



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 170 620**

⑫ Número de solicitud: 009902600

⑮ Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **25.11.1999**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.08.2002**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.08.2002

⑰ Solicitante/s: **Universidad de Alcalá**
Plaza de San Diego s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Domingo Galán, Alberto y**
Carraco Cuevas, Carolina

⑳ Agente: **No consta**

② Título: **Procedimiento de cuantificación de ácidos nucleicos mediante amplificación por reacción en cadena de polimerasa hemi-competitiva.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de cuantificación de ácidos nucleicos mediante amplificación por reacción en cadena de polimerasa hemi-competitiva, basado en la co-amplificación de un segmento de ácido nucleico analito y un segmento de ácido nucleico patrón intrínsecamente ajeno a la muestra que contiene el analito, siendo dicha coamplificación realizada mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) en la que intervienen tres oligonucleótidos cebadores, A, B y C, siendo el analito amplificado por la pareja formada por los cebadores A y C, y el patrón amplificado por la pareja B y C, siendo A un cebador específico y exclusivo del analito, B un cebador específico y exclusivo del patrón, y C un cebador específico de forma común para el analito y el patrón, de forma que durante el proceso de amplificación se establece una competición por la unión del cebador C entre el analito y el patrón, o sus respectivos productos de amplificación. La cuantificación del analito se consigue añadiendo una cantidad conocida del patrón a una alícuota de la muestra que se sospecha que contiene dicho analito, realizando una PCR con los cebadores A, B y C, cuantificando los productos de amplificación del analito y del patrón, y deduciendo la cantidad de analito presente en la muestra inicial a partir de las cantidades relativas de dichos productos de amplificación.

ES 2 170 620 A1

DESCRIPCION

Procedimiento de cuantificación de ácidos nucleicos mediante amplificación por reacción en cadena de polimerasa hemi-competitiva.

Campo de aplicación - Sector de la técnica al que se refiere la invención

El procedimiento descrito en esta patente sirve para la detección cuantitativa, absoluta o relativa, de ácidos nucleicos, o derivados de estos, caracterizados por tener una secuencia de bases determinada, siendo esta secuencia la que define realmente al analito. Por tanto, y en base a la terminología común en su campo de aplicación, podemos referirnos a este y otros tipos de procedimientos relacionados como de cuantificación de secuencias específicas, para diferenciarlos de los procedimientos de cuantificación de ácidos nucleicos genéricos, bien DNA o RNA o totales (DNA más RNA), independientemente de cual sea su secuencia de bases.

La cuantificación de ácidos nucleicos de secuencia específica es un proceso de utilidad muy diversa en el campo de la biología y la medicina, tanto para fines de investigación como diagnósticos, así como en otros campos afines a estos.

Estado de la técnica

Hasta la actualidad se han descrito y patentado numerosos procedimientos y aparatos para la cuantificación de ácidos nucleicos de secuencia específica.

Dentro de estos se encuentran muchos que no contienen o no dependen de un proceso de amplificación por reacción en cadena de polimerasa (PCR), y que por tanto no guardan ninguna relación con el objeto de esta patente.

También se encuentran diversos procedimientos que dependen de un proceso de amplificación por PCR, pero que realizan la cuantificación del o de los productos de amplificación por diversos procedimientos pero *durante* el proceso de PCR, a lo largo de un número de ciclos de amplificación sucesivos, siendo el estado final del proceso esencialmente irrelevante para la determinación cuantitativa, y por tanto tampoco guardan ninguna relación con el procedimiento objeto de esta patente, que solo depende y se basa en el estado final del proceso de amplificación.

Hay otros procedimientos que dependen de amplificación por PCR a punto final, pero que no dependen o se basan en una unión competitiva de uno o varios cebadores al analito y a un patrón interno en la reacción, y por tanto tampoco guardan ninguna relación con el procedimiento objeto de esta patente, que depende en su esencia de una reacción de unión competitiva de este tipo.

Hay también procedimientos que se basan en una PCR a punto final, de carácter competitivo en el sentido indicado o carentes de dicho carácter competitivo, pero que se fundamentan en la utilización de una secuencia endógena en calidad de patrón o referencia, esto es, distinta del analito pero también presente en la misma muestra a analizar por su propia naturaleza u origen, por ejemplo otro gen u otro mensajero que se sabe que está presente en dicha muestra y cuya cantidad se toma como valor de referencia para obtener

una cuantificación relativa del analito. En tanto que este carácter endógeno del patrón forme parte inherente del procedimiento reivindicado, estos procedimientos carecen de relación con el objeto de esta patente, que específicamente se describe en las reivindicaciones como dependiente de un patrón exógeno, no presente como tal secuencia completa en la muestra original a analizar.

