(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 761 920**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6865 (2008.01)
C12Q 1/6806 (2008.01)
C12Q 1/6825 (2008.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2013** **PCT/US2013/057458**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014** **WO14036369**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2013** **E 13760215 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019** **EP 2890814**

(54) Título: **Amplificación de ácido nucleico multifásica**

(30) Prioridad:

30.08.2012 US 201261695106 P
15.07.2013 US 201361846538 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.05.2020

(73) Titular/es:

GEN-PROBE INCORPORATED (100.0%)
Mail Stop 1/Patent Dept. 10210 Genetic Center Drive
San Diego, California 92121, US

(72) Inventor/es:

NELSON, NORMAN C.;
ARNOLD, LYLE J. JR.;
DAI, LIZHONG;
PHELPS, STEVEN S. y
CHELLISERRY, JIJUMON

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 761 920 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

Amplificación de ácido nucleico multifásica

Campo de la invención

Esta invención generalmente se refiere al campo de la biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere a la amplificación *in vitro* multifásica de ácidos nucleicos, que es útil para aumentar la eficiencia y precisión de la amplificación tanto en reacciones uniplex como multiplex, permitiendo una detección más sensible de ácidos nucleicos diana con características de cuantificación mejoradas, así como menos interferencia entre analitos en reacciones multiplex.

Antecedentes de la invención

La amplificación de ácido nucleico proporciona un medio para generar múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico que es relativamente rara o desconocida, para identificar la fuente de ácidos nucleicos, o para producir suficientes ácidos nucleicos para proporcionar una cantidad fácilmente detectable. La amplificación es útil en muchas aplicaciones, por ejemplo, en secuenciación, diagnóstico, desarrollo de fármacos, investigaciones forenses, análisis ambiental y pruebas de alimentos. Se conocen muchos métodos para amplificar secuencias de ácido nucleico *in vitro*, que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación mediada por replicasa, la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), los tipos de amplificación por "círculo rodante" y varios métodos de amplificación asociados a la transcripción. Estos métodos conocidos utilizan diferentes técnicas para hacer secuencias amplificadas, que generalmente se detectan utilizando una variedad de métodos.

La amplificación por PCR utiliza una ADN polimerasa, cebadores oligonucleotídicos y ciclos térmicos para sintetizar copias múltiples de ambas cadenas de un ADN bicatenario (ADNbc) o ADNbc hecho de un ADNc (patentes de EE.UU. nº 4,683,195, 4,683,202 y 4,800,159). La amplificación por LCR utiliza un exceso de dos pares complementarios de sondas monocatenarias que se hibridan con secuencias diana contiguas y se ligan para formar sondas fusionadas complementarias a la diana original, que permite que las sondas fusionadas sirvan como molde para fusiones adicionales en múltiples ciclos de hibridación, ligadura y desnaturalización (patente de EE.UU. nº 5,516,663 y patente eurpea EP 0320308 B1). La amplificación mediada por replicasa utiliza una secuencia de ARN autorreplicante unida a la secuencia de analito y a una replicasa, tal como Qβ-replicasa, para sintetizar copias de la secuencia autorreplicante específica para la replicasa elegida, tal como una secuencia viral Qβ (patente de EE.UU. nº 4,786,600).

La secuencia amplificada se detecta como una molécula sustituta o indicadora de la secuencia del analito. La SDA utiliza un cebador que contiene un sitio de reconocimiento para una endonucleasa de restricción que permite que la endonucleasa corte una cadena de un ADNbc hemi-modificado que incluye la secuencia diana, seguida de una serie de etapas de extensión de cebador y desplazamiento de cadena (patentes de EE.UU. nº 5,422,252 y 5,547,861). Los tipos de amplificación por círculo rodante se basan en una estructura de ácido nucleico circular o concatenada que sirve como molde utilizada para replicar enzimáticamente múltiples copias monocatenarias del molde (*p. ej.*, las patentes de EE.UU. nº 5,714,320 y 5,834,252). La amplificación asociada a la transcripción se refiere a métodos que amplifican una secuencia mediante la producción de múltiples transcritos a partir de un molde de ácidos nucleicos. Tales métodos generalmente utilizan uno o más oligonucleótidos, de los cuales uno proporciona una secuencia promotora, y enzimas con actividades de ARN polimerasa y ADN polimerasa para hacer una secuencia promotora funcional cerca de la secuencia diana y después transcribir la secuencia diana desde el promotor (*p. ej.*, la patentes de EE.UU. nº 4,868,105, 5,124,246, 5,130,238, 5,399,491, 5,437,990, 5,554,516 y 7,374,885; y la publicación PCT nº. WO 1988/010315).

Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos pueden amplificar una secuencia diana específica (*p. ej.*, una secuencia de genes), un grupo de secuencias diana relacionadas o una secuencia secundaria, que se puede denominar una secuencia etiqueta. Esta secuencia etiqueta se puede utilizar para una variedad de propósitos, tales como la detección, amplificación adicional, como una etiqueta de unión para la inmovilización, como un adaptador para utilizar en diversas funciones en reacciones de secuenciación, que incluyen la secuenciación de próxima generación, etc. La secuencia etiqueta es funcional para su propósito previsto solo si la secuencia diana del analito está presente en algún momento durante la reacción. Los métodos de amplificación de ácido nucleico modificados pueden amplificar más de una secuencia diana potencial utilizando un cebador o cebadores "universales" o cebado universal. Una forma de amplificación por PCR utiliza cebadores universales que se unen a secuencias conservadas para amplificar secuencias relacionadas en una reacción de PCR (Okamoto *et al.*, 1992, *J. Gen. Virol.* 73:673-679, Persing *et al.*, 1992, *J. Clin. Microbiol.* 30:2097-2103). Los métodos que utilizan cebadores universales a menudo se combinan con el uso de un cebador o cebadores específicos de especie, gen específicos o específicos de tipo para generar una secuencia amplificada que es única para una especie, variante genética o tipo viral, que se puede identificar mediante secuenciación o detección de alguna otra característica del ácido nucleico amplificado. La PCR anclada es otro método de PCR modificado que utiliza un cebador universal o un cebador "adaptador" para amplificar una secuencia que solo se conoce parcialmente. La PCR anclada introduce una secuencia "adaptadora" o secuencia "universal" en un ADNc y después utiliza un cebador que se une a la secuencia introducida en las etapas de amplificación posteriores. En general, la PCR anclada utiliza un cebador dirigido a una secuencia conocida para hacer un ADNc, añade una secuencia conocida (*p. ej.*, poli-G) al ADNc o utiliza una secuencia común en el ADNc (*p. ej.*,

poli-T), y realiza la PCR utilizando un cebador universal que se une a la secuencia añadida o común en el ADNc y un cebador diana específico secuencia abajo (Loh *et al.*, 1989, *Science* 243:217-220; Lin *et al.*, 1990, *Mol. Cell. Biol.* 10:1818-1821). La PCR anidada puede utilizar cebador o cebadores que contienen una secuencia universal no relacionada con la secuencia diana del analito para amplificar el ácido nucleico a partir de secuencias diana desconocidas en una reacción (Sullivan *et al.*, 1991, *Electrophoresis* 12:17-21; Sugimoto *et al.*, 1991, *Agric. Biol. Chem.* 55:2687-2692).

Chamberlain *et al.* (*Nucleic Acid Res.*, 1988, 16:11141-11156) demostró por primera vez el análisis de PCR multiplex para el gen de la distrofina humana. Las reacciones multiplex se logran mediante una cuidadosa selección y optimización de cebadores específicos. El desarrollo de reacciones multiplex robustas, sensibles y específicas ha exigido una serie de consideraciones de diseño específicas y optimizaciones empíricas. Esto da como resultado largos tiempos de desarrollo y compromete las condiciones de reacción que reducen la sensibilidad del ensayo. A su vez, el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico multiplex se vuelve muy costoso. Se han identificado varios problemas específicos que limitan las reacciones multiplex. La incorporación de conjuntos de cebadores para más de una diana requiere una concordancia cuidadosa de las eficiencias de reacción. Si un cebador amplifica su diana con una eficiencia incluso ligeramente mejor, la amplificación se sesga hacia la diana amplificada de manera más eficiente, lo que resulta en una amplificación ineficiente, una sensibilidad variada y un posible fallo total de otros genes diana en la reacción multiplex. Esto se llama "amplificación preferencial". La amplificación preferencial a veces se puede corregir haciendo coincidir cuidadosamente todas las secuencias de cebadores con longitudes similares y contenido de GC y optimizando las concentraciones de cebadores, por ejemplo, aumentando la concentración de cebadores de las dianas menos eficientes. También se ha utilizado la incorporación de inosina en los cebadores en un intento de ajustar las eficiencias de amplificación del cebador (patente de EE.UU. nº 5,738,995). Otro enfoque es diseñar cebadores quiméricos, donde cada cebador contiene una región 3' complementaria al reconocimiento de la diana específica de secuencia y una región 5' formada por una secuencia universal. El uso del cebador de secuencia universal permite que las eficiencias de amplificación de las diferentes dianas se normalicen (Shuber *et al.*, *Genome Res.*, 1995 5:488-493; y la patente de EE.UU. nº 5,882,856). Los cebadores quiméricos también se han utilizado para multiplexar la amplificación de desplazamiento de cadena isotérmica (patentes de EE.UU. nº 5,422,252, 5,624,825 y 5,736,365).

Dado que múltiples conjuntos de cebadores están presentes en las reacciones de amplificación multiplex, la multiplexación se complica con frecuencia por artefactos resultantes de la reactividad cruzada de los cebadores. Todas las combinaciones posibles se deben analizar de modo que a medida que aumenta el número de dianas esto se vuelve extremadamente complejo y limita severamente la selección del cebador. Incluso las combinaciones de cebadores cuidadosamente diseñadas a menudo producen productos falsos que dan como resultado resultados falsos negativos o falsos positivos. La cinética y la eficiencia de la reacción se alteran cuando se produce más de una reacción simultáneamente. Cada reacción multiplexada para cada tipo de muestra diferente se debe optimizar para la concentración de $MgCl_2$ y la relación con la concentración de desoxinucleótido, la concentración de KCl, la concentración de enzima de amplificación y los tiempos y de reacción de amplificación y temperaturas. Existe una competición por los reactivos en las reacciones multiplex para que todas las reacciones se estabilicen antes. Como consecuencia, las reacciones multiplexadas en general son menos sensibles y con frecuencia propensas a una mayor variabilidad que la reacción uniplex correspondiente.

Otra consideración para las reacciones de amplificación simultáneas es que debe haber un método para la discriminación y detección de cada una de las dianas. El número de dianas multiplexadas está entonces más limitado por el número de colorante u otros restos de marcadores distinguibles dentro de la reacción. A medida que aumenta el número de restos fluorescentes diferentes a detectar, también lo hace la complejidad del sistema óptico y los programas de análisis de datos necesarios para la interpretación de los resultados. Un enfoque es hibridar los productos multiplex amplificados a una fase sólida y después detectar cada diana. Esto puede utilizar una plataforma de hibridación plana con un patrón definido de sondas de captura (patente de EE.UU. nº 5,955,268), o capturar en un conjunto de perlas que se pueden clasificar por citometría de flujo (patente de EE.UU. nº 5,981,180).

Debido a la multitud de cuestiones técnicas discutidas, la tecnología actual para la detección de genes multiplex es costosa y severamente limitada en la cantidad y combinaciones de genes que se pueden analizar. En general, estas reacciones multiplexan solo dos o tres dianas con un máximo de alrededor de diez dianas. Las reacciones de amplificación isotérmica son más complejas que la PCR e incluso más difíciles de multiplexar (Van Deursen *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 1999, 27:e15). La patente de EE.UU. nº 6,605,451 describe una reacción multiplex de PCR de dos etapas donde se añade una pequeña cantidad de cada par de cebadores en una primera mezcla de reacción de PCR, y se realiza una primera amplificación exponencial para aumentar la cantidad de ácidos nucleicos diana en la reacción. La primera reacción se detiene a mitad de la fase logarítmica y después se separa en segundas reacciones, cada una de las cuales contiene pares de cebadores para uno de los ácidos nucleicos diana. Después se realiza una amplificación exponencial completa. Aunque una cantidad limitada de cada uno de los pares de cebadores multiplex está presente en la primera reacción, los problemas discutidos anteriormente comunes a la multiplexación todavía están presentes. Además, estas diversas especies de pares de cebadores se pueden transferir a las reacciones de amplificación secundarias, causando problemas multiplex comunes allí también.

El documento WO2010/126913 describe métodos y kits para uso en la amplificación selectiva de secuencias diana.

El documento WO2007/146154 describe oligonucleótidos etiquetados y su uso en métodos de amplificación de ácidos nucleicos.

El documento WO2011/003020 describe métodos y composiciones para la amplificación de ácido nucleico.

Por consiguiente, todavía existe la necesidad de un método que permita la multiplexación de un gran número de dianas sin grandes limitaciones de diseño y optimización, y que evite los problemas comunes de la multiplexación en presencia de una pluralidad de pares de oligonucleótidos de amplificación diferentes. Además, existe una necesidad continua de mejorar la sensibilidad y la precisión en el límite de detección y/o cuantificación para las reacciones de amplificación multiplex y uniplex. La presente invención aborda estas y otras necesidades.

Compendio de la invención

Como se explica en la técnica, todos los componentes requeridos para la amplificación de ácidos nucleicos están presentes en la mezcla de reacción cuando se inicia la amplificación (en al presente memoria denominado "método monofásico"). Este método monofásico crea un problema porque las reacciones secundarias no deseadas generalmente se inician junto con la reacción de amplificación deseada. Estas reacciones secundarias a menudo compiten y, por lo tanto, degradan el rendimiento general de la reacción de amplificación deseada. Además, en las reacciones de amplificación multiplex, la amplificación de analitos que están presentes en cantidades más altas en la mezcla de reacción o analitos cuya eficiencia de amplificación general es mayor que la de otros analitos compite indebidamente y, por lo tanto, degrada la amplificación de los otros analitos en la mezcla.

El método mejorado descrito en la presente memoria aborda estos problemas llevando a cabo la reacción de amplificación multifásica. Utilizando este método, la reacción o reacciones deseadas se inician y se permite que continúen a un cierto nivel, mientras que el inicio o la progresión de otras reacciones competitivas no es compatible con las condiciones de reacción. De esta manera, las reacciones deseadas, en esencia, se adelantan a las reacciones competitivas, lo que resulta en un mejor rendimiento general de las reacciones deseadas. Además, las reacciones de amplificación multiplex se pueden volver menos competitivas entre sí llevando a cabo el método de amplificación general en fases. Por lo tanto, de manera similar a la situación descrita anteriormente, las reacciones de menor eficiencia y/o las correspondientes a niveles iniciales más bajos de analito diana pueden proceder sin que las otras reacciones progresen sin control y las superen severamente. Se contempla que el principio general de la amplificación multifásica es ampliamente aplicable a una variedad de técnicas de amplificación y se puede realizar en una amplia variedad de modos diferentes, como se describe con más detalle en la presente memoria.

Los aspectos y realizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones.

Por consiguiente, en el primer aspecto, la presente descripción proporciona un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra que incluye al menos dos etapas. Inicialmente, la secuencia de ácido nucleico diana se somete a una reacción de amplificación de primera fase bajo condiciones que no permiten la amplificación exponencial de la secuencia de ácido nucleico diana. La reacción de amplificación de primera fase genera un primer producto de amplificación, que posteriormente se somete a una reacción de amplificación de segunda fase bajo condiciones que permiten la amplificación exponencial del primer producto de amplificación, generando así un segundo producto de amplificación.

Como se señaló anteriormente, en muchos casos, es deseable detectar y cuantificar múltiples secuencias de ácido nucleico diana en la misma muestra. Por consiguiente, en un segundo aspecto, la presente descripción proporciona un método para amplificar una pluralidad de diferentes secuencias de ácido nucleico diana en una muestra que incluye al menos dos etapas. Inicialmente, las secuencias de ácido nucleico diana se someten a una reacción de amplificación de primera fase bajo condiciones que no permiten, o que impiden, la amplificación exponencial de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico diana. La reacción de amplificación de primera fase genera una pluralidad de primeros productos de amplificación, que posteriormente se someten a una reacción de amplificación de segunda fase bajo condiciones que permiten la amplificación exponencial de los primeros productos de amplificación, generando así una pluralidad de segundos productos de amplificación.

En una versión modificada del segundo aspecto, la descripción proporciona un método para amplificar una pluralidad de diferentes secuencias de ácido nucleico diana en una muestra, donde algunas, pero no todas, las secuencias de ácido nucleico diana se someten a amplificación lineal, y/o algunas, pero no todas, de las secuencias de ácido nucleico diana se someten a amplificación exponencial en al menos una fase de la reacción. En consecuencia, se contemplan al menos cuatro posibles variantes de la amplificación de primera fase : (1) algunas de las secuencias diana se someten a amplificación lineal, y el resto no se amplifican; (2) algunas de las secuencias diana se someten a amplificación exponencial, y el resto no se amplifican; (3) algunas de las secuencias diana se someten a amplificación lineal, algunas se someten a amplificación exponencial y el resto no se amplifican; y (4) algunas de las secuencias diana se someten a amplificación lineal y el resto se someten a amplificación exponencial. Por lo tanto, en este aspecto de la descripción, la amplificación de primera fase puede dar como resultado la amplificación de todas las secuencias de ácido nucleico diana (opción 4) o solo un subconjunto de las mismas (opciones 1-3). El subconjunto de las secuencias de ácido nucleico diana puede representar dianas conocidas por estar presentes en cantidades relativamente bajas y/o dianas que son difíciles de amplificar en comparación con otras dianas. La reacción de

amplificación de primera fase genera uno o más primeros productos de amplificación. El primer producto o productos de amplificación y cualquier secuencia o secuencias de ácidos nucleicos diana no amplificada en la muestra se someten a una reacción de amplificación de segunda fase bajo condiciones que permiten la amplificación exponencial de los mismos, generando una pluralidad de segundos productos de amplificación. Alternativamente, puede haber más de dos fases donde las condiciones 1-4 anteriores se pueden aplicar para todas las fases excepto la fase final y donde para la última fase cualquier secuencia o secuencias de ácidos nucleicos diana no amplificadas o linealmente amplificadas en la muestra se somete a una reacción de amplificación bajo condiciones que permiten la amplificación exponencial de la misma.

En un tercer aspecto, la descripción proporciona una composición para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra. La composición incluye los siguientes componentes: (a) un oligonucleótido de amplificación que se hibrida con una primera parte de la secuencia de ácido nucleico diana; (b) un oligonucleótido de captura de la diana opcional que se hibrida con una segunda parte de la secuencia de ácido nucleico diana; y (c) una enzima de amplificación. Una de las características clave de la presente composición es que carece de al menos un componente requerido para la amplificación exponencial de la secuencia de ácido nucleico diana. Como se explica en detalle en otra parte de esta solicitud, una de las ventajas de la presente composición es que ayuda a reducir la amplificación no específica, enfocando así los recursos de amplificación en la secuencia diana.

En un cuarto aspecto, la descripción proporciona una composición alternativa para amplificar una pluralidad de diferentes secuencias de ácido nucleico diana en una muestra. La composición incluye los siguientes componentes: (a) una pluralidad de complejos de oligonucleótidos de amplificación diferentes que se hibridan con una pluralidad de secuencias de ácido nucleico diana diferentes, donde cada complejo de oligonucleótidos de amplificación incluye un primer oligonucleótido de amplificación que tiene una primera secuencia específica diana que se une a un segundo oligonucleótido de amplificación que tiene una segunda secuencia específica diana; (b) un oligonucleótido de captura de la diana que se hibrida con una segunda parte del ácido nucleico diana, y (c) una enzima de amplificación. Una vez más, la composición carece de al menos un componente requerido para la amplificación exponencial de las secuencias de ácido nucleico diana.

En un quinto aspecto, la descripción proporciona un método para cuantificar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra. De acuerdo con el método, primero está la etapa de (a) poner en contacto la muestra con un primer oligonucleótido de amplificación, específico para una primera parte de la secuencia de ácido nucleico diana, bajo condiciones que permitan la hibridación del primer oligonucleótido de amplificación con la primera parte de la secuencia de ácido nucleico diana, generando así un híbrido de preamplificación que incluye el primer oligonucleótido de amplificación y la secuencia de ácido nucleico diana. A continuación, está la etapa de (b) aislar el híbrido de preamplificación mediante captura de la diana en un soporte sólido seguido de lavado para eliminar cualquiera de los primeros oligonucleótidos de amplificación que no se hibridaron con la primera parte de la secuencia de ácido nucleico diana en la etapa (a). Esto es seguido por la etapa de (c) amplificar, en una mezcla de reacción de amplificación de primera fase, al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico diana del híbrido de preamplificación aislado en la etapa (b) en una primera fase, sustancialmente isotérmica, reacción de amplificación asociada a transcripción bajo condiciones que permiten la amplificación lineal de la misma, pero no la amplificación exponencial de la misma, lo que da como resultado una mezcla de reacción que incluye un primer producto de amplificación. En términos generales, la mezcla de reacción de amplificación de primera fase incluye un segundo oligonucleótido de amplificación, siendo el segundo oligonucleótido de amplificación complementario a una parte de un producto de extensión del primer oligonucleótido de amplificación. Además, el primer producto de amplificación no es un molde para la síntesis de ácido nucleico durante la reacción de amplificación asociada a transcripción, sustancialmente isotérmica, de primera fase. A continuación, está la etapa de (d) combinar la mezcla de reacción que incluye el primer producto de amplificación con al menos un componente que participa en la amplificación exponencial del primer producto de amplificación, pero que carece de la mezcla de reacción que incluye el primer producto de amplificación, para producir una mezcla de reacción de amplificación de segunda fase. Generalmente, la mezcla de reacción de amplificación de segunda fase incluye adicionalmente una sonda de hibridación específica de secuencia. A continuación, está la etapa (e) de realizar, en una segunda fase, una reacción de amplificación asociada a transcripción, sustancialmente isotérmica, en la mezcla de reacción de amplificación de segunda fase, una amplificación exponencial del primer producto de amplificación, sintetizando así un segundo producto de amplificación. Esto es seguido por las etapas de (f) detectar, con la sonda de hibridación específica de secuencia a intervalos de tiempo regulares, la síntesis del segundo producto de amplificación en la mezcla de reacción de amplificación de segunda fase; y después (g) cuantificar la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra utilizando los resultados de la etapa de detección (f). En un método generalmente preferido, el primer oligonucleótido de amplificación incluye una secuencia específica diana 3' y una secuencia promotora 5' para una ARN polimerasa. En un caso preferido, la ARN polimerasa es la ARN polimerasa T7. En otro método generalmente preferido, el segundo oligonucleótido de amplificación se extiende enzimáticamente en la reacción de amplificación asociada a transcripción isotérmica de primera fase. En otro método generalmente preferido, el soporte sólido incluye una sonda de captura inmovilizada. En otro método generalmente preferido, la etapa (a) incluye además poner en contacto la muestra con un oligonucleótido de captura de la diana que se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana; y el híbrido de preamplificación incluye la secuencia de ácido nucleico diana hibridada con cada uno de los oligonucleótidos de captura de la diana y el primer oligonucleótido de amplificación. En otro método generalmente preferido, el soporte sólido incluye partículas magnéticamente atraíbles. En otro método generalmente preferido, cada una de las reacciones de amplificación asociadas a la transcripción isotérmica de primera y segunda fase incluye una

ARN polimerasa y una transcriptasa inversa, y la transcriptasa inversa incluye una actividad RNasa H endógena. En otro método generalmente preferido, el al menos un componente incluye el primer oligonucleótido de amplificación. En otro método generalmente preferido, el primer producto de amplificación de la etapa (c) es una molécula de ADNc con la misma polaridad que la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra, y el segundo producto de amplificación de la etapa (e) es una molécula de ARN. En otro método generalmente preferido, la sonda de hibridación específica de secuencia en la etapa (d) es una sonda sensible a la conformación que produce una señal detectable cuando se hibrida con el segundo producto de amplificación. En otro método generalmente preferido, la sonda de hibridación específica de secuencia en la etapa (d) es una sonda de hibridación específica de secuencia marcada con fluorescencia. En otro método generalmente preferido, la etapa (g) incluye cuantificar la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra utilizando una curva de calibración lineal y los resultados de la etapa (f). En otro método generalmente preferido, la etapa (c) incluye la amplificación de 10 veces a 10000 veces, en la mezcla de reacción de amplificación de primera fase.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 Ilustra una realización de la amplificación mediada por transcripción directa de doble fase (TMA). En esta realización, un cebador de amplificación que contiene un promotor T7 ("cebador T7") se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana durante la captura de la diana, seguido de la eliminación del cebador T7 en exceso. El método de amplificación se divide en al menos dos fases distintas. Durante la primera fase, se introduce un cebador no T7 junto con todos los reactivos de amplificación y reactivos enzimáticos necesarios (AR y ER, por sus siglas en inglés, respectivamente), con la excepción del cebador T7 adicional (RT: transcriptasa inversa, por sus siglas en inglés; T7:ARN polimerasa T7). En presencia de transcriptasa inversa, el cebador T7 hibridado con la diana se extiende, creando una copia de ADNc, y el molde de ARN diana se degrada por la actividad RNasa H de RT. El cebador no T7 se hibrida posteriormente con el ADNc y después se extiende, rellenando la región promotora del cebador T7 y creando un molde de doble cadena, activo. La polimerasa T7 produce múltiples transcritos de ARN a partir de el molde. El cebador no T7 se hibrida posteriormente con los transcritos de ARN y se extiende, produciendo copias de ADNc sin promotor del molde de ARN diana. Las cadenas de ARN después se degradan por la actividad RNasa de RT. Debido a que no hay cebador T7 disponible en la mezcla de amplificación de fase 1, la reacción no puede continuar más. La segunda fase se inicia después con la adición de cebador T7, iniciando así la amplificación exponencial del conjunto de ADNc producido en la fase 1.

Las FIG. 2A-2B muestran una comparación entre la TMA directa monofásica estándar (FIG. 2A) y una TMA directa monofásica modificada que se utilizó como control en algunos de los ejemplos de trabajo descritos en la presente memoria (FIG. 2B). El protocolo de TMA directa monofásica estándar es bien conocido en la técnica y se describe en detalle en otra parte de la presente solicitud. En el protocolo de TMA directa monofásica modificada, un cebador T7 se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana durante la captura de la diana, eliminando así la etapa de apareamiento del cebador T7 habitual a una temperatura de 60°C después de la captura de la diana. Posteriormente, se añade un cebador no T7 junto con un cebador T7 adicional y todos los reactivos de amplificación y reactivos enzimáticos requeridos, permitiendo así que continúe la amplificación exponencial. Como se puede ver en las FIG. 2A y 2B, ambos protocolos de TMA monofásica parecen tener sensibilidades comparables en el extremo inferior, detectando de manera fiable 100 o más copias de un molde diana del virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) pero con un rendimiento deficiente en 10 copias del molde diana.

Las FIG. 3A-3C demuestran una comparación entre la TMA directa monofásica modificada y la TMA directa de doble fase. En la FIG. 3A, se utilizó TMA monofásica modificada como se describió anteriormente para amplificar un molde diana de VIH-1. En la FIG. 3B, el mismo molde de VIH-1 se amplificó utilizando la técnica de TMA de doble fase descrita en la FIG.1, es decir, el cebador T7 se retuvo inicialmente de la mezcla de amplificación y se proporcionó en la segunda fase para comenzar la amplificación exponencial. La FIG. 3C representa los ajustes lineales de la curva de calibración, que muestran cambios significativos en la sensibilidad entre las reacciones de amplificación monofásicas y las de doble fase.

Las FIG. 4A-4D ilustran la optimización de la concentración de cebador T7 añadido en la segunda fase de amplificación. En la FIG. 4A, la TMA directa monofásica modificada se utilizó para amplificar un molde diana de VIH-1. En las FIG. 4B-4D, el cebador T7 se retuvo de la mezcla de amplificación en la fase 1, y se proporcionaron diferentes concentraciones de cebador T7 en la segunda fase para iniciar la amplificación exponencial. Se observaron cambios significativos comparables en la sensibilidad y robustez entre las reacciones de amplificación monofásica y de doble fase a 1 pmol/rxn, 5 pmol/rxn y 10 pmol/rxn de cebador T7.

Las FIG. 5A-5D muestran la optimización de la concentración de cebador no T7 añadido en la amplificación de primera fase. En la FIG. 5A, la TMA directa monofásica modificada se utilizó para amplificar un molde diana de VIH-1. En las FIG. 5B-5D, el cebador T7 se retuvo de la mezcla de amplificación en la fase 1 y se proporcionó en la segunda fase para iniciar la amplificación exponencial. Se observaron cambios significativos comparables en la sensibilidad y robustez entre las reacciones de amplificación monofásica y de doble fase a 10 pmol/rxn y 15 pmoL/rxn de cebador no T7. El cambio fue algo menos pronunciado en presencia de 2 pmoL/rxn de cebador no T7.

Las FIG. 6A-6C demuestran el efecto del reactivo enzimático (RT y ARN polimerasa T7) en la segunda fase de amplificación en el rendimiento general del ensayo. En la FIG. 6A, la TMA directa monofásica modificada se utilizó

para amplificar un molde diana de VIH-1. Como antes, en las FIG. 6B-6C, el cebador T7 se retuvo de la mezcla de amplificación en la fase 1 y se proporcionó en la segunda fase para iniciar la amplificación exponencial. En la FIG. 6B, se añadieron cantidades iguales del reactivo enzimático en la primera y segunda fases de la reacción de amplificación. En la FIG. 6C, se añadió la misma cantidad total de reactivo enzimático en la amplificación de primera fase, mientras que no se añadió reactivo enzimático en la segunda fase. Se observaron cambios significativos comparables en la sensibilidad y robustez entre las reacciones de amplificación monofásica y de doble fase en ambos experimentos.

Las FIG. 7A-7C muestran una comparación entre la TMA directa monofásica estándar (FIG. 7A) y de doble fase (FIG. 7B) utilizando un molde diana del subtipo 16 del virus del papiloma humano (VPH16). Como se discutió anteriormente en referencia al molde diana de VIH-1, en el formato de doble fase, el cebador T7 se retuvo de la mezcla de amplificación en la fase 1 y se proporcionó en la segunda fase para iniciar la amplificación exponencial. La FIG. 7C representa los ajustes lineales de la curva de calibración, lo que demuestra un cambio significativo en la sensibilidad entre las reacciones de amplificación monofásica y de doble fase.

