

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 139**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6832 (2008.01)

C12Q 1/686 (2008.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

C12Q 1/689 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.10.2012 PCT/US2012/059554**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13055789**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.10.2012 E 12840751 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2766501**

54 Título: **Amplificación cuantitativa de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

14.10.2011 US 201161547573 P

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

20.10.2020

73 Titular/es:

**ACCUGENOMICS, INC. (100.0%)
1410 Commonwealth Drive, Suite 105
Wilmington, NC 28403-0365, US**

72 Inventor/es:

MORRISON, TOM

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 788 139 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 cuantitativa de ácidos nucleicos

Antecedentes de la invención

5 La PCR cuantitativa (qPCR) tiene un umbral de detección inferior excelente, una respuesta señal a analito y un intervalo dinámico. Sin embargo, la mayoría de las plataformas de qPCR en tiempo real disponibles comercialmente están limitadas en su idoneidad para diagnósticos debido a la variabilidad de instrumento a instrumento y al control de calidad insuficiente (incluida la falta de control para los inhibidores de PCR). La mayoría de los procedimientos se basan en mediciones repetidas para proporcionar cierto control de los resultados falsos negativos y positivos; sin embargo, este enfoque requiere un consumo de muestra adicional y no controla las sustancias que interfieren

10 específicas de la muestra tal como los inhibidores específicos del ensayo. Este problema se agrava por el hecho de que, con frecuencia, en muestras clínicas, el rendimiento del ARN es bajo y este bajo rendimiento del ARN limita el número de ensayos por prueba. Además, más pruebas consumen reactivos costosos y conllevan flujos de trabajo complicados, que requieren mano de obra altamente cualificada y reactivos costosos, haciendo la prueba costosa y posiblemente retrasando la adopción e implementación generalizadas, a pesar de su valor clínico intrínseco.

15 Las compañías de diagnóstico molecular y farmacéuticas, los médicos y la FDA están teniendo problemas con la forma de implementar diagnósticos basados en qPCR. Las plataformas disponibles comercialmente para medir la expresión génica, los procedimientos de qPCR que utilizan un patrón interno, no tienen la concordancia entre sitios necesaria para el cálculo exacto de las puntuaciones de resultados. El documento US2006/0127907 desvela un procedimiento para detectar mutación génica, pero el procedimiento desvelado no proporciona una medición cuantitativa de la

20 cantidad inicial de ácido nucleico diana.

Las barreras más significativas para la implementación del diagnóstico es la cuantificación precisa y potente de los transcritos génicos. Un claro beneficio para mejorar las capacidades de atención de la salud humana sería un sistema que proporcione la sensibilidad analítica y el intervalo dinámico lineal de qPCR, mientras minimiza la variación analítica entre laboratorios, el coste y el consumo de muestras. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de procedimientos

25 de diagnóstico a partir de la detección de dianas de ácidos nucleicos en una muestra que sean clínicamente implementables y tengan mayor sensibilidad analítica, flujo de trabajo simplificado y medidas de control de calidad mejoradas.

Sumario de la invención

30 Como se describe a continuación, la presente invención presenta procedimientos que proporcionan una PCR cuantitativa que reduce el efecto de la sonda de hibridación sobre la amplificación y potencia la detección de una diana de ácido nucleico en una muestra, tal como una muestra biológica.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para medir la amplificación de una molécula de ácido nucleico diana usando una sonda de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento: amplificar la molécula de ácido nucleico diana en presencia de una sonda de ácido nucleico, en el que la sonda de ácido nucleico hibrida con la

35 molécula de ácido nucleico diana y tiene una temperatura de fusión sonda:plantilla menor que la temperatura de desnaturalización, la temperatura de emparejamiento y la temperatura de extensión utilizadas en un ciclo de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el que dicho procedimiento mide cuantitativamente la cantidad inicial de dicho ácido nucleico diana mediante PCR cuantitativa competitiva o PCR cuantitativa en tiempo real.

40 En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, el ácido nucleico diana es ARN o ADN. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, la sonda de ácido nucleico es fluorogénica. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, se utiliza fluorescencia para generar una curva de fusión. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, el procedimiento implica el uso de un patrón interno. En diversas

45 realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, el procedimiento implica una etapa previa de amplificación o RT-PCR.

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, se utiliza un desnaturizante químico para aumentar la ΔT_f entre la temperatura de emparejamiento y la T_f de la sonda. En diversas realizaciones, el desnaturizante es una o más de una amida de bajo peso molecular, formamida, N-metilformamida, N,N-dimetilformamida, 2-pirrolidona, N-metilpirrolidona, N-hidroxiethylpirrolidona, acetamida, N-metilacetamida, N,N-dimetilacetamida, propionamida, isobutiramida, betaína, un detergente no iónico, Triton X-100, Tween 20, Nonidet P-40, cloruro de tetrametilamonio (TMAC), 7-deaza-2'-desoxiguanosina (dC⁷GTP), glicerol, polietilenglicol, hidróxido de metilmercurio, ácidos plurónicos y ditiotreitól (DTT).

50

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, la sonda está diseñada para tener una T_f sonda:plantilla menor que la temperatura de desnaturalización, la temperatura de emparejamiento y la temperatura de extensión utilizada para la amplificación. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, el procedimiento implica además diseñar la sonda para que tenga una T_f

55

sonda:plantilla menor que la temperatura de desnaturalización, la temperatura de emparejamiento y la temperatura de extensión utilizada para la amplificación (por ejemplo, incluyendo una o más bases no coincidentes o bases modificadas en la sonda y/o acortando la sonda. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, la temperatura de desnaturalización, la temperatura de emparejamiento y la temperatura de extensión utilizadas para la amplificación se incrementan por encima de la T_f sonda:plantilla (por ejemplo, aumentando la temperatura de emparejamiento de los cebadores para la amplificación por encima de la T_f sonda:plantilla).

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, la muestra es un fluido biológico o una muestra de tejido derivada de un paciente (p. ej., sangre, suero, orina, semen o saliva). En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, el ácido nucleico diana deriva de una bacteria, un virus, una espora, un hongo, un parásito, una célula procariota o una célula eucariota. En determinadas realizaciones, la célula eucariota es una célula neoplásica derivada del pulmón, mama, próstata, tiroides o páncreas.

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, la muestra se explora para identificar un marcador asociado con una afección seleccionada del grupo que consiste en neoplasia, inflamación, infección por patógenos, respuesta inmunitaria, septicemia, la presencia de metabolitos hepáticos y la presencia de un organismo genéticamente modificado. En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, la identificación del marcador diagnostica una neoplasia, identifica el tejido de origen de la neoplasia, monitoriza la respuesta de la neoplasia al tratamiento o predice el riesgo de desarrollar una neoplasia. En determinadas realizaciones, la neoplasia es leucemia mielógena crónica (LMC). En realizaciones particulares, el ácido nucleico diana es BCR-ABL.

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico diana deriva de un patógeno bacteriano seleccionado de la lista que consiste en *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Actinomyces israelii*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bacillus anthracis*, *Bacteroides*, *Bartonella*, *Bordetella*, *Bordetella pertussis*, *Borrelia*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Calymmatobacterium*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Enterobacter*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia*, *Francisella*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella*, *Haemophilus*, *Hafnia*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Morganella*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Pasteurella multocida*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Stentorophomonas*, *Streptococcus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, y *Yersinia*. En determinadas realizaciones, el patógeno bacteriano es resistente a los antibióticos.

En diversas realizaciones de cualquiera de los aspectos definidos en el presente documento, la molécula de ácido nucleico diana deriva de un virus seleccionado de la lista que consiste en el virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia humana, Retrovirus, Picornavirus, virus de la polio, virus de la hepatitis A, Enterovirus, virus Coxsackie humano, rinovirus, ecovirus, Calcivirus, Togavirus, virus de encefalitis equina, virus de la rubeola, Flavivirus, virus del dengue, virus de encefalitis, virus de la fiebre amarilla, Coronavirus, Rabdovirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, Filovirus, virus del Ébola, Paramixovirus, virus de parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, Ortomixovirus, virus de la gripe, Virus Hantaan, virus bunga, flebovirus, Nairovirus, Arenavirus, virus de la fiebre hemorrágica, reovirus, orbivirus, Rotavirus, Birnavirus, Hepadnavirus, virus de la hepatitis B, Parvovirus, Papovavirus, virus del papiloma, virus de polioma, adenovirus, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, virus de la varicela zóster, citomegalovirus, virus del herpes, variola virus, virus vaccinia, virus de la viruela, Virus de la peste porcina africana, Virus Norwalk y astrovirus. El ámbito de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado comprendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a los expertos una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton y col., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2^a ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5^a ed., R. Rieger y col. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a continuación, a menos que se especifique lo contrario.

Por "alteración" se entiende un aumento o disminución. Una alteración puede ser de tan solo el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, o del 40 %, 50 %, 60 %, o incluso hasta el 75 %, 80 %, 90 % o 100 %.

Por "amplificar" se entiende aumentar el número de copias de una molécula. En un ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza para amplificar ácidos nucleicos. Como se usa en el presente documento, "preamplificar" se entiende como aumentar el número de copias de una molécula (por ejemplo, un biomarcador o molécula de ácido nucleico) antes de amplificar exponencialmente la molécula. Por ejemplo, la preamplificación puede implicar un aumento lineal en el número de copias de una molécula.

Como se usa en el presente documento, "análogo de base" se refiere a un resto heterocíclico que se ubica en la posición 1' de un resto de azúcar de nucleótido en un nucleótido modificado que puede incorporarse en una doble

cadena de ácido nucleico (o la posición equivalente en una sustitución de resto de azúcar de nucleótido que puede incorporarse en una doble cadena de ácido nucleico). En los ARNbc de la invención, un análogo de base es generalmente una base de purina o pirimidina, excluyendo las bases comunes de guanina (G), citosina (C), adenina (A), timina (T) y uracilo (U). Los análogos de base pueden formar doble cadena con otras bases o análogos de base en los ARNbc. Los análogos de base incluyen aquellos útiles en los compuestos y procedimientos de la invención, por ejemplo, los desvelados en las Patentes de EE.UU. N.º 5.432.272 y 6.001.983 de Benner y la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 20080213891 de Manoharan. Ejemplos no limitantes de bases incluyen hipoxantina (I), xantina (X), 3-β-D-ribofuranosil-(2,6-diaminopirimidina; K), 3-β-D-ribofuranosil-(1-metil-pirazolo [4,3-d] pirimidina-5,7(4H, 6H)-diona; P), iso-citosina (iso-C), iso-guanina (iso-G), 1-β-D-ribofuranosil-(5-nitroindol), 1-β-D-ribofuranosil-(3-nitropirrol), 5-bromouracilo, 2-aminopurina, 4-tio-dT, 7-(2-tienil)-imidazo[4,5-b]piridina(Ds) y pirrol-2-carbaldehído (Pa), 2-amino-6-(2-tienil)purina (S), 2-oxopiridina (Y), difluorotolilo, 4-fluoro-6-metilbencimidazol, 4-metilbencimidazol, 3-metil isocarbostirililo, 5-metil isocarbostirililo y 3-metil-7-propinil isocarbostirililo, 7-azaindolilo, 6-metil-7-azaindolilo, imidizopiridinilo, 9-metil-imidizopiridinilo, pirrolopirizinilo, isocarbostirililo, 7-propinil isocarbostirililo, propinil-7-azaindolilo, 2,4,5-trimetilfenilo, 4-metilindolilo, 4,6-dimetilindolilo, fenilo, naftalenilo, antraceno, fenantraceno, pirenilo, estilbencilo, tetraceno, pentaceno y derivados estructurales de los mismos (Schweitzer y col., J. Org. Chem., 59:7238-7242 (1994); Berger y col., Nucleic Acids Res., 28(15):2911-2914 (2000); Moran y col., J. Am. Chem. Soc., 119:2056-2057 (1997); Morales y col., J. Am. Chem. Soc., 121:2323-2324 (1999); Guckian y col., J. Am. Chem. Soc., 118:8182-8183 (1996); Morales y col., J. Am. Chem. Soc., 122(6):1001-1007 (2000); McMinn y col., J. Am. Chem. Soc., 121:11585-11586 (1999); Guckian y col., J. Org. Chem., 63:9652-9656 (1998); Moran y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:10506-10511 (1997); Das y col., J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1:197-206 (2002); Shibata y col., J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1: 1605-1611 (2001); Wu y col., J. Am. Chem. Soc., 122(32):7621-7632 (2000); O'Neill y col., J. Org. Chem., 67:5869-5875 (2002); Chaudhuri y col., J. Am. Chem. Soc., 117:10434-10442 (1995); y la patente de EE.UU. N.º 6.218.108.). Los análogos de bases también pueden ser una base universal.

Como se usa en el presente documento, "base universal" se refiere a un resto heterocíclico ubicado en la posición 1' de un resto de azúcar de nucleótido en un nucleótido modificado, o la posición equivalente en una sustitución de resto de azúcar de nucleótido, que, cuando está presente en una doble cadena de ácido nucleico, se puede colocar frente a más de un tipo de base sin alterar la estructura de doble hélice (p. ej., la estructura de la cadena principal de fosfato). Adicionalmente, la base universal no destruye la capacidad del ácido nucleico monocatenario, en el que reside, de formar una doble cadena con un ácido nucleico diana. La capacidad de un ácido nucleico monocatenario que contiene una base universal para formar una doble cadena con un ácido nucleico diana se puede analizar mediante procedimientos evidentes para un experto en la materia (p. ej., absorbancia UV, dicroísmo circular, desplazamiento en gel, sensibilidad a nucleasa monocatenaria, etc.). Adicionalmente, las condiciones en las cuales se observa la formación de la doble cadena pueden variar para determinar la estabilidad o formación de la doble cadena, por ejemplo, temperatura, ya que la temperatura de fusión (Tf) se correlaciona con la estabilidad de las dobles cadenas de ácidos nucleicos. En comparación con un ácido nucleico monocatenario de referencia que es exactamente complementario a un ácido nucleico diana, el ácido nucleico monocatenario que contiene una base universal forma una doble cadena con el ácido nucleico diana que tiene una Tf inferior que una doble cadena formada con el ácido nucleico complementario. Sin embargo, en comparación con un ácido nucleico monocatenario de referencia en el que la base universal se ha reemplazado con una base para generar una falta de coincidencia, el ácido nucleico monocatenario que contiene la base universal forma una doble cadena con el ácido nucleico diana que tiene una Tf más alta que una doble cadena formada con el ácido nucleico que tiene la base no coincidente.

