

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 886 605**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6848 (2008.01)

C12Q 1/6851 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2016** **PCT/EP2016/082696**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.07.2017** **WO17114823**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2016** **E 16828748 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.06.2021** **EP 3397775**

54 Título: **Procedimiento genérico para la estabilización de ARN específico**

30 Prioridad:

28.12.2015 US 201562271614 P

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

20.12.2021

73 Titular/es:

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)

Sandhofer Straße 116

68305 Mannheim, DE y

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)

72 Inventor/es:

GUPTA, AMAR

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 886 605 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

Procedimiento genérico para la estabilización de ARN específico

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo del diagnóstico *in vitro*, y en particular a la detección y cuantificación de ácidos nucleicos a través de tecnología de amplificación.

10 **Antecedentes de la invención**

En el campo del diagnóstico molecular, la amplificación de ácidos nucleicos a partir de numerosas fuentes ha tenido una considerable importancia. Los ejemplos de aplicaciones de diagnóstico de amplificación y detección de ácidos nucleicos son la detección de virus, tales como el virus del papiloma humano (VPH), el virus del Nilo Occidental (VNO) o el cribado rutinario de donaciones de sangre para detectar la presencia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB) y/o C (VHC). Además, dichas técnicas de amplificación son adecuadas para dianas bacterianas tales como micobacterias, o el análisis de marcadores oncológicos.

La técnica de amplificación más destacada y ampliamente usada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Otras reacciones de amplificación comprenden, entre otras, la reacción en cadena de la ligasa, reacción en cadena de la polimerasa-ligasa, Gap-LCR, reacción en cadena de reparación, 3SR, NASBA, amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación por QB. 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.

En el campo de los diagnósticos clínicos de ácidos nucleicos es lo más deseable o incluso obligatorio controlar la amplificación respectiva usando ácidos nucleicos de control con una secuencia conocida, para propósitos cualitativos (control del rendimiento) y/o cuantitativos (determinación de la cantidad de un ácido nucleico diana usando el control como referencia). Dada la diversidad especialmente de dianas diagnósticas, que comprenden ácidos nucleicos procarióticos, eucarióticos así como víricos, y dada la diversidad entre diferentes tipos de ácidos nucleicos tales como ARN y ADN, los ácidos nucleicos de control normalmente se diseñan de una manera específica. En resumen, estos controles normalmente se asemejan al ácido nucleico diana para el que sirven como control para imitar sus propiedades durante el procedimiento. Esta circunstancia se aplica tanto para ensayos cualitativos como cuantitativos. En caso de que se vayan a detectar múltiples parámetros en un único experimento o en experimentos paralelos, normalmente se emplean diferentes controles que se asemejan a diferentes ácidos nucleicos diana, tales como, por ejemplo, en Swanson *et al.* (J. Clin. Microbiol., 2004, 42, pp. 1863-1868). Stöcher *et al.* (J. Virol. Meth., 2003, 108, pp. 1-8) divulgan un ácido nucleico de control en el que están comprendidos múltiples controles competitivos específicos de virus en la misma molécula de ADN.

En los últimos años, se han desarrollado ensayos de diagnóstico y ensayos para especies de ARNm específico en base a la detección de secuencias de ácidos nucleicos específicos. Muchos de estos ensayos se han adaptado para determinar la concentración absoluta de una especie de ARN específico. Estos ensayos de cuantificación absoluta requieren el uso de un patrón de ARN del que se ha determinado previamente la cantidad precisa. Estos patrones de ARN normalmente se sintetizan por transcripción *in vitro* o son los propios agentes infecciosos. El ARN se purifica y a continuación se cuantifica por varios procedimientos diferentes, tales como absorbancia a DO₂₆₀, análisis de fosfato, hipercromía o análisis de trazadores isotópicos (Collins, 1995).

Debido a la inestabilidad térmica inherente del ARN y las omnipresentes fuentes de contaminación por RNasa, tanto el ARNm específico de interés como los ARN usados como patrones a menudo se someten a una degradación no deseada durante la adquisición de muestra, el almacenamiento u otros procedimientos corriente abajo, lo que a menudo da como resultado fallas en las pruebas o sensibilidad de detección disminuida.

Un procedimiento común para estabilizar ARN es el llamado procedimiento de "ARN blindado", donde el ARN se encapsula usando las proteínas de la cubierta de un bacteriófago para crear partículas pseudovíricas (y como se describe además en los documentos US 5.677.124 y US 5.939.262). Otro procedimiento de encapsulación de ARN implica la tecnología AccuPlex (SeraCare Life Sciences, Milford MA) en la que el ARN de interés se genera por exocitosis en el interior de la envoltura de un virus de mamífero. Sin embargo, la protección de ARN ofrecida por estas partículas encapsuladas está limitada a temperaturas elevadas. El documento US 5939262 se refiere a la preparación y utilización de ARN resistente a ribonucleasa. Claramente, existe la necesidad de procedimientos y composiciones novedosos que incrementen el tiempo de vida útil del ARN en productos desarrollados en áreas donde la refrigeración puede ser limitada.

Sumario de la invención

El alcance de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación se refiere a procedimientos y composiciones para la estabilización de moléculas de ARN específico que pueden ser la diana para la detección o bien el patrón de control.

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de prevención o reducción de la degradación de un segmento de un molde de ARN monocatenario que se amplifica en una reacción de amplificación, comprendiendo el procedimiento las etapas de proporcionar el molde de ARN monocatenario; hibridar el molde de ARN monocatenario con uno o más oligonucleótidos con secuencias que son completa o parcialmente complementarias al segmento del molde de ARN monocatenario que se amplifica, en el que el uno o más oligonucleótidos se hibridan con más de un 48 % del segmento del molde de ARN monocatenario que se amplifica; y retrotranscribir y amplificar el segmento del molde de ARN monocatenario en condiciones de reacción con lo que el uno o más oligonucleótidos no interfieren con la retrotranscripción y la amplificación y con lo que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos se caracteriza por tener entre 11 nucleótidos y 50 nucleótidos de longitud y tener una temperatura de fusión que es al menos 5 °C menor que una temperatura de extensión usada durante la amplificación, y en el que la secuencia de cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos no se superpone con la secuencia de otro oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos; y el uno o más oligonucleótidos están presentes a una concentración que es al menos cincuenta veces menor que las concentraciones de los cebadores y sondas usados durante la retrotranscripción y la amplificación. Por el presente documento, el uno o más oligonucleótidos no sirven como cebadores, sondas o moldes durante la retrotranscripción y la amplificación. En otro modo de realización, cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos está presente a una concentración que está entre 0,1 nM y 2,0 nM. En un modo de realización, el uno o más oligonucleótidos se hibridan con más de un 60 %, más de un 75 % o más de un 90 % del segmento del molde de ARN monocatenario que se amplifica. En un modo de realización, el uno o más oligonucleótidos se hibridan con todo el segmento del molde de ARN monocatenario que se amplifica. En un modo de realización, cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos tiene entre 11 nucleótidos y 40 nucleótidos de longitud o entre 11 nucleótidos y 30 nucleótidos de longitud. En determinados modos de realización, la pluralidad de oligonucleótidos se hibrida con más de un 90 % del segmento de la molécula de ARN monocatenario, en la que cada oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos tiene entre 11 y 30 nucleótidos de longitud. En otro modo de realización, cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos tiene una temperatura de fusión que varía entre 20 °C y 80 °C, o entre 30 °C y 70 °C, o entre 40 °C y 70 °C, o entre 40 °C y 60 °C. Aún en otro modo de realización, la secuencia de cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos no se superpone con la secuencia de otro oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos. En otro modo de realización, el molde de ARN monocatenario está enjaulado. El enjaulado se puede lograr por medio de encapsulación, encapsidación, captura o por estar el molde de ARN en el interior de una célula. En otro modo de realización, se realiza una etapa de aislamiento o purificación del molde de ARN monocatenario antes de la etapa de retrotranscripción y amplificación. En otro modo de realización, el uno o más oligonucleótidos comprenden un grupo de oligonucleótidos con secuencias que se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-10, 11-19, 20-27 y 28-35.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de detección de la presencia de una secuencia de ARN sometida a prueba en una muestra de ácido nucleico durante una reacción de amplificación que comprende obtener la muestra de ácido nucleico; obtener un patrón de ácido nucleico que sirva como patrón en la detección y/o cuantificación de la secuencia de ARN sometida a prueba en el que el patrón de ácido nucleico comprende una secuencia de control de ARN monocatenario y uno o más oligonucleótidos con secuencias que son completa o parcialmente complementarias a un segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario, en el que el uno o más oligonucleótidos se hibridan con más de un 48 % del segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario; mezclar la muestra y el patrón de ácido nucleico; proporcionar condiciones para realizar la retrotranscripción y la amplificación tanto de la secuencia de ARN sometida a prueba como del segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario, en el que, en estas condiciones, el uno o más oligonucleótidos no interfieren con la retrotranscripción y la amplificación y con lo que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos se caracteriza por tener entre 11 nucleótidos y 50 nucleótidos de longitud y tener una temperatura de fusión que es al menos 5 °C menor que una temperatura de extensión usada durante la amplificación, y en el que la secuencia de cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos no se superpone con la secuencia de otro oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos; y el uno o más oligonucleótidos están presentes a una concentración que es al menos cincuenta veces menor que las concentraciones de los cebadores y sondas usados durante la retrotranscripción y la amplificación; y detectar productos de amplificación de la secuencia de ARN sometida a prueba y de la secuencia de control de ARN monocatenario. Por el presente documento, el uno o más oligonucleótidos no sirven como cebadores, sondas o moldes durante la retrotranscripción y la amplificación. En otro modo de realización, cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos está presente a una concentración que está entre 0,1 nM y 2,0 nM. En un modo de realización, el uno o más oligonucleótidos se hibridan con más de un 60 %, más de un 75 % o más de un 90 % del segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario que se amplifica. En un modo de realización, el uno o más oligonucleótidos se hibridan con todo el segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario. En un modo de realización, cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos tiene entre 11 nucleótidos y 40 nucleótidos de longitud o entre 11 nucleótidos y 30 nucleótidos de longitud. En determinados modos de realización, la pluralidad de oligonucleótidos se hibrida con más de un 90 % del segmento de la molécula de ARN monocatenario, en la que cada oligonucleótido de la pluralidad de

oligonucleótidos tiene entre 11 y 30 nucleótidos de longitud. En otro modo de realización, cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos tiene una temperatura de fusión que varía entre 20 °C y 80 °C, o entre 30 °C y 70 °C, o entre 40 °C y 70 °C, o entre 40 °C y 60 °C. Aún en otro modo de realización, la secuencia de cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos no se superpone con la secuencia de otro oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos. En un modo de realización, la secuencia de control de ARN monocatenario está enjaulada. En algunos modos de realización, la secuencia de control de ARN monocatenario se enjaula por medios seleccionados del grupo que consiste en encapsulación, encapsidación, captura y estar en el interior de una célula. En otro modo de realización, se realiza una etapa de aislamiento o purificación tanto de la secuencia de ARN sometida a prueba como del segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario antes de la etapa de proporcionar condiciones para realizar la retrotranscripción y la amplificación. En otro modo de realización, el uno o más oligonucleótidos comprenden un grupo de oligonucleótidos con secuencias que se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-10, 11-19, 20-27 y 28-35.

Se divulga además un patrón de ácido nucleico que sirve como patrón en la detección y/o cuantificación de una secuencia de ARN sometida a prueba que se amplifica en una reacción de amplificación en el que el patrón de ácido nucleico comprende una secuencia de control de ARN monocatenario y uno o más oligonucleótidos con secuencias que son completa o parcialmente complementarios a un segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario y se hibridan con más de un 48 % del segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario. En el presente documento, el uno o más oligonucleótidos no sirven como cebadores, sondas o moldes durante la reacción de amplificación. También se divulga que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos tiene una temperatura de fusión que es al menos 5 °C menor que una temperatura de extensión usada durante la reacción de amplificación. También se divulga que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos tiene una temperatura de fusión que es al menos 5 °C menor que las temperaturas de fusión de los cebadores y sondas usados durante la reacción de amplificación. También se divulga que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos está presente a una concentración que es al menos cincuenta veces menor que la concentración de los cebadores y sondas usados durante la reacción de amplificación. También se divulga que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos está presente a una concentración que está entre 0,1 nM y 2,0 nM. También se divulga que el uno o más oligonucleótidos se hibridan con más de un 60 %, más de un 75 % o más de un 90 % del segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario. También se divulga que el uno o más oligonucleótidos se hibridan con todo el segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario. También se divulga que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos tiene entre 11 nucleótidos y 50 nucleótidos o entre 11 nucleótidos y 40 nucleótidos de longitud o entre 11 nucleótidos y 30 nucleótidos de longitud. También se divulga que la pluralidad de oligonucleótidos se hibrida con más de un 90 % del segmento de la molécula de ARN monocatenario, en la que cada oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos tiene entre 11 y 30 nucleótidos de longitud. También se divulga que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos tiene una temperatura de fusión que varía entre 20 °C y 80 °C, o entre 30 °C y 70 °C, o entre 40 °C y 70 °C, o entre 40 °C y 60 °C. También se divulga que la secuencia de cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos no se superpone con la secuencia de otro oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos. También se divulga que la secuencia de control de ARN monocatenario está enjaulada. El enjaulado se puede lograr por medio de encapsulación, encapsidación, captura o por estar el molde de ARN en el interior de una célula. También se divulga que el uno o más oligonucleótidos comprenden un grupo de oligonucleótidos con secuencias que se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-10, 11-19, 20-27 y 28-35.

Se divulga además un procedimiento de prevención o reducción de la degradación de un segmento de una molécula de ARN monocatenario, comprendiendo el procedimiento las etapas de proporcionar la molécula de ARN monocatenario; e hibridar la molécula de ARN monocatenario con una pluralidad de oligonucleótidos con secuencias que son completa o parcialmente complementarias al segmento de la molécula de ARN monocatenario, en el que la pluralidad de oligonucleótidos se hibrida con más de un 48 % del segmento de la molécula de ARN monocatenario, en el que cada oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos tiene entre 11 nucleótidos y 50 nucleótidos de longitud. También se divulga que la pluralidad de oligonucleótidos se hibrida con más de un 60 %, más de un 75 % o más de un 90 % del segmento de la molécula de ARN monocatenario. También se divulga que la pluralidad de oligonucleótidos se hibrida con todo el segmento de la molécula de ARN monocatenario. También se divulga que cada oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos tiene entre 11 nucleótidos y 40 nucleótidos de longitud o entre 11 nucleótidos y 30 nucleótidos de longitud. También se divulga que la pluralidad de oligonucleótidos se hibrida con más de un 90 % del segmento de la molécula de ARN monocatenario, en la que cada oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos tiene entre 11 y 30 nucleótidos de longitud. También se divulga que cada oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos tiene una temperatura de fusión que varía entre 20 °C y 80 °C, o entre 30 °C y 70 °C, o entre 40 °C y 70 °C, o entre 40 °C y 60 °C. También se divulga que la secuencia de cada oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos no se superpone con la secuencia de otro oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos. También se divulga que la molécula de ARN monocatenario está enjaulada. El enjaulado se puede lograr por medio de encapsulación, encapsidación, captura o por estar la molécula de ARN en el interior de una célula. También se divulga que las etapas de proporcionar e hibridar se llevan a cabo en solución. También se divulga que la pluralidad de oligonucleótidos comprende un grupo de oligonucleótidos con secuencias que se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-10, 11-19, 20-27 y 28-35. También se divulga el uso de uno o más oligonucleótidos para prevenir o reducir la degradación de un segmento de una molécula de ARN monocatenario que se va a someter a

una reacción de retrotranscripción o una reacción de retrotranscripción y amplificación, en el que las secuencias de dicho uno o más oligonucleótidos son completa o parcialmente complementarias al segmento del ARN monocatenario. También se divulga que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos tiene una temperatura de fusión que es al menos 5 °C menor que una temperatura de extensión usada en la reacción de retrotranscripción o la reacción de retrotranscripción y amplificación. También se divulga que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos tiene una temperatura de fusión que es al menos 5 °C menor que las temperaturas de fusión de los cebadores y sondas usados durante la reacción de retrotranscripción o la reacción de retrotranscripción y amplificación. También se divulga que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos está presente a una concentración que es al menos cincuenta veces menor que la concentración de cebadores y sondas usados durante la reacción de retrotranscripción o la reacción de retrotranscripción y amplificación. También se divulga que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos está presente a una concentración que está entre 0,1 nM y 2,0 nM. También se divulga que el uno o más oligonucleótidos se hibridan con más de un 48 % del segmento del ARN monocatenario. También se divulga que el uno o más oligonucleótidos se hibridan con más de un 60 %, más de un 75 % o más de un 90 % del segmento del ARN monocatenario. También se divulga que el uno o más oligonucleótidos se hibridan con todo el segmento del ARN monocatenario. También se divulga que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos tiene entre 11 nucleótidos y 50 nucleótidos o entre 11 nucleótidos y 40 nucleótidos de longitud o entre 11 nucleótidos y 30 nucleótidos de longitud. También se divulga que la pluralidad de oligonucleótidos se hibrida con más de un 90 % del segmento del ARN monocatenario, en la que cada oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos tiene entre 11 y 30 nucleótidos de longitud. También se divulga que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos tiene una temperatura de fusión que varía entre 20 °C y 80 °C, o entre 30 °C y 70 °C, o entre 40 °C y 70 °C, o entre 40 °C y 60 °C. También se divulga que la secuencia de cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos no se superpone con la secuencia de otro oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos. También se divulga que el ARN monocatenario está enjaulado. El enjaulado se puede lograr por medio de encapsulación, encapsidación, captura o por estar el molde de ARN en el interior de una célula. También se divulga que el ARN es al menos una secuencia de control de ARN monocatenario. También se divulga que el ARN es al menos una secuencia de molde de ARN monocatenario. También se divulga que el ARN es una mezcla de al menos una secuencia de control de ARN monocatenario único y al menos una secuencia de molde de ARN monocatenario. También se divulga que la degradación del segmento de un ARN monocatenario se previene o reduce durante un período de al menos 18 días a una temperatura de incubación de 37 °C. También se divulga que la degradación del segmento de un ARN monocatenario se previene o reduce durante un período de al menos 18 días a una temperatura de incubación de 45 °C. También se divulga que la degradación del segmento de un ARN monocatenario se previene o reduce durante un período de al menos 45 días a una temperatura de incubación de 37 °C o 45 °C. También se divulga que la degradación del segmento de un ARN monocatenario se previene o reduce durante un período de al menos 71 días a una temperatura de incubación de 37 °C o 45 °C. También se divulga que la degradación del segmento de un ARN monocatenario se previene o reduce durante un período de al menos 12 semanas a una temperatura de incubación de 37 °C o 45 °C. También se divulga que el uno o más oligonucleótidos comprenden un grupo de oligonucleótidos con secuencias que se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-10, 11-19, 20-27 y 28-35.

