

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 759**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6844 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2017** **PCT/EP2017/068839**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.02.2018** **WO18024562**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2017** **E 17749655 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2024** **EP 3494227**

54 Título: **Oligonucleótido auxiliar para mejorar la eficacia de amplificación y detección/cuantificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

02.08.2016 US 201662370049 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.03.2025

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.00%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

MEHTA, ROCHAK

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 3 008 759 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

Oligonucleótido auxiliar para mejorar la eficacia de amplificación y detección/cuantificación de ácidos nucleicos

5 **Campo de la invención**

La presente divulgación se refiere al campo de diagnóstico *in vitro*. Dentro de este campo, la presente invención se refiere a procedimientos mejorados para la detección de un ácido nucleico diana que puede estar presente en una muestra (por ejemplo, muestra biológica o no biológica). En particular, la presente invención se refiere a la
 10 detección y cuantificación de un ácido nucleico diana, con la ayuda o asistencia de un oligonucleótido auxiliar no extensible que potencia la actividad de los cebadores. Al potenciar la actividad de los cebadores, el oligonucleótido auxiliar no extensible mejora la eficacia de amplificación, lo que da como resultado una producción de amplicón mayor y potenciada. La mejora, por lo tanto, permite un procedimiento de detección y cuantificación más eficaz y más sensible. La invención proporciona además mezclas de reacción y kits que contienen el oligonucleótido
 15 auxiliar no extensible, cebadores y sondas para la detección y cuantificación del ácido nucleico diana que puede estar presente en una muestra. La presente invención es útil, por ejemplo, para la detección y cuantificación de ácido nucleico vírico o bacteriano en muestras.

20 **Antecedentes de la invención**

En el campo del diagnóstico molecular, la amplificación y detección/cuantificación de ácidos nucleicos es de considerable importancia y significación. Los ejemplos para aplicaciones diagnósticas de amplificación y detección de ácido nucleico son para la detección y amplificación de ácidos nucleicos microbianos. Dichos ácidos nucleicos microbianos pueden incluir ácidos nucleicos bacterianos y/o ácidos nucleicos víricos. Las técnicas de amplificación
 25 y detección/cuantificación son adecuadas para dianas de ácido nucleico vírico, tales como papilomavirus humano (PVH) o virus del Nilo Occidental (VNO), o para el cribado de rutina de donaciones de sangre para detectar la presencia de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis B (VHB) o virus de la hepatitis C (VHC). Las técnicas de amplificación y detección/cuantificación también son adecuadas para dianas de ácido nucleico bacteriano o el análisis de marcadores oncológicos o similares.

El procedimiento más prominente y ampliamente usado para amplificación (y detección/cuantificación) de dianas de ácido nucleico es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otras técnicas de amplificación incluyen la reacción en cadena de la ligasa, reacción en cadena de la polimerasa ligasa, Gap-LCR, reacción en cadena de reparación, 3 SR, NASBA, amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación mediada por
 35 transcripción (TMA) y amplificación Q β . Los sistemas automatizados para el análisis basado en PCR a menudo hacen uso de la detección ultrarrápida de la amplificación del producto durante el procedimiento de PCR en el mismo recipiente de reacción. La clave para dichos procedimientos es el uso de oligonucleótidos modificados que llevan grupos indicadores o marcadores. La PCR utiliza una enzima polimerasa (patentes de EE. UU. n.ºs 4.683.195 y 4.683.202). Las mejoras significativas relacionadas son, por ejemplo, la detección ultrarrápida de productos amplificados durante la PCR usando oligonucleótidos modificados que portan grupos indicadores o marcadores conocidos como sondas 5'-nucleasa o de hidrolización tal como se usa en ensayos comerciales en COBAS® TaqMan® (patentes de EE. UU. n.ºs 5.210.015 y 5.487.972). Son conocidos otros procedimientos de
 40 amplificación y detección mejorados como la tecnología de balizas moleculares (publicación de patente internacional n.º WO 95/13399) o procedimientos que utilizan un oligonucleótido que comprende una porción de ligando del surco menor (MGB) (publicaciones de patente internacional n.ºs WO 03/062445 y WO 2006/135765). Es conocido además que el uso de cebadores que contienen un oligonucleótido añadido con un contenido en GC alto en el extremo 5' de al menos uno de estos cebadores presenta una mejora en la eficacia de amplificación (Liu, *et al.*, Genome Research 7:389-398 (1997); publicación de patente internacional n.º WO 01/94638; y publicación de patente de EE. UU. n.º US 2004/0110182). La cantidad final del producto amplificado después de aproximadamente 12 a 40 ciclos de PCR es notablemente mayor para cebadores a los que, por ejemplo, se ha añadido una unidad GGAC a los extremos 5' que para los cebadores no modificados. Afonina, *et al.*, BioTechniques 43(3):1-3 (2007); publicación de patente internacional n.º WO 2006/135765 describen el incremento de la señal fluorescente de PCR ultrarrápida y obtienen de este modo una eficacia de amplificación mejorada usando cebadores con solapas ricas en adenina y timina cortas, que se dispersan aleatoriamente, en las
 45 sondas de hibridación fluorescente del ligando del surco menor (MGB) y el extremo 5'. De forma similar, Babel, *et al.* (publicación de patente de EE. UU. n.º US 2014/0113279) describen cómo la adición de poliN a los cebadores puede dar como resultado la reducción o supresión de la formación de productos de alto peso molecular no deseados, evitando de este modo resultados negativos falsos o positivos falsos. El documento WO 2015/185655 divulga una amplificación isotérmica de una secuencia de ácido nucleico diana que comprende invasión de hebra usando oligonucleótidos de invasión, que tienen una estructura que comprende una región sin unión 5', pero no tienen una cola poli (A) 3' terminal y que se hibridan a una región que solo se solapa parcialmente con el sitio de hibridación de cebador extensible. El documento WO 2008/064687 divulga un procedimiento de un ensayo de amplificación específica de alelo (ASA) con fidelidad incrementada usando un cebador de PARADA, que está bloqueado en el extremo 3', pero no tiene una cola de poli (A) 3' terminal y que se hibrida a una región que solo se solapa parcialmente con el sitio de hibridación de cebador extensible. El documento WO 2009/043112 divulga un procedimiento para la amplificación selectiva de una secuencia de nucleótidos diana usando dos oligonucleótidos
 50
 55
 60
 65

modificados, un oligonucleótido facilitador no extensible que tiene una modificación de bloqueo en o cerca de su extremo 3' y un cebador iniciador que también tiene una modificación en o cerca de su extremo 3'. En el presente documento, la modificación del cebador iniciador termina la síntesis de la hebra inversa, mientras que el oligonucleótido facilitador actúa como un molde para la extensión de finalización en la hebra inversa y contiene la secuencia completa del cebador iniciador y un solapamiento de extremo 3' sustancial que se extiende más allá de la secuencia de cebador iniciador y permite la hibridación del oligonucleótido facilitador a la hebra inversa de la secuencia diana al tener una secuencia que es totalmente complementaria a la hebra inversa de la secuencia de ácido nucleico diana. Por tanto, siempre existe una necesidad en la técnica de mejoras en los procedimientos existentes. Por ejemplo, existe una necesidad en la técnica de proporcionar un procedimiento para la detección y cuantificación simple y fiable de una diana de ácido nucleico. Existe, en particular, una necesidad de mejorar la eficacia de la amplificación y detección/cuantificación de ADN.

Sumario de la invención

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

Determinados modos de realización en la presente divulgación se refieren a nuevos procedimientos y usos para la amplificación, detección y cuantificación de ácido nucleico diana en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica o no biológica). Por ejemplo, determinados modos de realización de la presente divulgación se refieren a la detección y cuantificación simple o múltiple de un microbio, tal como un virus (por ejemplo, PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH) por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ultrarrápida en un solo tubo de ensayo o recipiente de reacción. La mejora se basa en el uso de un oligonucleótido auxiliar no extensible en una reacción de amplificación, tal como PCR. Se cree que el oligonucleótido auxiliar no extensible actúa como una especie de oligonucleótido auxiliar o cebador auxiliar, ya que facilita y potencia la amplificación que está mediada por los cebadores (extensibles). Se cree además que la presencia del oligonucleótido auxiliar no extensible reduce o disminuye la energía libre de Gibbs de la estructura secundaria de la región diana del ácido nucleico diana. En algunos casos, se cree que el oligonucleótido auxiliar no extensible reduce/disminuye la energía libre de Gibbs de la estructura secundaria de la región de unión a cebador del ácido nucleico diana. En el presente documento, el oligonucleótido auxiliar no extensible se hibrida a la misma porción del ácido nucleico diana que uno o más de los cebadores. Sin embargo, durante la reacción en cadena de la polimerasa ultrarrápida, el oligonucleótido auxiliar no extensible no se extiende, a diferencia del al menos un cebador directo que se hibrida específicamente a una porción del ácido nucleico diana y el al menos un cebador inverso que se hibrida específicamente a una porción del ácido nucleico diana, que se extienden para generar al menos un amplicón bicatenario que se puede usar directamente como molde en etapas de amplificación subsiguientes de la reacción en cadena de la polimerasa ultrarrápida. Es decir, el oligonucleótido auxiliar no extensible no se extiende para generar un amplicón. En lugar de extenderse, el oligonucleótido auxiliar no extensible facilita e incrementa la accesibilidad a diana del cebador o cebadores, que sí se extienden y generan amplicones. Es decir, al igual que el cebador extensible, el oligonucleótido auxiliar no extensible se hibrida al ácido nucleico diana, pero a diferencia del cebador extensible, el oligonucleótido auxiliar no extensible no se extiende. Además, el oligonucleótido auxiliar no extensible comprende una secuencia de poli(A) en el extremo 3' del oligonucleótido de entre 4-12 nucleótidos de longitud que no se hibrida a ninguna porción del ácido nucleico diana, lo que de este modo desestabiliza la interacción entre el oligonucleótido auxiliar no extensible y el ácido nucleico diana, lo que a su vez abre la estructura secundaria y permite el desplazamiento del oligonucleótido auxiliar no extensible con el cebador (extensible). Adicionalmente, reemplazando el grupo 3'-OH con un grupo fosfato (es decir, fosforilación) también se evita la extensión. Se cree que el oligonucleótido auxiliar no extensible ayuda a la amplificación reduciendo la energía libre de Gibbs de la estructura secundaria en la región de unión a cebador del ácido nucleico diana, mejorando de este modo la accesibilidad de uno o más de los cebadores que se extienden (véanse las figuras 2 y 4). Esto da como resultado una mejora en la amplificación por PCR, de modo que se acumula más producto de PCR (es decir, amplicón) en presencia del oligonucleótido auxiliar no extensible que en ausencia del oligonucleótido auxiliar no extensible (véase la figura 1 y 3). Es decir, la eficacia global del ensayo de PCR se mejora y/o se potencia por el oligonucleótido auxiliar no extensible. Debido a que se mejora la eficacia del ensayo de PCR, es posible amplificar con éxito incluso pequeñas cantidades de material de partida (es decir, números de copias bajos), en presencia del oligonucleótido auxiliar no extensible. Por tanto, el oligonucleótido auxiliar no extensible también incrementa la sensibilidad del ensayo.

Los modos de realización incluyen procedimientos de detección y cuantificación de un ácido nucleico diana que comprenden realizar al menos una etapa de ciclado, que puede incluir una etapa de amplificación y una etapa de hibridación. Además, los modos de realización incluyen cebadores, sondas y uno o más oligonucleótidos auxiliares no extensibles, y kits que se diseñan para la detección y cuantificación de un ácido nucleico diana en un solo recipiente o tubo de reacción.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para detectar la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana en una muestra biológica de un individuo. Estos procedimientos se pueden emplear para detectar la presencia o ausencia de un ácido nucleico diana en plasma, para su uso en hemocribado y pruebas de diagnóstico. Adicionalmente, la misma prueba se puede usar por alguien con experiencia en la técnica para evaluar orina y otros tipos de muestras para detectar y/o cuantificar un ácido nucleico diana. Dichos procedimientos incluyen en general

realizar al menos una etapa de ciclado, que incluye una etapa de amplificación y una etapa de unión a tinte. Típicamente, la etapa de amplificación incluye poner en contacto la muestra con una pluralidad de pares de cebadores oligonucleotídicos y en este caso, uno o más oligonucleótidos auxiliares no extensibles, para producir uno o más productos de amplificación si una molécula de ácido nucleico está presente en la muestra, y la etapa de unión a tinte incluye poner en contacto el producto de amplificación con un tinte de unión a ADN bicatenario. Dichos procedimientos también incluyen detectar la presencia o ausencia de unión del tinte de unión a ADN bicatenario en el producto de amplificación, en los que la presencia de unión es indicativa de la presencia de un ácido nucleico diana en la muestra, y en los que la ausencia de unión es indicativa de la ausencia de ácido nucleico diana en la muestra. Un tinte de unión a ADN bicatenario representativo es bromuro de etidio. Otros tintes de unión a ácido nucleico incluyen DAPI, tintes Hoechst, PicoGreen®, RiboGreen®, OliGreen® y tintes de cianina tales como YO-YO® y SYBR® Green. Además, dichos procedimientos también pueden incluir determinar la temperatura de fusión entre el producto de amplificación y el tinte de unión a ADN bicatenario, en los que la temperatura de fusión confirma la presencia o ausencia de un ácido nucleico.