Algunas bases universales son capaces de emparejar bases formando enlaces de hidrógeno entre la base universal y la totalidad de las bases guanina (G), citosina (C), adenina (A), timina (T) y uracilo (U) en condiciones de formación de pares de bases. Una base universal no es una base que forma un par de bases con una sola base complementaria. En una doble cadena, una base universal puede formar enlaces no de hidrógeno, un enlace de hidrógeno, o más de un enlace de hidrógeno con cada una de G, C, A, T y U opuesta a ella en la cadena opuesta de una doble cadena. Preferentemente, una base universal no interacciona con la base opuesta a ella en la cadena opuesta de una doble cadena. En una doble cadena, el emparejamiento de bases entre una base universal se produce sin alterar la estructura de doble hélice de la cadena principal de fosfato. Una base universal también puede interactuar con bases en nucleótidos adyacentes en la misma cadena de ácido nucleico acumulando interacciones. Tales interacciones acumuladas estabilizan la doble cadena, especialmente en situaciones en las que la base universal no forma ningún enlace de hidrógeno con la base colocada opuesta a ella en la cadena opuesta de la doble cadena. Ejemplos no limitantes de nucleótidos de unión universal incluyen inosina, 1-β-D-ribofuranosil-5-nitroindol y/o 1-β-D-ribofuranosil-3-nitropirrol (Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 20070254362 de Quay y col.; Van Aerschot y col., An acyclic 5-nitroindazole nucleoside analogue as ambiguous nucleoside. Nucleic Acids Res. 11 de noviembre de 1995;23(21):4363-70; Loakes y col., 3-Nitropyrrole and 5-nitroindole as universal bases in primers for DNA sequencing and PCR. Nucleic Acids Res. 11 de julio de 1995;23(13):2361-6; Loakes y Brown, 5-Nitroindole as an universal base analogue. Nucleic Acids Res. 11 de octubre de 1994 1;22(20):4039-43).

Por "unión" se entiende tener una afinidad fisicoquímica por una molécula. La unión se mide por cualquiera de los procedimientos de la invención, por ejemplo, hibridación de una sonda de ácido nucleico detectable, como una sonda basada en TaqMan, sonda basada en Pleiades.

Por "muestra biológica" se entiende cualquier tejido, célula, fluido u otro material derivado de un organismo (p. ej., sujeto humano).

Por "complementario" o "complementariedad" se entiende que un ácido nucleico puede formar enlaces de hidrógeno con otra secuencia del ácido nucleico mediante el emparejamiento de bases tradicional de Watson-Crick o Hoogsteen. En referencia a las moléculas de ácidos nucleicos de la presente divulgación, a energía libre de unión para una molécula de ácido nucleico con su secuencia complementaria es suficiente para permitir la hibridación. La determinación de las energías libres de unión para las moléculas de ácidos nucleicos es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Turner y col., CSH Symp. Quant. Biol. LI I, págs. 123-133, 1987; Frier y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:9373-9377, 1986; Turner y col., J. Am. Chem. Soc. 109:3783-3785, 1987). Un porcentaje de complementariedad indica el porcentaje de restos contiguos en una molécula de ácido nucleico que puede formar enlaces de hidrógeno (por ejemplo, el emparejamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de un ácido nucleico (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de un total de 10 nucleótidos en el primer oligonucleótido que está emparejado por bases con una segunda secuencia de un ácido nucleico que tiene 10 nucleótidos representa el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, el 90 %, y el 100 % de complementariedad, respectivamente). Para determinar que un porcentaje de complementariedad es de al menos un determinado porcentaje, se calcula el porcentaje de restos contiguos en una molécula de ácido nucleico que puede formar enlaces de hidrógeno (por ejemplo, emparejamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de un ácido nucleico y se redondea al número entero más cercano (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 nucleótidos de un total de 23 nucleótidos en el primer oligonucleótido que está emparejado por bases con una segunda secuencia de un ácido nucleico que tiene 23 nucleótidos representa el 52 %, 57 %, 61 %, 65 %, 70 % y 74 %, respectivamente; y tiene al menos el 50 %, 50 %, 60 %, 60 %, 70 % y 70 % de complementariedad, respectivamente). Como se usa en el presente documento, "sustancialmente complementario" se refiere a la complementariedad entre las cadenas de modo que sean capaces de hibridarse en condiciones biológicas. Las secuencias sustancialmente complementarias tienen el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o incluso el 100 % de complementariedad. Adicionalmente, las técnicas para determinar si dos cadenas son capaces de hibridarse en condiciones biológicas mediante el examen de sus secuencias de nucleótidos son bien conocidas en la técnica.

Por "detectar" se refiere a identificar la presencia, ausencia o nivel de un agente.

Por "detectable" se entiende un resto que cuando se une a una molécula de interés hace que esta última sea detectable. Dicha detección puede ser a través de medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, marcadores útiles incluyen isótopos radiactivos, perlas magnéticas, perlas metálicas, partículas coloidales, colorantes fluorescentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como se usa comúnmente en ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos.

Como se usa en el presente documento, "doble cadena" se refiere a una estructura helicoidal doble formada por la interacción de dos ácidos nucleicos monocatenarios. Una doble cadena se forma generalmente por el enlace de hidrógeno por parejas de las bases, es decir, "emparejamiento de bases", entre dos ácidos nucleicos monocatenarios que están orientados antiparalelos entre sí. El emparejamiento de bases en las dobles cadenas generalmente se produce por emparejamiento de bases de Watson-Crick, por ejemplo, la guanina (G) forma un par de bases con citosina (C) en ADN y ARN, la adenina (A) forma un par de bases con timina (T) en el ADN y la adenina (A) forma un par de bases con uracilo (U) en el ARN. Las condiciones en las cuales se pueden formar pares de bases incluyen condiciones fisiológica o biológicamente relevantes (por ejemplo, intracelular: pH 7,2, ion potasio 140 mM; pH extracelular 7,4, ion sodio 145 mM). Además, las dobles cadenas se estabilizan acumulando interacciones entre nucleótidos adyacentes. Como se usa en el presente documento, una doble cadena puede establecerse o mantenerse por emparejamiento de bases o por acumulación de interacciones. Una doble cadena está formada por dos cadenas de ácido nucleico complementarias, que pueden ser sustancialmente complementarias o completamente complementarias.

Por "concentración eficaz semimáxima" o "CE₅₀" es la respuesta a medio camino entre el valor inicial y el máximo de la relación de la molécula diana a una molécula de referencia, que corresponde al punto de inflexión de un ajuste de curva sigmoideo cuando la relación de la molécula diana con el patrón interno se representa frente a la relación molar de la molécula de referencia.

Se dice que "hibridan" los ácidos nucleicos monocatenarios que forman pares de bases a través de varias bases. La hibridación generalmente se determina en condiciones fisiológica o biológicamente relevantes (por ejemplo, pH intracelular 7,2, ion potasio 140 mM; pH extracelular 7,4, ion sodio 145 mM). Las condiciones de hibridación generalmente contienen un catión monovalente y un tampón biológicamente aceptable y pueden o no contener un catión divalente, aniones complejos, por ejemplo, gluconato de gluconato de potasio, especies no cargadas tales como sacarosa y polímeros inertes para reducir la actividad del agua en la muestra, por ejemplo, PEG. Dichas condiciones incluyen condiciones en las que se pueden formar pares de bases.

La hibridación se mide por la temperatura necesaria para disociar los ácidos nucleicos monocatenarios que forman una doble cadena, (es decir, la temperatura de fusión, T_f). Las condiciones de hibridación también son condiciones en las que se pueden formar pares de bases. Se pueden usar varias condiciones de rigurosidad para determinar la hibridación (véase, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987) Methods Enzymol. 152:399; Kimmel, A. R. (1987) Methods Enzymol. 152:507). Las condiciones de temperatura rigurosas normalmente incluirán temperaturas de al menos aproximadamente 30 °C, más preferentemente de al menos aproximadamente 37 °C y lo más preferentemente de al menos aproximadamente 42 °C. La temperatura de hibridación para los híbridos que se prevé que tengan menos de 50 pares de bases de longitud debe ser 5-10 °C menor que la temperatura de fusión (T_f) del híbrido, en la que la

Tf se determina de acuerdo con las siguientes ecuaciones. Para híbridos de menos de 18 pares de bases de longitud, $Tf(^{\circ}C) = 2(\text{número de bases A+T}) + 4(\text{número de bases G+C})$. Para híbridos de entre 18 y 49 pares de bases de longitud, $Tf(^{\circ}C) = 81,5 + 16,6(\log_{10} [Na^{+}]) + 0,41 (\% G+C) - (600/N)$, en las que N es el número de bases en el híbrido y $[Na^{+}]$ es la concentración de iones de sodio en el tampón de hibridación ($[Na^{+}]$ para $1 \times SSC = 0,165 M$). Las técnicas de hibridación son bien conocidas por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein y Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 72:3961, 1975); Ausubel y col. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York (2001); Berger y Kimmel (Antisense to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Nueva York); y Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. Los parámetros adicionales variables, tales como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS), la inclusión o exclusión de ADN transportador y las condiciones de lavado son bien conocidas por los expertos en la materia. Las variaciones útiles sobre las condiciones de hibridación serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia.

Por "aumentos" se entiende una alteración positiva de al menos el 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 1000 % o más.

Por "patrón interno" se entiende una plantilla o molécula competitiva que se amplifica en presencia de una plantilla o molécula natural.

Por "perfil de expresión génica" se entiende una caracterización de la expresión o del nivel de expresión de dos o más polinucleótidos.

Por "marcador" o "biomarcador" se entiende un analito cuya presencia, ausencia o nivel está regulado diferencialmente en conexión con una enfermedad o afección en relación con una referencia. Analitos ejemplares incluyen polinucleótidos, polipéptidos y fragmentos de los mismos. Por ejemplo, BCR-ABL es un biomarcador para la leucemia mielógena crónica.

Por "coincidencia" se entiende cuando un nucleótido es capaz de formar un par de bases con otro nucleótido (por ejemplo, para formar una molécula bicatenaria). El emparejamiento de bases en las dobles cadenas generalmente se produce por emparejamiento de bases de Watson-Crick, por ejemplo, la guanina (G) forma un par de bases con citosina (C) en ADN y ARN, la adenina (A) forma un par de bases con timina (T) en el ADN y la adenina (A) forma un par de bases con uracilo (U) en el ARN.

Por "falta de coincidencia" se entiende cuando un nucleótido de una cadena de un ácido nucleico no es capaz de formar un par de bases con un nucleótido en la posición correspondiente de una segunda cadena de nucleótidos en una doble cadena. Dos cadenas de ácido nucleico aún pueden hibridar, incluso si una, dos, tres, o más posiciones tienen una falta de coincidencia. Se pueden tolerar faltas de coincidencia siempre que exista suficiente complementariedad entre dos secuencias del ácido nucleico.

Por "temperatura de fusión" o "Tf" se entiende la temperatura más baja a la que una sonda de detección o cebador no se une o hibrida con un ácido nucleico diana. La temperatura de fusión se puede determinar por el punto de inflexión del perfil de la curva de fusión, que mide la hibridación en función de la temperatura. La temperatura de fusión también se puede predecir usando programas (Epoch usa Aglutinantes de Surco Mayor y nucleótidos modificados para ajustar la Tf de la unión). Como se usa en el presente documento, " ΔTf " se entiende como la diferencia entre las temperaturas de funcionamiento de la PCR (por ejemplo, la temperatura de emparejamiento) y la Tf de la sonda.

Por "neoplasia" se entiende una enfermedad o trastorno caracterizado por una proliferación excesiva o una apoptosis reducida. Las neoplasias ilustrativas para las cuales se puede usar la invención incluyen, pero sin limitación, leucemias (por ejemplo, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia monocítica aguda, eritroleucemia aguda, leucemia crónica, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma (enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin), macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada y tumores sólidos tales como sarcomas y carcinomas (p. ej., fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer de útero, cáncer de testículos, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, schwannoma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" se refiere a desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, o nucleótidos modificados y polímeros de los mismos en forma mono- o bicatenaria. La expresión abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces modificados de la cadena

principal, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de forma similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforoamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos nucleicos peptídicos (ANP).

5 Por "natural" se entiende endógeno u originario de una muestra.

Como se usa en el presente documento, una "sonda de ácido nucleico u oligonucleótido" se define como un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, generalmente a través del emparejamiento de bases complementarias, generalmente a través de la formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa en el presente documento, una sonda puede incluir bases naturales (es decir, A, G, C o T) o modificadas (7-deazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda pueden estar unidas por un enlace que no sea un enlace fosfodiéster, siempre que no interfiera con la hibridación. Un experto en la materia entenderá que las sondas pueden unirse a secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda, dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas están preferentemente marcadas directamente con isótopos, por ejemplo, cromóforos, lumíforos, cromógenos, o marcadas indirectamente con biotina a la que se puede unir posteriormente un complejo de estreptavidina. Al analizar la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de un gen diana de interés.

