



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 572**

51 Int. Cl.:
C07H 21/00 (2006.01)
C07H 1/08 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C07D 495/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05792074 .6**
96 Fecha de presentación : **21.07.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1778713**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2007**

54 Título: **Procedimiento de marcado y de purificación de ácidos nucleicos de interés presentes en una muestra biológica a tratar en un único recipiente de reacción.**

30 Prioridad: **23.07.2004 FR 04 51632**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2009

73 Titular/es: **BIOMERIEUX**
Chemin de l'Orme
69280 Marcy-L'Etoile, FR

72 Inventor/es: **Laayoun, Ali;**
Menou, Lionel y
Ginot, Frédéric

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 320 572 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 320 572 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de marcado y de purificación de ácidos nucleicos de interés presentes en una muestra biológica a tratar en un único recipiente de reacción.

La presente invención se refiere a un procedimiento de marcado de ácidos nucleicos en presencia de al menos un soporte sólido.

Es estado de la técnica muestra que existen muchos métodos para marcar nucleótidos, oligonucleótidos o ácidos nucleicos.

Un primer método consiste en fijar el marcador en la base, sea ésta natural o modificada. Un segundo método propone fijar el marcador en el azúcar, sea éste aquí también natural o modificado. Un tercer método tiene por objeto la fijación del marcador en el fosfato.

El marcado en la base se ha utilizado particularmente en el enfoque de marcado de los ácidos nucleicos mediante incorporación de nucleótidos directamente marcados.

El marcado en el azúcar se utiliza a menudo en el caso de sondas nucleicas preparadas mediante síntesis química.

El marcado en el fosfato también se ha utilizado para introducir brazos funcionalizados y marcadores durante la síntesis química de los oligonucleótidos.

De hecho, el experto en la materia, que debe realizar un marcado de un nucleótido o de un análogo de nucleótido o de un ácido nucleico, es propenso a realizar esta fijación en la base o en el azúcar que le ofrecen mayor comodidad y más alternativas. Esto es, además, lo que se aprecia a partir del estudio de muchos documentos, tales como EP-A-0.329.198, EP-A-0.302.175, EP-A-0.097.373, EP-A-0.063.879, US-A-5.449.767, US-A-5.328.824, WO-A-93/16094, DE-A-3.910.151, EP-A-0.567.841 para la base o EP-A-0.286.898 para el azúcar.

La fijación del marcador en el fosfato es una técnica más compleja que la técnica que consiste en funcionalizar a la base o al azúcar y se ha utilizado mucho menos, particularmente por causa de la reducida reactividad del fosfato (véase por ejemplo Jencks W.P. *et al.*, J. Amer. Chem Soc., 82, 1778-1785, 1960). Del mismo modo, en la revista de O'Donnell y Mc Laughlin ("Reporter groups for the analysis of nucleic acid structure", p. 216-243, en "Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids", Ed Hecht S. M., Oxford University Press, 1996) que se refiere a los métodos de introducción de sondas en los fragmentos de oligonucleótidos, la alquilación eficaz del fosfodiéster internucleotídico se considera imposible.

La solicitud de patente WO-A-99/65926 describe un procedimiento de marcado de un ácido ribonucleico (ARN) de síntesis o natural que consiste en fragmentar el ARN y en marcarlo a nivel del fosfato terminal. Ese documento describe cierto número de funciones que pueden utilizarse para el marcado junto con la fragmentación, como las funciones hidroxilo, amina, hidrazina, alcóxiamina, halogenuro de alquilo, halogenuro de alquilo de tipo bencílico y en particular el derivado 5-(bromometil)fluoresceína. Estas funciones permiten marcar los ácidos nucleicos, pero es preciso asociar una etapa de fragmentación para tener un marcado eficaz, ya que este marcado se produce en el fosfato liberado durante la fragmentación. Además, es preciso añadir un exceso importante de reactivo de marcado con respecto al ARN para obtener un marcado eficaz, lo que induce problemas de ruido de fondo generados por el exceso de marcador. Finalmente, este método no funciona eficazmente en ADN de doble cadena.

