

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 294 287**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2003 E 03729220 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **12.08.2015 EP 1466018**

54 Título: **Empleo de un material de sílice en una reacción de amplificación**

30 Prioridad:

08.01.2002 US 347327 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
27.10.2015

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**PINSL-OBER, JUDITH;
WENZIG, PETER;
WEINDEL, KURT;
BARTL, KNUT;
SCHOENBRUNNER, RALF;
MALHOTRA, KHUSHBEER;
O'DONNELL, PATRICK y
KYGER, ERICH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 294 287 T5

DESCRIPCIÓN

Empleo de un material de sílice en una reacción de amplificación

5 Fundamentos de la invención

Campo de la invención

10 Esta invención se refiere a un método para el aislamiento de ácidos nucleicos empleando un material con una superficie de sílice sin modificar, tal como partículas de vidrio magnéticas, y subsiguiente amplificación de un ácido nucleico diana en presencia del material con una superficie de sílice sin modificar. El método se efectúa de preferencia como un proceso automatizado, de preferencia en un formato de alto rendimiento. El método se emplea de preferencia en diagnósticos.

15 Antecedentes

20 Muchas sustancias biológicas, especialmente los ácidos nucleicos, presentan problemas importantes en el sentido de su aislamiento de su entorno natural. Por una parte, están a menudo presentes en muy poca concentración, y por otra parte, se encuentran a menudo en presencia de muchas otras sustancias sólidas y disueltas, p. ej., después de la lisis de las células. Esto dificulta su aislamiento o su medición, en particular en ensayos bioespecíficos que permiten la detección de analitos específicos, p. ej., ácidos nucleicos o propiedades específicas de analitos y juega un papel importante en el campo de los diagnósticos y bioanalítica en investigación y desarrollo.

25 Antes de que una sustancia o compuesto biológico, por ejemplo, un ácido nucleico, pueda ser analizado en un ensayo bioespecífico o empleado para otros procesos, a menudo debe ser aislado o purificado a partir de muestras biológicas que contienen mezclas complejas de diferentes componentes como p. ej., componentes proteínicos y no proteínicos. Frecuentemente, la sustancia biológica está contenida en una célula bacteriana, una célula de un hongo, una partícula vírica, o la célula de un organismo más complejo, tal como una célula de sangre humana o una célula vegetal. La sustancia biológica para analizar recibe con frecuencia también el nombre de sustancia de interés o sustancia diana. Frecuentemente, la sustancia diana es un ácido nucleico, el cual en consecuencia, recibe el nombre de ácido nucleico diana.

35 Para liberar el contenido de dichas células o partículas, puede ser tratado con enzimas o con productos químicos para disolver, degradar o desnaturalizar las paredes de las células y/o las membranas de las células. Este proceso se conoce habitualmente con el nombre de lisis. La solución resultante que contiene dicho material lisado se conoce con el nombre de lisado. Un problema que a menudo aparece durante la lisis es que las enzimas que degradan la sustancia de interés, p. ej., las desoxirribonucleasas o ribonucleasas, que degradan los ácidos nucleicos, entran en contacto con la sustancia de interés durante la lisis. Estas enzimas de degradación pueden estar presentes fuera de las células o pueden haber sido separadas espacialmente en diferentes compartimentos celulares antes de la lisis. Otros componentes liberados durante este proceso pueden incluir por ejemplo, endotoxinas pertenecientes a la familia de los lipopolisacáridos las cuales son tóxicas para las células y pueden causar problemas en el caso de productos que se pretende utilizar en la terapia humana o animal. Existen una variedad de medios para abordar este citado problema. Es corriente emplear agentes caotrópicos como p. ej., las sales de guanidinio o detergentes aniónicos, catiónicos, biónicos o no iónicos cuando se proyecta que los ácidos nucleicos estén libres. Es también una ventaja, el empleo de proteasas, p. ej., la proteinasa K, la cual degrada rápidamente estas enzimas o proteínas no deseadas. Sin embargo, esto puede producir otro problema, a saber, que dichas sustancias o enzimas puedan interferir con reactivos o componentes en pasos subsiguientes.

50 Si las sustancias de interés son ácidos nucleicos, normalmente se extraen, y de esta forma se separan de las mezclas complejas de la lisis antes de ser utilizados en un ensayo. Existen varios métodos para la extracción de ácidos nucleicos como los métodos dependientes de la secuencia o métodos bioespecíficos (cromatografía de afinidad, hibridación a sondas inmovilizadas) o los métodos independientes de la secuencia o métodos físico-químicos (extracción líquido-líquido con p. ej., fenol-cloroformo, precipitación con p. ej., etanol puro, extracción con papel de filtro, extracción con agentes formadores de micelas como el bromuro de cetil-trimetil-amonio, unión a colorantes intercalados, inmovilizados, p. ej., derivados de acridina, adsorción a silica gel o tierras de diatomeas, adsorción a partículas de vidrio magnéticas (MGPs) ó partículas de organosilanos en condiciones caotrópicas. La extracción empleando fases sólidas comprende habitualmente los pasos de adición del lisado a la fase sólida en condiciones que permiten la unión de la sustancia de interés a la fase sólida, eliminación del resto de lisado de la sustancia unida a la fase sólida y subsiguiente liberación de la sustancia de interés de la fase sólida en un eluato líquido (algunas veces llamado también elución). El resultado del proceso de extracción es habitualmente una solución que contiene la sustancia de interés en estado disuelto. Particularmente interesante para la finalidad de la extracción es la adsorción del ácido nucleico a una superficie de vidrio, en particular las superficies de vidrio MGP. En los últimos años, han sido propuestos muchos procedimientos para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de su entorno natural, mediante el empleo de su comportamiento de unión a las superficies de vidrio.

65

Después del paso de extracción, la solución que contiene la sustancia de interés, p. ej., el ácido nucleico, se analiza mediante un ensayo bioespecífico para ver si la sustancia de interés está presente en la muestra original. Ejemplos de ensayos bioespecíficos son los ensayos de hibridación para ácidos nucleicos, inmunoensayos o ensayos de receptor-ligando para proteínas. Los ensayos de hibridación emplean el emparejamiento específico de las bases para la detección molecular de analitos de ácido nucleico, por ejemplo, ARN ó ADN. Así por ejemplo, sondas de oligonucleótidos con una secuencia de una longitud de aproximadamente 18 a aproximadamente 20 nucleótidos pueden permitir el reconocimiento específico de una secuencia complementaria seleccionada, por ejemplo, en el genoma humano. Otro ensayo que supone la unión selectiva de dos cebadores oligonucleótidos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita en la patente US 4.683.195. Este método permite la amplificación selectiva de una región específica de ácido nucleico hasta niveles detectables mediante una polimerasa termoestable en presencia de desoxidionucleótido trifosfatos en varios ciclos. A continuación, el ácido nucleico se detecta mediante métodos ya conocidos por el experto en la técnica. Otros métodos, como el ensayo TaqMan® descrito en la patente WO92/02638, permite simultáneamente la amplificación y detección de un ácido nucleico de interés.

Normalmente, los pasos de lisis, extracción y amplificación se realizan consecutivamente, mientras se efectúan una variedad de diferentes operaciones, p. ej., la eliminación de fases que contienen solamente proteína, la elución de los ácidos nucleicos a partir del soporte empleado para la extracción y eliminación del soporte, la transferencia de líquidos a tubos frescos, etc. Son necesarios nuevos métodos de preparación de muestras de ácido nucleico para mejorar la eficiencia y/o sensibilidad de por ejemplo, métodos de detección del ácido nucleico.

La patente EP 0389063 describe un procedimiento para el aislamiento del ácido nucleico mezclando un material de partida biológico complejo, una sustancia caotrópica y una fase sólida de unión al ácido nucleico que comprende sílice, separando la fase sólida con su ácido nucleico unido a la misma, lavando el ácido nucleico unido a la fase sólida y eluyendo el ácido nucleico a partir de la fase sólida.

La patente WO 96/18731 proporciona un método de aislamiento del ácido nucleico a partir de una muestra, en donde el método comprende la puesta en contacto de la muestra con un detergente y un soporte sólido.

La patente WO/99/39010 describe un reactivo de elución del ADN que comprende un tampón, una base, un agente quelante, y agua.

La patente WO 01/14590 divulga métodos para aislar una cantidad de un material de ADN diana a partir de otro material en un medio

La patente WO 99/16781 divulga un método para preparar muestras biológicas para la detección posterior de un analito, especialmente un ácido nucleico, en dicha muestra.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona métodos para efectuar la preparación de la muestra, seguido de la amplificación del ácido nucleico, que proporciona aumentos de la eficiencia de la reacción y sensibilidad de la detección a la vez que reduce los pasos de manipulación necesarios. En los métodos de la presente invención, la preparación de la muestra se efectúa empleando una superficie de vidrio sin modificar de partículas de vidrio magnéticas, para capturar el ácido nucleico contenido en la muestra. Un aspecto crítico de la invención es que la amplificación se efectúa en presencia de partículas de vidrio magnéticas.

