



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 144**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02004483 .0**

86 Fecha de presentación : **27.02.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1236805**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **04.09.2002**

54 Título: **Método para la determinación de un ácido nucleico utilizando un control.**

30 Prioridad: **02.03.2001 EP 01105172**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

72 Inventor/es: **Jaeger, Stephan**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 305 144 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

Método para la determinación de un ácido nucleico utilizando un control.

5 Esta invención va dirigida a un método para la determinación de un ácido nucleico diana utilizando un ácido nucleico control especial, un método para la amplificación de una secuencia parcial de dicho ácido nucleico diana utilizando cebadores y un ácido nucleico control especial, y un equipo que contiene dicho ácido nucleico control.

**Antecedentes de la invención**

10 La determinación de ácidos nucleicos se ha convertido en una herramienta importante en la química analítica, especialmente en el cuidado de la salud. Por ejemplo, las enfermedades infecciosas y el estado genético pueden determinarse fácilmente en base a la presencia o cantidad de un ácido nucleico indicativo de dicha enfermedad o estado en muestras recibidas de ese individuo. Por este motivo se establecieron métodos que utilizan una hibridación específica de secuencia de un ácido nucleico, preferiblemente un oligonucleótido, con un ácido nucleico diana indicativo de tal enfermedad o estado genético. Técnicas sensibles como el método de DNA ramificado (Patentes estadounidenses N° 5.681.702, 5.597.909, 5.545.730, 5.594.117, 5.591.584, 5.571.670, 5.580.731, 5.571.670, 5.591.584, 5.624.802, 5.635.352, 5.594.118, 5.359.100, 5.124.246 y 5.681.697), o los métodos de detección de ácidos nucleicos rRNA diana (PE 0 272 009), que están presentes en números de copia elevados en el organismo, pueden utilizarse para la detección directa de un ácido nucleico diana en una muestra de ese organismo. Pero muchos ácidos nucleicos diana están presentes en un organismo en tan baja concentración, que una detección directa en una muestra derivada de ese organismo no es posible. Tales dianas han de ser amplificadas previamente a su detección. Son métodos de amplificación adecuados por ejemplo la LCR (Patentes estadounidenses N° 5.185.243, 5.679.524 y 5.573.907; PE 0 320 308 B1; WO 90/01069; WO 89/12696 y WO 89/09835), tecnología de ciclado de sondas (Patentes estadounidenses N° 5.011.769, 5.403.711, 5.660.988 y 4.876.187, y las solicitudes PCT publicadas WO 95/05480, WO 95/1416 y WO 95/00667), tecnología Invader TM (Patentes estadounidenses N° 5.846.717, 5.614.402, 5.719.028, 5.541.311 y 5.843.669), tecnología de replicasa QBeta (Patente estadounidense N° 4.786.600), NASBA (Patente estadounidense N° 5.409.818; PE-0 329 822), TMA (Patentes estadounidenses N° 5.399.491, 5.888.779, 5.705.365 y 5.710.029), SDA (Patentes estadounidenses N° 5.455.166 y 5.130.238) y PCR (US-A-4.683.202).

30 Para minimizar los resultados erróneos en las determinaciones de ácido nucleico, las autoridades de varios países exigen la utilización de ácidos nucleicos control. Especialmente cuando se utilizan métodos de amplificación tales ácidos nucleicos control son muy importantes, ya que el proceso de amplificación puede verse fuertemente influenciado por las condiciones de reacción, lo que puede conducir a resultados erróneos. En ocasiones, una muestra puede contener sustancias inhibitorias, que pueden dar lugar a resultados negativos falsos.

40 En general se puede distinguir entre controles externos e internos. Los controles externos, como los controles positivo y negativo clásicos normalmente se utilizan para comprobar si el ensayo ha funcionado adecuadamente o si están presentes contaminantes. Un control interno por ejemplo es útil para reconocer sustancias inhibitorias que pueden contener una muestra o pueden utilizarse como un estándar de cuantificación en un ensayo cuantitativo. Al contrario que un control externo, que normalmente se analiza en un recipiente de reacción separado, el control interno preferiblemente se incubaba en el mismo recipiente de reacción junto con el analito a analizar. Por lo tanto, el control o el producto amplificado de ese control debe de ser distinguible del analito o del producto amplificado de ese analito. Cuando se utiliza un método de amplificación, el ácido nucleico control interno se está coamplificando esencialmente bajo las mismas condiciones de reacción que el ácido nucleico diana. Estas condiciones incluyen las concentraciones de reactivo, temperatura, concentración de inhibidor o actividades enzimáticas. Las secuencias frecuentemente utilizadas como controles se derivan de genes de mantenimiento ("housekeeping") (véanse Chelly *et al.* (1990) Eur. J. Biochem. 187:691-698 y Mallet *et al.* (1995) J. Clin. Microbiol. 33:3201-3208), pero también se utilizan secuencias sintéticas (Besnard *et al.* (1995) J. Clin. Microbiol. 32:1887-1893; Gilliland *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2725-2729; Wang *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9717-9721).

50 El ácido nucleico amplificado derivado del control interno puede distinguirse del ácido nucleico amplificado derivado del ácido nucleico diana, por ejemplo, mediante las diferencias en la longitud o capacidad de hibridación con una sonda distinta (para una revisión véanse: Clementi *et al.* (1990) PCR Methods Applic. 2:191-196; Clementi *et al.* (1995) Arch. Virol. 140:1523-1539). La US 5 840 487 describe la utilización de ácidos nucleicos como secuencias control internas en reacciones de amplificación isotérmicas, en las que las secuencias diana y control tienen sustancialmente la misma longitud y sustancialmente el mismo contenido en G+C, pero sin embargo difieren al menos parcialmente de la secuencia diana. En todos los casos la secuencia de nucleótidos del control interno es parcialmente o totalmente diferente de la secuencia del ácido nucleico diana. Sin embargo la secuencia y la longitud de un ácido nucleico determinan su contenido GC, estructuras secundarias y la temperatura de fusión, y por lo tanto es esencial para su comportamiento en una reacción de hibridación y amplificación. Una secuencia diferente en un control interno en casi todos los casos resulta en un comportamiento diferente del ácido nucleico control comparado con el del ácido nucleico diana. Por el contrario, el control interno ideal debería imitar exactamente al ácido nucleico diana para permitir una adecuada monitorización de la reacción.

65 Uno de los aspectos más críticos en una reacción de amplificación es la unión del cebador al ácido nucleico diana. Por lo tanto se están utilizando controles internos que poseen los mismos puntos de unión de cebador que el ácido nucleico diana (véase por ejemplo Gilliland *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2725-2729; Wang *et al.* (1989)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 9717-9721; US 5.219.727). Esto puede conducir a una competición en la reacción por los cebadores y puede resultar en una disminución de la sensibilidad del ensayo.

5 Gilliland *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2725-2729 describe controles internos que tienen casi la misma secuencia de nucleótidos que el ácido nucleico diana, pero contienen un nuevo punto de corte por una enzima de restricción o la secuencia de una región intrónica no contenida en el ácido nucleico diana. Debido a la muy elevada homología del control interno con la diana, ambos ácidos nucleicos así como las amplificaciones pueden hibridar de forma cruzada entre ellos. En función del método de detección utilizado, esto puede conducir a resultados erróneos especialmente en los ensayos cuantitativos. Además, los métodos descritos requieren técnicas elaboradas como la  
10 digestión con enzimas de restricción y la electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados.

Epplen *et al.* (1997) Human Genetics, 99:834-836 describe el análisis cuantitativo de un motivo (GAA)<sub>n</sub> en individuos portadores de repeticiones del motivo. El DNA de la repetición (GAA) se amplifica mediante PCR y a continuación se somete a electroforesis en gel de agarosa. El gel de electroforesis se transfiere a un filtro y una sonda (TCT)<sub>6</sub> marcada radiactivamente se hibrida para detectar las bandas de DNA que contienen repeticiones GAA. El número de repeticiones (GAA) se infiere a partir del tamaño del fragmento de DNA en relación a los marcadores de tamaño.  
15

Ginzinger *et al.* (2000) Cancer Research, 60:5405-5409 describe el análisis cuantitativo de microsatélites en un formato de ensayo homogéneo. Se describe un método basado en la PCR en el que el número relativo de copias de la secuencia de DNA se mide utilizando una sonda fluorogénica Taqman™ específica de las repeticiones CA que se hibrida sobre una secuencia diana amplificada que contiene una repetición CA.  
20

La WO 00/29613 describe un método para la amplificación/ cuantificación de un ácido nucleico diana, utilizando una cantidad conocida de un ácido nucleico calibrador. El método se basa en la utilización del calibrador durante los pasos de extracción de la muestra, de amplificación del ácido nucleico diana y la subsiguiente detección con sondas adecuadas capaces de hibridar de forma diferencial con el calibrador y la secuencia diana. El calibrador tiene una secuencia idéntica a la secuencia del ácido nucleico diana con la excepción de una o más regiones cuya secuencia es diferente de las correspondientes regiones del ácido nucleico diana, con una secuencia aleatoria y una T<sub>m</sub> similar respecto de este último. Es objeto de la presente invención mejorar los métodos para la determinación de ácidos nucleicos, especialmente evitando la totalidad o una parte de las desventajas de los métodos conocidos.  
25  
30

### Resumen de la invención

35 El aspecto principal de la invención es proporcionar ácidos nucleicos que imitan las propiedades de un ácido nucleico diana en relación a su longitud, contenido G/C, estructura secundaria, cinética de plegamiento y otras características, pero que pueda distinguirse fácilmente del respectivo ácido nucleico diana por su secuencia. Para conseguirlo, se construye una secuencia, que cubre esencialmente la región de dicho ácido nucleico diana a determinar o la cadena complementaria de dicha región del ácido nucleico diana y cuya secuencia es al menos en parte complementaria en paralelo con una cadena del ácido nucleico diana o una cadena complementaria de la misma. La parte o partes complementarias en paralelo de la secuencia de ácido nucleico control puede extenderse de pequeños tramos por ejemplo de al menos 8 nucleótidos, preferiblemente al menos 10 nucleótidos, a la región completa del ácido nucleico diana a determinar en el caso más extenso. En un aspecto preferible de la presente invención, la parte o partes complementarias en paralelo contienen la(s) secuencia(s) del punto de unión de la sonda.  
40  
45

En otro aspecto preferible, en particular, si la región del ácido nucleico diana a determinar se amplifica para la determinación, el ácido nucleico control de acuerdo con la presente invención también puede contener puntos de unión al cebador que son complementarios en paralelo a los respectivos puntos de unión al cebador de la región del ácido nucleico diana.  
50

Tales ácidos nucleicos control pueden utilizarse por ejemplo como controles internos en métodos de hibridación y amplificación y por lo tanto son útiles en el campo del análisis químico y diagnóstico médico.

55 La invención también está relacionada con un método para la amplificación de una región del ácido nucleico diana en una muestra que comprende los pasos de:

amplificar dicha región del ácido nucleico diana y una cantidad conocida de ácido nucleico control, en el que dicho ácido nucleico control cubre esencialmente dicha región del ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicha región del ácido nucleico diana, y los ácidos nucleicos amplificados se detectan en la mezcla de reacción de amplificación durante la reacción de amplificación utilizando sondas específicas, la hibridación de las sondas a los ácidos nucleicos amplificados durante la reacción de amplificación se monitoriza, una primera sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico control es esencialmente complementaria en paralelo con una segunda sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicho ácido nucleico diana y al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos de dicho ácido nucleico control no pueden unirse a la diana y es complementaria en paralelo en más del 80% de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana, la región del ácido nucleico control consiste en una o más partes, y la secuencia de cada parte es idéntica en más del 80% o complementaria en paralelo en más del 80% de la parte correspondiente de la región del ácido nucleico diana a determinar o de la cadena complementaria.  
60  
65

Respecto a los métodos de amplificación, los ácidos nucleicos control de la invención aportan ventajas adicionales. Si un punto de unión de cebador de estos ácidos nucleicos es complementario en paralelo al punto de unión del cebador de la diana, estos controles mimetizan las propiedades de unión del cebador a la diana, aunque las secuencias de los puntos de unión del cebador y los cebadores del ácido nucleico control son diferentes de los del ácido nucleico diana. Se evita una competición de los cebadores por la amplificación de la diana y el control, y la sensibilidad y el rango lineal del ensayo pueden mejorarse.