Han aparecido nuevos reactivos aún más eficaces desde el punto de vista del rendimiento de marcado. Estos son específicos a nivel de la posición de marcado y en particular no afectan a las propiedades de hibridación de las bases implicadas en la formación de la doble hélice, por medio de los puentes de hidrógeno, que son utilizables al tiempo para ADN y ARN y finalmente que permiten marcar de forma indiferente nucleótidos, oligonucleótidos, ácidos nucleicos naturales o preparados mediante amplificación enzimática.

La Solicitante ya ha propuesto dichos nuevos marcadores que responden a las condiciones mencionadas anteriormente y que utilizan la función diazometilo como función reactiva para el marcado. Éste es por ejemplo el caso en:

- solicitud de patente WO-A-02/090319,
- la solicitud de patente WO-A-02/090584,
- la solicitud de patente FR 2868071 titulada: "Réactifs de marquage, procédés de synthèse de tels réactifs et procédés de détection de molécules biologiques", o también
- el artículo de Laayoun *et al.*, publicado en Bioconjugate Chem. 2003, 14, 1298-1306 y titulado: "Aryldiazomethanes for Universal Labelling of Nucleic Acids and Analysis on DNA Chips", a los que puede remitirse el lector para entender mejor los modos de síntesis y de utilización de dichos constituyentes.

ES 2 320 572 T3

El contenido de esos documentos mencionados anteriormente se incorpora en este documento como referencia.

El estado de la técnica también describe la utilización de soporte sólido particularmente de sílice, y más particularmente en forma de polvo, de gel o de partículas magnéticas, para purificar ácidos nucleicos antes o después del marcado, en un proceso que conduce a una detección por hibridación específica (que se refiere a chips de ADN, pero también a las placas de ELISA o formas de ensayos rápidos). La purificación antes del marcado permite mejorar considerablemente el rendimiento de marcado, la purificación después del marcado permite mejorar de forma determinante el rendimiento de hibridación y la proporción señal/ruido, necesaria para una buena sensibilidad del ensayo.

Éste el caso de la patente EP-B-0.389.063 que propone un procedimiento de aislamiento de los ácidos nucleicos que contienen un material biológico complejo de partida, consistiendo el procedimiento por lo tanto en mezclar el material de depósito con una sustancia caotrópica y una fase sólida, permitiendo la fase sólida la fijación de ácidos nucleicos que posteriormente pueden limpiarse o eluirse del resto de complejos creados de este modo.

El contenido de esta patente también se incorpora en este documento como referencia.

De hecho, estas dos técnicas se emplean de forma independiente, realizándose las etapas de purificación y de marcado en diferentes consumibles, con modos operatorios también diferentes. La presencia de dos etapas impone por lo tanto transferencias de líquidos, potencialmente factores de contaminación, de pérdida de material y de forma general, moderadamente automatizable.

Por otro lado, el procedimiento que combina el marcado y la purificación en sílice presenta muchas ventajas que hasta ahora eran desconocidas para el experto en la materia.

Primera ventaja, el procedimiento de acuerdo con la invención en un medio de reacción que permite a la vez la reacción de marcado y la captura, mediante adsorción por ejemplo, de los ácidos nucleicos en perlas magnéticas de sílice no conlleva ninguna disminución de la eficacia del marcado, marcado que por lo tanto, no resulta afectado por la presencia de la sílice magnética.

Segunda ventaja, el procedimiento es comparativamente mucho más rápido de aplicar que un procedimiento en dos etapas diferenciadas de marcado y purificación.

Tercera ventaja de la invención, ésta permite concentrar los ácidos nucleicos marcados en un volumen muy reducido, del orden de 0,1 a 10 μl , estado los ácidos nucleicos fijados en las perlas y pudiendo eluirse mediante un simple tampón de hibridación convencional sin recurrir a un tampón de elución. Por lo tanto, es posible suprimir completamente esta etapa de dilución y mejorar la sensibilidad del procedimiento, concentrándose más los ácidos nucleicos durante la hibridación.

Además, el proceso puede automatizarse fácilmente, lo que constituye una cuarta ventaja, debido a la flexibilidad de la utilización de perlas magnéticas y de la relativa sencillez del procedimiento (calentamiento, lavado, elución). La utilización de perlas magnéticas permite particularmente hacer variar la capacidad de captura de los sistemas muy fácilmente, mediante simple modificación de la cantidad de perlas utilizadas. El procedimiento también puede utilizarse en un sistema que utiliza un flujo continuo, permitiendo simplificar las etapas de lavado. No hay entonces que realizar pipeteo de líquido.