Se divulga además una mezcla para prevenir o reducir la degradación de un segmento de una molécula de ARN monocatenario, comprendiendo la mezcla en solución una molécula de ARN monocatenario y una pluralidad de oligonucleótidos con secuencias que son completa o parcialmente complementarias al segmento de la molécula de ARN monocatenario, en la que la pluralidad de oligonucleótidos se hibrida con más de un 48 % del segmento de la molécula de ARN monocatenario y en la que cada oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos tiene entre 11 nucleótidos y 50 nucleótidos de longitud. También se divulga que la pluralidad de oligonucleótidos se hibrida con más de un 60 %, más de un 75 % o más de un 90 % del segmento de la molécula de ARN monocatenario. También se divulga que la pluralidad de oligonucleótidos se hibrida con todo el segmento de la molécula de ARN monocatenario. También se divulga que cada oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos tiene entre 11 nucleótidos y 40 nucleótidos de longitud o entre 11 nucleótidos y 30 nucleótidos de longitud. También se divulga que la pluralidad de oligonucleótidos se hibrida con más de un 90 % del segmento de la molécula de ARN monocatenario, en la que cada oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos tiene entre 11 y 30 nucleótidos de longitud. También se divulga que cada oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos tiene una temperatura de fusión que varía entre 20 °C y 80 °C, o entre 30 °C y 70 °C, o entre 40 °C y 70 °C, o entre 40 °C y 60 °C. También se divulga que la secuencia de cada oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos no se superpone con la secuencia de otro oligonucleótido de la pluralidad de oligonucleótidos. También se divulga que la molécula de ARN monocatenario está enjaulada. El enjaulado se puede lograr por medio de encapsulación, encapsidación, captura o por estar la molécula de ARN en el interior de una célula. También se divulga que la mezcla comprende además un tampón y sales adecuadas para realizar una reacción de retrotranscripción o una reacción de retrotranscripción y amplificación. También se divulga que la pluralidad de oligonucleótidos comprende un grupo de oligonucleótidos con secuencias que se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-10, 11-19, 20-27 y 28-35.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra los resultados de un análisis de UPLC del agrupamiento de oligonucleótidos complementarios usado en los experimentos de estabilidad.

La FIG. 2 muestra los resultados de un estudio de estabilidad de 18 días del transcrito de ARN PEF066 en presencia de oligonucleótidos complementarios. Se incubaron las muestras a 2-8 °C, 37 °C y 45 °C, y se amplificaron y detectaron por RT-PCR, donde un umbral (valor) de ciclo incrementado era indicativo de degradación de la muestra.

La FIG. 3 muestra los resultados de un estudio de estabilidad de 18 días del control de ARN blindado PEF070 en presencia de oligonucleótidos complementarios. Se incubaron las muestras a 2-8 °C, 37 °C y 45 °C, y se amplificaron y detectaron por RT-PCR, donde un umbral (valor) de ciclo incrementado era indicativo de degradación de la muestra.

La FIG. 4 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR de un estudio de estabilidad de 12 semanas de un transcrito de ARN PEF066 en ausencia o presencia de oligonucleótidos complementarios. Se incubaron las muestras a 4 °C, 37 °C y 45 °C, y se amplificaron y detectaron por RT-PCR, donde un umbral (valor) de ciclo incrementado era indicativo de degradación de la muestra.

La FIG. 5 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR de un estudio de estabilidad de 71 días de un transcrito de ARN de LTR de VIH-2 en ausencia o presencia de oligonucleótidos complementarios. Se incubaron las muestras a 4 °C, 37 °C y 45 °C, y se amplificaron y detectaron por RT-PCR, donde un umbral (valor) de ciclo incrementado era indicativo de degradación de la muestra.

La FIG. 6 muestra los resultados de un estudio de estabilidad de un control de ARN encapsulado en Accuplex en ausencia (SIN COPS) o presencia (COPS 10 nM) de oligonucleótidos complementarios. Las muestras incubadas a 4 °C, 37 °C o bien 45 °C durante 1 día, 15 días o 71 días se amplificaron y detectaron por RT-PCR, donde el umbral de ciclo (valor C_p) incrementado era indicativo de degradación de la muestra.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los "reactivos de amplificación" son componentes químicos o bioquímicos que posibilitan la amplificación de ácidos nucleicos. Dichos reactivos comprenden, pero no se limitan a, ácido nucleico polimerasas, tampones, mononucleótidos tales como nucleósidos trifosfato, oligonucleótidos, por ejemplo, como cebadores de oligonucleótidos, sales y sus respectivas soluciones, sondas de detección, tintes y más.

Como es conocido en la técnica, un "nucleósido" es una combinación base-glúcido. La porción de base del nucleósido es, normalmente, una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de dichas bases heterocíclicas son purinas y pirimidinas.

Los "nucleótidos" son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de glúcido del nucleósido. Para los nucleósidos que incluyen un glúcido pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar unido al resto 2', 3' o 5'-hidroxilo del glúcido. Un nucleótido es la unidad monomérica de un "oligonucleótido", que se puede designar más en general como un "compuesto oligomérico", o un "polinucleótido", designado más en general como un "compuesto polimérico". Otra expresión general de lo anteriormente mencionado es ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN).

Un "compuesto oligomérico" es un compuesto que consiste en "unidades monoméricas" que pueden ser nucleótidos solos o compuestos no naturales (véase a continuación), más específicamente nucleótidos modificados (o análogos nucleotídicos) o compuestos no nucleotídicos, solos o combinaciones de los mismos.

"Oligonucleótidos" y "oligonucleótidos modificados" (o "análogos oligonucleotídicos") son subgrupos de compuestos oligoméricos. En el presente documento, el término "oligonucleótido" se refiere a componentes formados a partir de una pluralidad de nucleótidos como sus unidades monoméricas. Los grupos fosfato hacen referencia comúnmente a que forman la cadena principal internucleósido del oligonucleótido. El enlace o cadena principal normal del ARN y el ADN es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'. Los oligonucleótidos y oligonucleótidos modificados se pueden sintetizar como se describe principalmente en la técnica y es conocido por el experto en la técnica. Los procedimientos para preparar compuestos oligoméricos de secuencias específicas son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas y síntesis química directa. Los procedimientos de síntesis química pueden incluir, por ejemplo, el procedimiento de fosfotriéster descrito por Narang S. A. *et al.*, *Methods in Enzymology* 68 (1979) 90-98, el procedimiento de fosfodiéster divulgado por Brown E. L., *et al.*, *Methods in Enzymology* 68 (1979) 109-151, el procedimiento de fosforamidita divulgado en Beaucage *et al.*, *Tetrahedron Letters* 22 (1981) 1859, el procedimiento de H-fosfonato divulgado en Garegg *et al.*, *Chem. Scr.* 25 (1985) 280-282 y el procedimiento de soporte sólido divulgado en el documento US 4.458.066.

En el procedimiento descrito anteriormente, los oligonucleótidos se pueden modificar químicamente, es decir, el cebador y/o la sonda comprenden un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. La sonda o el cebador

es a continuación un oligonucleótido modificado.

Los "nucleótidos modificados" (o "análogos nucleotídicos") difieren de un nucleótido natural en alguna modificación pero consisten todavía en una base, un glúcido pentofuranosilo, una porción de fosfato, una porción de tipo base de tipo glúcido pentofuranosilo y de tipo fosfato o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, se puede fijar un marcador 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 ejemplo, por una 7-desazapurina, con lo que también se obtiene un nucleótido modificado.

Un "oligonucleótido modificado" (o "análogo oligonucleotídico"), perteneciente a otro subgrupo específico de compuestos oligoméricos, posee uno o más nucleótidos y uno o más nucleótidos modificados como unidades monoméricas. Por tanto, el término "oligonucleótido modificado" (o "análogo oligonucleotídico") se refiere a estructuras que funcionan de manera sustancialmente similar a los oligonucleótidos y se pueden usar de manera intercambiable. Desde un punto de vista de síntesis, un oligonucleótido modificado (o un análogo oligonucleotídico) se puede preparar, por ejemplo, por modificación química de oligonucleótidos por modificación apropiada de la cadena principal de fosfato, unidad de ribosa o las bases nucleotídicas (Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90 (1990) 543; Verma S., y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134). Las modificaciones representativas incluyen enlaces entre nucleósidos fosforotioato, fosforditioato, metilfosfonato, fosfotriéster o fosforamidato en lugar de enlaces internucleosídicos fosfodiéster; desaza- o azapurinas y -pirimidinas en lugar de bases de purina y pirimidina naturales, bases de pirimidina que tienen grupos sustituyentes en la posición 5 o 6; bases de purina que tienen grupos sustituyentes alterados en las posiciones 2, 6 u 8 o en la posición 7 como 7-desazapurinas; bases que llevan restos alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo, por ejemplo, grupos alquilo inferiores tales como grupos metilo, etilo, propilo, butilo, *tert*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo o arilo como fenilo, bencilo, naftilo; glúcidos que tienen grupos sustituyentes en, por ejemplo, su posición 2'; o análogos glucídicos carbocíclicos o acíclicos. Otras modificaciones son conocidas por los expertos en la técnica. Dichos oligonucleótidos modificados (o análogos oligonucleotídicos) se describen mejor como que son funcionalmente intercambiables con, aunque estructuralmente diferentes de, oligonucleótidos naturales. Con más detalle, se divulgan modificaciones ejemplares en Verma S. y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134 o el documento WO 02/12263. Además, se puede realizar una modificación en la que las unidades nucleosídicas se unen por medio de grupos que sustituyen a los enlaces fosfato internucleosídicos o enlaces fosfato-glúcido. Dichos enlaces incluyen los divulgados en Verma S. y Eckstein F., Annu. Rev. Biochem. 67 (1998) 99-134. Cuando se utilizan enlaces distintos de fosfato para unir las unidades nucleosídicas, dichas estructuras también se han descrito como "oligonucleósidos".

Un "ácido nucleico", así como el "ácido nucleico diana", es un compuesto polimérico de nucleótidos como es conocido por el experto en la técnica. En el presente documento se usa "ácido nucleico diana" para designar un ácido nucleico en una muestra que se debe analizar, es decir, se debe determinar la presencia, no presencia y/o cantidad del mismo en una muestra. El término "cebador" se usa en el presente documento como es conocido por el experto 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 cebador, por ejemplo, proporciona un grupo 3'-OH libre al que se pueden fijar nucleótidos adicionales por una ADN polimerasa dependiente de molde estableciendo un enlace fosfodiéster de 3' a 5' con lo que se usan desoxinucleósidos trifosfato y con lo que se libera pirofosfato. Una "sonda" también designa un oligonucleótido natural o modificado. Como se conoce en la técnica, una sonda tiene el propósito de detectar un analito o un amplificado. En el caso del procedimiento descrito anteriormente, se pueden usar sondas para detectar los amplificados de los ácidos nucleicos diana. Para este propósito, las sondas llevan típicamente marcadores.

Los "marcadores", a menudo denominados "grupos indicadores", en general son grupos que hacen que un ácido nucleico, en particular oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados, así como cualquier ácido nucleico unido a los mismos, sea distinguible del resto de la muestra (los ácidos nucleicos que tienen un marcador fijado también se pueden denominar compuestos de unión a ácido nucleico marcado, sondas marcadas o simplemente sondas). Los marcadores ejemplares son marcadores fluorescentes, que son, por ejemplo, tintes fluorescentes tales como un tinte de fluoresceína, un tinte de rodamina, un tinte de cianina y un tinte de cumarina. Los tintes fluorescentes ejemplares son FAM, HEX, JA270, CAL635, Coumarin343, Quasar705, Cyan500, CY5.5, LC-Red 640, LC-Red 705.

Cualquier cebador y/o sonda se puede modificar químicamente, es decir, el cebador y/o la sonda comprende un nucleótido modificado o un compuesto no nucleotídico. La sonda o el cebador es a continuación un oligonucleótido modificado.

Un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se divulga, entre otras referencias, en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159 y 4.965.188. La PCR emplea típicamente dos o más cebadores oligonucleotídicos que se unen a un molde de ácido nucleico seleccionado (por ejemplo, ADN o ARN). Los cebadores útiles para el análisis de ácidos nucleicos incluyen oligonucleótidos que pueden actuar como un punto de inicio de la síntesis de ácido nucleico dentro de las secuencias de ácido nucleico de los ácidos nucleicos diana. Un cebador se puede purificar a partir de un

hidrolizado de restricción por procedimientos convencionales, o se puede producir sintéticamente. El cebador puede ser monocatenario para una máxima eficacia 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 de desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios es por calentamiento. Una "polimerasa termoestable" es una enzima polimerasa que es estable frente al calor, es decir, es una enzima que cataliza la formación de productos de extensión de cebador complementarios a un molde y no se desnaturaliza irreversiblemente cuando se somete a las 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 de 5' a 3' a lo largo de la hebra molde. Las polimerasas termoestables se han aislado, por ejemplo, de *Thermus flavus*, *T. ruber*, *T. thermophilus*, *T. aquaticus*, *T. lacteus*, *T. rubens*, *Bacillus stearothermophilus* y *Methanothermobacter feravidus*. No obstante, también se pueden emplear polimerasas que no son termoestables en ensayos de PCR siempre que se reponga la enzima.

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 las hebras se puede lograr por cualquier procedimiento de desnaturalización adecuado que incluya 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 los rasgos característicos de la reacción, tal como la temperatura y la longitud del ácido nucleico. La desnaturalización se realiza típicamente durante aproximadamente 5 s a 9 min. Para no exponer la respectiva polimerasa como, por ejemplo, la ADN polimerasa Z05 a dichas altas temperaturas durante demasiado tiempo y por tanto arriesgar una pérdida de enzima funcional, puede ser preferente usar etapas de desnaturalización breves.

Si el ácido nucleico molde bicatenario se desnaturaliza por calor, la mezcla de reacción se deja enfriar hasta una temperatura que promueva la hibridación de cada cebador con su secuencia diana en los ácidos nucleicos diana.

La temperatura para la hibridación puede ser de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 70 °C, o de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 65 °C; o de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C, o de aproximadamente 55 °C a aproximadamente 58 °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). En este contexto, puede ser ventajoso usar diferentes temperaturas de hibridación para incrementar la inclusividad del ensayo respectivo. En resumen, esto significa que a temperaturas de hibridación relativamente bajas, los cebadores también se pueden unir a dianas que tienen emparejamientos erróneos únicos, por lo que también se pueden amplificar variantes de determinadas secuencias. Esto puede ser deseable si, por ejemplo, un determinado organismo tiene variantes genéticas conocidas o desconocidas que también se deben detectar. Por otra parte, las temperaturas de hibridación relativamente altas tienen la ventaja de proporcionar mayor especificidad, puesto que a mayores temperaturas disminuye continuamente la probabilidad de unión del cebador a secuencias diana que no coincidan exactamente. Para beneficiarse de ambos fenómenos, en algunos modos de realización de la invención el procedimiento descrito anteriormente comprende la hibridación a diferentes temperaturas, por ejemplo, en primer lugar a una temperatura menor, a continuación a una mayor. Si, por ejemplo, una primera incubación tiene lugar a 55 °C durante aproximadamente 5 ciclos, se pueden (pre)amplificar secuencias diana que no coincidan exactamente. Esto puede ir seguido, por ejemplo, de aproximadamente 45 ciclos a 58 °C, proporcionando mayor especificidad en la mayor parte del experimento. De esta manera, no se omiten las variantes genéticas potencialmente importantes, mientras que la especificidad permanece relativamente alta.