El procedimiento descrito y reivindicado en esta patente tiene como únicos antecedentes relacionados, y único posible conflicto de diferenciación entre procedimientos, aquellos que reivindicaban un fundamento de tipo competitivo, que implica el uso de un patrón exógeno (al menos de origen no determinado, pero en cualquier caso no endógeno como fundamento básico del método), donde esta competencia se establece durante el proceso de amplificación por PCR, y que realizan la cuantificación sobre los productos finales de dicha PCR. Este procedimiento ha sido descrito y se encuentra patentado, y se conoce comúnmente por los profesionales de su campo específico de aplicación como PCR competitiva (competitive PCR), y en algunos textos como Q-PCR (por Quantitative PCR), si bien hay otros procedimientos cuantitativos, pero no con fundamento competitivo, que utilizan esta misma nomenclatura y que por tanto puede llevar a confusiones.

Todas las descripciones y patentes revisadas que hacen referencia a este procedimiento de PCR competitiva tienen una elemento común que es el que lo diferencia totalmente del procedimiento objeto de esta patente: en todos los casos se utiliza *una pareja de cebadores, no tres*, de modo que ambos cebadores de la pareja amplifican tanto el patrón como el analito, estableciéndose por supuesto una competencia en la unión de ambos cebadores a los mencionados patrón y analito, o sus productos de amplificación respectivos.

El hecho de que la competencia se establezca por uno solo o por los dos cebadores posiblemente no representa en sí mismo una diferencia notable en el fundamento del método. El hecho fundamental que lo diferencia es precisamente el contrario, es decir, que el otro cebador de cada par es diferente para el analito y para el patrón. Esta diferencia es un fundamento intrínseco del método descrito y reivindicado en esta patente, sobre el cual se puede construir toda una diversidad de procedimientos de cuantificación diferencial de los productos amplificados, después de la PCR, que constituyen un paso intermedio pero imprescindible para la cuantificación del analito. Todos estos procedimientos y variantes, que se apoyan en esta diferencia en los cebadores específicos y exclusivos del analito y del patrón, están recogidas en reivindicaciones específicas. Téngase en cuenta que los cebadores en la PCR tienen carácter de reactivos que se consumen al incorporarse en los productos de amplificación. Esta incorporación de los cebadores se realiza de forma íntegra, esto es, cualquier marcaje que se haya realizado previamente sobre dichos cebadores queda incorporado igualmente a los productos de amplificación respectivos. Por tanto, el disponer de dos cebadores independientes, diferentes y específicos para analito y patrón respectivamente, permite un marcaje igualmente independiente, diferente

y específico de sus correspondientes productos de amplificación.

Esta es la novedad y utilidad fundamental, sencilla pero no obvia, que aporta el procedimiento descrito y reivindicado en esta patente. Todas las demás reivindicaciones son derivadas de esta.

Explicación de la invención, de un modo de realización de la misma y sus ventajas sobre la tecnología actual

La invención consiste en un procedimiento de cuantificación de ácidos nucleicos mediante amplificación por reacción en cadena de polimerasa hemi-competitiva, basado en la coamplificación de un segmento de ácido nucleico analito y un segmento de ácido nucleico patrón, siendo este patrón intrínsecamente ajeno a la muestra que contiene el analito, y siendo dicha coamplificación realizada mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) en la que intervienen tres oligonucleótidos cebadores, A, B y C. El segmento analito es amplificado por la pareja formada por los cebadores A y C, y el segmento patrón es amplificado por la pareja formada por los cebadores B y C. Por tanto A un es cebador específico y exclusivo del analito, B es un cebador específico y exclusivo del patrón, y C es un cebador específico de forma común para el analito y el patrón. Durante el proceso de amplificación se establece una competición por la unión del cebador C entre el analito y el patrón, o sus respectivos productos de amplificación. La cuantificación del analito se consigue añadiendo una cantidad conocida del patrón a una alícuota de la muestra que se sospecha que contiene el analito, realizando una PCR con los cebadores A, B y C, cuantificando los productos de amplificación del analito y del patrón, y deduciendo la cantidad de analito presente en la muestra inicial a partir de las cantidades relativas de dichos productos de amplificación.