Un control como el mencionado puede utilizarse en cualquier método de hibridación y amplificación para la determinación de ácidos nucleicos. La utilización de este ácido nucleico control es potenciada por la necesidad de un control que refleje las características del ácido nucleico diana a determinar, pero que aun así puede detectarse separadamente.

### Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra un ejemplo de una secuencia de ácido nucleico y su secuencia complementaria en paralelo así como sus capacidades de formar estructuras secundarias similares. (QS: ácido nucleico control para su utilización en un ensayo cuantitativo o cualitativo).

La Fig. 2 muestra la predicción de estructuras secundarias realizada con Mfold versión 3.0 (copyright 1996 Dr. M. Zuker, M. Zuker, D.H. Mathews & D.H. Turner, Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide, en RNA Biochemistry and Biotechnology, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, Ed., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, (1999)) para las sondas ST650 (sonda específica de HCV), ST650pc (complementaria en paralelo de ST650) y ST2535 (secuencia no relacionada).

La Fig. 3 muestra la predicción de estructuras secundarias realizada con Mfold versión 3.0 para los cebadores ST280 (específico de HCV), ST280pc (complementaria en paralelo de ST280), ST778 (específico de HCV) y ST778pc (complementaria en paralelo de ST778).

La Fig. 4 muestra la predicción de estructuras secundarias realizada con Mfold versión 3.0 para el amplicón HCV, amplicón QS(pc)HCV (complementaria en paralelo del amplicón HCV) y amplicón QSHCV (amplicón control que contiene una secuencia de nucleótidos desordenada, una secuencia de unión a la sonda ST2535, un punto de unión de los cebadores ST280 y ST778, y del mismo tamaño que el amplicón HCV).

La Fig. 5 muestra las curvas de hibridación del ácido nucleico amplificado derivado de diferentes estándares internos, la amplificación QSHCV (Id. de Sec. N° 14) y la amplificación QS(pc)HCV (Id. de Sec. N° 13), comparado con la amplificación HCV-1b.

### Descripción detallada de la invención

La invención principalmente se basa en la observación de que un primer ácido nucleico con una secuencia que es complementaria en paralelo de una segunda secuencia de ácido nucleico tienen propiedades de hibridación muy similares definidas por su longitud, contenido GC, Tm y estructuras secundarias comparadas con la primera secuencia de ácido nucleico, aunque la secuencia sea completamente diferente. Tal ácido nucleico puede utilizarse como ácido nucleico control para la determinación de un ácido nucleico diana, ya que el ácido nucleico control y los ácidos nucleicos diana y sus amplificaciones tienen un comportamiento de hibridación muy similar, pero siguen siendo detectables de forma separada por sus diferentes secuencias.

Un ácido nucleico control preferible de acuerdo con la presente invención cubre esencialmente la región del ácido nucleico diana a determinar que se caracteriza porque la región de dicho ácido nucleico control que cubre esencialmente la región de dicho ácido nucleico diana a determinar o la complementaria de dicho ácido nucleico diana contiene al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos que son esencialmente complementarios en paralelo de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana y no puede unirse a la secuencia diana.

En este contexto, cubrir esencialmente la región del ácido nucleico diana a determinar significa que esta región del ácido nucleico control consiste en una o más partes, en las que la secuencia de cada parte es esencialmente idéntica o esencialmente complementaria en paralelo de la respectiva parte de la región del ácido nucleico diana a determinar o de la cadena complementaria. Por lo tanto, esta región del ácido nucleico control es esencialmente idéntica, esencialmente complementaria en paralelo o en parte esencialmente complementaria en paralelo, mientras que la otra parte es esencialmente idéntica a la región relevante de la región del ácido nucleico diana a determinar o a la cadena complementaria del ácido nucleico diana. Por lo tanto esta región del ácido nucleico control tiene unas propiedades de hibridación esencialmente idénticas comparado con la región del ácido nucleico diana a determinar o la cadena complementaria del ácido nucleico diana. Pequeños cambios en el comportamiento de la estructura secundaria pueden aparecer si se combinan demasiadas partes esencialmente complementarias en paralelo y esencialmente idénticas en el ácido nucleico control, mientras que esto no afecte el contenido GC. Para garantizar que el comportamiento del control sigue mimetizando el comportamiento de la diana, es preferible que la región del ácido nucleico control que cubre la región del ácido nucleico diana a determinar consista en menos de 10, más preferiblemente menos de 6 partes que sean esencialmente complementarias en paralelo o esencialmente idénticas.

## ES 2 305 144 T3

Como las secuencias esencialmente idénticas o idénticas no se pueden distinguir fácilmente, es muy importante que la región del ácido nucleico control que cubre la región del ácido nucleico diana a determinar contenga al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos, más preferiblemente al menos una secuencia de al menos 10 nucleótidos que sea esencialmente complementaria en paralelo de dicha secuencia de ácido nucleico diana para permitir una determinación diferencial del ácido nucleico diana y de los ácidos nucleicos control o sus amplificaciones, por ejemplo mediante la hibridación de una sonda.

Una parte de un primer ácido nucleico es complementaria en paralelo a un segundo ácido nucleico o una parte de éste, si la secuencia de ese primer ácido nucleico es idéntica a la secuencia de la cadena complementaria de la secuencia del segundo ácido nucleico o una parte de la misma cuando la secuencia de la cadena complementaria de la secuencia del ácido nucleico diana se lee en orientación inversa. Para los ácidos nucleicos naturales esto significa leer la secuencia del extremo 3' al extremo 5'. Se proporciona un ejemplo en la Figura 1. La secuencia complementaria en paralelo de la secuencia de ácido nucleico 5'-AGCGCATGCCAGATTACTGGC-3' (Id. de Sec. N° 1) es 5'-TCGCGTACGGTCTAATGACCG-3' (Id. de Sec. N° 2). La secuencia complementaria en paralelo de la cadena complementaria es 5'-CGGTCATTAGACCGTACGCGA-3' (Id. de Sec. N° 17).

Las partes de los ácidos nucleicos control de acuerdo con la presente invención no han de ser necesariamente un 100% idénticas o 100% complementarias en paralelo del ácido nucleico diana, aunque este caso es preferible. Es suficiente, si estas partes son esencialmente idénticas o esencialmente complementarias en paralelo. Esencialmente idéntica significa que la homología de esta parte o estas partes del ácido nucleico control lo son en más del 80%, más preferiblemente en más del 90% comparado con las partes relevantes del ácido nucleico diana. Esencialmente complementaria en paralelo significa que la homología de esta parte o estas partes del ácido nucleico control lo son en más del 80%, más preferiblemente en más del 90% complementarias en paralelo comparado con las partes relevantes del ácido nucleico diana.

Para la determinación exacta de homología y complementariedad es preferible utilizar programas informáticos adecuados como el FastA (Pearson y Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85; 2444-2448 (1988); versión de FastA del Wisconsin Package<sup>TM</sup>), parámetros por defecto: tamaño de palabra 2 (p-p), 6 (n-n); no mostrar puntuaciones cuyo valor de E() supere 10,0 (p-p), 2,0 (n-n)).

Los ácidos nucleicos control de acuerdo con la presente invención también son útiles en reacciones de hibridación y amplificación para la determinación de ácidos nucleicos diana con secuencias relacionadas como las formas alélicas. Con este propósito no es necesario sintetizar un nuevo control para cada forma alélica de un ácido nucleico diana.

Un ácido nucleico control de acuerdo con la presente invención para su utilización en un método de hibridación como un control puro para monitorizar por ejemplo un paso de hibridación de sonda cubre esencialmente la región del ácido nucleico diana a determinar caracterizada porque la región de dicho ácido nucleico control que cubre esencialmente la región de dicho ácido nucleico diana a determinar o la complementaria de dicho ácido nucleico diana contiene al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos que es esencialmente complementaria en paralelo de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana y no puede unirse a la secuencia diana. La región más importante en tales métodos es la región del ácido nucleico diana que se une realmente a la sonda específica de la diana, que es la región del ácido nucleico diana que realmente se está determinando. Por lo tanto, en la mayoría de casos es suficiente que esta región esté cubierta por el control interno. En el caso de que esta región sea inferior a 15 nucleótidos, más preferiblemente inferior a 10 nucleótidos es preferible que la región relevante del ácido nucleico control sea esencialmente complementaria en paralelo a la región de hibridación de la sonda del ácido nucleico diana. Si la región de hibridación de la sonda del ácido nucleico diana es superior a 15 nucleótidos, más preferiblemente superior a 10 nucleótidos, la región relevante del ácido nucleico control puede ser totalmente complementaria en paralelo a la región de hibridación de la sonda del ácido nucleico diana o la región puede ser en parte esencialmente complementaria en paralelo, mientras el resto de partes son esencialmente idénticas. Utilizando una sonda esencialmente complementaria, preferiblemente una sonda complementaria para la hibridación con tal ácido nucleico control es posible mimetizar la hibridación del ácido nucleico diana con su sonda, pero aun así permite una determinación separada de ambos complejos de hibridación.

Un control de amplificación permite la monitorización de un proceso de amplificación. Si por ejemplo se observa un ensayo típico de PCR, este puede incluir pasos de hibridación de cebadores, de elongación de los cebadores, de eficiencia de la amplificación y/o también otros pasos de hibridación de sondas. Un control de amplificación preferible de acuerdo con la presente invención puede contener regiones que flanquean la región que cubre esencialmente la región del ácido nucleico diana a amplificar, ya que los cebadores preferibles utilizados para la amplificación del control son esencialmente complementarios en paralelo o esencialmente idénticos, más preferiblemente complementarios en paralelo o idénticos a los cebadores de la amplificación de la diana, dependiendo de la secuencia del control. Así, la amplificación del ácido nucleico control no contiene las regiones flanqueantes del control sino sólo la región que cubre esencialmente la región del ácido nucleico diana a amplificar y la longitud de ambas amplificaciones es esencialmente idéntica.

La región del ácido nucleico control que esencialmente cubre la región del ácido nucleico diana a amplificar puede construirse de varias partes que son esencialmente complementarias en paralelo o esencialmente idénticas a la respectiva parte del ácido nucleico diana como se ha descrito anteriormente. Las combinaciones preferibles del ácido nucleico control que cubre la región del ácido nucleico diana a amplificar se listan en la tabla 1:

TABLA 1

5	Punto(s) de unión a cebador	Punto(s) de unión a sonda (si están presentes)	Región distinta de cebador y de sonda
	Id	Pc	Id
10			
15	Id	Pc	Pc
	Pc	Pc	Pc
20	Pc	Pc	Id
	Pc	Id	Pc
25	Pc	Id	Id
30	Id= esencialmente idéntico, Pc= esencialmente complementario en paralelo a la diana		

De acuerdo con la invención sólo es importante la secuencia de bases, mientras que el esqueleto no necesariamente ha de ser el esqueleto natural de azúcar-fosfato. Por lo tanto también es posible utilizar ácidos nucleicos como controles de acuerdo con la presente invención con un esqueleto modificado o un esqueleto sintético como un ácido nucleico peptídico (WO 92/20702). Cuando se utilizan ácidos nucleicos control que contienen análogos de base se debe tener cuidado de que esas bases tengan propiedades similares a las de la base natural complementaria situada en la posición relevante de la secuencia del ácido nucleico diana para mimetizar tanto como sea posible el comportamiento de hibridación del ácido nucleico diana. También se debe tener cuidado de que cuando se utilice un ácido nucleico control como ácido nucleico control de amplificación, la naturaleza del ácido nucleico control permita la amplificación del ácido nucleico control con el método de amplificación utilizado.