Como se usa en el presente documento, "nucleótido" se usa, como se reconoce en la técnica, para incluir aquellos con bases naturales (naturales) y con bases modificadas bien conocidos en la técnica. Dichas bases están generalmente ubicadas en la posición 1' de un resto de azúcar de nucleótido. Los nucleótidos generalmente comprenden una base, azúcar y un grupo fosfato. Los nucleótidos pueden estar no modificados o modificados en el resto azúcar, fosfato y/o base, (también denominados indistintamente análogos de nucleótidos, nucleótidos modificados, nucleótidos no naturales, nucleótidos no convencionales y otros; véase, por ejemplo, Usman y McSwiggen; supra; Eckstein y col., Publicación Internacional PCT N.º WO 92/07065; Usman y col., Publicación Internacional PCT N.º WO 93/15187; Uhlman & Peyman, supra). Existen varios ejemplos de bases de ácidos nucleicos modificadas conocidas en la técnica tal como se resumen por Limbach, y col., Nucleic Acids Res. 22:2183, 1994. Algunos de los ejemplos no limitantes de modificaciones de bases que pueden introducirse en moléculas de ácidos nucleicos incluyen, hipoxantina, purina, piridina-4-ona, piridina-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2,4,6-trimetoxibenceno, 3-metil uracilo, dihidouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitolinas (p. ej., 5-metilcitolina), 5-alquiluridinas (p. ej., ribotimidina), 5-halouridina (por ejemplo, 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6-alquilpirimidinas (por ejemplo, 6-metiluridina), propino y otros (Burgin, y col., Biochemistry 35:14090, 1996; Uhlman & Peyman, supra).

Por "bases modificadas" se entiende bases de nucleótidos que no sean adenina, guanina, citosina y uracilo en la posición 1' o sus equivalentes.

Como se usa en el presente documento, "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que tiene una o más modificaciones en el nucleósido, la nucleobase, el anillo de pentosa o en el grupo fosfato. Por ejemplo, los nucleótidos modificados excluyen los ribonucleótidos que contienen adenosina monofosfato, guanosina monofosfato, uridina monofosfato y citidina monofosfato y desoxirribonucleótidos que contienen desoxiadenosina monofosfato, desoxiguanosina monofosfato, desoxitimidina monofosfato y desoxicitolina monofosfato. Las modificaciones incluyen aquellas de origen natural que son el resultado de la modificación por enzimas que modifican nucleótidos, tales como metiltransferasas. Los nucleótidos modificados también incluyen nucleótidos sintéticos o de origen no natural. Las modificaciones sintéticas o de origen no natural en los nucleótidos incluyen aquellas con modificaciones 2', por ejemplo, 2'-metoxietoxi, 2'-fluoro, 2'-alilo, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo], 4'-tio, 4'-CH₂-O-2'-puente, 4'-(CH₂)₂-O-2'-puente, 2'-LNA (por sus siglas en inglés) y 2'-O-(N-metilcarbamato) o aquellas que comprenden análogos de bases. En relación con los nucleótidos 2' modificados como se describe para la presente divulgación, por "amino" se entiende 2'-NH₂ o 2'-O-NH₂, que puede ser modificado o no modificado. Dichos grupos modificados se describen, por ejemplo, en Eckstein y col., Patente de EE.UU. N.º 5.672.695 y Matulic-Adamic, y col., Patente de EE.UU. N.º 6.248.878.

Por "reduce" se entiende una alteración negativa de al menos el 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 100 %.

Por "referencia" se entiende una condición patrón o de control. Como es evidente para un experto en la materia, una referencia apropiada es en la que se cambia un elemento para determinar el efecto del un elemento.

La frase "hibrida de forma selectiva (o de forma específica) con" se refiere a la unión, formación de doble cadena o hibridación de una molécula solamente a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones de hibridación rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN celular o de biblioteca total).

Por "mezcla patrón de patrones internos" se entiende una mezcla que contiene patrones internos que tiene una concentración definida o un número definido de moléculas de los patrones internos.

55 Por "molécula de ácido nucleico diana" se entiende un ácido nucleico o biomarcador de la muestra que se va a detectar o medir, y/o amplificar. El ácido nucleico diana puede ser cualquier ácido nucleico a amplificar, sin limitaciones particulares. Ejemplos de ácidos nucleicos diana incluyen varios tipos de genes de animales y plantas, varios genes de virus y varios genes de microorganismos, tales como genes de bacterias, mohos y levaduras, independientemente

de si son o no ADN o ARN. Los ácidos nucleicos diana pueden ser de origen natural o sintetizados artificialmente, y un ejemplo de esto es el ANP. También, los ejemplos incluyen ácidos nucleicos monocatenarios y ácidos nucleicos bicatenarios. En la presente invención, la expresión "ácido nucleico plantilla" se refiere a una diana original de detección que comprende en sus moléculas una secuencia diana y sirve como base para el diseño de cebadores.

5 Las moléculas de ácido nucleico útiles en los procedimientos de la invención incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido de la invención o un fragmento del mismo. Dichas moléculas de ácido nucleico no necesitan ser 100 % idénticas a una secuencia endógena del ácido nucleico, pero generalmente mostrará una identidad sustancial. Los polinucleótidos que tienen "identidad sustancial" con una secuencia endógena son generalmente capaces de hibridar con al menos una cadena de una molécula de ácido nucleico bicatenario. Por
10 "hibridar" se entiende emparejar para formar una molécula bicatenaria entre secuencias de polinucleótidos complementarias (por ejemplo, un gen descrito en el presente documento), o porciones de las mismas, en diversas condiciones de rigurosidad. (Véase, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507).

15 Por ejemplo, una concentración rigurosa de sal será normalmente menor de aproximadamente NaCl 750 mM y citrato trisódico 75 mM, preferentemente menor de aproximadamente NaCl 500 mM y citrato trisódico 50 mM y más preferentemente menor de aproximadamente NaCl 250 mM y citrato trisódico 25 mM. Puede obtenerse una hibridación de baja rigurosidad en ausencia de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que puede obtenerse una alta rigurosidad de hibridación en presencia de al menos formamida al 35 % y más preferentemente, formamida a aproximadamente el 50 %. Las condiciones de temperatura rigurosas normalmente incluirán temperaturas de al menos
20 aproximadamente 30 °C, más preferentemente de al menos aproximadamente 37 °C y lo más preferentemente de al menos aproximadamente 42 °C. Los expertos en la materia conocen bien diversos parámetros adicionales, como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS) y la inclusión o exclusión de ADN portador. Se logran diversos niveles de rigurosidad combinando estas diversas condiciones según sea necesario. En una realización preferida, la hibridación se producirá a 30 °C en NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM y SDS al 1 %. En una realización más preferida, la hibridación se producirá a 37 °C en NaCl 500 mM, citrato trisódico 50 mM, SDS al 1 %, formamida al 35 % y 100 µg/ml de ADN (ADNmc) de esperma de salmón desnaturalizado. En la realización más preferida, la hibridación se producirá a 42 °C en NaCl 250 mM, citrato trisódico 25 mM, SDS al 1 %, formamida al 50 % y 200 µg/ml de ADNmc. Las variaciones útiles de estas condiciones serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia.

30 Para la mayoría de aplicaciones, las etapas de lavado que siguen a la hibridación también variarán en cuanto a su rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad de lavado pueden definirse por la concentración de sal y por la temperatura. Como en el caso anterior, la rigurosidad del lavado puede aumentarse reduciendo la concentración de sal o aumentando la temperatura. Por ejemplo, la concentración de sal rigurosa para las etapas de lavado será preferentemente menor de aproximadamente NaCl 30 mM y citrato trisódico 3 mM y lo más preferentemente menor
35 de aproximadamente NaCl 15 mM y citrato trisódico 1,5 mM. Las condiciones rigurosas de temperatura para las etapas de lavado incluirán normalmente una temperatura de al menos aproximadamente 25 °C, más preferentemente de al menos aproximadamente 42 °C, e incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 68 °C. En un ejemplo, las etapas de lavado se producirán a 25 °C en NaCl 30 mM, citrato trisódico 3 mM y SDS al 0,1 %. En otro ejemplo, las etapas de lavado se producirán a 42 °C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1,5 mM y SDS al 0,1 %. En un ejemplo adicional, las etapas de lavado se producirán a 68 °C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1,5 mM y SDS al 0,1 %. Las variaciones adicionales de estas condiciones serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia. Las técnicas de hibridación son bien conocidas por los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (*Science* 196:180, 1977); Grunstein y Hogness (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 72:3961, 1975); Ausubel y col. (*Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, Nueva York (2001)); Berger y Kimmel (*Guide to Molecular Cloning Techniques*, 1987, Academic Press, Nueva York); y Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

45 Por "sustancialmente idéntico" se entiende un polipéptido o molécula de ácido nucleico que muestra al menos un 50 % de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento) o una secuencia de un ácido nucleico (por ejemplo, una cualquiera de las secuencias de un ácido nucleico descritas en el presente documento). Preferentemente, tal secuencia es al menos el 60 %, más preferentemente el 80 % o el 85 % y más preferentemente el 90 %, 95% o incluso el 99 % idéntica a nivel de aminoácidos o el ácido nucleico a la secuencia utilizada para la comparación.

55 La identidad de secuencia generalmente se mide utilizando un programa informático de análisis de secuencias (por ejemplo, el Paquete de Programa Informático de Análisis de Secuencias del Genetics Computer Group, Centro de biotecnología de la Universidad de Wisconsin, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705, programas BLAST, BESTFIT, GAP o PILEUP/PRETTYBOX). Dicho programa informático coincide con secuencias idénticas o similares mediante la asignación de grados de homología a varias sustituciones, eliminaciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservativas incluyen generalmente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. En un enfoque ejemplar para determinar el grado de identidad, se puede usar un programa BLAST, con una puntuación de probabilidad entre e^{-3} y e^{-100} indicando una secuencia estrechamente relacionada.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un gráfico que muestra la respuesta de la fracción de patrón interno (IS) a la PCR en presencia o ausencia de sonda de hibridación. Los ensayos estandarizados de cuantificación de ácidos nucleicos (SNAQ, por sus siglas en inglés) midieron la fracción de IS (eje y) en muestras que contenían las relaciones de partida indicadas de patrón interno a plantilla natural (NT, por sus siglas en inglés) (IS:NT) (eje x). Las temperaturas de fusión de la sonda (Tf) para IS y NT fueron 63 °C y 43 °C, respectivamente. Las muestras se amplificaron en presencia de sonda de hibridación (cuadrados) o en ausencia de sonda de hibridación. Las muestras amplificadas sin sonda se midieron añadiendo la sonda de hibridación fluorescente después de la PCR (diamantes).

La Figura 2 es un gráfico que muestra un efecto de sonda en la PCR competitiva en presencia de una sonda fluorescente no hidrolizable. Doce ensayos diferentes de SNAQ (diamantes) midieron la fracción de NT en una muestra que contenía 1e4 NT y 1e4 IS.

Las Figuras 3A y 3B son gráficos que muestran que la temperatura de emparejamiento de la PCR afecta la distorsión de la PCR competitiva por la sonda. El aumento de la temperatura de emparejamiento de la PCR redujo el efecto de la sonda de hibridación sobre la amplificación por PCR. Los ensayos SNAQ (cuadrados) midieron la fracción de IS (eje y) en muestras que contenían las relaciones de partida IS:NT indicadas (eje x). Las Tf de la sonda para IS y NT fueron 63 °C y 43 °C, respectivamente. Las muestras se amplificaron a una temperatura de emparejamiento de bien de 60 °C (Figura 3A) o de 65 °C (Figura 3B). Las muestras también se amplificaron en presencia de una sonda de hibridación fluorescente no hidrolizable (cuadrados) o en ausencia de la sonda de hibridación. Las muestras amplificadas sin sonda se midieron añadiendo la sonda de hibridación fluorescente después de la PCR (diamantes).

La Figura 4 es un gráfico que muestra una reducción en el efecto de una sonda de hibridación sobre la amplificación por PCR disminuyendo la temperatura de fusión de la sonda de hibridación. La adición de formamida a las reacciones de PCR se usó para disminuir la Tf de la sonda de hibridación (mediana 6 °C, intervalo de 4 °C a 7,5 °C). Doce ensayos diferentes de SNAQ (diamantes) midieron la fracción de NT en una muestra que contenía copias de partida de 1e4 NT y 1e4 IS. Las muestras se amplificaron usando una mezcla maestra de PCR sin formamida (diamantes) o que contenía formamida al 8 % (cuadrados).

Las Figuras 5A y 5B son gráficos que muestran el efecto de la sonda de hibridación fluorescente en la PCR competitiva. La Figura 5A muestra curvas de fusión de la sonda de hibridación fluorescente en reacciones de PCR con una plantilla coincidente (línea continua) o no coincidente (línea punteada). Cuando una cantidad significativa de sonda de hibridación fluorescente se une a la plantilla coincidente a las temperaturas utilizadas durante la PCR, la sonda tiene el potencial de alterar o interferir con la amplificación de la plantilla coincidente. El cuadro etiquetado "Temperaturas de PCR" representa el intervalo de temperaturas de emparejamiento/extensión habituales de la PCR. El desplazamiento de la Tf de la sonda de la plantilla coincidente fuera de las temperaturas de ciclo de PCR reduce la distorsión de la amplificación de la plantilla coincidente. La Figura 5B demuestra que la reducción de los efectos de una sonda de hibridación fluorescente sobre la plantilla coincidente se puede lograr disminuyendo la Tf de la sonda o aumentando la temperatura de emparejamiento de la PCR.

Descripción detallada de la invención

Como se describe a continuación, la presente invención presenta composiciones y procedimientos que proporcionan una PCR cuantitativa que reduce el efecto de la sonda de hibridación sobre la amplificación y potencia la detección de una diana de ácido nucleico en una muestra (p. ej., una muestra biológica).

Ventajosamente, la presente invención proporciona la medición cuantitativa de la cantidad inicial de una molécula de ácido nucleico diana, cuando el ácido nucleico diana se amplifica en presencia de una sonda de hibridación (por ejemplo, una sonda detectable en PCR en tiempo real) y minimiza el efecto de la sonda de hibridación sobre la amplificación del ácido nucleico diana. La detección y medición de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con los procedimientos de la invención son útiles para el diagnóstico, monitorización o caracterización de prácticamente cualquier enfermedad caracterizada por una alteración en la expresión génica incluyendo, por ejemplo, neoplasia, inflamación y una variedad de enfermedades infecciosas.

La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la sonda de hibridación fluorescente que se une a la plantilla durante la PCR competitiva altera la cinética de PCR de la plantilla unida. Se ha encontrado que cuanto mayor es la Tf plantilla:sonda por encima de la temperatura de emparejamiento de la PCR, más inhibitorio es el efecto. Sin pretender quedar ligado a una teoría particular, la unión de la sonda fluorescente a la plantilla durante la PCR competitiva disminuye la eficacia de amplificación de la plantilla unida. Por lo tanto, es objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento que permita una amplificación estable en presencia de una sonda de detección de hibridación, mientras se mantiene un valor de ensayo preciso para determinar un ácido nucleico diana en un sistema de detección de ácido nucleico.