Las FIG. 8A-8C muestran una comparación entre la TMA directa monofásica estándar (FIG. 8A) y de doble fase (FIG. 8B) utilizando un molde diana del antígeno 3 de cáncer de próstata (PCA3, por sus siglas en inglés). Como se discutió anteriormente en referencia a los moldes diana de VIH-1 y VPH16, en el formato de doble fase, el cebador T7 se retuvo de la mezcla de amplificación en la fase 1 y se proporcionó en la segunda fase para iniciar la amplificación exponencial. La FIG. 8C representa los ajustes lineales de la curva de calibración, mostrando de manera similar un cambio significativo en la sensibilidad entre las reacciones de amplificación monofásica y de doble fase.

Las FIG. 9A-9F muestran una comparación entre la TMA directa monofásica estándar (FIG. 9A y 9D) y de doble fase (FIG. 9B y 9E) utilizada para la amplificación dúplex de PCA3 y T2-ERG, un marcador de cáncer de próstata formado por fusión génica de la serin proteasa transmembrana regulada por andrógenos (TMPRSS2, por sus siglas en inglés) con el factor de transcripción ETS (ERG). Las FIG. 9A y 9B muestran la detección de PCA3 en presencia de T2-ERG, mientras que las FIG. 9D y 9E muestran detección de T2-ERG en presencia de PCA3. Las FIG. 9C y 9F representan ajustes lineales de la curva de calibración, que muestran cambios significativos en las sensibilidades entre las reacciones de amplificación monofásica y de doble fase para ambas dianas en el contexto de amplificación dúplex.

Las FIG. 10A-10I muestran una comparación entre la TMA directa monofásica estándar (FIG. 10A, 10D y 10G) y la TMA directa de doble fase (FIG. 10B, 10E y 10H) utilizada para la amplificación triplex de PCA3, T2-ERG y el antígeno prostático específico (PSA, por sus siglas en inglés); las FIG. 10A y 10B muestran detección de PCA3 en presencia de T2-ERG y PSA; las FIG. 10D y 10E muestran detección de T2-ERG en presencia de PCA3 y PSA y las FIG. 10G y 10H muestran detección de PSA en presencia de PCA3 y T2-ERG. Las FIG. 10C, 10F y 10I representan ajustes lineales de la curva de calibración, que muestran cambios significativos en las sensibilidades entre las reacciones de amplificación monofásicas y de doble fase para las tres dianas en el contexto de amplificación triplex.

Las FIG. 11A-11C demuestran una comparación entre una TMA inversa monofásica modificada y una TMA inversa de doble fase. En la FIG. 11A, se utilizó una TMA inversa monofásica modificada para amplificar un molde diana T2-ERG. En la TMA inversa monofásica modificada, un cebador no T7 se hibrida con una secuencia de ácido nucleico diana durante la captura de la diana, eliminando así la etapa de apareamiento del cebador no T7 habitual a una temperatura de 60ºC después de la captura de la diana. Posteriormente, se añade un cebador T7 junto con un cebador adicional no T7 y todos los reactivos de amplificación, detección y reactivos enzimáticos necesarios, permitiendo así que continúe la amplificación exponencial. En la FIG. 11B, el mismo molde de T2-ERG se amplificó utilizando un protocolo de TMA inversa de doble fase, donde el cebador no T7 se retuvo de la mezcla de amplificación en la fase 1 y se proporcionó en la segunda fase para iniciar la amplificación exponencial. La FIG. 11C representa los ajustes lineales de la curva de calibración, que muestran cambios significativos en la sensibilidad entre las reacciones de amplificación monofásica y de doble fase.

Las FIG. 12A-12C muestran una comparación entre la TMA inversa monofásica modificada (FIG. 12A), el formato de doble fase descrito en 11 (FIG. 12B), y una TMA inversa en formato de doble fase diferente (FIG. 12C) utilizada para la amplificación cuádruplex de T2-ERG, PCA3, PSA y un control interno (CAP). Las FIG. 12A, 12B y 12C muestran la detección de T2-ERG en presencia de PCA3, PSA y CAP. En la FIG. 12B, las cuatro dianas se sometieron a la misma TMA inversa de doble fase que la descrita anteriormente en relación con la FIG. 11B. En la FIG. 12C, la PCA3, PSA y CAP (o CAP solo) se sometieron a amplificación lineal y T2-ERG se sometió a amplificación exponencial en la primera fase de la reacción, y PCA3, PSA y CAP se sometieron a amplificación exponencial y T2-ERG se continuó amplificando exponencialmente en la segunda fase (todas las reacciones de amplificación procedieron en el mismo recipiente).

Las FIG. 13A-13C muestran una comparación entre la TMA inversa monofásica modificada (FIG. 13A), la de doble fase (FIG. 13B) y la de triple fase (FIG. 13C) utilizada para la amplificación cuádruplex de T2-ERG, PCA3, PSA, y un control interno (CAP). Las FIG.13A, 13B y 13C muestran la detección de T2-ERG en presencia de PCA3, PSA y CAP. En la FIG. 13B, las cuatro dianas se sometieron a la misma TMA inversa de doble fase que la descrita anteriormente en relación con la FIG. 11B. En la FIG. 13C, T2-ERG se sometió a amplificación lineal y los otros 3 analitos no se amplificaron en la fase 1, T2-ERG se sometió a amplificación exponencial y los otros 3 analitos no se amplificaron en la fase 2, y PCA3, PSA y CAP (o CAP solo) se sometieron a amplificación exponencial y T2-ERG se continuó

amplificando exponencialmente en la fase 3 (todas las reacciones de amplificación procedieron en el mismo recipiente).

Descripción detallada de la invención

Para mayor claridad de la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las subsecciones que siguen.

A. Definiciones

A menos que se describa lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que los entendidos comúnmente por los expertos en la técnica de biología molecular basados en literatura técnica, *p. ej.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2nd ed. (Singleton *et al.*, 1994, John Wiley & Sons, Nueva York, NY) u otras publicaciones técnicas bien conocidas relacionadas con la biología molecular. A menos que se describa lo contrario, las técnicas empleadas o contempladas en la presente memoria son métodos estándar bien conocidos en la técnica de biología molecular. Para ayudar a comprender aspectos de los métodos y composiciones descritos, algunos términos se describen con más detalle o se ilustran mediante realizaciones descritas en la presente memoria.

Como se utiliza en la presente memoria, "un" o "una" significa "al menos uno" o "uno o más".

El lenguaje de aproximación, como se utiliza en la presente memoria a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, se puede aplicar para modificar cualquier representación cuantitativa o cualitativa que pueda variar permisiblemente sin dar como resultado un cambio en la función básica con la que está relacionado. En consecuencia, un valor modificado por un término tal como "aproximado" o "aproximadamente" no se debe limitar al valor preciso especificado, y puede incluir valores que difieren del valor especificado.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "muestra" se refiere a una muestra que puede contener un analito de interés, *p. ej.*, microbio, virus, ácido nucleico tal como un gen, o componentes del mismo, que incluye secuencias de ácido nucleico en un analito u obtenidas a partir de un analito. Las muestras pueden ser de cualquier fuente, tal como muestras biológicas o fuentes ambientales. Las muestras biológicas incluyen cualquier tejido o material obtenido a partir de un organismo vivo o muerto que puede contener un analito o ácido nucleico en un analito u obtenido a partir de un analito. Ejemplos de muestras biológicas incluyen tejido respiratorio, exudados (*p. ej.*, lavado broncoalveolar), biopsia, esputo, sangre periférica, plasma, suero, ganglios linfáticos, tejido gastrointestinal, heces, orina u otros fluidos, tejidos o materiales. Ejemplos de muestras ambientales incluyen agua, hielo, tierra, lodos, escombros, biofilms, partículas en el aire y aerosoles. Las muestras pueden ser muestras o materiales procesados, tales como los obtenidos del tratamiento de una muestra mediante filtración, centrifugación, sedimentación o adherencia a un medio, tal como matriz o soporte. Otro procesamiento de muestras puede incluir tratamientos para alterar física o mecánicamente tejidos, agregados celulares o células para liberar componentes intracelulares que incluyen ácidos nucleicos en una solución que puede contener otros componentes, tales como enzimas, tampones, sales, detergentes y similares.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "poner en contacto" significa unir dos o más componentes. El contacto se puede lograr mezclando todos los componentes en una mezcla fluida o semi-fluida. El contacto también se puede lograr cuando uno o más componentes se ponen en contacto físico con uno o más componentes en una superficie sólida, tal como una sección de tejido sólido o un sustrato.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "ácido nucleico" se refiere a un compuesto polinucleotídico, que incluye oligonucleótidos, que comprende nucleósidos o análogos de nucleósidos que tienen bases heterocíclicas nitrogenadas o análogos de bases nitrogenadas, unidas covalentemente por enlaces fosfodiéster estándar u otros enlaces. Los ácidos nucleicos incluyen ARN, ADN, polímeros de ADN-ARN quiméricos o análogos de los mismos. En un ácido nucleico, la cadena principal puede estar compuesta por una variedad de enlaces, que incluyen uno o más enlaces azúcar-fosfodiéster, enlaces péptido-ácido nucleico (PNA, por sus siglas en inglés) (la publicación PCT nº WO 95/32305), enlaces fosforotioato, enlaces metilfosfonato, o combinaciones de los mismos. Los restos de azúcar en un ácido nucleico pueden ser ribosa, desoxirribosa o compuestos similares con sustituciones, *p. ej.*, sustituciones 2' metoxi y 2' haluro (*p. ej.*, 2'-F). Las bases nitrogenadas pueden ser bases convencionales (A, G, C, T, U), análogos de las mismas (*p. ej.*, inosina; *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams et al., Ed., 11th ed., 1992), derivados de bases de purina o pirimidina (*p. ej.*, N4-metil desoxicogaunosina, deaza- o aza-purinas, deaza- o aza-pirimidinas, pirimidinas o purinas con grupos sustituyentes alterados o reemplazados en cualquiera de una variedad de posiciones químicas, *p. ej.*, 2-amino-6-metilaminopurina, O6-metilguanina, 4-tio-pirimidinas, 4-amino-pirimidinas, 4-dimetilhidrazina-pirimidinas y O4-alquil-pirimidinas, o compuestos de pirazolo, tales como pirazolo[3,4-d]pirimidina no sustituido o 3-sustituido (*p. ej.*, patentes de EE.UU. nº 5,378,825, 6,949,367 y la publicación PCT nº WO 93/13121)). Los ácidos nucleicos pueden incluir posiciones "abásicas" en las que la cadena principal no tiene una base nitrogenada en una o más localizaciones (patente de EE.UU. nº 5,585,481), *p. ej.*, una o más posiciones abásicas pueden formar una región enlazadora que une secuencias de oligonucleótidos separadas. Un ácido nucleico puede comprender solo azúcares, bases y enlaces convencionales como los que se encuentran en el ARN y ADN convencionales, o puede incluir componentes y sustituciones convencionales (*p. ej.*, bases convencionales unidas por una cadena principal 2'metoxi, o un polímero que contiene una mezcla de bases convencionales y uno o más análogos). El término incluye

"ácidos nucleicos bloqueados" (LNA, por sus siglas en inglés), que contienen uno o más monómeros de nucleótidos de LNA con una unidad de furanosa bicíclica bloqueada en una conformación de azúcar que simula el ARN, lo que mejora la afinidad de hibridación por secuencias complementarias en ARNmc, ADNmc o ADNbc (Vester *et al.*, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41).

Como se utiliza en la presente memoria, los términos intercambiables "oligonucleótido" y "oligómero" se refieren a polímeros de ácido nucleico generalmente hechos de menos de 1000 nucleótidos (nt), que incluyen aquellos en un intervalo de tamaño que tienen un límite inferior de aproximadamente 2 a 5 nt y un límite superior de aproximadamente 500 a 900 nt. Los oligonucleótidos preferidos están en un intervalo de tamaño que tiene un límite inferior de 5 a 15 nt y un límite superior de 50 a 500 nt, y los tamaños particularmente preferidos están en un intervalo de tamaño que tiene un límite inferior de 10 a 20 nt y un límite superior de 25 a 150 nt. Los oligonucleótidos preferidos se fabrican sintéticamente utilizando cualquier método químico o enzimático *in vitro* bien conocido, y se pueden purificar después de la síntesis utilizando métodos estándar, *p. ej.*, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los oligonucleótidos representativos discutidos en la presente memoria incluyen oligonucleótidos de cebado (*p. ej.*, cebadores, cebadores no T7, promotores-cebadores T7, etc.), proveedores de promotores (que son cebadores promotores que comprenden un extremo 3' bloqueado), oligonucleótidos de sonda de detección, oligonucleótidos de captura de la diana y bloqueadores, por nombrar algunos. Los oligonucleótidos de cebado y los proveedores de promotores generalmente se denominan "oligonucleótidos de amplificación".

Un "oligonucleótido de cebado" (o más simplemente, "cebador") es un oligonucleótido, al menos cuyo extremo 3' es complementario a un molde de ácido nucleico, y cuyos complejos (por enlace de hidrógeno o hibridación) con el molde para dar un complejo cebador:molde adecuado para el inicio de la síntesis por una ADN polimerasa dependiente de ARN o ADN. Un oligonucleótido de cebado se extiende mediante la adición de bases de nucleótidos unidas covalentemente a su extremo 3', cuyas bases son complementarias al molde. El resultado es un producto de extensión de cebador. Un oligonucleótido de cebado tiene típicamente al menos 10 nucleótidos de longitud y puede extenderse hasta 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos de cebado adecuados y preferidos se describen en la presente memoria. Prácticamente todas las ADN polimerasas (incluidas las transcriptasas inversas) que se conocen requieren la combinación de un oligonucleótido con un molde monocatenario ("cebado") para iniciar la síntesis de ADN, mientras que la replicación y transcripción de ARN (copia de ARN del ADN) generalmente no requieren un cebador. Por su propia naturaleza de ser extendido por una ADN polimerasa, un oligonucleótido de cebado no comprende un resto bloqueador 3´.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "complejo de oligonucleótidos de amplificación" se refiere a dos oligonucleótidos de amplificación unidos directa o indirectamente, como se discute a continuación. Por lo tanto, un complejo de oligonucleótidos de amplificación está hecho de un primer oligonucleótido de amplificación y un segundo oligonucleótido de amplificación que están unidos.

Un "oligonucleótido etiquetado" como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido que comprende al menos una primera región y una segunda región, donde la primera región comprende una "secuencia de hibridación diana" que hibrida una secuencia de ácidos nucleicos diana de interés, y donde la segunda región comprende una "secuencia etiqueta" situada en 5' respecto a la secuencia de hibridación diana y que no se hibrida o se une de manera estable a un ácido nucleico diana que contiene la secuencia de ácido nucleico diana. La hibridación de la secuencia de hibridación diana con la secuencia de ácido nucleico diana produce una "secuencia de ácido nucleico diana etiquetada". Las características y consideraciones de diseño para el componente de secuencia de hibridación diana serían las mismas que para los oligonucleótidos de cebado discutidos en la presente memoria. La "secuencia etiqueta" o la "secuencia etiqueta heteróloga" puede ser esencialmente cualquier secuencia siempre que no se hibride de manera estable con la secuencia de ácido nucleico diana de interés y, por lo tanto, participe en la amplificación detectable de la diana nativa (es decir, como se encontraría en una muestra biológica) antes de cualquier modificación de secuencia. La secuencia etiqueta preferiblemente no se hibrida de manera estable con ninguna secuencia obtenida a partir del genoma de un organismo que se está sometiendo a ensayo o, más particularmente, con cualquier ácido nucleico diana bajo condiciones de reacción. Una secuencia etiqueta que está presente en un oligonucleótido etiquetado se diseña preferiblemente de manera que no perjudique sustancialmente o interfiera con la capacidad de la secuencia de hibridación diana para hibridarse con su secuencia diana. Además, la secuencia etiqueta tendrá una longitud y composición suficientes de modo que una vez que se haya incorporado un complemento de la secuencia etiqueta en un producto de extensión de cebador de ADN inicial, se puede utilizar un oligonucleótido de cebado específico de etiqueta para participar en rondas posteriores de amplificación como se describe en la presente memoria. Una secuencia etiqueta tiene típicamente al menos 10 nucleótidos de longitud, y se puede extender hasta 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más nucleótidos de longitud. Los expertos en la técnica reconocerán que el diseño de secuencias etiqueta y oligonucleótidos etiquetados para uso en la presente invención puede seguir cualquiera de una serie de estrategias adecuadas, al tiempo que logra los objetivos y ventajas descritos en la presente memoria. El oligonucleótido etiquetado puede ser un "oligonucleótido de cebado etiquetado" que comprende una secuencia etiqueta y una secuencia de hibridación diana. El oligonucleótido etiquetado puede ser un "oligonucleótido promotor etiquetado" que comprende una secuencia etiqueta, una secuencia de hibridación diana y una secuencia promotora situada en 5' respecto a la secuencia etiqueta y efectiva para iniciar la transcripción a partir de la misma. Se describen ejemplos de secuencias etiquetas y métodos para identificar secuencias etiqueta particularmente útiles en la solicitud de patente provisional de EE.UU. de propiedad conjunta que tiene el número de serie 61/451,285.

Los oligonucleótidos que no se extienden enzimáticamente incluyen oligonucleótidos proveedores de promotores y oligonucleótidos bloqueadores. Estos oligonucleótidos se hibridan con un ácido nucleico diana, o su complemento, pero no se extienden de forma dirigida por el molde por la actividad enzimática de la polimerasa. Para evitar la extensión enzimática de un oligonucleótido, el extremo 3' del oligonucleótido se puede bloquear química o estructuralmente utilizando un resto de bloqueo, como es generalmente conocido en la técnica. Los oligonucleótidos bloqueados se describen, *p. ej.*, en las patente de EE.UU. nº 5,399,491, 5,554,516, 5,824,518 y 7,374,885. Un oligonucleótido bloqueado se refiere a un oligonucleótido que incluye una modificación química y/o estructural que generalmente está cerca o en el extremo 3' y que previene o impide el inicio de la síntesis de ADN del oligonucleótido por medios enzimáticos. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen el uso de una base 3' 2'-dideoxinucleótido, un resto no nucleotídico 3' que impide la extensión enzimática, o la unión de una secuencia corta en orientación 3' a 5' al oligonucleótido para formar un oligonucleótido final con dos terminaciones 5' (es decir, un primer oligonucleótido de 5' a 3' unido a un segundo oligonucleótido 5' a 3', generalmente más corto, uniendo covalentemente los oligonucleótidos en sus terminaciones 3'). Otro ejemplo de una modificación es una "caperuza" compuesta por una secuencia que es complementaria a al menos 3 nt en el extremo 3' del oligonucleótido de tal manera que la base del extremo 5' de la caperuza es complementaria a la base del extremo 3’ del oligonucleótido. Aunque los oligonucleótidos bloqueados no se extienden enzimáticamente, pueden participar en la amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, hibridando a una localización específica en una cadena molde de ácido nucleico para impedir la síntesis de una cadena complementaria más allá de la posición en la que se une el oligonucleótido bloqueado.

Los tamaños de los oligonucleótidos de amplificación generalmente están determinados por las partes funcionales que se incluyen en el oligonucleótido. Las partes del componente de un cebador promotor u oligonucleótido proveedor de promotor incluyen una secuencia promotora específica para una ARN polimerasa (RNP, por sus siglas en inglés). La RNP y sus secuencias promotoras correspondientes son bien conocidas y se pueden purificar o hacer sintéticamente *in vitro* mediante el uso de materiales obtenidos a partir de una variedad de fuentes, *p. ej.*, virus, bacteriófagos, hongos, levaduras, bacterias, células animales, vegetales o humanas. Los ejemplos de RNP y promotores incluyen ARN polimerasa III y su promotor (patente de EE.UU. nº 7,241,618), ARN polimerasa T7 de bacteriófago y su promotor o mutantes de la misma (patentes de EE.UU. nº 7,229,765 y 7,078,170), ARN polimerasa y promotor de *Thermus thermophilus* (patente de EE.UU. nº 7,186,525), ARN polimerasas de VIH-1 o VHC, y RNP directas de plantas (patente de EE.UU. nº 7,060,813). Un cebador promotor u oligonucleótido proveedor incluye una secuencia promotora que está unida funcionalmente a la RNP elegida. Las realizaciones preferidas de cebador promotor u oligonucleótidos proveedores de promotores incluyen una secuencia promotora T7 que se utiliza con RNP T7, donde la secuencia promotora está en el intervalo de 25 a 30 nt, tal como una secuencia promotora de SEQ ID NO:1 (AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGA) o SEQ ID NO:2 (GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGA).

Los oligonucleótidos de amplificación que incluyen una parte de etiqueta típicamente incluyen una secuencia etiqueta en un intervalo de 5 a 40 nt, con tamaños preferidos en un intervalo de 10 a 25 nt, o de 10 a 30 nt, o de 15 a 30 nt. Los oligonucleótidos de amplificación que incluyen una parte específica diana (TS, por sus siglas en inglés) típicamente incluyen una secuencia TS en un intervalo de 10 a 45 nt, con tamaños preferidos en un intervalo de 10 a 35 nt o de 20 a 30 nt. Los oligonucleótidos de amplificación que incluyen múltiples secuencias etiqueta y/o múltiples secuencias TS y/o una secuencia promotora estarán en un intervalo de tamaño que está determinado por la longitud de sus secuencias funcionales individuales. Por ejemplo, un cebador promotor u oligonucleótido proveedor que incluye una secuencia etiqueta y una secuencia TS será la suma de los tamaños de las secuencias de promotor, etiqueta y TS, y puede incluir opcionalmente nucleótidos de enlace o partes no nucleotídicas (*p. ej.*, enlazadores abásicos). Los oligonucleótidos de amplificación formados por múltiples componentes funcionales como se describe en la presente memoria pueden estar unidos covalentemente por enlaces fosfodiéster estándar, enlaces análogos de ácido nucleico o enlaces no ácidos nucleicos directamente entre las diferentes partes funcionales o pueden estar unidos de forma no covalente mediante el uso de secuencias de ácidos nucleicos adicionales o compuestos no nucleicos (*p. ej.*, enlaces abásicos) que sirven como espaciadores y/o enlaces entre partes funcionales. Los oligonucleótidos de amplificación se pueden unir para formar un complejo mediante el uso de enlaces no covalentes, tal como el uso de interacciones de miembros de pares de unión entre los oligonucleótidos, que incluye la hibridación directa de secuencias complementarias contenidas en dos o más oligonucleótidos, o mediante un componente de enlace (que incluye uno o más oligonucleótidos adicionales) a los que se unen los miembros del par de unión individual de un complejo de oligonucleótidos.

Como se utiliza en la presente memoria, "amplificación" de un ácido nucleico diana se refiere al método de creación de cadenas de ácido nucleico *in vitro* que son idénticas o complementarias a al menos a una parte de una secuencia de ácido nucleico diana, o una secuencia universal o secuencia etiqueta que sirve como un sustituto de la secuencia de ácido nucleico diana, todo lo cual solo se hace si el ácido nucleico diana está presente en una muestra. Típicamente, la amplificación de ácido nucleico utiliza una o más enzimas de polimerasa y/o transcriptasa de ácido nucleico para producir múltiples copias de un polinucleótido diana o fragmentos del mismo, o de una secuencia complementaria al polinucleótido diana o fragmentos del mismo, o de una secuencia universal o secuencia etiqueta que se ha introducido en el sistema de amplificación para servir como sustituto del polinucleótido diana, tal como en una etapa de detección, para indicar la presencia del polinucleótido diana en algún punto del ensayo, o como un sitio para cebar más en una reacción de amplificación, o para utilizar en un flujo de trabajo relacionado con la secuenciación o reacción de secuenciación. Las técnicas de amplificación de ácido nucleico *in vitro* son bien conocidas e incluyen métodos de amplificación asociados a la transcripción, tal como la amplificación mediada por transcripción (TMA) o la amplificación

basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA, por sus siglas en inglés), y otros métodos tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR), amplificación mediada por replicasa y reacción en cadena de la ligasa (LCR).

Como se utiliza en la presente memoria, el término "amplificación lineal" se refiere a un mecanismo de amplificación que está diseñado para producir un aumento en el ácido nucleico diana linealmente proporcional a la cantidad de ácido nucleico diana en la reacción. Por ejemplo, se pueden hacer múltiples copias de ARN a partir de un ADN diana utilizando una reacción asociada a la transcripción, donde el aumento en el número de copias se puede describir por un factor lineal (*p. ej.*, copias iniciales del molde x100). En realizaciones preferidas, una amplificación lineal de primera fase en un procedimiento de amplificación multifásica aumenta el número inicial de cadenas de ácido nucleico diana o los complementos de estas en al menos 10 veces, más preferiblemente 100 veces, o aún más preferiblemente de 10 a 1000 veces antes de que se empiece la reacción de amplificación de segunda fase. Un ejemplo de un sistema de amplificación lineal es la "Amplificación lineal de ADN basada en T7" (TLAD, por sus siglas en inglés; véase Liu *et al.*, *BMC Genomics*, 4:Art. No. 19, de 9 de mayo de 2003). Otros métodos se describen en la presente memoria. Por consiguiente, el término "amplificación lineal" se refiere a una reacción de amplificación que no da como resultado la amplificación exponencial de una secuencia de ácido nucleico diana. El término "amplificación lineal" no se refiere a un método que simplemente hace una copia única de una cadena de ácido nucleico, tal como la transcripción de una molécula de ARN en una molécula de ADNc como en el caso de la transcripción inversa (RT)-PCR.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "amplificación exponencial" se refiere a la amplificación de ácidos nucleicos que está diseñada para producir un aumento en el ácido nucleico diana geométricamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico diana en la reacción. Por ejemplo, la PCR produce una cadena de ADN para cada cadena diana original y para cada cadena sintetizada presente. De manera similar, la amplificación asociada a la transcripción produce múltiples transcritos de ARN para cada cadena diana original y para cada cadena sintetizada posteriormente. La amplificación es exponencial porque las cadenas sintetizadas se utilizan como moldes en las siguientes rondas de amplificación. Una reacción de amplificación no necesita realmente producir cantidades exponencialmente crecientes de ácidos nucleicos para ser considerada amplificación exponencial, siempre que la reacción de amplificación esté diseñada para producir tales aumentos.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "amplificación sustancialmente isotérmica" se refiere a una reacción de amplificación que se realiza a una temperatura sustancialmente constante. La parte isotérmica de la reacción puede estar precedida o seguida por una o más etapas a una temperatura variable, por ejemplo, una primera etapa de desnaturalización y una etapa final de inactivación por calor o etapa de enfriamiento. Se entenderá que esta definición de ninguna manera excluye ciertas variaciones de temperatura, preferiblemente pequeñas, sino que se utiliza para diferenciar las técnicas de amplificación isotérmica de otras técnicas de amplificación conocidas en la técnica que se basan básicamente en "temperaturas de ciclado" para generar los productos amplificados. La amplificación isotérmica difiere de la PCR, por ejemplo, en que esta última se basa en ciclos de desnaturalización por calentamiento seguido de hibridación del cebador y polimerización a una temperatura más baja.

Los métodos descritos utilizan aspectos de los sistemas de amplificación isotérmica que generalmente se denominan métodos de "amplificación asociada a la transcripción", que amplifican una secuencia diana mediante la producción de múltiples transcritos a partir de un molde de ácido nucleico. Tales métodos generalmente utilizan uno o más oligonucleótidos, de los cuales uno proporciona una secuencia promotora, desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTP, por sus siglas en inglés), ribonucleósidos trifosfatos (rNTP, por sus siglas en inglés) y enzimas con actividades de ARN polimerasa y ADN polimerasa para generar una secuencia promotora funcional cerca de la secuencia diana y después transcribe la secuencia diana del promotor (*p. ej.*, las patentes de EE.UU. nº 4,868,105, 5,124,246, 5,130,238, 5,399,491, 5,437,990, 5,554,516 y 7,374,885; y las publicaciones PCT nº WO 1988/001302, WO 1988/010315 y WO 1995/003430). Los ejemplos incluyen amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) y replicación de secuencia autosostenida (3SR). Aunque se prefiere el uso de TMA (patentes de EE.UU. nº 5,399,491 y 5,554,516) o amplificación asociada a la transcripción de un cebador (patentes de EE.UU. nº 7,374,885, 7,696,337 y 7,939,260), una persona experta en la técnica apreciará que esos métodos de amplificación alternativa basados en la extensión mediada por polimerasa de secuencias de oligonucleótidos también se pueden utilizar con las composiciones y/o los etapas del método descrito en la presente memoria.

Para ayudar a comprender algunas de las realizaciones descritas en la presente memoria, se resume brevemente el método de TMA que se ha descrito en detalle anteriormente (*p. ej.*, las patentes de EE.UU. nº 5,399,491, 5,554,516 y 5,824,518). En TMA, un ácido nucleico diana que contiene la secuencia a amplificar se proporciona como ácido nucleico monocatenario (*p. ej.*, ARNmc o ADNmc). Se puede utilizar cualquier método convencional para convertir un ácido nucleico bicatenario (*p. ej.*, ADNbc) en un ácido nucleico monocatenario. Un cebador promotor se une específicamente al ácido nucleico diana en su secuencia diana y una transcriptasa inversa (RT) extiende el extremo 3' del cebador promotor utilizando la cadena diana como molde para crear una copia de ADNc, que da como resultado un dúplex ARN:ADNc. La actividad de la ARNasa (*p. ej.*, ARNasa H de la enzima RT) digiere el ARN del dúplex ARN:ADNc y un segundo cebador se une específicamente a su secuencia diana en el ADNc, secuencia abajo del extremo del cebador promotor. Después, la RT sintetiza una nueva cadena de ADN extendiendo el extremo 3' del segundo cebador utilizando el ADNc como molde para crear un ADNbc que contiene una secuencia promotora funcional. La ARN polimerasa específica para el promotor funcional inicia la transcripción para producir

aproximadamente 100 a 1000 transcritos de ARN (copias amplificadas o amplicones) complementarias a la cadena diana inicial. El segundo cebador se une específicamente a su secuencia diana en cada amplicón y la RT crea un ADNc a partir del molde de ARN del amplicón para producir un dúplex ARN:ADNc. La ARNasa digiere el ARN del amplicón del dúplex ARN:ADNc y la secuencia específica diana del cebador promotor se une a su secuencia complementaria en el ADN recién sintetizado y la RT extiende el extremo 3' del cebador promotor, así como el extremo 3' del ADNc para crear un ADNbc que contiene un promotor funcional al cual la ARN polimerasa se une y transcribe amplicones adicionales que son complementarios a la cadena diana. Los ciclos autocatalíticos que utilizan estas etapas repetidamente durante la reacción producen una amplificación de aproximadamente mil millones de veces de la secuencia diana inicial. Los amplicones se pueden detectar durante la amplificación (detección en tiempo real) o en un punto final de la reacción (detección de punto final) mediante el uso de una sonda que se une específicamente a una secuencia contenida en los amplicones. La detección de una señal resultante de las sondas unidas indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra.