Un ácido nucleico control de acuerdo con la presente invención puede obtenerse en base a la secuencia de la cadena codificante de RNA o DNA, o su cadena complementaria. Los controles, por ejemplo, pueden sintetizarse químicamente y clonarse en vectores adecuados como plásmidos, ácidos nucleicos fágicos, o en el genoma de bacterias o virus o utilizarse tal y como se obtienen. Tales ácidos nucleicos control pueden amplificarse *in vitro* o producirse en bacterias transfectadas con los vectores que contienen la secuencia de ácido nucleico de los controles. Tales ácidos nucleicos control pueden utilizarse directamente en el ensayo o empaquetarse, por ejemplo como RNA blindado (Patente estadounidense 5.677.124) o empaquetarse en liposomas.

El ácido nucleico diana es el ácido nucleico a determinar. Este puede tener cualquier origen, por ejemplo de origen viroide, vírico, bacteriano o celular. Puede ser derivado de soluciones, como sangre, suero, plasma u orina, de suspensiones, fijadas en sólidos, medios con células, frotis de células, células fijadas, secciones de tejido u organismos fijados. Preferiblemente el ácido nucleico a determinar esta en solución. El ácido nucleico a determinar también puede ser un ácido nucleico derivado de los ácidos nucleicos diana, por ejemplo mediante recombinación, fragmentación, amplificación y/o formación de cDNA a partir de RNA.

El ácido nucleico diana normalmente se lleva a una forma disponible mediante el procesado de la muestra original con uno de varios métodos. Éstos comprenden por ejemplo, el cambio de pH (alcalino), calentamiento, cambios cíclicos de temperatura (congelación/ descongelación), cambios de las condiciones de crecimiento fisiológicas, utilización de detergentes, sales caotrópicas o enzimas (por ejemplo proteasas o lipasas), solos o en combinación. Si el ácido nucleico control de acuerdo con la presente invención se añade a una muestra previamente o durante el paso de preparación de la muestra, estos ácidos nucleicos control también pueden utilizarse como controles de la preparación de la muestra además de los subsiguientes pasos de amplificación y/o hibridación. Con este propósito puede añadirse el ácido nucleico control a la muestra como DNA o RNA, dependiendo de la naturaleza del ácido nucleico diana. También puede empaquetarse de forma similar a la del ácido nucleico diana, que a menudo se encuentra en el muestra unido a proteínas o otros componentes celulares o víricos. Para mimetizar al máximo el ácido nucleico diana, el ácido nucleico control puede empaquetarse por ejemplo en una cubierta de proteínas, como por ejemplo en el RNA blindado.

## ES 2 305 144 T3

Los ácidos nucleicos control de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse por ejemplo como controles, preferiblemente como controles internos en métodos de hibridación, como el método de DNA ramificado, o en la determinación de dianas de RNA ribosomal, o también puede ser útil en los métodos de hibridación de array.

5 Éstos también son útiles por ejemplo como controles, preferiblemente como controles internos, en los métodos de amplificación de la diana, como la TMA, SDA, NASBA, LCR y PCR. El método preferible es la PCR. En principio, un ácido nucleico diana, por ejemplo, indicativo de un agente infeccioso o un estado genético se utiliza como molde al cual se puede unir un cebador de forma específica de secuencia, bajo las condiciones de reacción adecuadas. Depen-  
10 diendo del método utilizado, el cebador por ejemplo puede extenderse con monómeros de nucleótido utilizando una polimerasa o ligarse con otro cebador hibridado cerca. En el caso de que tal producto de amplificación pueda servir por sí mismo directamente o indirectamente como molde, se puede amplificar el ácido nucleico diana exponencialmente. También son conocidos los métodos de amplificación lineal. Los productos de amplificación pueden detectarse directamente, por ejemplo mediante una electroforesis en gel de agarosa o realizando otra reacción de hibridación con al menos una sonda específica de secuencia.

15 Un cebador de acuerdo con la presente invención es una molécula que puede extenderse o modificarse preferiblemente mediante enzimas, más preferiblemente por una polimerasa por ejemplo de origen procariota, cuando hibrida con un molde de ácido nucleico.

20 Cuando se utiliza la PCR son preferibles las polimerasas termoestables, como la polimerasa de DNA de *T. aquaticus*. La extensión añade unidades de mononucleótido a partir de monodesoxiribonucleósidos trifosfato a un extremo de dicho primer, preferiblemente el extremo 3'-OH terminal. La longitud total y la secuencia de bases de un cebador es dictada por la especificidad requerida de la reacción de amplificación. Las longitudes preferibles de cebador para rea-  
25 lizar una PCR están entre 10 y 40, más preferiblemente entre 15 y 30 subunidades que contienen bases, seleccionadas de entre mononucleótidos y/o monómeros análogos de ácido nucleico. En general, los cebadores de esa longitud también son útiles en otros métodos de amplificación. Si se utiliza más de un cebador para la amplificación, por ejemplo cuando se utiliza la PCR o se amplifican múltiples ácidos nucleicos diana en una reacción, preferiblemente se utilizan cebadores que no pueden hibridar entre ellos, ya que no contienen ninguna porción de más de 5 bases complementarias consecutivas.

30 Para la PCR las localizaciones de hibridación de los cebadores se eligen normalmente de tal forma que hay una porción de al menos 10, pero de no mucho más de 1000, preferiblemente entre 100 y 500 nucleótidos entre sus extremos originales 3', en el híbrido de los productos de extensión.

35 Generalmente, es importante que un cebador se una suficientemente fuerte al ácido nucleico diana para permitir la amplificación bajo las condiciones de reacción, pero se debe tener cuidado de que el cebador sólo se una preferiblemente al ácido nucleico diana y debe evitarse la unión a otros ácidos nucleicos que puedan estar presentes en una muestra. Por lo tanto, son preferibles los cebadores de entre 10 y 40 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de  
40 entre 15 y 30 nucleótidos de longitud. Preferiblemente los cebadores son oligonucleótidos.

Una sonda es una molécula utilizada para la determinación de un ácido nucleico diana o un ácido nucleico diana amplificado. También puede utilizarse para determinar la secuencia de un ácido nucleico diana o ácido nucleico diana amplificado. Con este propósito pueden utilizarse sondas con diferentes secuencias. Tales sondas también pueden  
45 utilizarse por ejemplo para la determinación de diferentes formas alélicas de un ácido nucleico diana o para la determinación específica del género y especie de una diana. Las sondas son preferiblemente oligonucleótidos, pero también pueden utilizarse análogos, por ejemplo PNA. Para permitir la hibridación específica de secuencia, preferiblemente las sondas son de una longitud superior a 10 nucleótidos, más preferiblemente son de una longitud de entre 10 y 40 nucleótidos. Para permitir la detección del ácido nucleico diana, los productos de amplificación y los respectivos  
50 complejos de hibridación con la sonda, las sondas y/o los cebadores utilizados pueden acoplarse a grupos que pueden detectarse directamente o indirectamente, o que permiten una inmovilización del ácido nucleico diana, los productos de amplificación y los respectivos complejos de hibridación con la sonda en una fase sólida.

Un marcaje es generalmente conocido para un experto en la materia como un grupo que es detectable o puede hacerse detectable para determinar la presencia de un analito. Los marcajes bien conocidos son los marcajes fluores-  
55 centes, como la fluoresceína, marcajes electroquimioluminiscentes, como los complejos de rutenio, o matrices que pueden ser reconocidas por otras entidades moleculares, como los haptenos que pueden ser reconocidos por un anticuerpo generado contra ese hapteno, o matrices que pueden inmovilizarse, como la biotina (en fases sólidas recubiertas de estreptavidina, como tubos o cuentas). Los marcajes, por ejemplo, pueden estar unidos a la(s) sonda(s) o cebador(es), o pueden incorporarse en los ácidos nucleicos amplificados como unidades nucleósido trifosfato marcadas. Tam-  
60 bién pueden utilizarse marcajes que permitan la detección del ácido nucleico diana o ácido nucleico diana amplificado mediante otros medios, por ejemplo por intercalado del marcaje o un intercalante marcado en un DNA de doble cadena. Los marcajes pueden utilizarse para la detección de cebadores o sondas o cualquier producto que ha incorporado dicho cebador, para determinar el híbrido formado por dicho cebador o sonda con un ácido nucleico a determinar o los nucleótidos marcados incorporados a un ácido nucleico diana amplificado.

65 Una fase sólida es un sólido sustancialmente insoluble en la mezcla de reacción, por ejemplo en forma de una cuenta, una red, la superficie interna de un tubo, una placa microtitulada o una cámara de un dispositivo. Se utiliza

esencialmente para contener la mezcla de reacción, pero en el caso de tener la intención de unir una sonda, cebador o ácido nucleico control inmovilizable a ésta, puede contener en su superficie reactivos o un recubrimiento capaz de reconocer y unir una porción de dicha sonda, cebador o ácido nucleico control.

5 Utilizando métodos de detección heterogéneos, la determinación, por ejemplo mediante la hibridación de una sonda, se realiza tras el paso de amplificación. El complejo de hibridación puede detectarse en solución o tras la inmovilización sobre una fase sólida. También son conocidos los formatos de detección homogéneos, que permiten la determinación del ácido nucleico amplificado en la mezcla de reacción sin más pasos de separación o lavado. Con este propósito se conocen varios formatos de hibridación de sonda, como el Taqman (patentes estadounidenses N° 5210015 y 5487972), transferencia de la energía de resonancia de la fluorescencia (US 4.996.143), balizas moleculares (WO-95/13399, patentes estadounidenses N° 5.119.801 y 5.312.728), Sunrise (patente estadounidense N° 5.866.336) y Scorpions (PCT/GB98/03521). Tales métodos pueden utilizarse para detectar el nivel de amplificación sintetizada a lo largo de la reacción de amplificación completa. Cuando se utiliza un control interno, por ejemplo un control interno de acuerdo con la presente invención, en una reacción o para la determinación de múltiples dianas las señales medidas para cada diana y el control pueden distinguirse unas de otras. Por esa razón se pueden utilizar, por ejemplo, diferentes marcajes unidos a las diferentes sondas o cebadores, lo que permite una medida simultánea de las diferentes dianas y controles o ácidos nucleicos amplificados derivados de estos ácidos nucleicos en la mezcla de reacción.

20 El ácido nucleico control de acuerdo con la presente invención es un ácido nucleico, que puede haberse sintetizado químicamente, puede haberse clonado, amplificado o aislado mediante otros medios conocidos en la materia. Está formado preferiblemente por monómeros de RNA o DNA, pero también puede contener análogos naturales o no naturales de bases o azúcares. Debido a la(s) parte(s) complementarias en paralelo los ácidos nucleicos control tienen una secuencia diferente comparado con la secuencia del ácido nucleico diana y en la mayoría de los casos tales secuencias se han de obtener sintéticamente al menos una vez mediante métodos conocidos, como la tecnología de la fosforamidita.

30 Para permitir la producción de ácidos nucleicos de mayor longitud de acuerdo con la presente invención se pueden sintetizar oligonucleótidos cortos, de alrededor de 40 a 120 bases de longitud que solapan ambas cadenas del ácido nucleico control deseado de forma escalonada. Tras la hibridación de estos oligonucleótidos y el siguiente paso de ligación el ácido nucleico puede clonarse, por ejemplo, en un vector o puede utilizarse directamente como se ha descrito aquí. El ácido nucleico clonado puede amplificarse por ejemplo en bacterias y aislarse utilizando métodos estándar (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laborator, 2001, ISBN 0879695765). Si el ácido nucleico es un RNA, éste puede sintetizarse, por ejemplo, mediante la transcripción *in vitro* utilizando un vector, que contiene una secuencia promotor adecuada, como la secuencia promotor del fago T7. Los ácidos nucleicos pueden utilizarse como ácido nucleico desnudo o empaquetarse en partículas, por ejemplo, como un RNA blindado (US 5.677.124), o incluirse en un organismo viroide, vírico, bacteriano o celular.