En otro modo de realización, se proporciona un kit para detectar y/o cuantificar uno o más ácidos nucleicos diana. El kit puede incluir uno o más conjuntos de cebadores específicos para la amplificación del ácido nucleico diana; uno o más oligonucleótidos auxiliares no extensibles; y una o más sondas oligonucleotídicas detectables específicas para la detección de los productos de amplificación.

En un aspecto, el kit puede incluir sondas ya marcadas con restos donantes y aceptadores correspondientes, por ejemplo, otro resto fluorescente o un extintor oscuro, o puede incluir restos fluorofóricos para marcar las sondas. El kit también puede incluir nucleósidos trifosfato, ácido nucleico polimerasa y tampones necesarios para la función de la ácido nucleico polimerasa. El kit también puede incluir un prospecto del envase e instrucciones para usar los cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles, sondas y restos fluorofóricos para detectar la presencia o ausencia de productos de amplificación/ácidos nucleicos diana en una muestra.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de la presente materia objeto, los procedimientos y materiales adecuados se describen a continuación.

Los detalles de uno o más modos de realización de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otros rasgos característicos, objetivos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de los dibujos y la descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La **figura 1** muestra curvas de crecimiento de PCR ultrarrápida de un experimento que muestra los cebadores, sondas y oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas específicos para un ácido nucleico diana (de VHC).

La **figura 2** muestra la estructura secundaria prevista de la región diana (VHC) en presencia del oligonucleótido auxiliar no extensible, mostrando una ΔG de -107,2 kcal/mol.

La **figura 3** muestra curvas de crecimiento de PCR ultrarrápida de un experimento que muestra los cebadores, sondas y oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas específicos para un ácido nucleico diana (de VHC).

La **figura 4** muestra la estructura secundaria prevista de la región diana (VHC) en presencia del oligonucleótido auxiliar no extensible, mostrando una ΔG de -98,6 kcal/mol.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos nuevos y mejorados como se define en las reivindicaciones adjuntas para amplificar, detectar y cuantificar un ácido nucleico diana que puede estar presente en una muestra (por ejemplo, una muestra biológica) que comprende al menos un par de cebadores para generar un amplicón, una sonda detectable específica para el amplicón y un oligonucleótido auxiliar no extensible. La mejora se basa, en particular, en el hecho de que la amplificación (es decir, generación del amplicón) se potencia y se incrementa en presencia de un oligonucleótido auxiliar no extensible. Es decir, el oligonucleótido auxiliar no extensible potencia y mejora la actividad y eficacia de uno o más de los cebadores que se extienden, mejorando e incrementando de este modo la eficacia de la reacción de PCR. Esto tiene el efecto de incrementar la sensibilidad del ensayo. La presente invención se puede usar para cualquier número de aplicaciones, incluyendo, pero sin limitarse a, la amplificación y detección/cuantificación de ácidos nucleicos microbianos (por ejemplo, ácido nucleico vírico o bacteriano).

Los ejemplos de virus para su uso con la presente invención incluyen PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH.

El diagnóstico de una infección microbiana (por ejemplo, vírica o bacteriana) por amplificación de ácido nucleico

proporciona un procedimiento para detectar y/o cuantificar de forma rápida, exacta, fiable, específica y sensible la infección. Un ensayo de PCR de transcriptasa inversa ultrarrápida para detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos microbianos en una muestra biológica o no biológica se describe en el presente documento. Se proporcionan cebadores y sondas para detectar y/o cuantificar ácido nucleico diana (tal como ácido nucleico microbiano, como ácido nucleico vírico o bacteriano), así como artículos de fabricación o kits que contienen dichos cebadores y sondas. El incremento en la especificidad y sensibilidad de PCR ultrarrápida para la detección de ácido nucleico diana en comparación con otros procedimientos, así como la mejora en los rasgos característicos de PCR ultrarrápida incluyendo la contención de muestra y detección y cuantificación ultrarrápida del producto amplificado, hacen factible la implementación de esta tecnología para el diagnóstico habitual de infecciones microbianas (por ejemplo, infecciones víricas o bacterianas) en el laboratorio clínico. Adicionalmente, esta tecnología se puede emplear para hemocribado así como para pronóstico. Dicho ensayo de detección también se puede multiplexar con otros ensayos para la detección de otros ácidos nucleicos diana (por ejemplo, otros ácidos nucleicos microbianos u otros/diferentes genotipos del mismo microbio), en paralelo.

La presente divulgación incluye, a modo de ejemplo, cebadores oligonucleotídicos, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas de hidrólisis marcadas con fluorescencia que se hibridan al genoma de VHC, para identificar específicamente VHC usando, por ejemplo, tecnología de detección TaqMan®.

El término "cebador(es)" o "cebador(es) extensible(s)" como se usa en el presente documento es conocido para los expertos en la técnica y se refiere a compuestos oligoméricos, principalmente a oligonucleótidos, pero también a oligonucleótidos modificados que pueden "cebar" la síntesis de ADN por una ADN polimerasa dependiente de molde, es decir, el extremo 3' del, por ejemplo, oligonucleótido proporciona un grupo 3'-OH libre donde se pueden unir otros "nucleótidos" por una ADN polimerasa dependiente de molde que establece un enlace fosfodiéster 3' a 5', con lo que se usan desoxinucleósidos trifosfato y con lo que se libera pirofosfato.

Específicamente, los procedimientos divulgados pueden incluir realizar al menos una etapa de ciclado que incluye amplificar una o más porciones de la diana génica de la molécula de ácido nucleico de una muestra usando uno o más pares de cebadores. "Cebador(es)" o "cebador(es) extensible(s)" como se usa en el presente documento se refiere a cebadores oligonucleotídicos que se hibridan específicamente a secuencias de ácido nucleico halladas en la región diana en la muestra, e inician la síntesis de ADN a partir de las mismas en condiciones apropiadas produciendo los respectivos productos de amplificación. El producto de amplificación debe contener las secuencias de ácido nucleico que son complementarias a una o más sondas detectables específicas para el ácido nucleico diana. "Sonda(s)" o "sonda(s) detectable(s)" como se usa en el presente documento se refieren a sondas oligonucleotídicas que se hibridan específicamente a secuencias de ácido nucleico halladas en la región diana en la muestra. Cada etapa de ciclado incluye una etapa de amplificación, una etapa de hibridación y una etapa de detección, en las que la muestra se pone en contacto con la una o más sondas detectables para la detección de la presencia o ausencia de ácido nucleico diana en la región diana de la muestra.

Como se usa en el presente documento, el término "amplificar" se refiere al procedimiento de sintetizar moléculas de ácido nucleico que son complementarias a una o ambas hebras de una molécula de ácido nucleico molde (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico de un microbio, tal como virus o bacteria). Amplificar una molécula de ácido nucleico típicamente incluye desnaturalizar el ácido nucleico molde, hibridar cebadores al ácido nucleico molde a una temperatura que está por debajo de las temperaturas de fusión de los cebadores y alargar enzimáticamente a partir de los cebadores para generar un producto de amplificación. La amplificación típicamente requiere la presencia de desoxirribonucleósidos trifosfato, una enzima ADN polimerasa (por ejemplo, Platinum® Taq) y un tampón apropiado y/o cofactores para la actividad óptima de la enzima polimerasa (por ejemplo, MgCl₂ y/o KCl).

El término "hibridar" se refiere a la hibridación de una o más sondas a un producto de amplificación. Las "condiciones de hibridación" típicamente incluyen una temperatura que está por debajo de la temperatura de fusión de las sondas, pero que evita la hibridación inespecífica de las sondas.

El término "actividad nucleasa 5' a 3'" se refiere a una actividad de una ácido nucleico polimerasa, típicamente asociada con la síntesis de hebra de ácido nucleico, con lo que se retiran nucleótidos del extremo 5' de la hebra de ácido nucleico.

El término "polimerasa termoestable" se refiere a una enzima polimerasa que es estable frente al calor, es decir, la enzima cataliza la formación de productos de extensión de cebador complementarios a un molde y no se desnaturaliza irreversiblemente cuando se somete a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desnaturalización de ácidos nucleicos molde bicatenarios. En general, la síntesis se inicia en el extremo 3' de cada cebador y avanza en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra molde. Se han aislado polimerasas termoestables de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermus fervidus*. No obstante, también se pueden emplear polimerasas que no son termoestables en ensayos de PCR siempre que se reponga la enzima, si es necesario.

El término "complemento del mismo" se refiere a un ácido nucleico que tanto tiene la misma longitud que, como es exactamente complementario a, un ácido nucleico dado.

El término "extensión" o "alargamiento" cuando se usa con respecto a ácidos nucleicos se refiere a cuando se incorporan nucleótidos adicionales (u otras moléculas análogas) en los ácidos nucleicos. Por ejemplo, un ácido nucleico se extiende opcionalmente por un biocatalizador que incorpora nucleótido, tal como una polimerasa que típicamente añade nucleótidos en el extremo terminal 3' de un ácido nucleico.

Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácido nucleico, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, por ejemplo, como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencias disponibles para los expertos o por inspección visual. Los algoritmos ejemplares que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los programas BLAST, que se describen en, por ejemplo, Altschul *et al.* (1990) "Basic local alignment search tool" *J. Mol. Biol.* 215:403-410, Gish *et al.* (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search" *Nature Genet.* 3:266-272, Madden *et al.* (1996) "Applications of network BLAST server" *Meth. Enzymol.* 266:131-141, Altschul *et al.* (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, y Zhang *et al.* (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation" *Genome Res.* 7:649-656.

Un "nucleótido modificado" en el contexto de un oligonucleótido se refiere a una alteración en la que al menos un nucleótido de la secuencia oligonucleotídica se reemplaza por un nucleótido diferente que proporciona una propiedad deseada al oligonucleótido. Los nucleótidos modificados ejemplares que se pueden sustituir en los oligonucleótidos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, un t-butilbencilo, un fosfato, un C5-metil-dC, un C5-etil-dC, un C5-metil-dU, un C5-etil-dU, una 2,6-diaminopurina, un C5-propinil-dC, un C5-propinil-dU, un C7-propinil-dA, un C7-propinil-dG, un C5-propargilamino-dC, un C5-propargilamino-dU, un C7-propargilamino-dA, un C7-propargilamino-dG, un 7-desaza-2-desoxixantosa, un análogo de pirazolopirimidina, un pseudo-dU, un nitropirrol, un nitroindol, 2'-O-metil-ribo-U, 2'-O-metil-ribo-C, un N4-etil-dC, un N6-metil-dA, un 5-propinil-dU, un 5-propinil-dC y similares. Se hace referencia a muchos otros nucleótidos modificados que se pueden sustituir en los oligonucleótidos en el presente documento o de otro modo son conocidos en la técnica. En determinados modos de realización, las sustituciones de nucleótidos modificados modifican las temperaturas de fusión (T_f) de los oligonucleótidos con respecto a las temperaturas de fusión de los correspondientes oligonucleótidos no modificados. Para ilustrar además, determinadas sustituciones de nucleótidos modificados pueden reducir la amplificación de ácido nucleico inespecífica (por ejemplo, minimizar la formación de dímeros de cebador o similares), incrementar el rendimiento de un amplicón diana previsto y/o similares en algunos modos de realización. Los ejemplos de estos tipos de modificaciones de ácido nucleico se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.001.611. Otras sustituciones de nucleótidos modificados pueden alterar la estabilidad del oligonucleótido o proporcionar otros rasgos característicos deseables.

Detección de ácido nucleico diana

La presente divulgación proporciona procedimientos para detectar y cuantificar un ácido nucleico diana en una muestra amplificando una porción de la secuencia de ácido nucleico diana. A modo de ejemplo, se proporcionan procedimientos para detectar y cuantificar VHC en una muestra amplificando una porción de la secuencia de ácido nucleico de VHC. Específicamente, se proporcionan cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas para amplificar y detectar/cuantificar dianas de moléculas de ácido nucleico de VHC por los modos de realización en la presente divulgación.