Otra forma de amplificación asociada a la transcripción que utiliza un cebador único y uno o más oligonucleótidos de amplificación adicionales para amplificar los ácidos nucleicos *in vitro* haciendo transcritos que indican la presencia del ácido nucleico diana se ha descrito en detalle anteriormente (patentes de EE.UU. 7,374,885, 7,696,337 y 7,939,260). Brevemente, este método de cebador único utiliza un oligonucleótido de cebado, un oligonucleótido promotor (u oligonucleótido proveedor de promotor) que está modificado para evitar el inicio de la síntesis de ADN desde su extremo 3' y, opcionalmente, una molécula bloqueadora (*p. ej.*, un oligonucleótido bloqueado en 3') para terminar el alargamiento de un ADNc de la cadena diana. El método sintetiza múltiples copias de una secuencia diana tratando un ácido nucleico diana que incluye una secuencia diana de ARN con (i) un oligonucleótido de cebado que se hibrida con el extremo 3' de la secuencia diana de modo que se pueda iniciar una reacción de extensión del cebador a partir de la misma y (ii) una molécula bloqueadora que se une al ácido nucleico diana adyacente o cerca del extremo 5' de la secuencia diana. El oligonucleótido de cebado se extiende en una reacción de extensión del cebador utilizando una ADN polimerasa para dar un producto de extensión del cebador de ADN complementario a la secuencia diana, en el que el producto de extensión del cebador de ADN tiene un extremo 3' determinado por la molécula bloqueadora y que es complementario al extremo 5' de la secuencia diana. Después, el método separa el producto de extensión del cebador de ADN de la secuencia diana mediante el uso de una enzima que degrada selectivamente la secuencia diana y trata el producto de extensión del cebador de ADN con un oligonucleótido promotor formado por una primera región que se hibrida con una región 3' del producto de extensión del cebador de ADN para formar un oligonucleótido promotor:híbrido del producto de extensión del cebador de ADN, y una segunda región, que es un promotor para una ARN polimerasa que está situada en 5' de la primera región, donde el oligonucleótido promotor se modifica para evitar la iniciación de síntesis de ADN del oligonucleótido promotor. El método extiende el extremo 3' del producto de extensión del cebador de ADN en el oligonucleótido promotor:híbrido del producto de extensión de cebador de ADN para añadir una secuencia complementaria a la segunda región del oligonucleótido promotor, que se utiliza para transcribir múltiples productos de ARN complementarios al producto de extensión del cebador de ADN utilizando una ARN polimerasa que reconoce el promotor e inicia la transcripción a partir del mismo. Este método produce transcritos de ARN que son sustancialmente idénticos a la secuencia diana.

Un tipo del método de amplificación mediada por transcripción de un cebador sintetiza múltiples copias de una secuencia diana de ARN hibridando al ARN diana un cebador en una localización en la parte 3' de la secuencia diana y un oligonucleótido bloqueado 3' (es decir, el oligonucleótido bloqueador) en una localización en la parte 5' de la secuencia diana. Después, la actividad de ADN polimerasa de RT inicia extensiones desde el extremo 3' del cebador para producir un ADNc en un dúplex con la cadena de molde (un dúplex ARN:ADNc). El oligonucleótido bloqueado 3' se une a la cadena diana en una posición adyacente al extremo 5' previsto de la secuencia a amplificar porque el oligonucleótido bloqueado 3' unido impide la extensión del ADNc más allá de esa localización. Es decir, el extremo 3' del ADNc está determinado por la posición de la molécula bloqueadora porque la polimerización se detiene cuando el producto de extensión alcanza la molécula bloqueadora unida a la cadena diana. El dúplex ARN:ADNc está separado por la actividad ARNasa (RNasa H de RT) que degrada el ARN, aunque los expertos en la técnica apreciarán que se puede utilizar cualquier forma de separación de cadena. Un oligonucleótido proveedor de promotor incluye una secuencia promotora 5' para una ARN polimerasa y una secuencia 3' complementaria a una secuencia en la región 3' del ADNc con el que se hibrida. El oligonucleótido proveedor de promotor tiene un extremo 3' modificado que incluye un resto bloqueador para evitar el inicio de la síntesis de ADN desde el extremo 3' del oligonucleótido proveedor de promotor. En el dúplex formado por el proveedor de promotor hibridado con el ADNc, el extremo 3' del ADNc se extiende mediante el uso de la actividad ADN polimerasa de RT y el oligonucleótido proveedor de promotor sirve como molde para añadir una secuencia promotora al extremo 3' del ADNc, que crea un promotor funcional de doble cadena formado por la secuencia en el oligonucleótido proveedor de promotor y la secuencia de ADNc complementaria hecha a partir del molde del proveedor de promotor. La ARN polimerasa específica para la secuencia promotora se une al promotor funcional y transcribe múltiples transcritos de ARN que son complementarios al ADNc y son sustancialmente idénticos a la secuencia diana de la cadena de ARN diana inicial. El ARN amplificado resultante puede recorrer el método nuevamente uniéndose al cebador y sirviendo como molde para la producción adicional de ADNc, produciendo finalmente muchos amplicones a partir del ácido nucleico diana inicial presente en la muestra. El método de amplificación asociado a la transcripción de cebador único no siempre requiere el uso del oligonucleótido bloqueado en 3' que sirve como molécula bloqueadora y, si no se incluye una molécula de unión, el producto de ADNc hecho a partir del cebador tiene un extremo 3' indeterminado, pero la amplificación continúa sustancialmente como se describió anteriormente. Debido a la naturaleza de este método de amplificación, se realiza bajo condiciones sustancialmente

isotérmicas, es decir, sin ciclos de aumento y disminución de las temperaturas de incubación para separar las cadenas o permitir la hibridación de cebadores como se utiliza en los métodos basados en PCR.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "etiqueta" se refiere a una secuencia de nucleótidos unida covalentemente a una secuencia específica diana de un oligonucleótido con el fin de conferir alguna funcionalidad adicional más allá de la unión a la secuencia diana. Los ejemplos no limitantes de etiquetas de oligonucleótidos incluyen un promotor en 5' para una ARN polimerasa, un sitio de unión de cebador, una etiqueta de secuenciación, una etiqueta de masa, una etiqueta de código de barras, una etiqueta de captura, etc. (*p. ej.*, patente de EE.UU. nº 5,422,252, 5,882,856, 6,828,098 y publicación PCT nº 05/019479). Una etiqueta de oligonucleótido puede ser única para cada secuencia diana o universal (compartida por una pluralidad de secuencias diana, *p. ej.*, la patente de EE.UU. nº 5,104,792), dependiendo de los detalles de un ensayo particular.

Como se utiliza en la presente memoria, la "detección" de los productos amplificados se puede lograr utilizando cualquier método conocido. Por ejemplo, los ácidos nucleicos amplificados pueden estar asociados con una superficie que da como resultado un cambio físico detectable (*p. ej.*, un cambio eléctrico). Los ácidos nucleicos amplificados se pueden detectar en fase de solución o concentrándolos en o sobre una matriz y detectando marcadores asociados con ellos (*p. ej.*, un agente intercalante tal como el bromuro de etidio o el verde cyber). Otros métodos de detección utilizan sondas complementarias a una secuencia en el producto amplificado y detectan la presencia de la sonda:complejo del producto, o utilizan un complejo de sondas para amplificar la señal detectada a partir de productos amplificados (*p. ej.*, patentes de EE.UU. nº 5,424,413, 5,451,503 y 5,849,481). Otros métodos de detección utilizan una sonda en la que la producción de señal está vinculada a la presencia de la secuencia diana porque solo se produce un cambio en la señal cuando la sonda marcada se une al producto amplificado, tal como una baliza molecular, una antorcha molecular o una sonda conmutadora de hibridación (*p. ej.*, las patentes de EE.UU. nº 5,118,801, 5,312,728, 5,925,517, 6,150,097, 6,361,945, 6,534,274, 6,835,542, 6,849,412 y 8,034,554; y la publicación de EE.UU. nº 2006/0194240 A1). Tales sondas generalmente utilizan un marcador (*p. ej.*, fluoróforo) unido a un extremo de la sonda y un compuesto que interactúa (*p. ej.*, extintor) unido a otra localización de la sonda para inhibir la producción de señal del marcador cuando la sonda está en una conformación ("cerrada") que indica que no se hibrida con el producto amplificado, pero se produce una señal detectable cuando la sonda se hibrida con el producto amplificado que cambia su conformación (para "abrirse"). La detección de una señal de sondas marcadas directa o indirectamente que se asocia específicamente con el producto amplificado indica la presencia del ácido nucleico diana que se amplificó.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "marcador" se refiere a un resto molecular o compuesto que se puede detectar o conducir a una respuesta detectable, que se puede unir directa o indirectamente a una sonda de ácido nucleico. El marcaje directo puede utilizar enlaces o interacciones para unir marcador y sonda, lo que incluye enlaces covalentes, interacciones no covalentes (enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e iónicas), o quelatos o complejos de coordinación. El marcaje indirecto puede utilizar un resto puente o conector (*p. ej.*, anticuerpo, oligonucleótido u otro compuesto), que está marcado directa o indirectamente, el cual puede amplificar una señal. Las etiquetas incluyen cualquier resto detectable. Los ejemplos de restos detectables útiles incluyen radionúclidos, ligandos tales como biotina o avidina, enzimas, sustratos enzimáticos, grupos reactivos, cromóforos (colorantes, partículas o perlas detectables), fluoróforos o compuestos luminiscentes (*p. ej.*, marcador bioluminiscente, fosforescente o quimioluminiscente). Los marcadores quimioluminiscentes preferidos incluyen el éster de acridinio ("AE, por sus siglas en inglés") y derivados de los mismos (las patentes de EE.UU. nº 5,639,604, 5,656,207 y 5,658,737). Los marcadores preferidos son detectables en un ensayo homogéneo en el que la sonda marcada unida en una mezcla exhibe un cambio detectable en comparación con la sonda marcada no unida, *p. ej.*, estabilidad o degradación diferencial, sin requerir la separación física de las formas unidas de las no unidas (*p. ej.*, las patentes de EE.UU. nº 5,283,174, 5,656,207 y 5,658,737). Los métodos para sintetizar marcadores, unir marcadores a ácidos nucleicos y detectar marcadores son bien conocidos (*p. ej.*, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold spring Harbor, NY, 1989), Chapter 10; Patentes de EE.UU. nº 4,581,333, 5,283,174, 5,547,842, 5,656,207 y 5,658,737).

Los miembros de un par de unión específico (o copartícipes de unión) son restos que se reconocen y se unen específicamente entre sí. Se puede hacer referencia a los miembros como un primer miembro del par de unión (BPM1, por sus siglas en inglés) y un segundo miembro del par de unión (BPM2), que representan una variedad de restos que se unen específicamente. Los pares de unión específicos se ejemplifican por un receptor y su ligando, enzima y su sustrato, cofactor o coenzima, un anticuerpo o fragmento Fab y su antígeno o ligando, un azúcar y lectina, biotina y estreptavidina o avidina, un ligando y un agente quelante, una proteína o aminoácido y su metal de unión específico tal como histidina y níquel, secuencias polinucleotídicas sustancialmente complementarias, que incluyen secuencias completa o parcialmente complementarias, y secuencias homopoliméricas complementarias. Los pares de unión específicos pueden ser de origen natural (*p. ej.*, enzima y sustrato), sintéticos (*p. ej.*, receptor sintético y ligando sintético) o una combinación de un BPM natural y un BPM sintético.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "captura de la diana" se refiere a la separación selectiva de un ácido nucleico diana de otros componentes de una mezcla de muestra, tal como fragmentos celulares, orgánulos, proteínas, lípidos, carbohidratos u otros ácidos nucleicos. Un sistema de captura de la diana puede ser específico y separar selectivamente un ácido nucleico diana predeterminado de otros componentes de la muestra (*p. ej.*, utilizando una secuencia específica para el ácido nucleico diana deseado), o puede ser inespecífico y separar selectivamente un ácido nucleico diana de otros componentes de la muestra utilizando otras características de la diana (*p. ej.*, un

rasgo físico del ácido nucleico diana que lo distingue de otros componentes de la muestra que no exhiben esa característica física). Los métodos y composiciones de captura de de la diana preferidos se han descrito previamente en detalle (patentes de EE.UU. nº 6,110,678 y 6,534,273; y publicación de EE.UU. nº 2008/0286775 A1). Las realizaciones preferidas de captura de la diana utilizan un oligonucleótido de captura de la diana en fase de solución y una sonda de captura inmovilizada unida a un soporte para formar un complejo con el ácido nucleico diana y separar la diana capturada de otros componentes.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "oligonucleótido de captura de la diana" se refiere a al menos un oligonucleótido de ácido nucleico que abarca o une un ácido nucleico diana y una sonda de captura inmovilizada utilizando miembros de pares de unión, tales como secuencias de ácido nucleico complementarias o biotina y estreptavidina. En un enfoque, el oligonucleótido de captura de la diana se une de forma inespecífica al ácido nucleico diana y lo inmoviliza en un soporte sólido. En un enfoque diferente, una secuencia específica de diana (TS) del oligonucleótido de captura de la diana se une específicamente a una secuencia en el ácido nucleico diana. En ambos enfoques, el oligonucleótido de captura de la diana incluye una región de unión a la sonda de captura inmovilizada que se une a una sonda de captura inmovilizada (*p. ej.*, mediante una interacción de par de unión específica). Cuando tanto la secuencia TS como la región de unión de la sonda de captura inmovilizada son secuencias de ácido nucleico, pueden estar unidas covalentemente entre sí, o pueden estar en diferentes oligonucleótidos unidos por uno o más enlazadores.

Una "sonda de captura inmovilizada" proporciona un medio para unir un oligonucleótido de captura de la diana a un soporte sólido. La sonda de captura inmovilizada es una molécula de reconocimiento de secuencia de bases unida al soporte sólido, que facilita la separación del polinucleótido diana unido del material no unido. Se puede utilizar cualquier soporte sólido conocido, tales como matrices y partículas libres en solución. Por ejemplo, los soportes sólidos pueden ser nitrocelulosa, nylon, vidrio, poliacrilato, polímeros mixtos, poliestireno, silano, polipropileno y, preferiblemente, partículas magnéticamente atraíbles. Los soportes particularmente preferidos incluyen esferas magnéticas que son monodispersas (es decir, de tamaño uniforme ± aproximadamente 5%), proporcionando así resultados consistentes, lo cual es particularmente ventajoso para uso en un ensayo automatizado. La sonda de captura inmovilizada se puede unir directamente (*p. ej.*, mediante un enlace covalente o interacción iónica), o indirectamente al soporte sólido. Los ejemplos comunes de soportes sólidos útiles incluyen partículas o perlas magnéticas.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "separación" o "purificación" generalmente se refiere a la eliminación de uno o más componentes de una mezcla, tal como una muestra, de uno o más componentes en la mezcla. Los componentes de la muestra incluyen ácidos nucleicos en una fase de solución generalmente acuosa, que puede incluir fragmentos celulares, proteínas, carbohidratos, lípidos y otros compuestos. Al menos del 70% al 80%, y más preferiblemente aproximadamente el 95%, del ácido nucleico diana se pueden separar o eliminar de otros componentes en la mezcla.

B. Métodos de amplificación multifásica

Como se señaló anteriormente, el primer aspecto de la presente descripción se refiere a un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra que incluye las siguientes etapas. Inicialmente, la secuencia de ácido nucleico diana se somete a una reacción de amplificación de primera fase bajo condiciones que no permiten la amplificación exponencial de la secuencia de ácido nucleico diana. La reacción de amplificación de primera fase genera un primer producto de amplificación, que posteriormente se somete a una segunda fase de reacción de amplificación bajo condiciones que permiten la amplificación exponencial del primer producto de amplificación, generando así un segundo producto de amplificación.

En este aspecto, la secuencia de ácido nucleico diana puede ser cualquier secuencia de ARN o ADN; sin embargo, la secuencia diana es preferiblemente una secuencia de ARN. Antes de la primera etapa de amplificación, la muestra se puede poner en contacto con un primer oligonucleótido de amplificación bajo condiciones que permitan la hibridación del primer oligonucleótido de amplificación con una parte de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra. El primer oligonucleótido de amplificación generalmente incluye una secuencia específica diana y opcionalmente, una o más secuencias etiqueta. La secuencia etiqueta puede ser una secuencia promotora 5' reconocida por una ARN polimerasa, tal como la ARN polimerasa T7, un sitio de unión del cebador de amplificación, un sitio de unión específico utilizado para la captura o un sitio de unión del cebador de secuenciación. Se puede utilizar un segundo oligonucleótido de amplificación en combinación con el primer oligonucleótido de amplificación antes de la primera etapa de amplificación.

En muchos casos, puede ser deseable aislar la secuencia de ácido nucleico diana antes de la amplificación de primera fase. Para este fin, la muestra se puede poner en contacto con un oligonucleótido de captura de la diana bajo condiciones que permitan la hibridación del oligonucleótido de captura de la diana con una parte de la secuencia de ácido nucleico diana. El ácido nucleico diana se puede capturar directamente en el soporte sólido, por ejemplo, por interacción con una sonda de captura inmovilizada. Alternativamente, el ácido nucleico diana se captura en el soporte sólido como miembro de un complejo de tres moléculas, con el oligonucleótido de captura de la diana puenteando el ácido nucleico diana y la sonda de captura inmovilizada. En cualquier escenario, el soporte sólido típicamente incluye una pluralidad de partículas o perlas magnéticas o magnetizables que se pueden manipular utilizando un campo magnético. Preferiblemente, la etapa de aislar la secuencia de ácido nucleico diana también incluye lavar el

oligonucleótido de captura de la diana:híbrido de secuencia de ácido nucleico diana para eliminar componentes no deseados que pueden interferir con la amplificación posterior.

La etapa de aislar la secuencia de ácido nucleico diana a veces puede incluir poner en contacto la muestra con un primer oligonucleótido de amplificación bajo condiciones que permitan la hibridación del primer oligonucleótido de amplificación con una parte de la secuencia de ácido nucleico diana. La parte de la secuencia diana dirigida por el primer oligonucleótido de amplificación puede ser completamente diferente (*p. ej.*, sin solapamiento) de la parte dirigida por el oligonucleótido de captura de la diana. Alternativamente, la parte de la secuencia diana dirigida por el primer oligonucleótido de amplificación se puede solapar total o parcialmente con, o incluso ser idéntica a, la parte dirigida por el oligonucleótido de captura de la diana. El primer oligonucleótido de amplificación generalmente incluye una secuencia específica diana y opcionalmente, una o más secuencias etiqueta. La secuencia etiqueta puede ser una secuencia promotora 5' reconocida por una ARN polimerasa, tal como la ARN polimerasa T7, y otros sitios funcionales como se describe anteriormente. Se puede utilizar un segundo oligonucleótido de amplificación en combinación con el primer oligonucleótido de amplificación durante la etapa de aislamiento de la secuencia de ácido nucleico diana. Se contempla que el primer y segundo oligonucleótido de amplificación pueden formar un complejo, *p. ej.*, un complejo híbrido directo (DH, por sus siglas en inglés). Al menos uno de los oligonucleótidos de amplificación primero y segundo puede incluir una secuencia etiqueta (*p. ej.*, una etiqueta universal) localizada en 5' a una secuencia específica diana, cuya secuencia etiqueta puede ser dirigida por un oligonucleótido de amplificación durante la segunda fase de amplificación.

Los cebadores de oligonucleótidos de amplificación a menudo se proporcionan en un reactivo de captura de la diana. El reactivo de captura de la diana puede incluir solo uno de los oligonucleótidos de amplificación que se utilizarán en la producción de un producto de amplificación particular en una reacción de amplificación de primera fase. Los oligonucleótidos de amplificación se pueden hibridar con un ácido nucleico diana y aislarse junto con la secuencia diana durante la etapa de captura de la diana. Una ventaja de este método es que al hibridar el oligonucleótido de amplificación con el ácido nucleico diana durante la captura de la diana, los ácidos nucleicos capturados se pueden lavar para eliminar los componentes de la muestra, tales como cebadores, proveedores y/o complejos de oligonucleótidos de amplificación no hibridados. En una reacción multiplex, la eliminación de los oligonucleótidos de amplificación no hibridados permite que la reacción de amplificación multiplex ocurra sin interferencia de los oligonucleótidos de amplificación en exceso, reduciendo o eliminando así sustancialmente los problemas comunes a las reacciones multiplex. Además, si el oligonucleótido de amplificación o el complejo de oligonucleótidos de amplificación comprende una secuencia etiqueta, entonces la etiqueta se incorpora al primer producto de amplificación, permitiendo así la amplificación posterior utilizando cebadores específicos para la secuencia etiqueta.

Como se señaló anteriormente, la reacción de amplificación de primera fase se lleva a cabo bajo condiciones que no permiten la amplificación exponencial de la secuencia de ácido nucleico diana. La reacción de amplificación de primera fase puede ser una reacción de amplificación lineal. La reacción de amplificación de primera fase producirá típicamente una amplificación de aproximadamente 2 veces a aproximadamente 10000 veces, y preferiblemente una amplificación de aproximadamente 10 veces a aproximadamente 10000 veces, de la secuencia de ácido nucleico diana. La reacción de amplificación de primera fase puede ser sustancialmente isotérmica, es decir, no implica el ciclo térmico característico de la PCR y otras técnicas de amplificación populares. Típicamente, la reacción de amplificación de primera fase implicará poner en contacto la secuencia de ácido nucleico diana con una mezcla de reacción de amplificación de primera fase que permita la amplificación lineal de la secuencia de ácido nucleico diana y carezca de al menos un componente que sea necesario para su amplificación exponencial. La mezcla de reacción de amplificación de primera fase puede incluir una enzima de amplificación seleccionada de una transcriptasa inversa, una polimerasa y una combinación de las mismas. La polimerasa se selecciona típicamente de una ADN polimerasa dependiente de ARN, una ADN polimerasa dependiente de ADN, una ARN polimerasa dependiente de ADN y una combinación de las mismas. En realizaciones preferidas, la mezcla de reacción de amplificación de primera fase incluye además una ribonucleasa (RNasa), tal como una RNasa H o una transcriptasa inversa con una actividad RNasa H. Preferiblemente, la mezcla de amplificación de primera fase incluye una transcriptasa inversa con una actividad RNasa H y una ARN polimerasa.

En algunas realizaciones, la mezcla de amplificación de primera fase también puede incluir un oligonucleótido de amplificación. Preferiblemente, el oligonucleótido de amplificación incluye una secuencia promotora 5' para una ARN polimerasa, tal como ARN polimerasa T7, y/o un extremo 3' bloqueado que impide su extensión enzimática. Además, la mezcla de amplificación de primera fase a veces puede incluir un oligonucleótido bloqueador para evitar la extensión enzimática de la secuencia nucleica diana más allá de un punto final deseado.

Como se señaló anteriormente, la característica clave de la reacción de amplificación de primera fase es su incapacidad para permitir una reacción de amplificación exponencial porque faltan uno o más componentes necesarios para la amplificación exponencial, y/o está presente un agente que inhibe la amplificación exponencial, y/o la temperatura de la mezcla de reacción no es propicia para la amplificación exponencial, etc. Sin limitación, el componente que falta para la amplificación exponencial y/o inhibidor y/o condición de reacción se puede seleccionar del siguiente grupo: un oligonucleótido de amplificación (*p. ej.*, un oligonucleótido de amplificación que comprende una secuencia promotora 5' para una ARN polimerasa, un oligonucleótido de amplificación no promotor, o una combinación de los mismos), una enzima (*p. ej.*, una polimerasa, tal como una ARN polimerasa), una nucleasa (*p. ej.*, una exonucleasa, una endonucleasa, un cleavasa, una RNasa, una fosforilasa, una glicosilasa, etc.), un cofactor

enzimático, un quelante (*p. ej.*, EDTA o EGTA), ribonucleótidos trifosfato (rNTP), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), Mg^{2+}, una sal, un tampón, un inhibidor enzimático, un oligonucleótido de bloqueo, pH, temperatura, concentración de sal y una combinación de los mismos. En algunos casos, el componente que falta puede estar involucrado indirectamente, tal como un agente que revierte los efectos de un inhibidor de la amplificación exponencial que está presente en la reacción de primera fase.

Como se señaló anteriormente, la reacción de amplificación de segunda fase (o posterior, si hay más de 2 fases) se lleva a cabo bajo condiciones que permiten la amplificación exponencial de la secuencia de ácido nucleico diana. Por lo tanto, la reacción de amplificación de segunda fase puede ser una reacción de amplificación exponencial. Al igual que la reacción de amplificación de primera fase, la reacción de amplificación de segunda fase es preferiblemente una reacción sustancialmente isotérmica, tal como, por ejemplo, una reacción de amplificación asociada a transcripción o una reacción de amplificación por desplazamiento de cadena. En realizaciones particularmente preferidas, la reacción de amplificación de segunda fase es una reacción de amplificación mediada por transcripción (TMA).

La segunda (o posterior) fase de amplificación generalmente implica poner en contacto el primer producto de amplificación con una mezcla de reacción de amplificación de segunda fase que, en combinación con la mezcla de reacción de amplificación de primera fase, permitirá la amplificación exponencial de la secuencia de ácido nucleico diana. Por lo tanto, la mezcla de reacción de amplificación de segunda fase típicamente incluye, como mínimo, uno o más componentes requeridos para la amplificación exponencial de la que carece la mezcla de reacción de amplificación de primera fase. La mezcla de reacción de amplificación de segunda fase puede incluir un componente seleccionado de un oligonucleótido de amplificación, una transcriptasa inversa, una polimerasa, una nucleasa, una fosforilasa, un cofactor enzimático, un quelante, ribonucleótidos trifosfato (rNTP), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), Mg^{2+}, un pH óptimo, una temperatura óptima, una sal y una combinación de los mismos. La polimerasa se selecciona típicamente de una ADN polimerasa dependiente de ARN, una ADN polimerasa dependiente de ADN, una ARN polimerasa dependiente de ADN y una combinación de las mismas. La mezcla de reacción de amplificación de segunda fase puede incluir además una RNasa, tal como una RNasa H o una transcriptasa inversa con una actividad RNasa H. En algunos casos, la mezcla de reacción de amplificación de segunda fase incluye un oligonucleótido de amplificación, una transcriptasa inversa con una actividad RNasa H y una ARN polimerasa.

El método de la presente invención se puede utilizar para cuantificar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra biológica. Para este fin, la reacción de amplificación de segunda fase es preferiblemente una reacción de amplificación cuantitativa. Típicamente, el presente método incluirá una etapa adicional de detección del segundo producto de amplificación utilizando una variedad de técnicas de detección, *p. ej.*, una sonda de detección, una reacción de secuenciación, electroforesis, espectroscopía de masas, análisis de curva de fusión o una combinación de las mismas. Preferiblemente, el segundo producto de amplificación se cuantifica utilizando una sonda de detección. La etapa de cuantificación se puede realizar en tiempo real, lo que se puede lograr, por ejemplo, si la sonda de detección utilizada para la cuantificación es una baliza molecular, una antorcha molecular, una sonda conmutadora de hibridación o una combinación de las mismas. La sonda de detección se puede incluir en las reacciones de amplificación de primera y/o segunda fase con un grado de éxito básicamente igual.

El presente método puede incluir además una etapa de poner en contacto el segundo producto de amplificación con otro bolo de un componente de amplificación seleccionado de un oligonucleótido de amplificación, una transcriptasa inversa (*p. ej.*, una transcriptasa inversa con una actividad RNasa H), una polimerasa (*p. ej.*, una ARN polimerasa), una nucleasa, una fosforilasa, un cofactor enzimático, un quelante, ribonucleótidos trifosfato (rNTP), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP), Mg^{2+}, una sal y una combinación de los mismos. El propósito de esta etapa adicional es proporcionar un impulso a la reacción de amplificación de segunda fase ya que algunos de los componentes de la reacción de amplificación se pueden agotar con el tiempo.

Un aspecto estrechamente relacionado de la presente descripción se refiere a un método para amplificar una pluralidad de diferentes secuencias de ácido nucleico diana en una muestra que incluye las siguientes etapas. Inicialmente, las secuencias de ácido nucleico diana se someten a una reacción de amplificación de primera fase bajo condiciones que no permiten la amplificación exponencial de ninguna de las secuencias de ácido nucleico diana. La reacción de amplificación de primera fase genera una pluralidad de primeros productos de amplificación, que posteriormente se someten a una reacción de amplificación de segunda (o posterior) fase bajo condiciones que permiten la amplificación exponencial de los primeros productos de amplificación, generando así una pluralidad de segundos productos de amplificación.

En una versión modificada del segundo aspecto, la descripción proporciona un método para amplificar una pluralidad de diferentes secuencias de ácido nucleico diana en una muestra, donde algunas, pero no todas, de las secuencias de ácido nucleico diana se someten a amplificación lineal, y/o algunas, pero no todas, de las secuencias de ácido nucleico diana se someten a amplificación exponencial. Se contemplan al menos tres variantes de la amplificación de primera fase: (1) algunas de las secuencias diana se someten a amplificación lineal, y el resto no se amplifican; (2) algunas de las secuencias diana se someten a amplificación exponencial, y el resto no se amplifican; y (3) algunas de las secuencias diana se someten a amplificación lineal, y el resto se someten a amplificación exponencial. Por lo tanto, la amplificación de primera fase puede dar como resultado la amplificación de todas las secuencias de ácido nucleico diana (opción 3) o solo un subconjunto de las mismas (opciones 1 y 2). El subconjunto de las secuencias de ácido nucleico diana puede representar dianas conocidas por estar presentes en cantidades relativamente bajas y/o dianas

que son difíciles de amplificar en comparación con otras dianas. La reacción de amplificación de primera fase genera uno o más primeros productos de amplificación. El primer producto o productos de amplificación y cualquier secuencia o secuencias de ácido nucleico diana no amplificada en la muestra se someten después a una reacción de amplificación de segunda fase bajo condiciones que permiten la amplificación exponencial de los mismos, generando una pluralidad de segundos productos de amplificación.