A continuación, la mezcla de reacción se ajusta a una temperatura a la que se promueve u optimiza la actividad de la polimerasa, es decir, una temperatura suficiente para que se produzca la extensión del cebador hibridado para generar productos complementarios al ácido nucleico que se va a analizar. 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 de su molde complementario (por ejemplo, la temperatura para 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, o de aproximadamente 15 s a 2 min, o de aproximadamente 20 s a aproximadamente 1 min, o de aproximadamente 25 s a aproximadamente 35 s. Las hebras recién sintetizadas forman una molécula bicatenaria que se puede usar en las etapas sucesivas de la reacción. Las etapas de separación, hibridación y alargamiento de las hebras se pueden repetir tan a menudo como sea necesario para producir la cantidad deseada de productos de amplificación correspondientes a los ácidos nucleicos 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, desnaturalización, hibridación y extensión) se pueden repetir 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.

Se puede llevar a cabo una PCR en la que las etapas de hibridación y extensión se realizan en la misma etapa (PCR en una etapa) o, como se describe anteriormente, en etapas separadas (PCR en dos etapas). Realizar la hibridación y la extensión conjuntamente y, por tanto, en las mismas condiciones físicas y químicas, con una enzima adecuada tal como, por ejemplo, la ADN polimerasa Z05, tiene la ventaja de ahorrar el tiempo para realizar una etapa adicional en cada ciclo y también de suprimir la necesidad de realizar un ajuste de temperatura adicional entre la hibridación y la extensión. Por tanto, la PCR en una etapa reduce la complejidad global del ensayo respectivo.

En general, pueden ser preferentes tiempos más breves para la amplificación global, ya que se reduce el tiempo hasta el resultado y da lugar a un posible diagnóstico más temprano.

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico que se van a usar comprenden la reacción en cadena de la ligasa (LCR; Wu D. Y. y Wallace R. B., Genomics 4 (1989) 560-69; y Barany F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 189-193); reacción en cadena de la polimerasa-ligasa (Barany F., PCR Methods and Applic. 1 (1991) 5-16); Gap-LCR (documento WO 90/01069); reacción en cadena de reparación (documento EP 0439182 A2), 3SR (Kwoh D.Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 1173-1177; Guatelli J.C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 1874-1878; documento WO 92/08808) y NASBA (documento US 5.130.238). Además, existen amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación mediada por transcripción (TMA) y amplificación por Qb (para una revisión, véanse, por ejemplo, Whelen A. C. y Persing D. H., Annu. Rev. Microbiol. 50(1996) 349-373; Abramson R. D. y Myers T. W., Curr Opin Biotechnol 4 (1993) 41-47).

El ácido nucleico de control interno puede presentar las siguientes propiedades en relación con su secuencia:

- una temperatura de fusión de 55 °C a 90 °C, o de 65 °C a 85 °C, o de 70 °C a 80 °C, o de aproximadamente 75 °C

- una longitud de hasta 500 bases o pares de bases, o de 50 a 300 bases o pares de bases, o de 100 a 200 bases o pares de bases, o de 180 bases o pares de bases

- un contenido de GC de un 30 % a un 70 %, o de un 40 % a un 60 %, o de aproximadamente un 50 %.

Una "secuencia" es la estructura principal de un ácido nucleico, es decir, la disposición específica de las nucleobases individuales de las que consisten los ácidos nucleicos respectivos. Se ha de entender que el término "secuencia" no indica un tipo específico de ácido nucleico tal como ARN o ADN, sino que se aplica a ambos, así como a otros tipos de ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, APN u otros. Cuando las nucleobases se corresponden entre sí, en particular en el caso de uracilo (presente en el ARN) y timina (presente en el ADN), estas bases se pueden considerar equivalentes entre secuencias de ARN y ADN, como es bien conocido en la técnica pertinente.

Los ácidos nucleicos clínicamente pertinentes son a menudo ADN que se puede derivar, por ejemplo, de virus de ADN como, por ejemplo, virus de la hepatitis B (VHB), citomegalovirus (CMV) y otros, o bacterias como, por ejemplo, *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) y otros. En dichos casos, puede ser ventajoso usar un ácido nucleico de control interno que consiste en ADN, para reflejar las propiedades de los ácidos nucleicos diana.

Por otra parte, numerosos ácidos nucleicos pertinentes para el diagnóstico clínico son ácidos ribonucleicos como, por ejemplo, los ácidos nucleicos de virus de ARN tales como, por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis C (VHC), el virus del Nilo Occidental (VNO), virus del papiloma humano (VPH), virus de la encefalitis japonesa (VEJ), virus de la encefalitis de San Luis (VESL) y otros. La presente invención se puede aplicar fácilmente a dichos ácidos nucleicos. En este caso, puede ser ventajoso usar un ácido nucleico de control interno que consiste en ARN, para reflejar las propiedades de los ácidos nucleicos diana. Si se van a analizar tanto ARN como ADN en el procedimiento descrito *supra*, el ácido nucleico de control interno puede ser ARN, ya que el ácido nucleico de control interno imita a la diana más sensible de un ensayo que implica múltiples dianas, y normalmente las dianas de ARN se tienen que controlar más estrechamente.

Por tanto, un aspecto de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que dicho ácido nucleico de control interno es ARN.

Puesto que el ARN es más propenso a la degradación que el ADN debido a influencias tales como pH alcalino, ribonucleasas, etc., los ácidos nucleicos de control interno preparados con ARN se pueden proporcionar como partículas blindadas. Las partículas blindadas tales como ARN especialmente blindado se describen, por ejemplo, en el documento EP910643. En resumen, el ARN, que se puede producir química o heterogéneamente, por ejemplo, por bacterias tales como, por ejemplo, *E. coli*, está al menos parcialmente encapsulado en una proteína

de la cubierta vírica. Esto último confiere resistencia al ARN frente a influencias externas, en particular ribonucleasas. Se debe entender que el ADN de control interno también se puede proporcionar como una partícula blindada. Tanto el ARN como el ADN blindados son útiles como ácidos nucleicos de control interno. En un modo de realización, los ácidos nucleicos de control de ARN se blindan con la proteína de la cubierta MS2 en *E. coli*. En otro modo de realización, los ácidos nucleicos de control de ADN se blindan usando el fago lambda GT11.

Por lo tanto, un aspecto de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que dicho ácido nucleico de control interno es un ácido nucleico blindado.

Típicamente, en el diagnóstico con ácido nucleico basado en amplificación, los moldes de ARN se retrotranscriben a ADN antes de la amplificación y la detección.

Una "polimerasa con actividad retrotranscriptasa" es una polimerasa de ácido nucleico que puede sintetizar ADN en base a un molde de ARN. También puede replicar un ADN mono o bicatenario una vez que el ARN se ha retrotranscrito a ADNc monocatenario. En un modo de realización de la invención, la polimerasa con actividad retrotranscriptasa es termoestable.

Como se usa en el presente documento, el término "un segmento de un molde de ARN monocatenario" o "un segmento de una secuencia de control de ARN monocatenario" se refiere a la porción de un molde o secuencia de ARN en la que se evita o reduce la degradación por el uno o más oligonucleótidos que se usan en los procedimientos de la presente invención. En algunos casos, el segmento puede cubrir todo el molde o secuencia de ARN y, en otros casos, el segmento puede cubrir la porción del molde o secuencia de ARN que se amplifica y detecta.

En un modo de realización, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende la incubación de una muestra que contiene un molde de ARN con un cebador oligonucleotídico suficientemente complementario a dicho molde de ARN como para hibridarse con este último, y una ADN polimerasa termoestable en presencia de al menos los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato naturales o modificados, en un tampón apropiado que comprende un tampón de iones metálicos que, en un modo de realización, tampona tanto el pH como la concentración de iones metálicos. Esta incubación se realiza a una temperatura suficiente para que dicho cebador se hibride con dicho molde de ARN y dicha ADN polimerasa para catalizar la polimerización de dichos desoxirribonucleósidos trifosfato para formar una secuencia de ADNc complementaria a la secuencia de dicho molde de ARN.

Como se usa en el presente documento, el término "ADNc" se refiere a una molécula de ADN complementaria sintetizada usando una hebra de ácido ribonucleico (ARN) como molde. El ARN puede ser, por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNr u otra forma de ARN, tal como ARN vírico. El ADNc puede ser monocatenario, bicatenario o puede estar enlazado con hidrógeno a una molécula de ARN complementaria como en un híbrido ARN/ADNc. Un cebador adecuado para la hibridación a un molde de ARN también puede ser adecuado para la amplificación por PCR. Para la PCR, un segundo cebador, complementario a la hebra de ADNc retrotranscrita, proporciona un sitio de inicio para la síntesis de un producto de extensión.

En la amplificación de una molécula de ARN por una ADN polimerasa, la primera reacción de extensión es la retrotranscripción usando un molde de ARN, y se produce una hebra de ADN. La segunda reacción de extensión, usando el molde de ADN, produce una molécula de ADN bicatenario. Por tanto, la síntesis de una hebra de ADN complementaria a partir de un molde de ARN por una ADN polimerasa proporciona el material de partida para la amplificación.

Las ADN polimerasas termoestables se pueden usar en una reacción acoplada de retrotranscripción/amplificación con una sola enzima. El término "homogéneo", en este contexto, se refiere a una reacción de adición única de dos etapas para la retrotranscripción y la amplificación de una diana de ARN. Por homogéneo se entiende que, seguidamente a la etapa de retrotranscripción (RT), no existe necesidad de abrir el recipiente de reacción o de ajustar de otro modo los componentes de reacción antes de la etapa de amplificación. En una reacción RT/PCR no homogénea, seguidamente a la retrotranscripción y antes de la amplificación, uno o más de los componentes de reacción tales como los reactivos de amplificación, por ejemplo, se ajustan, añaden o diluyen, para lo que se tiene que abrir el recipiente de reacción o, al menos, se tiene que manipular su contenido. Tanto los modos de realización homogéneos como los no homogéneos están comprendidas por el alcance de la invención.

La retrotranscripción es una etapa importante en una RT/PCR. Por ejemplo, es conocido en la técnica que los moldes de ARN muestran una tendencia hacia la formación de estructuras secundarias que puede obstaculizar la unión del cebador y/o el alargamiento de la hebra de ADNc por la respectiva retrotranscriptasa. Por tanto, las temperaturas relativamente altas para una reacción de RT son ventajosas con respecto a la eficacia de la transcripción. Por otra parte, el aumento de la temperatura de incubación también implica una especificidad, es decir, los cebadores de RT no se hibridarán a secuencias que presentan emparejamientos erróneos con la secuencia o secuencias esperadas. En particular en el caso de múltiples ARN diana diferentes, puede ser deseable también transcribir y posteriormente amplificar y detectar secuencias con emparejamientos erróneos únicos, por ejemplo, en el caso de la posible presencia de subcepas o subespecies desconocidas o infrecuentes de

organismos en la muestra líquida.

Para beneficiarse de ambas ventajas descritas anteriormente, es decir, la reducción de estructuras secundarias y la retrotranscripción de moldes con emparejamientos erróneos, la incubación de RT se puede llevar a cabo a más de una temperatura diferente.

Por lo tanto, un aspecto de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que dicha incubación de la polimerasa con actividad retrotranscriptasa se lleva a cabo a diferentes temperaturas de 30 °C a 75 °C, o de 45 °C a 70 °C, o de 55 °C a 65 °C.

Como otro aspecto importante de la retrotranscripción, las etapas de RT prolongadas pueden dañar los moldes de ADN que pueden estar presentes en la muestra líquida. Si la muestra líquida contiene tanto especies de ARN como de ADN, es favorable, por tanto, mantener la duración de las etapas de RT lo más breve posible, pero al mismo tiempo garantizar la síntesis de cantidades suficientes de ADNc para la posterior amplificación y detección opcional de amplificadores.

Por tanto, un aspecto de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que el período de tiempo para la incubación de la polimerasa con actividad retrotranscriptasa es de hasta 30 minutos, 20 minutos, 15 minutos, 12,5 minutos, 10 minutos, 5 minutos o 1 minuto.

Otro aspecto de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que la polimerasa con actividad retrotranscriptasa y que comprende una mutación se selecciona del grupo que consiste en

- a) una ADN polimerasa CS5
- b) una ADN polimerasa CS6
- c) una ADN polimerasa de *Thermotoga maritima*
- d) una ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*
- e) una ADN polimerasa de *Thermus thermophilus*
- f) una ADN polimerasa de *Thermus flavus*
- g) una ADN polimerasa de *Thermus filiformis*
- h) una ADN polimerasa de *Thermus sp. Sps17*
- i) una ADN polimerasa Z05 de *Thermus sp.*
- j) una ADN polimerasa de *Thermotoga neapolitana*
- k) una ADN polimerasa de *Thermosipho africanus*
- l) una ADN polimerasa de *Thermus caldophilus*

Las enzimas que llevan una mutación en el dominio de la polimerasa que potencia su eficacia de retrotranscripción en términos de una tasa de extensión más rápida son en particular adecuadas para estos requisitos.

Por lo tanto, un aspecto de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que la polimerasa con actividad retrotranscriptasa es una polimerasa que comprende una mutación que confiere una tasa de extensión de ácido nucleico mejorada y/o una actividad retrotranscriptasa mejorada en relación con la respectiva polimerasa natural.

En un modo de realización, en el procedimiento descrito anteriormente, la polimerasa con actividad retrotranscriptasa es una polimerasa que comprende una mutación que confiere una actividad retrotranscriptasa mejorada en relación con la respectiva polimerasa natural.

Las polimerasas que llevan mutaciones puntuales que las hacen en particular útiles se divulgan en el documento WO 2008/046612. En particular, las polimerasas que se van a usar i pueden ser ADN polimerasas mutadas que comprenden al menos el siguiente motivo en el dominio de la polimerasa:

T-G-R-L-S-S-Xb7-Xb8-P-N-L-Q-N; en el que Xb7 es un aminoácido seleccionado de S o T y en el que Xb8 es un aminoácido seleccionado de G, T, R, K o L, en el que la polimerasa comprende actividad exonucleasa 3'-5' y tiene una tasa de extensión de ácido nucleico mejorada y/o una eficacia de retrotranscripción mejorada en relación con

la ADN polimerasa natural, en el que en dicha ADN polimerasa natural Xb8 es un aminoácido seleccionado de D, E o N.

Un ejemplo son los mutantes de la ADN polimerasa termoestable de la especie Z05 de *Thermus* (descritos, por ejemplo, en el documento US 5.455.170), comprendiendo dichas variaciones mutaciones en el dominio de la polimerasa en comparación con la respectiva enzima Z05 natural. Un modo de realización para el procedimiento de acuerdo con la invención es una ADN polimerasa Z05 mutante en la que el aminoácido en la posición 580 se selecciona del grupo que consiste en G, T, R, K y L.

Para la retrotranscripción usando una polimerasa termoestable, Mn^{2+} puede ser el catión divalente y se incluye típicamente como una sal, por ejemplo, cloruro de manganeso ($MnCl_2$), acetato de manganeso ($Mn(OAc)_2$) o sulfato de manganeso ($MnSO_4$). Si se incluye $MnCl_2$ en una reacción que contiene tampón tricina 50 mM, por ejemplo, el $MnCl_2$ está presente en general a una concentración de 0,5-7,0 mM; 2,5-3,5 mM está presente en general cuando se utilizan 200 μM de cada dGTP, dATP, dUTP y dCTP.

Puesto que en el alcance de la invención está retrotranscribir los ácidos nucleicos diana de ARN a ADNc mientras se conservan los ácidos nucleicos diana de ADN para que tanto ADNc como ADN se pueden usar para la posterior amplificación, el procedimiento controlado internamente descrito anteriormente es en particular útil para la amplificación simultánea de ácidos nucleicos diana derivados tanto de organismos que tienen un genoma de ARN como de organismos que tienen uno de ADN. Esta ventaja incrementa considerablemente el espectro de organismos diferentes, especialmente patógenos, que se pueden analizar en condiciones físicas idénticas.

Un "organismo", como se usa en el presente documento, significa cualquier forma de vida mono o multicelular viva. En este caso, un virus es un organismo.

Especialmente debido a una temperatura óptima apropiada, enzimas como la polimerasa Tth o, por ejemplo, la ADN polimerasa Z05 mutante mencionada anteriormente son adecuadas para llevar a cabo la etapa posterior de amplificación de los ácidos nucleicos diana. Aprovechar la misma enzima tanto para la retrotranscripción como para la amplificación contribuye a facilitar llevar a cabo el procedimiento y facilita su automatización, puesto que la muestra líquida no se tiene que manipular entre la etapa de RT y la de amplificación.