Para la amplificación, detección y cuantificación de VHC, se proporcionan cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas. También se pueden usar ácidos nucleicos de VHC distintos de los ejemplificados en el presente documento para detectar VHC en una muestra. Por ejemplo, se pueden evaluar variantes funcionales para determinar la especificidad y/o sensibilidad por los expertos en la técnica usando procedimientos habituales. Las variantes funcionales representativas pueden incluir, por ejemplo, una o más delecciones, inserciones y/o sustituciones en los ácidos nucleicos de VHC divulgados en el presente documento.

Más específicamente, los modos de realización de los oligonucleótidos incluyen cada uno un ácido nucleico con una secuencia seleccionada de SEQ ID NO:1-5, una variante sustancialmente idéntica de la misma en la que la variante tiene al menos, por ejemplo, un 80 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia con una de SEQ ID NO:1-5, o un complemento de SEQ ID NO:1-5 y la variante. El cebador directo, cebadores inversos y sondas detectables (SEQ ID NO:1-4) son de un ensayo de genotipado de VHC disponible comercialmente (cobas® HCV GT para su uso con el sistema cobas® 4800, Roche).

Tipo de oligonucleótido	Nombre de oligonucleótido	SEQ ID NO:	Secuencia	Modificaciones
Cebador directo	AYHCV500 1TBB	1	TGGGCAGGGTGGTTGCTK	K: t-butilbencil-dC
Cebador inverso	AYHCV500 2TBB	2	GTTGCATAGTTTACCCCGTCCT CAJ	J: t-butilbencil-dA
Cebador inverso	AYHCV501 2TBB	3	GTTGCATAGTTTATCCCGTCCT CAJ	J: t-butilbencil-dA
Sonda detectable	AYHCV501 2HBH6	4	EATCCCGQCTCGTAGGCGGCC CCGTTGP	Q: BHQ-2 P: Fosfato E: Threo-HEX
Oligo. auxiliar no extensible	RM_111	5	GTTGCATAGTTTATCCCGTCTT CAAGAACCCTTCACACCGTGTG CGAAAAAAAA	

Tabla 1: oligonucleótidos de VHC

En un modo de realización, los conjuntos descritos anteriormente de cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas de VHC se usan para proporcionar la detección de VHC en una muestra biológica sospechosa de contener VHC (tabla 1). Los conjuntos de cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas pueden comprender o consistir en los cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas específicos para las secuencias de ácido nucleico de VHC, que comprenden o consisten en las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO:1-5. En otro modo de realización, los cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas para la diana de VHC comprenden o consisten en una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas de SEQ ID NO:1-5.

Una variante funcionalmente activa de cualquiera de los cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y/o sondas de SEQ ID NO:1-5 se puede identificar usando los cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y/o sondas en los procedimientos divulgados. Una variante funcionalmente activa de un cebador, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y/o sonda de cualquiera de SEQ ID NO:1-5 pertenece a un cebador, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y/o sonda que proporciona una especificidad y sensibilidad similares o mayores en el procedimiento o kit descrito en comparación con la respectiva secuencia de SEQ ID NO:1-5.

La variante puede variar, por ejemplo, de la secuencia de SEQ ID NO:1-5 en una o más adiciones, deleciones o sustituciones nucleotídicas tal como una o más adiciones, deleciones o sustituciones nucleotídicas en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de la respectiva secuencia de SEQ ID NO:1-5. Como se detalla anteriormente, un cebador, oligonucleótido auxiliar no extensible y/o sonda se puede modificar químicamente, es decir, un cebador, oligonucleótido auxiliar no extensible y/o sonda puede comprender un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. Un cebador, oligonucleótido auxiliar no extensible y/o sonda es a continuación un oligonucleótido modificado. Los "nucleótidos modificados" (o "análogos nucleotídicos") difieren de un "nucleótido" natural en alguna modificación, pero todavía consisten en una base o compuesto similar a base, un glúcido pentofuranosilo o un compuesto similar a glúcido pentofuranosilo, una porción fosfato o porción similar a fosfato o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un "marcador" se puede unir a la porción de base de un "nucleótido", con lo que se obtiene un "nucleótido modificado". Una base natural en un "nucleótido" también se puede reemplazar por, por ejemplo, una 7-desazapurina con lo que también se obtiene un "nucleótido modificado". Los términos "nucleótido modificado" o "análogo nucleotídico" se usan de manera intercambiable en la presente solicitud. Un "nucleósido modificado" (o "análogo nucleosídico") difiere de un nucleósido natural en alguna modificación de la manera como se explica anteriormente para un "nucleótido modificado" (o un "análogo nucleotídico").

Oligonucleótidos que incluyen oligonucleótidos modificados y análogos oligonucleotídicos que amplifican una molécula de ácido nucleico correspondiente a una región diana. Se pueden diseñar oligonucleótidos correspondientes a, por ejemplo, porciones alternativas de la diana usando, por ejemplo, un programa informático tal como OLIGO (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, Colorado). Los rasgos característicos importantes cuando se diseñan oligonucleótidos que se van a usar como cebadores de amplificación incluyen, pero no se

limitan a, un producto de amplificación de tamaño apropiado para facilitar la detección (por ejemplo, por electroforesis), temperaturas de fusión similares para los miembros de un par de cebadores, y la longitud de cada cebador (es decir, los cebadores necesitan ser lo suficientemente largos como para hibridarse con especificidad de secuencia y para iniciar la síntesis, pero no tan largos como para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis oligonucleotídica). Típicamente, los cebadores oligonucleotídicos son de 8 a 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48 o 50 nucleótidos de longitud).

Los oligonucleótidos de la presente divulgación incluyen "oligonucleótido(s) auxiliar(es)" u "oligonucleótido(s) auxiliar(es) no extensible(s)". En algunos casos, el oligonucleótido auxiliar no extensible se hibridará, en parte, a una porción dentro del ácido nucleico diana. Debido a que se cree que los oligonucleótidos auxiliares no extensibles facilitan el acceso del cebador o cebadores extensibles al ácido nucleico diana, el oligonucleótido auxiliar no extensible puede actuar en o cerca de la misma localización donde se hibridará el cebador extensible. Por lo tanto, en algunos casos, el oligonucleótido auxiliar no extensible se hibridará, en parte o en su totalidad, a la misma región dentro del ácido nucleico diana que el cebador extensible. Es decir, en algunos casos, el oligonucleótido auxiliar no extensible y el cebador extensible se hibridarán a la misma porción, en parte o en su totalidad, dentro del ácido nucleico diana. Por tanto, en algunos casos, el oligonucleótido auxiliar no extensible y el cebador extensible pueden compartir las mismas secuencias, en parte o en su totalidad. Se cree que el oligonucleótido auxiliar no extensible reduce la energía libre de Gibbs de la estructura secundaria del ácido nucleico diana. Esto facilita la hibridación de uno o más cebadores extensibles a la diana, que a continuación iniciaría la extensión por medio de ADN polimerasas (es decir, síntesis de ácido nucleico). Por tanto, el oligonucleótido auxiliar no extensible

Para evitar que el propio oligonucleótido auxiliar se extienda, se pueden realizar cualquier cantidad de modificaciones en el oligonucleótido auxiliar. Dichas modificaciones serían bien conocidas para un experto en la técnica. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen la adición de nucleótidos poli(A) al extremo 3' del oligonucleótido auxiliar y/o el reemplazo del grupo 3'-OH por un grupo fosfato (es decir, fosforilación). Se cree que la adición de secuencias de poli(A) (que probablemente no se hibridarán al ácido nucleico diana) desestabiliza la interacción entre el oligonucleótido auxiliar no extensible y el ácido nucleico diana, abriendo de este modo la estructura secundaria, lo que facilita el acceso de la región de ácido nucleico diana al cebador (extensible).

Además de un conjunto de cebadores, los procedimientos pueden usar una o más sondas para detectar la presencia o ausencia del ácido nucleico diana. El término "sonda" se refiere a ácidos nucleicos (ADN o ARN) producidos sintéticamente o biológicamente, que por diseño o selección, contienen secuencias de nucleótidos específicas que les permiten hibridarse bajo restricciones predeterminadas definidas específicamente (es decir, preferentemente) a "ácidos nucleicos diana". Una "sonda" se puede denominar "sonda de detección", que quiere decir que detecta el ácido nucleico diana.

En algunos modos de realización, las sondas se pueden marcar con al menos un marcador fluorescente. En un modo de realización, las sondas se pueden marcar con un resto fluorescente donante, por ejemplo, un tinte fluorescente y un correspondiente resto aceptador, por ejemplo, un extintor. En un modo de realización, la sonda comprende o consiste en un resto fluorescente y las secuencias de ácido nucleico comprenden o consisten en SEQ ID NO:4.

Diseñar oligonucleótidos que se van a usar como sondas se puede realizar de manera similar al diseño de cebadores. Los modos de realización pueden usar una única sonda o un par de sondas para la detección del producto de amplificación. Dependiendo del modo de realización, el uso de la(s) sonda(s) puede comprender al menos un marcador y/o al menos un resto extintor. Como con los cebadores, las sondas normalmente tienen temperaturas de fusión similares, y la longitud de cada sonda debe ser suficiente para que se produzca hibridación específica de secuencia, pero no tan larga como para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis. Las sondas oligonucleotídicas tienen en general de 15 a 40 (por ejemplo, 16, 18, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) nucleótidos de longitud.

Las construcciones pueden incluir vectores conteniendo cada uno moléculas de ácido nucleico de cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas. Por ejemplo, las construcciones pueden incluir vectores conteniendo cada uno de moléculas de ácido nucleico de cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas (por ejemplo, SEQ ID NO:1, 2, 3, 4 y 5, para VHC). Se pueden usar construcciones, por ejemplo, como moléculas de ácido nucleico molde de control. Los vectores adecuados para su uso están disponibles comercialmente y/o se producen por procedimientos de tecnología de ácido nucleico recombinante habituales en la técnica. Las moléculas de ácido nucleico se pueden obtener, por ejemplo, por síntesis química, clonación directa de la región diana o por amplificación de ácido nucleico.

Las construcciones adecuadas para su uso en los procedimientos típicamente incluyen secuencias que codifican un marcador seleccionable (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos) para seleccionar construcciones y/o transformantes deseados, y un origen de replicación. La elección de sistemas de vectores normalmente depende de varios factores, incluyendo, pero sin limitarse a, la elección de células huésped, eficacia de la replicación, selectividad, inducibilidad y la facilidad de recuperación.

Las construcciones que contienen las moléculas de ácido nucleico diana se pueden propagar en una célula huésped. Como se usa en el presente documento, el término célula huésped pretende incluir procariotas y eucariotas, tales como células de levadura, vegetales y animales. Los huéspedes procariotas pueden incluir *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Los huéspedes eucariotas incluyen levaduras, tales como *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Pichia pastoris*, células de mamífero, tales como células COS o células de ovario de hámster chino (CHO), células de insecto y células vegetales, tales como *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*. Se puede introducir una construcción en una célula huésped usando cualquiera de las técnicas conocidas comúnmente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la precipitación con fosfato de calcio, electroporación, choque térmico, lipofección, microinyección y transferencia de ácido nucleico mediada por virus son procedimientos comunes para introducir ácidos nucleicos en células huésped. Además, se puede suministrar ADN no marcado directamente a las células (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 5.580.859 y 5.589.466).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las patentes de EE. UU. n.ºs 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188 divulgan técnicas de PCR convencionales. La PCR típicamente emplea dos cebadores oligonucleotídicos que se unen a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, ADN o ARN). Estos dos cebadores oligonucleotídicos son típicamente un cebador directo y un cebador inverso. Los cebadores útiles en algunos modos de realización incluyen oligonucleótidos que pueden actuar como puntos de iniciación de síntesis de ácido nucleico dentro de las secuencias de ácido nucleico de VHC descritas (por ejemplo, SEQ ID NO: 1, 2 y 3). Un cebador se puede purificar a partir de un hidrolizado de restricción por procedimientos convencionales, o se puede producir sintéticamente. El cebador es preferentemente monocatenario para una eficacia máxima en la amplificación, pero el cebador puede ser bicatenario. Los cebadores bicatenarios se desnaturalizan en primer lugar, es decir, se tratan para separar las hebras. Un procedimiento para desnaturalizar ácidos nucleicos bicatenarios es por calentamiento.