Una quinta ventaja de este procedimiento se basa en el hecho de que permite la transferencia de los ácidos nucleicos en forma sólida, es decir adsorbidos a las perlas de sílice magnéticas, lo que le hace fácilmente utilizable en microcomponentes, tecnología que actualmente está en pleno desarrollo.

Finalmente una sexta ventaja, entre otras, que también está vinculada a la automatización del procedimiento (cuarta ventaja descrita) consiste en un procedimiento que puede estar completamente integrado en un único tubo, de la purificación del ácido nucleico a la hibridación en chip, pasando por el marcado si, por supuesto, nos encontramos en el marco de un procedimiento que no necesita etapa de amplificación. Esto conlleva la reducción de los riesgos de contaminación y la disminución del número de consumibles empleados.

La presente invención se refiere esencialmente a un procedimiento de marcado y de purificación de ácidos nucleicos de interés presentes en una muestra biológica a tratar, que consiste en:

- disponer de un único recipiente de reacción
- introducir en el recipiente de reacción:
 - la muestra biológica,
 - al menos un reactivo de marcado de los ácidos nucleicos,
 - al menos un soporte sólido que permite la adsorción de dichos ácidos nucleicos,

ES 2 320 572 T3

- cualquier ingrediente necesario para el marcado de los ácidos nucleicos y/o para la inmovilización de dichos ácidos nucleicos en el soporte,

- incubar el contenido del recipiente de reacción, y
- aislar los ácidos nucleicos marcados de este modo.

De acuerdo con una primera realización de la invención, el procedimiento de marcado y de purificación anterior se caracteriza porque los ácidos nucleicos tratados pueden estar constituidos por ADN y/o ARN, de cadena sencilla y/o de cadena doble, sintéticos y/o naturales.

De acuerdo con una segunda realización de la invención, el procedimiento de marcado y de purificación anterior se caracteriza porque el reactivo de marcado puede permitir:

- la fragmentación de los ácidos nucleicos de manera no específica para generar una pluralidad de fragmentos de ácidos nucleicos, y
- marcar una pluralidad de estos fragmentos a nivel del fosfato terminal situado en el extremo 3' y/o 5', habiéndose liberado dicho fosfato terminal durante la fragmentación.

Siempre de acuerdo con esta segunda realización de la invención, el marcado del extremo 3' o 5' de un fragmento de ácido nucleico puede realizarse mediante fijación, en el fosfato en posición 2', en posición 3' o en posición 2'-3'-monofosfato cíclico, con respecto a la ribosa, de una función reactiva portada por un marcador.

También de acuerdo con esta segunda realización de la invención, la fragmentación y/o el marcado del extremo 3' o 5' de un fragmento de ácido nucleico puede realizarse mediante fijación, en el fosfato en posición 2', en posición 3' o en posición 2'-3'-monofosfato cíclico, con respecto a la ribosa, de una función nucleófila, electrófila o halógeno portada por un marcador.

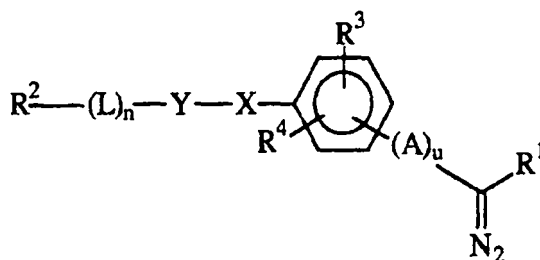
De acuerdo con las variantes de realización de esta segunda realización de la invención, la fragmentación de los ácidos nucleicos puede realizarse por vía:

- enzimática (nucleasas),
- química (cationes metálicos, tales como iones Mg^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} , Co^{++} y/o Zn^{++} , asociados o no a un catalizador químico, por ejemplo N-metil-imidazol o cualquier molécula química que tiene una afinidad por el ARN y que tiene un núcleo imidazol o un análogo sustituido) o
- física (mediante sonicación o mediante radiación).