40 Tales ácidos nucleicos son por ejemplo útiles para controlar las reacciones de hibridación y amplificación de ácidos nucleicos. Estos pueden utilizarse para identificar resultados falsos negativos debidos a inhibidores presentes en una muestra o como estándares en un ensayo cuantitativo. El control puede procesarse en una reacción paralela en diferentes recipientes (control externo) o coprocesado en el mismo recipiente de reacción (control interno) que la diana, siendo el último caso preferible.

45 La(s) parte(s) esencialmente complementaria(s) en paralelo en la construcción del control puede(n) incluir uno o más puntos de unión de la sonda y/o uno o más puntos de unión del cebador y/o uno o más regiones flanqueantes del cebador/sonda, y en el caso más extenso la secuencia completa del correspondiente ácido nucleico diana.

50 Esto significa que durante el procesado de un ácido nucleico control de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse cebadores y/o sondas, que son esencialmente complementarios en paralelo, preferiblemente complementarios en paralelo a los utilizados para procesar el ácido nucleico diana. Los correspondientes cebadores y sondas muestran el mismo contenido en GC y propiedades de hibridación, que principalmente reflejan las eficiencias de hibridación de la sonda y del cebador, y las eficiencias de amplificación, pero no muestran competición respecto a estos componentes de reacción, ya que los cebadores y/o sondas que se unen al ácido nucleico control no pueden unirse al ácido nucleico diana y viceversa. Sólo en el caso de bajas cantidades de ácido nucleico diana en una muestra tal competición podría llegar a dar lugar a una ausencia de amplificación de la diana o una unión de la sonda reducida. Por lo tanto, la utilización de cebadores y sondas complementarias en paralelo puede aumentar la sensibilidad y rango lineal de un ensayo. Aunque debe notarse que la utilización de cebadores idénticos para la amplificación del ácido nucleico diana y el ácido nucleico control tiene la ventaja de que un juego de cebadores es suficiente y es posible un control directo de los cebadores específicos de la diana.

60 En un análisis cualitativo, el ácido nucleico control de la presente invención puede utilizarse para identificar los resultados falsos negativos, preferentemente se utiliza como ácido nucleico control interno. Debido a su capacidad de mimetizar de forma muy parecida a la diana, responde a los inhibidores del mismo modo. Especialmente, cuando se añade el ácido nucleico control a la reacción en baja concentración, ya que en este caso el sistema reacciona de forma muy sensible a la aparición de sustancias inhibitoras. Tales ácidos nucleicos control también pueden utilizarse como estándares, preferiblemente como estándares internos, por ejemplo como método para estandarizar los resultados de experimentos paralelos.

## ES 2 305 144 T3

En un análisis cuantitativo, el ácido nucleico control de la presente invención puede utilizarse como un estándar cuantitativo para determinar el nivel de partida de ácido nucleico diana contenido en una muestra. Una cantidad conocida del ácido nucleico estándar se coamplifica esencialmente bajo las mismas condiciones de reacción junto con el ácido nucleico diana, preferiblemente como un estándar interno cuantitativo. Tras la amplificación o, en el caso de una detección homogénea, durante la reacción de amplificación, se determina la cantidad de ácido nucleico diana amplificado y la cantidad de ácido nucleico estándar amplificado. Utilizando estas y conociendo la cantidad inicial de ácido nucleico estándar en la reacción es posible calcular la cantidad inicial de ácido nucleico diana, que estaba presente en la muestra previamente a la amplificación. Son conocidos en la materia varios métodos para la cuantificación, lo que incluye por ejemplo conceptos que utilizan una curva de estándar interno, curva de estándar externo y el modelo Payan (véase por ejemplo Haberhausen *et al.*, Journal of Clinical Microbiology, Vol 36, pág. 628 a 633). Debe notarse que no es necesario medir las cantidades absolutas de las amplificaciones sintetizadas. Para la mayoría de propósitos las cantidades relativas son suficientes, que pueden determinarse por ejemplo mediante hibridación de las amplificaciones con sondas marcadas y la medida de la intensidad de la señal de los complejos de hibridación.

En una realización preferible, los ácidos nucleicos control de la presente invención se utilizan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrita en las patentes estadounidenses N° 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188, Saiki *et al.*, Science 230:1350-1354; Mullis *et al.*, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263-273; y Mullis y Faloona, 1987, Methods Enzymol. 155:335-350. Sin embargo la invención no se limita a ningún método de hibridación o amplificación.

El ácido nucleico control puede añadirse en determinados momentos de la reacción. Normalmente los ácidos nucleicos de una muestra, por ejemplo muestra de sangre, suero, esputo o tejido se purifican al menos parcialmente mediante un método de preparación de muestras conocido en la materia. El método particular utilizado no es una parte crítica de la presente invención. El ácido nucleico control puede añadirse previamente a la preparación de la muestra permitiendo que el ácido nucleico control se coprocese con el ácido nucleico diana contenido en la muestra. Esto permite monitorizar el paso de preparación de la muestra además de los siguientes pasos de amplificación y/o hibridación de la sonda.

Como alternativa, el ácido nucleico control también puede añadirse a la mezcla de reacción de amplificación tras la preparación de la muestra para permitir la monitorización de la coamplificación del ácido nucleico diana y del ácido nucleico control, pero también puede añadirse tras la amplificación en el paso de hibridación de la sonda, para monitorizar el paso de hibridación.

Preferiblemente, para la amplificación del ácido nucleico control se utilizan cebadores que son esencialmente idénticos o esencialmente complementarios en paralelo a los cebadores utilizados para la amplificación del ácido nucleico diana. Como tales cebadores específicos del control tienen esencialmente la misma temperatura de fusión que los respectivos cebadores específicos de la diana, es más fácil encontrar el perfil de ciclos de temperatura apropiado para la amplificación del ácido nucleico diana y del ácido nucleico control comparado con otras reacciones de amplificación multiplex. Esto mismo aplica si se utilizan sondas para la determinación de ácidos nucleicos control o ácidos nucleicos control amplificados, ya que las sondas son esencialmente complementarias en paralelo comparadas con las sondas utilizadas para la determinación del ácido nucleico diana o del ácido nucleico diana amplificado.

Cuando se amplifican ácidos nucleicos diana y ácidos nucleicos control utilizando la PCR, normalmente la mezcla de reacción además del ácido nucleico diana contiene el ácido nucleico control, cebadores específicos y opcionalmente sondas para la detección homogénea, y otros componentes de reacción como los tampones apropiados (por ejemplo tricina), cationes divalentes como  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ , una polimerasa, preferiblemente una polimerasa termoestable, y los cuatro desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). La reacción de amplificación puede realizarse con un termociclador conocido en la materia, por ejemplo un PE 9600 (o ABI Prism 7700) (Perkin Elmer Corp.) utilizando un perfil de ciclos de temperatura que permite la desnaturalización del ácido nucleico de doble cadena, hibridación específica de secuencia de los cebadores a la diana y control, y la elongación de los cebadores por la polimerasa. Este ciclo de temperatura puede repetirse tantas veces como sea necesario para permitir la síntesis de una cantidad suficiente de ácido nucleico amplificado para la determinación. Normalmente se realizan de 30 a 40 ciclos.

En el caso de que los ácidos nucleicos amplificados se determinen mediante la hibridación de una sonda tras la amplificación, los ácidos nucleicos amplificados se desnaturalizan por ejemplo mediante calor o álcali, se neutralizan (si es necesario), se añade(n) la(s) sonda(s) y se realiza la hibridación de la sonda con los ácidos nucleicos amplificados bajo condiciones adecuadas (temperatura y medio químico). Tales condiciones pueden ser fácilmente determinadas por un experto realizando algunos experimentos comparativos. Los complejos de hibridación específicos pueden detectarse utilizando marcajes y otros medios de detección como se describen aquí.

En el caso de un formato de determinación homogéneo, los ácidos nucleicos amplificados se detectan en la mezcla de reacción de amplificación preferiblemente durante la reacción de amplificación. Si los ácidos nucleicos amplificados se determinan utilizando sondas específicas, las sondas se añaden a la reacción de amplificación previamente al inicio de la reacción de amplificación. Además, tal formato de determinación tiene la ventaja de que normalmente el tubo no necesita abrirse tras la amplificación y los riesgos de contaminación se minimizan. La hibridación de sondas a los ácidos nucleicos amplificados durante la reacción de amplificación puede monitorizarse utilizando diferentes métodos. A menudo las sondas están marcadas con marcajes fluorescentes, que pueden detectarse durante la reacción si hay

detectores adecuados integrados en el termociclador (es decir un ABI Prism 7700, Perkin Elmer). Para permitir la detección sólo de sondas que han hibridado o que hibridan con el ácido nucleico amplificado específicamente, se han establecido varios formatos, a los que se hace referencia aquí. Utilizando el formato TaqMan la sonda hibridada es parcialmente digerida por la polimerasa cortando un primer marcaje de bloqueo del extremo 5' de la sonda, lo que permite la medida de la señal emitida por un segundo marcaje, preferiblemente fluorescente, unido a la sonda. Esta señal fluorescente se utiliza como medida de la cantidad de ácido nucleico amplificado específicamente sintetizado en la reacción. Como la sonda específica del ácido nucleico control preferiblemente tiene otro marcaje fluorescente del de la sonda específica del ácido nucleico diana, que emite luz con otra longitud de onda, las señales de ambas sondas pueden medirse de forma separada dentro del mismo tubo de reacción. Las dos señales pueden utilizarse para calcular, por ejemplo, la cantidad inicial de ácido nucleico diana presente en la muestra.

Un objeto preferible de la presente invención es un método para la cuantificación de un ácido nucleico diana que comprende los pasos de

a) amplificar una región de dicha región del ácido nucleico diana y una cantidad conocida del ácido nucleico control, cubriendo dicho ácido nucleico control esencialmente dicha región del ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicha región del ácido nucleico diana, en el que la región de dicho ácido nucleico control cubre esencialmente dicha región del ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicha región del ácido nucleico diana contiene al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos que es esencialmente complementaria en paralelo de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana, que no puede unirse a la secuencia diana;

b) detectar una señal indicativa de la cantidad de producto de amplificación obtenido a partir de dicho ácido nucleico control y detectar una señal indicativa de la cantidad de producto de amplificación obtenido a partir de dicho ácido nucleico diana

c) calcular la cantidad de dicho ácido nucleico diana utilizando la cantidad conocida de dicho ácido nucleico control, la señal indicativa de la cantidad de producto de amplificación obtenido a partir de dicho ácido nucleico control determinado en el paso b) y la señal indicativa de la cantidad de producto de amplificación obtenido a partir de dicho ácido nucleico diana determinado en el paso b), en el que los ácidos nucleicos amplificados se detectan en la mezcla de reacción de amplificación durante la reacción de amplificación que utiliza sondas específicas, en el que la hibridación de las sondas con los ácidos nucleicos amplificados durante la reacción de amplificación se monitoriza, en el que se utiliza una primera sonda para el procesado de dicho ácido nucleico control que es esencialmente complementaria en paralelo de una segunda sonda utilizada para el procesado de la región de dicho ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicho ácido nucleico diana, y al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos de dicho ácido nucleico control, que no puede unirse a la diana y es complementaria en paralelo en más del 80% de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana, en el que la región del ácido nucleico control consiste en una o más partes, y en el que la secuencia de cada parte es idéntica en más del 80% o complementaria en paralelo en más del 80% de la respectiva parte de la región del ácido nucleico diana a determinar o de la cadena complementaria.

Otro objeto de la presente invención es un ácido nucleico control en una reacción para la amplificación de una región de ácido nucleico diana, cubriendo dicho ácido nucleico control esencialmente la región de dicho ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicha región del ácido nucleico diana, en el que la región de dicho ácido nucleico control que cubre esencialmente la región de dicho ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicho ácido nucleico diana contiene al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos y es esencialmente complementaria en paralelo de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana que no puede unirse a la secuencia diana.