Una forma de aplicación sería seguir las indicaciones anteriores y si la cantidad de productos de amplificación del analito es superior a la de productos de amplificación del patrón, se deducirá que, en la alícuota de la muestra que se ha utilizado en la reacción en cadena de polimerasa, el analito estaba presente en una cantidad superior a la cantidad de patrón añadido a dicha reacción, siendo esta cantidad conocida de antemano al tratarse de un patrón o "standard" perfectamente caracterizado. Si la relación de cantidades de productos de amplificación de analito y de patrón fuese la contraria, se deducirá que el analito estaba presente en una cantidad inferior a la del patrón añadido. Por último, si las cantidades de productos amplificados son las mismas para el analito y para el patrón, se deducirá que el analito estaba presente en dicha alícuota en la misma cantidad que el patrón. Todo esto basado en que la competición por el cebador común, C, durante el proceso de amplificación se traduce en una amplificación, esto es un incremento del número de copias de ambas secuencias, pero no independiente para cada una de ellas, de modo que el valor de la relación de cantidades de analito y patrón antes de la reacción de amplificación puede ser igual, similar o diferente al valor de la relación final, tras la reacción, pero dicha ampli-

cación competitiva no cambia el carácter de dicha relación, en el sentido de ser mayor, menor o igual a uno, si se expresa como fracción o cociente, o mayor, menor o igual a cero si se expresa como diferencia. En todo este razonamiento hay siempre que considerar un cierto intervalo de error en todas las mediciones implicadas.

De esta forma de aplicación sencilla se pasa, por extrapolación, a la forma de aplicación más útil y realista, que consiste en realizar no una sola reacción con una sola cantidad de patrón, sino una serie de reacciones, por ejemplo con una cantidad igual en todas ellas de la muestra a analizar, y cantidades distintas y todas ellas conocidas de patrón. Basta así determinar las cantidades de productos de amplificación del patrón y del analito en todas las reacciones, tras someterlas a un proceso de amplificación en idénticas condiciones, y en aquella reacción de la serie donde ambas cantidades de productos amplificados sean iguales será debido a que las cantidades iniciales eran también iguales, y puesto que conocemos la cantidad inicial de patrón en esa reacción, directamente podemos deducir la cantidad de analito en la alícuota de la muestra, y a su vez, con los cálculos adecuados, tendremos determinada la cantidad o concentración del analito en dicha muestra. Una aproximación que se considera válida en el campo, en el caso de que no ocurra esta igualdad en ninguna de las reacciones de la serie, consiste en representar gráficamente el logaritmo de la relación (cantidad de productos de amplificación del analito partido por cantidad de productos de amplificación del patrón) frente al logaritmo de la cantidad inicial de patrón, para cada reacción de la serie. Donde la recta ajustada a dichos puntos experimentales pase por el valor cero para el logaritmo de la relación de productos se determina el valor de logaritmo de patrón inicial que le correspondería, en este caso ya de forma teórica, y de este valor se deduce la cantidad de analito como antes. Hasta aquí la descripción es idéntica a la de los procedimientos de PCR competitiva ya conocidos, que emplean una pareja de cebadores.

La característica diferencial del procedimiento descrito en esta patente, en cuanto a la forma de aplicación, reside en las múltiples posibilidades que admite en todo lo relativo al paso de determinar las cantidades de los productos amplificados del analito y del patrón. Lo que sigue es la descripción de un ejemplo hipotético que aprovecha una de estas múltiples posibilidades, correspondiente además a una de las reivindicaciones de esta patente.

En este ejemplo se supone que los tres cebadores, A, B y C, están marcados con X, Y y Z respectivamente, habiéndose incorporado esta marca previamente a la realización de todo el procedimiento. En este ejemplo se supone que la marca Z (cebador C, común) es un medio de captura, por ejemplo biotina, que permite la retención sobre un soporte insoluble que tiene unidas moléculas de avidina, por ejemplo la superficie interior de una cubeta, tubo o recipiente que permita una determinación fluorimétrica. Siempre dentro del ejemplo, las marcas X (cebador A, del analito) e Y (cebador B, del patrón) son dos medios de de-