Sea cual sea la realización, el marcado del extremo 3' o 5' de un fragmento de ARN puede realizarse mediante fijación, en el fosfato unido a la posición 2', a la posición 3' o a la posición 2'-3'-monofosfato cíclico de la ribosa, de una molécula R-X, donde R está constituido por el marcador y X es el agente de unión entre el marcador y el ARN, tal como un grupo hidroxilo, amina, hidrazina, alcoxilamina, halógeno de alquilo, fenil-metil halógeno, yodoacetamida o maleimida.

Sea cual sea la realización, el marcado en el grupo fosfato puede realizarse por medio de 5-(bromometil)-fluoresceína.

De acuerdo con una realización particular, el procedimiento de marcado y de purificación, de acuerdo con la invención, se caracteriza porque el reactivo de marcado puede ponerse en contacto con los ácidos nucleicos en solución homogénea, en un tampón prácticamente acuoso, siendo dicho reactivo de marcado estable a la temperatura y de fórmula (0):

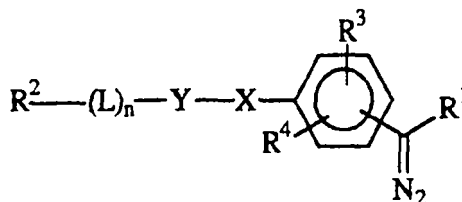


ES 2 320 572 T3

en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo,
- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es un número entero comprendido entre 0 y 2, preferentemente de 0 ó 1, y
- $-Y-X-$ representa $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $\text{CH}_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{S}-$.

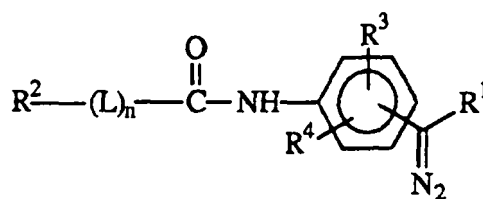
De acuerdo con esta realización particular, el reactivo de marcado puede ser de fórmula (1):



en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo, y
- $-Y-X-$ representa $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $\text{CH}_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{S}-$.

De acuerdo con las dos características anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (2):



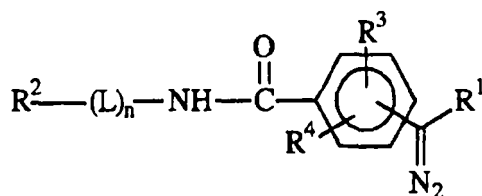
en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,

ES 2 320 572 T3

- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2\text{-(L)}_n\text{-Y-X-}$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo.

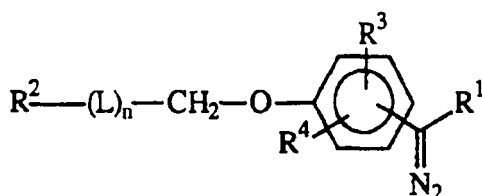
De acuerdo con una primera variante de las dos realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (3):



en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1, y
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $\text{R}^2\text{-(L)}_n\text{-Y-X-}$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo.

De acuerdo con una variante de las dos realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (4):

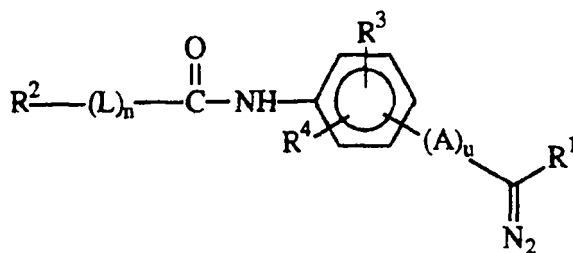


en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1, y
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $\text{R}^2\text{-(L)}_n\text{-Y-X-}$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo.