Si el ácido nucleico molde es bicatenario, es necesario separar las dos hebras antes de que se pueda usar como molde en la PCR. La separación de hebras se puede lograr por cualquier procedimiento de desnaturalización adecuado incluyendo medios físicos, químicos o enzimáticos. Un procedimiento de separación de las hebras de ácido nucleico implica calentar el ácido nucleico hasta que esté predominantemente desnaturalizado (por ejemplo, más de un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % desnaturalizado). Las condiciones de calentamiento necesarias para desnaturalizar el ácido nucleico molde dependerán, por ejemplo, de la concentración salina de tampón y la longitud y composición de nucleótidos de los ácidos nucleicos que se desnaturalizan, pero típicamente varían de aproximadamente 90 °C a aproximadamente 105 °C durante un tiempo dependiendo de rasgos característicos de la reacción, tales como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización típicamente se realiza durante de aproximadamente 30 s a 4 min (por ejemplo, de 1 min a 2 min 30 s, o 1,5 min).

Si el ácido nucleico molde bicatenario se desnaturaliza por calor, la mezcla de reacción se deja enfriar hasta una temperatura que promueve la hibridación de cada cebador con su secuencia diana. La temperatura para la hibridación es normalmente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C (por ejemplo, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C; de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 50 °C). Los tiempos de hibridación pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 1 min (por ejemplo, de aproximadamente 20 s a aproximadamente 50 s; de aproximadamente 30 s a aproximadamente 40 s). A continuación, se ajusta la mezcla de reacción hasta una temperatura a la que la actividad de la polimerasa se promueve o se optimiza, es decir, una temperatura suficiente para que se produzca la extensión a partir del cebador hibridado para generar productos complementarios al ácido nucleico molde. La temperatura debe ser suficiente para sintetizar un producto de extensión a partir de cada cebador que se hibrida a un molde de ácido nucleico, pero no debe ser tan alta como para desnaturalizar un producto de extensión a partir de su molde complementario (por ejemplo, la temperatura para la extensión varía en general de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C (por ejemplo, de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C; aproximadamente 60 °C). Los tiempos de extensión pueden ser de aproximadamente 10 s a aproximadamente 5 min (por ejemplo, de aproximadamente 30 s a aproximadamente 4 min; de aproximadamente 1 min a aproximadamente 3 min; de aproximadamente 1 min 30 s a aproximadamente 2 min).

El genoma de un retrovirus o virus de ARN, (por ejemplo, VHC así como otros flavivirus), está compuesto de un ácido ribonucleico, es decir, ARN. En dicho caso, el ácido nucleico molde, ARN, se debe transcribir primero en ADN complementario (ADNc) por medio de la acción de la enzima retrotranscriptasa. Las retrotranscriptasas usan un molde de ARN y un cebador corto complementario al extremo 3' del ARN para dirigir la síntesis de la primera hebra de ADNc, que a continuación se puede usar directamente como molde para la reacción en cadena de la polimerasa.

Los ensayos de PCR pueden emplear ácido nucleico diana, tal como ARN o ADN (ADNc). No se necesita purificar el ácido nucleico molde; puede ser una fracción minoritaria de una mezcla compleja, tal como ácido nucleico diana microbiano contenido en células humanas. Las moléculas de ácido nucleico microbiano, tales como de virus, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH, se pueden extraer de una muestra biológica por técnicas de rutina tales

como las descritas en *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications* (Persing et al. (eds), 1993, American Society for Microbiology, Washington D.C.). Se pueden obtener ácidos nucleicos de una serie de fuentes, tales como plásmidos, o fuentes naturales incluyendo bacterias, levaduras, virus, orgánulos u organismos superiores tales como plantas o animales.

Los cebadores oligonucleotídicos (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-3, para VHC) se combinan con reactivos de PCR en condiciones de reacción que inducen la extensión de cebador. Por ejemplo, las reacciones de extensión de la cadena en general incluyen KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 15 mM, gelatina al 0,001 % (p/v), 0,5-1,0 µg de ADN molde desnaturizado, 50 pmol de cada cebador oligonucleotídico, 2,5 U de polimerasa Taq y DMSO al 10 %). Las reacciones normalmente contienen de 150 a 320 µM de cada uno de dATP, dCTP, dTTP, dGTP o uno o más análogos de los mismos.

Las hebras recién sintetizadas forman una molécula bicatenaria que se puede usar en las etapas subsiguientes de la reacción. Las etapas de separación de hebras, hibridación y alargamiento se pueden repetir tan a menudo como se necesite para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes a las moléculas de ácido nucleico diana. Los factores limitantes en la reacción son las cantidades de cebadores, enzima termoestable y nucleósidos trifosfato presentes en la reacción. Las etapas de ciclado (es decir, desnaturización, hibridación y extensión) se repiten preferentemente al menos una vez. Para su uso en la detección, el número de etapas de ciclado dependerá, por ejemplo, de la naturaleza de la muestra. Si la muestra es una mezcla compleja de ácidos nucleicos, se requerirán más etapas de ciclado para amplificar la secuencia diana lo suficiente para la detección. En general, las etapas de ciclado se repiten al menos aproximadamente 20 veces, pero se pueden repetir tantas como 40, 60 o incluso 100 veces.

Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET)

La tecnología FRET (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 4.996.143, 5.565.322, 5.849.489 y 6.162.603) se basa en un concepto de que cuando un resto fluorescente donante y un correspondiente resto fluorescente aceptador se sitúan dentro de una determinada distancia entre sí, tiene lugar una transferencia de energía entre los dos restos fluorescentes que se puede visualizar o de otro modo detectar y/o cuantificar. El donante típicamente transfiere la energía al aceptador cuando el donante se excita por radiación de luz con una longitud de onda adecuada. El aceptador típicamente reemite la energía transferida en forma de radiación de luz con una longitud de onda diferente. En determinados sistemas, se puede transferir energía no fluorescente entre restos donantes y aceptadores, por medio de biomoléculas que incluyen restos donantes sustancialmente no fluorescentes (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.741.467).

En un ejemplo, una sonda oligonucleotídica puede contener un resto fluorescente donante (por ejemplo, FAM) y un extintor correspondiente (por ejemplo, BlackHole Quenchers™ (BHQ) (tal como BHQ2)), que puede ser fluorescente o no, y que disipa la energía transferida en una forma distinta de luz. Cuando la sonda está intacta, la transferencia de energía típicamente se produce entre los restos donantes y aceptadores, de modo que la emisión fluorescente del resto fluorescente donante se extingue por el resto aceptador. Durante una etapa de extensión de una reacción en cadena de la polimerasa, una sonda unida a un producto de amplificación se escinde por la actividad nucleasa 5' a 3' de, por ejemplo, una polimerasa Taq de modo que la emisión fluorescente del resto fluorescente donante ya no se extingue. Las sondas ejemplares para este propósito se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.210.015, 5.994.056 y 6.171.785. Los pares donante-aceptador usados comúnmente incluyen el par FAM-TAMRA. Los extintores usados comúnmente son DABCYL y TAMRA. Los extintores oscuros usados comúnmente incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ) (tal como BHQ2), (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™, (Integrated DNA Tech., Inc., Coralville, Iowa), BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650), (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

En otro ejemplo, dos sondas oligonucleotídicas, que contienen cada una un resto fluorescente, se pueden hibridar a un producto de amplificación en posiciones particulares determinadas por la complementariedad de las sondas oligonucleotídicas con la secuencia de ácido nucleico diana. Tras la hibridación de las sondas oligonucleotídicas al ácido nucleico de producto de amplificación en las posiciones apropiadas, se genera una señal FRET. Las temperaturas de hibridación pueden variar de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C durante de aproximadamente 10 s a aproximadamente 1 min.

Se puede llevar a cabo el análisis fluorescente usando, por ejemplo, un sistema de microscopio epifluorescente de recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico apropiado y filtros para supervisar la emisión fluorescente en el intervalo particular), un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones o un fluorímetro. La excitación para iniciar la transferencia de energía, o para permitir la detección directa de un fluoróforo, se puede llevar a cabo con un láser de iones de argón, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una lámpara de xenón, una fuente de luz de fibra óptica u otra fuente de luz de alta intensidad filtrada apropiadamente para la excitación en el intervalo deseado.

Como se usa en el presente documento con respecto a los restos donantes y aceptadores correspondientes, "correspondiente" se refiere a un resto fluorescente aceptador o un extintor oscuro que tiene un espectro de

absorbancia que se solapa con el espectro de emisión del resto fluorescente donante. El máximo de longitud de onda del espectro de emisión del resto fluorescente aceptador debe ser al menos 100 nm mayor que el máximo de longitud de onda del espectro de excitación del resto fluorescente donante. En consecuencia, se puede producir transferencia de energía no radiativa eficaz entre los mismos.

Los restos donantes y aceptadores correspondientes fluorescentes en general se eligen para (a) transferencia de energía de Foerster de alta eficacia; (b) un gran desplazamiento de Stokes final (>100 nm); (c) desplazamiento de la emisión lo más lejos posible en la porción roja del espectro visible (>600 nm); y (d) desplazamiento de la emisión a una longitud de onda mayor que la emisión fluorescente de agua de Raman producida por excitación a la longitud de onda de excitación de donante. Por ejemplo, se puede elegir un resto fluorescente donante que tiene su máximo de excitación cercano a una línea láser (por ejemplo, helio-cadmio 442 nm o argón 488 nm), un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico y un buen solapamiento de su emisión fluorescente con el espectro de excitación del correspondiente resto fluorescente aceptador. Se puede elegir un correspondiente resto fluorescente aceptador que tiene un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico, un buen solapamiento de su excitación con la emisión del resto fluorescente donante y emisión en la parte roja del espectro visible (>600 nm).

Los restos fluorescentes donantes representativos que se pueden usar con diversos restos fluorescentes aceptadores en tecnología FRET incluyen fluoresceína, amarillo Lucifer, B-ficoeritrina, 9-acridinisotiocianato, amarillo Lucifer VS, ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcumarina, 1-pirenbutirato de succinimido y derivados de ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico. Los restos fluorescentes aceptadores representativos, dependiendo del resto fluorescente donante usado, incluyen LC Red 640, LC Red 705, Cy5, Cy5.5, cloruro de sulfonilo de lisamina-rodamina B, tetrametilrodamina-isotiocianato, rodamina x-isotiocianato, eritrosina-isotiocianato, fluoresceína, pentaacetato de dietilentriamina u otros quelatos de iones de lantánido (por ejemplo, europio o terbio). Se pueden obtener restos fluorescentes donantes y aceptadores, por ejemplo, de Molecular Probes (Junction City, Oreg.) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.).

Los restos fluorescentes donantes y aceptadores se pueden unir al oligonucleótido de sonda apropiado por medio de un brazo conector. La longitud de cada brazo conector es importante, ya que los brazos conectores afectarán a la distancia entre los restos fluorescentes donantes y aceptadores. La longitud de un brazo conector puede ser la distancia en Angstroms (Å) desde la base nucleotídica al resto fluorescente. En general, un brazo conector es de aproximadamente 10 Å a aproximadamente 25 Å. El brazo conector puede ser del tipo descrito en la publicación de patente internacional n.º WO 84/03285. La publicación de patente internacional n.º WO 84/03285 también divulga procedimientos para unir brazos conectores a una base nucleotídica particular, y también para unir restos fluorescentes a un brazo conector.

Un resto fluorescente aceptador, tal como un LC Red 640, se puede combinar con un oligonucleótido que contiene un conector de amino (por ejemplo, C6-aminofosforamiditas disponibles de ABI (Foster City, Calif.) o Glen Research (Sterling, VA)) para producir, por ejemplo, un oligonucleótido marcado con LC Red 640. Los conectores usados con frecuencia para acoplar un resto fluorescente donante tal como fluoresceína a un oligonucleótido incluyen conectores de tiourea (derivados de FITC, por ejemplo, fluoresceína-CPG de Glen Research o ChemGene (Ashland, Mass.)), conectores de amida (derivados de fluoresceína-NHS-éster, tal como CX-fluoresceína-CPG de BioGenex (San Ramon, Calif.)) o 3'-amino-CPG que requieren el acoplamiento de fluoresceína-NHS-éster después de la síntesis oligonucleotídica.