Se entiende que los diversos elementos y parámetros opcionales discutidos anteriormente en relación con la amplificación uniplex multifásica (es decir, diana única) también son aplicables a los modos de amplificación multiplex multifásica descritos en la presente memoria.

C. Composiciones para amplificación multifásica

Como se indicó anteriormente, en un tercer aspecto, la presente descripción proporciona una composición para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra que incluye los siguientes componentes: (a) un oligonucleótido de amplificación que se hibrida con una primera parte de la secuencia de ácido nucleico diana; (b) un oligonucleótido de captura de la diana opcional que se hibrida con una segunda parte de la secuencia de ácido nucleico diana; y (c) una enzima de amplificación. Una de las características clave de la presente composición es que carece de al menos un componente requerido para la amplificación exponencial de la secuencia de ácido nucleico diana. Como se explica en detalle en otra parte de esta aplicación, una de las ventajas de la presente composición es que ayuda a reducir la amplificación no específica, enfocando así los recursos de amplificación en la secuencia diana.

En este aspecto, la secuencia de ácido nucleico diana puede ser cualquier secuencia de ARN o ADN. La parte de la secuencia diana dirigida por el primer oligonucleótido de amplificación puede ser completamente diferente (*p. ej.*, sin solapamiento) de la parte dirigida por el oligonucleótido de captura de la diana (si se utiliza). Alternativamente, la parte de la secuencia diana dirigida por el primer oligonucleótido de amplificación se puede solapar total o parcialmente con, o incluso ser idéntica a, la parte dirigida por el oligonucleótido de captura de la diana. En algunos casos especiales, el oligonucleótido de captura de la diana también puede ser estructuralmente idéntico al oligonucleótido de amplificación y realizar una función de amplificación además de la captura de la diana. El oligonucleótido de captura de la diana se puede acoplar directamente a un soporte sólido (*p. ej.*, mediante enlace covalente); alternativamente, la composición puede incluir además una sonda de captura acoplada a un soporte sólido de tal manera que la sonda de captura se hibrida con una parte del oligonucleótido de captura de la diana. El soporte sólido incluye preferiblemente una pluralidad de partículas o perlas magnéticas o magnetizables que se pueden manipular utilizando un campo magnético.

Como se indicó anteriormente, el oligonucleótido de amplificación de la presente composición puede incluir una secuencia específica diana y una secuencia promotora 5' reconocida por una ARN polimerasa, tal como la ARN polimerasa T7. La composición puede incluir al menos dos oligonucleótidos de amplificación, uno de los cuales puede incluir una secuencia promotora 5' para una ARN polimerasa (*p. ej.*, ARN polimerasa T7). El oligonucleótido de amplificación que contiene el promotor puede incluir además una terminación 3' bloqueada que impide su extensión enzimática. En aquellos casos donde la composición incluye dos o más oligonucleótidos de amplificación, los oligonucleótidos pueden formar un complejo, *p. ej.*, un complejo DH. El complejo DH puede incluir un oligonucleótido de amplificación no promotor que incluye una secuencia específica diana unida en su extremo 5' a un miembro de enlace para unir el oligonucleótido de amplificación no promotor a un segundo oligonucleótido de amplificación del complejo DH. El segundo oligonucleótido de amplificación típicamente incluye una secuencia promotora 5' para una ARN polimerasa, tal como la ARN polimerasa T7. Como se explicó con más detalle anteriormente en relación con la amplificación de cebador único, el segundo oligonucleótido de amplificación puede incluir a veces un extremo 3' bloqueado que impide su extensión enzimática. El miembro de enlace del oligonucleótido de amplificación no promotor típicamente incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una parte del segundo oligonucleótido de amplificación. En los casos donde el segundo oligonucleótido de amplificación incluye una secuencia promotora, el miembro de enlace del primer oligonucleótido de amplificación incluye preferiblemente una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una parte de la secuencia promotora del segundo oligonucleótido de amplificación. Al menos uno de los oligonucleótidos de amplificación puede incluir una secuencia etiqueta (*p. ej.*, una etiqueta universal) localizada en 5' a una secuencia específica diana. Además, la presente composición puede incluir un oligonucleótido bloqueador para evitar la extensión enzimática de la secuencia nucleica diana más allá de un punto final deseado.

La enzima de amplificación de la presente composición puede estar en forma de una transcriptasa inversa, una polimerasa o una combinación de las mismas. La polimerasa se puede seleccionar de una ADN polimerasa dependiente de ARN, una ADN polimerasa dependiente de ADN, una ARN polimerasa dependiente de ADN y una combinación de las mismas. La composición preferiblemente incluye además una RNasa, tal como una RNasa H o una transcriptasa inversa con una actividad RNasa H. En algunos casos, la composición puede incluir además una sonda de detección para monitorizar la reacción de amplificación isotérmica en tiempo real, la cual se puede seleccionar de una baliza molecular, una antorcha molecular, una sonda conmutadora de hibridación y una combinación de las mismas.

Como se indicó anteriormente, una de las características clave de la presente composición es su falta de al menos un componente requerido para la amplificación exponencial de la secuencia de ácido nucleico diana. El componente requerido que falta para la amplificación exponencial puede ser un oligonucleótido de amplificación (*p. ej.*, un cebador

promotor o un cebador no promotor), una polimerasa (*p. ej.*, una ARN polimerasa), una nucleasa, una fosforilasa, un cofactor enzimático, un quelante, uno o más ribonucleótidos trifosfatos (rNTP), Mg^{2+}, un pH óptimo, una temperatura óptima, una sal, una concentración óptima de sal o una combinación de los mismos. Se entiende que esta lista no es exhaustiva y puede incluir otros componentes que son necesarios para que se produzca una reacción de amplificación exponencial.

Cuando se planea la amplificación multiplex, la presente composición puede incluir una pluralidad de oligonucleótidos de captura de la diana diferentes y una pluralidad de oligonucleótidos de amplificación diferentes que se hibridan con una pluralidad de secuencias de ácido nucleico diana diferente.

Como se indicó anteriormente, la presente descripción también proporciona una composición alternativa para amplificar una pluralidad de diferentes secuencias de ácido nucleico diana en una muestra. Esta composición alternativa incluye los siguientes componentes: (a) una pluralidad de complejos de oligonucleótidos de amplificación diferentes que se hibridan con una pluralidad de secuencias de ácido nucleico diana diferentes, donde cada complejo de oligonucleótidos de amplificación incluye un primer oligonucleótido de amplificación, que tiene una primera secuencia específica diana, que está directa o indirectamente unido a un segundo oligonucleótido de amplificación, que tiene una segunda secuencia específica diana; y (b) una enzima de amplificación. Una vez más, la composición carece de al menos un componente requerido para la amplificación exponencial de las secuencias de ácido nucleico diana.

Uno de los oligonucleótidos de amplificación primero y segundo incluye una secuencia promotora 5' para una ARN polimerasa, tal como ARN polimerasa T7. Como se explica con más detalle anteriormente en relación con la amplificación de cebador único, el oligonucleótido de amplificación que contiene el promotor puede incluir un extremo 3' bloqueado que impide su extensión enzimática. Al menos uno de los oligonucleótidos de amplificación primero y segundo también puede incluir una secuencia etiqueta (*p. ej.*, una etiqueta universal) localizada en 5' a una secuencia específica diana. La composición puede incluir además un oligonucleótido bloqueador para evitar la extensión enzimática de la secuencia nucleica diana más allá de un punto final deseado.

La composición también puede incluir una pluralidad de oligonucleótidos de captura de la diana diferentes que se hibridan con las secuencias de ácido nucleico diana. El oligonucleótido de captura de la diana se puede acoplar directamente a un soporte sólido (*p. ej.*, mediante enlace covalente); alternativamente, la composición puede incluir además una sonda de captura acoplada a un soporte sólido de tal manera que la sonda de captura se hibrida con una parte del oligonucleótido de captura de la diana. El soporte sólido incluye preferiblemente una pluralidad de partículas o perlas magnéticas o magnetizables que se pueden manipular utilizando un campo magnético.

Como se indicó anteriormente, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria son útiles para amplificar secuencias de ácido nucleico diana *in vitro* para producir secuencias amplificadas que se pueden detectar para indicar la presencia del ácido nucleico diana en una muestra. Los métodos y composiciones son útiles para sintetizar ácidos nucleicos amplificados para proporcionar información útil para hacer diagnósticos y/o pronósticos de afecciones médicas, detectar la pureza o calidad de muestras ambientales y/o alimentarias, o investigar evidencia forense. Los métodos y composiciones son ventajosos porque permiten la síntesis de una variedad de ácidos nucleicos para proporcionar ensayos altamente sensibles en un amplio rango dinámico que son relativamente rápidos y económicos de realizar, lo que los hace adecuados para su uso en sistemas de alto rendimiento y/o automatizados. Los métodos y composiciones se pueden utilizar para ensayos que analizan secuencias diana individuales, es decir, sistemas de amplificación uniplex, y son especialmente útiles para ensayos que analizan simultáneamente múltiples secuencias diana diferentes, es decir, sistemas de amplificación multiplex. Las composiciones preferidas y las mezclas de reacciones se proporcionan en kits que incluyen componentes de ensayo definidos que son útiles porque permiten al usuario realizar de manera eficiente métodos que utilizan los componentes juntos en un ensayo para amplificar las dianas deseadas.

Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria se pueden entender mejor por los ejemplos que siguen. Las etapas del método utilizadas en los ejemplos se han descrito en la presente memoria y la siguiente información describe los reactivos y condiciones típicos utilizados en los métodos con más particularidad. Los expertos en la técnica de amplificación de ácidos nucleicos apreciarán que se pueden utilizar otros reactivos y condiciones que no afectarán sustancialmente el método o los resultados, siempre y cuando se siga la orientación proporcionada en la descripción anterior. Por ejemplo, aunque los métodos de amplificación mediada por transcripción (TMA) se describen en los ejemplos a continuación, los métodos reivindicados no se limitan a las realizaciones basadas en TMA. Además, los expertos en la técnica de biología molecular también comprenderán que los métodos y composiciones descritos se pueden realizar manualmente o en un sistema que realiza una o más etapas (*p. ej.*, pipeteo, mezcla, incubación y similares) en un dispositivo automatizado o se utiliza en cualquier tipo de dispositivo conocido (*p. ej.*, tubos de ensayo, dispositivos de unidades de múltiples tubos, dispositivos de múltiples pocillos, tales como placas de microtitulación de 96 pocillos, y similares).

Ejemplos

Los reactivos ejemplares utilizados en los métodos descritos en los ejemplos incluyen los siguientes.

El "medio de transporte de muestra" o "STM", por sus siglas en inglés, es una solución tamponada con fosfato (pH 6.7) que incluía EDTA, EGTA y lauril sulfato de litio (LLS).

El "reactivo de captura de la diana" o "TCR" es una solución tamponada con HEPES (pH 6.4) que incluía cloruro de litio y EDTA, junto con 250 µg/ml de partículas magnéticas (1 micrón de partículas SERA-MAG™ MG-CM, Seradyn, Inc. Indianapolis, IN) con oligonucleótidos $(dT)_{14}$ unidos covalentemente a los mismos.

La "solución de lavado de captura de la diana" o "solución de lavado de TC" es una solución tamponada con HEPES (pH 7.5) que incluía cloruro de sodio, EDTA, etanol absoluto al 0.3% (v/v), metil parabeno al 0.02% (p/v), propil parabeno al 0.01% (p/v) y lauril sulfato de sodio al 0.1% (p/v).

El "reactivo de amplificación" o "AR", por sus siglas en inglés, es una solución tamponada con HEPES (pH 7.7) que incluía cloruro de magnesio, cloruro de potasio, cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), cuatro ribonucleótidos trifosfatos (rATP), rCTP , rGTP y rUTP). Se pueden añadir cebadores y/o sondas a la mezcla de reacción en el reactivo de amplificación, o se pueden añadir por separado del reactivo (reactivo de amplificación sin cebador).

Los "reactivos enzimáticos" o "ER", por sus siglas en inglés, como se utilizan en las mezclas de reacción de amplificación o preamplificación, son soluciones tamponadas con HEPES (pH 7.0) que incluyen transcriptasa inversa (RT) MMLV, ARN polimerasa T7, sales y cofactores.

Ejemplo 1

Protocolo de amplificación monofásica estándar

A continuación, se presenta un protocolo ejemplar para reacciones TMA monofásicas estándar que detectan resultados en tiempo real. El ensayo incluye la purificación de ácidos nucleicos diana antes de la amplificación, amplificación y detección de los productos amplificados durante la amplificación.

La captura de la diana se realiza básicamente como se describió previamente en detalle (patente de EE.UU. nº 6,110,678, 6,280,952 y 6,534,273). Brevemente, las muestras se preparan para contener cantidades conocidas de ARN diana (transcritos *in vitro* ("IVT") presentes a un nivel de copia predeterminado por muestra en un volumen total de 400 ml de una mezcla 1:1 (v:v) de agua y medio de transporte de muestra). Cada muestra se mezcla con 100 ml de TCR que generalmente contiene 5 pmol de oligonucleótido de captura de la diana (TCO) específico para el ácido nucleico analito a capturar (es decir, región de unión específica de diana 3') y una región de cola 5' (*p. ej.*, secuencia dT_3A_{30}) para unirse a la sonda inmovilizada (*p. ej.*, oligonucleótidos poli-T unidos a partículas paramagnéticas; 12.5 µg de partículas con oligonucleótidos unidos por reacción). Las mezclas se incuban durante 25 a 30 minutos a una temperatura de 60 ±1ºC y después durante 25 a 30 minutos a temperatura ambiente (20 a 25°C) para formar complejos de hibridación a través de los cuales los ácidos nucleicos diana se unen a las partículas paramagnéticas aisladas mediante separación magnética (*p. ej.*, procesador de partículas magnéticas KingFisher96™, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) y se lavó una vez con una solución de lavado TC.

Las partículas se vuelven a suspender en 0.075 ml de reactivo de amplificación y con oligonucleótidos de amplificación utilizados en la amplificación. Las sondas de detección (*p. ej.*, las sondas de baliza molecular o antorcha molecular marcadas con un compuesto marcador fluorescente) se pueden añadir con oligonucleótidos de amplificación, o con la adición de enzimas, o después de la adición de enzimas. Las mezclas de reacción se cubren para evitar la evaporación y se incuban durante 1 a 2 minutos a una temperatura de 42 ± 0,5ºC. Mientras se mantienen a una temperatura de 42 ± 0,5ºC, las mezclas se descubrieron y se mezclaron con 0.025 ml de reactivo enzimático por mezcla, se cubrieron nuevamente, y se incubó durante 30 a 40 minutos a 42 ± 0.5ºC, tiempo durante el cual se midió la fluorescencia a intervalos de tiempo regulares (*p. ej.*, cada minuto o varias lecturas por minuto) que se conocen como "ciclos" para la recolección y visualización de datos, que es típicamente un gráfico de unidades de fluorescencia detectadas frente al tiempo, a partir del cual se determina un tiempo de aparición de la señal ("Tiempo T", es decir, el tiempo en el que la señal de fluorescencia para una muestra se vuelve positiva sobre un nivel de fondo predeterminado).

Ejemplo 2

Evaluación de la amplificación de VIH-1 de doble fase en formato TMA directa

En este ejemplo, se evaluó la TMA directa de doble fase utilizando un virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), conteniendo el molde diana subtipo B la región *pol*.

En el enfoque de amplificación de doble fase utilizado en la presente memoria, que se resume brevemente en la FIG. 1, un cebador T7 se hibridó con la secuencia de VIH-1 diana durante la captura de la diana, seguido de la eliminación del cebador T7 en exceso. El método de amplificación se dividió en dos fases distintas. Durante la primera fase, se introdujo un cebador no T7 junto con todos los reactivos de amplificación, detección y reactivos enzimáticos necesarios, con la excepción del cebador T7 adicional. En presencia de transcriptasa inversa, el cebador T7 hibridado con la diana se extendió, creando una copia de ADNc, y el molde de ARN diana se degradó por la actividad de la transcriptasa inversa RNasa H. El cebador no T7 se hibridó posteriormente con el ADNc y después se extendió,

rellenando la región promotora del cebador T7 y creando un molde activo de doble cadena. La polimerasa T7 produjo múltiples transcritos de ARN a partir del molde. El cebador no T7 posteriormente se hibridó con los transcritos de ARN y se extendió, produciendo copias de ADNc sin promotor del molde de ARN diana. Las cadenas de ARN se degradaron por la actividad RNasa de la transcriptasa inversa. Debido a que estaba disponible el cebador no T7 en la mezcla de amplificación de fase 1, la reacción no pudo continuar más. La segunda fase se inició después con la adición de cebador T7, iniciando así la amplificación exponencial del conjunto de ADNc producido en la fase 1.

Los resultados de la evaluación inicial del enfoque de doble fase se muestran en las FIG. 3A-3C. La FIG. 3A muestra los resultados de un experimento de amplificación monofásica que se modificó para imitar el formato de doble fase. Más específicamente, se añadió el cebador T7 durante la etapa de captura de la diana (permitiendo que la etapa de apareamiento estándar a una temperatura de 60ºC se elimine del protocolo); no se añadieron cebadores ni reactivos enzimáticos en la primera fase; y los cebadores no T7 y T7, así como el reactivo enzimático, se añadieron a la segunda fase para el inicio de la amplificación exponencial. Para abordar la preocupación que este protocolo modificado para el control monofásico estándar puede haber comprometido algo su rendimiento, comparamos el protocolo directo monofásico modificado con la TMA directa monofásica estándar (FIG. 2A-2B). Como se puede ver en las FIG. 2A y 2B, los dos protocolos dieron como resultado niveles muy similares de precisión y sensibilidad de detección. Por el contrario, el protocolo de doble fase produjo una sensibilidad y precisión significativamente mejoradas en el extremo inferior de la concentración de analito (~20 copias/rxn) en comparación con el formato monofásico estándar en estas condiciones (FIG. 3B). En particular, el formato de doble fase produjo un rendimiento superior tanto en términos de precisión como de tiempo de detección más corto (Figura 3C).

Ejemplo 3

Optimización de los parámetros de amplificación de VIH-1 de doble fase

La primera prioridad en el método de optimización fue ralentizar los tiempos de emergencia y separar los niveles de entrada diana individuales para permitir una cuantificación exacta y precisa, así como reducir cualquier posible interferencia con el cebador no T7. Esto se logró disminuyendo gradualmente la concentración de cebador T7 en la segunda fase (la cantidad utilizada en la reacción de doble fase representada en la FIG. 3B fue 10 pmol/rxn). El ensayo se mostró para retener una sensibilidad de 10 copias/rxn y una alta precisión con la cantidad más baja de proveedor de T7 sometida a ensayo (1.0 pmol/rxn; FIG. 4A-4D).

Asimismo, el cebador no T7 también se disminuyó gradualmente (la cantidad utilizada en la reacción de doble fase representada en la Figura 3B fue 15 pmol/rxn) mientras se mantuvo constante el cebador T7 a 1 pmol/rxn. Se encontró que un nivel de 10 pmol/rxn era suficiente para una amplificación sensible sin perder precisión (FIG. 5A). A un nivel de 2 pmol/rxn de cebador no T7, la precisión a 10 copias/rxn no fue tan buena como con 10 pmol/rxn de cebador no T7 (FIG. 3B), pero el rendimiento del ensayo aún fue superior a la del control monofásico (FIG. 3A).

Por lo tanto, los presentes autores encontraron inesperadamente que el formato de amplificación de doble fase permite reducir sustancialmente las concentraciones de cebador y aún lograr un rendimiento superior en comparación con el formato monofásico, mientras se reduce la formación de productos secundarios y la interferencia multiplex.

También se examinó la necesidad de un bolo adicional de enzima en la segunda fase (FIG. 6A-6C). La restricción de la adición de enzimas a la primera fase dio como resultado una mejora moderada en la precisión en el extremo inferior de las concentraciones de analito sometidas a ensayo (FIG. 6B y 6C). Además, cada nivel de copia surgió aproximadamente cinco minutos después en relación con el formato de doble fase donde el reactivo enzimático estaba presente en ambas fases. Sin embargo, la mejora observada previamente en la sensibilidad se mantuvo.

Ejemplo 4

Amplificación de doble fase de VPH16

Para determinar si el formato de amplificación de doble fase tiene una amplia aplicabilidad más allá de la detección del VIH-1, se sometió a ensayo en el virus del papiloma humano subtipo 16 (VPH16).

El protocolo de amplificación de doble fase era esencialmente el mismo que el descrito anteriormente en el ejemplo 2. Brevemente, un cebador T7 se hibridó con la secuencia diana de VPH16 durante la captura de la diana, seguido de la eliminación del cebador T7 en exceso. En la amplificación de primera fase, se añadió un cebador no T7 junto con todos los reactivos necesarios de amplificación, detección y reactivos enzimáticos, con la excepción del cebador T7 adicional. Después de cinco minutos a una temperatura de 42°C, se añadió el cebador T7 a la mezcla de reacción para iniciar la fase de amplificación exponencial, que también se llevó a cabo a una temperatura de 42°C con detección en tiempo real. El experimento de control monofásico se llevó a cabo utilizando los mismos cebadores y la sonda de detección en el formato de TMA directa monofásica estándar como se describe en el Ejemplo 1.

Los resultados del experimento de amplificación de VPH16 se muestran en las FIG. 7A-7C. Como se muestra en la FIG. 7A, el formato monofásico fue capaz de detectar el molde diana hasta ~ 500 copias/ml (~200 copias/rxn), mientras que el formato de doble fase mejoró la sensibilidad más de 15 veces a ~30 copias/ml (~13 copias/rxn) (FIG. 7B).

Además, de acuerdo con nuestras observaciones anteriores, el formato de amplificación de doble fase se asoció con una reducción significativa en el tiempo de detección en comparación con el formato monofásico (FIG. 7C).

Ejemplo 5

Amplificación de doble fase de PCA3

Además, el formato de amplificación de doble fase se sometió a ensayo en el antígeno de cáncer de próstata 3 (PCA3).

Se utilizó un protocolo de amplificación de doble fase similar. Brevemente, un cebador T7 se hibridó con la secuencia PCA3 diana durante la captura de la diana, seguido de la eliminación del cebador T7 en exceso. En la primera fase de amplificación, se añadió un cebador no T7 junto con todos los reactivos necesarios de amplificación y reactivos enzimáticos, con la excepción del cebador T7 adicional y una sonda de detección de antorcha molecular. Después de cinco minutos a una temperatura de 42°C, el cebador T7 y la sonda de detección se añadieron a la mezcla de reacción para comenzar la fase de amplificación exponencial, que también se llevó a cabo a una temperatura de 42°C con detección en tiempo real. El experimento de control monofásico se llevó a cabo utilizando los mismos cebadores y la sonda de detección en el formato de TMA monofásica estándar.

Los resultados del experimento de amplificación de PCA3 se muestran en las FIG. 8A-8C. Como se puede ver en las FIG. 8A-8B, el formato de doble fase produjo una sensibilidad y precisión significativamente mejoradas en el extremo inferior de la concentración de analito (~130 copias/ml, lo que equivale a ~50 copias/rxn) en comparación con el formato monofásico estándar. Además, de forma similar a nuestras observaciones anteriores, el formato de amplificación de doble fase se asoció con una reducción significativa en el tiempo de detección en comparación con el formato monofásico (FIG. 8C).

Ejemplo 6

Amplificación conjunta de doble fase de PCA3 y T2-ERG

A continuación, empleamos el formato de amplificación de doble fase para la amplificación simultánea de múltiples dianas. En este ejemplo, los moldes diana de PCA3 y T2-ERG se amplificaron conjuntamente utilizando el protocolo de TMA directa de doble fase para determinar si la amplificación dúplex dará como resultado la misma mejora en la sensibilidad y precisión que hemos observado previamente en ensayos uniplex (Ejemplos 2-5), además de proporcionar una reducción en la interferencia entre analitos que a menudo se observa en un formato monofásico estándar.

Brevemente, los cebadores T7 se hibridaron con las secuencias PCA3 y T2-ERG diana durante la captura de la diana, seguido de la eliminación de cebadores T7 en exceso. En la amplificación de primera fase, se añadieron cebadores no T7 junto con todos los reactivos necesarios de amplificación, detección y reactivos enzimáticos, con la excepción de cebadores T7 adicionales. Después de cinco minutos a una temperatura de 42°C, los cebadores T7 se añadieron a la mezcla de reacción para iniciar la fase de amplificación exponencial, que también se llevó a cabo a una temperatura de 42°C con detección en tiempo real en dos canales fluorescentes diferentes (uno para cada diana). El experimento de control monofásico se llevó a cabo utilizando los mismos cebadores y sondas de detección en el formato de TMA directa monofásica estándar como se describe en el Ejemplo 1.

Los resultados de la amplificación de PCA3 en presencia de T2-ERG se muestran en las FIG. 9A-9C. Como se puede ver en las FIG. 9A-9B, el formato de doble fase produjo una sensibilidad y precisión significativamente mejoradas en el extremo inferior de la concentración de analito (~1250 copias/ml, que es equivalente a ~500 copias/rxn) en comparación con el formato monofásico estándar. Estos resultados demuestran que el formato de doble fase es efectivo para reducir la interferencia analito-analito en una reacción multiplex. Además, de acuerdo con nuestras observaciones anteriores, el formato de amplificación de doble fase se asoció con una reducción significativa en el tiempo de detección en comparación con el formato monofásico (FIG. 9C).

Los resultados de la amplificación de T2-ERG en presencia de PCA3 se muestran en las FIG. 9D-9F. Como se muestra en la FIG. 9D, el formato monofásico fue capaz de detectar el molde diana hasta ~500 copias/ml (~200 copias/rxn), mientras que el formato de doble fase mejoró la sensibilidad al menos 10 veces a ~50 copias/ml (~20 copias/rxn) (FIG. 9E). Estos resultados también demuestran que el formato de doble fase es efectivo para reducir la interferencia analito-analito en una reacción multiplex. Además, de acuerdo con nuestras observaciones anteriores, el formato de amplificación de doble fase se asoció con una reducción significativa en el tiempo de detección en comparación con el formato monofásico (FIG. 9F).

En particular, las ventajas combinadas de una sensibilidad y precisión de ensayo mejoradas, y una menor interferencia entre las reacciones competitivas en el formato de amplificación multiplex (es decir, como lo demuestra la comparación del rendimiento de analito único y analito doble, tal como el rendimiento de PCA3 solo en un formato monofásico como se muestra en la FIG 8A, donde 1.1×10^3 copias produce una señal fuerte, y el rendimiento de PCA3 en presencia de T2 en un formato monofásico como se muestra en la Figura 9A, donde 1.25×10^3 copias de PCA3 producen una señal débil (debido a la interferencia de T2), y el rendimiento de PCA3 en presencia de T2 en un formato de doble fase como se muestra en la Figura 9B, donde 1.25×10^3 copias de PCA3 producen una señal muy fuerte como resultado de una

reducción significativa en la interferencia debido a T2) fue una característica general de los ensayos en formato de doble fase. Estas ventajas espectaculares no se habrían predicho antes de esta demostración. A continuación, se muestran demostraciones adicionales de esta característica del método de amplificación de ácido nucleico de doble fase.

Ejemplo 7

Amplificación conjunta de doble fase de PCA3, PSA y T2-ERG

En este ejemplo, los moldes diana de PCA3, PSA y T2-ERG se amplificaron conjuntamente utilizando el protocolo de TMA directa de doble fase para determinar si la amplificación triplex dará como resultado la misma mejora en la sensibilidad y precisión que hemos observado previamente en ensayos uniplex y duplex (Ejemplos 2-6).

Brevemente, los cebadores T7 se hibridaron con las secuencias diana de PCA3, PSA y T2-ERG durante la captura de la diana, seguido de la eliminación de cebadores T7 en exceso. En la amplificación de primera fase, se añadieron cebadores no T7 junto con todos los reactivos necesarios de amplificación, detección y reactivos enzimáticos, con la excepción de cebadores T7 adicionales. Después de cinco minutos a una temperatura de 42°C, los cebadores T7 se añadieron a la mezcla de reacción para iniciar la fase de amplificación exponencial, que también se llevó a cabo a una temperatura de 42°C con detección en tiempo real en tres canales fluorescentes diferentes (uno para cada diana). El experimento de control monofásico se llevó a cabo utilizando los mismos cebadores y sondas de detección en el formato de TMA directa monofásica estándar como se describe en el Ejemplo 1.

Los resultados de la amplificación de PCA3 en presencia de PSA y T2-ERG se muestran en las FIG. 10A-10C. Como se muestra en la FIG. 10A, el formato monofásico fue capaz de detectar el molde diana hasta ~12000 copias/mL (~5000 copias/rxn), mientras que el formato de doble fase mejoró la sensibilidad 10 veces a ~1250 copias/mL (~ 500copias/rxn) (FIG. 10B). Además, de acuerdo con nuestras observaciones anteriores, el formato de amplificación de doble fase se asoció con una reducción significativa en el tiempo de detección en comparación con el formato monofásico (FIG. 10C).

Los resultados de la amplificación de T2-ERG en presencia de PCA3 y PSA se muestran en las FIG. 10D-10F. Como se muestra en la FIG. 10D, el formato monofásico fue capaz de detectar el molde diana hasta ~5000 copias/mL (~2000 copias/rxn), mientras que el formato de doble fase mejoró la sensibilidad 100 veces a ~50 copias/mL (~20 copias/rxn) (FIG. 10E). Además, de acuerdo con nuestras observaciones anteriores, el formato de amplificación de doble fase se asoció con una reducción significativa en el tiempo de detección en comparación con el formato monofásico (FIG 10F).

Los resultados de la amplificación de PSA en presencia de PCA3 y T2-ERG se muestran en las FIG. 10G-10I. Como se muestra en la FIG. 10G, el formato monofásico fue capaz de detectar el molde diana hasta ~125000 copias/mL (~50000 copias/rxn), mientras que el formato de doble fase mejoró la sensibilidad en 10 veces a ~12500 copias/mL (~500 copias/rxn) (Figura 10H). Además, de acuerdo con nuestras observaciones anteriores, el formato de amplificación de doble fase se asoció con una reducción significativa en el tiempo de detección en comparación con el formato monofásico (Figura 10I).