ES 2 320 572 T3

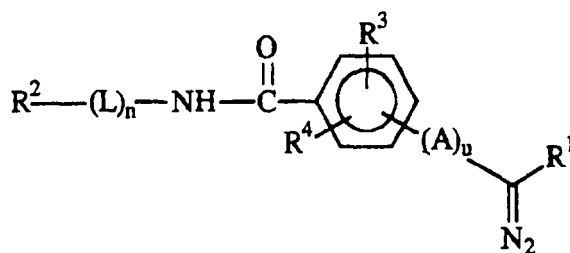
De acuerdo con otra variante de la primera de estas dos realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (21):



en la que:

- 20
- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
 - R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
 - 25
 - L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
 - A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1, y
 - 30
 - R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2\text{-(L)}_n\text{-Y-X-}$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR con R = alquilo o arilo.

35 De acuerdo con otra variante más de la primera de estas dos realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (22):

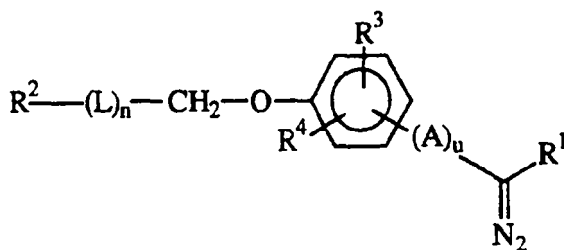


en la que:

- 55
- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
 - R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
 - 60
 - L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
 - A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1, y
 - 65
 - R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2\text{-(L)}_n\text{-Y-X-}$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR con R = alquilo o arilo.

ES 2 320 572 T3

Siempre de acuerdo con otra variante de la primera de estas dos realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (23):

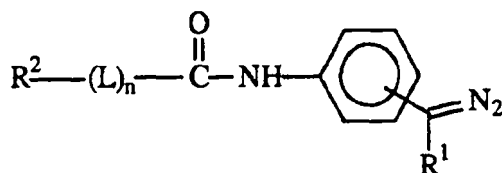


15 en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1, y
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, $NHCOR$, $CONHR$, $COOR$ con R = alquilo o arilo.

De acuerdo con todas las variantes de estas dos realizaciones anteriores, el reactivo, R^3 y R^4 pueden representar independientemente uno de otro: H, NO_2 , OCH_3 , $-CO-NH-(CH_2)_3-(O-CH_2-CH_2)_3-CH_2-NH-R^2$, $-CO-NH-(CH_2)_3-(O-CH_2-CH_2)_4-CH_2-NH-R^2$.

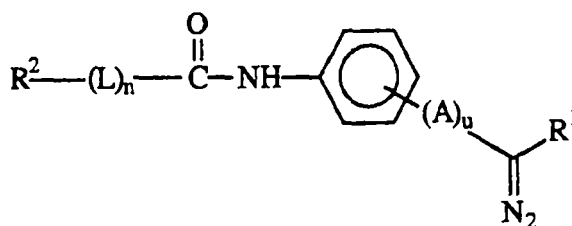
De acuerdo con otra variante de estas realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (7):



en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica, y
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1.

De acuerdo con otra variante más de estas realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (24):

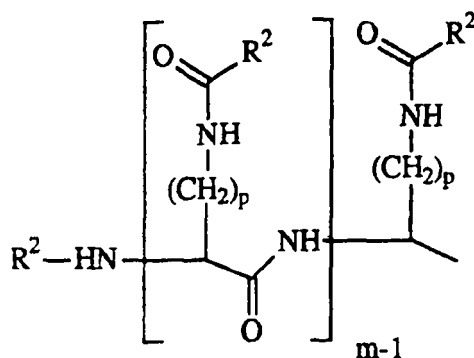


ES 2 320 572 T3

en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica, y
- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1.

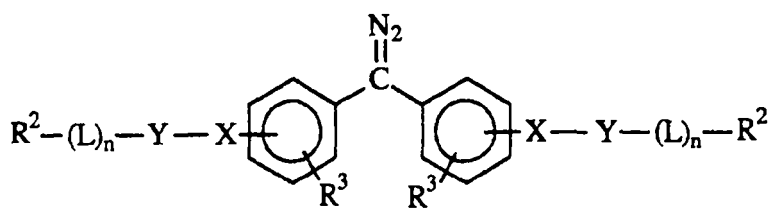
Sea cual sea la variante de estas realizaciones anteriores, la estructura $R^2-(L)_n-$ del reactivo puede ser de fórmula (5):



en la que:

- R^2 representa un marcador detectable,
- m es un número entero comprendido entre 1 y 100, y
- p es un número entero comprendido entre 1 y 10.