tección, por ejemplo dos grupos fluorescentes con distintas características espectrales, por ejemplo rodamina y fluoresceína respectivamente. Como resultado del proceso de amplificación tendremos una mezcla que contiene segmentos de DNA doble hebra resultantes de la amplificación del analito, y que por tanto contienen los cebadores A y C en sus extremos, y con ellos las marcas respectivas X y Z, cada uno en una de las hebras y ambos en los extremos 5' de su hebra correspondiente. Igualmente dicha mezcla contendrá segmentos de DNA de doble hebra resultantes de la amplificación del patrón, que análogamente tendrán las marcas Y y Z. Esta mezcla resultante de la PCR se pasa al recipiente antes indicado que contiene avidina unida a su superficie interna. Debido a la capacidad de unión que existe entre la avidina y la biotina (marca Z, presente en ambos productos de amplificación), ambos tipos de productos de amplificación resultan inmovilizados sobre dicha superficie recubierta de avidina. El resto de la mezcla se descarta tras un tiempo de incubación que permita la compleción del proceso de unión, y con ello se eliminan todos los compuestos que se encuentren en disolución en dicha mezcla. Tras un lavado, por ejemplo con un medio salino, para eliminar todos los restos de dicha mezcla, se procede a determinar cuantitativamente la intensidad de fluorescencia del material retenido sobre la superficie recubierta de avidina antes descrita, discriminando la intensidad de fluorescencia debida a la marca X de aquella debida a la marca Y, mediante el uso adecuado de las longitudes de onda de excitación y de emisión características de cada fluorocromo. Puesto que los únicos compuestos portadores de la marca X que pueden quedar retenidos sobre la superficie a través de la marca Z son los productos de amplificación completos del analito, que tienen ambas marcas, la determinación cuantitativa de la marca X aporta una medida proporcional a la cantidad de dichos productos de

amplificación del analito. Por el mismo razonamiento la determinación cuantitativa de la marca Y aporta una medida proporcional a la cantidad de los productos de amplificación del patrón.

Nótese que en todo este proceso de cuantificación diferencial no se ha requerido ninguna separación física de los dos tipos de productos amplificados, mediante técnicas electroforéticas por ejemplo, ni tampoco ninguna reacción diferencial con otros reactivos adicionales, como una hibridación con sondas específicas del analito y/o del patrón, ni se ha mencionado ninguna diferencia de tamaño o de secuencia entre patrón y analito, o sus productos de amplificación, a excepción de la diferencia de secuencia en las regiones donde se unen los cebadores no comunes, A y B.

Toda esta descripción tiene el carácter de ejemplo de una de las posibles formas de aplicación del procedimiento objeto de esta patente, que demuestra algunas de las utilidades que aporta el hecho de limitar la competición a uno solo de los cebadores, común al analito y al patrón, de modo que los otros dos cebadores sean diferentes, uno específico y exclusivo del analito y el otro específico y exclusivo del patrón.

Aplicación industrial

La aplicación industrial del procedimiento descrito y reivindicado en esta patente consiste en su utilización como base de kits comerciales para la cuantificación de ácidos nucleicos de una o varias secuencias específicas, o bien en la comercialización de los componentes, como cebadores y patrones por separado. Otras aplicaciones consisten en la comercialización de dispositivos o aparatos específicos para la etapa de determinación cuantitativa de los productos de amplificación del analito y del cebador tras la PCR. Otras aplicaciones consisten en la utilización de este procedimiento cuantitativo como parte de procesos que se comercialicen como servicios.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el análisis cuantitativo de un ácido nucleico analito en una muestra, **caracterizado** por:

- 1.a. el empleo de un ácido nucleico patrón (control), exógeno a la muestra.
- 1.b. el empleo de tres oligonucleótidos cebadores.
- 1.c. la realización de la co-amplificación del analito y del patrón, mediante una reacción de polimerización enzimática en la cual dichos ácidos nucleicos analito y patrón actúan como “moldes” y los tres oligonucleótidos citados actúan como “cebadores”, siendo uno de los cebadores común para el patrón y el analito y los otros dos cebadores específicos, uno para el analito y otro para el patrón.
- 1.d. la cuantificación de los productos resultantes de dicha co-amplificación.

2. Un procedimiento para el análisis cuantitativo de un ácido nucleico en una muestra, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el analito es una molécula o fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), definido por:

- 2.a. un segmento contiguo con una secuencia de bases específica y conocida, o bien
- 2.b. más de uno de tales segmentos en la misma molécula pero separados entre sí.