Otro objeto de la presente invención es una composición que comprende un ácido nucleico diana, un ácido nucleico control, una primera sonda para el procesado de dicho ácido nucleico control, una segunda sonda para el procesado de dicho ácido nucleico diana, cebadores para la amplificación de dicho ácido nucleico diana, y cebadores para la amplificación de dicho ácido nucleico control, cuya composición está presente en una mezcla de reacción de hibridación o amplificación para detectar la región del ácido nucleico diana y en la que dicho ácido nucleico control cubre esencialmente la región de dicho ácido nucleico diana a determinar o la complementaria de dicha región del ácido nucleico diana que se caracteriza porque la región de dicho ácido nucleico control que cubre esencialmente la región de dicho ácido nucleico diana a determinar o la complementaria de dicho ácido nucleico diana contiene al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos y es esencialmente complementaria en paralelo de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana, en la que la secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos no puede unirse a la diana.

Otro objeto de la presente invención es un equipo para la amplificación de un ácido nucleico diana que comprende un manual de instrucciones y al menos un contenedor que contiene al menos un ácido nucleico control, sondas específicas de la diana y del control, cebadores específicos de la diana y del control, tampones de reacción, nucleósidos trifosfato, y una polimerasa, en el que dicho ácido nucleico control cubre esencialmente la región de dicho ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de la región de dicho ácido nucleico diana, que se caracteriza porque

una primera sonda para el procesado de dicho ácido nucleico control es esencialmente complementaria en paralelo de una segunda sonda para el procesado de la región de dicho ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicho ácido nucleico diana, al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos de dicho ácido nucleico control no puede unirse a la diana y es complementaria en paralelo en más del 80% de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana, en el que la región del ácido nucleico control consiste en una o más partes, y en el que la secuencia de cada parte es idéntica en más del 80% o complementaria en paralelo en más del 80% de la respectiva parte de la región del ácido nucleico diana a determinar o de la cadena complementaria. Los equipos más preferibles contienen además del manual y el ácido nucleico control, otros componentes de la reacción como sondas específicas de la diana o del control, cebadores específicos de la diana o del control, tampones de reacción, nucleósidos trifosfato o enzimas como una polimerasa. Estos componentes pueden empaquetarse en el primer contenedor de tal equipo, pero también pueden estar contenidos en uno o más contenedores adicionales. También es preferible un equipo útil para la detección de un ácido nucleico diana utilizando métodos de hibridación, que contiene un manual de instrucciones y al menos un ácido nucleico control de acuerdo con la presente invención.

Otro objeto de la presente invención es la utilización de un ácido nucleico control como control en una reacción de amplificación de una región del ácido nucleico diana o en una reacción de hibridación para la determinación de una región de un ácido nucleico diana, en la que dicho ácido nucleico control cubre esencialmente la región de dicho ácido nucleico diana a amplificar o hibridar, o la complementaria de la región de dicho ácido nucleico diana, que se caracteriza porque los ácidos nucleicos amplificados se detectan en la mezcla de reacción de amplificación durante la reacción de amplificación utilizando sondas específicas y en la que la hibridación de las sondas a los ácidos nucleicos amplificados durante la reacción de amplificación se monitoriza, en la que la primera sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico control es esencialmente complementaria en paralelo de una segunda sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico diana a amplificar o hibridar, o la complementaria de dicho ácido nucleico diana, al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos de dicho ácido nucleico control no puede unirse a la diana y es complementaria en paralelo en más del 80% de la sonda para el procesado de dicho ácido nucleico diana o de la sonda para el procesado de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana.

La presente invención se ejemplifica mediante los siguientes ejemplos:

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

*Diseño de una secuencia de sonda, que es complementaria en paralelo de la secuencia de la sonda del HCV diana*

Para la detección del ácido nucleico de HCV en el ensayo Taqman puede utilizarse la siguiente sonda, que se une al amplicón HCV (Id. de Sec. N° 10):

ST650 (Id. de Sec. N° 3):

5'(Cy5-)CGG TGT ACT CAC CG(FAMs) TTC CGC AGA CCA CTA TGG C-PO4-3'

Cy5: Derivatización de oligonucleótidos con pentametin-di-indocarbocianina utilizando un enlazante alquilfosfatidilo (Pharmacia Biotech Cy5-N-etil-fosforamidita), Fams: Derivatización de oligonucleótidos con 6-carboxi-fluoresceína utilizando un enlazante 2-(amino-ciclohexil-)propan-1,3-diol (Biogenex CX-FAM-fosforamidita).

Todas las secuencias específicas de HCV incluidas en esta solicitud se derivan de la secuencia del genoma del HCV tipo I (NCBI, N° entrada de Genbank AF054249 o AJ000009).

En el mejor de los casos la sonda para la detección del control interno mimetiza la sonda de la diana exactamente, pero es distinguible de la sonda de la diana. La secuencia complementaria en paralelo de la sonda de la diana, denominada ST650pc (Id. de Sec. N° 5), puede utilizarse como sonda del control interno. ST650pc tienen el mismo contenido GC, secuencia GC/AT, longitud, estructura secundaria y por lo tanto la misma temperatura de fusión que la sonda de la diana. Además, como G y A se sustituyen por C y T, respectivamente, y viceversa, es distinguible de la sonda de la diana. La ST2535 (Id. de Sec. N° 4) contiene una secuencia que no está relacionada con la secuencia de HCV, por ejemplo no es esencialmente idéntica o esencialmente complementaria en paralelo de la secuencia de HCV. Un control interno que contiene una secuencia de unión para ST2535 puede utilizarse junto con la sonda ST2535 para controlar la reacción de determinación del ácido nucleico diana. Las sondas y controles que contienen una secuencia no relacionada con la secuencia del ácido nucleico diana a menudo se han utilizado previamente en la materia. Al contrario que éstas, ST650pc (Id. de Sec. N° 5) tiene el potencial de mimetizar la sonda de la diana perfectamente.

La sonda ST650pc (Id. de Sec. N° 5) puede utilizarse con todas las construcciones de control interno o estándar de cuantificación que contienen una secuencia de unión de ST650pc.

## ES 2 305 144 T3

ST2535 (Id. de Sec. N° 4):

5' (Cy5-)TGG ACT CAG TCC T(HEX<sub>s</sub>)T GGT CAT CTC ACC TTC T-P04 3'

5

HEXs: Derivatización de oligonucleótidos con hexacloro-6-carboxi-fluoresceína utilizando un enlazante 2-(amino-ciclohexil)propan-1,3-diol (Biogenex CX-HEX-fosforamidita)

10 ST650pc (Id. de Sec. N° 5):

5' (Cy5-)GCC ACA TGA GTG GC(HEX<sub>s</sub>) AAG GCG TCT GGT GAT ACC G-PO4 3'

15 La predicción de estructuras secundarias se realizó utilizando el software Mfold versión 3.0 (copyright 1996 Dr. M. Zuker, M. Zuker, D.H. Mathews & D.H. Turner, Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide, en RNA Biochemistry and Biotechnology, J. Barciszewski & B.F.C. Clark, Ed., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, (1999)). Como se puede observar en la Fig. 2 la predicción de estructuras secundarias es idéntica entre la sonda de la diana y la sonda complementaria en paralelo.

20

### Ejemplo 2

25 *Diseño de secuencias de cebador que son complementarias en paralelo de las secuencias de cebador de la diana HCV, y comparación de las estructuras secundarias probablemente formadas por los cebadores de la diana y los cebadores complementarios en paralelo*

Para la amplificación del ácido nucleico de HCV se utilizan los siguientes cebadores:

30

ST280 (Id. de Sec. N° 6):

5' GCA GAA AGC GTC TAG CCA TGG CGT TA 3'

35

ST778 (Id. de Sec. N° 7):

5' GCA AGC ACC CTA TCA GGC AGT ACC ACA A 3'

40

Las secuencias complementarias en paralelo de estos cebadores de amplificación son

45 ST280 pc (Id. de Sec. N° 8):

5' CGT CTT TCG CAG ATC GGT ACC TCA AT 3'

50 ST778 pc (Id. de Sec. N° 9):

5' CGT TCG TGG GAT AGT CCG TCA TGG TGT T 3'

55 Estos cebadores internos diseñados se utilizan para la amplificación del control interno. La amplificación del control interno es no competitiva, ya que la diana y el control interno utilizan diferentes cebadores para la amplificación. Sin embargo, los cebadores complementarios en paralelo diseñados son estructuralmente muy similares a los cebadores de la diana, respecto a contenido GC, secuencia GC/AT, longitud, estructura secundaria y por lo tanto temperatura de fusión. ST280pc y ST778pc pueden utilizarse como cebadores de amplificación para todas las construcciones de control interno y estándares de cuantificación que son no competitivas y contienen puntos de unión del cebador apropiados.

60

Las predicciones de estructuras secundarias, realizadas con Mfold versión 3.0, son idénticas entre los cebadores de la diana y los cebadores complementarios en paralelo (véase Fig. 3).

65

## ES 2 305 144 T3

### Ejemplo 3

*Construcción de un control interno para el análisis no competitivo cualitativo y cuantitativo de ácidos nucleicos de HCV, que es complementario en paralelo de la secuencia de HCV*

5 Un fragmento de DNA de doble cadena se clonó, utilizando oligonucleótidos solapados con una longitud de 60-120 b, que es complementario en paralelo de un fragmento de 5' del genoma del HCV tipo I y que incluye la región altamente conservada 5'-UTR. El fragmento que se sintetizó y clonó es de 943 pb de longitud y se clonó en el punto Bgl II/ Hind III de un vector de expresión de aRNA (AMBION, Austin, USA). Los resultados de expresión en una  
10 partícula de RNA blindado que contiene un RNA que incluye el gen de la proteína de cubierta MS-2, la señal de empaquetamiento de MS-2 y la secuencia complementaria en paralelo del fragmento de 5' del HCV. Este RNA es distinguible de la diana, pero la complementariedad en paralelo, contenido GC y secuencia de nucleótidos G o C y A o T son idénticos a los del correspondiente fragmento del HCV, lo que influye principalmente en la estructura secundaria. Esta construcción se coamplifica y detecta en la misma reacción junto con la diana de HCV (Id. de Sec. N°  
15 10) de forma no competitiva utilizando los cebadores y la sonda mencionados en el ejemplo 2 y 1, respectivamente.