Ejemplo 8

Amplificación de T2-ERG en formato de TMA inversa de doble fase

En este ejemplo, sometimos a ensayo un protocolo de TMA inversa de doble fase utilizando T2-ERG como molde diana. Esto contrasta con todos los ejemplos de trabajo anteriores, donde se emplearon varios protocolos de TMA directa. La descripción general de la TMA inversa se expone anteriormente en relación con la amplificación de cebador único.

En el protocolo de TMA inversa de doble fase utilizado en la presente memoria, un cebador no T7 se hibridó con el extremo 3' de la secuencia T2-ERG diana durante la captura de la diana, seguido de la eliminación del cebador no T7 en exceso. El método de amplificación se dividió en dos fases distintas. Durante la primera fase, se introdujo un proveedor de promotor T7 junto con todos los reactivos necesarios de amplificación, detección y reactivos enzimáticos, con la excepción de cebador adicional no T7. El proveedor del promotor T7 se bloqueó en el extremo 3', por lo que es imposible extenderlo enzimáticamente. En presencia de transcriptasa inversa, el cebador no T7 hibridado con la diana se extendió, creando una copia de ADNc, y el molde de ARN diana se degradó por la actividad RNasa H de la transcriptasa inversa. El proveedor del promotor T7 se hibridó posteriormente al extremo 3' del ADNc, y el extremo 3' del ADNc se extendió aún más, completando la región promotora del proveedor de promotor T7 y creando un molde activo de doble cadena. La polimerasa T7 produjo múltiples transcritos de ARN a partir del molde que eran idénticos al molde diana. Debido a que no estaba disponible un cebador no T7 en la mezcla de amplificación de fase 1, la reacción no pudo continuar más. La segunda fase se inició después con la adición de cebador no T7, iniciando así la amplificación exponencial del conjunto de transcritos de ARN producidos en la fase 1.

Los resultados del experimento de TMA inversa de doble fase se muestran en la FIG. 11B. La FIG. 11A muestra los resultados de un experimento de TMA inversa monofásica control que se modificó para imitar el formato de doble fase. Más específicamente, el cebador no T7 se añadió durante la etapa de captura de la diana (permitiendo que la etapa

de apareamiento a una temperatura de 60ºC estándar se elimine del protocolo); no se añadieron cebadores ni reactivos enzimáticos en la primera fase; y el cebador no T7 y el proveedor de promotor T7, así como el reactivo enzimático, se añadieron a la segunda fase para el inicio de la amplificación exponencial. Como se puede ver en las FIG. 11A y 11B, el formato de TMA inversa de doble fase produjo una sensibilidad y precisión significativamente mejoradas en el extremo inferior de la concentración de analito (~50 copias/rxn) en comparación con el formato de TMA inversa monofásica modificada. Una vez más, el formato de doble fase produjo un rendimiento superior tanto en términos de precisión como de tiempo de detección más corto (FIG. 11C).

Ejemplo 9

Amplificación conjunta de T2-ERG, PCA3, PSA y CAP en formato de TMA inversa de doble fase

En este ejemplo, T2-ERG, PCA3, PSA y los moldes diana de control interno (CAP) se amplificaron conjuntamente utilizando dos protocolos diferentes de TMA inversa de doble fase para determinar si la amplificación cuádruplex dará como resultado la misma mejora en la sensibilidad y precisión que hemos observado previamente en ensayos uniplex, duplex y triplex (Ejemplos 2-8).

La detección de 25 copias/rxn de T2-ERG, que es notoriamente difícil de amplificar a niveles bajos en presencia de otras dianas, se muestra en las FIG. 12A-12C en presencia de 500000 copias/rxn de PCA3, 5000000 copias/rxn de PSA y 5000 copias/rxn de CAP (círculos abiertos) o en presencia de 5000 copias/rxn de CAP solo (diamantes sólidos). La FIG. 12A muestra los resultados de un experimento de control que se llevó a cabo en el formato de TMA inversa monofásica modificada como se describe anteriormente en el Ejemplo 8. La FIG. 12B muestra los resultados de un experimento de doble fase utilizando el formato de TMA inversa de doble fase como también se describe en el ejemplo 8. Brevemente, los cebadores no T7 se hibridaron con las secuencias de T2ERG, PCA3, PSA y CAP diana durante la captura de la diana, seguido de la eliminación del exceso de cebadores no T7. En la primera fase de amplificación, se añadieron proveedores de promotores T7 junto con todos los reactivos necesarios de amplificación, detección y reactivos enzimáticos, con la excepción de cebadores adicionales no T7. Después de cinco minutos a una temperatura de 42°C, los cebadores no T7 se añadieron a la mezcla de reacción para iniciar la fase de amplificación exponencial, que también se llevó a cabo a una temperatura de 42°C con detección en tiempo real en cuatro canales fluorescentes diferentes (uno para cada diana). Como se puede ver en las FIG. 12A y 12B, el formato de TMA inversa de doble fase produjo una sensibilidad y precisión mejoradas a 25 copias/rxn de T2-ERG en presencia de PCA3, PSA y CAP y una sensibilidad y precisión significativamente mejoradas a 25 copias/rxn de T2-ERG en presencia de CAP solo en comparación con el formato de TMA inversa monofásica modificada. Estos resultados también demuestran que el formato de doble fase es efectivo para reducir la interferencia analito-analito en una reacción múltiple. Además, de acuerdo con nuestras observaciones anteriores, el formato de amplificación de doble fase se asoció con una reducción en el tiempo de detección en comparación con el formato monofásico.

La FIG. 12C muestra resultados de un formato de doble fase diferente, donde en la primera fase de la reacción PCA3, PSA y CAP (o CAP solo) se sometieron a amplificación lineal y T2-ERG se sometió a amplificación exponencial, y en la segunda fase PCA3, PSA y CAP se sometieron a amplificación exponencial y T2-ERG continuó amplificándose exponencialmente (las cuatro reacciones de amplificación se llevaron a cabo en el mismo recipiente). La distribución de cebadores específicos de diana entre las diferentes fases de amplificación se establece en la Tabla 1 a continuación. Como se puede ver en las FIG. 12A y 12C, este formato de TMA inversa de doble fase diferente produjo una sensibilidad significativamente mejorada a 25 copias/rxn de T2-ERG en presencia de PCA3, PSA y CAP, o CAP solo, en comparación con el formato de TMA inversa monofásica modificada. Al igual que con el formato de doble fase descrito en ejemplos anteriores, estos resultados demuestran que este formato de doble fase diferente es efectivo para reducir la interferencia analito-analito en una reacción múltiple. Además, este formato de amplificación de doble fase diferente se asoció con una reducción en el tiempo de detección en comparación con el formato monofásico.

Tabla 1

Analito	Captura de la diana	Primera fase	Segunda fase
T2-ERG	Cebador no T7	Cebador no T7+ Proveedor de promotor T7	---
PCA3	Cebador no T7	Proveedor de promotor T7	Cebador no T7
PSA	Cebador no T7	Proveedor de promotor T7	Cebador no T7
CAP	Cebador no T7	Proveedor de promotor T7	Cebador no T7

Ejemplo 10

Amplificación conjunta de T2-ERG, PCA3, PSA y CAP en formato de TMA inversa trifásica

En este ejemplo, T2-ERG, PCA3, PSA y los moldes diana de control interno (CAP) se amplificaron conjuntamente utilizando protocolos de TMA inversa de doble fase y de triple fase para determinar si la amplificación de triple fase podría producir mejoras adicionales en la sensibilidad y/o precisión en el extremo inferior de la concentración de analito.

La detección de 150 copias/rxn de T2-ERG se muestra en las FIG. 13A-13C en presencia de 500000 copias/rxn de PCA3, 5000000 copias/rxn de PSA y 5000 copias/rxn de CAP (círculos abiertos) o en presencia de 5000 copias/rxn de CAP solo (diamantes sólidos). La FIG. 13A muestra los resultados de un experimento control que se llevó a cabo en el formato de TMA inversa monofásica modificada como se describe anteriormente en el Ejemplo 8. La FIG. 13B muestra los resultados de un experimento de doble fase utilizando el formato de TMA inversa de doble fase como también se describe en el ejemplo 8. La sensibilidad y la precisión se mejoraron utilizando el formato de doble fase.

La FIG. 13C muestra los resultados de un experimento de triple fase, donde en la fase 1 T2-ERG se sometió a amplificación lineal y los otros 3 analitos no se amplificaron, en la fase 2 T2-ERG se sometió a amplificación exponencial y los otros 3 analitos no se amplificaron, y en la fase 3 PCA3, PSA y CAP (o CAP solo) se sometieron a amplificación exponencial y T2-ERG continuó amplificándose exponencialmente (todas las reacciones de amplificación procedieron en el mismo recipiente). La distribución de cebadores específicos de diana entre las diferentes fases de amplificación se expone en la Tabla 2 a continuación. Como se puede ver en las FIG. 13A y 13C, el formato de TMA inversa de triple fase produjo grandes mejoras tanto en sensibilidad como en precisión a 150 copias/rxn de T2-ERG en presencia de PCA3, PSA y CAP, o CAP solo, en comparación con el formato de TMA inversa monofásica modificada. Estos resultados también demuestran que este formato de triple fase es efectivo para reducir la interferencia analito-analito en una reacción multiplex. Además, este formato de amplificación de triple fase se asoció con una reducción en el tiempo de detección en comparación con el formato monofásico.

Tabla 2

Analito	Captura de la diana	Primera fase	Segunda fase	Tercera fase
T2-ERG	Cebador no T7	Proveedor de promotor T7	Cebador no T7	---
PCA3	Cebador no T7	---	---	Cebador no T7+ Proveedor de promotor T7
PSA	Cebador no T7	---	---	Cebador no T7+ Proveedor de promotor T7
CAP	Cebador no T7	---	---	Cebador no T7+ Proveedor de promotor T7

Como se ilustró anteriormente, se ha desarrollado un formato de amplificación multifásica y se ha demostrado que funciona para varias dianas de ácido nucleico diferentes, así como combinaciones de dianas. En comparación con el formato monofásico estándar, el formato de amplificación multifásica dio como resultado mejoras significativas en los límites de detección, lo que se traducirá en mejoras comparables en los límites de cuantificación.

Aunque la presente invención se ha descrito y mostrado con considerable detalle con referencia a ciertas realizaciones preferidas, los expertos en la materia apreciarán fácilmente otras realizaciones de la presente invención. Por consiguiente, se considera que la presente invención incluye todas las modificaciones y variaciones abarcadas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para cuantificar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto la muestra con un primer oligonucleótido de amplificación que comprende una secuencia específica diana 3' específica para una primera parte de la secuencia de ácido nucleico diana y es capaz de extenderse por una transcriptasa inversa, bajo condiciones que permiten la hibridación del primer oligonucleótido de amplificación con la primera parte de la secuencia de ácido nucleico diana, generando así un híbrido de preamplificación que comprende el primer oligonucleótido de amplificación y la secuencia de ácido nucleico diana,

en donde el primer oligonucleótido de amplificación comprende además una secuencia promotora 5' para una ARN polimerasa;

(b) aislar el híbrido de preamplificación de la etapa (a) mediante captura de la diana en un soporte sólido seguido de lavado para eliminar cualquiera de los primeros oligonucleótidos de amplificación que no se hibridaron con la primera parte de la secuencia de ácido nucleico diana en la etapa (a);

(c) amplificar, en una mezcla de reacción de amplificación de primera fase que comprende un segundo oligonucleótido de amplificación, al menos una parte de la secuencia de ácido nucleico diana del híbrido de preamplificación aislado en la etapa (b) en una reacción de amplificación asociada a transcripción, sustancialmente isotérmica, de primera fase bajo condiciones que permiten la amplificación lineal de la misma, pero no permiten la amplificación exponencial de la misma, dando como resultado así una mezcla de reacción que comprende un primer producto de amplificación,

en donde la reacción de amplificación asociada a transcripción, sustancialmente isotérmica, de primera fase comprende:

(i) en presencia de cada una transcriptasa inversa, una ARN polimerasa y una actividad RNasa H, extender el extremo 3' del primer oligonucleótido de amplificación del híbrido de preamplificación para crear un producto de extensión;

(ii) extender el extremo 3' del segundo oligonucleótido de amplificación hibridado con una parte del producto de extensión producido en la etapa (i) rellenando así la región promotora del primer oligonucleótido de amplificación para formar un molde de doble cadena que contiene un promotor de doble cadena, en donde el segundo oligonucleótido de amplificación es complementario a una parte de un producto de extensión de la secuencia específica diana 3' del primer oligonucleótido de amplificación;

(iii) proporcionar condiciones que permitan que la ARN polimerasa produzca múltiples transcritos de ARN a partir del molde de doble cadena; y

(iv) proporcionar condiciones que permitan (a) al segundo oligonucleótido de amplificación hibridarse con los transcritos de ARN producidos en la etapa (iii) y se extienda para producir copias de ADNc sin promotor del molde de ácido nucleico diana y (b) que permitan que las cadenas de ARN sean degradadas por la actividad RNasa H,

en donde la mezcla de reacción de amplificación de primera fase no comprende ningún primer oligonucleótido de amplificación además del aislado con el híbrido de preamplificación en la etapa (b), sino que comprende el segundo oligonucleótido de amplificación;

(d) combinar la mezcla de reacción de amplificación de primera fase que comprende el primer producto de amplificación de la etapa (c) con un cebador promotor que se hibrida con el primer producto de amplificación y participa en la amplificación exponencial del primer producto de amplificación, pero que carece de la mezcla de reacción que comprende el primer producto de amplificación, para producir una mezcla de reacción de amplificación de segunda fase,

en donde la mezcla de reacción de amplificación de segunda fase comprende adicionalmente una sonda de hibridación específica de secuencia; y

en donde tanto las mezclas de reacción de amplificación de primera fase como de segunda fase comprenden cada una de una transcriptasa inversa, una ARN polimerasa y una actividad RNasa H;

(e) realizar, en una reacción de amplificación asociada a transcripción, sustancialmente isotérmica, de segunda fase, en la mezcla de reacción de amplificación de segunda fase producida en la etapa (d), una amplificación exponencial del primer producto de amplificación, sintetizando así un segundo producto de amplificación;

(f) detectar, con la sonda de hibridación específica de secuencia a intervalos de tiempo regulares, la síntesis del segundo producto de amplificación en la mezcla de reacción de amplificación de segunda fase; y

(g) cuantificar la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra utilizando los resultados de la etapa (f).

2. El método de la reivindicación 1, en donde la ARN polimerasa es ARN polimerasa T7.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el soporte sólido comprende una sonda de captura inmovilizada.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la etapa (a) comprende además poner en contacto la muestra con un oligonucleótido de captura de la diana que se hibrida con la secuencia de ácido nucleico diana, y

en donde el híbrido de preamplificación comprende la secuencia de ácido nucleico diana hibridada con cada uno de los oligonucleótidos de captura de la diana y con el primer oligonucleótido de amplificación.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el soporte sólido comprende partículas atraíbles magnéticamente.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde cada una de las reacciones de amplificación asociadas a transcripción isotérmicas de primera y segunda fase comprende una transcriptasa inversa que comprende una actividad RNasa H endógena.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el cebador promotor de la etapa (d) comprende el primer oligonucleótido de amplificación.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el primer producto de amplificación de la etapa (c) tiene la misma polaridad que la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra, y

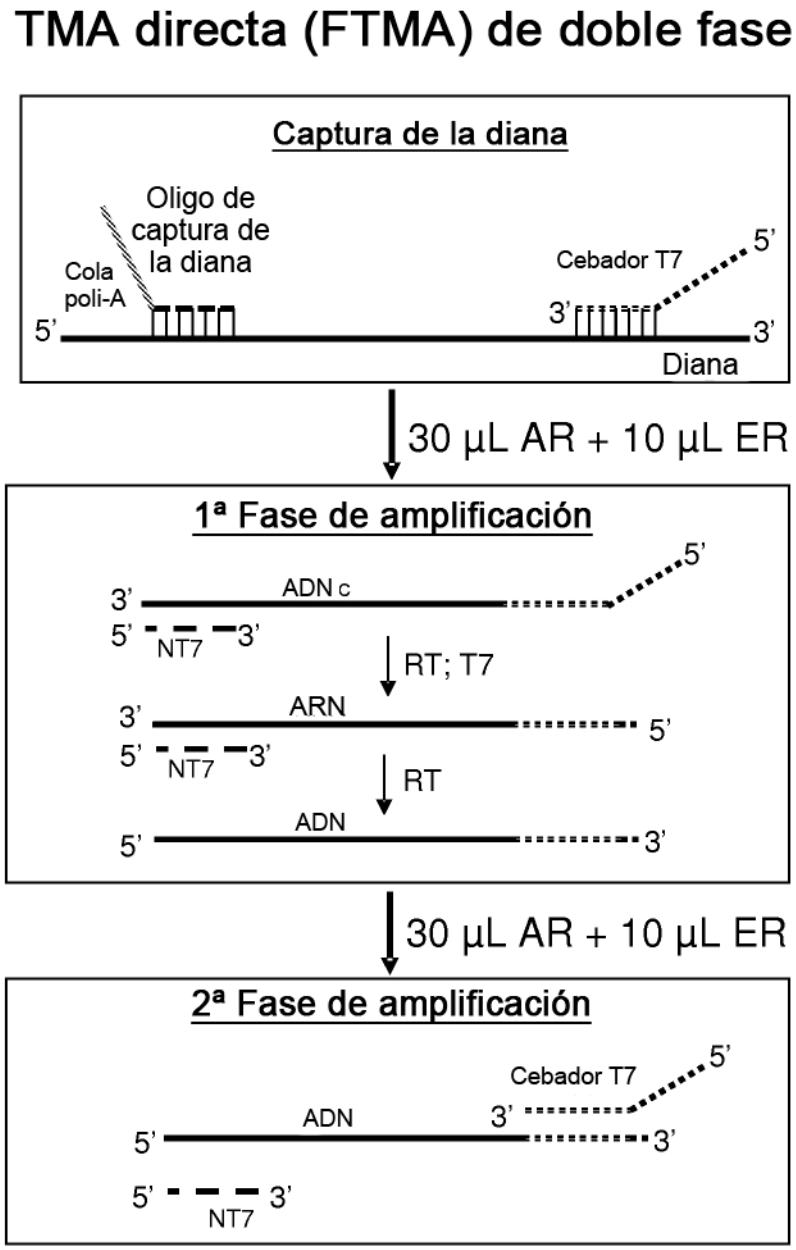
en donde el segundo producto de amplificación de la etapa (e) es una molécula de ARN

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la sonda de hibridación específica de secuencia en la etapa (d) es una sonda sensible a la conformación que produce una señal detectable cuando se hibrida con el segundo producto de amplificación.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la sonda de hibridación específica de secuencia en la etapa (d) es una sonda de hibridación específica de secuencia marcada con fluorescencia.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la etapa (g) comprende cuantificar la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra utilizando una curva de calibración lineal y resulta de la etapa (f).

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la etapa (c) comprende amplificar de 10 veces a 10000 veces, en la mezcla de reacción de amplificación de primera fase.



AR: Reactivo de amplificación
ER: Reactivo enzimático

FIG. 1

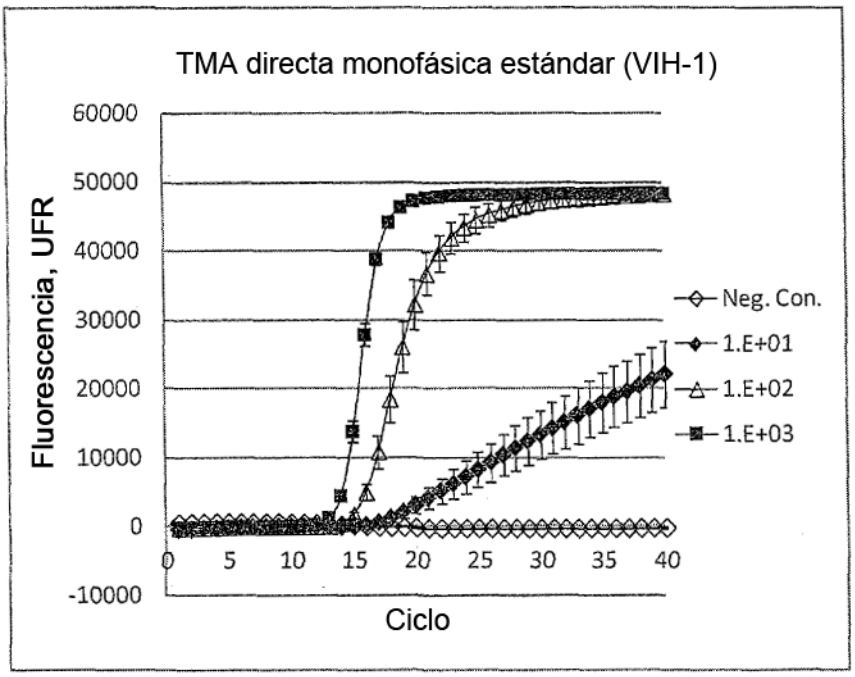

TMA directa monofásica estándar (VIH-1)
Fluorescencia, UFR
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
-10000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Ciclo
Neg. Con.
1.E+01
1.E+02
1.E+03

FIG. 2A

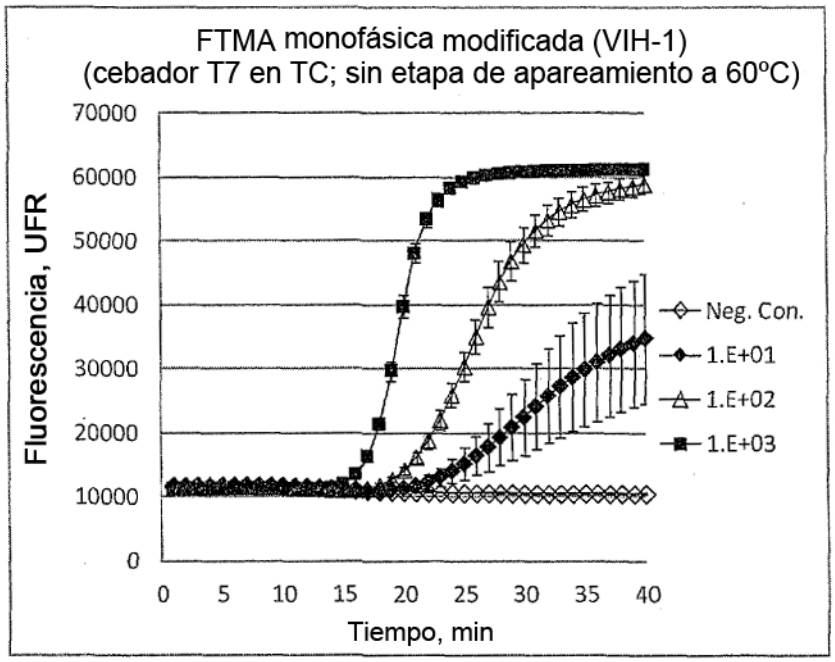

FTMA monofásica modificada (VIH-1)
(cebador T7 en TC; sin etapa de apareamiento a 60ºC)
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.E+01
1.E+02
1.E+03

FIG. 2B

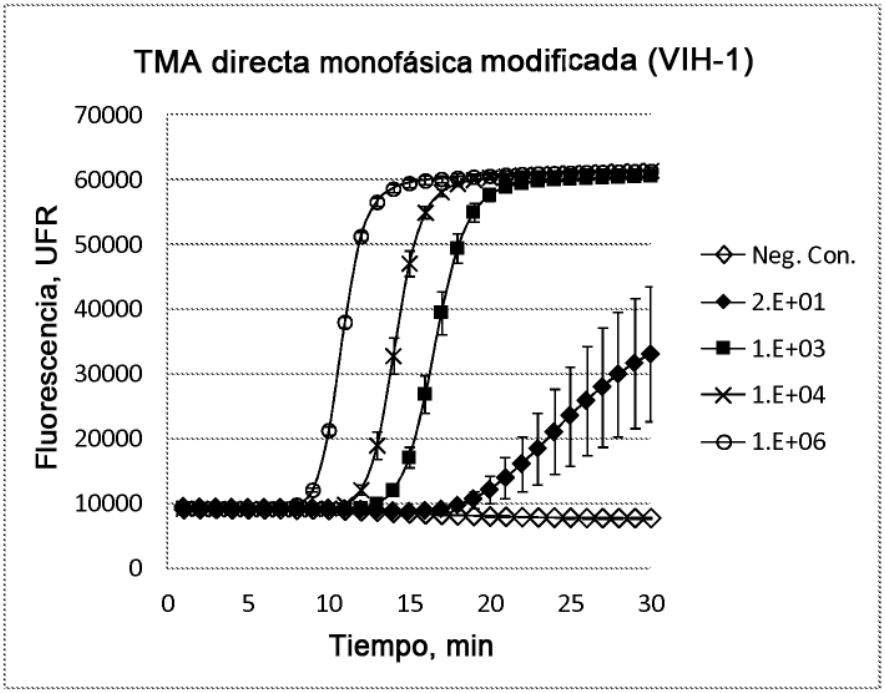

TMA directa monofásica modificada (VIH-1)
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
30
Tiempo, min
Neg. Con.
2.E+01
1.E+03
1.E+04
1.E+06

FIG. 3A

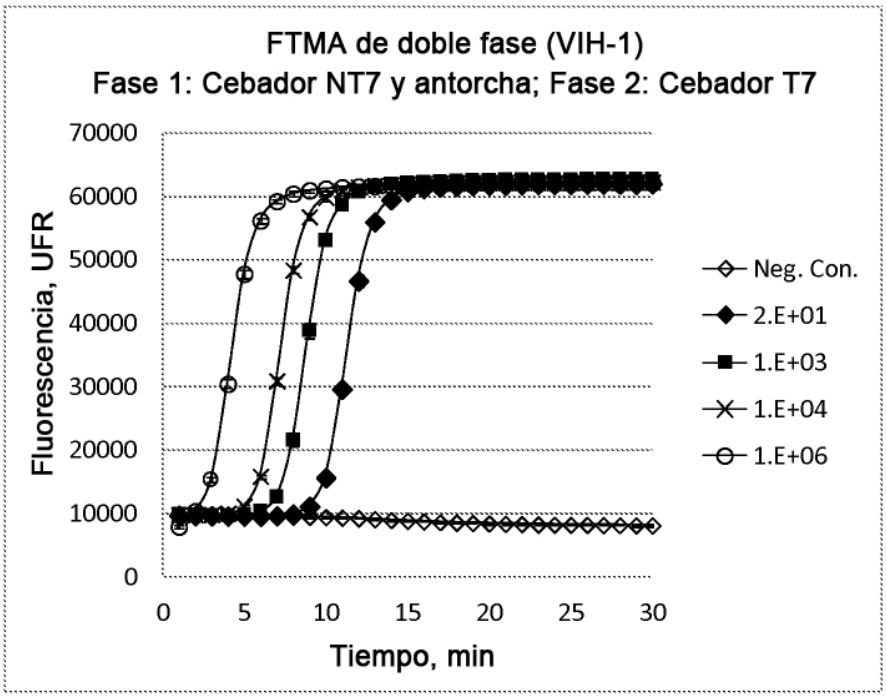

FTMA de doble fase (VIH-1)
Fase 1: Cebador NT7 y antorcha; Fase 2: Cebador T7
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
30
Tiempo, min
Neg. Con.
2.E+01
1.E+03
1.E+04
1.E+06

FIG. 3B

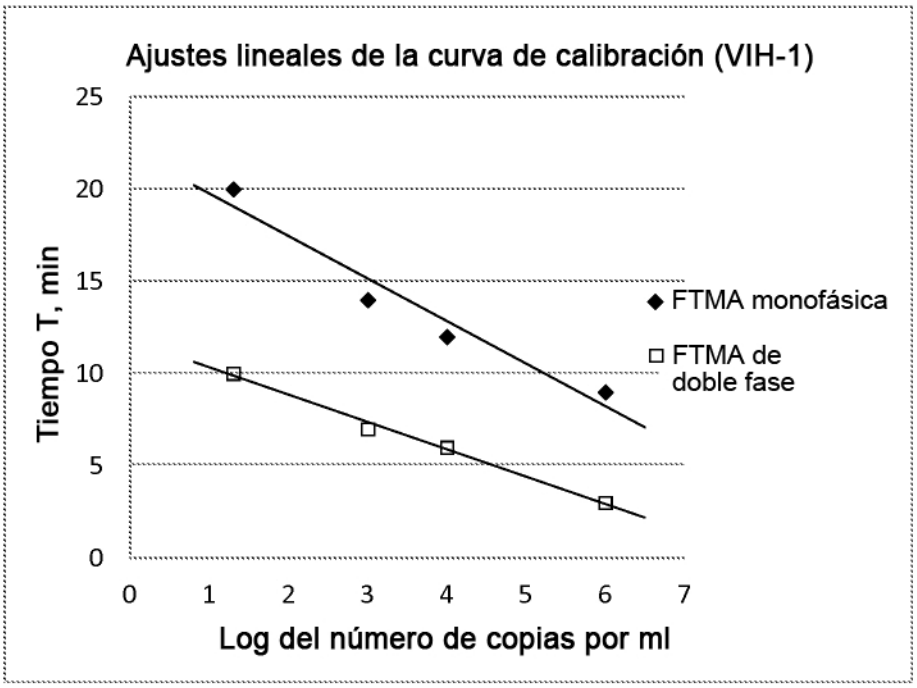

Ajustes lineales de la curva de calibración (VIH-1)
Tiempo T, min
25
20
15
10
5
0
0
1
2
3
4
5
6
7
Log del número de copias por ml
FTMA monofásica
FTMA de doble fase