Los métodos de la presente invención proporcionan varias ventajas sobre los métodos previamente descritos empleando partículas de vidrio magnéticas. Una ventaja es que los métodos necesitan menos pasos de manipulación, lo cual da como resultado una disminución del tiempo y el esfuerzo requeridos y permite una mejor automatización. Más sorprendentemente, los presentes métodos proporcionan una mayor sensibilidad de la reacción comparada con los métodos en los cuales el ácido nucleico purificado se eluye del vidrio antes de la amplificación y la amplificación se efectúa sin la presencia de vidrio.

Por lo tanto, la presente invención contempla un método para la purificación y amplificación de un ácido nucleico diana a partir de una mezcla biológica que contiene dicho ácido nucleico diana y ácidos nucleicos no diana, el cual método comprende los pasos de adición de un material que contiene partículas de vidrio magnéticas con una superficie de sílice sin modificar, a dicha muestra para unir dicho ácido nucleico diana y ácidos nucleicos no diana a dicho material, separación de dicho material de dicha muestra, elución de dicho ácido nucleico diana y ácidos nucleicos no diana de dicho material, amplificación de dicho ácido nucleico diana en presencia de dicho material, en donde directamente después de la etapa c)

(i) dichos ácido nucleico diana, ácidos nucleicos no dianas y dicho material se transfieren a un tubo de reacción que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación o

(ii) todos los reactivos necesarios para la amplificación se añaden a dichos ácido ácido nucleico diana, ácidos nucleicos no diana y dicho material,

en donde dichas partículas de vidrio magnéticas se fabrican mediante el método de sol-gel que comprende suspender objetos magnéticos en un sol, hidrolizar el sol para cubrir los objetos magnéticos con un gel, secar por pulverización los objetos magnéticos cubiertos con un gel en un sistema de secado por pulverización y sinterizar el polvo secado por pulverización para formar un vidrio a partir del gel que cubre a los objetos magnéticos. El método contempla además un método para la amplificación de un ácido nucleico diana en una muestra tal como se ha descrito anteriormente, comprendiendo dicho método los pasos de adición de un material que contiene partículas de vidrio magnéticas, con una superficie de sílice sin modificar, a dicha muestra, separación de dicho material de dicha muestra, elución de dicho ácido nucleico diana de dicho material y amplificación de dicho ácido nucleico diana y ácidos nucleicos no diana en presencia de dicho material

en donde directamente después de la etapa c)

(i) dichos ácido nucleico diana, ácidos nucleicos no dianas y dicho material se transfieren a un tubo de reacción que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación o

(ii) todos los reactivos necesarios para la amplificación se añaden a dichos ácido nucleico diana, ácidos nucleicos no diana y dicho material,

en donde dichas partículas de vidrio magnéticas se fabrican mediante el método de sol-gel que comprende suspender objetos magnéticos en un sol, hidrolizar el sol para cubrir los objetos magnéticos con un gel, secar por pulverización los objetos magnéticos cubiertos con un gel en un sistema de secado por pulverización y sinterizar el polvo secado por pulverización para formar un vidrio a partir del gel que cubre a los objetos magnéticos.

El ácido nucleico diana puede ser un ácido desoxirribonucleico (ADN) ó un ácido ribonucleico (ARN) y de preferencia se amplifica mediante, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las partículas de vidrio magnéticas se obtienen mediante el método sol-gel tal como se ha definido anteriormente, con mayor preferencia, empleando un paso de secado por pulverización con un secador por pulverización de dos toberas, operando en condiciones específicas. De preferencia, el método está automatizado o se efectúa en un formato de alto rendimiento. Con la máxima preferencia, el método se emplea en diagnósticos o para la exploración de sangre para detectar la presencia de un ácido nucleico de un virus.

Descripción de las figuras

Figura 1: Comparación de los valores C_T de las reacciones PCR con y sin partículas de vidrio magnéticas que contienen el pigmento fabricado por la compañía CERAC y fabricado de acuerdo con la patente EP 1154443 (cp/ml: copias/ml).

Figura 2: Comparación de los valores C_T de las reacciones PCR con y sin partículas de vidrio magnéticas que contienen el pigmento MMB (Merck) (cp/ml: copias/ml).

Descripción detallada de la invención

El término "sin modificar" significará que allí no existe ninguna modificación química más, es decir, ningún otro grupo químico está unido ni covalentemente ni no covalentemente. El término "superficie de sílice sin modificar" significará que ningún otro grupo químico está unido covalentemente o no covalentemente, que sirva como una substancia intermediaria para la unión del ácido nucleico y en donde los ácidos nucleicos se unen a la substancia intermediaria y no a la propia superficie de sílice. Por lo tanto, los ácidos nucleicos son capaces de unirse mediante enlaces hidrógeno y otras fuerzas atómicas directamente a la "superficie de sílice sin modificar" en presencia de por ejemplo, altas concentraciones de sal. Un ejemplo de una superficie modificada son las superficies de sílice a las cuales se han unido oligonucleótidos que se unen en moléculas de ácidos nucleicos de manera secuencial específica. Otro ejemplo de superficies de sílice modificadas son las superficies de sílice recubiertas con estreptavidina que se une a las moléculas de ADN biotinadas.

De acuerdo con la presente invención, un "ácido nucleico diana" será el ácido nucleico de interés o más generalmente la substancia de interés, es decir, un ácido nucleico que será investigado puesto que su presencia es indicativa de una cierta condición o enfermedad de un humano o animal. Por ejemplo, la presencia de un ácido nucleico de un virus (p. ej., el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C ó el virus de la inmunodeficiencia humana) indica que el individuo respectivo está infectado por el virus respectivo. En consecuencia, el ácido nucleico de este virus específico sería el ácido nucleico diana. Otros ácidos nucleicos diana son p. ej., los ácidos nucleicos que son indicativos de una predisposición de un individuo a cierta enfermedad, p. ej., una enfermedad heredada, como la anemia falciforme, o ciertos tipos de cáncer.

La presente invención contempla un método para la purificación y amplificación de un ácido nucleico diana de una muestra biológica que contiene dicho ácido nucleico diana, el cual método comprende los pasos de adición de un material que contiene partículas de vidrio magnéticas con una superficie de sílice sin modificar, a dicha muestra para unir dicho ácido nucleico diana a dicho material, separación de dicho material de dicha muestra, elución de dicho ácido nucleico diana de dicho material, amplificación de dicho ácido nucleico diana en presencia de dicho material, en donde dichas partículas de vidrio magnéticas han sido obtenidas mediante el método de sol-gel, tal como se define en las reivindicaciones. De preferencia, más del 50%, con mayor preferencia más del 80%, ó incluso el 100%

del material que contiene partículas de vidrio magnéticas con una superficie de sílice sin modificar la cual se emplea para unir el ácido nucleico diana a la misma, está presente en la muestra durante la amplificación del ácido nucleico diana. Es también evidente al experto en la técnica que, debido a las ventajas descritas más arriba, el material que contiene partículas de vidrio magnéticas con una superficie de sílice sin modificar, puede añadirse directamente a una mezcla de amplificación para potenciar la sensibilidad. Por lo tanto, la invención contempla también un método para la amplificación de un ácido nucleico diana en una muestra, el cual método comprende los pasos de adición de un material que contiene partículas de vidrio magnéticas con una superficie de sílice sin modificar, a dicha muestra, separación de dicho material de dicha muestra, elución de dicho ácido nucleico diana de dicho material y amplificación de dicho ácido nucleico diana en presencia de dicho material, en donde dichas partículas de vidrio magnéticas han sido obtenidas mediante el método de sol-gel tal como se define en las reivindicaciones. Las condiciones durante la amplificación en ambos métodos de acuerdo con la invención se escogen de tal manera que ningún ácido nucleico diana se une al material que contiene partículas de vidrio magnéticas con una superficie de sílice sin modificar. Sin embargo, puede unirse un pequeño porcentaje de ácido nucleico diana dando como resultado una unión no específica, lo cual no puede ser totalmente excluido. Ambos métodos pueden comprender además el paso de detección del ácido nucleico diana amplificado. En una versión preferida de la invención, el ácido nucleico diana es el ARN ó ADN. De preferencia las condiciones de amplificación se escogen de tal manera que los cebadores y/o el molde no se unan al material.