Secuencia del fragmento clonado Bgl II/ Hind III de QS(pc)HCV (Id. de Sec. N° 11):

20 Nueva sec.: 943 pb;

Composición 203 A; 287 C; 282 G; 171 T; 0 Otros

25 Porcentaje: 22% A; 30% C; 30% G; 18% T; 0% Otros

Peso molecular (kDa): ssDNA: 291,24; dsDNA: 581,5

Origen

30 ***BglIII***

**1 AGATCTCCGC TGTGAGGTGG TATCTAGTGA GGGGACACTC CTTGATGACA GAAGTGCGTC**  
**61 TTTOGCAGAT CGGTACCGCA ATCATACTCA CAGCACGTCG GAGGTCCTGG GGGGGAGGGC**  
**121 CCTCTCGGTA TCAACCAGAOG CCTTGGCCAC TCATGTGGCC TFAACGGTCC TGCTGGOCCA**  
**181 GGAAAGAACC TAGTTGGGCG AGTTACGGAC CTCTAAACCC GCACGGGGGC GCTCTGACGA**  
**40 241 TCGGCTCATC ACAACCCAGC GCTTCCGGA ACACCATGAC GGA CTATCCC ACGAACGCTC**  
**301 ACGGGGCCCT CCAGAGCATC TGGCACGTGG TACTCGTGCT TAGGATTTGG AGTTTCTTTT**  
**45 361 TGGTTTGCAT TGTGGTTGGC GGCAGGTGTC CTGCAGTTCA AGGGCCCGCC ACCAGTCTAG**  
**421 CAACCACCTC AAATGGACAA CGGCGCGTCC CCGGGGTCCA ACCCACACGC GOGCGAGTCC**  
**481 TTCTGAAGGC TCGCCAGCGT TGGAGCACCT TCCGCTGTTG GATAGGGGTT CCGAGCGGCT**  
**50 541 GGGCTCCCGT CCCGGACCCG AGTCGGGCC ATGGGAACCG GGGAGATACC GTTACTCCCG**  
**601 TACCCACCCC GTCCTACCGA GGACAGTGGG GCACCAAGAG CCGGATCAAC CCCGGGGAGT**  
**55 661 CTGGGGGCCG CATCCAGCGC ATTAACCCA TTCCAGTAGC TATGGGAATG TACGCCGAAG**  
**721 CGGCTGGAGT ACCCCATGTA AGGCGAGCAG CCGCGGGGAG ATCCCCCGCG GCGGTCCCGG**  
**781 GACCGCGTAC CGCAGGCCCA AGACCTCCTG CCGCACTTGA TACGTTGTCC CTTAAACGGG**  
**60 841 CCAACGAGAA AGAGATAGAA GGAGAACCCA AACGACAGAA CAAACTGGTA GGGTCCGAAGG**  
**901 CGAATACTTC ACGCGTAAAC ATGAGGATTA CCCATGTAAG CTT**

65 ***HindIII***

Impreso en negrita: amplicón (Id. de Sec. N° 12) al utilizar los cebadores ST280pc y ST778pc para la amplificación.

## ES 2 305 144 T3

### Ejemplo 4

5 *Comparación de las estructuras secundarias probablemente formadas por el amplicón de la diana HCV de cadena sencilla frente al amplicón del control interno de cadena sencilla y frente al amplicón de control interno QSHCV desordenado (Id. de Sec. N° 13)*

10 El ácido nucleico control desordenado (Id. de Sec. N° 13) tiene un punto de unión de los cebadores ST280 y ST778, un punto de unión de la sonda ST2535 y es de la misma longitud y contenido GC que el amplicón de la diana HCV. El plegamiento se realizó con Mfold versión 3.0, véase la Fig. 4.

15 Los amplicones de HCV y la complementaria en paralelo QS(pc)HCV tienen el potencial de formar estructuras secundarias similares. Esta es diferente de la estructura que forma el amplicón del control interno desordenado (QSHCV) (Id. de Sec. N° 13) que es conocida en la materia. Como el amplicón QS(pc)HCV (Id. de Sec. N° 12) mimetiza de forma muy exacta el amplicón de la diana HCV, QS(pc)HCV (Id. de Sec. N° 11) es la mejor elección como control de la amplificación de la diana.

### Ejemplo 5

20 *Clonaje de un control interno para el análisis competitivo, cualitativo y cuantitativo de ácidos nucleicos del HCV con puntos de unión de cebador nativos (ICSJ620HCV)*

25 De acuerdo con el ejemplo 3 se clonó un fragmento de DNA sintético de 375 pb, es decir, aparte del punto de unión del cebador, complementario en paralelo al 5'UTR del HCV tipo I. Los puntos de unión del cebador son idénticos a los de la secuencia de la diana para dar lugar a una PCR competitiva entre diana y control. La secuencia entre ambos cebadores es complementaria en paralelo para mimetizar la diana. Como el contenido en GC, longitud y secuencia de G/C y A/T entre los cebadores es idéntica a la de la diana, esta construcción es muy parecida al amplicón de la diana. Esta construcción puede coamplificarse y detectarse en la misma reacción junto con la diana HCV de forma competitiva utilizando los cebadores de amplificación de la diana y la sonda complementaria en paralelo mencionada en el ejemplo 1.

30 ICSJ620HCV (Id. de Sec. N° 14)

35 Nueva sec.: 375 pb;

Composición 76 A; 104 C; 117 G; 78 T; 0 Otros

40 Porcentaje: 20% A; 28% C; 31% G; 21% T; 0% Otros

Peso molecular (kDa): ssDNA: 116,05; dsDNA: 231,2

45 Origen

***Bgl***III

1 **AGATCTCGGT CGGGGGACTA CCCCCGCTGT GAGGTGGTAC TTAGTGAGGG GACACTCCTT**  
50 **61 GATGACAGAA GTGGCAGAAA GCGTCTAGCC ATGGCGTTAC AACTCAGAG CACGTCGGAG**  
**121 GTCCTGGGGG GGAGGGCCCT CTCGGTATCA CCAGACGCCT TGGCCACTCA TGTGGCCTTA**  
**181 ACGGTCCTGC TGGCCCAGGA AAGAACCTAG TTTGGGCGAG TTACGGACCT CTAACCCCGC**  
55 **241 ACGGGGGCGC TCTGACGATC GGCTCATCAC AACCCAGGCGC TTTCCGGTTG TGGTACTGCC**  
**301 TGATAGGGTG CTTGCCTCGA GGGGCCCTCC AGAGCATCTG GCACGTGGAA ACATGAGGAT**  
**361 TACCCATGTA AGCTT**

60 ***Hind***III

Impreso en negrita: amplicón (Id. de Sec. N° 15) al utilizar los cebadores ST280 y ST778 para la amplificación.

65

## ES 2 305 144 T3

### Ejemplo 6

#### *Comparación de las curvas de hibridación derivadas de HCV1b salvaje, QSHCV y QS(pc)HCV*

5 Se amplificaron fragmentos relacionados de HCV-1b salvaje, QSHCV y QS(pc)HCV y a continuación los productos de amplificación se compararon en experimentos de hibridación utilizando SybrGreen como agente intercalante para profundizar en la cinética de plegamiento del amplicón

10 1000 UI RNA de HCV-1b, QSHCV o QS(pc)HCV en concentraciones comparables (UI: Unidad Internacional, Estándar de la WHO)  
5% DMSO  
5,64% Glicerol  
15 50 mM Tricina (pH = 8,3)  
100 mM KOAc (pH = 7,5)  
20 300  $\mu$ M dNTP (A, C, G)  
50  $\mu$ M dTTP  
500  $\mu$ M dUTP  
25 20 pmol NTQ21-46-A (Aptamero, Secuencia: CGA TCA TCT CAG AAC ATT CTT AGC GTT TTG TTC TTG TGT ATG ATC G-PO<sub>4</sub>)  
40 U ZO5 Polimerasa  
30 10 U UNG (Uracil-N-Glucosilasa)  
3 mM Mn(Ac)<sub>2</sub>  
12  $\mu$ l Sybr-Green (dilución 1:300, de Molecular Probes, Leiden Netherlands; concentrado 10000x en DM-SO)  
35 hasta 100  $\mu$ l Cebadores en agua tratada con DEPC

40 Cebadores en la amplificación de HCV-1b y QSHCV

15 pmol ST280

40 pmol ST778

45

Cebadores en la amplificación de QS(pc)HCV

15 pmol ST280pc

50

40 pmol ST778pc

La polimerasa ZO5 se describe en la patente estadounidense N° 5.455.170 y la patente estadounidense N° 5.674.738.

55

Ciclos de amplificación:

(50°C 240 s

60

59°C 1800 s) 1x

(95°C 15 s

58°C 25 s) 5x

65

(91°C 15 s

58°C 25 s) 55x

## ES 2 305 144 T3

Curva de hibridación:

pasos de 0,5°C iniciándose en 90°C y enfriando hasta 70°C

5 20 s cada paso

La amplificación y las curvas de hibridación (detectadas por el Sybr-Green intercalado) se realizaron en un ABI Prism 7700 (Perkin Elmer Corp.)

10

*Comparación de las curvas de hibridación (véase la Fig. 5)*

15

En el ensayo la referencia es la curva de hibridación del amplicón HCV-1b. La construcción del control interno que se utiliza en la materia QSHCV muestra una curva de hibridación con una temperatura de fusión superior, mientras la curva de hibridación de la secuencia control complementaria en paralelo QS(pc)HCV encaja con la curva de hibridación del amplicón HCV-1b casi perfectamente.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para la amplificación de una región del ácido nucleico diana en una muestra, que comprende el paso de amplificar una cantidad conocida de ácido nucleico control y dicho ácido nucleico diana, y dicho ácido nucleico control cubre esencialmente dicha región de dicho ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicha región del ácido nucleico diana,

que se **caracteriza** porque

- los ácidos nucleicos amplificados se detectan en la mezcla de reacción de amplificación durante la reacción de amplificación utilizando sondas específicas,

- la hibridación de las sondas con los ácidos nucleicos amplificados durante la reacción de amplificación se monitoriza,

- una primera sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico control es esencialmente complementaria en paralelo de una segunda sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicho ácido nucleico diana,

- al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos de dicho ácido nucleico control no puede unirse a la diana y es complementaria en paralelo en más del 80% de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana,

- la región del ácido nucleico control consiste en una o más partes, y

- la secuencia de cada parte es idéntica en más del 80% o complementaria en paralelo en más del 80% de la respectiva parte de la región del ácido nucleico diana a determinar o de la cadena complementaria.

2. Un método para la cuantificación de una región del ácido nucleico diana que comprende los pasos de:

a) amplificar dicha región del ácido nucleico diana y una cantidad conocida de ácido nucleico control, cubriendo dicho ácido nucleico control esencialmente dicha región del ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicha región del ácido nucleico diana

b) detectar una señal indicativa de la cantidad de producto de amplificación obtenido a partir de dicho ácido nucleico control y detectar una señal indicativa de la cantidad de producto de amplificación obtenido a partir de dicho ácido nucleico diana

c) calcular la cantidad de dicho ácido nucleico diana utilizando la cantidad conocida de dicho ácido nucleico control, la señal indicativa de la cantidad de producto de amplificación obtenido a partir de dicho ácido nucleico control detectado en el paso b) y la señal indicativa de la cantidad de producto de amplificación obtenido a partir de dicho ácido nucleico diana detectado en el paso b)

que se **caracteriza** porque

- los ácidos nucleicos amplificados se detectan en la mezcla de reacción de amplificación durante la reacción de amplificación utilizando sondas específicas,

- la hibridación de las sondas con los ácidos nucleicos amplificados durante la reacción de amplificación se monitoriza,

- una primera sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico control es esencialmente complementaria en paralelo de una segunda sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicho ácido nucleico diana,

- al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos de dicho ácido nucleico control no puede unirse a la diana y es complementaria en paralelo en más del 80% de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana,

- la región del ácido nucleico control consiste en una o más partes, y

- la secuencia de cada parte es idéntica en más del 80% o complementaria en paralelo en más del 80% de la respectiva parte de la región del ácido nucleico diana a determinar o de la cadena complementaria.

## ES 2 305 144 T3

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho ácido nucleico diana y dicho ácido nucleico control se amplifican utilizando la PCR.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho ácido nucleico diana y dicho ácido nucleico control se amplifican en el mismo recipiente de reacción.

5. Un equipo para la amplificación de un ácido nucleico diana que comprende un manual de instrucciones, cebadores para la amplificación de dicho ácido nucleico diana, al menos un contenedor que contiene al menos un ácido nucleico control, sondas específicas de la diana y del control, cebadores específicos de la diana y del control, tampones de reacción, nucleósidos trifosfato, y una polimerasa, en el que dicho ácido nucleico control cubre esencialmente dicha región del ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicha región del ácido nucleico diana,

que se **caracteriza** porque

15 - una primera sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico control es esencialmente complementaria en paralelo de una segunda sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicho ácido nucleico diana,

20 - al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos de dicho ácido nucleico control no puede unirse a la diana y es complementaria en paralelo en más del 80% de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana,

- la región del ácido nucleico control consiste en una o más partes, y

25 - la secuencia de cada parte es idéntica en más del 80% o complementaria en paralelo en más del 80% de la respectiva parte de la región del ácido nucleico diana a determinar o de la cadena complementaria.