La diana de la etapa de amplificación puede ser una molécula híbrida de ARN/ADN. La diana puede ser un ácido nucleico monocatenario o bicatenario. Aunque el procedimiento de PCR más ampliamente usado usa una diana bicatenaria, esto no es necesario. Después del primer ciclo de amplificación de una diana de ADN monocatenario, la mezcla de reacción contiene una molécula de ADN bicatenario que consiste en la diana monocatenaria y una hebra complementaria recién sintetizada. De forma similar, seguidamente al primer ciclo de amplificación de una diana de ARN/ADNc, la mezcla de reacción contiene una molécula de ADNc bicatenario. En este punto, los ciclos de amplificación sucesivos avanzan como se describe anteriormente.

Los procedimientos de detección de ácidos nucleicos adecuados son conocidos por el experto en la materia y se describen en libros de texto estándar como Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 y Ausubel F. *et al.*: Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Wiley and Sons, NY. También pueden existir etapas de purificación adicionales antes de que se lleve a cabo la etapa de detección de ácido nucleico como, por ejemplo, una etapa de precipitación. Los procedimientos de detección pueden incluir, pero no se limitan a, la unión o intercalación de tintes específicos como bromuro de etidio, que se intercalan en el ADN bicatenario y después de esto cambian su fluorescencia. El ácido nucleico purificado también se puede separar por procedimientos electroforéticos opcionalmente después de una hidrolización de restricción y visualizarse después de esto. También existen ensayos basados en sondas que aprovechan la hibridación de oligonucleótidos a secuencias específicas y posterior detección del híbrido.

Los ácidos nucleicos diana amplificados se pueden detectar durante o después de la reacción de amplificación para evaluar el resultado del análisis. En particular para la detección ultrarrápida, es ventajoso usar sondas de ácido nucleico.

Puede ser favorable realizar un seguimiento de la reacción de amplificación ultrarrápida, es decir, detectar los ácidos nucleicos diana y/o sus amplicones durante la propia amplificación.

Los procedimientos expuestos anteriormente se pueden basar en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre un resto fluorescente donante y un resto fluorescente aceptor. Un resto fluorescente donante representativo es fluoresceína, y los restos fluorescentes aceptores correspondientes representativos incluyen LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5 y Cy5,5. Típicamente, la detección incluye excitar la muestra a una longitud de onda absorbida por el resto fluorescente donante y visualizar y/o medir la longitud de onda emitida por el resto fluorescente aceptor correspondiente. En el procedimiento de acuerdo con la invención, la detección puede ir seguida de la cuantificación de la FRET. Por ejemplo, la detección se realiza después de cada etapa de ciclado. Por ejemplo, la detección se realiza de forma ultrarrápida. Usando instrumentos de PCR ultrarrápida disponibles comercialmente (por ejemplo, LightCycler™ o TaqMan®), la amplificación por PCR y la detección del producto de

amplificación se pueden combinar en una única cubeta cerrada con un tiempo de ciclado considerablemente reducido. Puesto que la detección se produce simultáneamente con la amplificación, los procedimientos de PCR ultrarrápida obvian la necesidad de manipulación del producto de amplificación y disminuyen el riesgo de contaminación cruzada entre los productos de amplificación. La PCR ultrarrápida reduce en gran medida el tiempo de respuesta y es una alternativa atractiva frente a las técnicas de PCR convencionales en el laboratorio clínico.

Las siguientes solicitudes de patente describen la PCR ultrarrápida como se usa en la tecnología de LightCycler™: Documentos WO 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712. El instrumento LightCycler™ es un ciclador térmico rápido combinado con un microfluorímetro que utiliza óptica de alta calidad. Esta técnica de termociclado rápido usa cubetas de vidrio fino como recipientes de reacción. El calentamiento y enfriamiento de la cámara de reacción se controlan alternando aire caliente y ambiental. Debido a la baja masa de aire y la alta proporción de área superficial con respecto al volumen de las cubetas, se pueden lograr tasas de intercambio de temperatura muy rápidas dentro de la cámara térmica.

La tecnología TaqMan® utiliza una sonda de hibridación monocatenaria marcada con dos restos fluorescentes. 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 de acuerdo con los principios de FRET. El segundo resto fluorescente es, en general, una molécula extintora. Los tintes fluorescentes típicos usados en este formato son, por ejemplo, entre otros, FAM, HEX, CY5, JA270, ciano y CY5.5. Durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ácido nucleico diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada por la actividad exonucleasa de 5' a 3' de la Taq u otra polimerasa adecuada como es conocido por el experto en la técnica, tal como una polimerasa Z05 mutante, durante la fase de alargamiento posterior. Como resultado, el resto fluorescente excitado y el resto extintor se separan espacialmente uno del otro. Como consecuencia, tras la excitación del primer resto fluorescente en ausencia del extintor, se puede detectar la emisión de fluorescencia del primer resto fluorescente.

En ambos formatos de detección descritos anteriormente, la intensidad de la señal emitida se puede correlacionar con el número de moléculas de ácido nucleico diana iniciales.

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, SYBRGREEN I® o SYBRGOLD® (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 intercalante de ácido nucleico. Cuando se usan tintes de unión a ADN bicatenario, normalmente se realiza un análisis de la curva de fusión para confirmar la presencia del producto de amplificación.

Las balizas moleculares junto con FRET también se pueden usar para detectar la presencia de un producto de amplificación usando los procedimientos de PCR ultrarrápida de la invención. La tecnología de balizas moleculares usa una sonda de hibridación marcada con un primer resto fluorescente y un segundo resto fluorescente. El segundo resto fluorescente, en general, es un extintor, y los marcadores fluorescentes típicamente se localizan en cada extremo de la sonda. La tecnología de balizas moleculares usa un oligonucleótido de sonda que tiene secuencias que permiten la formación de una estructura secundaria (por ejemplo, una horquilla). Como resultado de la formación de una 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 productos de amplificación, la estructura secundaria de la sonda se rompe y los restos fluorescentes se separan uno del otro de modo que después de la excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede detectar la emisión del primer resto fluorescente.

Por tanto, en un procedimiento de acuerdo con la invención está el procedimiento descrito anteriormente que usa FRET, en el que dichas sondas comprenden una secuencia de ácido nucleico que permite la formación de una estructura secundaria, en el que dicha formación de una estructura secundaria da como resultado una proximidad espacial entre dicho primer y segundo resto fluorescente.

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 superpone con el espectro de absorción del resto fluorescente aceptor.

Por tanto, en un modo de realización, dichos restos fluorescentes donante y aceptor están dentro de no más de 5 nucleótidos entre sí en dicha sonda.

En otro modo de realización, dicho resto fluorescente aceptor es un extintor.

Como se describe anteriormente, en el formato TaqMan®, durante la etapa de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación marcada se une al ácido nucleico diana (es decir, el producto de amplificación) y se degrada por la actividad exonucleasa de 5' a 3' de la Taq u otra polimerasa adecuada como es conocido por el experto en la

técnica, tal como una polimerasa Z05 mutante, durante la fase de alargamiento posterior.

Por tanto, en un modo de realización, en el procedimiento descrito anteriormente, la amplificación emplea una enzima polimerasa que tiene actividad exonucleasa de 5' a 3'.

Es además ventajoso seleccionar cuidadosamente la longitud del amplicón que se obtiene como resultado del procedimiento descrito anteriormente. En general, los amplicones relativamente cortos incrementan la eficacia de la reacción de amplificación. Por tanto, un aspecto de la invención es el procedimiento descrito anteriormente, en el que los fragmentos amplificados comprenden hasta 450 bases, hasta 300 bases, hasta 200 bases o hasta 150 bases.

El ácido nucleico de control interno usado en la presente invención puede servir como "ácido nucleico patrón cuantitativo" que es idóneo para ser y usarse como referencia para cuantificar, es decir, para determinar la cantidad de los ácidos nucleicos diana. Para este propósito, uno o más ácidos nucleicos patrón cuantitativos experimentan todas las etapas de preparación de muestra posibles junto con los ácidos nucleicos diana. Además, un ácido nucleico patrón cuantitativo se procesa durante todo el procedimiento dentro de la misma mezcla de reacción. Debe generar, directa o indirectamente, una señal detectable tanto en presencia como en ausencia del ácido nucleico diana. Para este propósito, la concentración del ácido nucleico patrón cuantitativo se tiene que optimizar cuidadosamente en cada prueba, no para que interfiera con la sensibilidad, sino para que genere una señal detectable también, por ejemplo, a concentraciones de diana muy altas. En términos del límite de detección (LDD, véase a continuación) del ensayo respectivo, el intervalo de concentración para el "ácido nucleico patrón cuantitativo" es de 20-5000x LDD, 20-1000x LDD o 20-500x LDD. La concentración final del ácido nucleico patrón cuantitativo en la mezcla de reacción depende del intervalo de medición cuantitativa logrado.

"Límite de detección" o "LDD" significa la cantidad o concentración más baja detectable de un ácido nucleico en una muestra. Un "LDD" bajo corresponde a alta sensibilidad y viceversa. El "LDD" se expresa normalmente por medio de la unidad "cp/ml", en particular si el ácido nucleico es un ácido nucleico vírico, o bien como UI/ml. "Cp/ml" significa "copias por mililitro", en la que una "copia" es una copia del ácido nucleico respectivo. UI/ml quiere decir "unidades internacionales/ml", haciendo referencia a las normas de la OMS.

Un procedimiento ampliamente usado para calcular un LDD es el "análisis Probit", que es un procedimiento que analiza la relación entre un estímulo (dosis) y la respuesta cuántica (todo o nada). En un experimento de respuesta cuántica típico, a los grupos de animales se les administran diferentes dosis de un fármaco. Se registra el porcentaje de muerte a cada nivel de dosis. A continuación, estos datos se pueden analizar usando el análisis Probit. El modelo Probit supone que el porcentaje de respuesta está relacionado con el logaritmo de la dosis como la distribución normal acumulada. Es decir, se puede usar el logaritmo de las dosis como variables para leer el porcentaje de muerte a partir de la normal acumulada. El uso de la distribución normal, en lugar de otras distribuciones de probabilidad, influye en la tasa de respuesta prevista en los extremos alto y bajo de las dosis posibles, pero tiene poca influencia en la zona intermedia.

El análisis de Probit se puede aplicar a distintas "tasas de acierto". Como es conocido en la técnica, una "tasa de acierto" se expresa comúnmente en porcentaje [%] e indica el porcentaje de resultados positivos a una concentración específica de un analito. Por tanto, por ejemplo, un LDD se puede determinar a un 95 % de tasa de éxito, lo que significa que el LDD se calcula para un entorno en el que un 95 % de los resultados válidos son positivos.

En un modo de realización, el procedimiento descrito anteriormente proporciona un LDD de 1 a 100 cp/ml o de 0,5 a 50 UI/ml, o de 1 a 75 cp/ml o de 0,5 a 30 UI/ml, o de 1 a 25 cp/ml o de 1 a 20 UI/ml.

Con respecto a algunos ejemplos de posibles ácidos nucleicos diana de determinados virus, el procedimiento descrito anteriormente proporciona los siguientes LDD:

VIH: hasta 60 cp/ml, hasta 50 cp/ml, hasta 40 cp/ml, hasta 30 cp/ml, hasta 20 cp/ml o hasta 15 cp/ml

- VHB: hasta 10 UI/ml, hasta 7,5 UI/ml o hasta 5 UI/ml
- VHC: hasta 10 UI/ml, hasta 7,5 UI/ml o hasta 5 UI/ml
- VNO I: hasta 20 cp/ml, hasta 15 cp/ml o hasta 10 cp/ml
- VNO II: hasta 20 cp/ml, hasta 15 cp/ml, hasta 10 cp/ml o hasta 5 cp/ml
- VEJ: hasta 100 cp/ml, hasta 75 cp/ml, hasta 50 cp/ml o hasta 30 cp/ml

- VESL: hasta 100 cp/ml, hasta 75 cp/ml, hasta 50 cp/ml, hasta 25 cp/ml o hasta 10 cp/ml.

Un ejemplo de cómo realizar el cálculo de resultados cuantitativos en el formato TaqMan® en base a un ácido nucleico de control interno que sirve como ácido nucleico patrón cuantitativo se describe en lo que sigue: se calcula un valor a partir de los datos de entrada de los valores de fluorescencia corregidos para el instrumento de toda una tanda de PCR. Un conjunto de muestras que contienen un ácido nucleico diana y un ácido nucleico de control interno que sirve como ácido nucleico patrón cuantitativo se someten a PCR en un termociclador usando un perfil de temperatura especificado. A temperaturas y tiempos seleccionados durante el perfil de PCR, las muestras se iluminan por luz filtrada y los datos de fluorescencia filtrados se recogen para cada muestra para el ácido nucleico diana y para el ácido nucleico de control interno. Después de que se completa la tanda de PCR, las lecturas de fluorescencia se procesan para proporcionar un conjunto de datos de concentración de tinte para el ácido nucleico de control interno y un conjunto de datos de concentración de tinte para el ácido nucleico diana. Cada conjunto de datos de concentración de tinte se procesa de la misma manera. Después de varias verificaciones de verosimilitud, se calculan los valores de inflexión (CT) para el ácido nucleico de control interno y el ácido nucleico diana. El valor de inflexión se define como el punto donde la fluorescencia del ácido nucleico diana o el ácido nucleico de control interno cruza un umbral predefinido (concentración de fluorescencia). La determinación del valor se basa en los supuestos de que el ácido nucleico diana y el ácido nucleico de control interno se amplifican con la misma eficacia y de que, en el valor de inflexión calculado, se amplifican y detectan cantidades iguales de copias de amplificación de ácido nucleico diana y ácido nucleico de control interno. Por lo tanto, el (CTPC - CTdiana) es lineal con respecto al log (conc. diana/conc. PC). En este contexto, PC indica el ácido nucleico de control interno que sirve como ácido nucleico patrón cuantitativo. A continuación, se puede calcular el valor T, por ejemplo, usando una fórmula de calibración polinómica como en la siguiente ecuación:

$$T' = 10 (a(CTPC - CTdiana)^2 + b(CTPC - CTdiana) + c)$$

Las constantes polinómicas y la concentración del ácido nucleico patrón cuantitativo son conocidas, por lo que la única variable en la ecuación es la diferencia (CTPC-CTdiana).

Además, el ácido nucleico de control interno puede servir como "ácido nucleico de control interno cualitativo". Un "ácido nucleico de control interno cualitativo" es en particular útil para confirmar la validez del resultado de la prueba de un ensayo de detección cualitativa: incluso en el caso de un resultado negativo, se debe detectar el control interno cualitativo; de otro modo, se considera que la prueba por sí misma es ineficaz. Sin embargo, en una configuración cualitativa, no se tiene necesariamente que detectar en caso de un resultado positivo. Como consecuencia, su concentración debe ser relativamente baja. Se tiene que adaptar cuidadosamente al ensayo respectivo y a su sensibilidad. Por ejemplo, el intervalo de concentración para el ácido nucleico interno cualitativo, es decir, el segundo ácido nucleico de control, comprenderá un intervalo de 1 copia por reacción a 1000 copias por reacción. En relación con el límite de detección (LDD) del ensayo respectivo, su concentración está entre el LDD de un ensayo y 25 veces el valor del LDD o entre el LDD y 10x LDD. O está entre 2x LDD y 10x LDD. O está entre 5x LDD y 10x LDD. O es 5x o 10x LDD.

Un aspecto principal de la invención es la preparación y uso de patrones y controles de ácidos nucleicos resistentes a la nucleasa y la hidrólisis. Los patrones internos y los controles positivos desempeñan un papel importante para asegurar el funcionamiento correcto de los kits de prueba y confirmar los resultados de la prueba. Los patrones internos también proporcionan un medio para la cuantificación. La detección y cuantificación de ARN específicos en muestras se ha vuelto frecuente con el advenimiento de RT-PCR. El patrón interno para los estudios con RT-PCR debe ser una molécula de ARN, ya que controla tanto la retrotranscripción como las etapas de amplificación por PCR. Esto es problemático, ya que el ARN es en particular susceptible de degradación térmica y por RNasa. Se pueden producir resultados de la prueba alterados por la degradación parcial o completa de un patrón de ARN durante su almacenamiento o bien después de su introducción en una muestra. La probabilidad de una degradación del ARN al menos parcial es bastante alta, dado que muchos de los esquemas de detección con ARN están diseñados para detectar ARN víricos en muestras de suero, donde están localizadas cantidades relativamente altas de diversas RNasas. El patrón interno ideal para los ensayos de diagnóstico con ARN es una molécula que es funcionalmente equivalente al ARN en el formato de ensayo, pero resistente a la degradación por nucleasas o por hidrólisis. Se pueden imaginar tres procedimientos generales para proteger el ARN de la degradación mediada por enzimas en un entorno en el que las RNasas están activas: (1) microencapsular el ARN en el interior de una estructura impenetrable, (2) unir no covalentemente el ARN con moléculas que impiden el acceso de nucleasas al patrón, y (3) alterar químicamente la estructura del ARN de tal manera que no ya sea un sustrato para las nucleasas mientras que todavía es funcionalmente equivalente al ARN en el formato de ensayo.