En una versión de la invención, la muestra biológica contiene un virus o células bacterianas, así como células aisladas de organismos multicelulares como p. ej., células humanas y animales tales como leucocitos y compuestos químicos inmunológicamente activos de bajo y alto peso molecular tales como haptenos, antígenos, anticuerpos y ácidos nucleicos, plasma sanguíneo, fluido cerebral, esputos, materia fecal, especies de biopsia, médula ósea, enjuagues orales, suero sanguíneo, tejidos, orina o mezclas de los mismos. En una versión preferida de la invención, la muestra biológica es un fluido del cuerpo humano o animal. De preferencia la muestra biológica es la sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina. El plasma sanguíneo es de preferencia plasma sanguíneo tratado con EDTA, heparina o citrato. En una versión de la invención la muestra biológica contiene células de bacterias, células eucarióticas, virus o mezclas de los mismos. En una versión preferida de la invención, el virus es el virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), el virus del papiloma humano (HPV) ó el parvovirus B19. La muestra biológica puede también ser de un tipo empleado para el análisis del entorno, análisis de alimentos o investigación de biología molecular, p. ej., de cultivos de bacterias o lisados de fagos. La muestra biológica que contiene una mezcla de compuestos biológicos que contienen ácido nucleico no diana y un ácido nucleico diana, no necesita ser lisado cuando la muestra biológica puede emplearse sin pretratamiento en el método de acuerdo con la invención. Sin embargo, de preferencia, una muestra biológica que comprende ácidos nucleicos no diana y un ácido nucleico diana, se lisa para crear una mezcla de compuestos biológicos que contienen ácidos nucleicos no diana y ácido nucleico diana. Por lo tanto, los compuestos biológicos, ácidos nucleicos no diana y el ácido nucleico diana contenido en la muestra biológica son liberados creando con ello una mezcla de compuestos biológicos que contiene ácidos nucleicos no diana y el ácido nucleico diana. Los procedimientos para el lisado de muestras biológicas son ya conocidos por el experto y pueden ser de naturaleza química, enzimática o física. Una combinación de estos procedimientos es también aplicable. Por ejemplo, la lisis puede efectuarse empleando ultrasonidos, presión elevada, fuerzas de cizallamiento, álcali, detergentes o soluciones salinas caotrópicas o proteasas o lipasas. Para el procedimiento de lisis para obtener ácidos nucleicos, hacemos una especial referencia de Sambrook et al.: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* ("Clonación molecular. Un manual de laboratorio"), 2ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, y Ausubel et al.: *Current Protocols in Molecular Biology* ("Protocolos corrientes en Biología Molecular"), 1987, J. Wiley and Sons, NY.

El método de acuerdo con la invención comprende el paso de adición de un material que contiene partículas de vidrio magnéticas con una superficie de sílice sin modificar, a dicha muestra para unir dicho ácido nucleico diana a dicho material. Las condiciones para ello son básicamente ya conocidas por el experto en la especialidad. Estos procedimientos están descritos en detalle en varios documentos. En Proc. Natl. Acad. USA 76, 615-691 (1979), por ejemplo, se propone un procedimiento para la unión de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa en presencia de yoduro de sodio a un vidrio "flint" de base. La purificación del ADN del plásmido a partir de bacterias sobre polvo de vidrio en presencia de perclorato de sodio, se describe en Anal. Biochem. 121 (1982) 382-387. En la patente DE-A 37 34 442, se describe el aislamiento del ADN del fago M13 monocatenario sobre filtros de fibra de vidrio por precipitación de las partículas de fago empleando ácido acético y lisis de las partículas de fago con perclorato. Los ácidos nucleicos unidos a los filtros de fibra de vidrio se lavan y a continuación se eluyen con tampón de Tris/EDTA conteniendo metanol. Un procedimiento similar para la purificación del ADN a partir de fagos lambda se describe en Anal. Biochem. 175 (1988) 196-201. El procedimiento consiste en la unión selectiva de los ácidos nucleicos a superficies de vidrio en soluciones de sal caotrópica y separación de los ácidos nucleicos de los contaminantes tales como agarosa, proteínas o residuos celulares. Para separar las partículas de vidrio de los contaminantes, las partículas pueden o bien centrifugarse o bien los fluidos son eliminados a través de filtros de fibra de vidrio. Este es sin embargo, un paso limitante, que impide que el procedimiento se emplee para procesar grandes cantidades de muestras. En una versión de la invención, se emplean partículas de vidrio magnéticas para inmovilizar los ácidos nucleicos después de la precipitación mediante la adición de sal y etanol, como se describe p. ej., en Anal. Biochem. 201 (1992) 166-169 y PCT GB 91/00212.

El procedimiento para la unión del ácido nucleico diana (y también de los ácidos nucleicos no diana) a partículas de vidrio, puede describirse en detalle como sigue. De preferencia, se realiza en presencia de sales caotrópicas con una concentración entre 1 y 8 moles/litro, y de preferencia entre 2 y 6 moles/litro. Las sales caotrópicas pueden ser el yoduro de sodio, perclorato de sodio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio ó hidrocloreuro de guanidinio. Un agente caotrópico de acuerdo con la presente invención es una sustancia química cualquiera que trastorna la estructura ordenada del agua líquida y tiene el efecto de que el ADN ó el ARN se unen a las partículas de vidrio magnéticas si este agente está presente en la solución que contiene el ADN ó el ARN. Otras sustancias biológicas conocidas por el experto en la especialidad, pueden estar también presentes. Todavía otras sustancias son también posibles. El efecto de purificación resulta del comportamiento del ADN ó del ARN para unir al material con una superficie de vidrio bajo estas condiciones, es decir, en presencia de ciertas concentraciones de un agente caotrópico, altas concentraciones de disolventes orgánicos o bajo condiciones ácidas. Para pasar la mezcla de compuestos biológicos que contienen ácidos nucleicos no diana y el ácido nucleico diana, se añaden perlas de vidrio con una superficie de vidrio sin modificar, a la mezcla y se incuba durante un período de tiempo suficiente para que tenga lugar la unión. Los expertos están habitualmente familiarizados con la duración del paso de incubación. Este paso puede ser optimizado mediante la determinación de la cantidad de ácidos nucleicos inmovilizados sobre la superficie en diferentes momentos. Los tiempos de incubación entre 10 segundos y 30 minutos pueden ser apropiados para los ácidos nucleicos. Después de la incubación los ácidos nucleicos no diana y el ácido nucleico diana se separan del líquido. Esto puede lograrse en general por gravedad o en el caso conveniente de ácidos nucleicos unidos a partículas de vidrio magnéticas, por separación del material unido a las partículas magnéticas, aplicando un campo magnético. Por ejemplo, las partículas magnéticas pueden ser impulsadas a la pared del recipiente en el cual tiene lugar la incubación. El líquido que contiene los compuestos biológicos que no estaban unidos a las partículas magnéticas puede a continuación, eliminarse. Por lo tanto el método de acuerdo con la invención contiene el paso de separación de dicho material con dichos ácidos nucleicos no diana unidos y dicho ácido nucleico diana unido, de los compuestos biológicos no unidos. El procedimiento de eliminación empleado depende del tipo de recipiente en el cual se ha realizado la incubación. Los pasos adecuados incluyen la eliminación del líquido mediante pipeteado o aspiración. El material con el ADN ó el ARN unido puede a continuación lavarse por lo menos una vez, de preferencia con una mezcla de 70 partes en volumen de etanol con 30 partes en volumen de agua ("70% de etanol") ó en una solución ácida de lavado como se describe en la patente WO 99/40098. Se emplea una solución de lavado que no ocasiona que los ácidos nucleicos y el ácido nucleico diana se liberen de la superficie del material, pero que arrastran por lavado los contaminantes indeseables lo más completamente posible. Este paso de lavado tiene lugar de preferencia mediante la incubación de las perlas de vidrio con la superficie de sílice modificada con los ácidos nucleicos unidos y el ácido nucleico diana. El material, de preferencia, se resuspende durante este paso. La solución de lavado, contaminada, se elimina de preferencia justo en el paso de unión descrito más arriba. Después del paso de lavado, el material puede secarse brevemente al vacío o puede dejarse que el fluido se evapore. Puede realizarse también un paso de pretratamiento empleando acetona.