La presente invención desvela un procedimiento para la amplificación de ácidos nucleicos que comprende evitar que una sonda de hibridación afecte la reacción de amplificación de un ácido nucleico diana. En los procedimientos de la invención, la sonda de hibridación tiene una temperatura de fusión (Tf) sonda:plantilla menor que las temperaturas utilizadas para la amplificación (p. ej., PCR). Sin pretender quedar ligado a una teoría particular, disminuir la Tf sonda:plantilla está en relación con las temperaturas de amplificación, disminuye su interferencia con la cinética de la PCR competitiva (por ejemplo, añadiendo desnaturizantes químicos a la reacción). En diversos ejemplos, la sonda de hibridación está diseñada para disminuir la temperatura de fusión (Tf) sonda:plantilla en relación con las

temperaturas utilizadas para la amplificación (por ejemplo, añadiendo nucleótidos no coincidentes con el ácido nucleico diana). En otros ejemplos, la temperatura de fusión (T_f) sonda:plantilla de una sonda de hibridación preexistente se reduce en relación con las temperaturas utilizadas para la amplificación (por ejemplo, acortando la longitud de una sonda preexistente). Alternativamente, pueden aumentarse las temperaturas utilizadas en la reacción de amplificación (por ejemplo, aumentando la temperatura de emparejamiento de la PCR). Otros medios para abordar el efecto de la sonda de hibridación incluyen realizar la amplificación sin la sonda y añadir la sonda antes del análisis de la curva de fusión o usar un factor de corrección para ajustar el efecto de la sonda. Además, se pueden usar combinaciones de cualquiera de los anteriores para reducir el efecto de la sonda de hibridación sobre la reacción de amplificación. Con este enfoque, la medición es cuantitativa y la variación de instrumento a instrumento se minimiza cuando se mide con el criterio de valoración.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Cinética de la PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de amplificación o síntesis de grandes cantidades de un segmento de ADN diana. La PCR se logra separando el ADN en sus dos cadenas complementarias, uniendo un cebador a cada cadena sencilla al final del segmento de ADN dado en el que comienza la síntesis y añadiendo una ADN polimerasa para sintetizar la cadena complementaria en cada cadena sencilla que tiene un cebador unido a la misma. El procedimiento se repite hasta que se haya sintetizado un número suficiente de copias del segmento de ADN seleccionado.

Durante una reacción habitual de PCR, el ADN bicatenario se separa en cadenas sencillas elevando la temperatura de la muestra que contiene ADN a una temperatura desnaturalizante en la que las dos cadenas de ADN se separan (es decir, la "temperatura de fusión del ADN") y después la muestra se enfría a una temperatura inferior que permite unirse (emparejarse) a los cebadores específicos y que se produzca la replicación (extensión). En ejemplos ilustrativos, se utiliza una polimerasa termoestable en la reacción en cadena de la polimerasa, tales como la ADN polimerasa Taq y derivados de la misma, incluyendo el fragmento Stoffel de la ADN polimerasa Taq y la polimerasa KlenTaqI (una variante deficiente en 5'-exonucleasa de la polimerasa Taq - véase la Patente de EE.UU N^o. 5.436.149); polimerasa Pfu; polimerasa Tth; y polimerasa Vent.

La PCR tiene una sensibilidad de cinco órdenes de magnitud mejor que los mejores procedimientos de transferencia. Esta sensibilidad hace que la PCR sea deseable como herramienta cuantitativa. Sin embargo, el uso de un sistema sometido a amplificación exponencial no es ideal para la cuantificación. Pequeñas diferencias entre los tamaños de las muestras pueden convertirse en una gran diferencia en los resultados cuando se amplifican por medio de 20-40 ciclos.

Un perfil de reacción de PCR habitual tiene tres segmentos: una fase de retraso temprana, una fase de crecimiento exponencial y una meseta. La fase de retraso es principalmente un reflejo de la sensibilidad del instrumento y la señal de fondo del sistema de sonda utilizado para detectar el producto de PCR. La fase de crecimiento exponencial comienza cuando se ha acumulado suficiente producto para ser detectado por el instrumento. Durante esta fase "logarítmica", el curso de amplificación se describe mediante la ecuación $T_n = T_0(E)^n$, en la que T_n es la cantidad de secuencia diana en el ciclo n , T_0 es la cantidad inicial de diana y E es la eficacia de amplificación. Finalmente, en la fase de meseta, la eficacia de amplificación disminuye extremadamente rápido. El producto compite cada vez más eficazmente con los cebadores para el emparejamiento y la cantidad de enzima se vuelve limitante. La ecuación exponencial ya no se cumple en la fase de meseta.

La mayor parte de la información cuantitativa se encuentra en los ciclos exponenciales, pero los ciclos exponenciales generalmente comprenden solamente 4 o 5 ciclos de 40. Con los procedimientos tradicionales de PCR, encontrar estos ciclos informativos requiere que la reacción se divida en múltiples tubos de reacción que se someten a ensayo para determinar el producto de PCR después de un número variable de ciclos. Esto requiere analizar muchos tubos o tener una buena idea de la respuesta antes de comenzar el experimento. Una vez que se determina la posición de la fase exponencial, la fase experimental se puede comparar con los patrones conocidos y se puede calcular el número de copias.

PCR Cuantitativa Competitiva

Se desarrollaron procedimientos de PCR cuantitativa competitiva para intentar superar las dificultades asociadas con la búsqueda de la fase exponencial de la reacción y obtener una mayor precisión. Se construye una secuencia competidora que se amplifica usando los mismos cebadores que se usan para amplificar la secuencia diana. El competidor y la diana están diferenciados, generalmente por longitud o secuencia interna y la cantidad relativa de competidor y diana se mide después de la amplificación. Si la diana y el competidor se amplifican con igual eficacia, entonces su relación al final de la reacción será la misma que la relación que había sido al principio. Esto es válido incluso en la fase de meseta, siempre que ambos disminuyan en eficacia a la misma velocidad. Por lo tanto, encontrar la región exponencial ya no es un problema. Proporcionar patrones en los mismos tubos con las dianas desconocidas permite un control adicional que no es posible con los procedimientos cinéticos. Por ejemplo, añadir el competidor antes de la purificación de ARNm controlaría las variaciones en la preparación de la muestra y en la transcripción inversa.

5 El uso de las técnicas de PCR competitivas actualmente disponibles sigue experimentando varias deficiencias. En primer lugar, la secuencia competidora debe construirse para que sea lo más similar posible a la secuencia diana con respecto a la eficacia de la amplificación, sin embargo, las dos secuencias deben ser distinguibles entre sí. Si el competidor está demasiado cerca en secuencia de la diana, se forman dobles cadenas híbridas durante la PCR que sesgan la relación del producto a la plantilla.

Además, el competidor debe añadirse a la muestra desconocida en una concentración que se aproxime a la de la diana. Si un producto alcanza la meseta antes de que el otro se eleve por encima del fondo, no se puede obtener información cuantitativa de esa muestra. Generalmente, una muestra desconocida se divide y se mezcla con múltiples concentraciones de competidor.

10 Se han planteado otras preocupaciones con respecto a los procedimientos de cuantificación competitiva. Una crítica común es que a pesar de todos los esfuerzos, la diana y el competidor juntos en una muestra pueden amplificarse a diferentes eficacias, incluso si la diana y el competidor se amplifican con la misma eficacia cuando se amplifican por separado (el control obvio). Cuando la diana y el competidor se combinan en un recipiente y los reactivos son limitantes, las eficacias de las dos reacciones de amplificación pueden cambiar a diferentes velocidades. Las diferencias de longitud entre la diana y el competidor son las principales preocupaciones en este caso, ya que el producto más largo puede competir más eficazmente con los cebadores y puede verse más afectado por las limitaciones de reactivos. Ambas preocupaciones podrían abordarse haciendo que la diana y el competidor sean lo suficientemente parecidos, si no fuera por el problema de formar dobles cadenas híbridas durante la reacción de PCR.

PCR Cuantitativa en Tiempo Real

20 Los avances en la instrumentación han hecho posible ahora la monitorización en tiempo real de las reacciones de PCR y, por lo tanto, han hecho que el problema de encontrar la fase logarítmica de la reacción sea trivial.

25 El termociclado se puede llevar a cabo utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia, incluido el uso de PCR de ciclo rápido. Las técnicas de ciclado rápido son posibles por el uso de recipientes de muestra de gran área superficial a volumen, tal como tubos capilares. El uso de recipientes de muestra de gran área superficial a volumen permite una respuesta de temperatura rápida y homogeneidad de temperatura en toda la muestra biológica. La homogeneidad de la temperatura mejorada también aumenta la precisión de cualquier técnica analítica utilizada para monitorizar la PCR durante la amplificación.

30 De acuerdo con un ejemplo ilustrado, la amplificación de una secuencia de un ácido nucleico se realiza mediante ciclado térmico de la secuencia del ácido nucleico en presencia de una ADN polimerasa termoestable utilizando el dispositivo y las técnicas descritos en la Patente de EE.UU. N.º 5,455,175. De acuerdo con la presente invención, la amplificación por PCR de una o más regiones dirigidas de una muestra de ADN se realiza mientras la reacción se monitoriza por fluorescencia.

35 El primer uso de la monitorización por fluorescencia en cada ciclo para PCR cuantitativa se desarrolló por Higuchi y col., "Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences," Bio. Technology, 10:413-417, 1992, y usaron bromuro de etidio como entidad fluorescente. La fluorescencia se adquirió una vez por ciclo para una medida relativa de la concentración del producto. El ciclo en el que la fluorescencia observable apareció por primera vez por encima de la fluorescencia de fondo (el umbral) se correlacionó con el número de copia de partida, permitiendo así la construcción de una curva patrón. El sistema de detección de fluorescencia basado en la sonda que depende de la actividad 5'-exonucleasa de la polimerasa ha mejorado el procedimiento cinético en tiempo real añadiendo una detección específica de secuencia.

40 La diana amplificada puede detectarse usando un tinte fluorescente TaqMan para medir cuantitativamente la fluorescencia. La sonda TaqMan tiene un colorante fluorescente desactivado exclusivo que hibrida específicamente con una secuencia de plantilla de la PCR, según lo descrito por Livak y col., "Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay," Genet Anal. Febrero de 1999; 14(5-6): 143-9.). Durante la fase de extensión de la PCR, la sonda hibridada es digerida por la actividad exonucleasa de la polimerasa Taq, dando como resultado la liberación del colorante fluorescente específico para esa sonda.

45 La diana amplificada también puede detectarse utilizando un ensayo de detección de sonda fluorescente Pleiades para medir cuantitativamente la fluorescencia. La sonda Pleiades hibrida específicamente con una secuencia de ADN diana y tiene un colorante fluorescente en el extremo 5' que se desactiva por las interacciones de un desactivador 3' y un aglutinante del surco menor 5' (MGB, por sus siglas en inglés), cuando la sonda no se hibrida con una secuencia de ADN diana, según lo descrito por Lukhtanov y col., "Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence," Nucl. Acids. Res. 2007 enero;35(5):e30). Al final de la PCR, las emisiones fluorescentes de los colorantes liberados reflejan la relación molar de la muestra. Los procedimientos para analizar tales emisiones son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, por Fabienne Hermitte, "Myeloproliferative Biomarkers", Molecular Diagnostic World Congress, 2007.

55 Alternativamente, la amplificación por PCR de una o más regiones dirigidas de una muestra de ADN se puede realizar en presencia de sondas de hibridación marcadas con fluorescencia, en la que las sondas se sintetizan para hibridar con un locus específico presente en una región diana amplificada del ADN. En un ejemplo ilustrado, el sistema de

sonda de hibridación comprende dos sondas de oligonucleótidos que hibridan con regiones adyacentes de una secuencia de ADN en el que cada sonda de oligonucleótidos está marcada con un miembro correspondiente de un par de transferencia de energía fluorescente. La presencia de la secuencia de ácido nucleico diana en una muestra biológica se detecta midiendo la transferencia de energía fluorescente entre los dos oligonucleótidos marcados.

- 5 Estas técnicas de instrumentación y monitorización fluorescente han hecho que la PCR cinética sea significativamente más fácil que la PCR competitiva tradicional. Más particularmente, la PCR en tiempo real ha mejorado enormemente la facilidad, exactitud y precisión de la PCR cuantitativa permitiendo la observación de la concentración del producto de PCR en cada ciclo. En los ejemplos de la presente invención, las reacciones de PCR se llevan a cabo utilizando el LIGHTCYCLER.RTM. (Roche Diagnostics), un instrumento de PCR en tiempo real que combina un ciclador térmico
10 rápido con un fluorímetro. Mediante el uso de este dispositivo, el producto de PCR se detecta con fluorescencia y no son necesarios el procesamiento adicional de la muestra, matrices de membrana, geles, capilares o herramientas analíticas. Se puede utilizar otra instrumentación de PCR, tal como se conoce en la técnica, en la práctica de la presente invención.