FIG. 3C

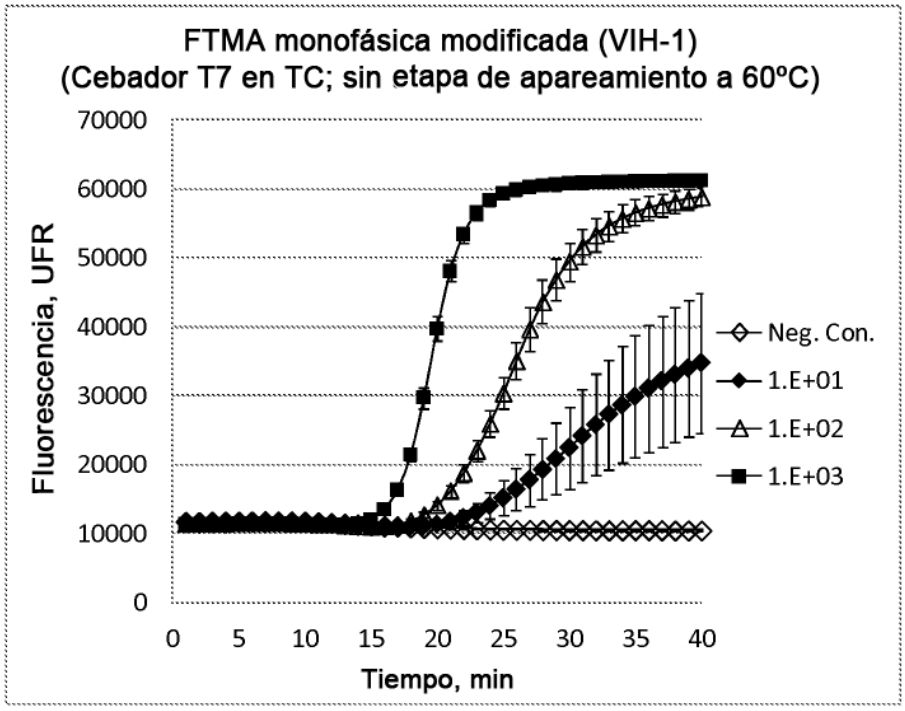

FTMA monofásica modificada (VIH-1)
(Cebador T7 en TC; sin etapa de apareamiento a 60ºC)
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.E+01
1.E+02
1.E+03

FIG. 4A

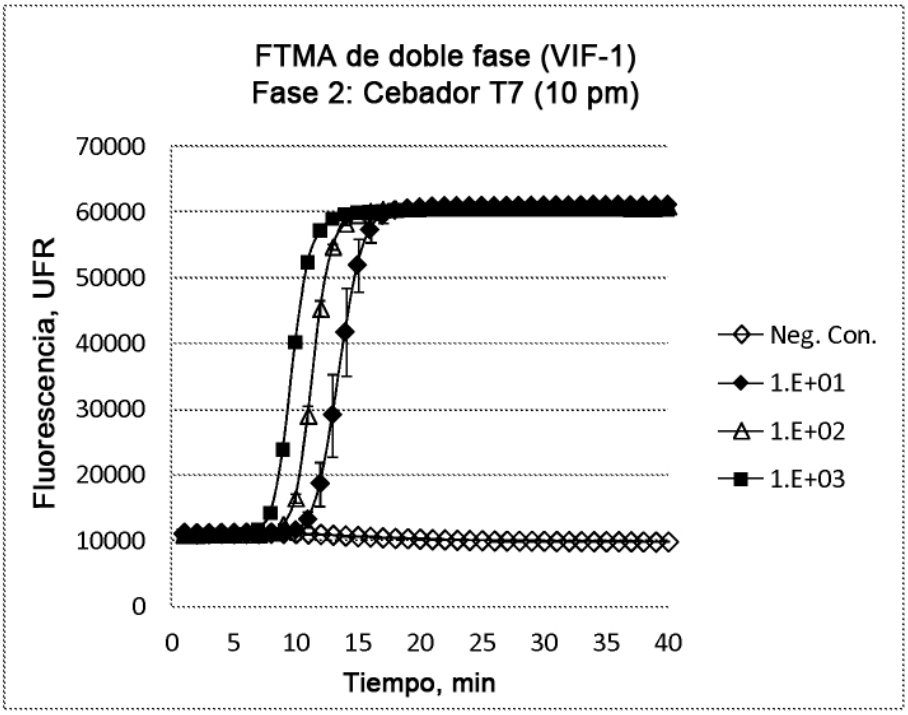

FTMA de doble fase (VIF-1)
Fase 2: Cebador T7 (10 pm)
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.E+01
1.E+02
1.E+03

FIG. 4B

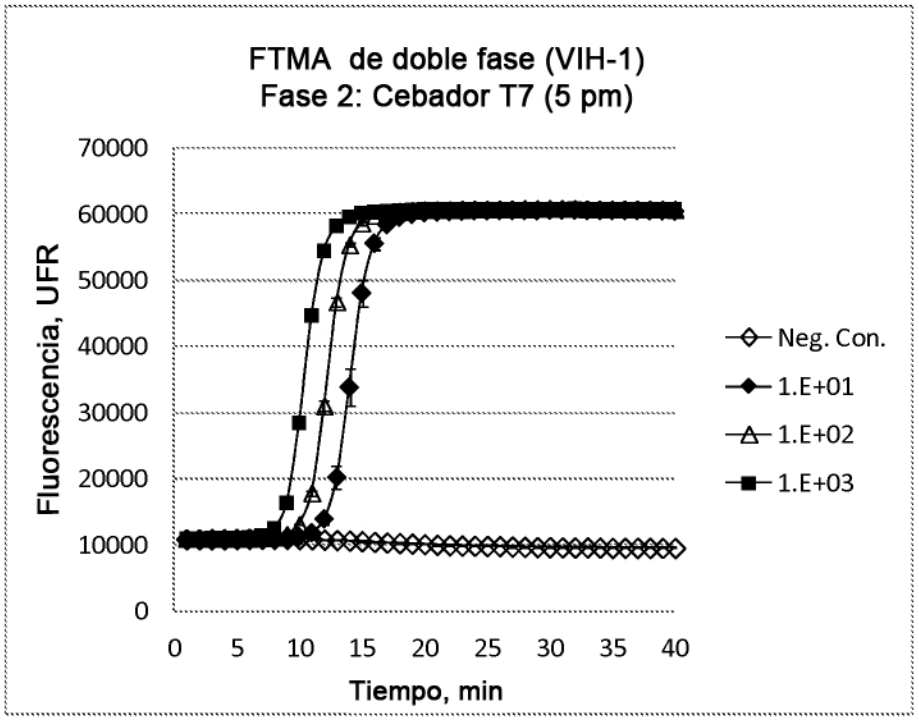

FTMA de doble fase (VIH-1)
Fase 2: Cebador T7 (5 pm)
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.E+01
1.E+02
1.E+03

FIG. 4C

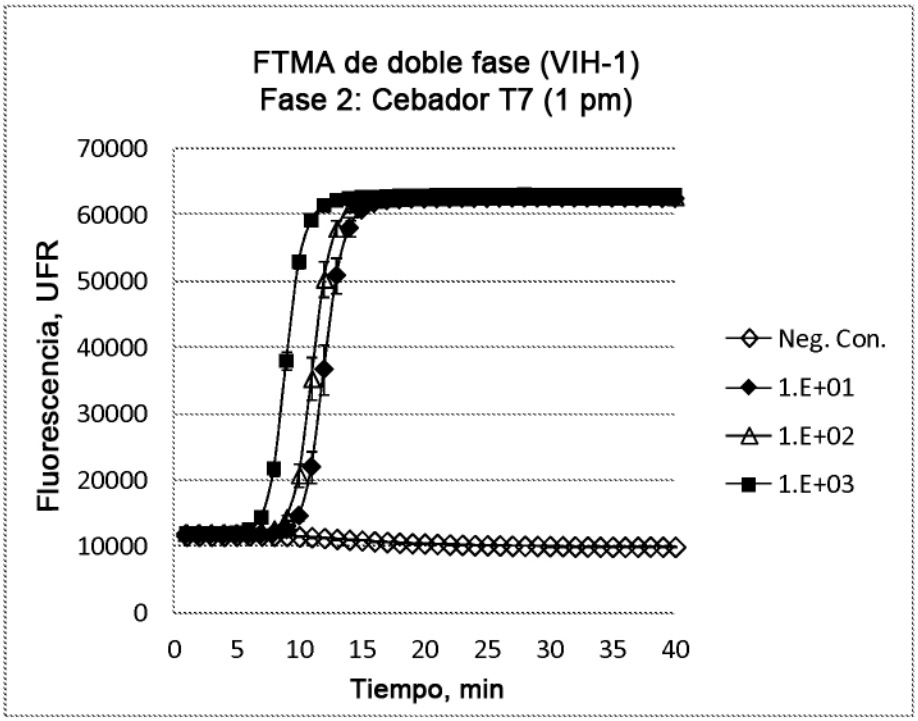

FTMA de doble fase (VIH-1)
Fase 2: Cebador T7 (1 pm)
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.E+01
1.E+02
1.E+03

FIG. 4D

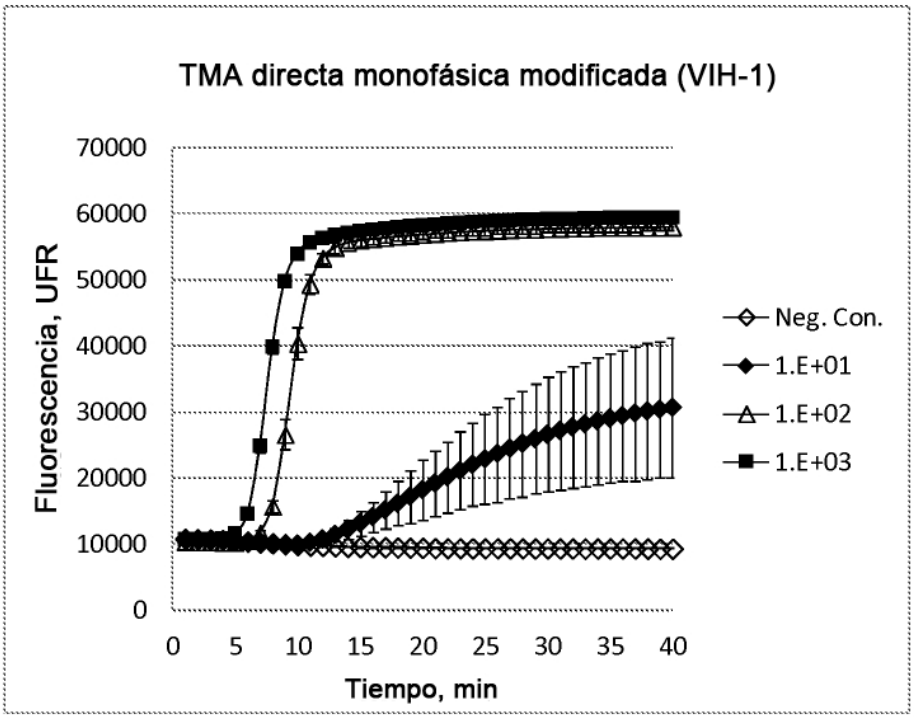

TMA directa monofásica modificada (VIH-1)
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.E+01
1.E+02
1.E+03

FIG. 5A

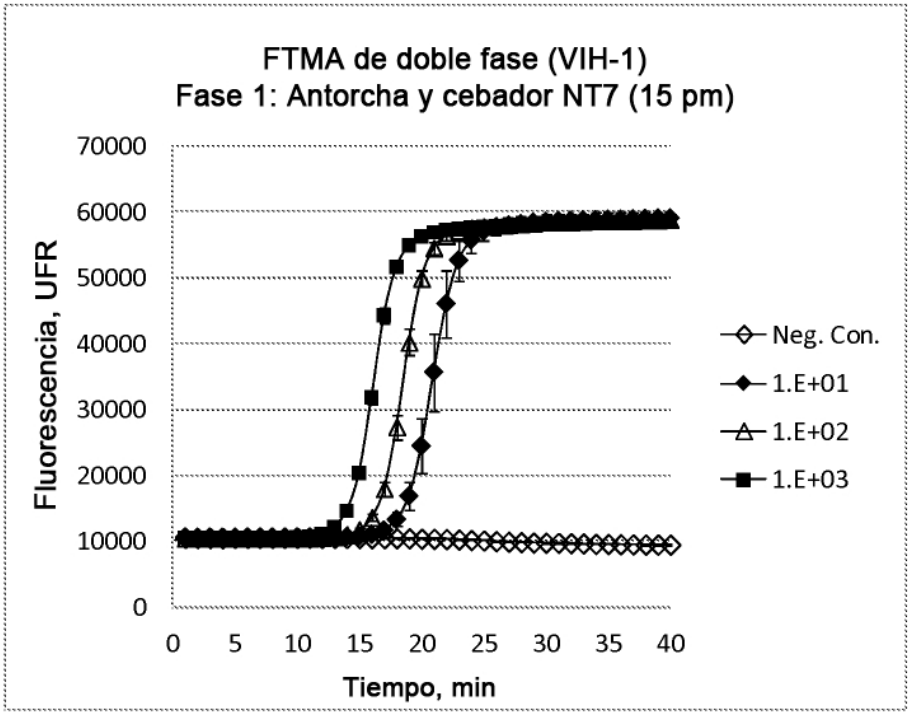

FTMA de doble fase (VIH-1)
Fase 1: Antorcha y cebador NT7 (15 pm)
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.E+01
1.E+02
1.E+03

FIG. 5B

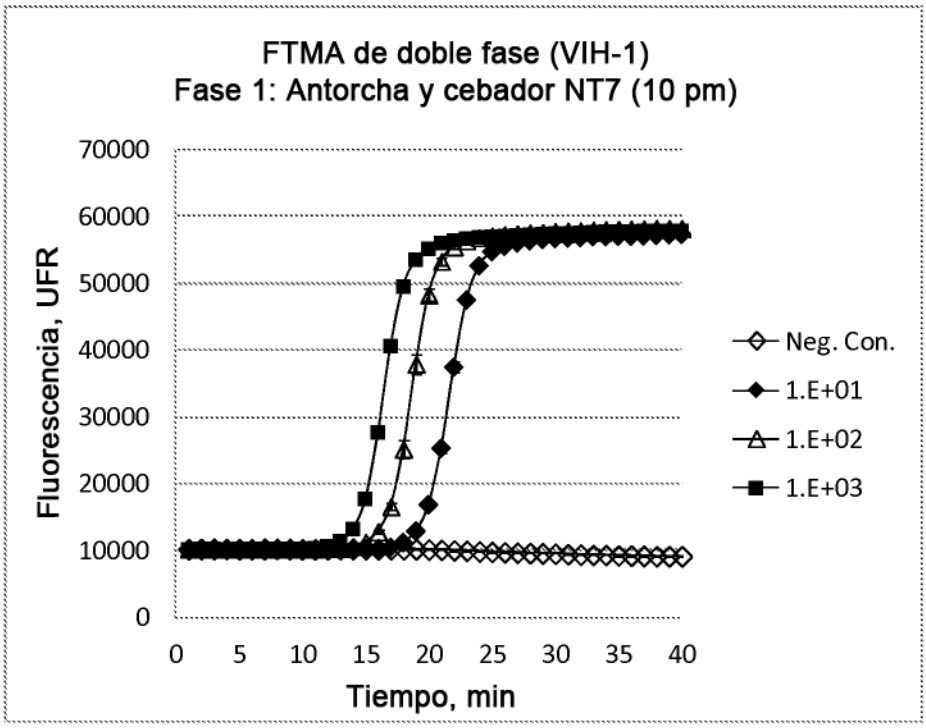

FTMA de doble fase (VIH-1)
Fase 1: Antorcha y cebador NT7 (10 pm)
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.E+01
1.E+02
1.E+03

FIG. 5C

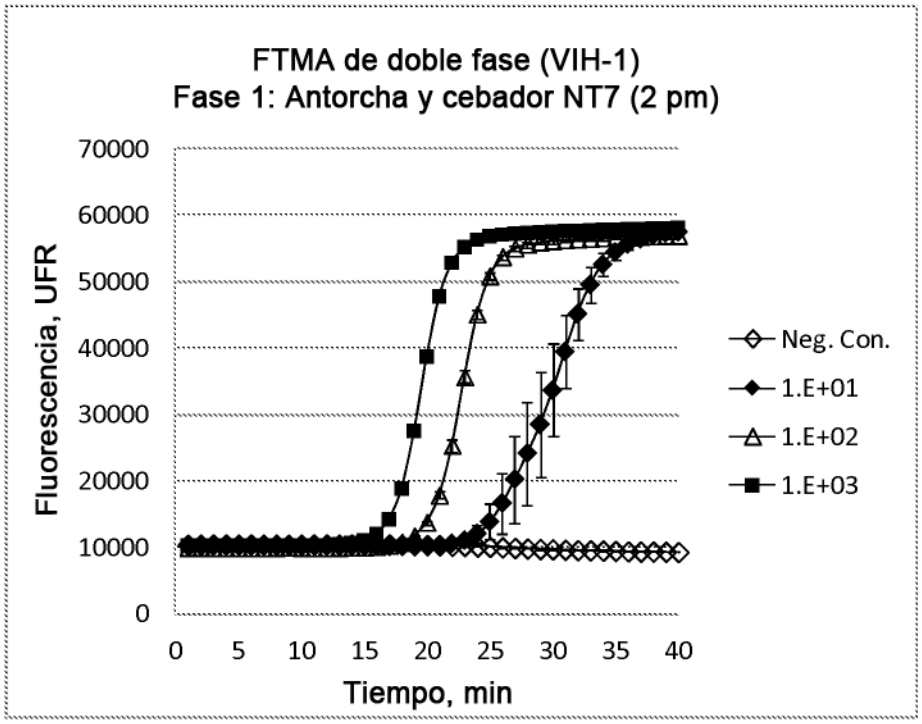

FTMA de doble fase (VIH-1)
Fase 1: Antorcha y cebador NT7 (2 pm)
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.E+01
1.E+02
1.E+03

FIG. 5D

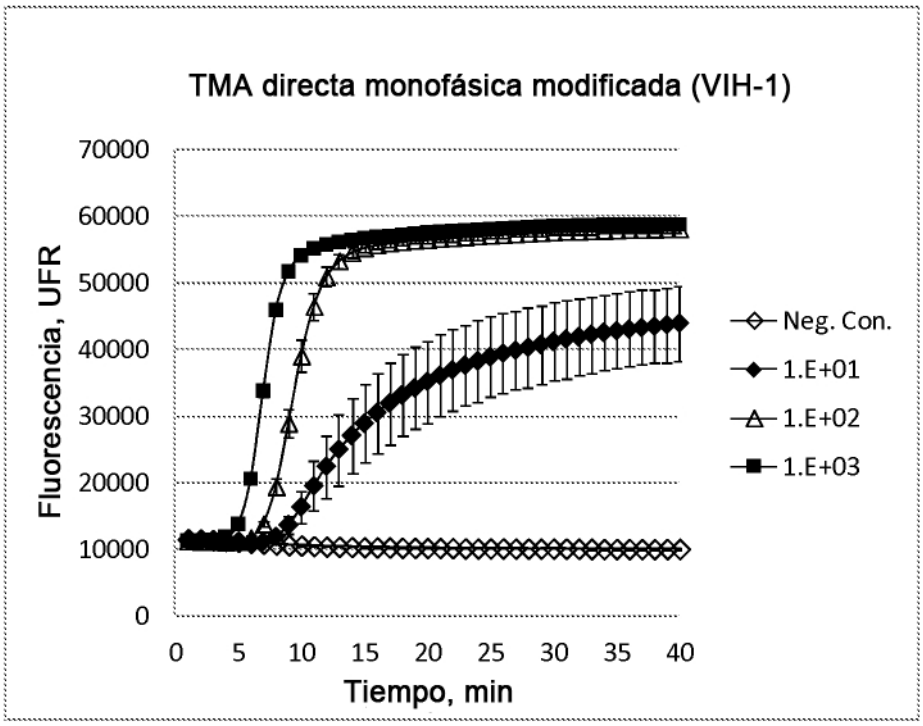

TMA directa monofásica modificada (VIH-1)
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.E+01
1.E+02
1.E+03

FIG. 6A

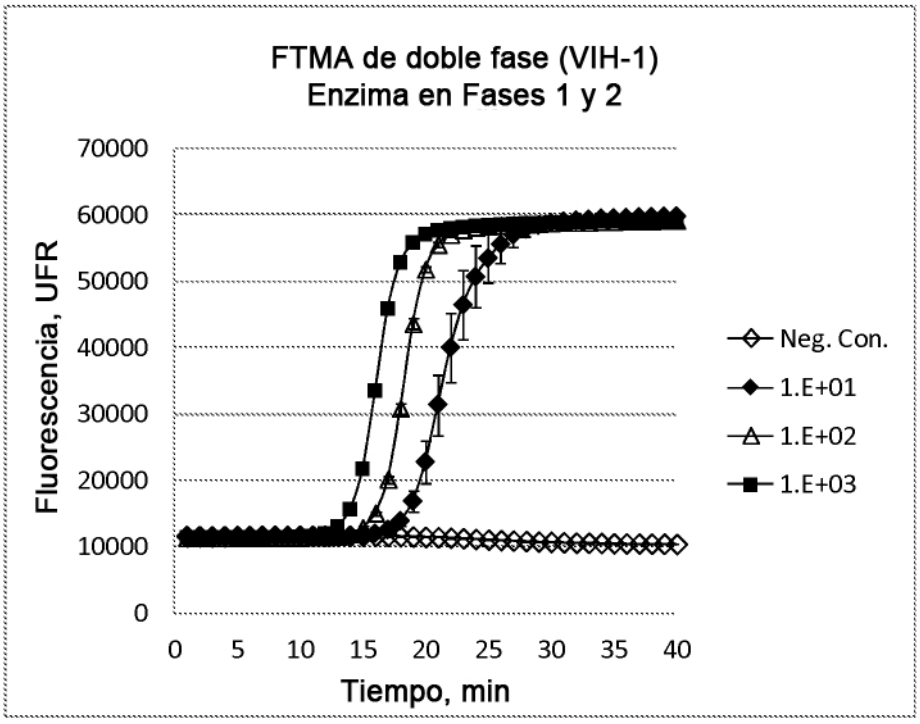

FTMA de doble fase (VIH-1)
Enzima en Fases 1 y 2
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.E+01
1.E+02
1.E+03

FIG. 6B

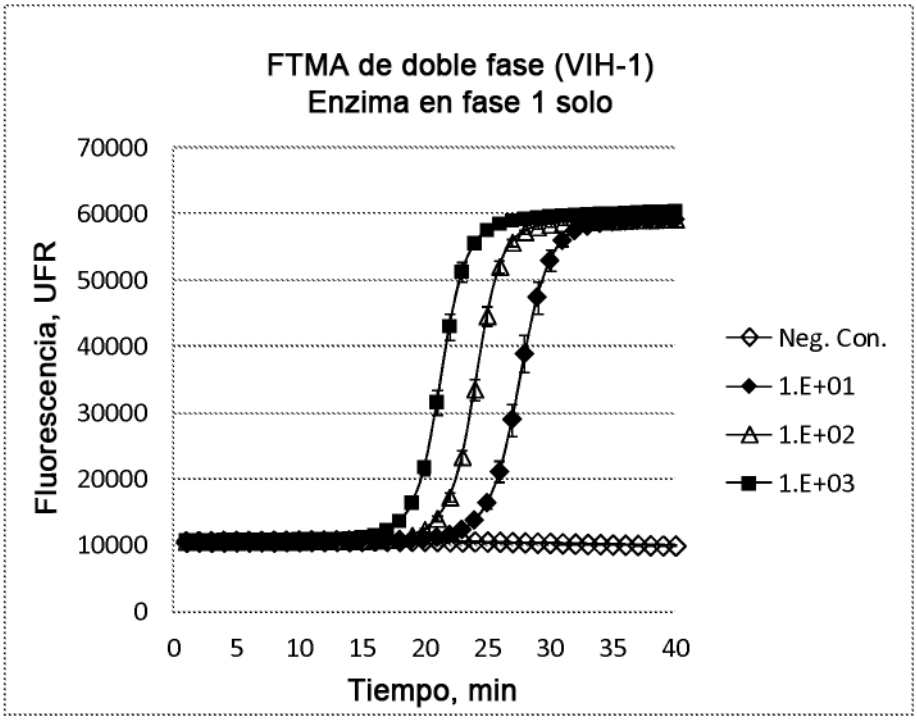

FTMA de doble fase (VIH-1)
Enzima en fase 1 solo
Fluorescencia, UFR
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.E+01
1.E+02
1.E+03

FIG. 6C

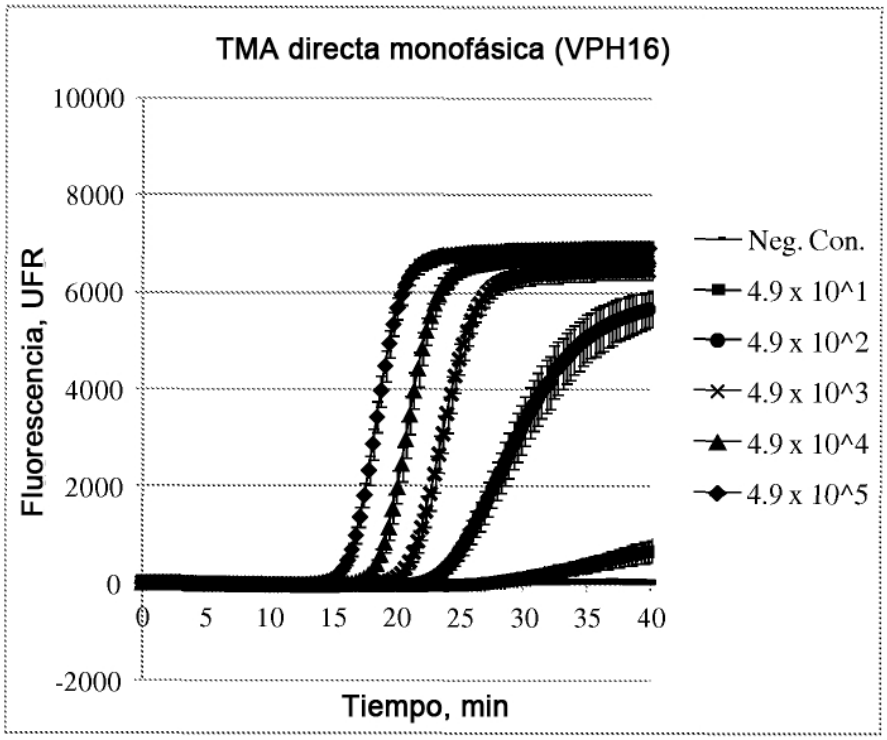

TMA directa monofásica (VPH16)
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
Fluorescencia, UFR
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con.
4.9 x 10^1
4.9 x 10^2
4.9 x 10^3
4.9 x 10^4
4.9 x 10^5

FIG. 7A

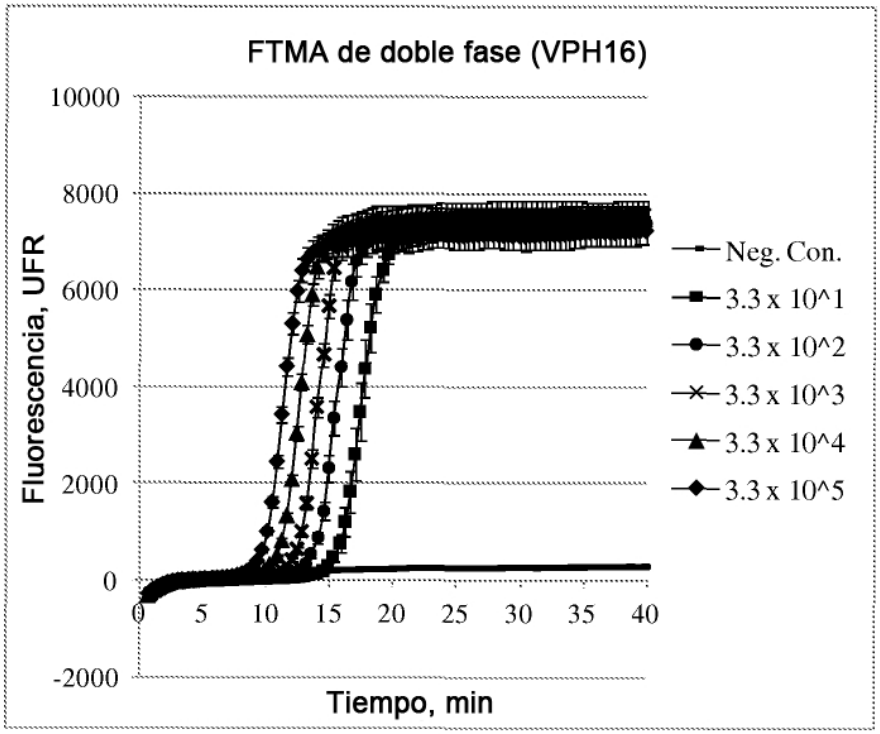

FTMA de doble fase (VPH16)
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
Fluorescencia, UFR
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con.
3.3 x 10^1
3.3 x 10^2
3.3 x 10^3
3.3 x 10^4
3.3 x 10^5

FIG. 7B

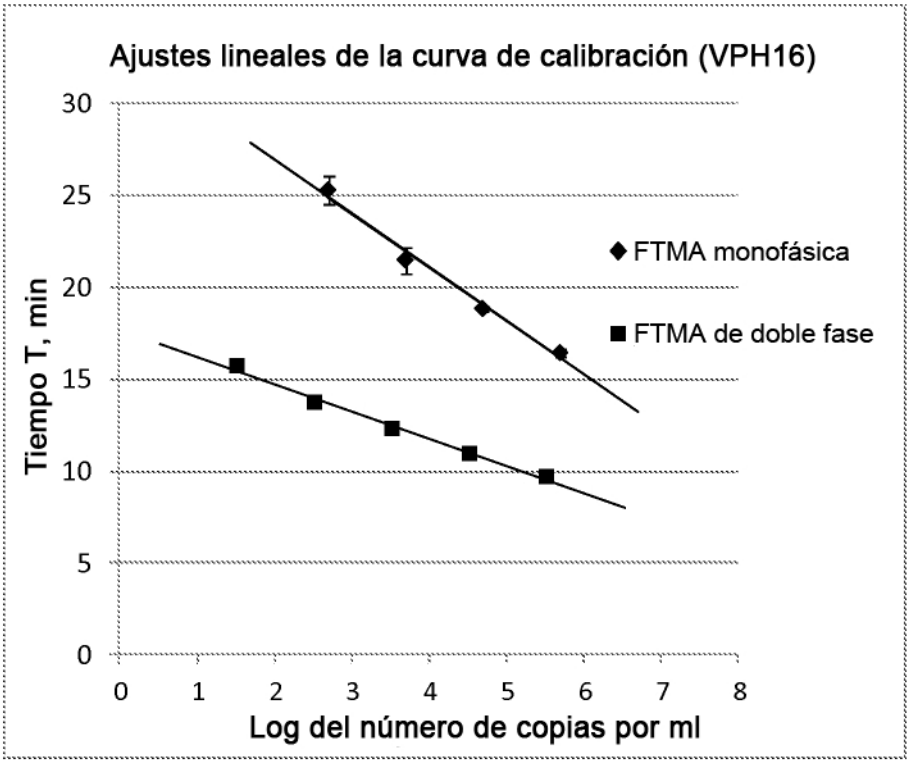

Ajustes lineales de la curva de calibración (VPH16)
Tiempo T, min
30
25
20
15
10
5
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Log del número de copias por ml
FTMA monofásica
FTMA de doble fase