La invención comprende además el paso de elución de dichos ácidos nucleicos no diana unidos y dicho ácido nucleico diana unido a partir de dicho material y amplificando después dicho ácido nucleico diana. Para que la elución tenga lugar, el material que contiene las partículas de vidrio magnéticas con la superficie de sílice sin modificar, se resuspende en una solución con ninguno o solamente con una pequeña cantidad de agente caotrópico y/o disolvente orgánico. Alternativamente, la suspensión puede diluirse con una solución sin nada de, o solamente con una pequeña cantidad, de agente caotrópico y/o disolvente orgánico. Tampones de esta naturaleza son conocidos mediante la patente DE 3724442 y Analytical Biochemistry ("Bioquímica analítica") 175 (1988) 196-201. Los tampones de elución con un bajo contenido de sal son en particular, tampones con un contenido menor de 0,2 moles/litro. En una versión especialmente preferida, el tampón de elución contiene la sustancia Tris como tamponante, en particular una solución tamponada con Tris con un pH aproximadamente de 7 ó mayor de 7. En otra versión especial, el tampón de elución es agua desmineralizada. La solución que contiene el ácido nucleico diana purificado está ahora listo para ser empleado en la reacción de amplificación, es decir, la solución con los ácidos nucleicos no diana y el ácido nucleico diana y el material que contiene las partículas de vidrio magnéticas con la superficie de sílice sin modificar tal como se define en las reivindicaciones, son transferidos a un nuevo tubo de reacción que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación. De otra manera, una solución que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación, se añade a la suspensión del material que contiene las partículas de vidrio magnéticas con la superficie de sílice sin modificar tal como se define en las reivindicaciones y los ácidos nucleicos no diana liberados y el ácido nucleico diana.

Hablando en general, para los pasos de lavado y unión, se emplean de preferencia, líquidos, que son adecuados para los procesos de biología molecular, en particular los procesos de purificación del ácido desoxirribonucleico (ADN) ó ácido ribonucleico (ARN) que emplean la unión de estas sustancias con partículas de vidrio en ciertas condiciones. Los líquidos preferidos contienen alcoholes y/o cetonas o cualquier mezcla de los mismos con agua. Los alcoholes incluirán de acuerdo con la invención, de preferencia alcoholes primarios, secundarios o terciarios de fórmula general R-OH en donde R representa la fórmula general $-(CH_2)_n-CH_3$ con $n \geq 0$. Sin embargo, pueden emplearse también otros alcoholes si son adecuados para los fines de la biología molecular como p. ej., la glicerina. Particularmente adecuados son los alcoholes isopropanol, etanol o mezclas de los mismos con agua, de preferencia una mezcla de 80 partes por volumen de isopropanol con 20 partes en volumen de agua. En otra versión de la invención el líquido contiene cetonas como p. ej., la acetona. Además se emplean soluciones acuosas tamponadas adecuadas. Los sistemas tampón que son adecuados para los fines de la biología molecular pueden encontrarse p.

ej., en Sambrook et al., *Molecular Cloning* ("Clonación molecular"), Cold Spring Harbor University Press (1989). Las sustancias tampón preferidas son la tris-hidroximetilamina (TRIS), fosfato, ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etansulfónico) (HEPES), sales del mismo u otras sustancias adecuadas. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias que modifican la fuerza iónica de las soluciones como p. ej., NaCl, KCl ó CaCl₂ ó los agentes complexantes de un catión metálico como p. ej., el ácido etilen-diamina-tetraacético (EDTA) ó las sales del mismo.

El método de acuerdo con la presente invención es adecuado para la purificación de los ácidos nucleicos, es decir, ARN ó ADN, a partir de las mezclas complejas con otros compuestos biológicos que los contienen. Con ello, pueden purificarse también mezclas de diferentes ácidos nucleicos, incluso mezclas que contienen un ácido nucleico diana poco abundante. En una versión de la invención se purifican mezclas de ácidos nucleicos específicos, en las cuales el (los) ácido(s) nucleico(s) diana pueden ser un componente poco importante en términos de concentración (o pueden estar presentes en poca cantidad).

En una versión preferida de la invención, el ácido nucleico diana se amplifica con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El método de amplificación puede ser también la reacción en cadena de la ligasa (LCR, Wu y Wallace, *Genomics* 4 (1989)560-569 y Barany, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 88 (1991)189-193); reacción en cadena de la polimerasa ligasa (Barany, *Methods PCR and Applic.* 1 (1991)5-16); Gap-LCR (publicación de la patente PCT n° WO 90/01069; Repair Chain Reaction ("reacción en cadena de reparación") (publicación de la patente europea n° EP 439.182 A2), 3SR (Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989)1173-1177; Guatelli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990)1874-1878; publicación de la patente PCT n° WO 92/0880A), y NASBA (U.S. patente n° US 5.130.238). Además, existe la amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA), amplificación mediada por la transcripción (TMA), y la amplificación Q β (para una revisión, véase p. ej., Whelen y Persing, *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1996) 349-373; Abramson y Myers, *Current Opinion in Biotechnology* ("Opinión corriente en Biotecnología"), 4 (1993)41-47).

En una versión preferida, el método puede comprender además el paso de detección del ácido nucleico diana amplificado. El ácido nucleico diana amplificado puede ser determinado o detectado mediante métodos analíticos estándar ya conocidos por el experto en la técnica y descritos p. ej., en Sambrook et al., *Molecular Cloning* ("Clonación molecular"), Cold Spring Harbor University Press (1989), Lottspeich y Zorbas (eds.), "Bioanalytik" ("Bioanalítica") (1ª edición 1998), editorial Spektrum Akademischer, Heidelberg, Berlin, Alemania, o en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* ("Protocolos corrientes en Biología Molecular") (1987), J. Wiley and Sons, NY, USA. Pueden haber también más pasos de purificación antes de que el ácido nucleico diana sea detectado p. ej., un paso de precipitación. Los métodos de detección pueden incluir, pero no están limitados a la unión o intercalado de colorantes específicos como el bromuro de etidio que se intercala en el ADN de doble cadena y cambia su fluorescencia después. Los ácidos nucleicos purificados pueden también separarse mediante métodos electroforéticos opcionalmente después de una digestión con enzimas de restricción y visualizadas después. Hay también ensayos basados en sondas que aprovechan la hibridación de oligonucleótidos con secuencias específicas y subsiguiente detección del híbrido. También es posible secuenciar el ácido nucleico diana después de más pasos conocidos por el experto en la especialidad. Otros métodos aplican una diversidad de secuencias de ácido nucleico a un chip de silicio al cual están unidas sondas específicas, y suministran una señal cuando se unen a secuencias complementarias.

En una versión particularmente preferida de la invención, el ácido nucleico diana se detecta midiendo la intensidad de la luz fluorescente durante la amplificación.

Este método comprende la monitorización de la fluorescencia a tiempo real. Un método particularmente preferido que aprovecha simultáneamente la amplificación y detección midiendo la intensidad de la luz fluorescente, es el método TaqMan® descrito en la patente WO92/02638 y las correspondientes patentes US 5.210.015, US 5.804.375, US 5.487.972. Este método aprovecha la actividad exonucleasa de una polimerasa para generar una señal. En detalle, el ácido nucleico diana es detectado mediante un procedimiento que comprende la puesta en contacto de la muestra con un oligonucleótido que contiene una secuencia complementaria a una región del ácido nucleico diana y un oligonucleótido marcado que contiene una secuencia complementaria a una segunda región de la misma cadena de ácido nucleico diana, pero sin incluir la secuencia de ácido nucleico definida por el primer oligonucleótido, para crear una mezcla duplex durante las condiciones de hibridación, en donde los duplex comprenden el ácido nucleico diana reasociado al primer oligonucleótido y al oligonucleótido marcado de tal manera que el extremo 3' del primer oligonucleótido es adyacente al extremo 5' del oligonucleótido marcado. A continuación, se trata esta mezcla con un ácido nucleico polimerasa dependiente del molde, que tiene una actividad nucleasa 5' a 3' en condiciones suficientes para permitir la actividad nucleasa 5' a 3' de la polimerasa para escindir el oligonucleótido reasociado, marcado, y liberar los fragmentos marcados. La señal generada por la hidrólisis del oligonucleótido marcado es detectada y/o medida. La tecnología Taq/Man® elimina la necesidad de formar un complejo de reacción unido a una fase sólida, y lo haga detectable. En términos más generales, la amplificación y/o reacción de detección del método de acuerdo con la invención es un ensayo homogéneo solución-fase. Otro método preferido consiste en el formato Lightcycler™ (ver p. ej., la patente US 6.174.670).

En una versión preferida de la presente invención, el método está automatizado, es decir, el método efectúa un proceso automatizado como p. ej., se describe en la patente WO 99/16781. Un proceso automatizado significa que

los pasos del proceso son adecuados para ser efectuados con un aparato o máquina capaces de operar con poco control o ningún control o influencia externa por un ser humano. Un método automatizado significa que los pasos del método automatizado son efectuados con un aparato o máquina capaces de operar con poco o ningún control o influencia externa por un ser humano. Solamente los pasos de preparación para el método pueden tener que hacerse a mano, p. ej., los recipientes de almacenamiento tienen que llenarse y colocarse en su lugar, la elección de las muestras tiene que ser hecha por un ser humano y otros pasos conocidos por el experto en la especialidad, p. ej., la operación con el ordenador de control. El aparato o la máquina puede p. ej., añadir automáticamente líquidos, mezclar las muestras o efectuar los pasos de incubación a temperatura específicas. Típicamente, esta máquina o aparato es un robot controlado por un ordenador que efectúa un programa en el cual están especificados los pasos individuales y comandos. En una versión preferida de la invención, el método es un formato de alto rendimiento, es decir, los métodos automatizados se efectúan en un formato de alto rendimiento lo cual significa que los métodos y la máquina o aparato empleados están optimizados para operar una alta cantidad de muestras en un tiempo corto.