Sistema de ensayo

- 15 En una realización, el producto de PCR del criterio de valoración para un ácido nucleico diana se cuantifica en relación con un número conocido de moléculas de su patrón interno correspondiente dentro de la mezcla estandarizada de patrones internos. Por ejemplo, se añaden partes alícuotas de muestra a una serie de tubos (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) que contienen un número creciente de copias de patrones internos sintéticos de la plantilla competitiva y cebadores. Cada par de cebadores amplifica conjuntamente una plantilla natural y su correspondiente plantilla de patrón interno
20 competitiva con igual eficacia. Las mediciones de genes se normalizan a un gen de referencia amplificado conjuntamente que controla las fuentes de variación conocidas, incluida la variación entre muestras en la carga debido al pipeteo, las sustancias interferentes tal como los inhibidores de la PCR, la variación entre genes en la eficacia de amplificación y los falsos negativos. Informes recientes han descrito el uso exitoso de dicho procedimiento para medir la expresión génica de varios biomarcadores prometedores en muestras de sangre (Rots y col., *Leukemia* diciembre de 2000;14(12):2166-75; Peters y col., *Clin Chem* junio de 2007; 53(6): 1030-7) u otros tejidos. Se ha utilizado con éxito la StaRT-PCR para identificar patrones de expresión génica asociados con el diagnóstico de cáncer de pulmón (Warner y col., *J Mol Diagn* agosto de 2003;5(3):176-83), de riesgo de cáncer de pulmón (Crawford y col., *Carcinogenesis* diciembre de 2007;28(12):2552-9), sarcoidosis pulmonar (Allen y col., *Am J Respir Cell Mol Biol* diciembre de 1999;21(6):693-700), fibrosis quística (Loitsch y col., *Clin Chem* mayo de 1999;45(5):619-24),
30 quimiorresistencia en cáncer de pulmón (Harr y col., *Mol Cancer* 2005;4:23; Weaver y col., *Mol Cancer* 2005;4(1):18) leucemias infantiles (Rots y col., *Leukemia* diciembre de 2000; 14(12):2166-75), estadificación del cáncer de vejiga (Mitra y col., *BMC Cancer* 2006;6:159) y para desarrollar bases de datos del intervalo normal de expresión de genes inflamatorios en muestras de sangre periférica (Peters y col., *Clin Chem* junio de 2007;53(6):1030-7).

- Los cebadores de la invención abarcan oligonucleótidos de longitud suficiente y secuencia apropiada para
35 proporcionar el inicio específico de la polimerización en un número significativo de ácidos nucleicos en el locus polimórfico. De manera específica, el término "cebador" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia que comprende dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, preferentemente más de tres y lo más preferentemente más de 8, cuya secuencia es capaz de iniciar la síntesis de un producto de extensión de cebador, que es sustancialmente complementario a una cadena del locus polimórfico. El cebador debe ser lo suficientemente
40 largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente de inducción de la polimerización. La longitud exacta del cebador dependerá de muchos factores, incluyendo la temperatura, tampón y composición de nucleótidos. El cebador de oligonucleótido contiene generalmente entre 12 y 27 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos. Los cebadores de la invención están diseñados para ser "sustancialmente" complementarios a cada cadena del locus genómico a amplificar e incluyen los nucleótidos G o C apropiados como
45 se analiza anteriormente. Esto significa que los cebadores deben ser lo suficientemente complementarios para hibridar con sus cadenas correspondientes en condiciones que permitan que el agente para la polimerización funcione. En otras palabras, los cebadores deberían tener suficiente complementariedad con las secuencias flanqueantes 5' y 3' para hibridar con ellas y permitir la amplificación del locus genómico. Si bien se proporcionan cebadores ejemplares en el presente documento, se entiende que cualquier cebador que hibrida con las secuencias diana de la invención son útiles en el procedimiento de la invención para detectar un ácido nucleico diana.
50

- El ácido nucleico diana puede estar presente en una muestra, por ejemplo, muestras clínicas y muestras biológicas. Si no se utilizan muestras clínicas de alta calidad, los cebadores de amplificación están diseñados para reconocer secuencias diana más cortas. La T_f de los cebadores es de aproximadamente 60 +/-1 °C. Los cebadores de amplificación se comparan por homología con secuencias conocidas para asegurar la especificidad de unión. A pesar
55 del uso de DNAsa en el protocolo de purificación de ARN, cuando es posible, los cebadores están diseñados para abarcar uniones de corte y empalme intrón/exón del ARN. Por lo tanto, La amplificación de los contaminantes genómicos se inhibirá por no producir productos de longitud completa (generalmente > 6 KB).

- Para cada molécula de ácido nucleico o biomarcador diana, el patrón interno sintético correspondiente coincidirá con la plantilla natural en todos menos 1, 2 o 3 nucleótidos dentro de la secuencia de unión de la sonda de la molécula de
60 ácido nucleico o biomarcador natural. La secuencia de la sonda para el patrón interno se basará en esta reorganización y, por lo tanto, se prevé que se unirá solamente a la secuencia del patrón interno, pero no a la plantilla natural

correspondiente. Los patrones internos se formulan en una mezcla que contiene los patrones internos a una concentración o número de moléculas definidos de los patrones internos. Por ejemplo, dichos patrones internos también se denominan "molécula de ácido nucleico de referencia definida", que tiene una concentración conocida de la molécula de ácido nucleico o un número conocido de moléculas de ácido nucleico.

5 Un producto de PCR (es decir, amplicón) o un producto de PCR en tiempo real se detecta mediante la unión de la sonda. La presente invención desvela un procedimiento para la amplificación de ácidos nucleicos que comprende evitar que una sonda de hibridación afecte la reacción de amplificación de un ácido nucleico diana. En los procedimientos de la invención, la sonda de hibridación tiene una temperatura de fusión (T_f) sonda:plantilla menor que la temperatura utilizadas para la amplificación (p. ej., PCR). Sin pretender quedar ligado a una teoría particular, disminuir la T_f sonda:plantilla está en relación con las temperaturas de amplificación, disminuye su interferencia con la cinética de la PCR competitiva.

15 En diversas realizaciones, se añaden a la reacción desnaturalizantes químicos para aumentar la ΔT_f entre las temperaturas de funcionamiento de la PCR (por ejemplo, la temperatura de emparejamiento) y la T_f de la sonda. Sin pretender quedar ligado a una teoría particular, el desnaturalizante aumenta la separación entre las temperaturas de funcionamiento de la PCR y la T_f sonda:plantilla. Los desnaturalizantes químicos incluyen, sin limitación, amidas de bajo peso molecular (formamida, N-metilformamida, N,N-dimetilformamida, 2-pirrolidona, N-metilpirrolidona, N-hidroxiethylpirrolidona, acetamida, N-metilacetamida, N,N-dimetilacetamida, propionamida, isobutiramida); betaína (N,N,N-trimetilglicina, [carboximetil]trimetilamonio); detergentes no iónicos (Triton X-100, Tween 20, Nonidet P-40); cloruro de tetrametilamonio (TMAC); 7-deaza-2'-deoxiguanosina (dC^7 GTP); glicerol; polietilenglicol; hidróxido de metilmercurio; ácidos plurónicos; y ditiotreitól (DTT). Se describe el uso de aditivos en la PCR, por ejemplo, en Chakrabarti y col., *Nucleic Acids Res.* 2001; 29 (11):2377-81; Smith y col., *Amplifications* 1990; 5: 16-17; Varadaraj y col., *Gene* 1994; 140(1): 1-5; Bookstein y col., *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(6): 1666; Sarkar y col., *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(24): 7465; Rees y col., *Biochemistry* 1993; 32(1): 137-144; Weissensteiner y col., *BioTechniques* 1996; 21: 1102-1108; Baskaran *Genome Research* 1996; 6: 633-638; Henke y col., *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(19): 3957-3958; Melchior y col., *Proc Natl Acad Sci USA.* 1973; 70 (2):298-302; Hengen, *Trends in Biochemical Science* 22(6): 225-226; Demeke y col., *Biotechniques* 1992;12(3):332-334; Bachman y col., *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(5): 1309; Hung y col., *Nucleic Acids Res.* 1990; 18(16): 4953; Chevet y col., *Nucleic Acids Res.* 23(16): 3343-3344; McConlogue y col., *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(20): 9869; *Nucleic Acids Res.* 16: 3360; www.staff.uni-mainz.de/lieb/additiva.html; Raiser y col., *Biochem Biophys Res Commun.* 1 de septiembre de 2006;347(3):747-5;

30 En diversas realizaciones, la sonda de hibridación está diseñada para tener una temperatura de fusión (T_f) sonda:plantilla inferior en relación con la temperatura utilizada para la amplificación (por ejemplo, añadiendo nucleótidos no coincidentes con el ácido nucleico diana). En un ejemplo, la temperatura de fusión (T_f) sonda:plantilla de una sonda de hibridación preexistente se reduce en relación con las temperaturas utilizadas para la amplificación (por ejemplo, acortando la longitud de una sonda preexistente).

35 Alternativamente, pueden aumentarse las temperaturas utilizadas en la reacción de amplificación (por ejemplo, aumentado la temperatura de emparejamiento de la PCR). Como será evidente para un experto en la materia, cuando se aumentan las temperaturas utilizadas en la reacción de amplificación, los cebadores de amplificación se modifican para aumentar la T_f (por ejemplo, alargando los cebadores). Se pueden hacer otras modificaciones para la amplificación usando temperaturas más altas, que incluye ajustar el tampón de PCR y seleccionar una polimerasa para mejorar la amplificación por PCR a temperaturas más altas.

Otros medios para abordar el efecto de la sonda de hibridación incluyen realizar la amplificación sin la sonda y añadir la sonda antes del análisis de la curva de fusión o usar un factor de corrección para ajustar el efecto de la sonda. Además, se pueden usar combinaciones de cualquiera de los anteriores para reducir el efecto de la sonda de hibridación sobre la reacción de amplificación. Con este enfoque, la medición es cuantitativa y la variación de instrumento a instrumento se minimiza cuando se mide con el criterio de valoración.

45 En un ejemplo, la unión de la sonda genera una señal fluorescente, por ejemplo, mediante el acoplamiento de una molécula de colorante fluorogénico y un resto desactivador al mismo o diferentes sustratos de oligonucleótidos (por ejemplo, TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), Pleiades (Nanogen, Inc., Bothell, WA, EE. UU.), Balizas moleculares (véase, por ejemplo, Tyagi y col., *Nature Biotechnology* 14(3):303-8, 1996), Scorpions® (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EE. UU.)). En otro ejemplo, un producto de PCR se detecta mediante la unión de un colorante fluorogénico que emite una señal fluorescente al unirse (por ejemplo, SYBR® Green (Molecular Probes)). Tales procedimientos de detección son útiles para la detección de un producto de PCR específico de diana.

55 Después de la PCR, la concentración de la plantilla natural se calcula a partir de la relación (plantilla natural: plantilla de patrón interno) frente a copias conocidas de patrón interno incluidas en la reacción. Las mediciones de genes se normalizan a un gen de referencia amplificado conjuntamente para controlar las fuentes de variación conocidas, incluida la variación entre muestras en la carga debido al pipeteo, sustancias interferentes, tales como inhibidores de PCR, la variación entre genes en la eficacia de amplificación y los falsos negativos.

En un ejemplo, la amplificación del ácido nucleico diana comprende además una etapa de preamplificación. El uso de la etapa de preamplificación reduce notablemente las cantidades de muestra de partida (p. ej., ADNc) y los reactivos

necesarios para cada reacción de PCR. La medición de cada gen en relación con un número conocido de moléculas de patrones internos dentro de una mezcla estandarizada de patrones internos en cada reacción controla la variación impredecible entre muestras en la eficacia de la preamplificación causada por el consumo de reactivos, inhibidores de la PCR y/o inhibición del producto. Una mezcla estandarizada de patrones internos controla la amplificación preferente de un transcrito sobre otro debido a las diferencias en las eficacias de amplificación. El uso de la tecnología nanofluídica en combinación con la preamplificación con múltiples conjuntos de cebadores y patrones internos en la misma reacción proporciona la medición de muchos genes (> 100) usando la cantidad de ARN normalmente necesaria para seis mediciones. Esto permite un mayor rendimiento que no está restringido prácticamente por la entrada de ARN.

10 Procedimientos de diagnóstico

La presente invención puede emplearse para medir la expresión génica o un perfil de expresión génica en una muestra biológica. De manera deseable, los procedimientos de la invención requieren mucho menos material de partida que los procedimientos de diagnóstico convencionales y pueden emplearse para medir la expresión génica de biomarcadores en sangre u otros tejidos. En consecuencia, la invención describe la identificación de patrones de expresión génica útiles en prácticamente cualquier entorno clínico en el que se utilizan procedimientos de análisis convencionales. Por ejemplo, los procedimientos actuales proporcionan el análisis de biomarcadores asociados con cáncer de pulmón (Warner y col., J Mol Diagn 2003;5:176-83), riesgo de cáncer de pulmón (Crawford y col., Cancer Res 2000;60:1609-18, sarcoidosis pulmonar (Allen y col., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1999;21, 693-700), fibrosis quística (Loitsch y col., Clin. Chem. 1999;45, 619-624), quimiorresistencia en cáncer de pulmón (Weaver y col., Molecular Cancer, 4, 18, 2005; Harr y col., Molecular Cancer, 4, 23, 2005) leucemias infantiles (Rots y col., Leukemia, 14, 2166-2175, 2000), estadificación del cáncer de vejiga (Mitra y col., BMC Cancer 2006;6:159) y para desarrollar bases de datos del intervalo normal de expresión de genes inflamatorios en muestras de sangre periférica (Peters y col., Clinical Chemistry 53: 1030-1037, 2007).

En una realización, la muestra biológica es una muestra de tejido que incluye células de un tejido u órgano (p. ej., pulmón, mama, células de tejido prostático). Tal tejido se obtiene, por ejemplo, de una biopsia del tejido u órgano. En otra realización, la muestra biológica es una muestra de fluido biológico. Las muestras de fluidos biológicos incluyen sangre, suero sanguíneo, plasma, orina, fluidos seminales y eyaculación, o cualquier otro fluido biológico útil en los procedimientos de la invención. Alternativamente, la muestra de tejido es una biopsia por aspiración con aguja fina citológica o tejido embebido en parafina fijado con formalina. El uso de los procedimientos de la invención es particularmente ventajoso para tales muestras, en las que el ARN, con frecuencia, está limitado por el tamaño o la degradación de la muestra.

Ensayos diagnósticos

La presente invención desvela una serie de ensayos de diagnóstico que son útiles para detectar o medir una molécula de ácido nucleico diana en una muestra biológica. En particular, la invención describe procedimientos para la detección de alteraciones en la expresión génica asociadas con neoplasia (por ejemplo, BCR-ABL en leucemia mielógena crónica). En ejemplos particulares, la invención desvela la detección de genes enumerados en la Tabla 1 (a continuación).