FIG. 7C

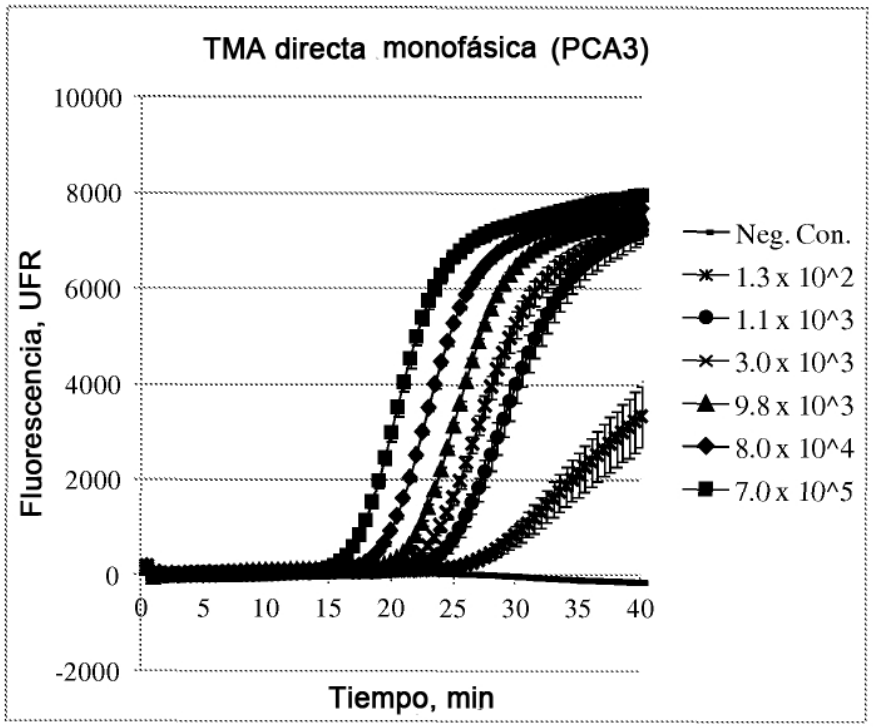

TMA directa monofásica (PCA3)
Fluorescencia, UFR
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.3 x 10^2
1.1 x 10^3
3.0 x 10^3
9.8 x 10^3
8.0 x 10^4
7.0 x 10^5

FIG. 8A

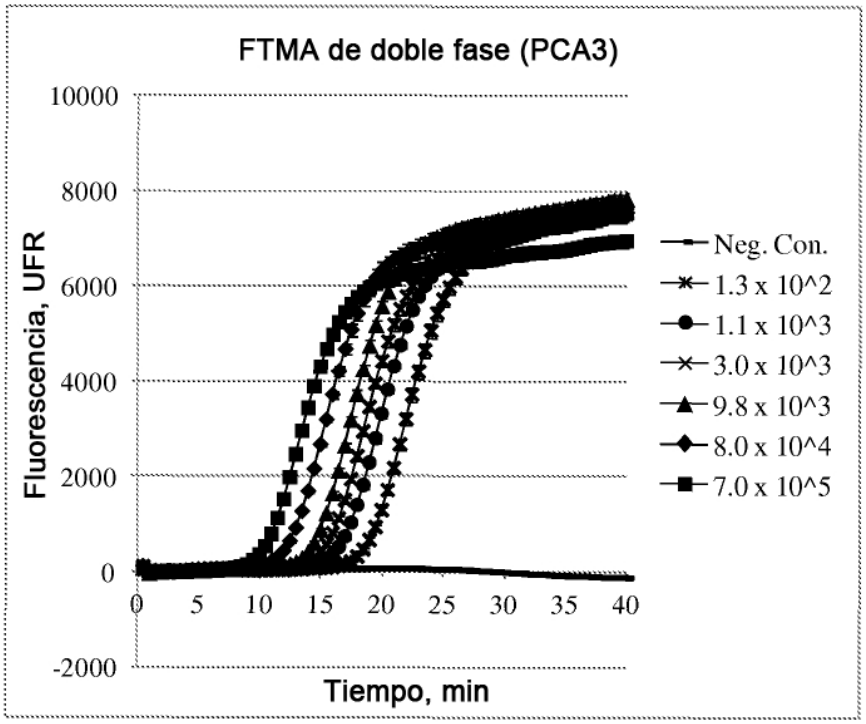

FTMA de doble fase (PCA3)
Fluorescencia, UFR
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con.
1.3 x 10^2
1.1 x 10^3
3.0 x 10^3
9.8 x 10^3
8.0 x 10^4
7.0 x 10^5

FIG. 8B

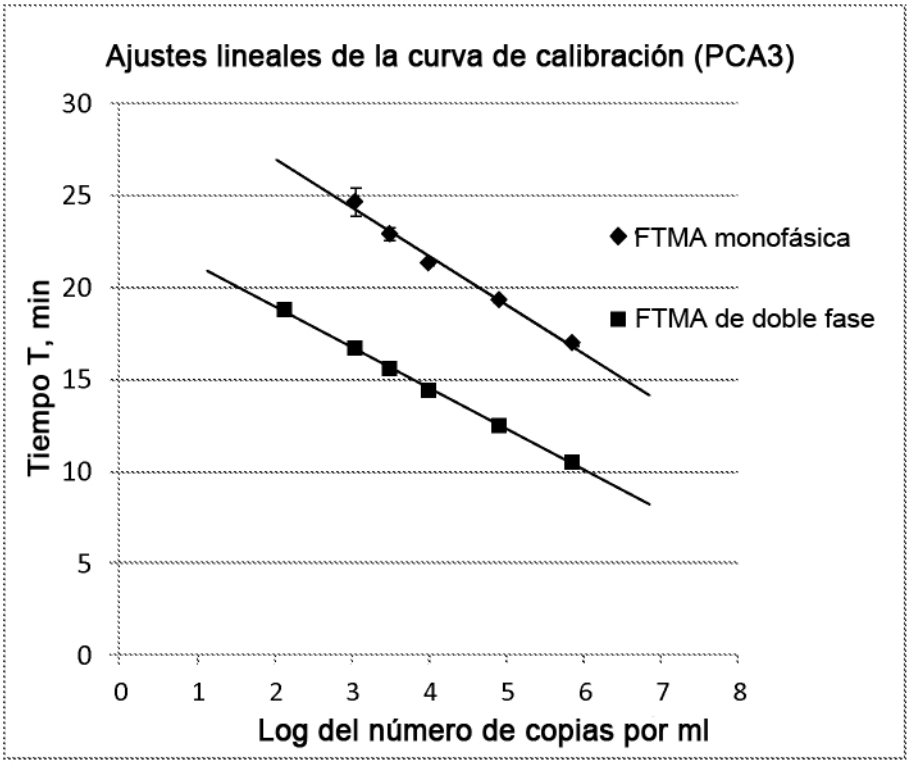

Ajustes lineales de la curva de calibración (PCA3)
Tiempo T, min
30
25
20
15
10
5
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Log del número de copias por ml
FTMA monofásica
FTMA de doble fase

FIG. 8C

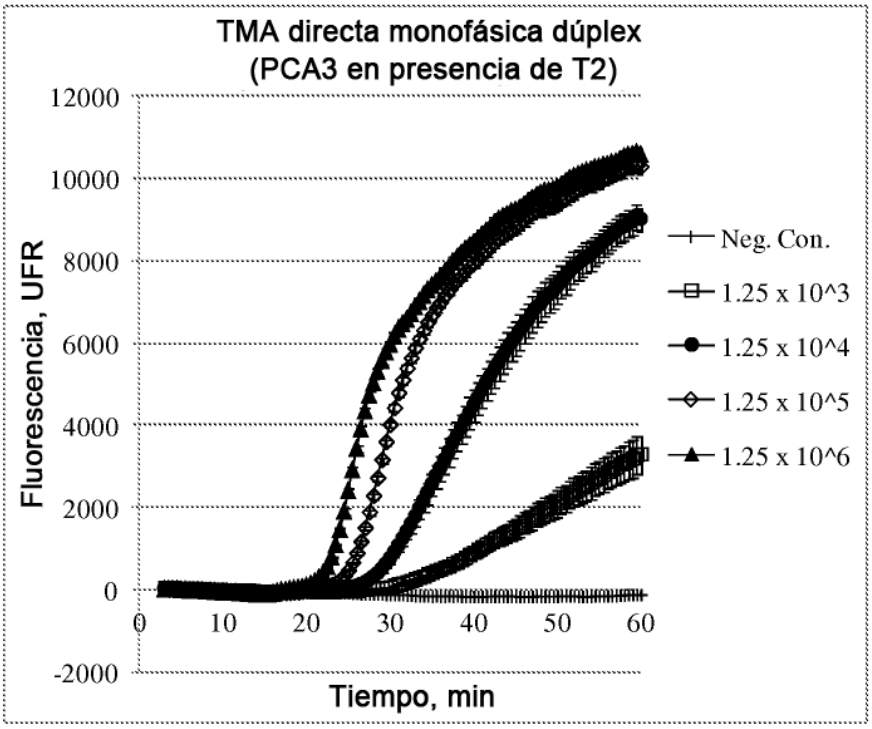

TMA directa monofásica dúplex
(PCA3 en presencia de T2)
Fluorescencia, UFR
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
0
10
20
30
40
50
60
Tiempo, min
Neg. Con.
1.25 x 10^3
1.25 x 10^4
1.25 x 10^5
1.25 x 10^6

FIG. 9A

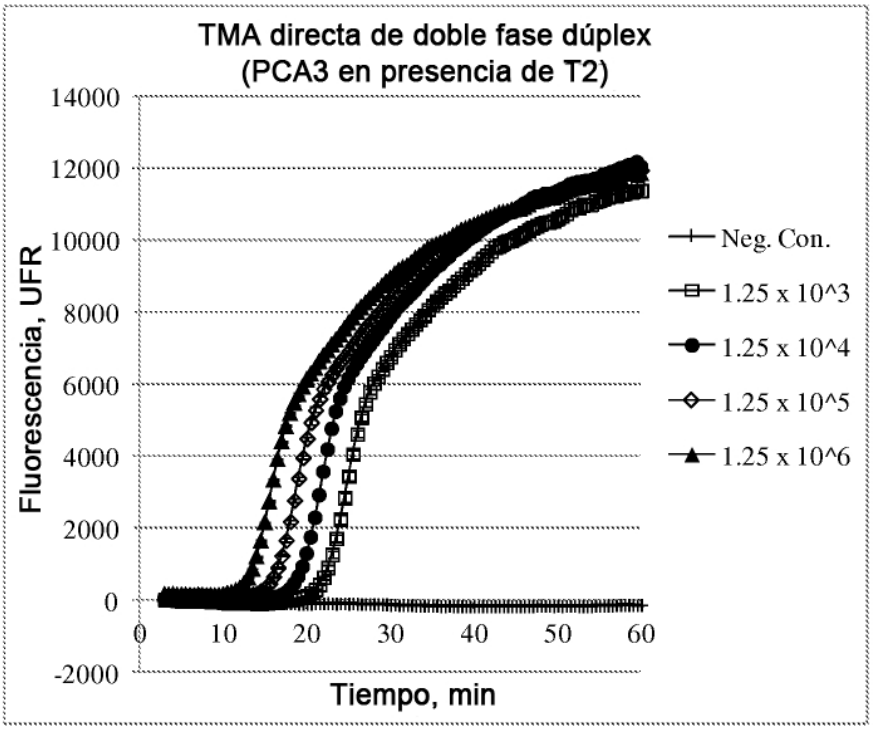

TMA directa de doble fase dúplex
(PCA3 en presencia de T2)
Fluorescencia, UFR
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
0
10
20
30
40
50
60
Tiempo, min
Neg. Con.
1.25 x 10^3
1.25 x 10^4
1.25 x 10^5
1.25 x 10^6

FIG. 9B

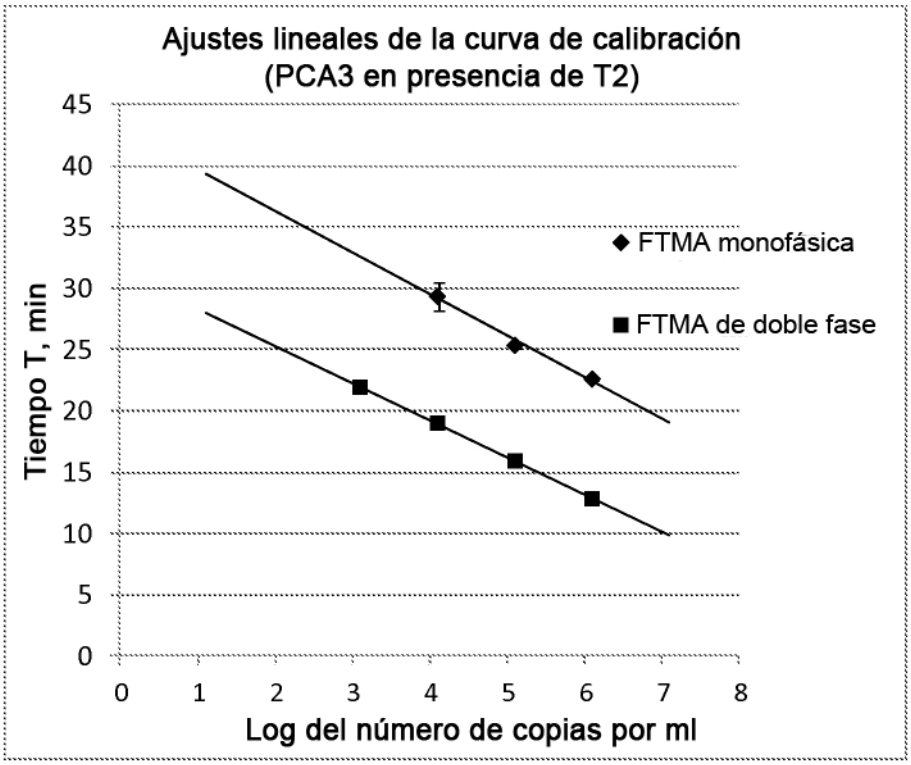

Ajustes lineales de la curva de calibración
(PCA3 en presencia de T2)
Tiempo T, min
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Log del número de copias por ml
FTMA monofásica
FTMA de doble fase

FIG. 9C

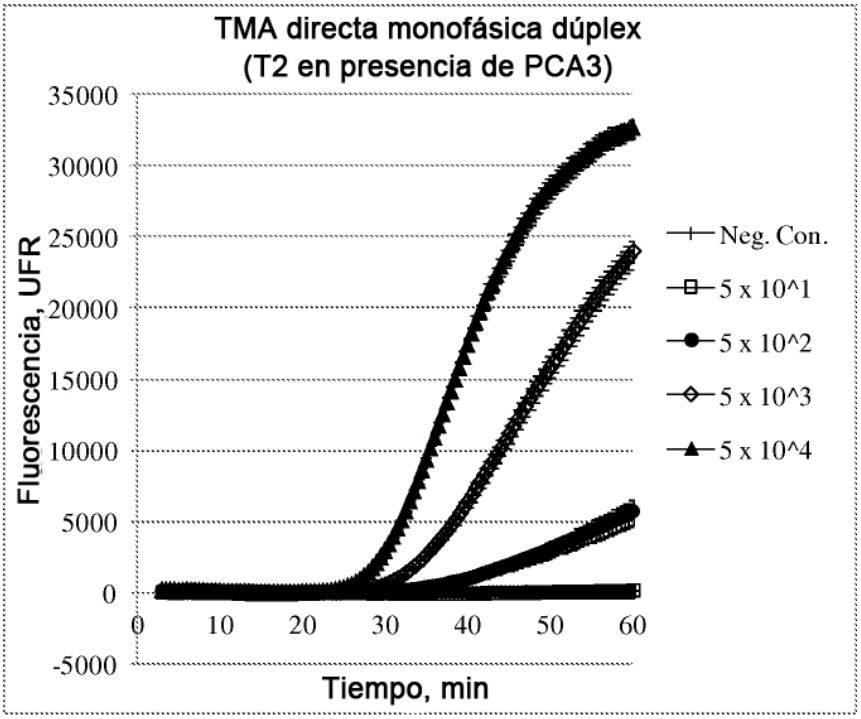

TMA directa monofásica dúplex
(T2 en presencia de PCA3)
Fluorescencia, UFR
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
-5000
0
10
20
30
40
50
60
Tiempo, min
Neg. Con.
5 x 10^1
5 x 10^2
5 x 10^3
5 x 10^4

FIG. 9D

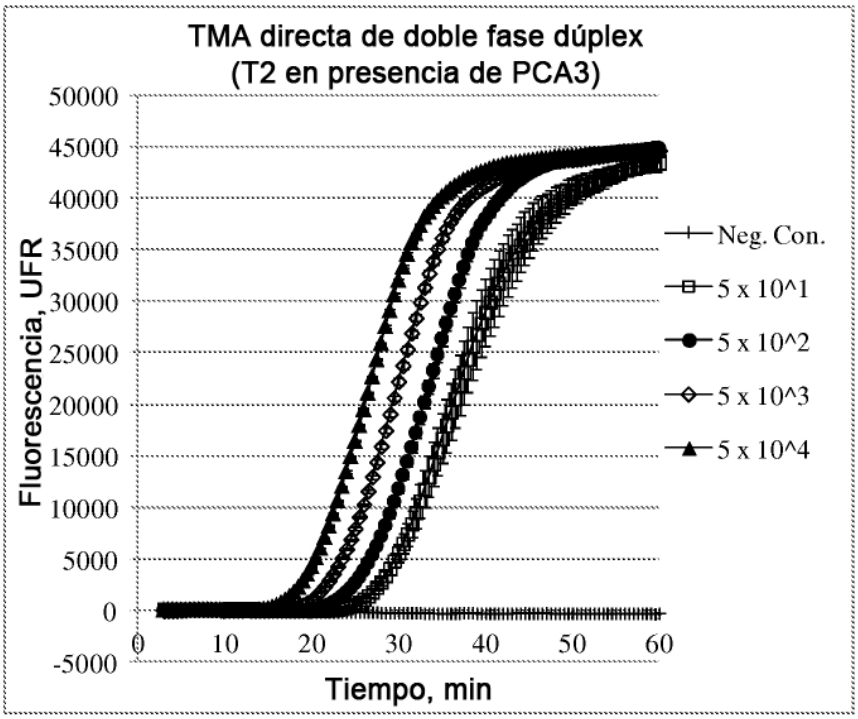

TMA directa de doble fase dúplex
(T2 en presencia de PCA3)
Fluorescencia, UFR
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
-5000
0
10
20
30
40
50
60
Tiempo, min
Neg. Con.
5 x 10^1
5 x 10^2
5 x 10^3
5 x 10^4

FIG. 9E

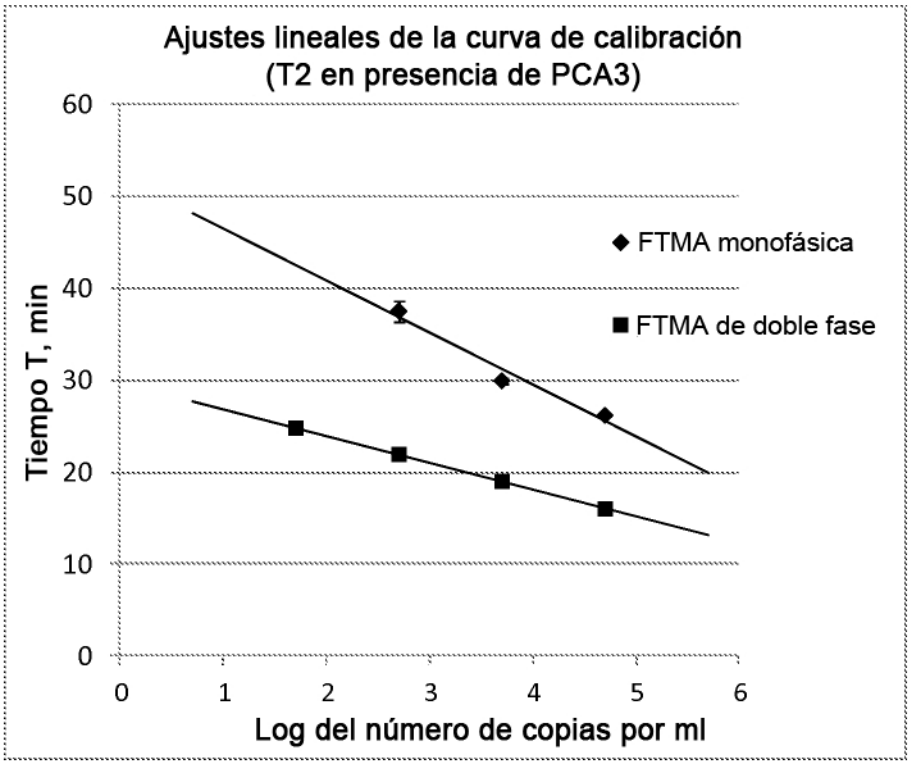

Ajustes lineales de la curva de calibración
(T2 en presencia de PCA3)
60
50
40
30
20
10
0
Tiempo T, min
0
1
2
3
4
5
6
Log del número de copias por ml
FTMA monofásica
FTMA de doble fase

FIG. 9E

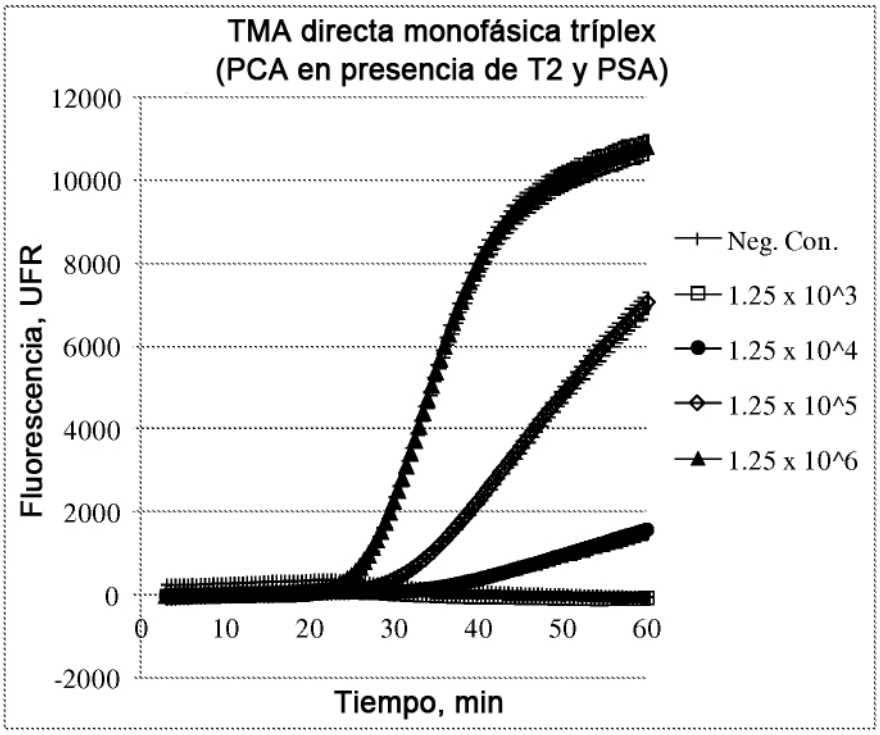


FIG. 10A

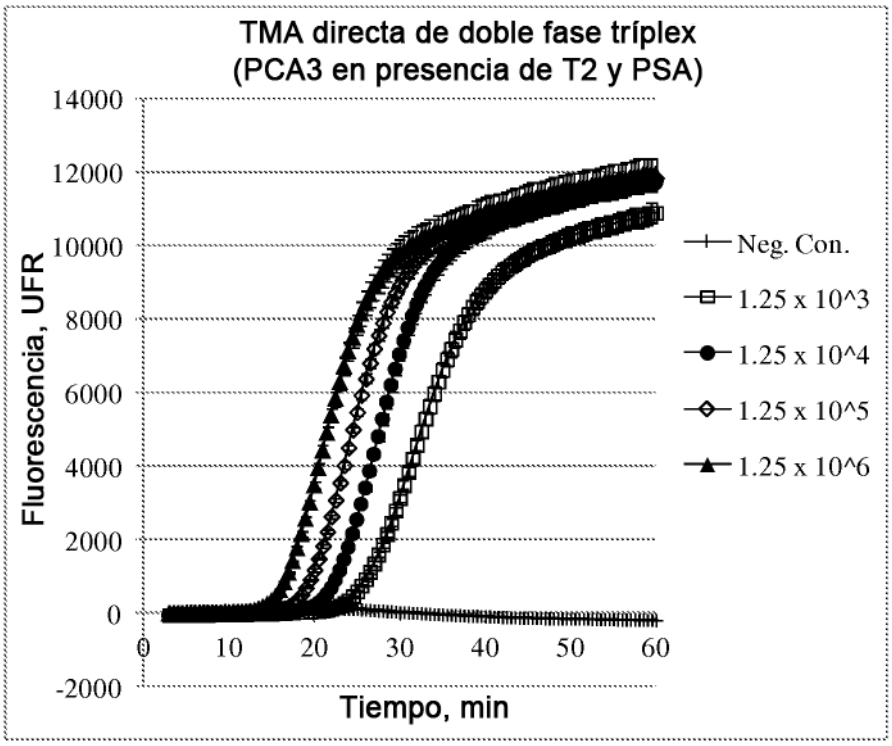


FIG. 10B

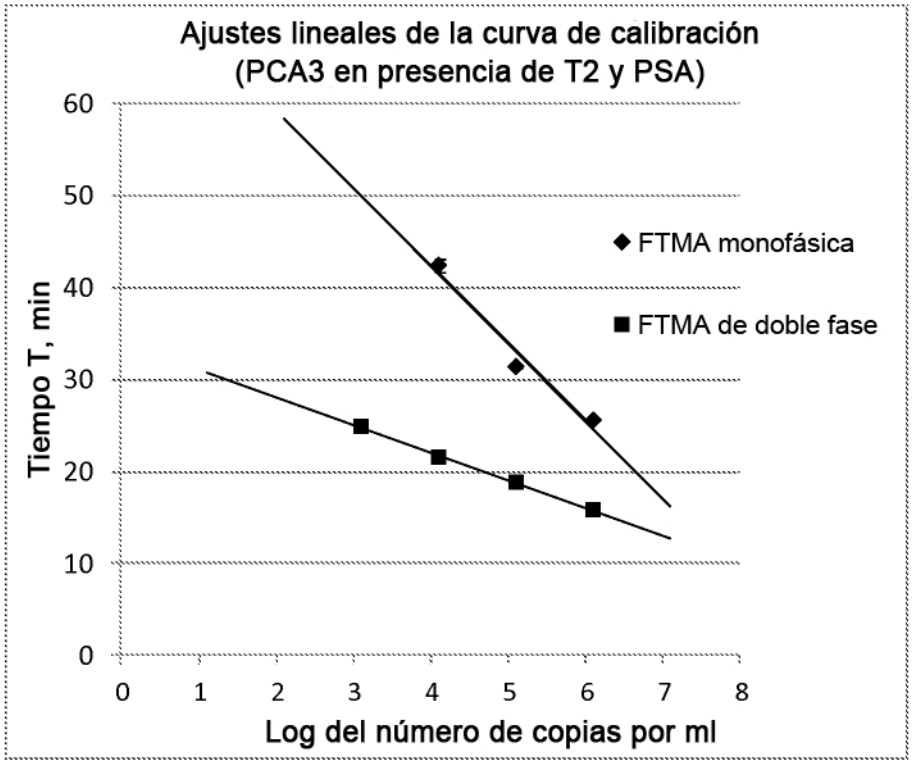

Ajustes lineales de la curva de calibración
(PCA3 en presencia de T2 y PSA)
Tiempo T, min
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Log del número de copias por ml
FTMA monofásica
FTMA de doble fase