3. Un procedimiento para el análisis cuantitativo de un ácido nucleico en una muestra, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el patrón (control) es una molécula, fragmento o derivado de ADN o ARN, **caracterizado** por:

- 3.a. ser exógeno o ajeno a la muestra a analizar, de modo que su secuencia de bases completa se sabe o se supone que no está presente en dicha muestra, no aplicándose esto a partes de dicha secuencia.
- 3.b. unir uno de los tres cebadores, en adelante “cebador común”, el cual también se une al analito, y por tanto una característica derivada de esta es:
- 3.c. compartir un segmento de su secuencia con el analito, al menos aquella a la que se une dicho cebador común.
- 3.d. unir un segundo cebador, en adelante “cebador del patrón”, el cual no se une al analito, y por tanto una característica derivada de esta es:
- 3.e. tener un segmento de su secuencia que no está presente en el analito, al menos aquella secuencia a la que se une dicho cebador del patrón.

4. Un procedimiento para el análisis cuantitativo de un ácido nucleico en una muestra, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los tres cebadores empleados son oligonucleótidos sintéticos cuyas secuencias se diseñan para cada aplicación de modo que uno de ellos (cebador del patrón) se une a una región del patrón, otro (cebador del analito) se une a una región del analito, el tercero (cebador común) se une tanto al patrón como al analito, la pareja formada por el cebador del analito y el cebador común posibilita la “amplificación” del analito, y la pareja formada por el cebador del patrón y el cebador común posibilita la amplificación del patrón.

5. Un procedimiento para el análisis cuantitativo de un ácido nucleico en una muestra, según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** por las siguientes etapas:

- 5.a. tomar una alícuota de la muestra, de la cual se sabe o sospecha que contiene el analito, y añadir a dicha alícuota una cantidad predeterminada de patrón.
- 5.b. tratar dicha muestra en condiciones adecuadas para llevar a cabo una amplificación por reacción en cadena de polimerasa, en la cual dichos ácidos nucleicos, patrón y analito, son llevados a un estado de cadena sencilla y expuestos a un agente para polimerización, deoxirribonucleótidos 5' trifosfato, y una pareja de cebadores para el patrón más una pareja de cebadores para el analito.

La pareja de cebadores para el analito esta compuesta por el cebador común y el cebador del analito, y la pareja de cebadores para el patrón está compuesta por el cebador común y el cebador del patrón.

De tal modo se puede sintetizar un producto de extensión de cada uno de los cebadores usando como molde para la síntesis las hebras separadas del patrón y del analito. Los productos de la extensión de cada cebador, cuando se separan de la hebra molde correspondiente, pueden servir como molde para la síntesis de productos de extensión del otro cebador de cada par.

- 5.c. separar de sus hebras molde los productos de extensión de los cebadores para formar moléculas de cadena sencilla.
- 5.d. Repetir los pasos (5.b) y (5.c) sobre las moléculas de cadena sencilla producidas en el paso (5.c) al menos una vez, siendo cada repetición de los pasos (5.b) y (5.c) un ciclo de amplificación.
- 5.e. repetir el paso (5.b) sin que este sea seguido de una repetición del paso (5.c). El producto de interés que se obtiene en la reacción al terminar este paso (5.e) consiste en segmentos de ácido nucleico en estado de doble hebra que denominamos en lo sucesivo como productos de amplificación del analito o bien segmentos amplificados del analito, y productos de amplificación del patrón o bien segmentos amplificados del patrón.

5.f. cuantificar las cantidades de los segmentos amplificados del patrón y de los segmentos amplificados del analito producidos en el paso (5.e).

5.g. finalmente calcular, a partir los segmentos amplificados del patrón y del analito producidos en el paso (5.e), la cantidad de dicho segmento de ácido nucleico analito presente en la muestra antes de la amplificación.

6. Un método según la reivindicación 5 que además incluye el paso de preparar al menos dos mezclas según el paso (5.a) antes del paso (5.b), de tal modo que se varían las cantidades del patrón y/o del analito antes de dicha reacción de amplificación, y todos los pasos posteriores se realizan por igual para dichas dos o más mezclas.

7. Un método según las reivindicaciones 5 y 6, en el cual el analito y el patrón son ambas moléculas o segmentos de ácido desoxirribonucleico, ADN.

8. Un método según las reivindicaciones 5 y 6, en el cual el analito o el patrón o ambos son moléculas o segmentos de ácido ribonucleico, ARN, y dicho ARN es transcrito en reverso de forma que se obtiene un segmento de ADN complementario a dicho ARN, en adelante referido como cDNA, realizándose este paso antes del paso (5.a) o antes del paso (5.b).