Tabla 1: Genes Diana Ejemplares para la Detección de Neoplasia

Gen	UniGeneID
BCR-ABL	Hs.517461; Hs.715409
ERBB3	Hs.18681
LCK	Hs.470627
DUSP6	Hs.298654
STAT1	Hs.470943
MMD	Hs.463483
CPEB4	Hs.127126
RNF4	Hs.66394
STAT2	Hs.530595
NF1	Hs.113577
FRAP1	Hs.338207
DLG2	Hs.503453
IRF4	Hs.401013
ANXA5	Hs.480653
HMMR	Hs.72550
HGF	Hs.396530
ZNF264	Hs.515634

Alternativamente, la invención proporciona la detección y el diagnóstico de un patógeno en una muestra biológica. Se

puede detectar una variedad de patógenos bacterianos y víricos usando el sistema y los procedimientos de la invención. Patógenos bacterianos ejemplares incluyen, pero sin limitación, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Actinomyces israelii*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bacillus anthracis*, *Bacteroides*, *Bartonella*, *Bordetella*, *Bortella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Calymmatobacterium*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Clostridium perfringers*,
 5 *Clostridium tetani*, *Corynebacterium*, *corynebacterium diphtheriae*, *corynebacterium sp.*, *Enterobacter*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia*, *Francisella*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella*, *Haemophilus*, *Hafnia*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Morganella*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Pasturella multocida*, *Proteus*,
 10 *Providencia*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Stentorophomonas*, *Streptococcus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Xanthomonas*, *Vibrio*, y *Yersinia*.

Ejemplos de virus detectables usando el sistema y los procedimientos de la invención incluyen *Retroviridae* (p. ej., virus de inmunodeficiencia humana, como el VIH-1 (también denominado HDTV-III, LAVE o HTLV-III/IIAV, o HIV-III); y otros aislados, tal como el VIH-LP; *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A; enterovirus, virus
 15 Coxsackie humanos, rinovirus, echovirus); *Calciviridae* (por ejemplo, cepas que causan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo, virus de encefalitis equina, virus de la rubéola); *Flaviridae* (por ejemplo, virus del dengue, virus de encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo, coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo, virus de estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo, virus del ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus de parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo,
 20 virus de la gripe); *Bungaviridae* (por ejemplo, virus Hantaan, virus bunga, flebovirus y virus de Nairo); *Arena viridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (Virus de la hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus del polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simple (VHS) 1 y 2, virus de la varicela zóster, citomegalovirus (CMV), el virus del herpes; *Poxviridae* (variola virus, virus vaccinia, virus de la viruela); e *Iridoviridae*
 25 (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, el agente de la hepatitis delta (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de hepatitis no-A, no B (clase 1 = transmitidos internamente; clase 2 = transmitidos por vía parenteral (es decir, hepatitis C); virus de Norwalk y relacionados y astrovirus).

Ejemplos de hongos patógenos incluyen, sin limitación, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Basidiobolus*, *Bipolaris*, *Blastoschizomyces*, *Candida*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* (anteriormente llamado *Torulopsis glabrata*), *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida dubliniensis*, y *Candida lusitanae*, *Coccidioides*, *Cladophialophora*, *Cryptococcus*, *Cunninghamella*, *Curvularia*,
 30 *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Histoplasma*, *Madurella*, *Malassezia*, *Plasmodium*, *Rhodotorula*, *Scedosporium*, *Scopulariopsis*, *Sporobolomyces*, *Tinea*, y *Trichosporon*.

Los parásitos se pueden clasificar según si son intracelulares o extracelulares. Un "parásito intracelular" como se usa en el presente documento es un parásito cuyo ciclo de vida completo es intracelular. Ejemplos de parásitos intracelulares humanos incluyen *Leishmania*, *Plasmodium*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Babesia* y *Trichinella spiralis*. Un "parásito extracelular" como se usa en el presente documento es un parásito cuyo ciclo de vida completo es extracelular. Los parásitos extracelulares capaces de infectar a los seres humanos incluyen *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Naegleria* y *Acanthamoeba* así como la mayoría de los helmintos. Sin embargo, otra clase de parásitos se define como principalmente extracelular pero con una existencia intracelular obligada en una etapa crítica en sus ciclos de vida. Dichos parásitos se denominan en el presente documento "parásitos intracelulares obligados". Estos parásitos pueden existir la mayor parte de sus vidas o solo una pequeña parte de sus vidas en un entorno extracelular, pero todos tienen al menos una etapa intracelular obligada en sus ciclos de vida. Esta última categoría de parásitos incluye *Trypanosoma rhodesiense* y *Trypanosoma gambiense*, *Iso spor a*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Neospora*, *Sarcocystis*, y *Schistosoma*. La divulgación incluye la prevención y el tratamiento de la infección resultante de parásitos intracelulares y parásitos intracelulares obligados que tienen al menos una etapa de su ciclo de vida que es intracelular. En algunos ejemplos, la invención describe la prevención de la infección por parásitos intracelulares obligados que son predominantemente intracelulares. Una lista ejemplar y no limitante de parásitos para algunos aspectos de la invención incluye *Plasmodium spp.* tal como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium vivax* y *Toxoplasma gondii*. Los parásitos transmitidos por la sangre y/o los tejidos incluyen *Plasmodium spp.*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, *Leishmania spp.*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* y *Trypanosoma rhodesiense* (Enfermedad del sueño africana), *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas) y *Toxoplasma gondii*. Los parásitos transmitidos por la sangre y/o los tejidos incluyen *Plasmodium*, *Babesia microti*, *Babesia divergens*, *Leishmania tropica*, *Leishmania*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma gambiense* y *Trypanosoma rhodesiense* (Enfermedad del sueño africana), *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas) y *Toxoplasma gondii*.

Kits

La divulgación proporciona kits para la detección de la expresión génica. Dichos kits son útiles para el diagnóstico, caracterización o monitorización de una neoplasia en una muestra biológica obtenida de un sujeto (p. ej., LMC). Alternativamente, la divulgación describe kits para la detección de un gen o genes patógenos en una muestra biológica. En diversos ejemplos, el kit incluye al menos un par de cebadores que identifica una secuencia diana, junto con

instrucciones para usar los cebadores para identificar un perfil de expresión génica en una muestra biológica. Preferentemente, los cebadores se proporcionan en combinación con una mezcla estandarizada de patrones internos en una plataforma de PCR nanofluidica (por ejemplo, una matriz de alta densidad). En otro ejemplo más, el kit comprende además un par de cebadores capaces de unirse a y amplificar una secuencia de referencia. En otros ejemplos más, el kit comprende un recipiente estéril que contiene los cebadores; tales envases pueden ser cajas, ampollas, frascos, viales, tubos, bolsas, bolsitas, envases blíster u otra forma de envase adecuada conocida en la técnica. Dichos envases pueden estar hechos de plástico, vidrio, papel laminado, lámina metálica u otros materiales adecuados para contener ácidos nucleicos.

Las instrucciones generalmente incluirán información sobre el uso de las composiciones de la invención en la detección de un perfil de expresión génica. En ejemplos particulares, el perfil de expresión génica diagnostica o caracteriza una neoplasia. Preferentemente, el kit comprende además uno o más de los reactivos útiles para un procedimiento analítico descrito en el presente documento (por ejemplo, PCR de transcriptasa inversa estandarizada). En otros ejemplos, las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripciones del cebador; procedimientos para usar los materiales incluidos para el diagnóstico de una neoplasia; precauciones; advertencias; indicaciones; estudios clínicos o de investigación; y/o referencias. Las instrucciones pueden imprimirse directamente en el envase (cuando esté presente), o como una etiqueta aplicada al envase, o como una hoja, folleto, tarjeta o carpeta por separado suministrada en o con el envase.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, no a modo de limitación. Si bien se han proporcionado ejemplos específicos, la descripción anterior es ilustrativa y no restrictiva. Una cualquiera o más de las características de las realizaciones descritas previamente se pueden combinar de cualquier manera con una o más características de cualquier otra realización en la presente invención. Además, muchas variaciones de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia después de la revisión de la memoria descriptiva. El ámbito de la invención debe determinarse, por lo tanto, no con referencia a la descripción anterior, sino en su lugar debe determinarse con referencia a las reivindicaciones adjuntas.

La práctica de la presente invención emplea, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro del alcance del experto. Dichas técnicas se explican completamente en las referencias, tales como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait, 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney, 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental Immunology" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protocols in Immunology" (Coligan, 1991). Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención, y, como tales, pueden considerarse en la fabricación y la práctica de la invención.

Los siguientes ejemplos se presentan para proporcionar a los expertos en la materia una divulgación y descripción completas de cómo hacer y usar el ensayo, la exploración y los procedimientos terapéuticos de la divulgación y no pretenden limitar el ámbito de lo que los inventores consideran su invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. La sonda de hibridación afecta la amplificación por PCR.

En PCR cuantitativa, las sondas de hibridación fluorescentes se utilizan para detectar la amplificación de productos de PCR. Sin embargo, la presencia de la sonda de hibridación tiene el potencial de alterar o interferir con la amplificación por PCR de la plantilla natural. Los ensayos estandarizados de cuantificación de ácidos nucleicos (SNAQ) se realizaron en presencia (cuadrados) o ausencia (diamantes) de la sonda de hibridación (Figura 1). Las temperaturas de fusión de la sonda (T_f) para IS y NT fueron 63 °C y 43 °C, respectivamente. La fracción de IS se midió (eje y) en muestras que contenían las relaciones de partida IS:NT indicadas (eje x). Las muestras amplificadas sin sonda se midieron añadiendo la sonda de hibridación fluorescente después de la PCR. Las curvas de IS se generaron representando gráficamente la fracción de IS frente a la relación IS:NT. Las reacciones de amplificación realizadas en presencia de la sonda produjeron una fracción de la curva de IS distinta de la de las reacciones de amplificación realizadas en ausencia de la sonda (Figura 1). Por lo tanto, la presencia de una sonda de hibridación en una reacción de PCR tiene el potencial de alterar o interferir con la amplificación de la plantilla natural.

El efecto de la sonda de hibridación en la PCR competitiva se determinó midiendo la fracción de NT cuando la amplificación se realizó en presencia de una sonda de hibridación fluorescente con temperaturas de fusión crecientes. El ensayo SNAQ se realizó en muestras que contenían 1e4 NT y 1e4 IS. Las sondas de hibridación eran sondas fluorescentes no hidrolizables diseñadas para coincidir (es decir, "ser complementarias a") la plantilla natural y tener temperaturas de fusión entre aproximadamente 63-70 °C. Se midió la fracción de NT (eje y; Coincidencia de fracciones) en las muestras que contenían sonda fluorescente no hidrolizable a las temperaturas de fusión indicadas (eje x). Cuando las reacciones se amplificaron en presencia de sonda, la fracción de NT disminuyó de 1 con el aumento de la temperatura de fusión. Por lo tanto, se observó que el efecto era más significativo, cuanto mayor era la temperatura de fusión de plantilla:sonda por encima de la temperatura de emparejamiento de la PCR.

Durante la PCR competitiva, la unión de la sonda de hibridación fluorescente a la plantilla alteró la cinética de la PCR de la plantilla unida. La unión de la sonda fluorescente a la plantilla durante la PCR competitiva tiene el potencial de reducir la eficacia de la amplificación de la plantilla unida. Sin pretender quedar ligado a una teoría particular, cuanto mayor sea la TF de plantilla:sonda por encima de la temperatura de emparejamiento de la PCR, más significativo es el impacto sobre la amplificación por PCR. Para ensayos cuantitativos como la PCR competitiva, las sondas de hidrólisis fluorescentes tienen el potencial de generar un impacto de manera similar en la amplificación de un ácido nucleico diana y alterar su medición.

Ejemplo 2. La disminución de la temperatura de fusión de la sonda de hibridación reduce los efectos de la sonda de hibridación sobre la amplificación por PCR.

Para abordar el efecto de la sonda de hibridación en la PCR competitiva, se realizaron estudios que disminuyeron la temperatura de fusión de la sonda de hibridación en relación con las temperaturas de ciclo de PCR (por ejemplo, la temperatura de emparejamiento). Los ensayos estandarizados de cuantificación de ácidos nucleicos (SNAQ) se realizaron en presencia (cuadrados) o ausencia (diamantes) de la sonda de hibridación utilizando una temperatura de emparejamiento de 60 °C (Figura 3A) o 65 °C (Figura 3B). Las temperaturas de fusión de la sonda (Tf) para IS y NT fueron 63 °C y 43 °C, respectivamente. La fracción de IS se midió (eje y) en muestras que contenían las relaciones de partida IS:NT indicadas (eje x). Las muestras amplificadas sin sonda se midieron añadiendo la sonda de hibridación fluorescente después de la PCR. Las curvas de IS se generaron representando gráficamente la fracción de IS frente a la relación IS:NT.

Cuando las reacciones de PCR se realizaron a una temperatura de emparejamiento de 60 °C, las curvas de IS para la amplificación con y sin sonda diferían significativamente, indicando el efecto de la sonda de hibridación sobre la PCR (Figura 3A). Elevar la temperatura de emparejamiento de la PCR a 65 °C dio como resultado una curva de IS para la amplificación en presencia de una sonda que se asemejaba más a la de la amplificación en ausencia de sonda (Figura 3B). Por lo tanto, elevar las temperaturas de ciclo de PCR, en particular, la temperatura de emparejamiento en relación con la temperatura de fusión de la sonda de hibridación reduce el efecto de la sonda de hibridación sobre la amplificación.

El efecto de reducir la temperatura de fusión de la sonda de hibridación fluorescente sobre la PCR competitiva se determinó añadiendo un desnaturalizante químico (formamida al 8 % en una mezcla maestra de PCR) a las reacciones de PCR competitivas y midiendo la fracción de NT (Figura 4). El ensayo SNAQ se realizó en muestras que contenían 1e4 NT y 1e4 IS en presencia de una sonda fluorescente no hidrolizable coincidente, como en la Figura 2. Los ensayos SNAQ sin formamida (diamantes) midieron la fracción de NT en una muestra que contenía copias de partida de 1e4 NT y 1e4 IS. Las muestras se midieron usando una mezcla maestra de PCR que contenía formamida al 8 % (cuadrados) para disminuir la Tf de la sonda de hibridación (Mediana 6 °C, intervalo de 4 °C a 7,5 °C). Se midió la fracción de NT (eje y; Coincidencia de fracciones) en las muestras que contenían sonda fluorescente no hidrolizable a las temperaturas de fusión indicadas (eje x).