6. El equipo de la reivindicación 5, en el que la secuencia de al menos un punto de unión de cebador de dicho ácido nucleico control es complementaria en paralelo de un punto de unión de cebador de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana.

7. Una composición que comprende un ácido nucleico diana, un ácido nucleico control, una primera sonda, una segunda sonda, cebadores para la amplificación de dicho ácido nucleico diana, y cebadores para la amplificación de dicho ácido nucleico control, en el que dicho ácido nucleico control cubre esencialmente dicha región del ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicha región del ácido nucleico diana,

que se **caracteriza** porque

40 - la primera sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico control es esencialmente complementaria en paralelo de la segunda sonda utilizada para el procesado de dicha región del ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicho ácido nucleico diana,

45 - al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos de dicho ácido nucleico control no puede unirse a la diana y es complementaria en paralelo en más del 80% de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana,

- la región del ácido nucleico control consiste en una o más partes, y

50 - la secuencia de cada parte es idéntica en más del 80% o complementaria en paralelo en más del 80% de la respectiva parte de la región del ácido nucleico diana a determinar o de la cadena complementaria.

8. Una composición como la de la reivindicación 7, en la que la secuencia de al menos un punto de unión de sonda de dicho ácido nucleico control es complementaria en paralelo del punto de unión de sonda de dicho ácido nucleico diana o la cadena complementaria del punto de unión de sonda de dicho ácido nucleico diana.

9. La utilización de un ácido nucleico como control en una reacción de amplificación del ácido nucleico diana en la que dicho ácido nucleico control cubre esencialmente la región de dicho ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicha región del ácido nucleico diana

que se **caracteriza** porque

65 - los ácidos nucleicos amplificados se detectan en la mezcla de reacción de amplificación durante la reacción de amplificación utilizando sondas específicas,

- la hibridación de las sondas con los ácidos nucleicos amplificados durante la reacción de amplificación se monitoriza,

## ES 2 305 144 T3

- una primera sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico control es esencialmente complementaria en paralelo de una segunda sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico diana a amplificar o la complementaria de dicho ácido nucleico diana,

5 - al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos de dicho ácido nucleico control no puede unirse a la diana y es complementaria en paralelo en más del 80% de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana,

- la región del ácido nucleico control consiste en una o más partes, y

10

- la secuencia de cada parte es idéntica en más del 80% o complementaria en paralelo en más del 80% de la respectiva parte de la región del ácido nucleico diana a determinar o de la cadena complementaria.

15 10. La utilización de un ácido nucleico como control en una reacción de hibridación para la determinación de dicho ácido nucleico diana, en la que dicho ácido nucleico control cubre esencialmente la región de dicho ácido nucleico diana a determinar o la complementaria de dicha región del ácido nucleico diana

que se **caracteriza** porque

20

- los ácidos nucleicos amplificados se detectan en la mezcla de reacción de amplificación durante la reacción de amplificación utilizando sondas específicas,

25

- la hibridación de las sondas con los ácidos nucleicos amplificados durante la reacción de amplificación se monitoriza,

- una primera sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico control es esencialmente complementaria en paralelo de una segunda sonda utilizada para el procesado de dicho ácido nucleico diana a determinar o la complementaria de dicho ácido nucleico diana,

30

- al menos una secuencia contigua de al menos 8 nucleótidos de dicho ácido nucleico control no puede unirse a la diana y es complementaria en paralelo en más del 80% de dicho ácido nucleico diana o de la cadena complementaria de dicho ácido nucleico diana,

35

- la región del ácido nucleico control consiste en una o más partes, y

- la secuencia de cada parte es idéntica en más del 80% o complementaria en paralelo en más del 80% de la respectiva parte de la región del ácido nucleico diana a determinar o de la cadena complementaria.