Los ácidos nucleicos en los patrones de la invención se pueden usar en ensayos de cuantificación. Estos patrones se pueden usar para una variedad de propósitos, tales como patrones de ARN cuantitativos (para determinar el número de copias absoluto de una secuencia de ARN específica), específicamente para cuantificar el número de virus de ARN tales como VIH-1, VIH-2, VHC, VLTH-1, VLTH-2, hepatitis G, enterovirus, virus del dengue o rabia, en plasma, suero o líquido cefalorraquídeo. También se pueden usar para cuantificar la expresión de ARNm específico en células o tejidos por un ensayo de RT-PCR. Los patrones pueden ser internos o externos. Se mezcla un patrón interno con la muestra a una concentración conocida de modo que la muestra y el patrón se procesan y

se someten a ensayo como uno solo. Por tanto, las diferencias en la eficacia del ensayo de una muestra a otra se normalizan usando la señal generada por el patrón interno. Un patrón externo se procesa y se somete a ensayo a una concentración conocida en paralelo con la muestra, pero se procesa por separado de la muestra. Se pueden procesar varias concentraciones diferentes del patrón externo simultáneamente para producir una curva patrón que a continuación se puede usar para determinar el valor de la muestra desconocida. Se pueden usar tanto patrones internos como externos para la cuantificación, pero los patrones internos en general se consideran más exactos. Los patrones se pueden usar como patrones cualitativos que actúan como controles positivos en el diagnóstico, por ejemplo, de enfermedades bacterianas, fúngicas o parasitarias que se basan en ARN de diagnóstico o en ensayos con RT-PCR para indicar que todos los reactivos están funcionando apropiadamente. Estos patrones se pueden usar para medir la integridad de un procedimiento de aislamiento de ARN midiendo la cantidad de degradación observada en el ARN protegido después de que se ha sometido al procedimiento de aislamiento seguido de la técnica Northern. Se pueden usar como trazadores ambientales para seguir el flujo de agua subterránea o para marcar los desechos de empresas individuales con una secuencia de ácido nucleico única que se rastrea de vuelta a la empresa infractora.

La presente invención es en particular útil para la cuantificación vírica. Existen muchos ensayos nuevos basados en ácidos nucleicos en proceso de desarrollo y/o comercialización. Estos ensayos detectan virus humanos patógenos tales como el VIH y el VHC en plasma o suero humano. Estos ensayos son altamente sensibles, detectan incluso menos de 300 viriones por 1,0 ml de plasma. En su formato actual, varios de estos ensayos basados en ácidos nucleicos usan ARN no marcado para sus patrones cuantitativos. Desafortunadamente, estos patrones de ARN no marcado son muy susceptibles a la ribonucleasa contaminante y la hidrólisis mediada térmicamente y, por tanto, los resultados del ensayo se pueden ver afectados.

Un modo de realización principal de la presente invención se refiere a patrones de ácido nucleico que comprenden segmentos de ácido nucleico recombinante resistentes a la nucleasa y la hidrólisis que comprenden una secuencia que codifica un ácido nucleico patrón. En algunos modos de realización preferentes, el patrón de ácido nucleico es un patrón de ARN que comprende un segmento de ARN resistente a la ribonucleasa y la hidrólisis que comprende una secuencia que codifica un ARN patrón. Como se usa en el presente documento, los términos "ácido nucleico patrón" y "ARN patrón" se refieren respectivamente a ácidos nucleicos y ARN que son adecuados para su uso como patrón en el ensayo particular que se va a emplear. La presente invención contempla un ARN recombinante resistente a la ribonucleasa y la hidrólisis que es altamente adecuado como patrón de ARN para cuantificar virus de ARN, aunque no necesita ser recombinante y se puede usar como patrón de ARN para ARN aislado de cualquier fuente, tal como células de cultivos tisulares.

En el presente documento, los términos "resistente a la nucleasa" y "resistente a la ribonucleasa" significan que un ácido nucleico presenta cierto grado de resistencia incrementada a la nucleasa con respecto a un ácido nucleico sin modificar no marcado de la misma secuencia. De forma similar, el término "resistente a la hidrólisis" significa que un ácido nucleico presenta cierto grado de resistencia incrementada a la hidrólisis espontánea dependiente de la temperatura con respecto a un ácido nucleico sin modificar no marcado de la misma secuencia.

Existen una variedad de procedimientos que se pueden emplear para hacer que un segmento de ácido nucleico sea resistente a la nucleasa. El segmento de ácido nucleico se puede modificar químicamente, recubrir con un recubrimiento resistente a la nucleasa o enjaular en una estructura resistente a la nucleasa. Por ejemplo, el patrón de ARN puede ser un ARN modificado químicamente que es resistente a la ribonucleasa. Otra manera de hacer que un segmento de ARN recombinante sea resistente a la ribonucleasa es recubrirlo con un recubrimiento resistente a la ribonucleasa. Un recubrimiento de este tipo puede ser cualquiera que se une de una manera dependiente o independiente de la secuencia al ARN y hace que el ARN sea resistente a la ribonucleasa. En algunos casos, el patrón de ARN es un ARN recombinante que está enjaulado del entorno externo en una estructura resistente a la ribonucleasa. El ARN puede estar enjaulado simplemente por estar en el interior de una célula. Otros procedimientos sintéticos de enjaulado de ARN implican la encapsidación parcial del ARN en proteínas víricas, la encapsulación lipídica parcial del ARN, la captura parcial del ARN en matrices poliméricas, etc.

En otro procedimiento, la estructura resistente a la ribonucleasa o la hidrólisis está compuesta por una proteína de la cubierta vírica que encapsida parcialmente el patrón de ARN. El ARN se transcribe *in vivo* en un huésped bacteriano y a continuación se encapsida por proteínas de bacteriófago. Este "enjaulado" del ARN da como resultado un ARN que está protegido de la ribonucleasa (ARN blindado). Aunque el ácido nucleico o ARN puede estar completa o sustancialmente enjaulado en la estructura resistente a la nucleasa o resistente a la hidrólisis, los ácidos nucleicos y ARN parcialmente enjaulados también están dentro del alcance de la presente invención siempre que el enjaulado parcial haga que el ácido nucleico o ARN sea resistente a la nucleasa o la ribonucleasa o la hidrólisis. Por tanto, cuando se usan en el presente documento, los términos "encapsidación", "encapsulación", "capturado", etc., engloban estructuras en las que la encapsidación, encapsulación, captura, etc., es parcial, así como sustancial o sustancialmente completa siempre que la estructura resultante sea resistente a la nucleasa o la hidrólisis como se usan esos términos en el presente documento.

El ARN también se puede modificar químicamente de modo que sea resistente a la ribonucleasa. Un ARN modificado químicamente puede estar compuesto por nucleótidos modificados químicamente. Estos nucleótidos

se modifican de modo que las ribonucleasas no puedan actuar sobre el ARN. El ARN modificado químicamente se prepara por la modificación química de un ARN o un transcrito de ARN previamente transcrito. De forma alternativa, el ARN modificado químicamente se puede transcribir o sintetizar a partir de nucleótidos que ya se han modificado químicamente.

Un patrón de ARN también puede comprender un ARN que está unido no covalentemente o recubierto con un recubrimiento resistente a la ribonucleasa. Dicha unión, que puede ser dependiente o independiente de la secuencia, hace que el ARN sea resistente a la ribonucleasa. En algunos modos de realización, la molécula unida está compuesta por una proteína. Los ejemplos de dichas proteínas de unión son la proteína de la cubierta MS2/R17, la proteína de la nucleocápside del VIH-1, gp32, la proteína regA de T4 o la gp32 del bacteriófago T4. En otros casos, la molécula unida no covalentemente está compuesta por una molécula pequeña. Por ejemplo, las poliaminas, espermina y/o espermidina. El recubrimiento resistente a ribonucleasas también puede estar compuesto por un ácido nucleico. En algunos modos de realización preferentes, el ácido nucleico se hibrida con el ARN recombinante, bloquea las nucleasas y puede servir como cebador para la retrotranscriptasa. En otros casos, se pueden usar poli-L-lisina y detergentes catiónicos tales como CTAB para recubrir y proteger el ARN.

Un concepto genérico de control interno/patrón de cuantificación (CI/PC) se basa en el uso de una única secuencia de control (por ejemplo, un ADN y un ARN derivados de una secuencia) que se va a usar en todos los ensayos de diagnóstico. Históricamente, la amplificación competitiva se ha utilizado para el diseño de controles internos, controles que compiten con la diana por los cebadores. Usando el concepto de amplificación competitiva, cada ensayo usó secuencias de control individuales compuestas por secuencias de unión a cebador idénticas a la diana del ensayo y un sitio de unión de sonda genérico. Para cada nuevo ensayo, los cebadores diana sirvieron también como cebadores de control, por tanto, no se necesitaron cebadores adicionales en el ensayo. En los ensayos múltiples, solo se construyó un control interno con los sitios de unión a cebador correspondientes a una de las dianas. El uso de un CI en un ensayo múltiple obviamente ya no era competitivo para las demás dianas en el ensayo. Por tanto, el objetivo de un control total del proceso sólo se cumplió parcialmente. Un segundo ejemplo de un control no competitivo usa un control interno genómico humano endógeno derivado de células en la muestra que requiere su propio conjunto de cebadores. Los requisitos clave del CI/PC genérico incluyeron los siguientes: debe cumplir todas las necesidades normativas. Debe servir como un control total del proceso (CTP), control interno (CI) y patrón de cuantificación interno (PCI) en los ensayos respectivos. Para un CTP, debe pasar por la preparación de muestra con una eficacia similar a la de la(s) diana(s). No debe compartir los sitios de unión a cebador y a sonda con ninguna diana prevista, sino que debe amplificar/detectar con una eficacia similar, es decir, debe fallar cuando la diana lo hace y debe responder a los inhibidores de la PCR de manera similar a la de la diana. El CI/PC genérico debe dar como resultado un intervalo dinámico, LDD, y una precisión de ensayo mejorados y debe dar como resultado un tiempo de desarrollo y una complejidad operativa reducidos.

El concepto de control genérico consistiría en una secuencia de control común que puede ser ARN o bien ADN, y estará protegida (por ejemplo, como en partículas denominadas ARN blindado (partículas de proteína de la cubierta de fago MS2) o ADN blindado (partículas de fago lambda)). El control genérico tendrá un conjunto de cebadores genéricos nuevos y sonda que se van a usar en todos los ensayos, si es posible. Con este fin, se puede diseñar un control interno genérico (CIG) junto con los cebadores y la sonda usando el programa Blast de NCBI y EMBOS shuffleseq (European Molecular Biology Open Software Suite) para generar una secuencia única.

El concepto básico de la presente invención es el concepto de protección frente a la hidrólisis o la degradación por RNasa del ARN por la conversión de la secuencia de ARN específico de interés en un ácido nucleico bicatenario. En un modo de realización, esta estructura bicatenaria es un híbrido bicatenario de ARN/ADN. Es conocido que la velocidad de hidrólisis de un enlace fosfodiéster en el ADN bicatenario es 10 veces más lenta que la del ADN monocatenario. Además, todas las ribonucleasas contaminantes comunes prefieren sustratos de ARN monocatenario. Aunque un híbrido bicatenario de ARN/ADN es el sustrato preferente para la RNasa H, esta ribonucleasa no es un contaminante común.

Es bien conocido que el ARN monocatenario se hidroliza fácilmente y tiene una baja estabilidad térmica. Esto se debe a la estrecha proximidad del 2'-hidroxilo que puede dar como resultado una asistencia anquímica y transesterificación seguida de la escisión final de la hebra. También es conocido que el estado de transición que da lugar al intermedio cíclico 2',3' tiene estrictos requisitos geométricos y estéricos. El 2'-hidroxilo se debe poder orientar en la posición correcta de modo que esté en línea con el grupo saliente, lo que da lugar a una estructura bipiramidal trigonal temporal. La formación del intermedio de fosfato cíclico 2'-3' no está restringida en la conformación del ARN monocatenario, puesto que la formación del estado de transición tiene bajos requisitos de energía debido a la naturaleza flexible de los enlaces y al gran número de grados de libertad disponibles. Al forzar al ARN a estar en forma bicatenaria, el nucleófilo y el grupo saliente se verán limitados y los grados de libertad de los grupos funcionales se reducirán en gran medida. Con la adición de los agrupamientos de oligonucleótidos complementarios para estabilización (COPS) de la presente invención, se produce la hibridación y se forma un híbrido bicatenario de ADN:ARN. Cuando se mantiene en una estructura bicatenaria, el ARN es rígido y ya no es flexible. En el estado bicatenario, el 2'-hidroxilo y el enlace fosfodiéster (grupo saliente) no están localizados en una orientación opuesta entre sí. La formación del estado de transición no es posible sin desenrollar y romper muchos enlaces de hidrógeno. Esto es energéticamente muy desfavorable y, por lo tanto, no permitido. Además, no se

puede formar un intermedio de 2',3'-fosfato bicíclico rígido en una estructura ya rígida. Esto explica la extraordinaria estabilidad térmica conferida al ARN por la estrategia COPS.

Por tanto, los rasgos característicos clave de la presente invención se pueden implementar introduciendo una o más secuencias oligonucleotídicas de complemento inverso en una solución de almacenamiento, una muestra o un tampón de extracción, según sea apropiado. Toda la secuencia de ARN que se va a proteger se puede cubrir opcionalmente por hibridación con la una o más secuencias oligonucleotídicas de complemento inverso. Las secuencias oligonucleotídicas complementarias no necesitan ser completamente complementarias a la secuencia de ARN de interés y pueden ser parcialmente complementarias a la secuencia de ARN siempre que la hibridación entre el/los oligonucleótido(s) y el ARN se pueda producir todavía en condiciones moderadamente rigurosas, como se entiende en la técnica. Las secuencias oligonucleotídicas complementarias se pueden seleccionar opcionalmente para que sean contiguas entre sí. Las concentraciones, longitudes y composiciones de las secuencias oligonucleotídicas complementarias se han de elegir de tal manera que las etapas del procedimiento corriente abajo (por ejemplo, amplificación por PCR) se vean mínimamente afectadas o dañadas. Por ejemplo, manteniendo las longitudes de los complementos oligonucleotídicos en un intervalo (por ejemplo, entre 11 y 50 nucleótidos o entre 11 y 30 nucleótidos de longitud) que permite la hibridación con la secuencia de ARN a temperaturas de 45 °C o más, pero que minimiza la unión a un fase sólida en un procedimiento de preparación de muestra corriente abajo, se minimizará cualquier interferencia dañina en una reacción de RT-PCR posterior. Además, diseñando los complementos oligonucleotídicos para que tengan temperaturas de fusión suficientemente menores que los cebadores y manteniendo una temperatura de hibridación suficientemente alta durante la etapa de retrotranscripción (RT), se puede minimizar la competencia con los cebadores. De forma similar, bloqueando los extremos terminales 3' de los complementos oligonucleotídicos, cualquiera de dichos complementos que todavía puedan estar presentes en una reacción de RT-PCR posterior no podrá extenderse por la polimerasa. Las concentraciones de los complementos oligonucleotídicos también se pueden elegir de modo que estén en exceso molar suficiente para proporcionar una protección adecuada para la secuencia de ARN, pero que estén en una concentración lo suficientemente baja como para no provocar ningún daño a los procedimientos corriente abajo (por ejemplo, la amplificación por PCR).

Las composiciones de las secuencias oligonucleotídicas de complemento sólo están restringidas por su capacidad para formar estructuras bicatenarias estables con las secuencias de ARN de interés. Por lo tanto, estos oligonucleótidos pueden comprender ADN, L-ADN, ARN, ANB, APN, BNA, etc., o cualquier otra variación y modificación conocidas en las bases de nucleótidos, glúcidos o cadenas principales de fosfodiéster.

Aunque la invención precedente se ha descrito con cierto detalle para propósitos de claridad y comprensión, será evidente para un experto en la técnica, a partir de una lectura de la presente divulgación, que se pueden realizar diversos cambios en forma y detalle. Por ejemplo, todas las composiciones y procedimientos descritos anteriormente se pueden usar en diversas combinaciones.

Los siguientes ejemplos se dan para ilustrar los modos de realización de la presente invención como es preferente en la actualidad para su práctica. Se entenderá que los ejemplos son ilustrativos y que la invención no se considera restringida, excepto como se indica en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran los procedimientos de la presente invención.

Ejemplo 1: diseño y preparación de los agrupamientos de oligonucleótidos complementarios

Se diseñaron oligonucleótidos complementarios frente a la secuencia de ARN usando herramientas de diseño informáticas. Se diseñó un total de diez oligonucleótidos para cubrir la secuencia de interés, variando en longitud entre 14 y 26 bases y con un intervalo de T_f calculado de 49,9-57,9 °C. Estas secuencias se modificaron además con un resto fosfato en el extremo 3'. Las secuencias y temperaturas de fusión de los diez oligonucleótidos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

SEQ ID NO:	SECUENCIA	T_f
1	TCACCTCGCCCCGA	53,8
2	GAGTTCGTCGGGCCGC	57,9
3	GGTTGTGACCGGAACC	51,0

4	TGCGCGTCCCGTTTGA	54,7
5	TTTTCTAGCGTTCGCCCA	50,8
6	AGGGGCTTTTTACGTGGGAG	53,8
7	TACTTCGTAACGGTGCGGGT	54,1
8	CTCACTTAATTGCTGGCGTCAG	53,4
9	CTTCATTCTTGACATGTATGGCGC	49,9
10	TTATACAGTACCAATCGTCGGTTCG	55,3

Los oligonucleótidos se sintetizaron y purificaron por HPLC y se ajustaron a una concentración final de 100 micromolar cada uno. Se combinaron volúmenes iguales de estas soluciones para proporcionar un agrupamiento de oligonucleótidos complementarios 10 micromolar, que se caracterizó además por análisis de UPLC usando una columna de fase inversa C18 y un gradiente lineal de acetato de trietilamonio y acetonitrilo. Los resultados se muestran en la fig. 1 y confirman la presencia de los 10 oligonucleótidos.