Detección del producto de ácido nucleico diana amplificado (amplicón)

La presente divulgación proporciona procedimientos para detectar y cuantificar ácidos nucleicos diana (incluyendo ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH) en una muestra biológica o no biológica. Los procedimientos proporcionados evitan problemas de contaminación de muestra, negativos falsos y positivos falsos. Los procedimientos incluyen realizar al menos una etapa de ciclado que incluye amplificar una porción de moléculas de ácido nucleico diana de una muestra (por ejemplo, PVH, VNO, VHA, VHB, VHC o VIH) usando uno o más pares de cebadores diana, un Por ejemplo, las construcciones pueden incluir vectores conteniendo cada uno de moléculas de ácido nucleico de cebadores, un oligonucleótido auxiliar no extensible, y una etapa de detección por FRET. Se realizan múltiples etapas de ciclado, preferentemente en un termociclador. Se pueden realizar procedimientos usando los cebadores diana, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas para detectar la presencia de un ácido nucleico diana (por ejemplo, PVH, VNO, VHA, VHB, VHC o VIH). Detección del ácido nucleico diana (por, por ejemplo, una sonda) indica la presencia del ácido nucleico diana (por ejemplo, PVH, VNO, VHA, VHB, VHC o VIH) en la muestra.

Como se describe en el presente documento, se pueden detectar productos de amplificación usando sondas de hibridación marcadas que aprovechan la tecnología FRET. Un formato FRET utiliza tecnología TaqMan® para detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación y, por tanto, la presencia o ausencia de virus VHC. La tecnología TaqMan® utiliza una sonda de hibridación monocatenaria marcada con, por ejemplo, un tinte fluorescente (por ejemplo, HEX) y un extintor (por ejemplo, BHQ o BHQ-2), que puede ser fluorescente o no. Cuando se excita un primer resto fluorescente con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se

transfiere a un segundo resto fluorescente o un extintor oscuro de acuerdo con los principios de FRET. El segundo resto fluorescente en general es una molécula extintora. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ADN diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada por la actividad nucleasa 5' a 3' de, por ejemplo, la polimerasa Taq durante la fase de alargamiento posterior. Como resultado, el resto fluorescente y el resto extintor se separan espacialmente entre sí. Como consecuencia, tras la excitación del primer resto fluorescente en ausencia del extintor, se puede detectar la emisión de fluorescencia del primer resto fluorescente. A modo de ejemplo, un sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7700 (Applied Biosystems) usa tecnología TaqMan® y es adecuado para realizar los procedimientos descritos en el presente documento para detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación/ácido nucleico diana en la muestra.

También se pueden usar balizas moleculares conjuntamente con FRET para detectar la presencia de un producto de amplificación usando los procedimientos de PCR ultrarrápida. La tecnología de baliza molecular usa una sonda de hibridación marcada con un primer resto fluorescente y un segundo resto fluorescente. El segundo resto fluorescente es en general un extintor, y los marcadores fluorescentes típicamente se localizan en cada extremo de la sonda. La tecnología de baliza molecular usa un oligonucleótido de sonda que tiene secuencias que permiten la formación de estructura secundaria (por ejemplo, una horquilla). Como resultado de la formación de estructura secundaria dentro de la sonda, ambos restos fluorescentes están en proximidad espacial cuando la sonda está en solución. Después de la hibridación a los ácidos nucleicos diana (es decir, productos de amplificación), la estructura secundaria de la sonda se altera y los restos fluorescentes se separan entre sí de modo que después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se pueda detectar la emisión del primer resto fluorescente.

Otro formato común de tecnología FRET utiliza dos sondas de hibridación. Cada sonda se puede marcar con un resto fluorescente diferente y en general se diseñan para hibridarse en estrecha proximidad entre sí en una molécula de ADN diana (por ejemplo, un producto de amplificación). Un resto fluorescente donante, por ejemplo, fluoresceína, se excita a 470 nm por la fuente de luz del instrumento LightCycler®. Durante la FRET, la fluoresceína transfiere su energía a un resto fluorescente aceptador, tal como LightCycler®-Red 640 (LC Red 640) o LightCycler®-Red 705 (LC Red 705). A continuación, el resto fluorescente aceptador emite luz de una longitud de onda más larga, que se detecta por el sistema de detección óptica del instrumento LightCycler®. La FRET eficaz solo puede tener lugar cuando los restos fluorescentes están en proximidad local directa y cuando el espectro de emisión del resto fluorescente donante se solapa con el espectro de absorción del resto fluorescente aceptador. La intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ADN diana originales (por ejemplo, el número de genomas de VHC). Si se produce amplificación del ácido nucleico diana y se produce un producto de amplificación, la etapa de hibridación da como resultado una señal detectable basada en FRET entre los miembros del par de sondas.

En general, la presencia de FRET indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra, y la ausencia de FRET indica la ausencia del ácido nucleico diana en la muestra. Sin embargo, la extracción de muestras inadecuada, retrasos de transporte, condiciones de transporte inapropiadas o uso de determinados hisopos de extracción (varilla de alginato de calcio o aluminio) son todas condiciones que pueden afectar al éxito y/o exactitud de un resultado de prueba.

Las muestras biológicas representativas que se pueden usar en la práctica de los procedimientos incluyen, pero no se limitan a, muestras respiratorias, orina, muestras fecales, muestras de sangre, plasma, hisopados dérmicos, hisopados nasales, hisopados en heridas, hemocultivos, piel e infecciones de partes blandas. Los procedimientos de extracción y almacenamiento de muestras biológicas son conocidos para los expertos en la técnica. Las muestras biológicas se pueden procesar (por ejemplo, por procedimientos y/o kits de extracción de ácido nucleico conocidos en la técnica) para liberar el ácido nucleico diana (ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH) o, en algunos casos, la muestra biológica se puede poner en contacto directamente con los componentes de la reacción PCR y los oligonucleótidos apropiados.

El análisis de la curva de fusión es una etapa adicional que se puede incluir en un perfil de ciclado. El análisis de la curva de fusión se basa en el hecho de que el ADN se funde a una temperatura característica llamada temperatura de fusión (T_f), que se define como la temperatura a la que la mitad de las dobles hebras de ADN se han separado en hebras únicas. La temperatura de fusión de un ADN depende principalmente de su composición nucleotídica. Por tanto, las moléculas de ADN ricas en nucleótidos G y C tienen una mayor T_f que las que tienen una abundancia de nucleótidos A y T. Detectando la temperatura a la que se pierde la señal, se puede determinar la temperatura de fusión de las sondas. De forma similar, detectando la temperatura a la que se genera la señal, se puede determinar la temperatura de hibridación de las sondas. La(s) temperatura(s) de fusión de las sondas de ácido nucleico diana de los productos de amplificación de ácido nucleico diana puede(n) confirmar la presencia o ausencia de ácido nucleico diana en la muestra (por ejemplo, ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH).

Dentro de cada tanda de termociclador, también se pueden ciclar muestras de control. Las muestras de control positivo pueden amplificar el molde de control de ácido nucleico diana (distinto de los productos de amplificación descritos de genes diana) usando, por ejemplo, cebadores de control y sondas de control. Las muestras de control

positivo también pueden amplificar, por ejemplo, una construcción plasmídica que contiene las moléculas de ácido nucleico diana. Dicho control plasmídico se puede amplificar internamente (por ejemplo, dentro de la muestra) o en una tanda con muestra separada paralelamente con las muestras del paciente usando los mismos cebadores y sonda como se usa para la detección de la diana prevista. Dichos controles son indicadores del éxito o fracaso de la amplificación, hibridación y/o reacción de FRET. Cada tanda de termociclador también puede incluir un control negativo que, por ejemplo, carece de ADN molde diana. El control negativo puede medir la contaminación. Esto garantiza que el sistema y los reactivos no dan lugar a una señal positiva falsa. Por lo tanto, las reacciones de control pueden determinar fácilmente, por ejemplo, la capacidad de los cebadores para hibridarse con especificidad de secuencia y para iniciar el alargamiento, así como la capacidad de las sondas para hibridarse con especificidad de secuencia y para que se produzca FRET.

En un modo de realización, los procedimientos incluyen etapas para evitar la contaminación. Por ejemplo, un procedimiento enzimático que utiliza uracil-ADN glucosilasa se describe en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.035.996, 5.683.896 y 5.945.313 para reducir o eliminar la contaminación entre una tanda de termociclador y la siguiente.

Los procedimientos de PCR convencionales conjuntamente con tecnología FRET se pueden usar para practicar los procedimientos. En un modo de realización, se usa un instrumento LightCycler®. Las siguientes solicitudes de patente describen la PCR ultrarrápida como se usa en la tecnología LightCycler®: publicaciones de patente internacional n.ºs WO 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712.

Se puede hacer funcionar el LightCycler® usando una estación de trabajo para PC y puede utilizar un sistema operativo Windows NT. Las señales de las muestras se obtienen a medida que la máquina sitúa los capilares secuencialmente sobre la unidad óptica. El programa informático puede mostrar las señales de fluorescencia de forma ultrarrápida de inmediato después de cada medición. El tiempo de adquisición fluorescente es de 10-100 milisegundos (ms). Después de cada etapa de ciclado, se puede actualizar continuamente una visualización cuantitativa de la fluorescencia frente al número de ciclos para todas las muestras. Los datos generados se pueden almacenar para análisis adicional.

Como alternativa a FRET, se puede detectar un producto de amplificación usando un tinte de unión a ADN bicatenario tal como un tinte de unión a ADN fluorescente (por ejemplo, SYBR® Green o SYBR® Gold (Molecular Probes)). Tras la interacción con el ácido nucleico bicatenario, dichos tintes de unión a ADN fluorescentes emiten una señal de fluorescencia después de la excitación con luz a una longitud de onda adecuada. También se puede usar un tinte de unión a ADN bicatenario tal como un tinte de intercalación de ácido nucleico. Cuando se usan tintes de unión a ADN bicatenario, normalmente se realiza un análisis de la curva de fusión para la confirmación de la presencia del producto de amplificación.

Un experto en la técnica apreciará que también se pueden emplear otros procedimientos de amplificación de señal o ácido nucleico. Los ejemplos de dichos procedimientos incluyen, sin limitación, amplificación de señales de ADN ramificado, amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), replicación de secuencia autosostenida (3SR), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), o procedimiento de amplificación inteligente versión 2 (SMAP 2).

Se entiende que los modos de realización de la presente divulgación no se limitan por la configuración de uno o más instrumentos disponibles comercialmente.

Artículos de fabricación/kits

Los modos de realización de la presente divulgación proporcionan además artículos de fabricación o kits para detectar y cuantificar un ácido nucleico diana (por ejemplo, ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH). Un artículo de fabricación puede incluir cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas usadas para detectar la diana génica (por ejemplo, ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH), conjuntamente con materiales de empaquetado adecuados. Los cebadores y sondas representativos para la detección y cuantificación de un ácido nucleico diana (por ejemplo, ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH) se pueden hibridar a moléculas de ácidos nucleicos diana. Los oligonucleótidos auxiliares no extensibles representativos se pueden hibridar, en parte o en su totalidad, a las moléculas de ácido nucleico diana. En algunos casos, el oligonucleótido auxiliar no extensible y los cebadores (extensibles) se hibridan a la misma porción, en parte o en su totalidad, del ácido nucleico diana. Es decir, el oligonucleótido auxiliar no extensible se puede diseñar en la región de unión a cebador. De forma alternativa, el oligonucleótido auxiliar no extensible y los cebadores (extensibles) no se hibridan a la misma porción del ácido nucleico diana. Además, los kits también pueden incluir reactivos y materiales adecuadamente envasados necesarios para la inmovilización, hibridación, detección y cuantificación de ADN, tales como soportes sólidos, tampones, enzimas y patrones de ADN. Los procedimientos para diseñar cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas se divulgan en el presente documento, y se proporcionan ejemplos representativos de cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas que amplifican y se hibridan a moléculas de ácido nucleico diana.

Los artículos de fabricación también pueden incluir uno o más restos fluorescentes para marcar las sondas o, de forma alternativa, se pueden marcar las sondas suministradas con el kit. Por ejemplo, un artículo de fabricación puede incluir un resto fluorescente donante y/o uno aceptador para marcar las sondas de ácido nucleico diana (por ejemplo, sondas específicas para ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH). Los ejemplos de restos fluorescentes donantes y correspondientes restos fluorescentes aceptadores de FRET adecuados se proporcionan anteriormente.

Los artículos de fabricación también pueden contener un prospecto del envase o ficha técnica del envase que tiene instrucciones para usar los cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas para detectar y cuantificar el ácido nucleico diana (por ejemplo, ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH) en una muestra. Los artículos de fabricación pueden incluir adicionalmente reactivos para llevar a cabo los procedimientos divulgados en el presente documento (por ejemplo, tampones, enzimas polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa), monómeros de nucleósido trifosfato u otros monómeros nucleosídicos, cofactores o agentes para evitar la contaminación). Dichos reactivos pueden ser específicos para uno de los instrumentos disponibles comercialmente descritos en el presente documento.

