



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 173 782**

② Número de solicitud: 009902758

⑤ Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **17.12.1999**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2002**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.10.2002

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Alcalá
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Domingo Galán, Alberto**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento de cuantificación de ácidos nucleicos mediante amplificación por reacción en cadena de ligasa competitiva.**

⑤ Resumen:

Procedimiento de cuantificación de ácidos nucleicos mediante amplificación por reacción en cadena de ligasa 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 ligasa (LCR) en la que intervienen seis oligonucleótidos ligando, A1, A2, P1, P2, C1 y C2, siendo el analito amplificado por el cuarteto formado por los ligandos A1, A2, C1 y C2, y el patrón amplificado por el cuarteto P1, P2, C1 y C2, siendo A1 y A2 ligandos específicos y exclusivos del analito, P1 y P2 ligandos específicos y exclusivos del patrón, y C1 y C2 ligandos específicos de forma común para el analito y el patrón, de forma que durante el proceso de amplificación se establece una competición por la unión de los ligandos C1 y C2 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 LCR con los ligandos A1, A2, P1, P2, C1 y C2, 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 2 173 782 A1

DESCRIPCION

Procedimiento de cuantificación de ácidos nucleicos mediante amplificación por reacción en cadena de ligasa 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 no se ha encontrado ninguno que dependa únicamente de una reacción iterativa de ligamiento, también denominada reacción en cadena de ligasa o LCR (Ligase Chain Reaction).

Existe un procedimiento patentado que depende de una reacción iterativa que implica polimerización y ligamiento, pero su dependencia del paso de polimerización hace que este procedimiento no guarde relación con el descrito y reivindicado en esta patente.

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 ligasa competitiva, basado en la co-amplificación 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 ligasa (LCR) en la que intervienen seis oligonucleótidos ligando, A1, A2, P1, P2, C1 y C2. El segmento analito es amplificado por el cuarteto formado por los ligandos A1, C1, A2 y C2, y el segmento patrón es amplificado por el cuarteto formado por los ligandos P1, C1, P2 y C2. Por tanto A1 y A2 son ligandos específicos y exclusivos del analito, P1 y P2 son ligandos específicos y exclusivos del patrón, y C1 y C2 son ligandos específicos de forma común para el analito y el patrón. Durante el proceso de amplificación se establece una competición por la unión de los ligandos C1 y C2 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 seis ligandos ya mencionados, 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 los ligandos comunes, C1 y C2, 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 amplificación 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 te 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 paralela a la de los procedimientos de PCR competitiva ya conocidos.

La novedad del procedimiento descrito en esta patente es que se describe por primera vez un procedimiento de cuantificación basado en amplificación competitiva por reacción en cadena de ligasa con un patrón exógeno, sin ninguna intervención de pasos de polimerización o enzimas polimerasas.

Este procedimiento tiene una gran versatilidad, ya que admite múltiples posibilidades 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 al menos uno de los miembros de cada una de las tres parejas de ligandos, A (A1, A2), P (P1, P2) y C (C1, C2), 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 (ligandos C, comunes) 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 (ligandos A, del analito) e Y (ligandos P, del patrón) son dos medios de detección, 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 ligandos A y C en sus extremos, y con ellos las marcas respectivas X y Z. 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 LCR 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 mez-

cla 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 ligandos no comunes, A y P.

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 una sola de las parejas de ligandos, aquella común al analito y al patrón, de modo que las otras dos parejas de ligandos sean diferentes, una específica exclusiva del analito y la otra específica y exclusiva 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 ligandos 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 patrón tras la LCR. 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 o control, exógeno a la muestra.
- 1.b. el empleo de seis oligodeoxirribonucleótidos como sustratos ligandos de una reacción de ligamiento catalizada por un enzima ligasa, agrupados en tres parejas, en adelante denominadas “ligandos del patrón” (P1 y P2), “ligandos del analito” (A1 y A2) y “ligandos comunes” (C1 y C2). Los ligandos que forman cada pareja tienen secuencias recíprocamente complementarias.
- 1.c. la realización de un co-amplificación del analito y del patrón, mediante una reacción de ligamiento enzimático.
- 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 un fragmento de DNA o RNA, de simple o doble hebra (las hebras o secuencias complementarias del analito se denominarán HA1 y HA2 en lo sucesivo), definido por un segmento contiguo con una secuencia de bases específica y conocida.