Ejemplo 2: preparación de muestras de ARN y ARN blindado para estudios de estabilidad acelerados

Se prepararon muestras de transcrito de ARN y ARN blindado a una concentración de 300 copias por microlitro en Tris.HCl (pH 7,0) que contenía KCl 100 mM. Los agrupamientos del complemento, denominados agrupamientos de oligonucleótidos complementarios para estabilización (COPS) se añadieron a la muestra a una concentración final de 0, 0,1, 1 o 10 nM. Se incubaron las muestras a 2-8 °C, 37 °C o 45 °C durante un período de 18 días.

Ejemplo 3: determinación de la estabilidad del ARN por RT-PCR

Se amplificaron 5 microlitros de cada muestra por RT-PCR basada en Taqman®. Se prepararon las mezclas de reacción de PCR en una placa de 96 pocillos con las siguientes concentraciones finales: Tricina 60 mM (pH 8,3), acetato de potasio 120 mM, glicerol al 3 %, DMSO al 5,4 %, Tween 20 al 0,015 %, cada dATP, dCTP y dGTP 400 µM, dUTP 800 µM, 600 nM de cada cebador, sonda 100 nM, transcrito de ARN diana o ARN blindado (1500 copias), 900 unidades/ml de ADN polimerasa Z05D (con actividad 5' nucleasa), 200 unidades/ml de UNG, EDTA 44 µM y acetato de manganeso 3,3 mM. La retrotranscripción, la amplificación y el análisis se realizaron usando el instrumento Roche LightCycler® 480 (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). Se usó el siguiente perfil de temperaturas: 50 °C durante 2 minutos, 94 °C durante 5 segundos, 55 °C durante 2 minutos, 60 °C durante 6 minutos, 65 °C durante 4 minutos, 2 ciclos de 95 °C (10 segundos) a 55 °C (15 segundos) seguido de ciclado de 91 °C (5 segundos) a 65 °C (15 segundos) 45 veces. Los resultados de estos experimentos se muestran en la FIG. 2 y la FIG. 3. Como se puede ver fácilmente, en presencia de los agrupamientos de oligonucleótidos complementarios, tanto el transcrito de ARN como el ARN blindado son más estables, como se demuestra por los Ct anteriores en comparación con las muestras sin los oligonucleótidos COPS.

Ejemplo 4: estudio de estabilidad de ARN con hibridación parcial por COPS

Las muestras de transcrito de ARN y ARN blindado se preparan como en el ejemplo 2 con la excepción de que en una reacción, solo se añaden COPS correspondientes a SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 y 10 (conjunto A) y en otra reacción, solo se añaden COPS correspondientes a SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 y 9 (conjunto B). Los cálculos muestran que el conjunto A cubre un 52 % de la secuencia de transcrito de ARN/ARN blindado, mientras que el conjunto B cubre un 48 % de la secuencia de transcrito de ARN/ARN blindado. Después de 18 días de incubación a 45 °C, se puede comparar la estabilidad del ARN en ausencia de COPS o en presencia del conjunto A de COPS o del conjunto B de COPS determinando los valores de Ct de cada reacción por RT-PCR como se describe en el ejemplo 3.

Ejemplo 5: estabilidad del ARN después de una incubación prolongada

Se prepararon muestras de transcrito de ARN y ARN blindado como en el ejemplo 2, excepto que se preparó el ARN blindado a 1500 copias por microlitro. A continuación, se añadió COPS a las muestras a una concentración final de 0, 0,1, 1 o 10 nM y se incubaron las muestras a 4 °C, 37 °C o 45 °C durante 12 semanas. La determinación de la estabilidad del ARN por RT-PCR se realizó como se describe en el ejemplo 3. La estabilidad mejoró significativamente con la presencia de COPS para tanto el ARN no blindado como el blindado a 37 °C y 45 °C de incubación. La figura 4 muestra los resultados de las curvas de crecimiento de RT-PCR para el molde de ARN no blindado. En ausencia de COPS (gráfico superior), la muestra incubada a 45 °C presentó un retraso de 10 ciclos del valor de Ct en comparación con la muestra incubada a 4 °C. Por el contrario, en presencia de COPS 10 nM (gráfico inferior), la muestra a 45 °C mostró solo un retraso de 1,4 ciclos, lo que demuestra una mejora de 8,6 ciclos

o aproximadamente 400 veces en la estabilidad del ARN. Para el experimento de ARN blindado, se observó una mejora de 7,4 ciclos o aproximadamente 200 veces (datos no mostrados).

Ejemplo 6: estabilización de ARN encapsulado en Accuplex

Accuplex (SeraCare Life Sciences, Milford MA) es una tecnología recombinante que puede encapsular una molécula de ARN de interés en el interior de una partícula similitiva de mamífero de replicación insuficiente que contiene tanto una cubierta de proteína como una bicapa lipídica. Para someter a prueba la utilidad de COPS para la estabilización del ARN en el interior de la partícula Accuplex, la secuencia de control de ARN, pEF070, que se usó para diseñar y preparar los oligonucleótidos complementarios descritos en el ejemplo 1, se proporcionó a SeraCare para la preparación personalizada de ARN monocatenario encapsulado en Accuplex. A continuación, se añadió COPS a las muestras de ARN en Accuplex a una concentración de 10 nM y se incubaron las muestras a 4 °C, 37 °C o 45 °C durante 71 días. La determinación de la estabilidad del ARN por RT-PCR se realizó como se describe en el ejemplo 3 y los resultados del estudio se muestran en la FIG. 6. Después de 71 días de incubación, el valor de ΔC_p entre ausencia y presencia de COPS fue de 4,3 (30,9-26,6) para 37 °C y 8,3 (35,3-27,0) para 45 °C, lo que muestra claramente la eficacia de COPS en la reducción de la degradación del ARN en partículas Accuplex que se almacenan a alta temperatura.

Ejemplo 7: estabilización por COPS de moldes de ARN del VIH

Se usaron tres secuencias de ARN correspondientes a segmentos de las regiones GAG de VIH-1, LTR de VIH-1 y LTR de VIH-2 como moldes de ARN para someter a prueba los efectos estabilizadores de sus correspondientes COPS. Se diseñaron un total de 25 oligonucleótidos, nueve para VIH-GAG, ocho para LTR de VIH-1 y ocho para LTR de VIH-2, para cubrir las respectivas secuencias de interés. Los 25 oligonucleótidos variaron en longitud entre 17 y 26 bases y sus secuencias se muestran en la tabla 2.

Tabla 2

SEQ ID NO:	SECUENCIA	MOLDE
11	CCCCACTGTGTTTAGC	GAG de VIH-1
12	CCTGGTGCAATAGGCCC	GAG de VIH-1
13	TTCCTGCTATGTCACCTCC	GAG de VIH-1
14	CCTTGGTTCTCTCATCTGG	GAG de VIH-1
15	TATCCCATTTCTGCAGCTTC	GAG de VIH-1
16	TGCATGCACTGGATGCACTC	GAG de VIH-1
17	TGCATGGCTGCTTGATGTCC	GAG de VIH-1
18	ATTTGTTCCCTGAAGGGTACTAGTAG	GAG de VIH-1
19	CTCATTGATGGTCTCTTTTAACATT	GAG de VIH-1
20	CCGAGTCCTGCGTCGAG	LTR de VIH-1
21	TTCAAGTCCCTGTTTCGGGC	LTR de VIH-1
22	GCTGTGTGCACTTCAGCAAG	LTR de VIH-1
23	ACCTAGAGTGGTCTGAGGGA	LTR de VIH-1
24	CGAGTCCCTATTAACCTTCGCT	LTR de VIH-1
25	TCTCTAGTTACCAGAGTCACACA	LTR de VIH-1
26	GCCACTGCTAGAGATTTTACACT	LTR de VIH-1
27	AGAACTTCTCTGGAACCTTTCGTTTT	LTR de VIH-1
28	TTCTGCTTGGTTTCC	LTR de VIH-2
29	AGCGTGGAGCCGTCTGC	LTR de VIH-2

30	ACCGAATGACCAGGCGGC	LTR de VIH-2
31	CAGGGTCTTGTTATTCAGGTGAAC	LTR de VIH-2
32	TTAACTTGCTTCTAACTGGCAGCT	LTR de VIH-2
33	CAAAGCAAGAAGGGTCCTAACAGAC	LTR de VIH-2
34	GACTAGGAGAGATGGGAACACACAC	LTR de VIH-2
35	TTATTAAGAGGTCTTTAAGCAAGCA	LTR de VIH-2

Se realizaron dos estudios de estabilidad. En el primer estudio, se usaron moldes de ARN blindado a 100 copias por microlitro en Tris.HCl (pH 7,0) que contenía KCl 100 mM. A continuación, se añadieron COPS correspondientes a SEQ ID NO: 11-35 a las muestras a una concentración final de 0 o 10 nM y se incubaron las muestras a 4 °C, 37 °C o 45 °C durante 15 semanas. Se realizó RT-PCR con cebadores correspondientes a los tres moldes de ARN usando las condiciones descritas en el ejemplo 3. Los resultados del estudio se muestran en la tabla 3 y demuestran claramente que la presencia de COPS estabilizó en gran medida ambos moldes de ARN.

Tabla 3

Molde	Concentración de COPS	Temperatura	Valor de Ct (número de ciclo)	Retraso de ciclo
GAG de VIH-1	0	4 °C	28,6	N/A
GAG de VIH-1	0	37 °C	32,9	4,3
GAG de VIH-1	0	45 °C	40,0	11,4
GAG de VIH-1	10 nM	4 °C	28,4	N/A
GAG de VIH-1	10 nM	37 °C	30,0	1,6
GAG de VIH-1	10 nM	45 °C	30,1	1,7
LTR de VIH-2	0	4 °C	29,8	N/A
LTR de VIH-2	0	37 °C	34,5	4,7
LTR de VIH-2	0	45 °C	Sin señal	-
LTR de VIH-2	10 nM	4 °C	29,8	N/A
LTR de VIH-2	10 nM	37 °C	30,9	1,1
LTR de VIH-2	10 nM	45 °C	31,7	1,9

En el segundo estudio, se usaron moldes de VIH-1 y VIH-2 no blindados a 300 copias por microlitro en presencia de una concentración de 0 o 10 nM del COPS correspondiente. Se incubaron las muestras a 4 °C, 37 °C o 45 °C durante 71 días. Se realizó RT-PCR con cebadores correspondientes a los tres moldes de ARN usando las condiciones descritas en el ejemplo 3. Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 4. La FIG. 5 muestra las curvas de crecimiento de RT-PCR generadas para el molde LTR de VIH-2. Estos experimentos muestran que COPS puede incrementar en gran medida la estabilidad de los moldes de ARN blindados y no blindados.

Tabla 4

Molde	Concentración de COPS	Temperatura	Valor de Ct (número de ciclo)	Retraso de ciclo
GAG de VIH-1	0	4 °C	27,3	N/A
GAG de VIH-1	0	37 °C	30,6	3,3
GAG de VIH-1	0	45 °C	32,9	5,6
GAG de VIH-1	10 nM	4 °C	27,0	N/A
GAG de VIH-1	10 nM	37 °C	27,4	0,4
GAG de VIH-1	10 nM	45 °C	27,7	0,7
LTR de VIH-2	0	4 °C	27,5	N/A

ES 2 886 605 T3

LTR de VIH-2	0	37 °C	30,5	3,0
LTR de VIH-2	0	45 °C	32,4	4,9
LTR de VIH-2	10 nM	4 °C	27,3	N/A
LTR de VIH-2	10 nM	37 °C	27,7	0,4
LTR de VIH-2	10 nM	45 °C	27,8	0,5

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG Roche Molecular Systems, Inc.	
5	<120>	Procedimiento genérico para la estabilización de ARN específico	
	<130>	P33287-WO-HS	
	<150>	US 62/271.614	
	<151>	28/12/2015	
	<160>	35	
10	<170>	PatentIn versión 3.5	
	<210>	1	
	<211>	14	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sintético	
	<400>	1	
		tcacctcgcc ccga	14
	<210>	2	
20	<211>	16	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sintético	
25	<400>	2	
		gagttcgtcg ggccgc	16
	<210>	3	
	<211>	16	
	<212>	ADN	
30	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido sintético	

	<400>	3		
			ggttgtgacc ggaacc	16
	<210>	4		
	<211>	17		
5	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Oligonucleótido sintético		
	<400>	4		
10			tgcgcgtccc gttttga	17
	<210>	5		
	<211>	18		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
15	<220>			
	<223>	Oligonucleótido sintético		
	<400>	5		
			ttttctagcg ttcgccca	18
	<210>	6		
20	<211>	20		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Oligonucleótido sintético		
25	<400>	6		
			aggggctttt tacgtgggag	20
	<210>	7		
	<211>	21		
	<212>	ADN		
30	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Oligonucleótido sintético		
	<400>	7		
			tacttcgtaa cgggtgcggg t	21

	<210>	8		
	<211>	22		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
5	<220>			
	<223>	Oligonucleótido sintético		
	<400>	8		
		ctcacttaat tgctggcgtc ag		22
	<210>	9		
10	<211>	24		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Oligonucleótido sintético		
15	<400>	9		
		cttcattctt gacatgtatg gcgc		24
	<210>	10		
	<211>	25		
	<212>	ADN		
20	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Oligonucleótido sintético		
	<400>	10		
		ttatacagta ccaatcgtcg gttcg		25
25	<210>	11		
	<211>	16		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
30	<223>	Oligonucleótido GAG de VIH-1 sintético		
	<400>	11		
		ccccactgtg tttagc		16
	<210>	12		

	<211>	17	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
5	<223>	Oligonucleótido GAG de VIH-1 sintético	
	<400>	12	
		cctggtgcaa taggccc	17
	<210>	13	
	<211>	19	
10	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido GAG de VIH-1 sintético	
	<400>	13	
15		ttcctgctat gtcacttcc	19
	<210>	14	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
20	<220>		
	<223>	Oligonucleótido GAG de VIH-1 sintético	
	<400>	14	
		ccttggttct ctcactctgg	19
	<210>	15	
25	<211>	19	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido GAG de VIH-1 sintético	
30	<400>	15	
		tatcccattc tgcagcttc	19
	<210>	16	
	<211>	20	
	<212>	ADN	

	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido GAG de VIH-1 sintético	
	<400>	16	
5		tgcattgcact ggatgcactc	20
	<210>	17	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
10	<220>		
	<223>	Oligonucleótido GAG de VIH-1 sintético	
	<400>	17	
		tgcattggctg cttgatgtcc	20
	<210>	18	
15	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido GAG de VIH-1 sintético	
20	<400>	18	
		atttgcttcct gaagggtact agtag	25
	<210>	19	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
25	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido GAG de VIH-1 sintético	
	<400>	19	
		ctcattgatg gtctctttta acatt	25
30	<210>	20	
	<211>	17	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	

	<220>		
	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-1 sintético	
	<400>	20	
		ccgagtcctg cgtcgag	17
5	<210>	21	
	<211>	19	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
10	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-1 sintético	
	<400>	21	
		ttcaagtccc tgttcgggc	19
	<210>	22	
	<211>	20	
15	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-1 sintético	
	<400>	22	
20		gctgtgtgca cttcagcaag	20
	<210>	23	
	<211>	20	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
25	<220>		
	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-1 sintético	
	<400>	23	
		acctagagtg gtctgagggga	20
	<210>	24	
30	<211>	22	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-1 sintético	

	<400>	24		
		cgagtcacctt ttaactttcg ct		22
	<210>	25		
	<211>	23		
5	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-1 sintético		
	<400>	25		
10		tctctagtta ccagagtcac aca		23
	<210>	26		
	<211>	24		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
15	<220>			
	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-1 sintético		
	<400>	26		
		gccactgcta gagattttta cact		24
	<210>	27		
20	<211>	25		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-1 sintético		
25	<400>	27		
		agaactttctc tggaactttc gtttt		25
	<210>	28		
	<211>	17		
	<212>	ADN		
30	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-2 sintético		
	<400>	28		
		ttcctgcctt gggtttcc		17

	<210>	29		
	<211>	17		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
5	<220>			
	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-2 sintético		
	<400>	29		
		agcgtggagc cgtctgc		17
	<210>	30		
10	<211>	18		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-2 sintético		
15	<400>	30		
		accgaatgac caggcggc		18
	<210>	31		
	<211>	24		
	<212>	ADN		
20	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-2 sintético		
	<400>	31		
		cagggctcttg ttattcaggt gaac		24
25	<210>	32		
	<211>	24		
	<212>	ADN		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
30	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-2 sintético		
	<400>	32		
		ttaacttgct tctaactggc agct		24
	<210>	33		
	<211>	25		

	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-2 sintético	
5	<400>	33	
		caaagcaaga agggtcctaa cagac	25
	<210>	34	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
10	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-2 sintético	
	<400>	34	
		gactaggaga gatgggaaca cacac	25
15	<210>	35	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
20	<223>	Oligonucleótido LTR de VIH-2 sintético	
	<400>	35	
		ttattaagag gtctttaagc aagca	25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de prevención o reducción de la degradación de un segmento de un molde de ARN monocatenario que se amplifica en una reacción de amplificación, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

a) proporcionar el molde de ARN monocatenario;

b) hibridar el segmento del molde de ARN monocatenario con uno o más oligonucleótidos con secuencias que son completa o parcialmente complementarias al segmento del molde de ARN monocatenario que se amplifica, en el que el uno o más oligonucleótidos se hibridan con más de un 48 % del segmento del molde de ARN monocatenario que se amplifica; y

c) retrotranscribir y amplificar el segmento del molde de ARN monocatenario en condiciones de reacción con lo que el uno o más oligonucleótidos no interfieren con la retrotranscripción y la amplificación y con lo que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos **se caracteriza por** tener entre 11 nucleótidos y 50 nucleótidos de longitud y tener una temperatura de fusión que es al menos 5 °C menor que una temperatura de extensión usada durante la amplificación, y en el que la secuencia de cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos no se superpone con la secuencia de otro oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos; y el uno o más oligonucleótidos están presentes a una concentración que es al menos cincuenta veces menor que las concentraciones de cebadores y sondas usadas durante la retrotranscripción y la amplificación.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el uno o más oligonucleótidos se hibridan con todo el segmento del molde de ARN monocatenario que se amplifica.