Cuando se añadió formamida a las reacciones de amplificación, la fracción de NT permaneció en aproximadamente 1 hasta aproximadamente 63 °C. Por encima de aproximadamente 63 °C, la formamida no disminuyó la temperatura de fusión de la sonda de hibridación por debajo de las temperaturas de ciclo de PCR, y, por lo tanto, la fracción de NT disminuyó al aumentar la temperatura de fusión. Disminuir la temperatura de fusión de la sonda de hibridación usando un desnaturalizante químico (formamida) redujo el efecto de la sonda de hibridación sobre la PCR competitiva.

La presencia de la sonda de hibridación durante la amplificación tiene el potencial de afectar la PCR competitiva. Sin pretender quedar ligado a una teoría particular, cuando una cantidad significativa de sonda de hibridación fluorescente se une a la plantilla coincidente a las temperaturas utilizadas durante la PCR (temperaturas de emparejamiento/extensión habituales de PCR que se muestran en el recuadro), la sonda puede distorsionar la amplificación de la plantilla coincidente (Figura 5A). La cantidad de sonda de hibridación fluorescente que se une a la plantilla coincidente depende de la temperatura de fusión de la sonda de hibridación. En particular, las sondas de hibridación que tienen una temperatura de fusión dentro de las temperaturas de ciclo de PCR (por ejemplo, sonda coincidente; línea continua) se une significativamente a la plantilla durante la amplificación. Una sonda no coincidente (línea de puntos) tiene una temperatura de fusión más baja en comparación con la sonda coincidente (línea continua) y, por lo tanto, no se une significativamente a las temperaturas de ciclo de PCR utilizadas. Alternativamente, el desplazamiento de la Tf de la sonda de la plantilla coincidente fuera de las temperaturas de ciclo de PCR reduce la distorsión de la amplificación de la plantilla coincidente. El desplazamiento de la Tf de la sonda de la plantilla coincidente fuera de las temperaturas de ciclo de PCR se puede lograr disminuyendo la Tf de la sonda coincidente (por ejemplo, acortando la sonda) o elevando la temperatura de emparejamiento de la PCR (Figura 5B).

Los resultados indicados en el presente documento se obtuvieron usando los siguientes procedimientos y materiales a menos que se indique lo contrario.

Sonda Fluorescente y Diseño Patrón Interno

Al generar ensayos de SNAQ, se construyen sondas de fusión y patrones internos para cada diana de amplificación. Las sondas (p. ej., sondas fluorescentes no hidrolizables) están diseñadas para la Tf de la plantilla natural. Se diseñan

patrones internos de oligo de plantilla sintética con mutaciones en el sitio de unión de la sonda que disminuyen la T_f de unión a IS en $15\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$. Se utiliza un programa de análisis de secuencias (p. ej., DINAMelt Server (35)) para seleccionar las mutaciones de IS apropiadas. La métrica para determinar el diseño exitoso de la sonda y del IS es la relación señal a ruido (S/N) en el ensayo. La S/N de cada ensayo se mide comparando las señales generadas por cuatro réplicas de muestras de NT puro frente a IS puro.

Análisis de Curvas de Fusión

Los algoritmos utilizados para convertir la información de la curva de fusión en mediciones de la relación molar son conocidos en la técnica. Brevemente, la conversión de los datos de la curva de fusión en abundancia de transcritos comienza con el establecimiento de los parámetros de la curva de fusión para cada plantilla NT e IS. Las curvas de fusión de la sonda fluorescente (p. ej., Pleiades) de muestras con plantilla bien IS o NT se ajustan a una curva sigmoidea inclinada variable y la T_f y el coeficiente de Hill resultantes se guardan como parámetros de entrada para el análisis SNAQ. A continuación, las curvas de fusión para cada combinación de muestra-ensayo se ajustan a una curva de dos sigmoides utilizando las entradas de parámetros definidas anteriormente, lo que permite ajustar el $Fondo_{IS}$ y el $Fondo_{NT}$ para minimizar los residuos. La fracción NT se calcula a partir de las soluciones de $Fondo_{IS}$ y $Fondo_{NT}$.

Por último, la S/N se calcula para cada muestra a partir de las cuatro réplicas de muestra. La medición precisa de SNAQ requiere > 10 S/N. Los ensayos que no cumplan este criterio probablemente requieran cambios, que pueden generarse por selección de mutaciones del patrón interno. Ocasionalmente, tal como está diseñada, la sonda no genera suficiente señal de encendido/apagado y se reemplaza. Se generan tres patrones internos por sonda y diez sondas adicionales para los 60 genes propuestos por el panel. Los ensayos con > 50 S/N pueden diseñarse rutinariamente con la amplia latitud en la colocación y el diseño de la sonda (Epoch usa Aglutinantes de Surco Mayor y nucleótidos modificados para ajustar la T_f de unión) y numerosas opciones para el tipo de mutación y la ubicación del sitio de unión de la sonda del patrón interno. Los ensayos que pasan esta métrica están listos para medirse en el panel completo.

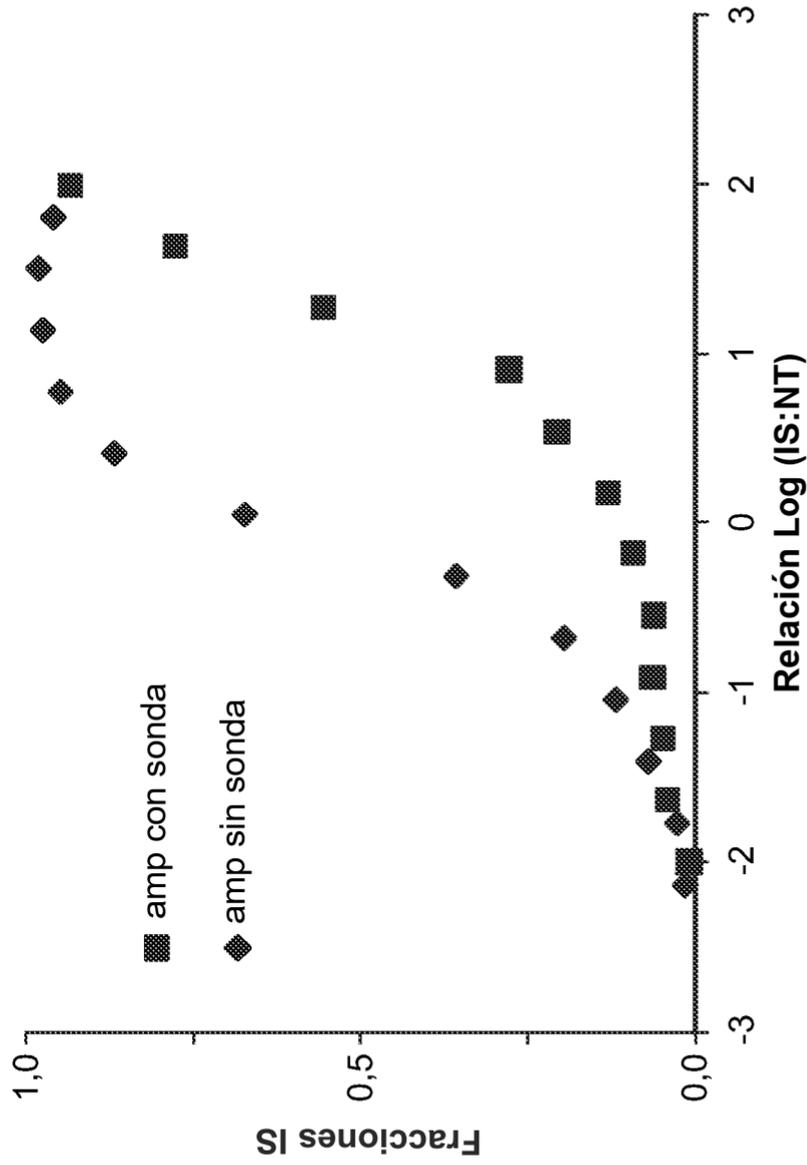
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para medir la amplificación de una molécula de ácido nucleico diana usando una sonda de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento:
 5 amplificar la molécula de ácido nucleico diana en presencia de una sonda de ácido nucleico, en el que la sonda de ácido nucleico hibrida con la molécula de ácido nucleico diana y tiene una temperatura de fusión sonda:plantilla menor que la temperatura de desnaturalización, la temperatura de emparejamiento y la temperatura de extensión utilizadas en un ciclo de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el que dicho procedimiento mide cuantitativamente la cantidad inicial de dicho ácido nucleico diana mediante PCR cuantitativa competitiva o PCR cuantitativa en tiempo real.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la sonda de ácido nucleico tiene una temperatura de fusión menor que las temperaturas de emparejamiento de los cebadores usados en la etapa de amplificación y/o en el que se usa un desnaturalizante químico para aumentar la ΔT_f entre la temperatura de emparejamiento y la T_f de la sonda, en el que dicho desnaturalizante químico es preferentemente una o más de una amida de bajo peso molecular, formamida, N-metilformamida, N,N-dimetilformamida, 2-pirrolidona, N-metilpirrolidona, N-hidroxietil-pirrolidona,
 15 acetamida, N-metilacetamida, N,N-dimetilacetamida, propionamida, isobutiramida, betaína, un detergente no iónico, Triton X-100, Tween 20, Nonidet P-40, cloruro de tetrametilamonio (TMAC), 7-deaza-2'-desoxiguanosina (dC⁷GTP), glicerol, polietilenglicol, hidróxido de metilmercurio, ácidos plurónicos y ditiotreitol (DTT).
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la sonda está diseñada para tener una T_f sonda:plantilla menor que la temperatura de desnaturalización, la temperatura de emparejamiento y la temperatura de extensión utilizadas para la amplificación, en el que la sonda comprende, opcionalmente, una o más bases no coincidentes o bases modificadas, o en el que la T_f sonda:plantilla se reduce opcionalmente acortando la sonda.
- 25 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura de desnaturalización, la temperatura de emparejamiento y la temperatura de extensión utilizadas para la amplificación se incrementan por encima de la T_f sonda:plantilla.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la sonda de ácido nucleico es fluorogénica, en el que dicha fluorescencia se usa preferentemente para generar una curva de fusión.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además usar un patrón interno y/o que comprende además una etapa de preamplificación o RT-PCR.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el ácido nucleico diana es ARN o ADN.
- 30 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la muestra es una muestra de fluido biológico o de tejido derivada de un paciente, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en sangre, suero, orina, semen y saliva.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho ácido nucleico diana deriva de una bacteria, un virus, una espora, un hongo, un parásito, una célula procariota o una célula eucariota, preferentemente
 35 de una célula eucariota que es una célula neoplásica derivada de pulmón, mama, próstata, tiroides o páncreas.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la muestra se explora para identificar un marcador asociado con una afección seleccionada del grupo que consiste en neoplasia, inflamación, infección por patógenos, respuesta inmunitaria, septicemia, la presencia de metabolitos hepáticos y la presencia de un organismo genéticamente modificado.
- 40 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la identificación del marcador diagnostica una neoplasia, identifica el tejido de origen de la neoplasia, monitoriza la respuesta de la neoplasia al tratamiento o predice el riesgo de desarrollar una neoplasia, en el que dicha neoplasia es, preferentemente, leucemia mielógena crónica (LMC).
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el ácido nucleico diana es BCR-ABL.
- 45 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la molécula de ácido nucleico diana deriva de un patógeno bacteriano seleccionado de la lista que consiste en *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Actinomyces israelii*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bacillus anthracis*, *Bacteroides*, *Bartonella*, *Bordetella*, *Bortella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Calymmatobacterium*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Clostridium perfringers*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium*, *Corynebacterium diphtheriae*, *corynebacterium sp.*, *Enterobacter*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Escherichia*, *Francisella*, *Fusobacterium nucleatum*,
 50 *Gardnerella*, *Haemophilus*, *Hafnia*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Morganella*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Pasteurella multocida*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Stentorophomonas*, *Streptococcus*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Xanthomonas*, *Vibrio* y *Yersinia*; o
 55 deriva de un virus seleccionado de la lista que consiste en el virus de la hepatitis C, virus de la inmunodeficiencia

humana, Retrovirus, Picornavirus, virus de la polio, virus de la hepatitis A, Enterovirus, virus Coxsackie humano, rinovirus, ecovirus, Calcivirus, Togavirus, virus de encefalitis equina, virus de la rubeola, Flavivirus, virus del dengue, virus de encefalitis, virus de la fiebre amarilla, Coronavirus, Rabdovirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia, Filovirus, virus del Ébola, Paramixovirus, virus de parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, Ortomixovirus, virus de la gripe, Virus Hantaan, virus bunga, flebovirus, Nairovirus, Arenavirus, virus de la fiebre hemorrágica, reovirus, orbivirus, Rotavirus, Birnavirus, Hepadnavirus, virus de la hepatitis B, Parvovirus, Papovavirus, virus del papiloma, virus de polioma, adenovirus, virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, virus de la varicela zóster, citomegalovirus, virus del herpes, variola virus, virus vaccinia, virus de la viruela, Virus de la peste porcina africana, Virus Norwalk y astrovirus;