Los modos de realización de la presente divulgación también proporcionan un conjunto de cebadores, uno o más oligonucleótidos auxiliares no extensibles y una o más sondas detectables para la detección de un ácido nucleico diana (por ejemplo, ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH) en una muestra.

Mezclas de reacción

Los modos de realización de la presente divulgación proporcionan además mezclas de reacción para amplificar, detectar y cuantificar un ácido nucleico diana (por ejemplo, ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH). Una mezcla de reacción puede incluir cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas usadas para detectar la diana génica (por ejemplo, ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH), conjuntamente con materiales de empaquetado adecuados. Los cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas representativos para la detección y cuantificación de un ácido nucleico diana (por ejemplo, ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH) se pueden hibridar a moléculas de ácido nucleico diana. Además, los kits también pueden incluir reactivos y materiales adecuadamente envasados necesarios para la inmovilización, hibridación, detección y cuantificación de ADN, tales como soportes sólidos, tampones, enzimas y patrones de ADN. Los procedimientos para diseñar cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas se divulgan en el presente documento, y se proporcionan ejemplos representativos de cebadores, oligonucleótidos auxiliares no extensibles y sondas que amplifican y se hibridan a moléculas de ácido nucleico diana.

Las mezclas de reacción también pueden incluir uno o más restos fluorescentes para marcar las sondas o, de forma alternativa, se pueden marcar las sondas suministradas con el kit. Por ejemplo, una mezcla de reacción puede incluir un resto fluorescente donante y/o uno aceptador para marcar las sondas de ácido nucleico diana (por ejemplo, sondas específicas para ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH). Los ejemplos de restos fluorescentes donantes y correspondientes restos fluorescentes aceptadores de FRET adecuados se proporcionan anteriormente.

Las mezclas de reacción pueden incluir adicionalmente reactivos para llevar a cabo los procedimientos divulgados en el presente documento (por ejemplo, tampones, enzimas polimerasa (por ejemplo, ADN polimerasa), monómeros de nucleósido trifosfato u otros monómeros nucleosídicos, cofactores o agentes para evitar la contaminación). Dichos reactivos pueden ser específicos para uno de los instrumentos disponibles comercialmente descritos en el presente documento.

Los modos de realización de la presente divulgación también proporcionan un conjunto de cebadores, uno o más oligonucleótidos auxiliares no extensibles y una o más sondas detectables para la detección de un ácido nucleico diana (por ejemplo, ácidos nucleicos diana microbianos, tales como PVH, VNO, VHA, VHB, VHC y VIH) en una muestra.

Un modo de realización de la divulgación se refiere a un procedimiento para detectar y/o cuantificar un ácido nucleico diana en una muestra que comprende: (a) poner en contacto ácidos nucleicos en la muestra con reactivos de amplificación, comprendiendo los reactivos de amplificación: al menos una enzima que comprende actividad ADN polimerasa; al menos monómeros de nucleósido trifosfato u otros monómeros nucleosídicos; al menos un cebador directo específico para el ácido nucleico diana, o al menos un cebador inverso específico para el ácido nucleico diana, o una combinación de los mismos, para generar al menos un amplicón; al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible, en el que: (i) el oligonucleótido auxiliar no extensible no se extiende, (ii) el oligonucleótido auxiliar no extensible se hibrida a parte de la misma porción del ácido nucleico diana que al menos uno de los cebadores, y (iii) el oligonucleótido auxiliar no extensible potencia la actividad de al menos uno de los cebadores; y al menos una sonda detectable específica para el amplicón o al menos un tinte de unión a ADN; (b) incubar los ácidos nucleicos con los reactivos de amplificación durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para

que se produzca una reacción de amplificación; y (c) detectar el amplicón con la al menos una sonda detectable o el al menos un tinte de unión a ADN. En otro modo de realización, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico microbiano (tal como un ácido nucleico vírico y/o un ácido nucleico bacteriano). En algunos modos de realización, el ácido nucleico vírico es un ácido nucleico de papilomavirus humano (PVH), virus del Nilo Occidental (VNO), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis A (VHA), virus de la hepatitis B (VHB) o virus de la hepatitis C (VHC). En un modo de realización relacionado, el ácido nucleico vírico es un ácido nucleico de virus de la hepatitis C (VHC), incluyendo, por ejemplo, el genotipo 5 de VHC. En otro modo de realización, el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende una secuencia de poli(A) en el extremo 3' del al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible. En un modo de realización relacionado, la secuencia de poli(A) tiene entre 4-12 nucleótidos de longitud, tal como aproximadamente 8 nucleótidos de longitud. En otro modo de realización, el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de la misma.

En otro modo de realización, la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una secuencia complementaria de la misma. Aún en otro modo de realización, el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, o una secuencia complementaria de la misma; el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de la misma; y la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una secuencia complementaria de la misma. Otro modo de realización de la presente divulgación se refiere a un procedimiento para detectar y/o cuantificar un ácido nucleico de VHC en una muestra que comprende: (a) poner en contacto ácidos nucleicos en la muestra con reactivos de amplificación, comprendiendo los reactivos de amplificación: al menos una enzima que comprende actividad ADN polimerasa; al menos monómeros de nucleósido trifosfato u otros monómeros nucleosídicos; al menos un cebador directo específico para el ácido nucleico diana, o al menos un cebador inverso específico para el ácido nucleico diana, o una combinación de los mismos, para generar al menos un amplicón; al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible, en el que: (i) el oligonucleótido auxiliar no extensible no se extiende, (ii) el oligonucleótido auxiliar no extensible se hibrida a parte de la misma porción del ácido nucleico diana que al menos uno de los cebadores, y (iii) el oligonucleótido auxiliar no extensible potencia la actividad de al menos uno de los cebadores; y al menos una sonda detectable específica para el amplicón o al menos un tinte de unión a ADN; (b) incubar los ácidos nucleicos con los reactivos de amplificación durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación; y (c) detectar el amplicón con la al menos una sonda detectable o el al menos un tinte de unión a ADN. En otro modo de realización, el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende una secuencia de poli(A) en el extremo 3' del al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible. En otro modo de realización, la secuencia de poli(A) tiene entre 4-12 nucleótidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 8 nucleótidos de longitud. En otro modo de realización, el VHC es genotipo 5 de VHC. En otro modo de realización, el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, o una secuencia complementaria de la misma. En un modo de realización relacionado, el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, o una secuencia complementaria de la misma; el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y/o 3, o una secuencia complementaria de la misma; y la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una secuencia complementaria de la misma.

Otro modo de realización de la presente divulgación se refiere a un kit para amplificar y detectar y/o cuantificar un ácido nucleico diana en una muestra que comprende reactivos de amplificación, comprendiendo los reactivos de amplificación: (a) una enzima que comprende actividad ADN polimerasa; (b) monómeros de nucleósido trifosfato u otros monómeros nucleosídicos; (c) al menos un cebador directo o al menos un cebador inverso específico para el ácido nucleico diana, o una combinación de los mismos; (d) al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible, en el que: (i) el oligonucleótido auxiliar no extensible no se extiende, (ii) el oligonucleótido auxiliar no extensible se hibrida a parte de la misma porción del ácido nucleico diana que al menos uno de los cebadores, y (iii) el oligonucleótido auxiliar no extensible potencia la actividad de al menos uno de los cebadores; y (c) al menos una sonda detectable para el ácido nucleico diana o un tinte de unión a ADN. En otro modo de realización, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico microbiano (tal como un ácido nucleico vírico o un ácido nucleico bacteriano). En un modo de realización relacionado, el ácido nucleico vírico es un ácido nucleico de PVH, VNO, VIH, VHA, VHB o VHC. En un modo de realización más particular, el ácido nucleico vírico es un ácido nucleico de VHC, incluyendo, por ejemplo, el genotipo 5 de VHC. En otro modo de realización, el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende una secuencia de poli(A) en el extremo 3' del al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible. En otro modo de realización, la secuencia de poli(A) tiene entre 4-12 nucleótidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 8 nucleótidos de longitud. En otro modo de realización, el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, o una secuencia complementaria de la misma. En

otro modo de realización, el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, o una secuencia complementaria de la misma; el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de la misma; y la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una secuencia complementaria de la misma.

Un modo de realización relacionado de la presente divulgación se refiere a un kit para amplificar y detectar y/o cuantificar un ácido nucleico de VHC en una muestra que comprende reactivos de amplificación, comprendiendo los reactivos de amplificación: (a) una enzima que comprende actividad ADN polimerasa; (b) monómeros de nucleósido trifosfato u otros monómeros nucleosídicos; (c) al menos un cebador directo o al menos un cebador inverso específico para el ácido nucleico diana, o una combinación de los mismos; (d) al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible, en el que: (i) el oligonucleótido auxiliar no extensible no se extiende, (ii) el oligonucleótido auxiliar no extensible se hibrida a parte de la misma porción del ácido nucleico diana que al menos uno de los cebadores, y (iii) el oligonucleótido auxiliar no extensible potencia la actividad de al menos uno de los cebadores; y (e) al menos una sonda detectable para el ácido nucleico diana o un tinte de unión a ADN. En otro modo de realización, el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende una secuencia de poli(A) en el extremo 3' del al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible. En otro modo de realización, la secuencia de poli(A) tiene entre 4-12 nucleótidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 8 nucleótidos de longitud. En otro modo de realización, el VHC es genotipo 5 de VHC. En otro modo de realización, el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, o una secuencia complementaria de la misma. En un modo de realización relacionado, el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de las mismas. En otro modo de realización, la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, o una secuencia complementaria de la misma; el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de la misma; y la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una secuencia complementaria de la misma.

Aún otro modo de realización de la presente divulgación se refiere a una mezcla de reacción eficaz para amplificar y detectar y/o cuantificar un ácido nucleico diana en una muestra que comprende reactivos de amplificación que comprenden: (a) una muestra; (b) una enzima que comprende actividad ADN polimerasa; (c) monómeros de nucleósido trifosfato u otros monómeros nucleosídicos; (d) al menos un cebador directo o al menos un cebador inverso específico para el ácido nucleico diana, o una combinación de los mismos; (e) al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible, en el que: (i) el oligonucleótido auxiliar no extensible no se extiende, (ii) el oligonucleótido auxiliar no extensible se hibrida a parte de la misma porción del ácido nucleico diana que al menos uno de los cebadores, y (iii) el oligonucleótido auxiliar no extensible potencia la actividad de al menos uno de los cebadores; y (f) al menos una sonda detectable para el ácido nucleico diana o un tinte de unión a ADN. En otro modo de realización, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico microbiano. En otro modo de realización, el ácido nucleico microbiano es un ácido nucleico vírico. En otro modo de realización, el ácido nucleico microbiano es un ácido nucleico bacteriano. En otro modo de realización, el ácido nucleico vírico es un ácido nucleico de PVH, VNO, VIH, VHA, VHB o VHC. En un modo de realización particular, el ácido nucleico vírico es un ácido nucleico de VHC, incluyendo, por ejemplo, el genotipo 5 de VHC. En otro modo de realización, el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende una secuencia de poli(A) en el extremo 3' del al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible. En otro modo de realización, la secuencia de poli(A) tiene entre 4-12 nucleótidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 8 nucleótidos de longitud. En otro modo de realización, el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, o una secuencia complementaria de la misma; el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de la misma; y la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una secuencia complementaria de la misma.

Un modo de realización relacionado de la presente divulgación se refiere a una mezcla de reacción eficaz para amplificar y detectar y/o cuantificar un ácido nucleico de VHC en una muestra que comprende reactivos de amplificación que comprenden: (a) una muestra; (b) una enzima que comprende actividad ADN polimerasa; (c) monómeros de nucleósido trifosfato u otros monómeros nucleosídicos; (d) al menos un cebador directo o al menos un cebador inverso específico para el ácido nucleico diana, o una combinación de los mismos; (e) al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible, en el que: (i) el oligonucleótido auxiliar no extensible no se extiende, (ii) el

oligonucleótido auxiliar no extensible se hibrida a parte de la misma porción del ácido nucleico diana que al menos uno de los cebadores, y (iii) el oligonucleótido auxiliar no extensible potencia la actividad de al menos uno de los cebadores; y (f) al menos una sonda detectable para el ácido nucleico diana o un tinte de unión a ADN. En otro modo de realización, el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende una secuencia de poli(A) en el extremo 3' del al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible. En otro modo de realización, la secuencia de poli(A) tiene entre 4-12 nucleótidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 8 nucleótidos de longitud. En un modo de realización, el VHC es el genotipo 5 de VHC. En otro modo de realización, el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de las mismas. En otro modo de realización, la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una secuencia complementaria de la misma. En otro modo de realización, el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, o una secuencia complementaria de la misma; el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de la misma; y la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una secuencia complementaria de la misma.