Sea cual sea la variante de estas realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (6):

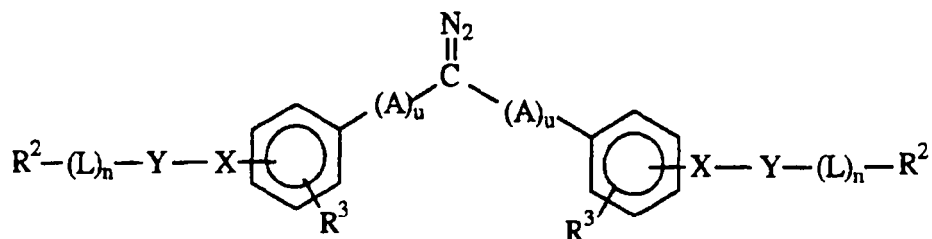


en la que

- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- R^3 representa H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1, y
- $-Y-X-$ representa $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $\text{CH}_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{S}-$.

ES 2 320 572 T3

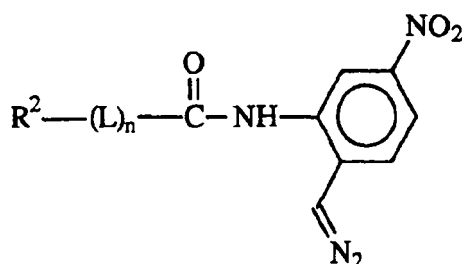
Sea cual sea la variante de estas realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (25):



en la que:

- 15
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
 - R^3 representa H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR con R = alquilo o arilo,
 - L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
 - A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1, y
 - -Y-X- representa -CONH-, -NHCO-, CH_2O -, CH_2S -.
- 20
- 25
- 30

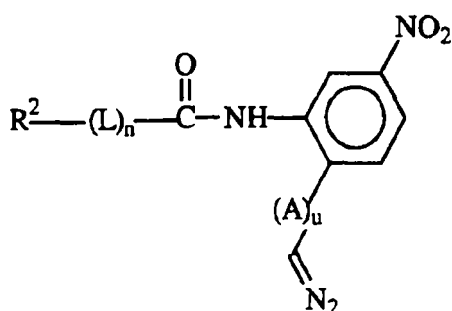
Sea cual sea la variante de estas realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (14):



en la que:

- 45
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica, y
 - L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1.
- 50

Sea cual sea la variante de estas realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (26):

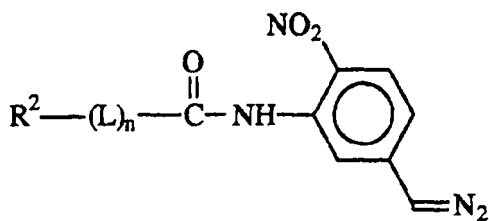


ES 2 320 572 T3

en la que:

- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1, y
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1.

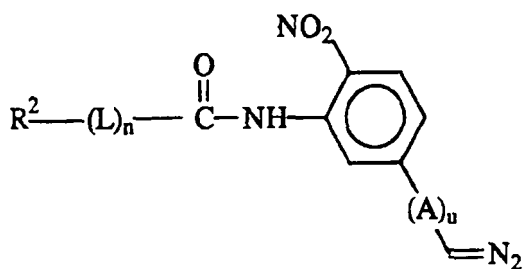
Sea cual sea la variante de estas realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (15):



en la que:

- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica, y
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1.

Sea cual sea la variante de estas realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (27):



en la que:

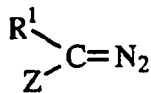
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1, y
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1.

De acuerdo con el conjunto de variantes de estas realizaciones anteriores, el constituyente L del reactivo puede comprender un resto $-(O-CH_2-CH_2)-$, repetido de 1 a 20 veces, preferentemente de 1 a 10 veces y aún más preferentemente de 2 a 5 veces.