Las partículas de vidrio magnéticas son una dispersión sólida de pequeños núcleos magnéticos de vidrio, es decir, son gotitas de vidrio en las cuales están dispersados una muy pequeña cantidad de cuerpos. Estos cuerpos que reciben el nombre de magnéticos, son atraídos por un imán, es decir, materiales ferri o ferromagnéticos o superparamagnéticos, por ejemplo. Las sustancias paramagnéticas no son útiles puesto que son atraídas solamente por un imán muy débil, lo cual no es suficiente para un método de acuerdo con esta invención. Se prefieren los materiales ferri o ferromagnéticos, en particular si todavía no han sido premagnetizados. La premagnetización en este contexto significa la puesta en contacto con un imán, el cual aumenta la remanencia. Los materiales magnéticos preferidos son el hierro o el óxido de hierro como p. ej., la magnetita (Fe_3O_4) ó el Fe_2O_3 , de preferencia el $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. En principio, puede emplearse el bario ferrita, níquel, cobalto, aleaciones Al-Ni-Fe-Co, u otro material ferri o ferromagnético. Particularmente preferidas de acuerdo con la presente invención, son las partículas de vidrio magnéticas descritas en las patentes WO96/41811 ó WO 00/32762.

En una muy preferida versión de la invención, las partículas de vidrio magnéticas con una superficie de vidrio sin modificar tienen un bajo lixiviado de hierro, lo cual es esencial para el método de acuerdo con la invención cuando se emplean partículas de vidrio magnéticas, dado que el hierro es un inhibidor de la subsiguiente reacción de amplificación, es decir, el hierro es un inhibidor enzimático. Por lo tanto, esto es una importante característica de las partículas de vidrio magnéticas con una superficie de vidrio sin modificar.

En la versión más preferida de la invención, las partículas de vidrio magnéticas con una superficie sin modificar, son las descritas en la solicitud de patente europea EP 1 232 502 (WO 01/32791) las cuales están también públicamente disponibles en el kit MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche, Mannheim, Alemania). Estas partículas sedimentan lentamente y pueden por lo tanto emplearse ventajosamente en un método automatizado de acuerdo con la invención. La obtención de las mismas se resume a continuación.

Las partículas de vidrio magnéticas son substancialmente esféricas y tienen un diámetro pequeño y contienen por lo menos un cuerpo magnético con un diámetro entre 5 y 500 nm. Esto tiene consecuencias sorprendentes en la cinética de la sedimentación, cuantificada por los valores del tiempo mitad, $t_{1/2}$ el cual es el tiempo que transcurre hasta que el 50% de las partículas se han sedimentado a partir de un elemento de volumen específico. El período de semivida para la sedimentación de una suspensión de 3 mg/ml peso-por-volumen de MGPs con una superficie de vidrio sin modificar de acuerdo con la invención, en isopropanol, es mayor de 3 minutos, de preferencia 4 minutos, con mayor preferencia 6 minutos. Sin embargo, los valores más preferidos para el período de semivida son mayores de 10 minutos o incluso mayores de 20 minutos. Los cuerpos magnéticos de las MGPs más preferidas pueden ser p. ej., un pigmento magnético. El tamaño de los cuerpos magnéticos es del orden de los nanómetros, es decir, entre 5 y 500 nm, de preferencia entre 10 y 200 nm y con mayor preferencia, entre 15 y 50 nm. Son pigmentos magnéticos adecuados los fabricados por la compañía CERAC, los cuales tienen un diámetro medio de 23 nm y consisten en $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (superficie BET de $50 \text{ m}^2/\text{g}$, CERAC: P.O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178 USA; Artículos nº I-2012). Las partículas de vidrio magnéticas más preferidas de acuerdo con la presente invención, se caracterizan además por el hecho de que las MGPs tienen un diámetro de partícula entre $5 \mu\text{m}$ y $5 \mu\text{m}$, de preferencia entre $1 \mu\text{m}$ y $2 \mu\text{m}$, determinado mediante microscopía electrónica de scanning, mientras que los cuerpos magnéticos tienen un diámetro entre 5 y 500 nm, con más preferencia entre 10 y 200, con la mayor preferencia en el margen de 15 a 50 nm como se ha descrito más arriba. Por lo tanto, las MGPs se caracterizan además, por un ratio del diámetro del núcleo del pigmento magnético a la partícula de vidrio magnética, inferior a de 1 a 10, determinado por microscopía electrónica de scanning de alta resolución.

Las MGPs más preferidas son microporosas pero tienen una superficie altamente estructurada y por lo tanto una superficie relativamente grande con más de $6 \text{ m}^2/\text{g}$. De preferencia, las partículas de vidrio magnéticas tienen un área de superficie en el margen de 5 a $100 \text{ m}^2/\text{g}$, de preferencia de 5 a $90 \text{ m}^2/\text{g}$, con más preferencia en el margen de 10 a $50 \text{ m}^2/\text{g}$, y con la mayor preferencia en el margen de 15 a $30 \text{ m}^2/\text{g}$. Esto puede determinarse por el método Braunauer-Emmett-Teller empleando un aparato automatizado comercial. Para una descripción de este método corrientemente llamado método BET, véase S. Braunauer, The Adsorption of Gases and Vapors ("Adsorción de gases y vapores"), Princeton University Press 1 1943).

Las partículas de vidrio magnéticas empleadas en la presente invención pueden suministrarse en diferentes formulaciones, esencialmente como se ha descrito en la publicación de la patente europea EP 1154443. Es posible proporcionar las mismas en forma de comprimido, como un polvo, o de preferencia como una suspensión. En una versión preferida de la invención estas suspensiones contienen entre 5 y 60 mg/ml de partículas de vidrio magnéticas (MGPs). En otra versión de la invención, el material que contiene la sílice se suspende en soluciones acuosas tamponadas que opcionalmente pueden contener un agente caotrópico en una concentración entre 2 y 8 moles/litro, y de preferencia entre 4 y 6 moles/litro. Sales caotrópicas son el yoduro de sodio, perclorato de sodio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio o hidrocloreuro de guanidinio. Un agente caotrópico de acuerdo con la presente invención es cualquier sustancia química que trastorne la estructura ordenada del agua líquida y tendrá el efecto de que el ADN ó el ARN se unirán a las MGPs de acuerdo con la presente invención si este agente está presente en la solución que contiene el ADN ó ARN. Otros compuestos conocidos por el experto en la especialidad son también posibles.

Las partículas de vidrio magnético con una superficie de vidrio sin modificar, se obtienen mediante el método de sol-gel descrito en las patentes EP 1154443 y WO 96/41811, en donde el método de sol-gel comprende los pasos de:

- (a) suspensión de los cuerpos magnéticos en un sol
- (b) hidrólisis del sol para recubrir los cuerpos magnéticos con un gel
- (c) secado por pulverización de los cuerpos magnéticos recubiertos con un gel en un sistema de secado por pulverización, tal como un secador por pulverización de dos toberas, y
- (d) sinterizado del polvo secado por pulverización para formar un vidrio a partir del gel por recubrimiento de los cuerpos magnéticos.