Los modos de realización de la presente divulgación se describirán además en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan para ayudar a entender la materia objeto, el verdadero alcance de ésta se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: detección de VHC por PCR ultrarrápida

Se extrajeron muestras de ARN usadas para un ensayo de PCR ultrarrápida de una muestra de plasma humano positiva para VHC. Los reactivos usados incluyen mezcla maestra para PCR genérica cobas® 6800/8800, con el perfil y condiciones para su uso con cobas® 6800/8800 y usando tecnología de detección y cuantificación TaqMan®. En 50 µl de reacción de PCR, las concentraciones finales fueron como sigue: los cebadores directos e inversos variaron de 0,2-0,5 µM; el oligonucleótido auxiliar no extensible estuvo a 0,20 µM; y la sonda estuvo a 0,12 µM. Se cree que el cebador directo, cebadores inversos y oligonucleótidos auxiliares no extensibles en una concentración dentro de un intervalo de 0,10 µM-0,50 µM serían eficaces.

Para demostrar el efecto del oligonucleótido auxiliar no extensible, se realizó un ensayo de PCR ultrarrápida usando muestras de plasma humano positivas para VHC por duplicado con las siguientes dos condiciones experimentales: (1) PCR ultrarrápida solo con pares de cebadores y sonda (es decir, sin oligonucleótido auxiliar no extensible); y (2) PCR ultrarrápida con pares de cebadores, oligonucleótido auxiliar no extensible y sonda. Los oligonucleótidos específicos para el genotipo 5 de VHC usados para el ensayo de PCR ultrarrápida fueron SEQ ID NO: 1 para el cebador directo, SEQ ID NO:2 y 3 para los cebadores inversos, SEQ ID NO:5 para el oligonucleótido auxiliar no extensible y SEQ ID NO:4 para la sonda. El oligonucleótido auxiliar no extensible (SEQ ID NO:5) es un oligonucleótido no marcado de 53 pares de bases con una cola de poli(A) en su extremo 3' y se diseña en la región central de unión de cebador inverso del genoma de VHC.

Para estas muestras de plasma humano positivas para VHC, la estructura secundaria prevista de la región diana de VHC en presencia del oligonucleótido auxiliar no extensible se representa en la figura 2, mostrando un ΔG de -107,2 kcal/mol (CLC Genomics Workbench 6, Qiagen), y los resultados se muestran en la figura 1, que muestra curvas de crecimiento de PCR ultrarrápida. Como se puede observar en la figura 1, la reacción de PCR es más eficaz en presencia de un oligonucleótido auxiliar no extensible que sin él.

Estos resultados demuestran que la reacción de PCR es más robusta y más eficaz en presencia del oligonucleótido auxiliar no extendido. Es decir, hay una acumulación mejorada del producto de PCR en presencia del oligonucleótido auxiliar no extendido que sin él.

Ejemplo 2: detección del genotipo 5 de VHC por PCR ultrarrápida

Como en el ejemplo 1, se usaron muestras de ARN para un ensayo de PCR ultrarrápida, pero se extrajeron de una muestra de plasma humano positiva para VHC diferente de la muestra usada en el ejemplo 1. Como en el ejemplo 1, los reactivos usados incluyen mezcla maestra para PCR genérica cobas® 6800/8800, con el perfil y condiciones para su uso con cobas® 6800/8800 y usando tecnología de detección y cuantificación TaqMan®. En 50 µl de reacción de PCR, las concentraciones finales fueron como sigue: los cebadores directos e inversos variaron de 0,2-0,5 µM; el oligonucleótido auxiliar no extensible estuvo a 0,20 pM; y la sonda estuvo a 0,12 µM. Se cree que el cebador directo, cebadores inversos y oligonucleótidos auxiliares no extensibles en una concentración dentro de un intervalo de 0,10 µM-0,50 µM serían eficaces.

Para demostrar el efecto del oligonucleótido auxiliar no extensible, se realizó un ensayo de PCR ultrarrápida usando muestras de plasma humano positivas para VHC (diferentes de las muestras empleadas en el ejemplo 1) por duplicado con las siguientes dos condiciones experimentales: (1) PCR ultrarrápida solo con pares de cebadores y sonda (es decir, sin oligonucleótido auxiliar no extensible); y (2) PCR ultrarrápida con pares de cebadores, oligonucleótido auxiliar no extensible y sonda. Los oligonucleótidos específicos para el genotipo 5 de VHC usados para el ensayo de PCR ultrarrápida fueron SEQ ID NO: 1 para el cebador directo, SEQ ID NO:2 y 3 para los cebadores inversos, SEQ ID NO:5 para el oligonucleótido auxiliar no extensible y SEQ ID NO:4 para la sonda. Como en el ejemplo 1, el oligonucleótido auxiliar no extensible (SEQ ID NO:5) es un oligonucleótido no marcado de 53 pares de bases con una cola de poli(A) en su extremo 3' y se diseña en la región central de unión de cebador inverso del genoma de VHC.

Para esta muestra de plasma humano positiva para VHC particular, la estructura secundaria prevista de la región diana de VHC en presencia del oligonucleótido auxiliar no extensible se representa en la figura 4, mostrando una ΔG de -98,6 kcal/mol y los resultados se muestran en la figura 3, que muestra curvas de crecimiento de PCR ultrarrápida. Como se puede observar en la figura 3, la reacción de PCR es más eficaz en presencia de un oligonucleótido auxiliar no extensible que sin él.

Estos resultados demuestran que la reacción de PCR es más robusta y más eficaz en presencia del oligonucleótido auxiliar no extendido. Es decir, hay una acumulación mejorada del producto de PCR en presencia del oligonucleótido auxiliar no extendido que sin él.

Tomados conjuntamente, estos dos ejemplos demuestran que, en diferentes muestras, el oligonucleótido auxiliar no extensible usado en el procedimiento de la presente invención parece reducir la energía libre de Gibbs de la estructura secundaria del ácido nucleico diana, lo que facilita el acceso del ácido nucleico diana a los cebadores. Esto da como resultado una mejora en la eficacia de amplificación. Por tanto, el oligonucleótido auxiliar no extensible incrementa la sensibilidad de un ensayo de amplificación.

Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle para propósitos de claridad y entendimiento, quedará claro para un experto en la técnica a partir de una lectura de la presente divulgación que se pueden realizar diversos cambios de forma y detalle dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, se pueden usar todas las técnicas y aparatos descritos anteriormente en diversas combinaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar y/o cuantificar un ácido nucleico diana en una muestra por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ultrarrápida que comprende:

(a) poner en contacto ácidos nucleicos en la muestra con reactivos de amplificación, comprendiendo los reactivos de amplificación:

al menos una enzima que comprende actividad ADN polimerasa;

al menos monómeros de nucleósido trifosfato u otros monómeros nucleosídicos;

al menos un cebador directo que se hibrida específicamente a una porción del ácido nucleico diana y al menos un cebador inverso que se hibrida específicamente a una porción del ácido nucleico diana para generar al menos un amplicón bicatenario que se puede usar directamente como molde en etapas de amplificación subsiguientes de la reacción en cadena de la polimerasa ultrarrápida;

al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible, en el que: (i) el oligonucleótido auxiliar no extensible no se extiende, y (ii) el oligonucleótido auxiliar no extensible y al menos uno de los cebadores se hibridan a la misma porción del ácido nucleico diana; y (iii) el oligonucleótido auxiliar no extensible en el extremo 3' comprende además una modificación que consiste en una secuencia de poli(A) de entre 4-12 nucleótidos de longitud que no se hibrida al ácido nucleico diana, con lo que el oligonucleótido auxiliar no extensible mejora la eficacia de amplificación de la reacción de amplificación; y

al menos una sonda detectable específica para el amplicón;

(b) incubar los ácidos nucleicos con los reactivos de amplificación durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para que se produzca una reacción de amplificación; y

(c) detectar el amplicón con la al menos una sonda detectable.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana es un ácido nucleico bacteriano o un ácido nucleico vírico.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el ácido nucleico vírico es un ácido nucleico del virus de la hepatitis C (VHC), tal como el genotipo 5 de VHC.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, o una secuencia complementaria de la misma.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3-4, en el que el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, o una secuencia complementaria de la misma, el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de la misma y/o la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una secuencia complementaria de la misma.

6. Un kit para amplificar y detectar y/o cuantificar un ácido nucleico diana en una muestra que comprende reactivos de amplificación para realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ultrarrápida, comprendiendo los reactivos de amplificación:

(a) una enzima que comprende actividad ADN polimerasa;

(b) monómeros de nucleósido trifosfato u otros monómeros nucleosídicos;

(c) al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso que se hibrida específicamente a una porción del ácido nucleico diana adecuada para generar al menos un amplicón bicatenario que se puede usar directamente como molde en etapas de amplificación subsiguientes de la reacción en cadena de la polimerasa ultrarrápida;

(d) al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible, en el que: (i) el oligonucleótido auxiliar no extensible no se extiende, y (ii) el oligonucleótido auxiliar no extensible y al menos uno de los cebadores se hibridan a la misma porción del ácido nucleico diana; y (iii) el oligonucleótido auxiliar no extensible en el extremo 3' comprende además una modificación que consiste en una secuencia de poli(A) de entre 4-12 nucleótidos de longitud que no se hibrida al ácido nucleico diana, con lo que el oligonucleótido auxiliar no extensible mejora la eficacia de amplificación de la reacción de amplificación; y

(e) al menos una sonda detectable para el ácido nucleico diana.

7. El kit de la reivindicación 6, en el que el ácido nucleico diana es un ácido nucleico bacteriano o un ácido nucleico vírico.
- 5 8. El kit de la reivindicación 6 o 7, en el que el ácido nucleico vírico es un ácido nucleico de VHC, tal como el genotipo 5 de VHC.
9. El kit de la reivindicación 8, en el que el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, o una secuencia complementaria de la misma.
- 10 10. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en el que el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO:1, o una secuencia complementaria de la misma; el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de la misma; y/o la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una
- 15 secuencia complementaria de la misma.
11. Una mezcla de reacción eficaz para amplificar y detectar y/o cuantificar un ácido nucleico diana en una muestra en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ultrarrápida que comprende reactivos de amplificación que comprenden:
- 20 (a) una muestra;
- (b) una enzima que comprende actividad ADN polimerasa;
- 25 (c) monómeros de nucleósido trifosfato u otros monómeros nucleosídicos;
- (d) al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso que se hibrida específicamente a una porción del ácido nucleico diana adecuada para generar al menos un amplicón bicatenario que se puede usar directamente como molde en etapas de amplificación subsiguientes de la reacción en cadena de la polimerasa ultrarrápida;
- 30 (e) al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible, en el que: (i) el oligonucleótido auxiliar no extensible no se extiende, y (ii) el oligonucleótido auxiliar no extensible y al menos uno de los cebadores se hibridan a la misma porción del ácido nucleico diana; y (iii) el oligonucleótido auxiliar no extensible en el extremo 3' comprende además una modificación que consiste en una secuencia de poli(A) de entre 4-12 nucleótidos de longitud que no se hibrida
- 35 al ácido nucleico diana, con lo que el oligonucleótido auxiliar no extensible mejora la eficacia de amplificación de la reacción de amplificación; y
- (f) al menos una sonda detectable para el ácido nucleico diana.
- 40 12. La mezcla de reacción de la reivindicación 11, en la que el ácido nucleico diana es VHC, tal como el genotipo 5 de VHC.
13. La mezcla de reacción de la reivindicación 12, en la que el al menos un oligonucleótido auxiliar no extensible comprende la secuencia de SEQ ID NO:5, o una secuencia complementaria de la misma.
- 45 14. La mezcla de reacción de la reivindicación 12 o 13, en la que el al menos un cebador directo comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, o una secuencia complementaria de la misma; el al menos un cebador inverso comprende la secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:2 y 3, o una secuencia complementaria de la misma; y/o la al menos una sonda comprende la secuencia de SEQ ID NO:4, o una
- 50 secuencia complementaria de la misma.