ES 2 320 572 T3

De acuerdo con las dos primeras realizaciones, el reactivo de marcado puede permitir el marcado y la fragmentación de un ácido nucleico de cadena sencilla o doble, de acuerdo con las siguientes etapas:

- fragmentar el ácido nucleico,
- unir un marcador en al menos uno de los fragmentos por medio de un reactivo de marcado seleccionado entre los compuestos de fórmula (19):

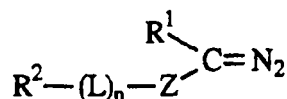


en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido, y
- Z comprende un marcador detectable,

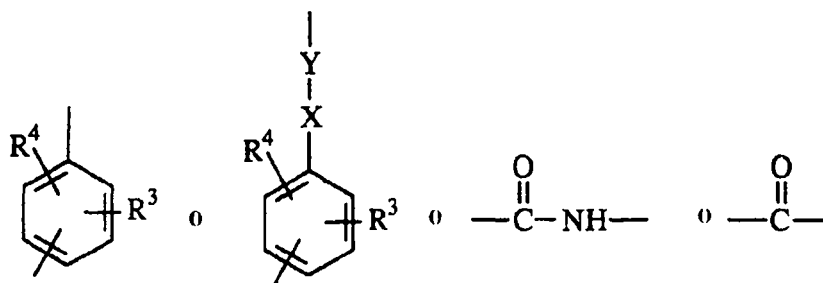
acoplándose dicho reactivo de manera covalente y mayoritaria en al menos un fosfato de dicho fragmento.

De acuerdo con la realización anterior, el reactivo de marcado puede seleccionarse entre los compuestos de fórmula (20):



en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 es un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es igual a 0 ó 1, y
- se selecciona entre:



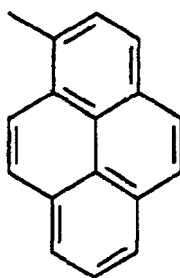
en la que:

- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $\text{R}^2-(\text{L})_n-\text{Y}-\text{X}-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo, y
- $-\text{Y}-\text{X}-$ representa $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $\text{CH}_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{S}-$.

ES 2 320 572 T3

De acuerdo con una variante de realización, el grupo Z puede estar constituido por:

5



10

15

De acuerdo con otra variante de realización, la fragmentación y el marcado pueden realizarse en dos etapas.

De acuerdo con otra variante de realización, la fragmentación y el marcado pueden realizarse en una etapa.

20

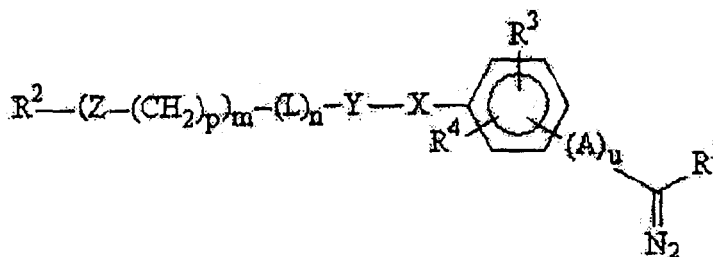
De acuerdo con otra variante de realización, el marcado puede realizarse en solución homogénea prácticamente acuosa.

De acuerdo con otra variante de realización, la fragmentación puede realizarse por vía enzimática, física o química.

25

De acuerdo con las dos primeras realizaciones, el reactivo de marcado puede ponerse en contacto en solución homogénea, en un tampón prácticamente acuoso, siendo dicho reactivo de marcado estable a la temperatura y de fórmula (8):

30



35

40

en la que:

45

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,

50

- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,

55

- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,

- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $\text{R}^2\text{-(L)}_n\text{-Y-X-}$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $\text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_3\text{-CH}_2\text{-NH-R}^2$, $\text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_4\text{-CH}_2\text{-NH-R}^2$ con R = alquilo o arilo,

60

- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es un número entero comprendido entre 0 y 2, preferentemente de 0 ó 1,

65

- -Y-X- representa -CONH- , -NHCO- , $\text{CH}_2\text{O-}$, $\text{CH}_2\text{S-}$,

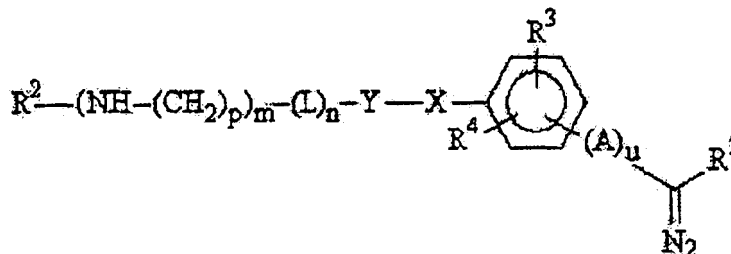
- -Z- representa -NH- , -NHCO- , -CONH- u -O- ,

- m es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3, y

ES 2 320 572 T3

- p es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3.

