias, arqueas, protozoos, hongos y virus.
- 45 6. Método según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico que comprende T es un oncogén, preferentemente un oncogén humano.
- 50 7. Kit para la detección de un ácido nucleico que comprende una secuencia diana (T) en una muestra, en el que dicho kit comprende:
- 55 (a) unos cebadores FOR y REV, en el que FOR y REV hibridan con secuencias que flanquean a T;
  - (b) un plásmido que comprende una secuencia que hibrida con FOR, seguido por una secuencia de control 1 (S1), seguido por una secuencia que hibrida con REV;
  - 60 (c) un plásmido que comprende una secuencia que hibrida con FOR, seguido por una secuencia de control 2 (S2), seguido por una secuencia que hibrida con REV;
- en el que T, S1 y S2 no son idénticas.

**Fig. 1A**

Región de cebador directo de la diana	Secuencia sin homología conocida con la diana	Región de cebador inverso de la diana
--	--	--

**Fig. 1B**

Región de NS3_F	S1	Región de NS3_R	Región de NS5B_F	S2	Región de NS5B_R
--------------------	----	--------------------	---------------------	----	---------------------

**Fig. 1C**

Región de NS5B_F	S3	Región de NS5B_R
---------------------	----	---------------------