Las MGPs más preferidas de acuerdo con la invención se obtienen de acuerdo con la solicitud de patente internacional EP 1154443 la cual figura también en el MagNA Pure LC ADN Isolation Kit I (Roche, Mannheim, Alemania). Se obtienen también mediante el método de sol-gel como se describe en la solicitud de patente internacional (EP 1154443) empleando cuerpos metálicos o pigmentos con un diámetro de aproximadamente 23 nm (fabricados por CERAC a base de γ -Fe₂O₃; CERAC: P.O. Box 1178, Milwaukee, Wisconsin 53201-1178 USA; artículo nº I-2012). Después de recubrir los cuerpos magnéticos con un gel, se genera un polvo pulverizando la dispersión a través de dos toberas fluidas. Sistemas de secado por pulverización adecuados están fabricados por Nubilosa Molekularzerstäubung, Ladisch GmbH & Co. KG, Constanza, Alemania, p. ej., el "LaborZerstäubungstrockner" (Typ LTK) ("secadero por pulverización, de laboratorio (tipo LTK)") ó por Büchi AG, Uster, Suiza p. ej., el Mini Spray Dryer (type B-191) ("minisecadero de pulverización (tipo B-191)"). Debido a que los ratios de los diámetros de los núcleos magnéticos a la cápsula de vidrio son menores que de 1 a 10, de preferencia entre 1:10 y 1:1000, la geometría y el número de núcleos magnéticos incorporados o de sus soportes inertes, no determinan la forma y tamaño de las partículas pero sí las condiciones de fabricación, en particular las condiciones durante el secado por pulverización. En otras palabras, la elección de la presión, temperatura de entrada, temperatura de salida y velocidad de flujo durante el procedimiento de secado por pulverización son los grados de libertad que determinan la distribución de tamaño, la forma de las gotas de vidrio y con ello se modificarán las MGPs. Por lo tanto, las toberas del sistema de secado por pulverización, se calientan. La temperatura de entrada está entre 120°C y 500°C, de preferencia entre 170°C y 230°C ó 150°C y 230°C, con la mayor preferencia entre 150°C y 200°C ó 190°C y 210° ó a 200°C ó ligeramente menor. La temperatura de salida depende del punto de ebullición del sol y por lo tanto, del disolvente, y puede ser superior, igual o ligeramente inferior, es decir, menor de 10°C el punto de ebullición del disolvente. Cuando se emplea el etanol como disolvente, está entre 50°C y 300°C, de preferencia 70°C y 150°C, con la mayor preferencia entre 80°C y 110°C. La temperatura óptima está entre 90°C y 100°C. La presión en la tobera es mayor de 3 bars, de preferencia se regula de 4 a 6 bars. El experto apreciará el hecho de que los parámetros exactos dependerán del sistema de secado por pulverización empleado. Sin embargo, puede transferir las especificaciones de la presente invención a cualquier otro sistema de secado por pulverización, y deducir los parámetros tomando en consideración los descubrimientos de esta invención. Fórmulas como se describen en las obras maestras: Spray Drying Handbook ("Tratado de Secado por Pulverización"), quinta edición, John Wiley & Sons (1991) Nueva York, pueden conducirse a descubrir cuáles son los parámetros a elegir para otro ajuste. De preferencia, consultará los manuales de este sistema de secado por pulverización o contactará con el servicio técnico del fabricante del sistema del secador por pulverización.

Para optimizar el rendimiento, la temperatura de densificación o sinterización debe ser lo más alta posible, es decir, ligeramente inferior al margen de fusión. Las temperaturas exactas dependen de la composición del vidrio pero pueden estar entre 400°C a 1200°C. En el caso de la composición de vidrio EJ descrita en la patente EP1154443 la temperatura de sinterización es entre 720°C y 770°C, de preferencia aproximadamente 750°C. En la habilidad del experto reside el encontrar las temperaturas para cada composición de vidrio teniendo en cuenta las enseñanzas de la presente invención. A continuación, el polvo se calienta durante 1 hora a 200°C, opcionalmente se enfría a temperatura ambiente y se calienta a 750°C (temperatura de densificación o sinterización) en una atmósfera de nitrógeno con una velocidad de calentamiento de 1 K/minuto, y se mantiene esta temperatura durante 1 hora. A continuaciones se enfría el horno a 150°C y se calienta de nuevo a 200°C durante una hora al aire. Después de enfriar a temperatura ambiente el polvo se transfiere a un tamiz (50 μ m) y se tamiza durante 30 minutos. La muestra tamizada se envasa en frascos y se esteriliza a 200°C durante 4 horas y a continuación se enfría a 80°C. A continuación los recipientes de vidrio se retiran del horno, se recubren con una lámina estéril y se cierran.

De preferencia, el método de acuerdo con la invención se emplea en diagnósticos, para análisis de diagnósticos o para bioanalítica, o para el screening de fluidos procedentes del cuerpo humano o incluso animal para detectar la presencia de un ácido nucleico diana, es decir, por ejemplo un ácido nucleico de un virus. Además, el método de acuerdo con la invención, se emplea para potenciar la velocidad, exactitud o sensibilidad de la detección de un ácido nucleico diana.

Ejemplos

Ejemplo I

Influencia de las partículas de vidrio magnéticas (MGPs) en una PCR Taqman®

El ejemplo describe experimentos efectuados para medir el efecto de las partículas de vidrio magnéticas (MGP) sobre la eficiencia de la amplificación. Las amplificaciones se efectuaron empleando un protocolo de PCR Taqman®, como se describe más adelante.

En un ensayo TaqMan, las sondas de detección marcadas que hibridan dentro de la región amplificada se añaden a la mezcla de reacción de amplificación. Las sondas se modifican de preferencia, para evitar que las sondas actúen como cebadores para la síntesis del ADN. La amplificación se efectúa empleando una ADN polimerasa que posee actividad 5' a 3' exonucleasa, p. ej., ZO5 ADN polimerasa. Durante cada paso de síntesis de la amplificación cualquier sonda que hibrida con el ácido nucleico diana corriente abajo extendida a partir del cebador es degradada por la actividad 5' a 3' exonucleasa de la ADN polimerasa. Así, la síntesis de una nueva cadena diana produce también como resultado la degradación de una sonda, y la acumulación del producto de degradación proporciona una medida de la síntesis de las secuencias diana.

El aumento de productos de amplificación durante una reacción TaqMan® puede ser monitorizada empleando sondas fluorescentes. Las sondas de detección están marcadas con dos colorantes fluorescentes, uno de los cuales es capaz de extinguir la fluorescencia del otro colorante, de manera que las sondas son autoextinguibles cuando están próximas entre sí, es decir, cuando están unidos a la misma sonda o al ácido nucleico. Los colorantes están unidos a la sonda, de preferencia uno unido al terminal 5' y el otro unido al sitio interno, de manera que la escisión de la sonda mediante la actividad exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa tiene lugar entre los dos colorantes.

La amplificación da como resultado la escisión de la sonda y la separación de los colorantes, con la concomitante eliminación de la extinción y aumento de la fluorescencia observable. Así, la acumulación del producto de degradación, la cual constituye una medida del aumento del producto de amplificación, se monitoriza midiendo el aumento de la reacción fluorescente.

En los experimentos descritos en este ejemplo, cada sonda se sintetizó para contener un colorante polimetinacianina y una marca 6-carboxi-fluoresceína. Las sondas resultantes son autoextinguibles cuando están próximas unas de otras. Para evitar la extensión de la sonda mediante la ADN polimerasa durante la amplificación, la sonda se sintetizó con un bloque de 3' fosfato. La acumulación del producto amplificado se midió en cada ciclo durante la reacción midiendo el aumento de la fluorescencia de la reacción. Durante cada ciclo de amplificación, las sondas fueron excitadas con luz de una longitud de onda cercana al máximo de excitación del fluoróforo y la emisión del fluoróforo se midió en la proximidad de su máximo de emisión.

Las mediciones de la fluorescencia se normalizaron dividiendo por la medición inicial de la fluorescencia, es decir, la fluorescencia de fondo, obtenida durante un ciclo temprano de la reacción, mientras las mediciones de la fluorescencia entre ciclos parecen ser relativamente constantes. El número de ciclos escogido para la medición de la fluorescencia inicial fue el mismo para todas las reacciones comparadas, de forma que todas las mediciones representan aumentos relativos al mismo ciclo de reacción.

En los ciclos tempranos de una amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa, el número de moléculas diana puede describirse mediante la siguiente ecuación geométrica

$$N_i = N_o \times (1 + E)^i$$

en donde N_i = número de moléculas diana al finalizar el ciclo i avo, N_o = número de moléculas diana al comienzo de la reacción, y E = eficiencia de la amplificación ($0 \leq E < 1$). Durante esta fase de crecimiento geométrico de la amplificación, el número de ciclos necesarios para alcanzar un valor umbral particular (C_T) es inversamente proporcional al logaritmo de $(1 + E)$. Así, el valor C_T representa una medida de la eficiencia de la reacción que permite efectuar comparaciones entre las reacciones. Una disminución del valor C_T el cual significa que la reacción alcanzó el valor umbral en pocos ciclos, indica un aumento de la sensibilidad global.

Como el aumento del producto de amplificación se monitoriza midiendo el aumento de la fluorescencia de la reacción, el C_T se define en la presente como el número de ciclos de amplificación efectuados hasta que la fluorescencia excede un nivel de fluorescencia arbitrario (AFL). El AFL se escogió próximo al nivel de fluorescencia

de la línea base, pero superior al margen de fluctuaciones al azar en la fluorescencia medida, de forma que se midió la cinética de la reacción durante la fase de crecimiento geométrico de la amplificación. La acumulación del producto amplificado en los últimos ciclos inhibe la reacción y conduce eventualmente a una región plana de la reacción.

- 5 Se escogió un AFL de 1,5 para todas las reacciones. Debido a que la amplificación PCR consiste en ciclos discretos y las mediciones de la fluorescencia se efectúan una vez por ciclo, la fluorescencia medida aumenta típicamente desde debajo del AFL hasta por encima del AFL en un ciclo individual. Para aumentar la precisión de las mediciones, se calculó un número "exacto" de ciclos para alcanzar el umbral del AFL, que recibe aquí el nombre de valor C_T , por interpolación de las mediciones de la fluorescencia entre ciclos.