3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en el que el molde de ARN monocatenario está enjaulado.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el molde de ARN monocatenario se enjaula por medios seleccionados del grupo que consiste en encapsulación, encapsidación, captura y estar en el interior de una célula.

5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además entre la etapa b) y la etapa c), una etapa de aislamiento o purificación del molde de ARN monocatenario.

6. Un procedimiento de detección de la presencia de una secuencia de ARN sometida a prueba en una muestra de ácido nucleico durante una reacción de amplificación que comprende:

a) proporcionar la muestra de ácido nucleico;

b) proporcionar un patrón de ácido nucleico que sirve como patrón en la detección y/o cuantificación de la secuencia de ARN sometida a prueba en el que el patrón de ácido nucleico comprende una secuencia de control de ARN monocatenario y uno o más oligonucleótidos con secuencias que son completa o parcialmente complementarias a un segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario, en el que el uno o más oligonucleótidos se hibridan con más de un 48 % del segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario;

c) mezclar la muestra y el patrón de ácido nucleico;

d) proporcionar condiciones para realizar la retrotranscripción y la amplificación tanto de la secuencia de ARN sometida a prueba como del segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario, en el que, en dichas condiciones, el uno o más oligonucleótidos no interfieren con la retrotranscripción y la amplificación y con lo que cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos **se caracteriza por** tener entre 11 nucleótidos y 50 nucleótidos de longitud y tener una temperatura de fusión que es al menos 5 °C menor que una temperatura de extensión usada durante la amplificación, y en el que la secuencia de cada oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos no se superpone con la secuencia de otro oligonucleótido del uno o más oligonucleótidos; y el uno o más oligonucleótidos están presentes a una concentración que es al menos cincuenta veces menor que las concentraciones de cebadores y sondas usadas durante la retrotranscripción y la amplificación; y

e) detectar productos de amplificación de la secuencia de ARN sometida a prueba y del segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que el uno o más oligonucleótidos se hibridan con más de un 48 % del segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario o en el que el uno o más oligonucleótidos se hibridan con todo el segmento de la secuencia de control de ARN monocatenario.

8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, en el que la secuencia de control de ARN monocatenario está enjaulada.

5 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además entre la etapa c) y la etapa d) una etapa de aislamiento o purificación de la secuencia de control de ARN monocatenario.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el uno o más oligonucleótidos comprenden un grupo de oligonucleótidos con secuencias que se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1-10, 11-19, 20-27 y 28-35.

10

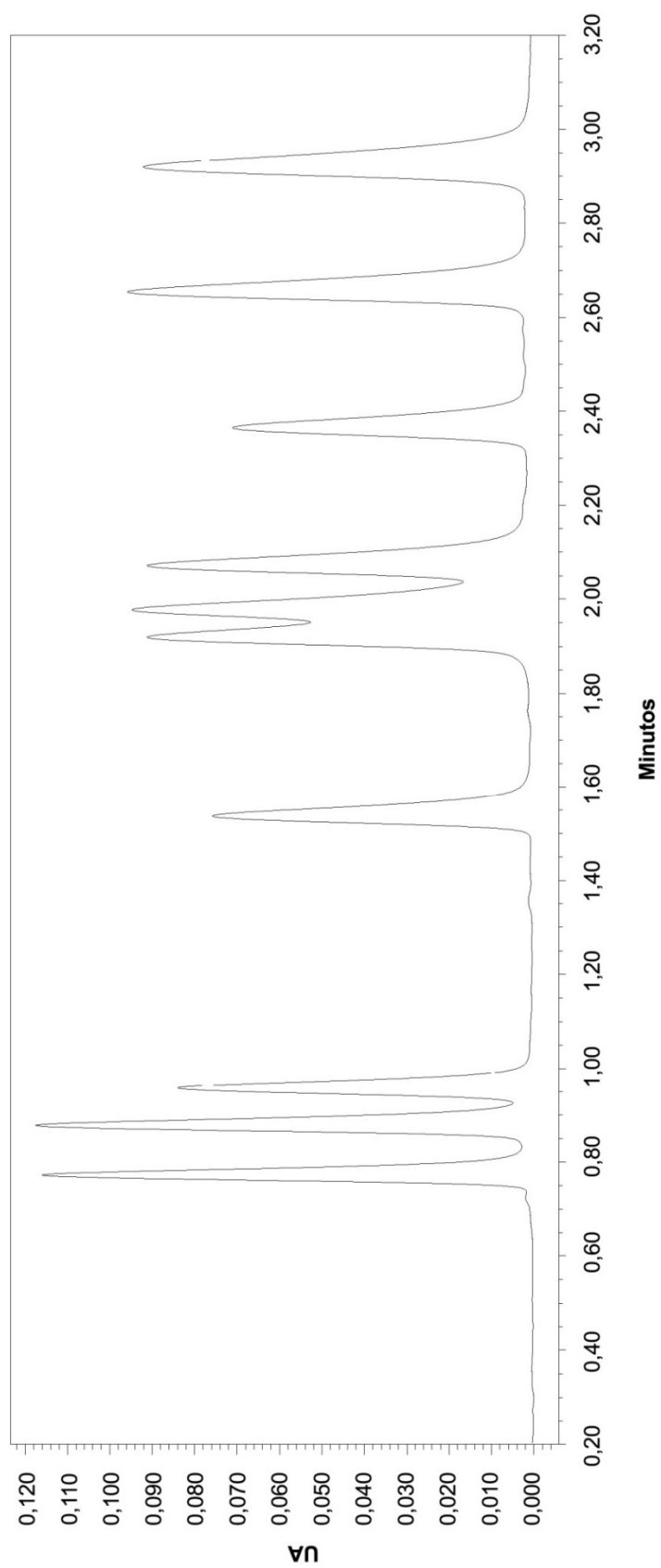


FIG. 1

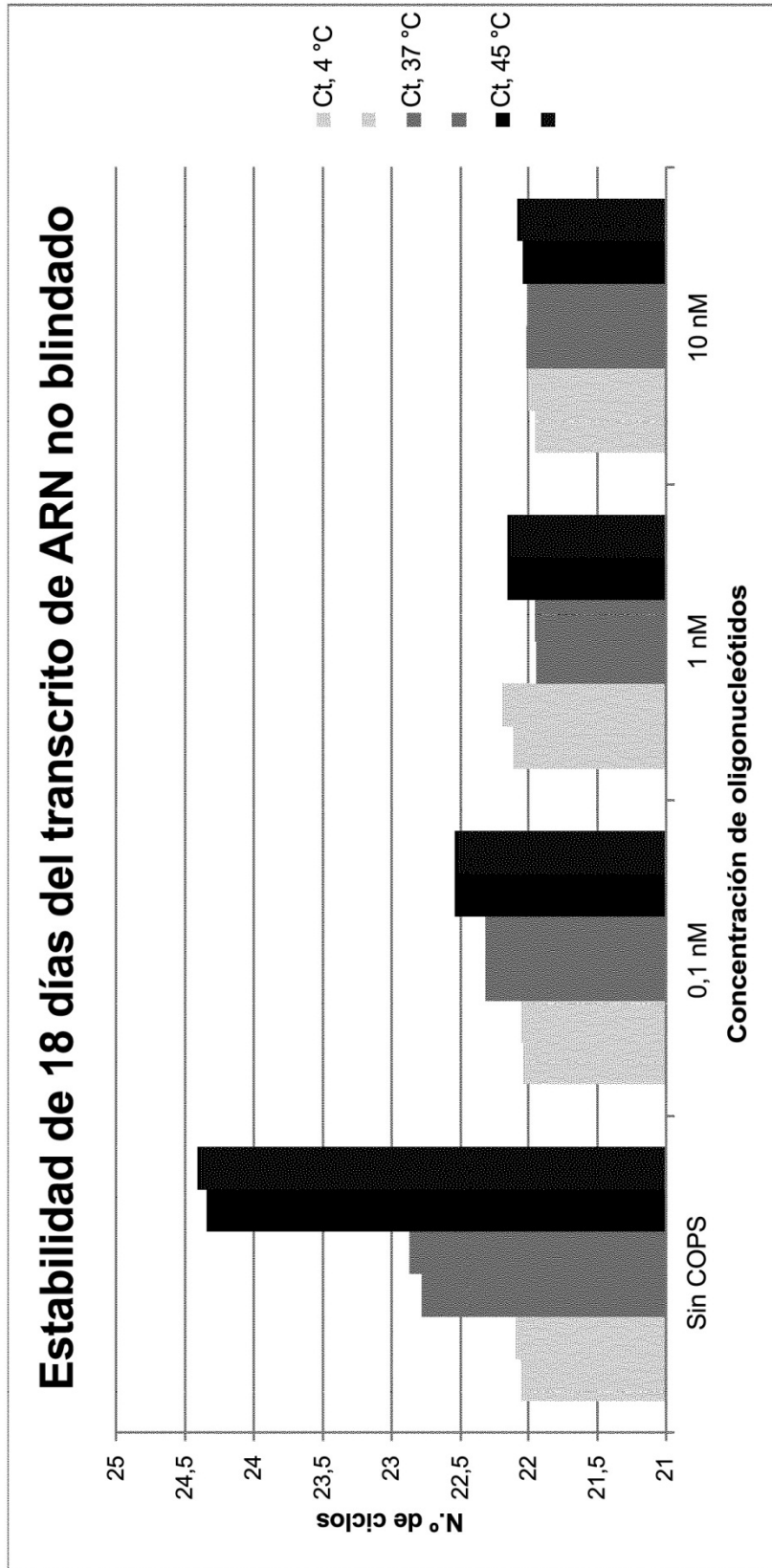


FIG. 2

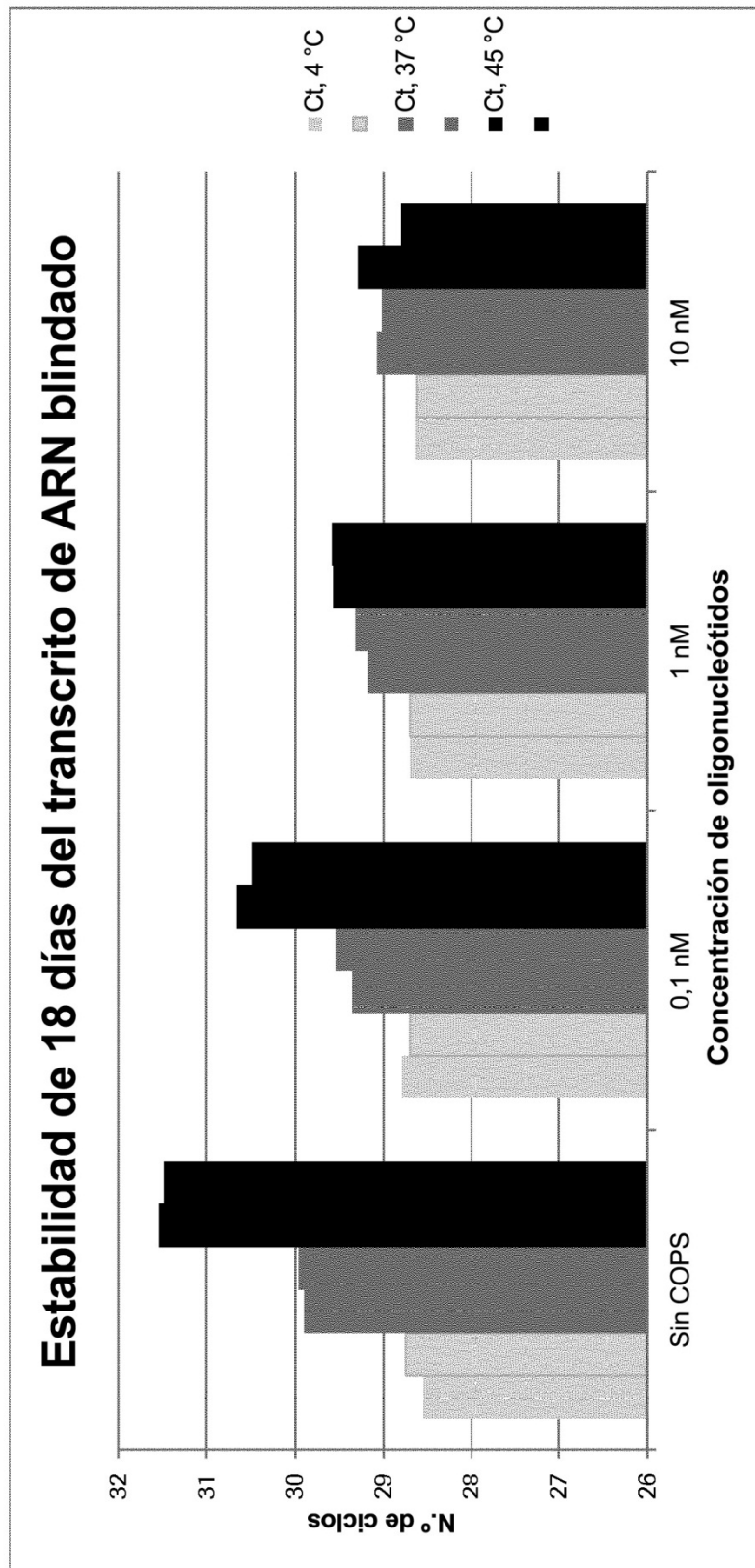


FIG. 3

Estabilidad de 12 semanas del transcrito de ARN no blindado a 4 °C, 37 °C o 45 °C