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 DNA o RNA, de simple o doble hebra (las hebras o secuencias complementarias del patrón se denominarán HP1 y HP2 en lo sucesivo), definido 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 el ligando C2 en la hebra HP1, y por tanto unir, por razón de complementariedades, el ligando C1 en la hebra HP2. Ambos “ligandos comunes” también se unen al analito, y por tanto una característica del patrón derivada de esta es:
- 3.c. compartir un segmento de su secuencia con el analito, al menos aquella a la que se unen dichos ligandos comunes.
- 3.d. unir el ligando P2 en la hebra HP1 y por tanto unir, por razón de complementariedades, el ligando P1 en la hebra HP2. Ambos “ligandos del patrón” no se unen al analito, y por tanto una característica del patrón 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 unen dichos ligandos del patrón.

4. Un procedimiento para el análisis cuantitativo de un ácido nucleico en una muestra, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los seis ligandos empleados son oligonucleótidos sintéticos cuyas secuencias se diseñan para cada aplicación formando tres parejas de oligonucleótidos recíprocamente complementarios de modo que la pareja de “ligandos del patrón” (P1 y P2) se une a las respectivas secuencias complementarias de una región del patrón, la pareja de “ligandos del analito” (A1 y A2) se une a una región del analito, la pareja de “ligandos comunes” (C1 y C2) se une tanto al patrón como al analito, el cuarteto formado por los dos ligandos del analito y los dos ligandos comunes (A1, A2, C1 y C2) posibilita la “amplificación” del analito mediante una reacción de ligamiento enzimático (1.c), y de forma análoga el cuarteto formado por los ligandos del patrón y los ligandos comunes (P1, P2, C1 y C2) 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 dicha muestra que se conoce 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 ligasa, en la cual dichos ácidos nucleicos, patrón y analito, son llevados a un estado de cadena sencilla y expuestos a un agente para ligamiento junto con un cuarteto de oligonucleótidos ligando para el patrón más un cuarteto de oligonucleótidos ligando para el analito.

El cuarteto de ligandos para el analito está compuesta por los ligandos comunes, C1 y C2, y los ligando del analito, A1 y A2, y el cuarteto de ligandos para el patrón está compuesta por los ligandos comunes, C1 y C2 y los ligandos del patrón, P1 y P2.

De tal modo se puede sintetizar un producto de ligamiento de cada una de las parejas de ligandos, usando las hebras separadas del patrón y del analito como molde en el ordenamiento y aproximación de los respectivos oligonucleótidos ligando para la reacción de ligamiento. Los productos de esta reacción de ligamiento, cuando se separan de la hebra molde correspondiente, pueden servir como molde para la síntesis de productos de ligamiento de la otra pareja de ligandos de cada cuarteto. Concretamente el producto de ligamiento de C1 y P1 puede servir como molde para el ligamiento de C2 y P2, el producto de ligamiento de C2 y P2 puede servir como molde para el ligamiento de C1 y P1, el producto de ligamiento de C1 y A1 puede servir como molde para el ligamiento de C2 y A2, y finalmente el producto de ligamiento de C2 y A2 puede servir como molde para el ligamiento de C1 y A1.

5.c. Separar de sus hebras molde los productos

de ligamiento de los ligandos 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. Con carácter opcional, repetir el paso (5.b) sin que este sea seguido de una repetición del paso (5.c).

El procedimiento resultante de tomar la opción de aplicar este paso (5.e) se denominará en lo sucesivo como "LCR con terminación en cadena doble". 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 se denominarán 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.