10

Condiciones de la reacción

Las reacciones se efectuaron empleando los componentes de la reacción que se detallan más adelante. Cada ensayo se realizó en un ensayo umbral.

15

Ensayo 1: 25,75 μ l de componente R1 de Mastermix
24,25 μ l de componente R2 de Mastermix
50 μ l de material estándar HCV (diluido en solución poli A)

20

Ensayo 2: 25,75 μ l de componente A de MasterMix
24,25 μ l de componente B de MasterMix
50 μ l de material estándar HCV (diluido en solución poli A)
6 mg de partículas de vidrio magnéticas (MGP "Cerac", como se han descrito más arriba).

25

Formulación de los componentes de Mastermix, R1 y R2:

| | Contenido | Concentración de la solución de stock | Concentración final en la reacción | μ l/ reacción | μ l/ reacción/ R ₁ |
|----|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| R1 | Agua pura | | | 10,85 | |
| | Mn(Ac) ₂ pH=6,5 | 50 mM | 3 mM | 6,00 | |
| | KOAc pH=7,0 | 2 M | 100 mM | 5,00 | |
| | Glicerina (libre) | 80% | 2,8% | 3,50 | |
| | HCV sonda ST650p2 | 50 μ M | 10 pmol/100 μ l | 0,20 | |
| | IC sonda ST2535Cy5F15 | 50 μ M | 10 pmol/100 μ l | 0,20 | 25,75 |
| R2 | Cebador 1(HCV)ST280A | 50 μ M | 15 pmol/100 ml | 0,30 | |
| | Cebador2(HCV)ST778AA | 50 μ M | 40 pmol/100 ml | 0,80 | |
| | Tricina pH = 8,3 | 1 M | 50 mM | 5,00 | |
| | dNTPs no equimolar (GAC) | 100 mM | 300 μ M | 2,50 | |
| | dNTPs no equimolar (T) | 100 mM | 50 μ M | | |
| | dNTPs no equimolar (U) | 100 mM | 500 μ M | | |
| | ZO5 polimerasa | 10 U/ μ l | 40 U/ 100 μ l | 4,00 | |
| | Uracilo N glicosilasa (UNG) | 2,0U/ μ l | 10 U/ 100 μ l | 5,00 | |
| | Dimetilsulfóxido (DMSO) | 80% | 5% | 6,25 | |
| | NTQ21-46A | 50 μ M | 20 pmol/100 μ l | 0,40 | 24,25 |

30

Las secuencias de los cebadores ST280A y ST778AA están descritas en la patente U.S. nº 5.837.442. El nucleótido terminal 3' de cada cebador se modificó mediante la unión covalente de un grupo p-terc-butilbencilo al nucleótido terminal 3', como se describe en la solicitud de patente europea nº 866.071 y patente U.S. nº 6.001.611.

35

Las secuencias de la sonda específica del HCV y las sondas de control (IC)-específicas están descritas más adelante en la orientación 5' a 3'. Las sondas específicas del HCV se sintetizaron para contener un fluoróforo Cy5 unido al término 5' a través del fosfato terminal empleando una fosforamidita comercialmente disponible (Pharmacia, Piscataway, NJ). Se incorporó una marca 6-carboxi-fluoresceína (FAM) en una posición interna entre los nucleótidos 14 y 15 empleando un enganche marcado, comercialmente adquirible, como p. ej., una fosforamidita de BioGenex (San Ramon, CA). Las sondas resultantes son autoextinguibles cuando están en un estado no hibridado. Para evitar la extensión de la sonda mediante la ADN polimerasa durante la amplificación, la sonda se sintetizó con un bloque fosfato 3' empleando una fosforamidita comercialmente adquirible en Glenn Research (Sterling, VA).

40

Sonda ST650p2 para HCV: (SEC ID Nº: 1)
(Cy5-) CGG TGT ACT CAC CG(FAM) TTC CGC AGA CCA CTA TG

Sonda ST2535Cy5F15 para IC: (SEC ID Nº: 2)

(Cy5-) TGG ACT CAG TCC T(HEX)T GGT CAT CTC ACC TTC T

Los siguientes oligonucleótidos se incluyeron en la mezcla de reacción R2 para inhibir la actividad ADN polimerasa a bajas temperaturas.

5 NTQ21-46A (SEC ID N°: 3)

**CGA TCA TCT CAG AAC ATT CTT AGC GTT TTG TTC TTG
TGT ATG ATC G**

10 El material estándar para HCV consistió en moldes del ARN de HCV, sintetizados empleando un vector de transcripción del ARN de HCV, como se ha descrito esencialmente en Young et al., 1993, J. Clin. Microbiol. 31(4):882-886. Los moldes del ARN de HCV se diluyeron en solución poli A (20 µg/ml de Poli rA, 10 mM de Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM de EDTA, 0,05% de azida de sodio, agua tratada con DEPC, filtrada estéril), a una concentración de 200 copias por 50 µl.

15 Protocolo de amplificación

La amplificación se efectuó empleando el siguiente perfil de temperaturas:

| | | |
|----|----------------------------|--------------------------------------|
| 20 | Pre-reacción de incubación | 45°C, 10 minutos |
| | Desnaturalización inicial | 94°C, 30 segundos |
| | Transcripción inversa | 58°C, 30 minutos |
| | 5 ciclos | 95°C, 20 segundos; 59°C, 50 segundos |
| 25 | 55 ciclos | 91°C, 15 segundos, 52°C, 50 segundos |

Resultados

30 Los resultados de las reacciones están representados en las figuras 1 y 2. Los valores C_T están indicados para cada reacción. Comparando los valores C_T, es aparente que las reacciones efectuadas en presencia de partículas de vidrio magnéticas alcanzaron el valor umbral más pronto que las reacciones comparables efectuadas sin las partículas de vidrio magnéticas en la reacción. Estos resultados demuestran el sorprendente aumento en la eficiencia de la reacción obtenida efectuando la amplificación en presencia de las partículas de vidrio magnéticas.

Lista de referencias

35 Abramson and Myers, Current Opinion in Biotechnology ("Criterios corrientes en Biotecnología") 4 (1993)41-47
Anal. Biochem. 121 (1982) 382-387
Anal. Biochem. 175 (1988) 196-201
Anal. Biochem. 201 (1992) 166-169

40 Analytical Biochemistry ("Bioquímica analítica") 175 (1988) 196-201
Andreadis and Chrisey (2000). Nucl. Acids Res. Vol. 28, No. 2, e5, I- VIII.
Ausubel, et al., Current Protocols in Molecular Biology ("Protocolos corrientes en Biología molecular")(1987), J. Wiley and Sons, NY, USA

45 Barany, PCR Methods and Applic. 1 (1991)5-16
Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991)189-193
C. J. Brinker, G. W. Scherer, Sol Gel Science - The Physics and Chemistry of Sol Gel Processing ("La física y la química del método de Sol Gel"), Academic Press Inc. (1990)
Chungue et al. (1993) J. Med. Virol. 40,142-145.

50 DE 198 54 973.3
DE 198 55 259.9
DE 3724442
DE 198 01 730
DE 198 16 137
DE-A 37 34 442

55 DE-A-1941191
DE-A-3719339
DE-A-4117041
DE-A-4217432
Eberwine, BioTechniques ("Biotécnicas") 20 (1996) 584-591

60 EP 00110165.8
EP 439,182 A2
Guatelli, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 1874-1878

- Kwoh, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989)1173-1177
 Lisa C. Klein, Ed., Kluwer Academic Publishers (1994) 450 ff.
 Lottspeich and Zorbas (eds.), "Bioanalytik" ("Bioanalítica")(1ª edición 1998), editorial Spektrum Akademischer, Heidelberg, Berlin, Alemania
 5 Masters: Spray Drying Handbook, quinta edición, John Wiley & Sons (1991) Nueva York
 Orum, et al., Nucl. Acids Res. 21 (1993) 5332-5336
 PCT GB 91/00212
 S. Braunauer, The Adsorption of Gases and Vapors ("La adsorción de gases y vapores"), Princeton University Press 1, 1943
 10 Sambrook, et al., Molecular Cloning ("Clonación molecular"), Cold Spring Harbor University Press (1989)
 Seeger, et al., BioTechniques ("Biotécnicas") 23 (1997) 512-517
 Tano, et al., J. Clin. Microbiol. (1995)
 US 4.683.195
 US 5.130.238
 15 US 5.210.015
 US 5.487.972
 US 5.804.375
 Whelen and Persing, Annu. Rev. Microbiol. 50 (1996) 349-373
 WO 00/32762
 20 WO 90/01069
 WO 92/02638
 WO 92/0880A
 WO 96/41811
 WO 99/16781
 25 WO 99/40098
 Wu and Wallace, Genomics 4 (1989)560-569