40

45

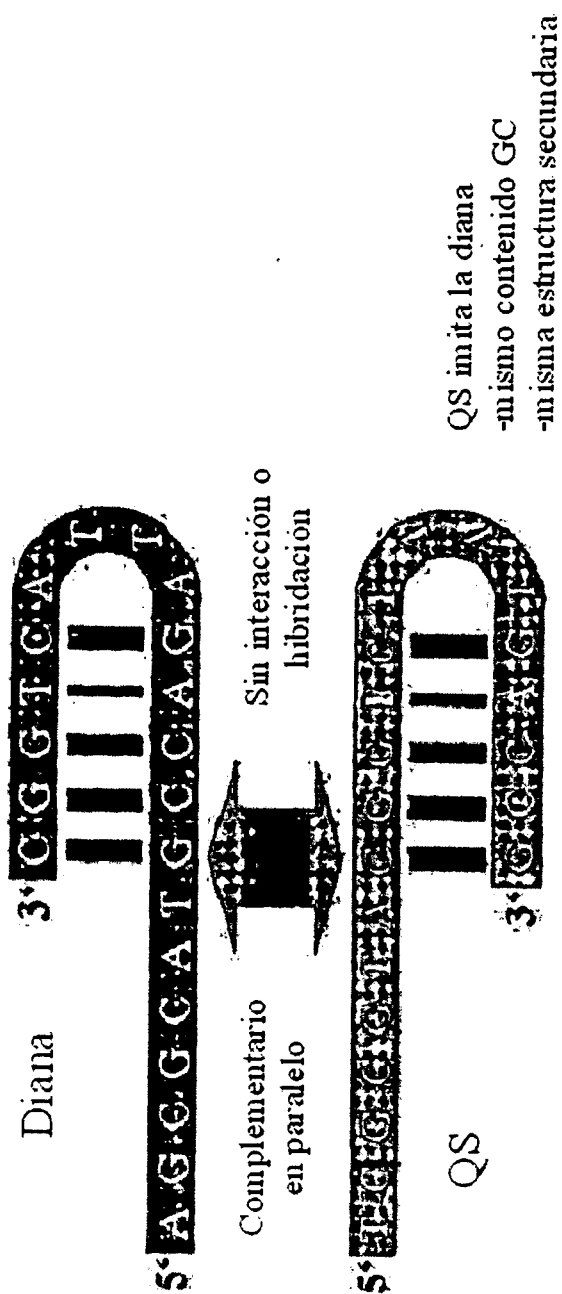
50

55

60

65

Fig. 1/5





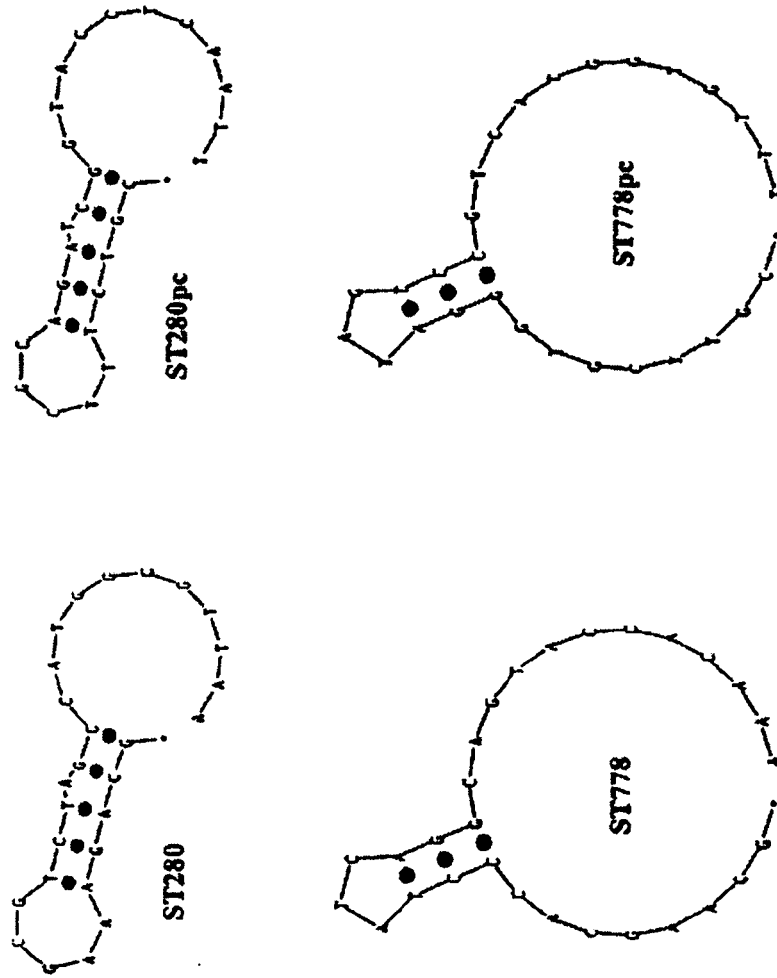


Fig. 3/5

Fig. 4/5

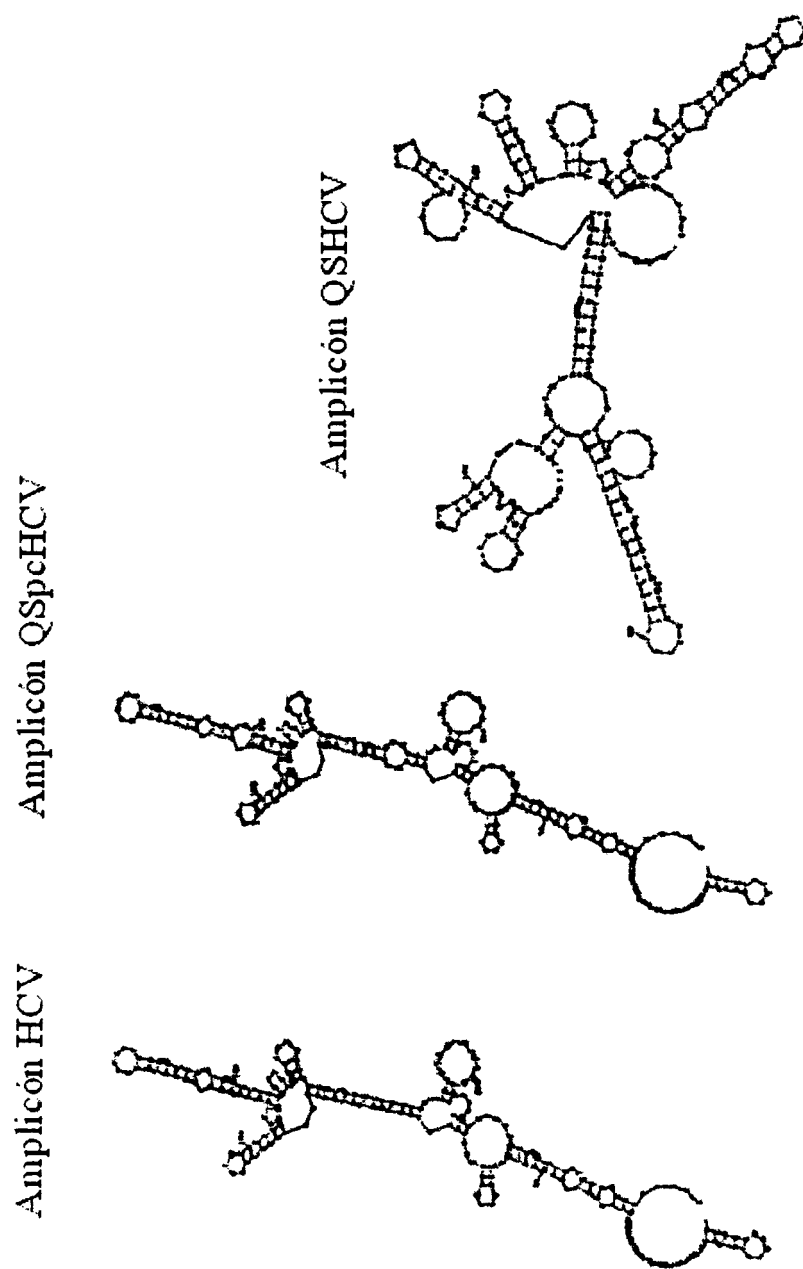
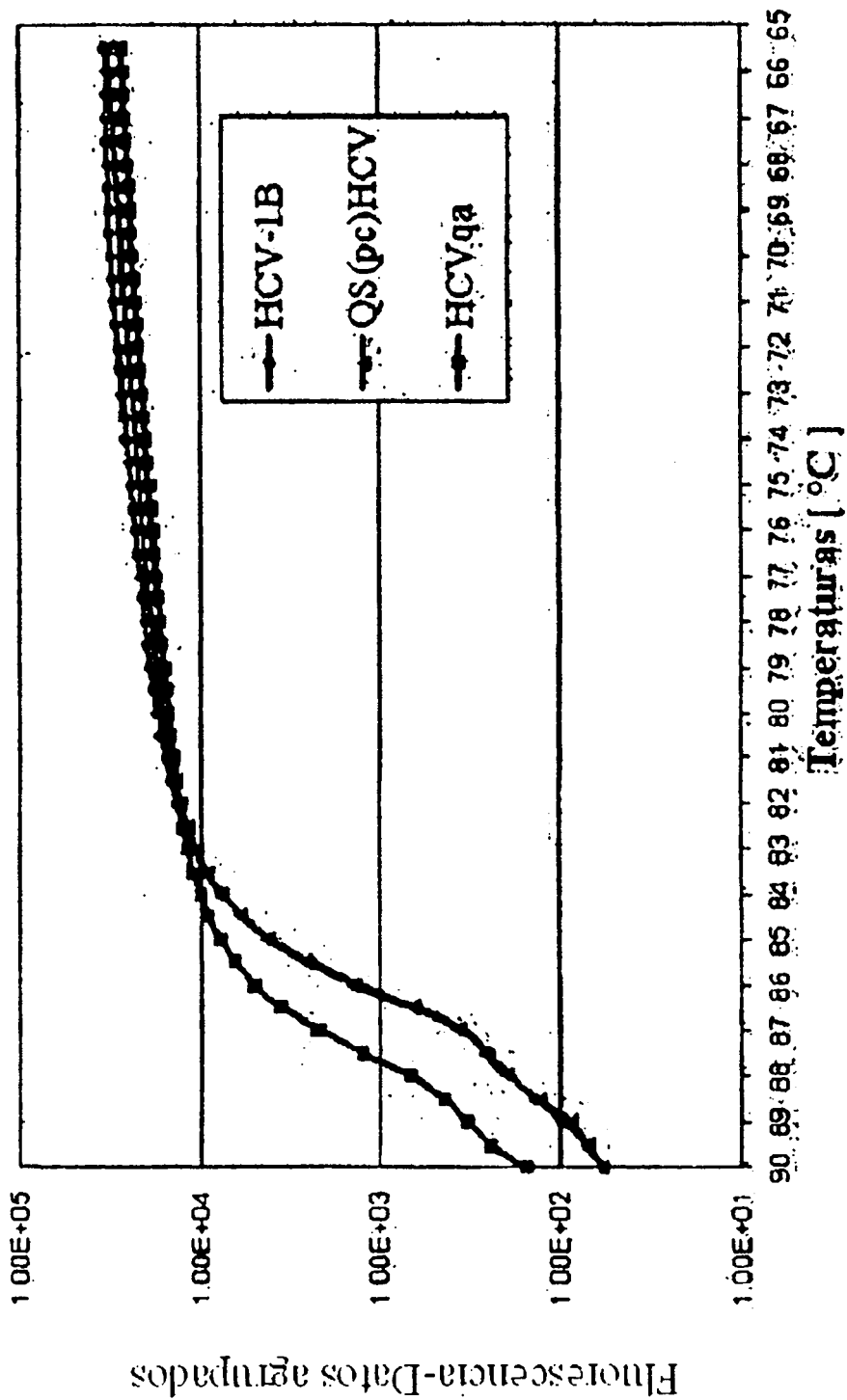


Fig. 5/5

Curvas de hibridación a partir de datos crudos



# ES 2 305 144 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

	<110> F. Hoffmann-La Roche AG	
5	<120> Un método para la determinación de un ácido nucleico utilizando un control	
	<130> 18981	
	<140>	
	<141>	
10	<160> 17	
	<170> PatentIn Ver. 2.1	
	<210> 1	
	<211> 21	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia artificial para ejemplificar un principio	
	<400> 1	
25	agcgcgatgcc agattactgg c	21
	<210> 2	
	<211> 21	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia artificial para ejemplificar un principio	
35	<400> 2	
40	tcgcgtacgg tctaagacc g	21
	<210> 3	
	<211> 34	
	<212> DNA	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de la sonda específica de HCV ST650	
50	<220>	
	<221> región N	
	<222> (15)	
	<223> n representa un enlazante básico ((2-amino-ciclohexil)propan-1,3-diol)	
55	<400> 3	
60	egggtgactc accgnttccg cagaccacta tggc	34
	<210> 4	
	<211> 31	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de la sonda ST2535	

## ES 2 305 144 T3

	<220>	
	<221> región N	
	<222> (15)	
5	<223> n representa un enlazante básico ((2-amino-ciclohexil)propan-1,3-diol)	
	<400> 4	
10	tggactcagt cctntgggtca ttcaccttc t	31
	<210> 5	
	<211> 34	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de la sonda ST650pc (complementaria en paralelo de ST650)	
	<220>	
	<221> región N	
	<222> (15)	
25	<223> n representa un enlazante básico ((2-amino-ciclohexil)propan-1,3-diol)	
	<400> 5	
30	gccacatgag tggcnaaggc gtctggtgat accg	34
	<210> 6	
	<211> 26	
35	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia del cebador específico de HCV ST280	
	<400> 6	
45	gcagaaagcg tctagccatg gcgtta	26
	<210> 7	
	<211> 28	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia del cebador específico de HCV ST778	
55	<400> 7	
	gcaagcaccc tatcaggcag taccacaa	28
60	<210> 8	
	<211> 26	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador ST280pc, complementario en paralelo de ST280	

## ES 2 305 144 T3

<400> 8

cgctttcgc agatcggtag ctcaat

26

5

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Cebador ST778pc, complementario en paralelo de ST778

15 <400> 9

cgttcgtggg atagtcgtag atggtgtt

28

20 <210> 10

<211> 241

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia de DNA derivada mediante amplificación a partir de HCV tipo 1 utilizando los cebadores ST280 y ST778

30 <400> 10

```

gcagaaagcg tctagccatg gcgttagtat gagtgtcgtg cagcctccag gacccccct 60
cccgggagag ccatagtggg ctgcggaacc ggtgagtaca ccggaattgc caggacgacc 120
gggtccttcc ttggatcaac ccgctcaatg cctggagatt tgggcgtgcc cccgcgagac 180
tgctagccga gtagtgttgg gtcgcaaaag gccttgtggt actgcctgat aggggtgctt 240
c

```

<210> 11

40 <211> 943

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: QS(pc)HCV que es complementaria en paralelo a la respectiva región del genoma del HCV tipo 1

<400> 11

50

```

agatctccgc tgtgaggtgg tatctagtga ggggacactc cttgatgaca gaagtgcgtc 60
tttcgcagat cggtaaccgca atcatactca cagcaactcg gaggtcctgg gggggagggc 120
cctctcggta tcaccagacg ccttggccac tcatgtggcc ttaacggtec tgctggccca 180
ggaaagaacc tagttgggag agttacggac ctctaaacct gcacgggggc gctctgacga 240
tcggctcacc acaaccacgc gcttccgga acaccatgac ggactatccc accgaacgctc 300
acggggccct ccagagcatc tggcacgtgg tactcgtgct taggatttgg agttttcttt 360
tggtttgcat tgtggttggc ggcaggtgct ctgcagttca agggcccggc accagttctag 420
caaccacctc aaatggacaa cggcgcgtcc ccggggcca acccacagc gcgcgagttc 480
ttctgaagge tcgccagcgt tggagcactc tccgctggtg gataggggtt ccgagcgggt 540
gggctcccgt cccgaccccg agtcggggcc atgggaaccg gggagatacc gttactcccg 600
taccccaccc gtcctaccga ggacagtggg gcaccaagag ccggatcaac cccggggagt 660
ctggggggccg catccagcgc attaaaccca ttccagtagc tatgggaatg tacgccgaag 720
cggtctggag accccatgta aggcgagcag ccgcggggag atcccccgcg gcggteccgg 780
gaccgcgtac cgcaggccca agacctctg ccgcacttga tacgttgtcc cttaaaccggg 840
ccaacgagaa agagatagaa ggagaaccca aacgacagaa caaactggta gggtcgaagg 900
cgaatacttc acgcgtaaac atgaggatta cccatgtaag ctt

```

65

943

## ES 2 305 144 T3

<210> 12  
 <211> 241  
 <212> DNA  
 5 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: amplicón derivado de QS(pc)HCV utilizando los cebadores ST280pc y ST778pc  
 10  
 <400> 12

```

cgtctttcgc agatcgggtac cgcaatcata ctcacagcac gtcggaggtc ctggggggga 60
gggccctctc ggtatcacca gacgccttgg ccactcatgt ggccttaacg gtcctgctgg 120
cccaggaaaag aacctagttg ggcgagttac ggacctctaa acccgcacgg gggcgctctg 180
acgatcggct catcacaacc cagcgctttc cggaacacca tgacggacta tcccacgaac 240
g 241
  
```

<210> 13  
 <211> 241  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Descripción de la Artificial Secuencia: secuencia del amplicón derivado de QSHCV (control amplificación de HCV con puntos de unión de ST280, ST778 y ST2535) utilizando los cebadores ST280 y ST778  
 30  
 <400> 13

```

gcagaaagcg tctagccatg gcgtagtat agtggcgtga gagcagcct tgcctcggcc 60
accgcgcgtc tagaagggtga gatgaccaga ggactgagtc caatgcatgc tggctccgag 120
atgctccgca aacttgccgt caacgtgact gcgtacggcg ggcgtgcccg cctggctctg 180
tatgagctgg tgaccgtgat ctggctggag gccttgtggg actgcctgat aggggtgctt 240
c 241
  
```

<210> 14  
 40 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: ICSJ620HCV (control amplificación específico de HCV con un punto de unión de ST280 y ST778 y una región interna que es complementaria en paralelo de HCV)  
 <400> 14

```

agatctcggg cgggggacta cccccgctgt gaggtggtac ttagtgaggg gacactcctt 60
gatgacagaa gtggcagaaa gcgtctagcc atggcgttac atactcacag cacgtcggag 120
gtcctggggg ggagggcct ctcggtatca ccagacgct tggccactca tgtggcctta 180
acggtcctgc tggcccagga aagaacctag tttgggcgag ttacggacct ctaaaccgcg 240
acggggggcg tctgacgatc ggctcafcac aaccagcgc tttccggttg tggtactgcc 300
tgatagggtg cttgcctcga ggggcccctc agagcatctg gcacgtggaa acatgaggat 360
taccatgta agctt 375
  
```

<210> 15  
 <211> 242  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 65 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: amplicón derivado de ICSJ620HCV (control de amplificación específico de HCV) utilizando ST280 y ST778 como cebadores

ES 2 305 144 T3

<400> 15

```
gcagaaagcg tctagccatg gcgttacata ctcacagcac gtcggaggtc ctggggggga 60
5 gggccctctc ggtatcacca gacgccttgg ccactcatgt ggccttaacg gtcctgctgg 120
cccagaaaag aacctagttt gggcgagtta cggacctcta aaccgcacg ggggcgctct 180
gacgatcggc tcatcacaac ccagcgcttt ccggttgagg tactgcctga tagggtgctt 240
gc 242
```

10 <210> 16

<211> 46

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: NTQ21-46-A

20 <400> 16

```
cgatcatctc agaacattct tagcgttttg ttcttgta tgatcg 46
```

<210> 17

25 <211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia artificial para ejemplificar un principio

<400> 17

```
35 cggtcattag accgtacg a 21
```

40

45

50

55

60

65