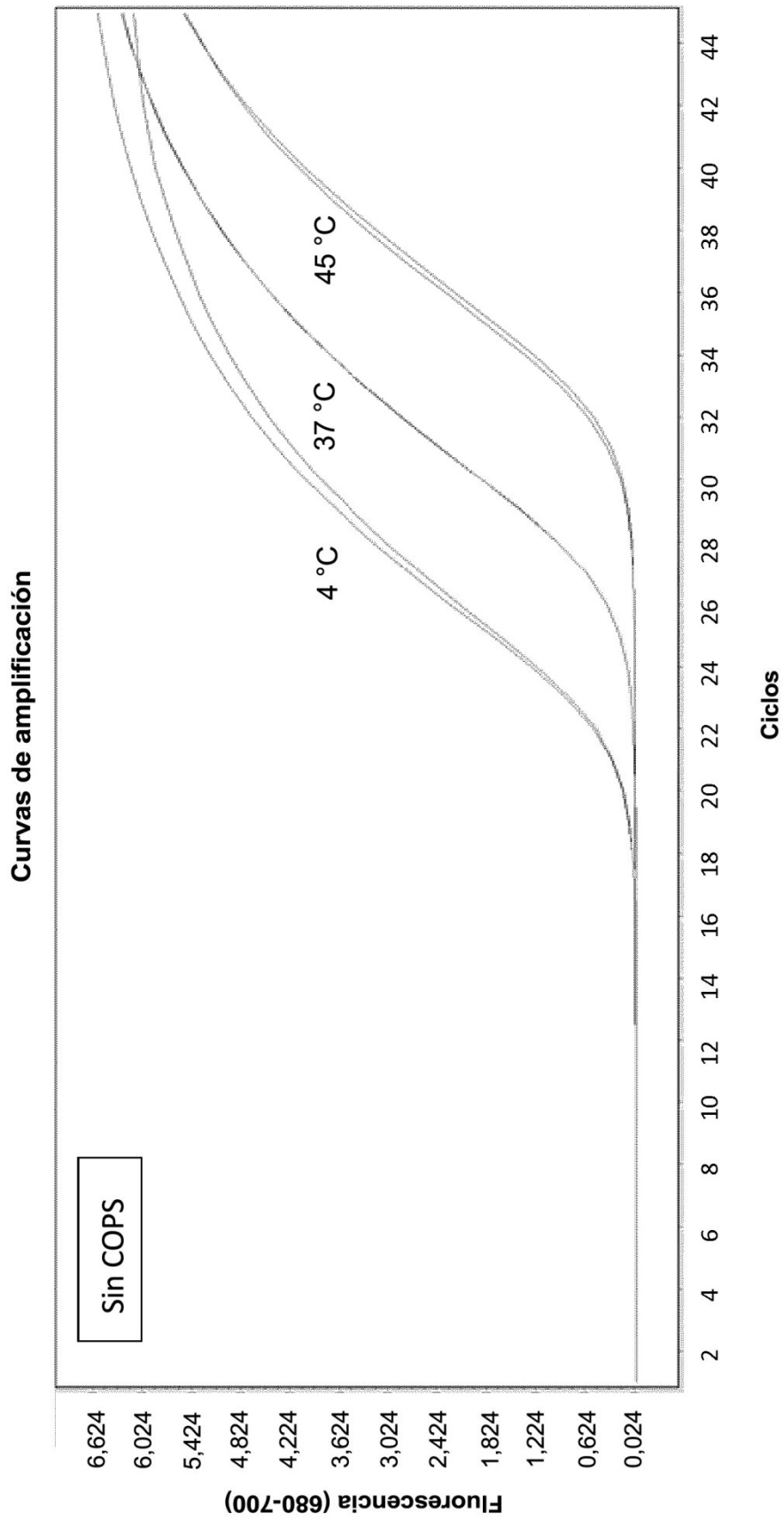


FIG. 4

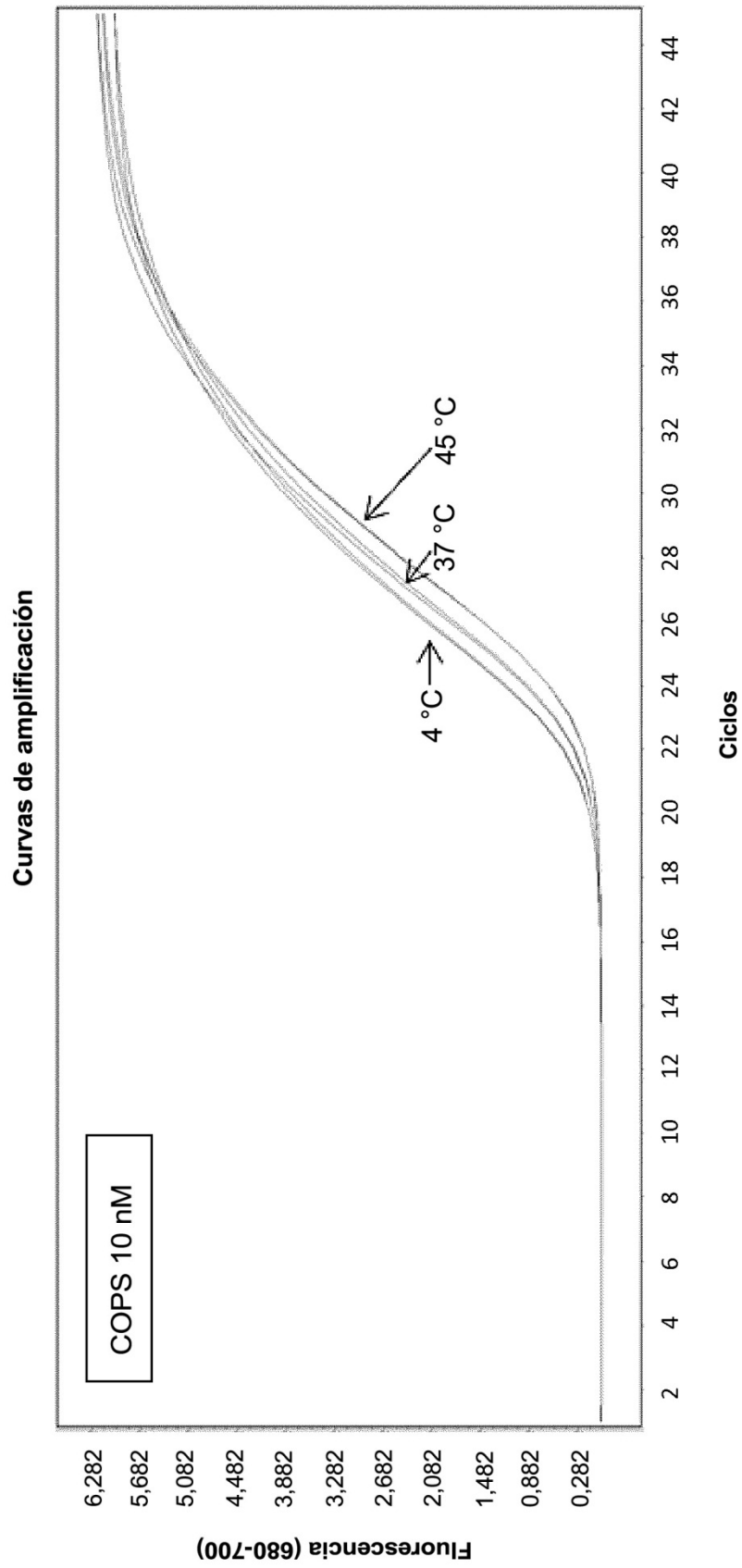


FIG. 4 cont.

Estabilidad de 71 días del transcrito de ARN del VIH-2 a 4 °C, 37 °C o 45 °C

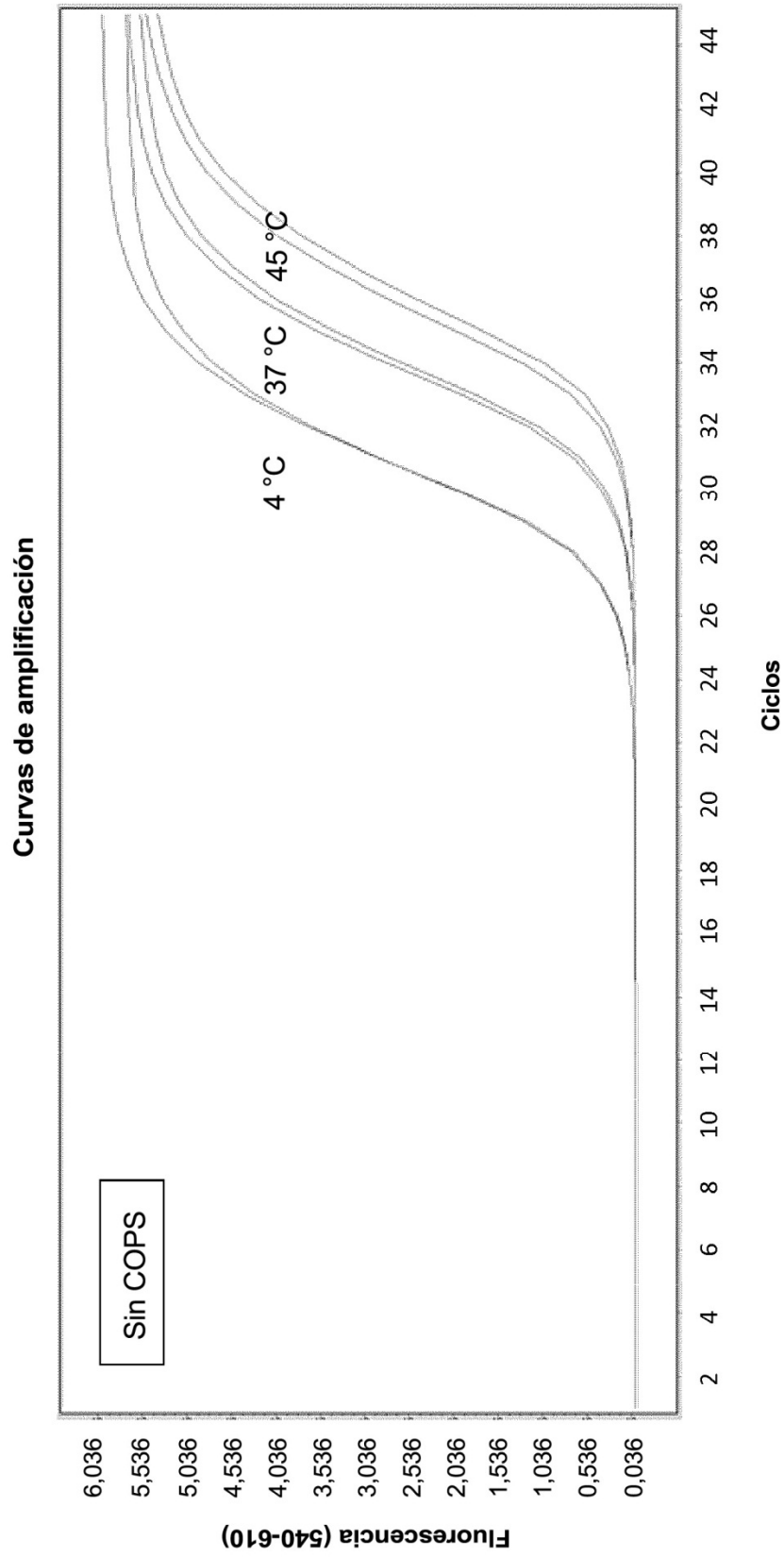


FIG. 5

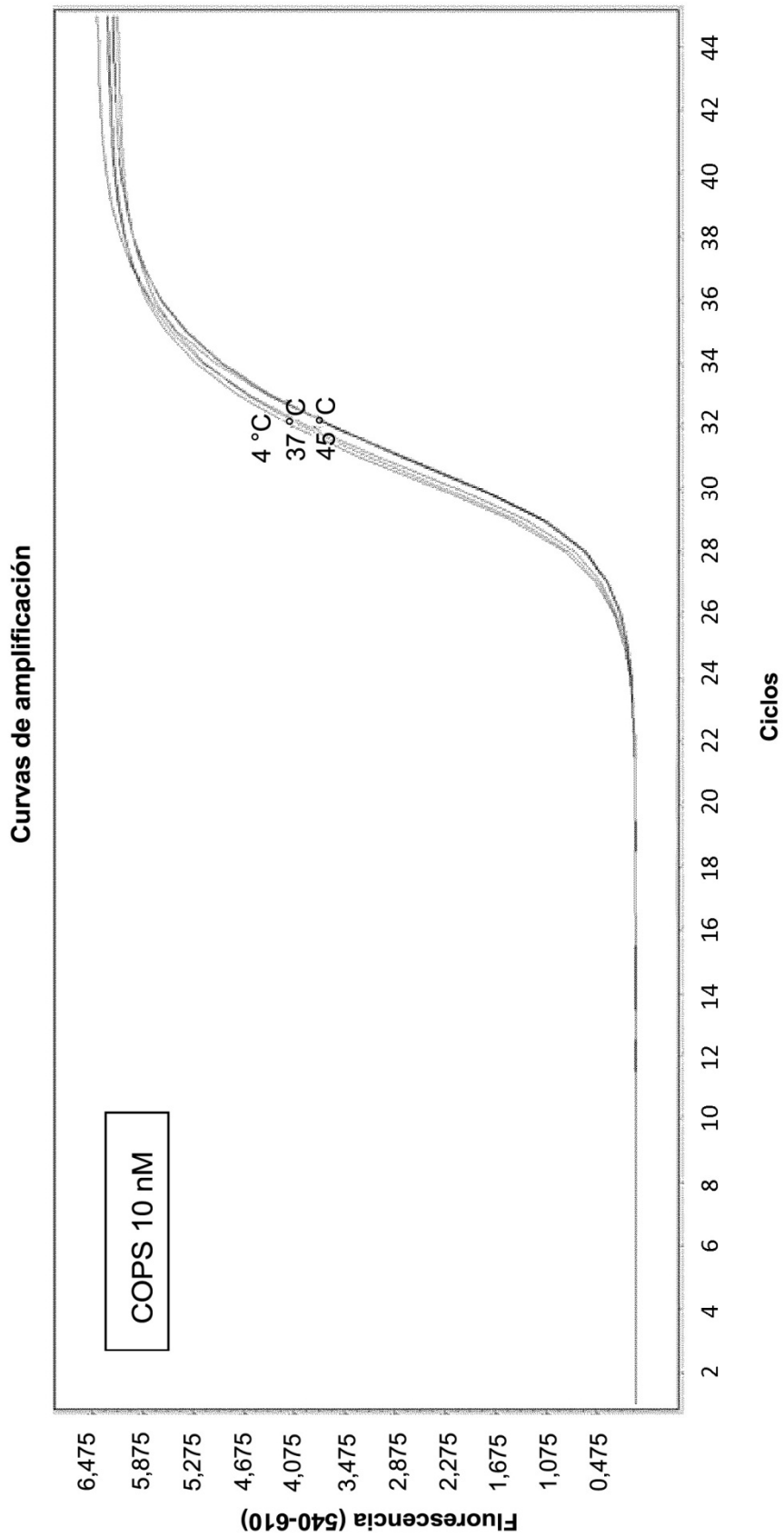


FIG. 5 cont.

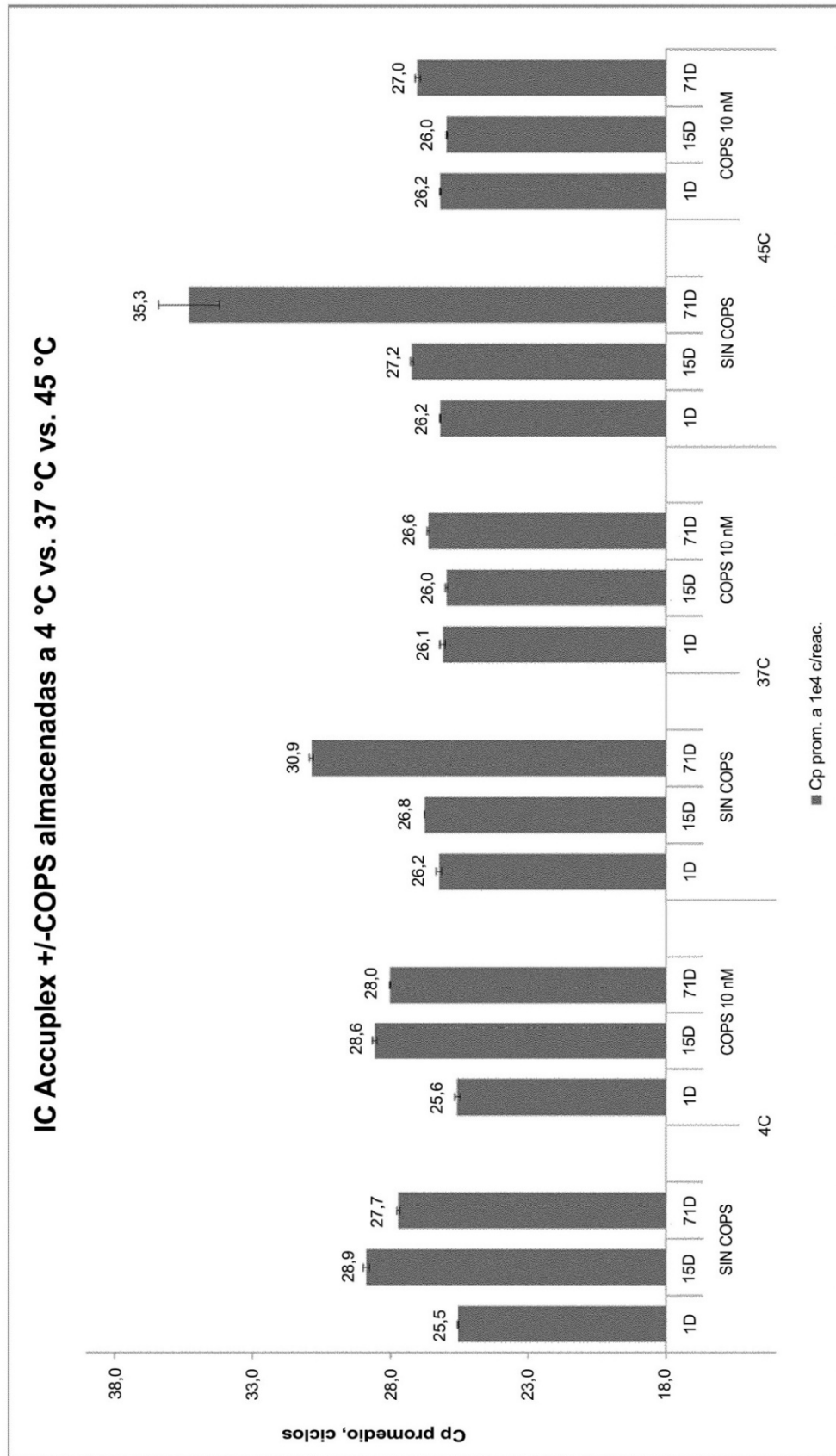


FIG. 6