9. Un método según las reivindicaciones 5 a 8, en el cual los segmentos resultantes de la amplificación del patrón y del analito difieren en longitud, y por tanto en masa molecular, de forma que son distinguibles tras la aplicación de un procedimiento de separación que aproveche esta diferencia, y la cuantificación señalada en el paso (5.f) se realiza después de, y gracias a, dicho procedimiento de separación.

10. Un procedimiento según las reivindicaciones 5 a 8, en el cual al menos uno de los oligonucleótidos cebadores está marcado, y la cuantificación señalada en el paso (5.f) se realiza determinando la cantidad de dicha marca incorporada en los productos amplificados.

11. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el cual el cebador marcado es el cebador común.

12. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha marca contiene o consiste en un grupo químico con propiedades o características que permiten su detección y cuantificación por técnicas espectroscópicas de absorción y/o fluorescencia.

13. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha marca contiene o consiste en isótopos radiactivos.

14. Un procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicha marca contiene o consiste en un grupo químico con propiedades o características que permiten su detección y cuantificación por técnicas electroquímicas.

15. Un procedimiento según la reivindicación 10, en que dicha marca contiene o consiste en un grupo químico o de origen biológico que se une de forma específica a una determinada proteína.

16. Un procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicha proteína está marcada con un

grupo químico con propiedades o características que permiten su detección o cuantificación, mediante técnicas espectroscópicas de absorción o fluorescencia, o isotópicas, o electroquímicas, o dicho anticuerpo, fragmento o derivado está unido a un enzima que permite su detección y cuantificación a través de una reacción catalizada por dicho enzima.

17. Un procedimiento según las reivindicaciones 15 y 16, en el que dicha proteína es del tipo de las inmunoglobulinas, también denominadas anticuerpos, o un fragmento derivado de dichas inmunoglobulinas, o una proteína de secuencia total o parcialmente artificial derivada por selección o diseño de dichas inmunoglobulinas.

18. Un procedimiento según las reivindicaciones 15 y 16, en el que dicha proteína es la avidina, streptavidina u otro derivado de estas que conserva la capacidad de unir biotina, y dicha marca es o contiene biotina o un derivado de biotina.

19. Un procedimiento según la reivindicación 10, en que dicha marca contiene o consiste en un grupo químico o de origen biológico que se une de forma específica a un determinado material o molécula de naturaleza no proteica.

20. Un procedimiento según las reivindicaciones 5 a 8, en el cual al menos uno de los deoxirribonucleótidos 5' trifosfato está marcado de forma que dicha marca resulta incorporada en los productos de polimerización de dicho monómero, y la cuantificación señalada en el paso (5.f) se realiza determinando la cantidad de dicha marca incorporada en los productos amplificados.

21. Un procedimiento según las reivindicaciones 5 a 8, en el que los dos oligonucleótidos cebadores no comunes están marcados de diferente forma, en adelante denominando X a la marca del cebador del analito, e Y a la marca del cebador del patrón, y la cuantificación señalada en el paso (5.f) se realiza determinando las cantidades de dichas marcas, X e Y, incorporadas en los productos amplificados, siendo dicha cantidad de la marca X proporcional a la cantidad de productos de amplificación del analito, y dicha cantidad de la marca Y proporcional a la cantidad de productos de amplificación del patrón.

22. Un procedimiento según la reivindicación 21, en el que una o ambas de dichas marcas X e Y contienen o consisten en grupos químicos con propiedades o características que permiten su detección y cuantificación por técnicas espectroscópicas de absorción y/o fluorescencia.

23. Un procedimiento según la reivindicación 21, en el que una o ambas de dichas marcas X e Y contienen o consisten en isótopos radiactivos.

24. Un procedimiento según la reivindicación 21, en el que una o ambas de dichas marcas X e Y contienen o consisten en grupos químicos con propiedades o características que permiten su detección y cuantificación por técnicas electroquímicas.

25. Un procedimiento según la reivindicación 21, en que una o ambas de dichas marcas X e Y contienen o consisten en un grupo químico o de origen biológico que se une de forma específica a una determinada proteína.