FIG. 10C

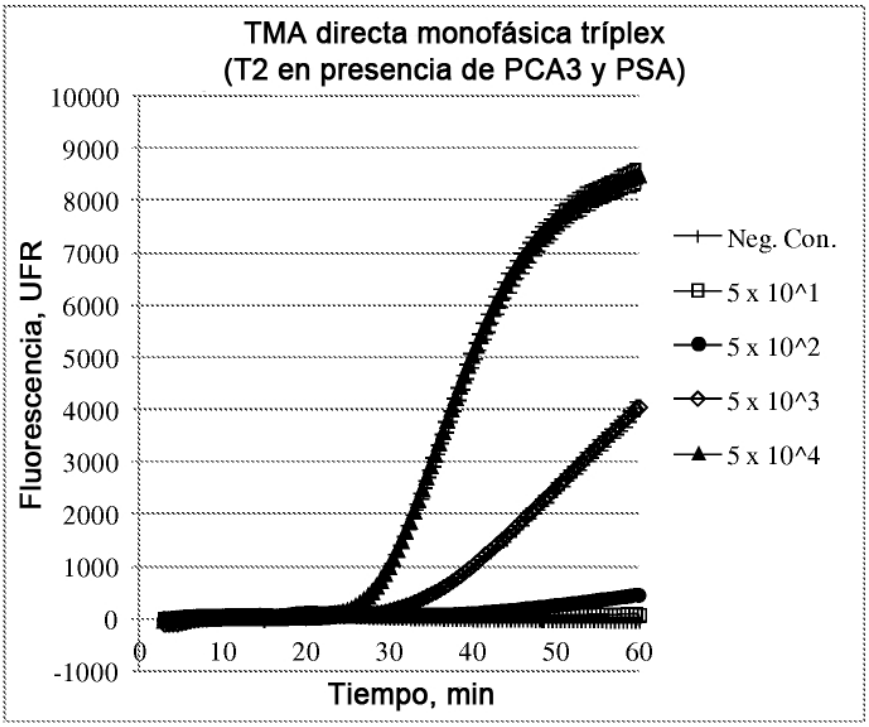


FIG. 10D

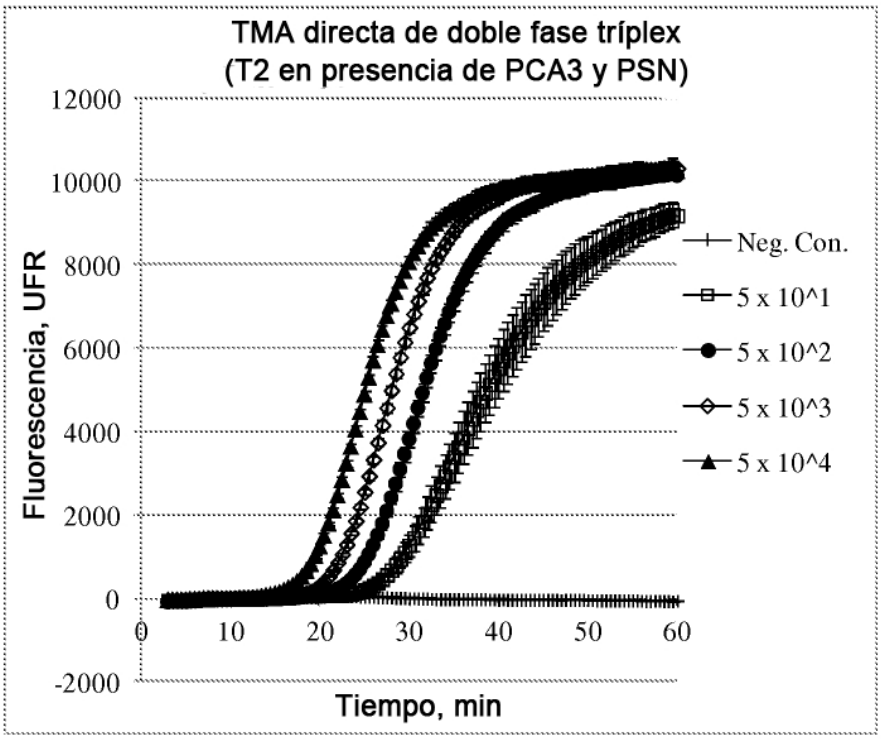


FIG. 10E

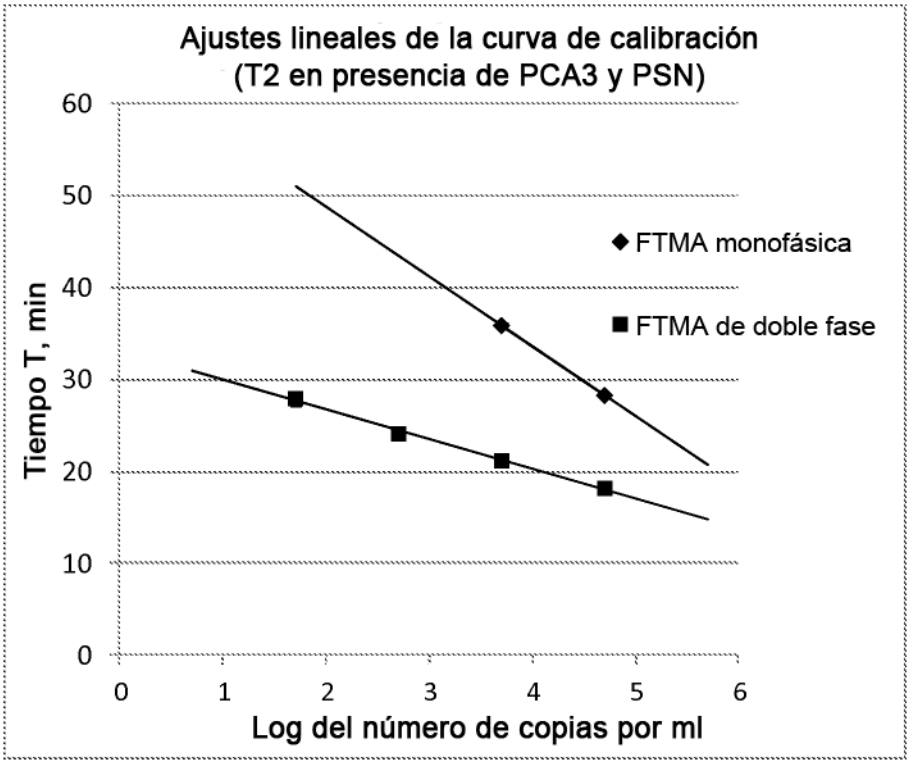

Ajustes lineales de la curva de calibración
(T2 en presencia de PCA3 y PSN)
Tiempo T, min
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
6
Log del número de copias por ml
FTMA monofásica
FTMA de doble fase

FIG. 10F

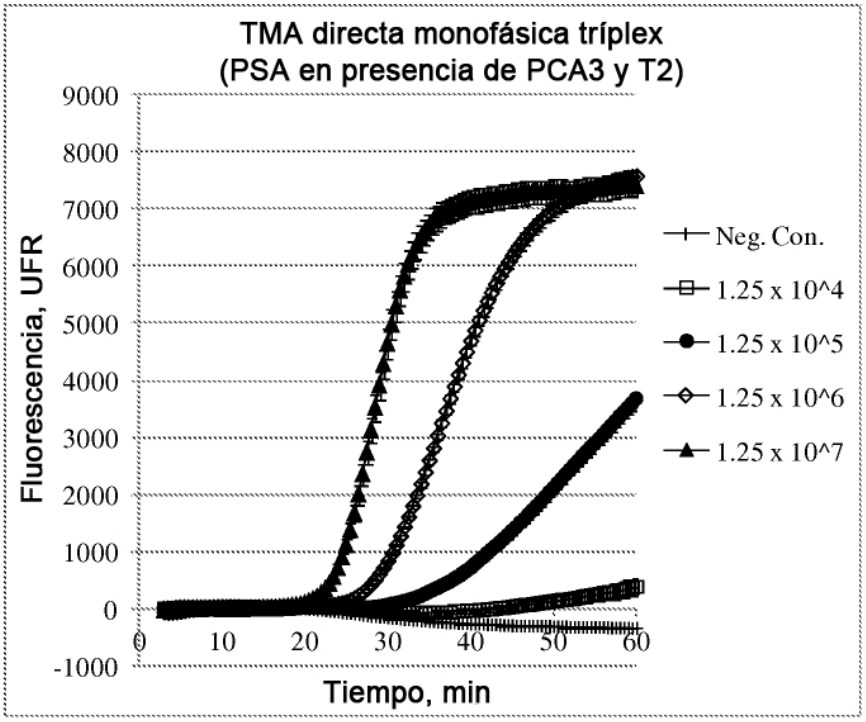


FIG. 10G

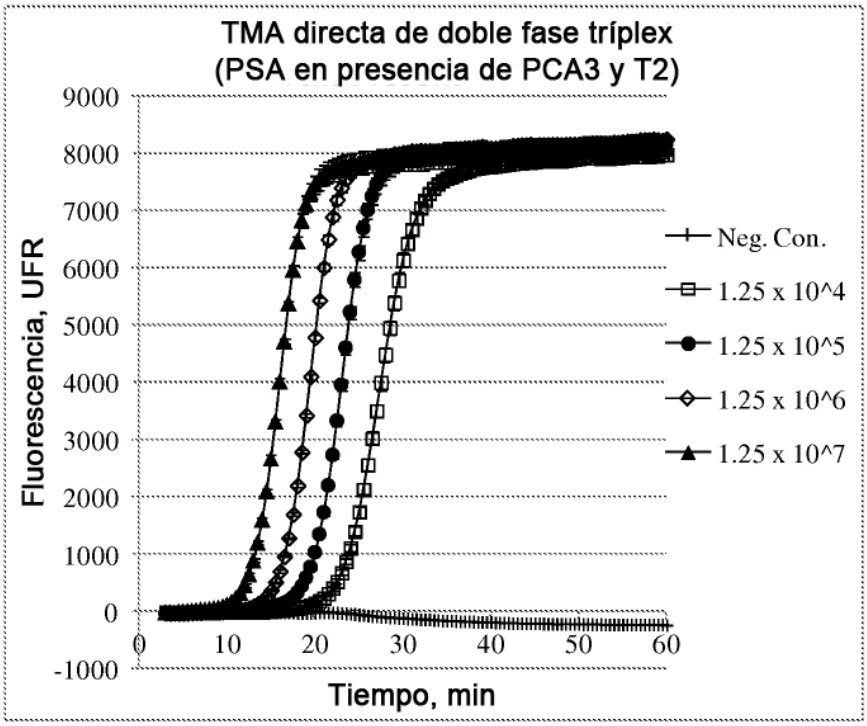


FIG. 10H

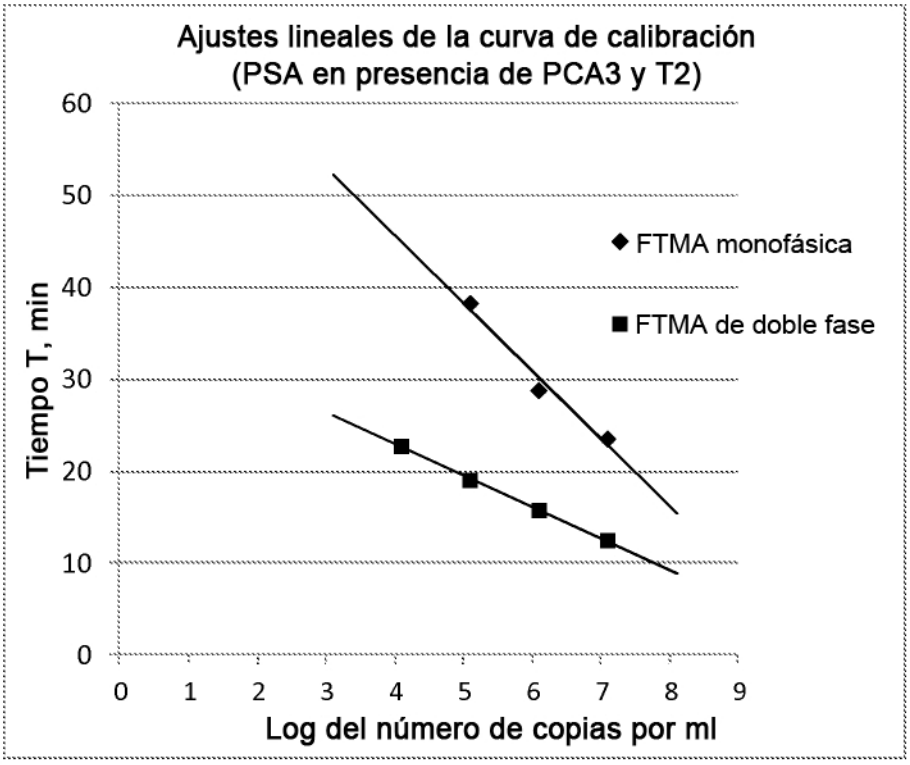

Ajustes lineales de la curva de calibración
(PSA en presencia de PCA3 y T2)
Tiempo T, min
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Log del número de copias por ml
FTMA monofásica
FTMA de doble fase

FIG. 10I

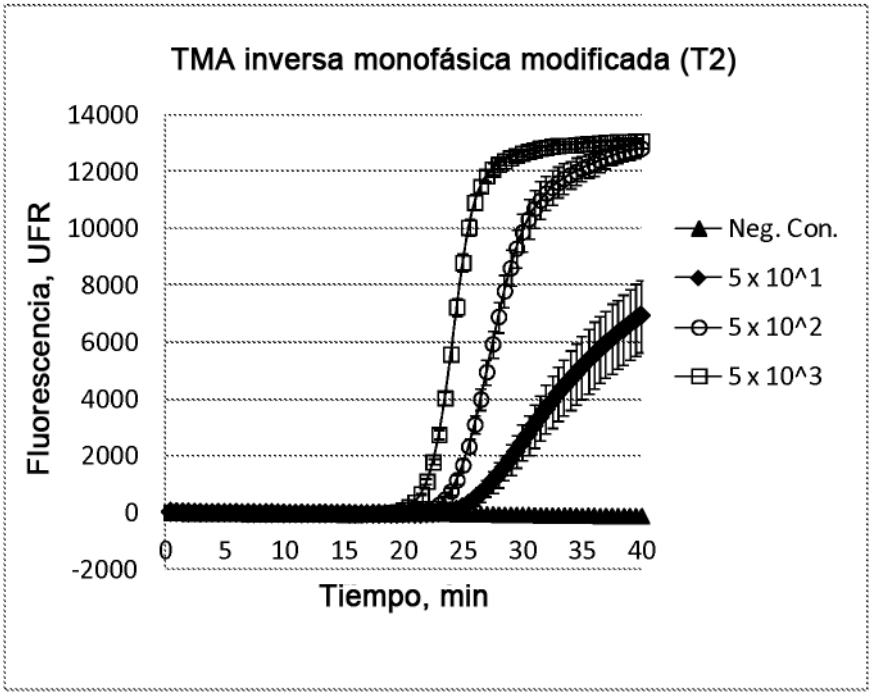


FIG. 11A

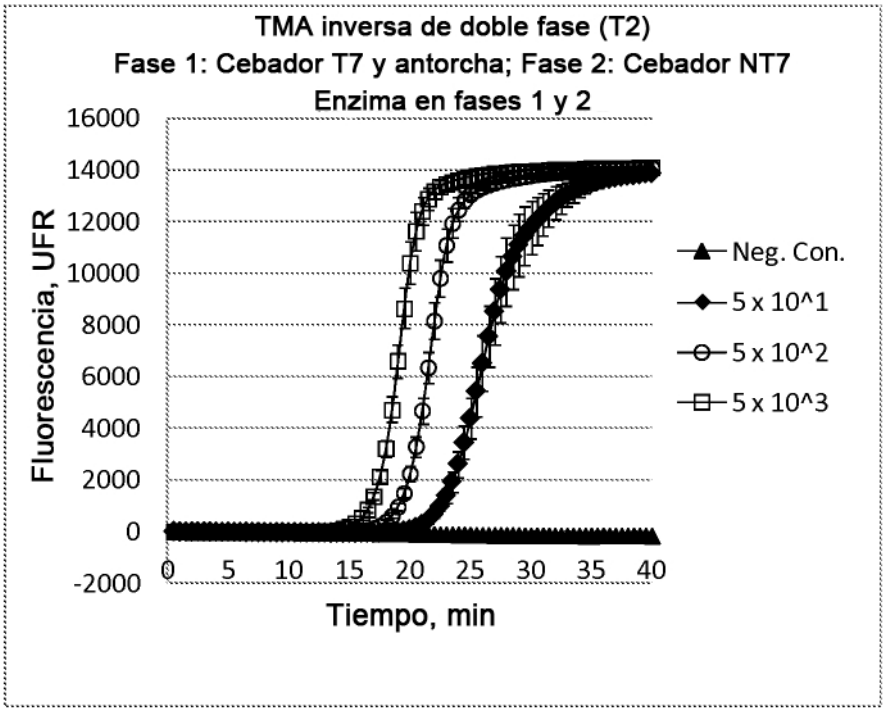


FIG. 11B

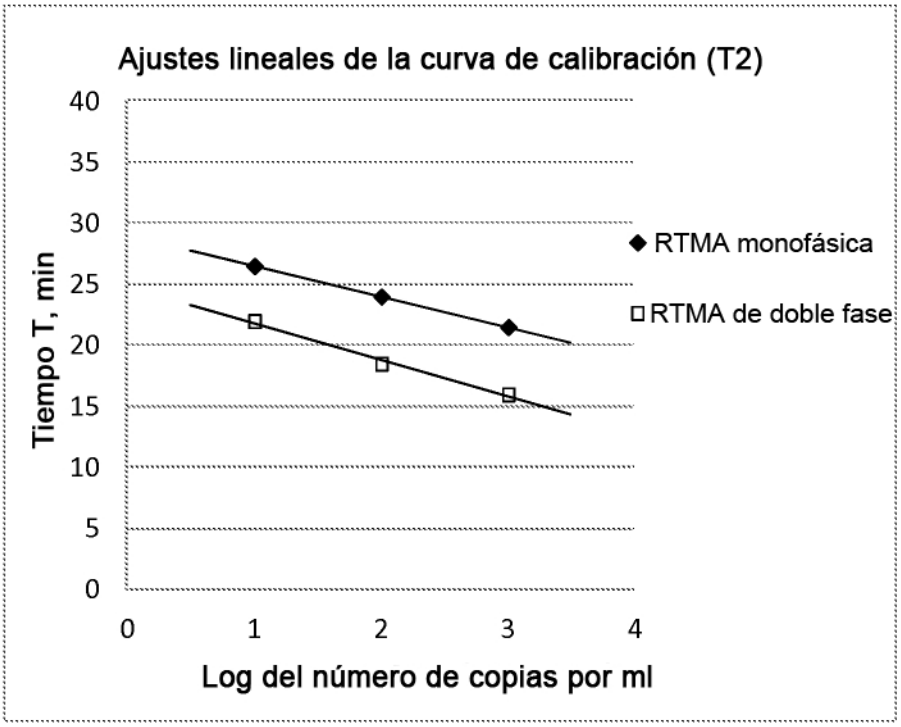

Ajustes lineales de la curva de calibración (T2)
Tiempo T, min
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
1
2
3
4
Log del número de copias por ml
RTMA monofásica
RTMA de doble fase

FIG. 11C

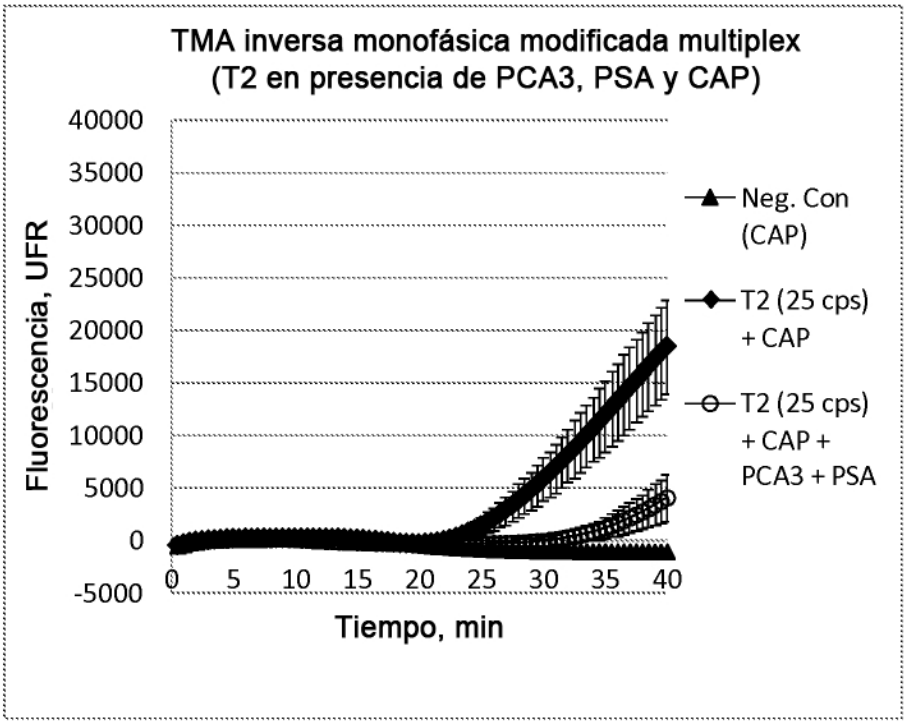


FIG. 12A

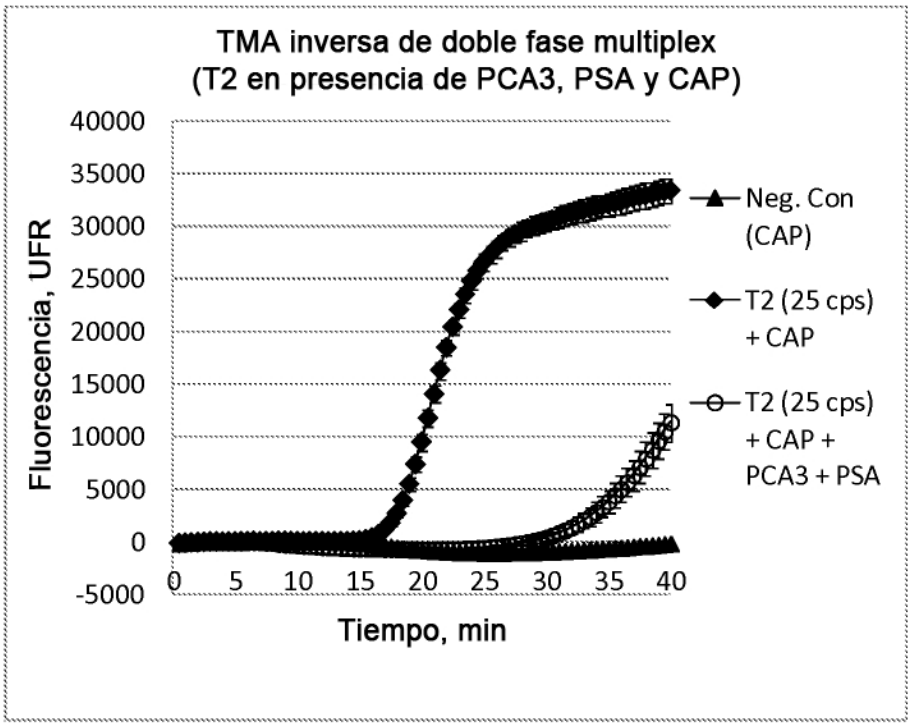


FIG. 12B

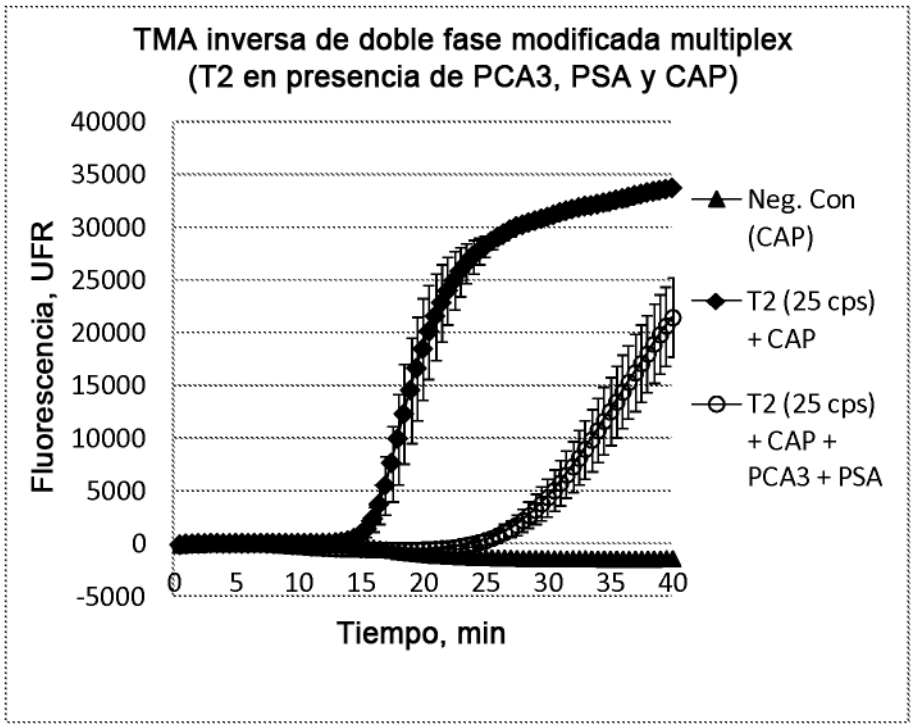

TMA inversa de doble fase modificada multiplex
(T2 en presencia de PCA3, PSA y CAP)
Fluorescencia, UFR
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
-5000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con (CAP)
T2 (25 cps) + CAP
T2 (25 cps) + CAP + PCA3 + PSA

FIG. 12C

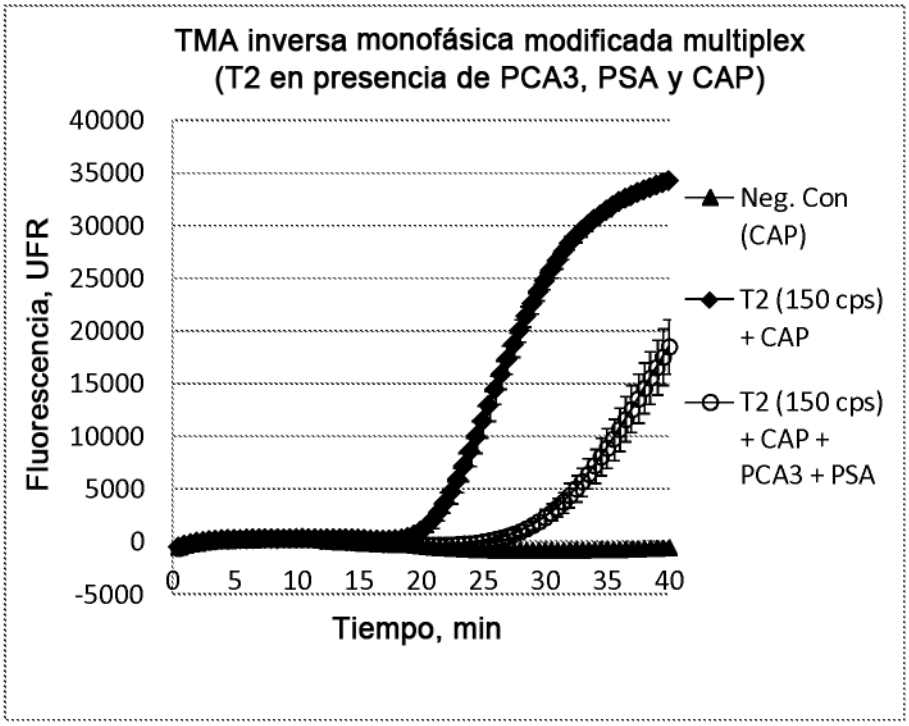


FIG. 13A

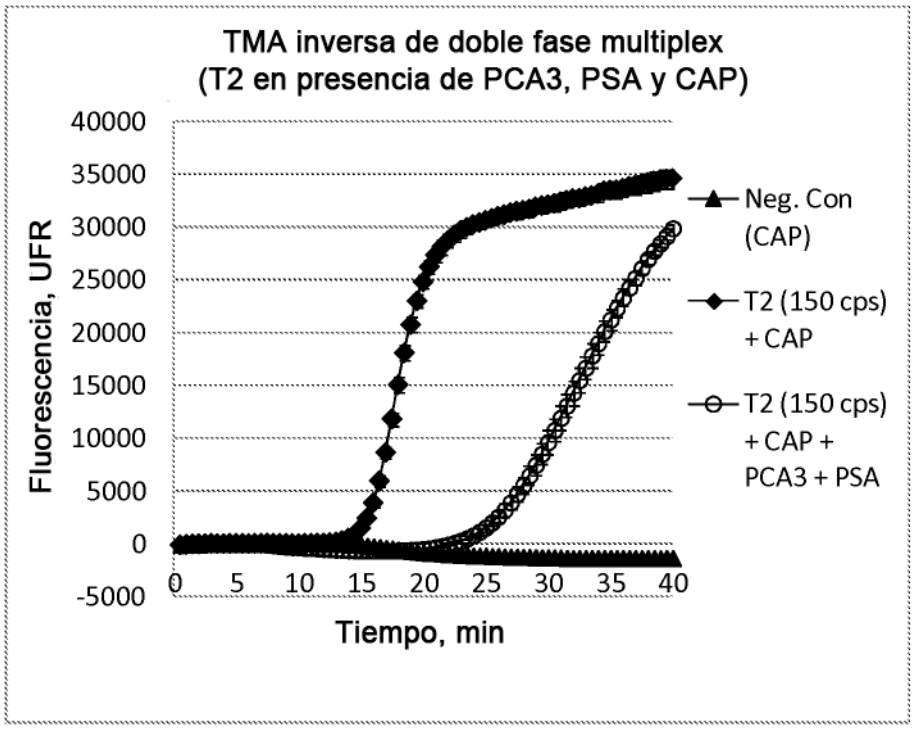


FIG. 13B

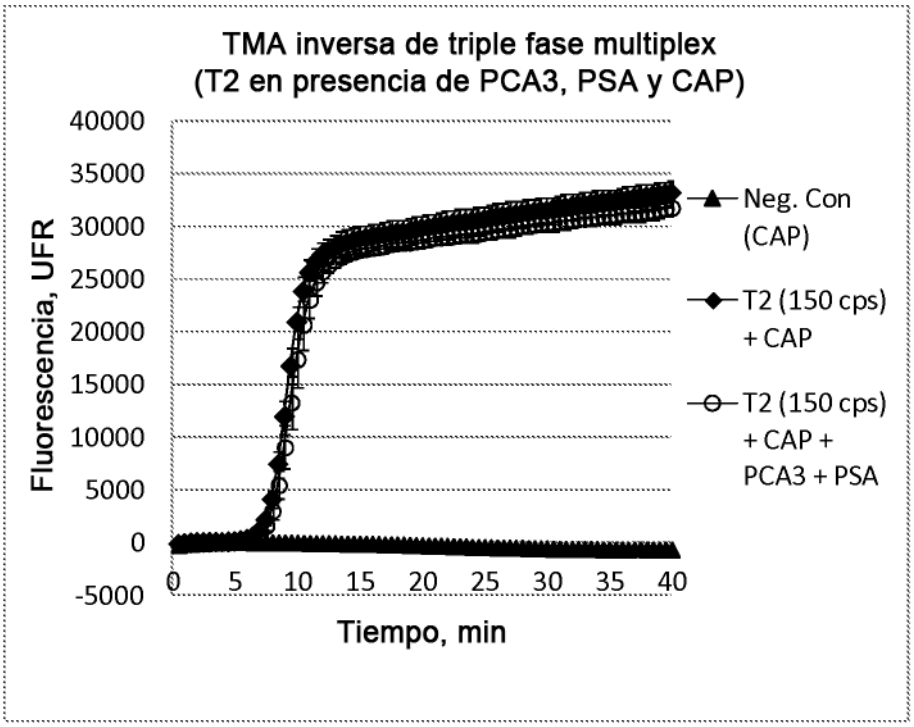

TMA inversa de triple fase multiplex
(T2 en presencia de PCA3, PSA y CAP)
Fluorescencia, UFR
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
-5000
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Tiempo, min
Neg. Con (CAP)
T2 (150 cps) + CAP
T2 (150 cps) + CAP + PCA3 + PSA

FIG. 13C