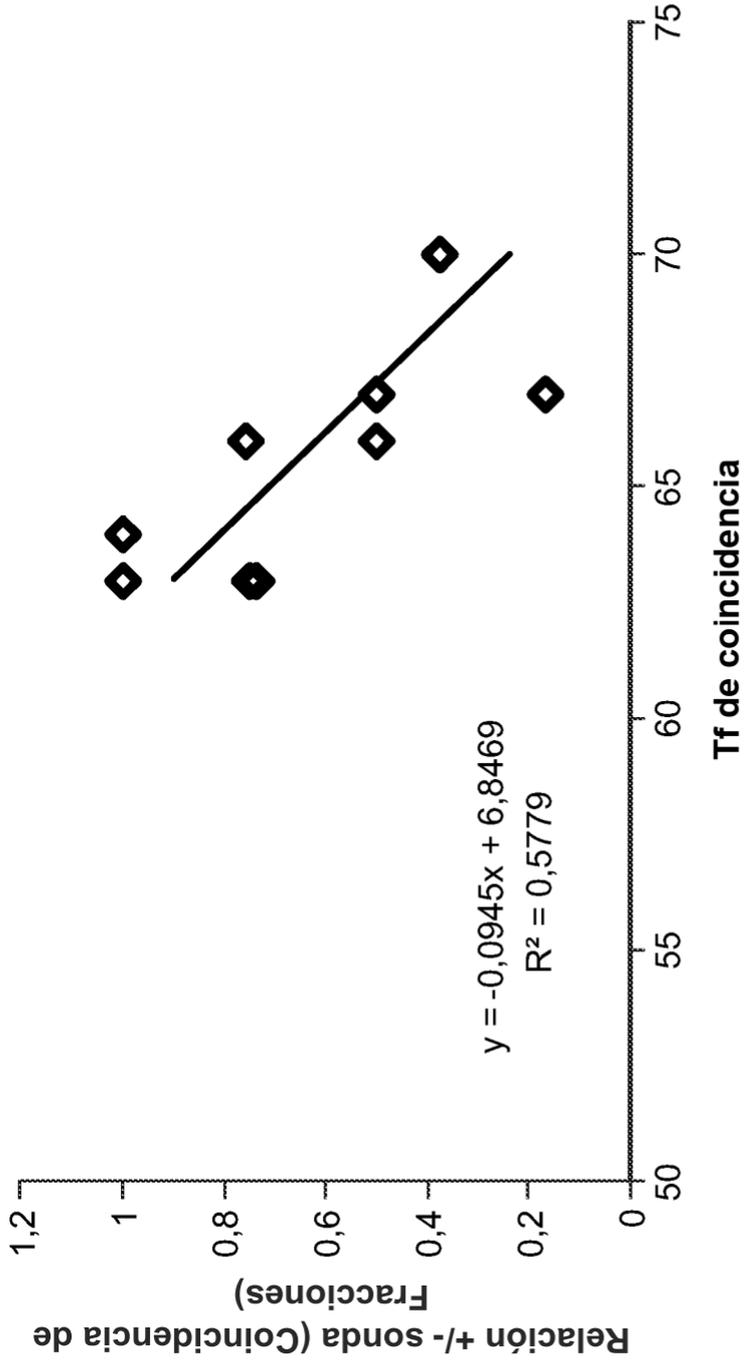
5

10 en el que dicho patógeno bacteriano es preferentemente resistente a antibióticos.



La fracción IS responde a la PCR en presencia o ausencia de sonda de hibridación. Los ensayos SNAQ (cuadrados) midieron la fracción de IS (eje y) en muestras que contenían las relaciones de partida de IS:NT indicadas (eje x). Las Tf de la sonda para IS y NT fueron 63C y 43C, respectivamente. Se midieron las mismas muestras añadiendo la sonda de hibridación fluorescente después de la PCR (diamantes).

FIG. 1



La sonda fluorescente no hidrolizable afecta a la PCR competitiva. Doce ensayos SNAQ diferentes (diamantes) midieron la fracción de NT en una muestra que contenía 1e4 NT y 1e4 IS. Se midió la misma muestra usando una mezcla maestra de PCR que contenía formamida al 8 % (cuadrados) para disminuir la Tf de la sonda de hibridación (Mediana 6C, intervalo 4C a 7,5 C)

FIG. 2

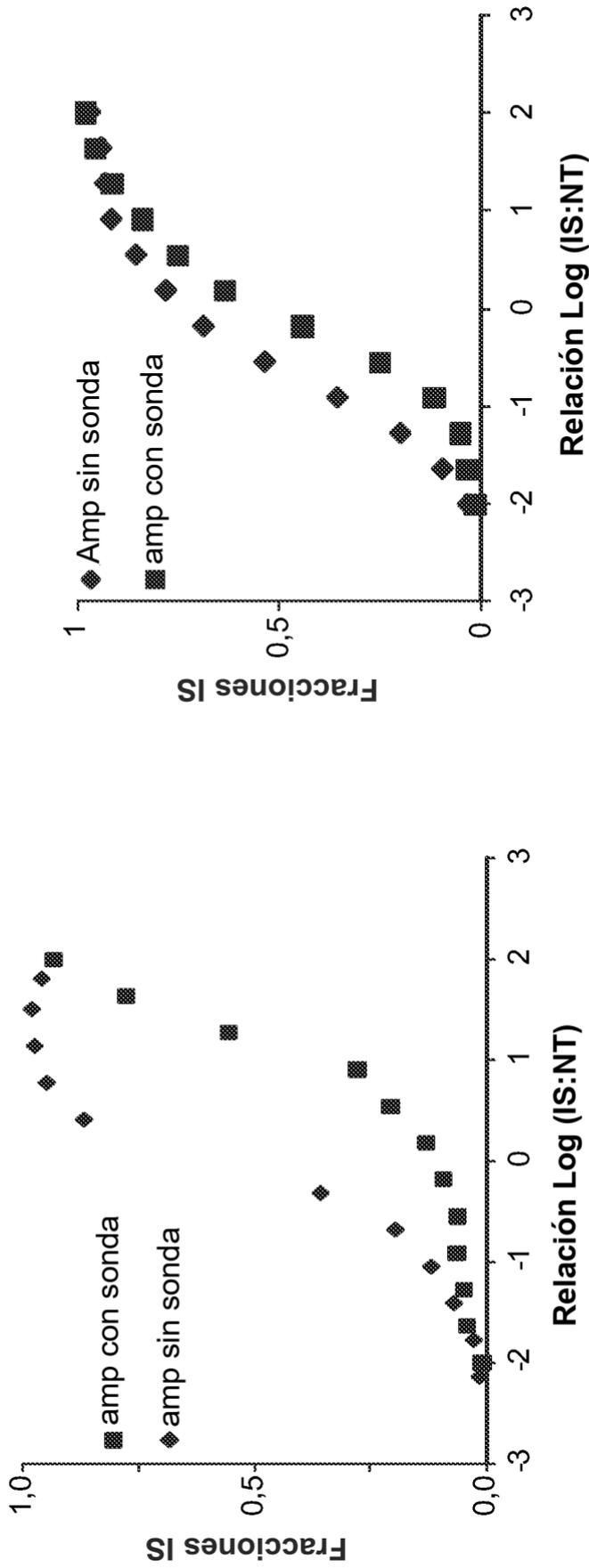
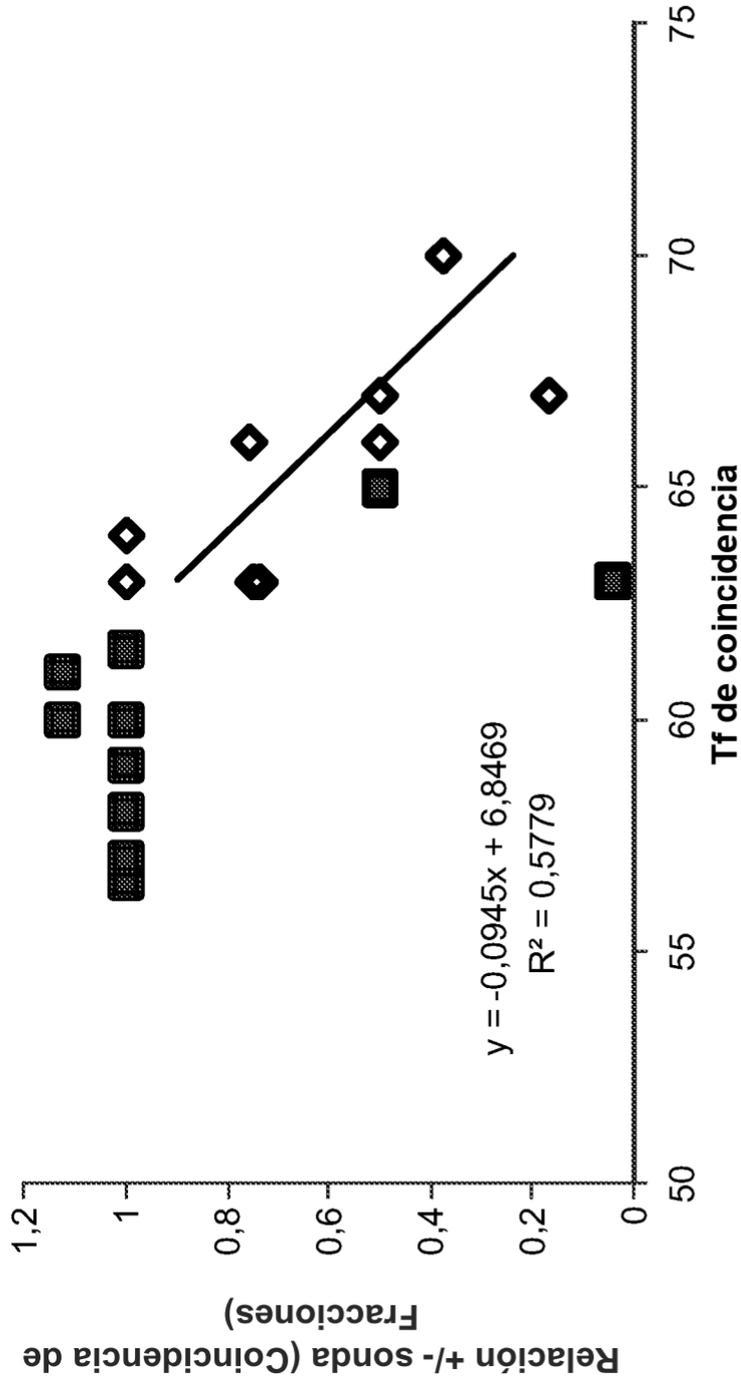


FIG. 3B

FIG. 3A

La temperatura de emparejamiento de la PCR afecta a la distorsión por la sonda en la PCR competitiva. Los ensayos SNAQ (cuadrados) midieron la fracción de IS (eje y) en muestras que contenían las relaciones de partida de IS: NT indicadas (eje x). Las T_f de la sonda para IS y NT fueron 63C y 43C, respectivamente. Se midieron las mismas muestras añadiendo la sonda de hibridación fluorescente después de la PCR (diamantes). Las muestras se amplificaron a una temperatura de emparejamiento de 60C (A) o 65C (B).



La sonda fluorescente no hidrolizable afecta a la PCR competitiva. Doce ensayos SNAQ diferentes (diamantes) midieron la fracción de NT en una muestra que contenía copias de partida de 1e4 NT y 1e4 IS. Se midió la misma muestra usando una mezcla maestra de PCR que contenía formamida al 8 % (cuadrados) para disminuir la Tf de la sonda de hibridación (Mediana 6C, intervalo 4C a 7,5 C)

FIG. 4

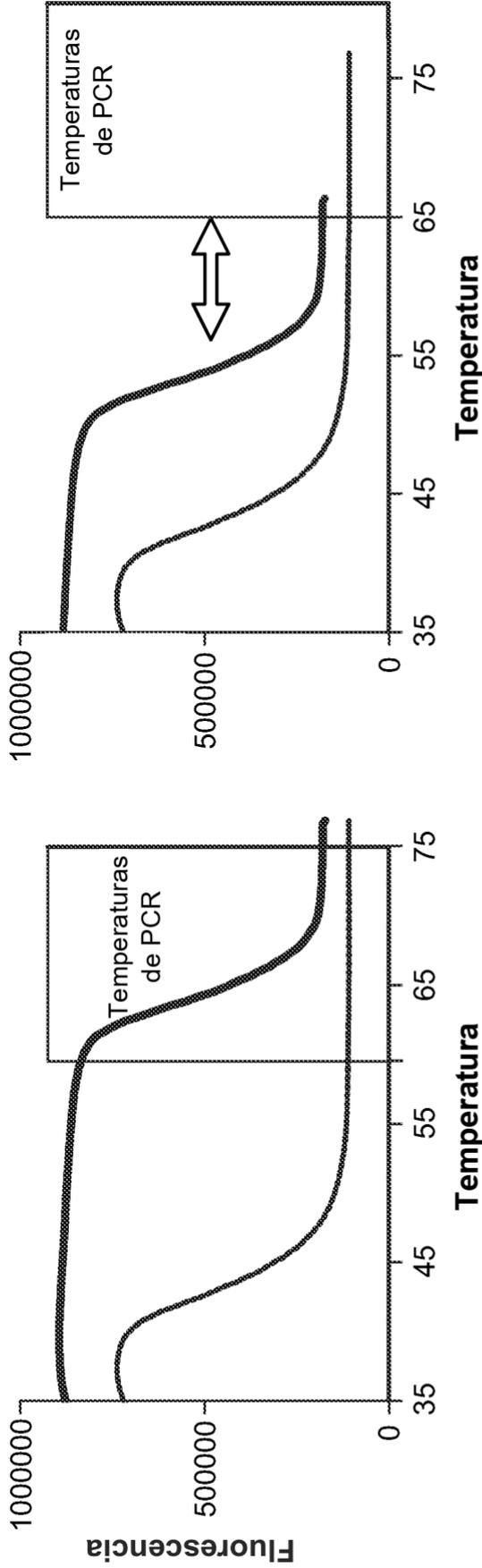


FIG. 5A

Influencia de la sonda de hibridación fluorescente en la PCR competitiva. El gráfico A muestra las curvas de fusión de la sonda de hibridación fluorescente de la plantilla coincidente (línea continua) o no coincidente (línea discontinua). Cuando una cantidad significativa de sonda de hibridación fluorescente se une a la plantilla coincidente a las temperaturas utilizadas durante la PCR, la sonda puede distorsionar las amplificaciones de la plantilla coincidente (A). El recuadro indica las temperaturas típicas de emparejamiento / extensión de la PCR. El desplazamiento de la T_f de la sonda de plantilla coincidente fuera de las temperaturas de ciclo de PCR reducirá la distorsión de la amplificación de la plantilla coincidente. El gráfico B demuestra que esto se puede lograr disminuyendo la T_f de la sonda o elevando la temperatura de emparejamiento de la PCR.