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Roche Diagnostics GmbH
 F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Empleo de material de sílice para una reacción de amplificación
 35 <130> 21255 WO
 <140>
 <141>
 40 <150> US 60/347 327
 <151> 2002-01-08
 <160> 3
 45 <170> PatentIn versión 3.2
 <210> 1
 <211> 31
 <212> ADN
 50 <213> artificial
 <220>
 <223> Sonda específica de HCV
 55 <400> 1
 cggtgtactc accgttccgc agaccactat g
 31
 60 <210> 2
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> artificial
 65 <220>
 <223> Sondas específicas de control interno

ES 2 294 287 T5

<400> 2
tggactcagt ccttggatc ctcaccttct 30

5 <210> 3
<211> 46
<212> ADN
<213> artificial

10 <220>

<223> Inhibidor de la actividad ADN polimerasa a bajas temperaturas

15 <400> 3

cgatcatctc agaacattct tagcgttttg ttcttgta tgatcg
46

REIVINDICACIONES

1. Un método para la purificación y amplificación de un ácido nucleico diana a partir de una muestra biológica que contiene dicho ácido nucleico diana, el cual método comprende los pasos de:

- 5 a) adición de un material que contiene partículas de vidrio magnéticas con una superficie de sílice sin modificar, a dicha muestra para unir dicho ácido nucleico diana a dicho material,
- b) separación de dicho material de dicha muestra,
- 10 c) elución de dicho ácido nucleico diana de dicho material, y
- d) amplificación de dicho ácido nucleico diana en presencia de dicho material, en donde directamente después de la etapa c)
 - (i) dichos ácido nucleico diana, ácidos nucleicos no dianas y dicho material se transfieren a un tubo de reacción que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación o
 - 15 (ii) todos los reactivos necesarios para la amplificación se añaden a dichos ácido ácido nucleico diana, ácidos nucleicos no diana y dicho material,

en donde dichas partículas de vidrio magnéticas se fabrican mediante el método de sol-gel que comprende suspender objetos magnéticos en un sol, hidrolizar el sol para cubrir los objetos magnéticos con un gel, secar por pulverización los objetos magnéticos cubiertos con un gel en un sistema de secado por pulverización y sinterizar el polvo secado por pulverización para formar un vidrio a partir del gel que cubre a los objetos magnéticos.

2. Método para la amplificación de un ácido nucleico diana en una muestra, el cual método comprende los pasos de:

- 25 (a) adición de un material que contiene partículas de vidrio magnéticas con una superficie de sílice sin modificar, a dicha muestra,
- (b) separación de dicho material de dicha muestra,
- (c) elución de dicho ácido nucleico diana a partir de dicho material, y
- 30 (d) amplificación de dicho ácido nucleico diana en presencia de dicho material, en donde directamente después de la etapa c)
 - (i) dichos ácido nucleico diana, ácidos nucleicos no dianas y dicho material se transfieren a un tubo de reacción que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación o
 - 35 (ii) todos los reactivos necesarios para la amplificación se añaden a dichos ácido ácido nucleico diana, ácidos nucleicos no diana y dicho material,

en donde dichas partículas de vidrio magnéticas se fabrican mediante el método de sol-gel que comprende suspender objetos magnéticos en un sol, hidrolizar el sol para cubrir los objetos magnéticos con un gel, secar por pulverización los objetos magnéticos cubiertos con un gel en un sistema de secado por pulverización y sinterizar el polvo secado por pulverización para formar un vidrio a partir del gel que cubre a los objetos magnéticos.

3. El método de la reivindicación 1, en donde dicho ácido nucleico diana es ARN ó ADN.

4. El método de la reivindicación 1, en donde dicho paso de amplificación se efectúa empleando una reacción en cadena de la polimerasa.

5. El método de la reivindicación 1, en donde dicho material que tiene una superficie de sílice sin modificar, está presente mientras se efectúa la amplificación del ácido nucleico diana y mientras se efectúa la detección del ácido nucleico diana.

6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho ácido nucleico diana amplificado es detectado durante dicha amplificación.

7. El método de la reivindicación 1, en donde dicho método de sol-gel comprende los pasos de:

- 55 (a) suspensión de cuerpos magnéticos en un sol,
- (b) hidrólisis del sol para recubrir los cuerpos magnéticos con un gel,
- (c) secado por pulverización de los cuerpos magnéticos recubiertos con un gel en un secador de pulverización de dos toberas, y
- 60 (d) sinterización del polvo secado por pulverización para formar un vidrio a partir del gel que recubre los cuerpos magnéticos.

8. El método de la reivindicación 7, en donde la temperatura de entrada del secador de pulverización de dos toberas, es entre 120°C y 500°C, la temperatura de salida se escoge de acuerdo con el punto de ebullición del sol, y la presión de pulverización está entre 4 y 6 bars.

9. El método de la reivindicación 8, en donde el período de semivida para la sedimentación de una suspensión de 3 mg/litro peso-por-volumen de las partículas de vidrio magnéticas en isopropanol, es mayor de 6 minutos.
- 5 10. El método de la reivindicación 8, en donde las partículas de vidrio magnéticas tienen un diámetro medio entre 0,5 μm y 5 μm .
11. El método de la reivindicación 8, en donde las partículas de vidrio magnéticas con una superficie de vidrio sin modificar contienen un cuerpo magnético con un diámetro entre 5 y 500 nm.
- 10 12. El método de la reivindicación 8, en donde las partículas de vidrio magnéticas con una superficie de vidrio sin modificar contienen un cuerpo magnético con un diámetro medio de 23 nm.

FIGURA 1
200 cp/ml de HCV diana

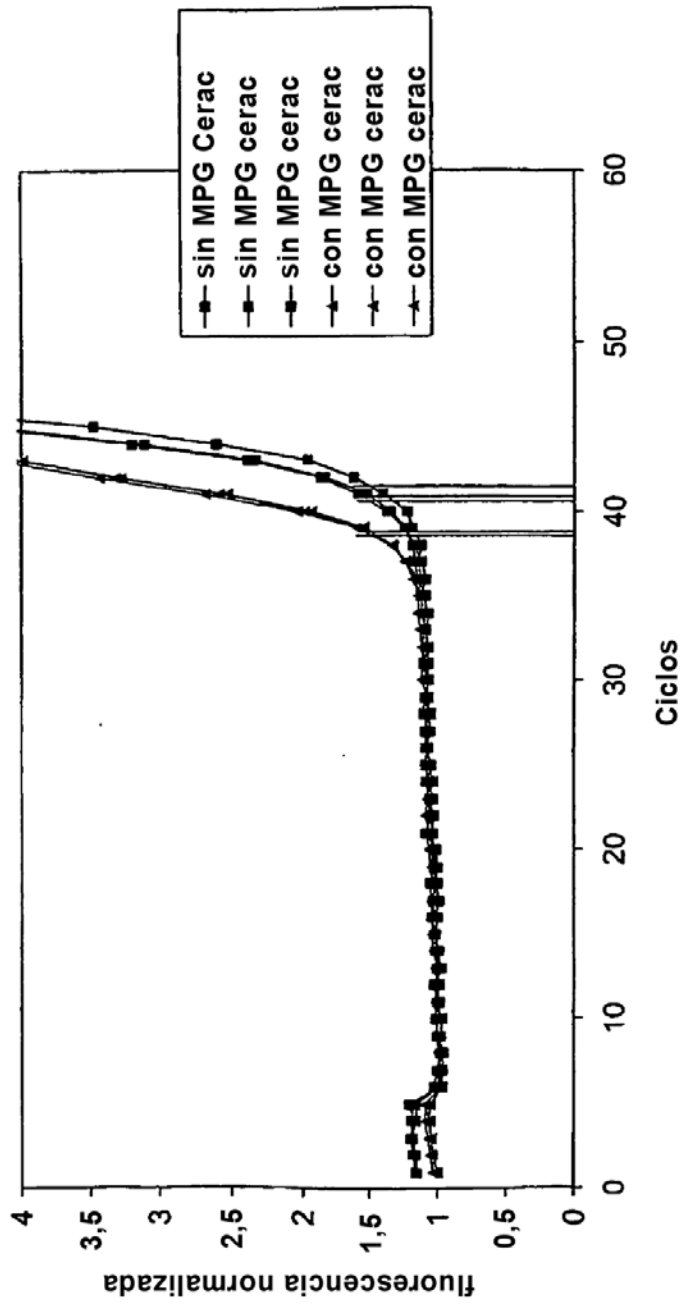


Fig. 2 200 cp/ml
de HCV tipo salvaje diana