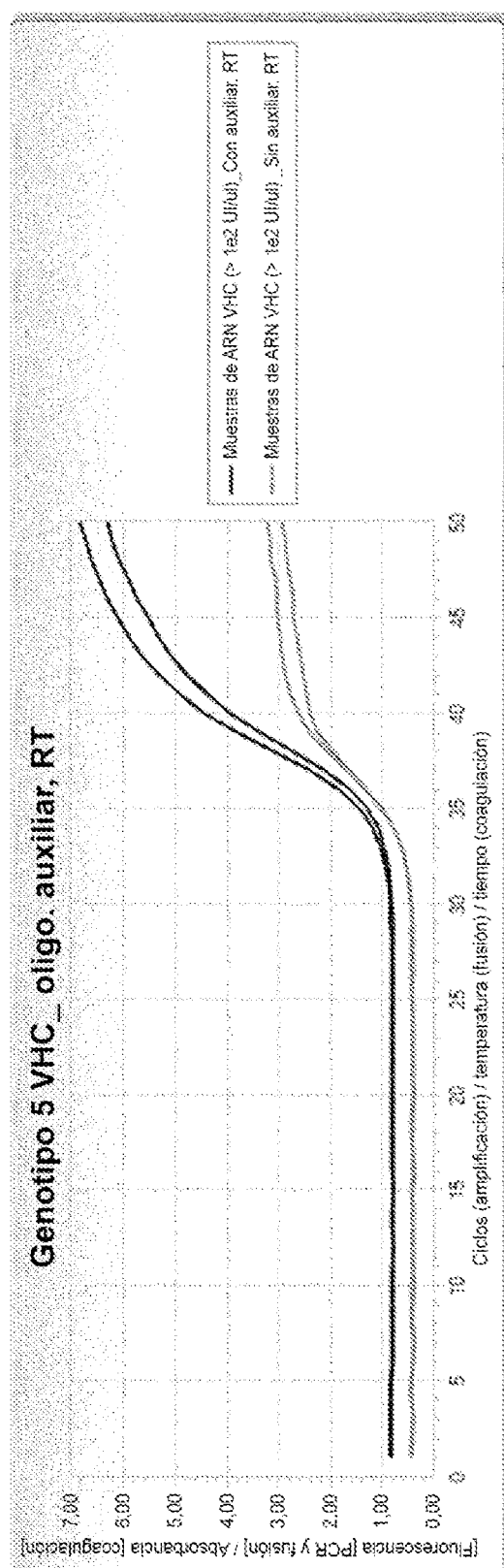


Figura 1

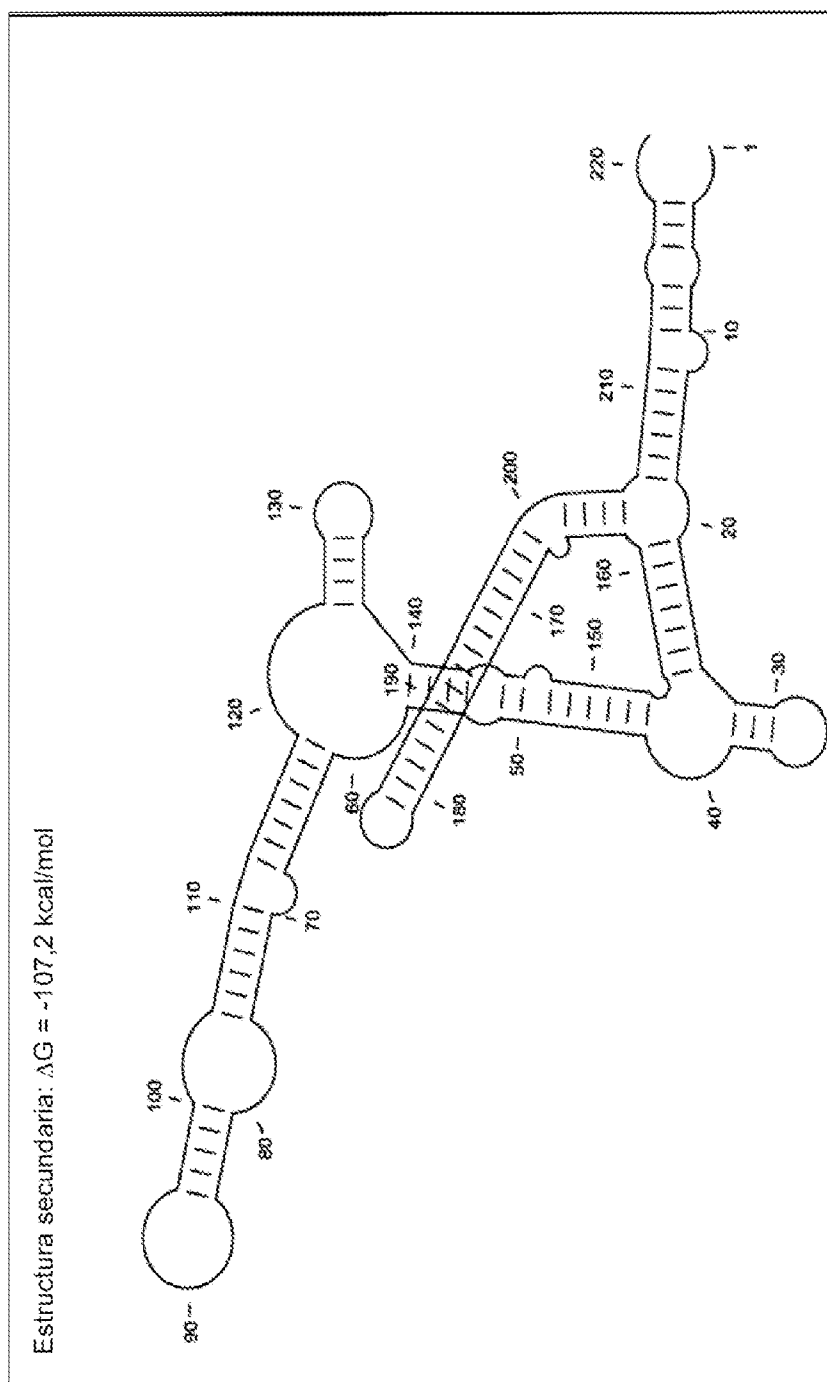


Figura 2

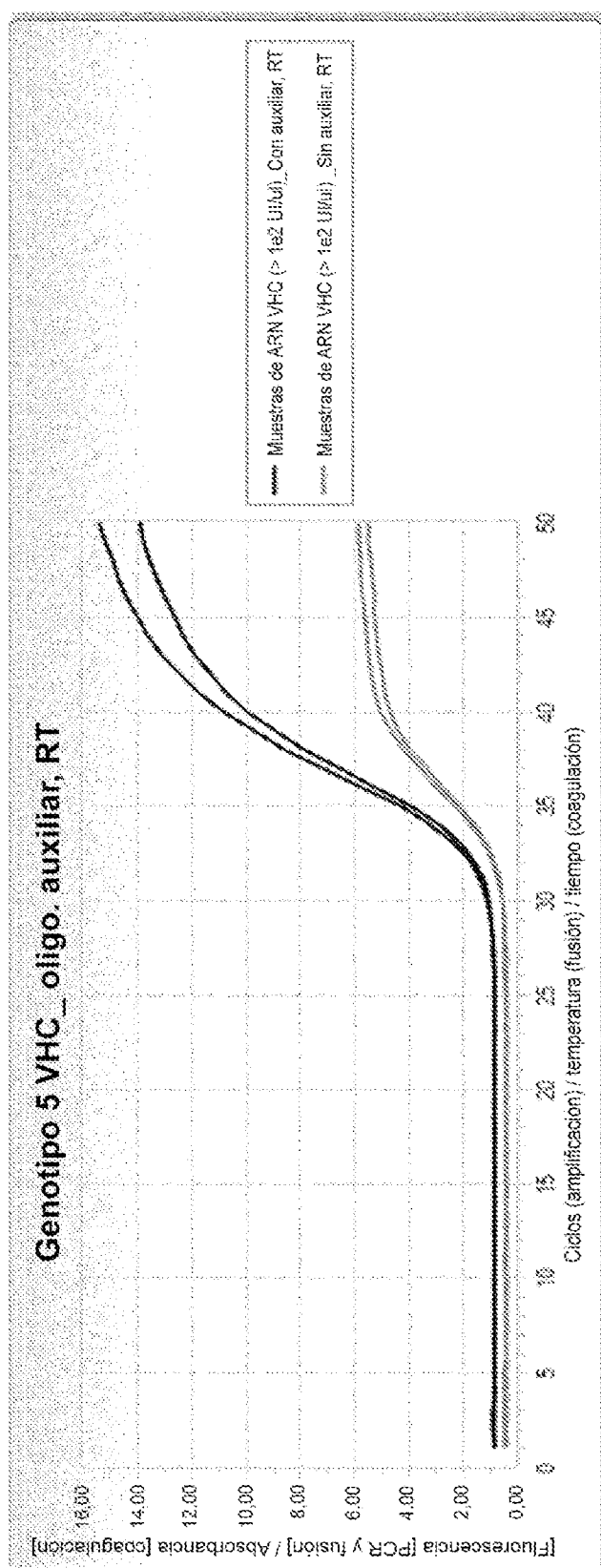


Figura 3

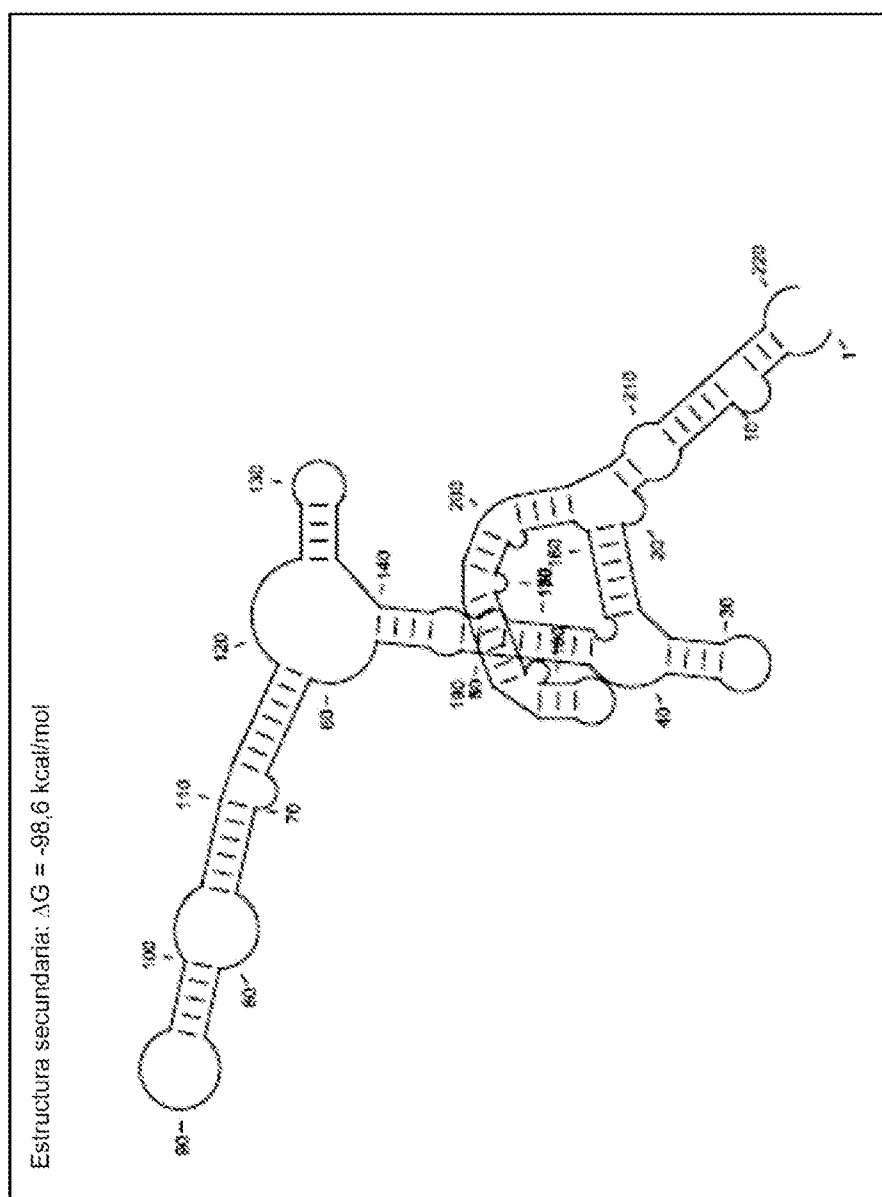


Figura 4