26. Un procedimiento según la reivindicación 25, en el que dicha proteína está marcado con un

grupo químico con propiedades o características que permiten su detección o cuantificación, mediante técnicas espectroscópicas de absorción o fluorescencia, o isotópicas, o electroquímicas, o dicho anticuerpo, fragmento o derivado está unido a un enzima que permite su detección y cuantificación a través de una reacción catalizada por dicho enzima.

27. Un procedimiento según la reivindicaciones 25 y 26, en el que dicha proteína es del tipo de las inmunoglobulinas, también denominadas anticuerpos, o un fragmento derivado de dichas inmunoglobulinas, o una proteína de secuencia total o parcialmente artificial derivada por selección o diseño de dichas inmunoglobulinas.

28. Un procedimiento según las reivindicaciones 25 y 26, en el que dicha proteína es la avidina, streptavidina u otro derivado de estas que conserva la capacidad de unir biotina, y dicha marca es o contiene biotina o un derivado de biotina.

29. Un procedimiento según las reivindicaciones 5 a 8, en el que el oligonucleótido cebador común está marcado, en adelante denominando Z a esta marca del cebador común, de modo que los dos tipos de productos de amplificación, del analito y del patrón, resultan marcados con Z, cada uno de dichos tipos de productos en una sola de sus hebras, y dicha marca Z tiene propiedades o características que permiten o facilitan la discriminación o separación de dichos productos de amplificación de los restantes componentes presentes en la mezcla de reacción de amplificación que no contienen la marca Z.

30. Un procedimiento según la reivindicación 29, en que la marca Z contiene o consiste en un grupo químico o de origen biológico que se une de forma específica a una determinada proteína.

31. Un procedimiento según la reivindicación 30, en el que dicha proteína es del tipo de las inmunoglobulinas, también denominadas anticuerpos, o un fragmento derivado de dichas inmunoglobulinas, o una proteína de secuencia total o parcialmente artificial derivada por selección o

diseño de dichas inmunoglobulinas.

32. Un procedimiento según la reivindicación 30, en el que dicha proteína es la avidina, streptavidina u otro derivado de estas que conserva la capacidad de unir biotina, y dicha marca Z es o contiene biotina o un derivado de biotina.

33. Un procedimiento según la reivindicación 29, en que la marca Z contiene o consiste en un grupo químico o de origen biológico que se une de forma específica a un determinado material o molécula de naturaleza no proteica.

34. Un procedimiento según las reivindicaciones 5 a 8, en el que el cebador del analito está marcado con X, el cebador del patrón está marcado con Y, y el cebador común está marcado con Z, y en el cual, tras el paso de amplificación, la marca Z se utiliza para discriminar o separar físicamente todos los componentes de la mezcla de reacción que contienen dicha marca de los restantes componentes que no la contienen, en particular de los cebadores no comunes marcados con X e Y que no se hayan consumido en el sentido de no haber sido incorporados a los productos de amplificación, y de forma simultánea o en un paso posterior dichas marcas X e Y se utilizan para la cuantificación señalada en el paso (5.f) mediante determinación de las cantidades de dichas marcas, X e Y, incorporadas en los productos amplificados, siendo dicha cantidad de la marca X proporcional a la cantidad de productos de amplificación del analito, y dicha cantidad de la marca Y proporcional a la cantidad de productos de amplificación del patrón. Dicha determinación diferencial se realiza mediante técnicas espectroscópicas de absorción o fluorescencia, o isotópicas, o electroquímicas, según lo requiera la naturaleza y propiedades de dichas marcas X e Y. En el procedimiento objeto de esta reivindicación, la utilidad final de la marca Z es eliminar la posible interferencia de los cebadores no comunes no consumidos en el momento de realizar la determinación diferencial de las marcas X e Y en los productos de amplificación.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 170 620
⑫ N.º solicitud: 009902600
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 25.11.1999
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 5972602 A (HYLAND et al.) 26.10.1999, todo el documento.	1-34
X	FR 2668162 A (LABORATOIRES EURO BIO) 24.04.1992, todo el documento.	1-34
X	WO 9318177 A (THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA) 16.09.1993, todo el documento.	1-34
A	WO 9322456 A (TRUSTEES OF DARTMOUTH COLLEGE) 11.11.1993, todo el documento.	1-34
A	WO 9640996 A (ABBOTT LABORATORIES) 19.12.1996, todo el documento.	1-34
A	DIVIACCO, S. et al. "A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates" GENE, 1992, Vol. 122, páginas 313-320. Todo el documento.	1-34

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

04.07.2002

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1