El procedimiento resultante de tomar la opción de NO aplicar este paso (5.e) se denominará en lo sucesivo como "LCR con terminación en cadena sencilla". El producto de interés que se obtiene en la reacción al terminar el paso anterior (5.d) sin aplicar el paso (5.e) consiste en segmentos de ácido nucleico en estado de hebra simple, que se denominarán igualmente 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 dicho analito y dicho patrón son ambos moléculas o segmentos de ácido desoxirribonucleico, o de un derivado de dicho ácido desoxirribonucleico, en adelante genéricamente denominados como DNA.

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, RNA y de dicho RNA se obtiene un segmento de DNA complementario a dicho RNA, 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 pueden diferir en longitud, y por tanto en masa molecular, de forma que pueden ser distinguibles tras la aplicación de un procedimiento de separación que aproveche dicha diferencia de dimensiones, y la cuantificación señalada en el paso (5.f) se puede realizar 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 seis oligonucleótidos ligando 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 ligando marcado es al menos uno de los ligandos comunes, C1 y C2.

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 dicha proteína esta unida 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 que al menos uno de los miembros de cada pareja de oligonucleótidos ligando

no comunes (pareja A1-A2 y pareja P1-P2) están marcados de diferente forma, en adelante denominando X a la marca del ligando del analito (A1 y/o A2), e Y a la marca del ligando del patrón (P1 y/o P2), 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.

21. Un procedimiento según la reivindicación 20, 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.

22. Un procedimiento según la reivindicación 20, en el que una o ambas de dichas marcas X e Y contienen o consisten en isótopos radiactivos.

23. Un procedimiento según la reivindicación 20, 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.

24. Un procedimiento según la reivindicación 20, en el 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.

25. Un procedimiento según la reivindicación 24, 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 dicha proteína esta unida a un enzima que permite su detección y cuantificación a través de una reacción catalizada por dicha enzima.

26. Un procedimiento según las reivindicaciones 24 y 25, 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.

27. Un procedimiento según las reivindicaciones 24 y 25, 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.

28. Un procedimiento según las reivindicaciones 5 a 8, en el que al menos uno de los oligonucleótidos ligando comunes (C1 y/o C2) esta marcado, en adelante denominando Z a esta marca del ligando común, de modo que los dos tipos de productos de amplificación, del analito y del patrón, resultan marcados con Z, y dicha marca Z tiene propiedades o características que permi-

ten 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.

29. Un procedimiento según la reivindicación 28, en el 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.

30. Un procedimiento según la reivindicación 29, 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.

31. Un procedimiento según la reivindicación 29, 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.

32. Un procedimiento según la reivindicación 28, en el 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.

33. Un procedimiento según las reivindicaciones 5 a 8, en el que al menos uno de los miembros de la pareja de ligandos del analito (A1-A2) está marcado con X, al menos uno de los miembros de la pareja de ligandos del patrón (P1-P2) está marcado con Y, y al menos uno de los miembros de la pareja de ligandos comunes (C1-C2) 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 ligandos 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 ligandos no comunes no consumidos en el momento de realizar la determinación diferencial de las marcas X e Y en los productos de amplificación.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12Q 1/68

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X | WO 9302215 A (ROYAL FREE HOSPITAL SCHOOL OF MEDICINE) 04.02.1993, página 3, línea 22 - página 6, línea 15; páginas 16,17; reivindicaciones 1,10. | 1-33 |
| A | WO 9704128 A (STATENS INSTITUTT FOR FOLKEHELSE) 06.02.1997, todo el documento. | 1-33 |
| A | US 5972602 A (HYLAND et al.) 16.10.1999, todo el documento. | 1-33 |
| A | CROTTY, P.L. et al. "Quantitative analysis in molecular diagnostics", HUMAN PATHOLOGY, 1994, Vol. 25, N° 6, páginas 572-579. Todo el documento. | 1-33 |

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°:

Fecha de realización del informe

17.09.2002

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1