De acuerdo con una variante de la realización anterior, el reactivo puede ser de fórmula (9):

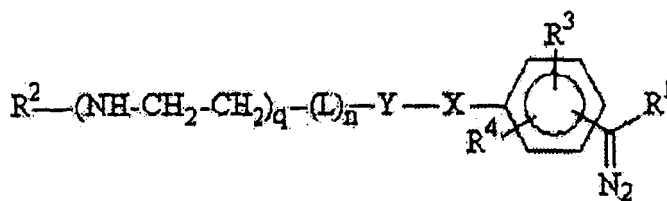


en la que:

- R¹ representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R² representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- R³ y R⁴ representan independientemente uno de otro: H, NO₂, Cl, Br, F, I, R²-(L)_n-Y-X-, OR, SR, NR₂, R, NHCOR, CONHR, COOR, -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₃-CH₂-NH-R², -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₄-CH₂-NH-R² con R = alquilo o arilo, y
- -Y-X- representa -CONH-, -NHCO-, CH₂O-, CH₂S-,
- m es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3, y
- p es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3.

De acuerdo con las dos realizaciones anteriores, en la fórmula del reactivo, p puede ser inferior o igual a m.

De acuerdo con las tres realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (10):

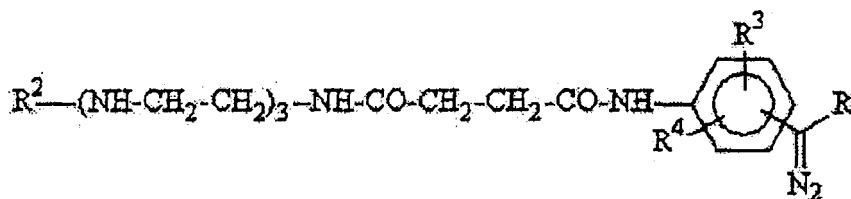


en la que:

- R¹ representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R² representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- R³ y R⁴ representan independientemente uno de otro: H, NO₂, Cl, Br, F, I, R²-(L)_n-Y-X-, OR, SR, NR₂, R, NHCOR, CONHR, COOR, -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₃-CH₂-NH-R², -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₄-CH₂-NH-R² con R = alquilo o arilo, y
- q es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3.

ES 2 320 572 T3

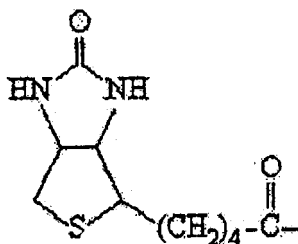
De acuerdo con las cuatro realizaciones anteriores, el reactivo puede ser de fórmula (11):



en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1, y
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ con R = alquilo o arilo.

De acuerdo con una realización, el reactivo R^2 puede estar constituido por un resto de D-Biotina de fórmula (12):

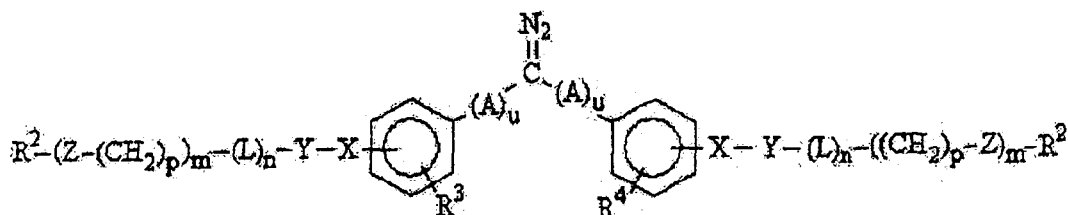


De acuerdo con las seis realizaciones anteriores, el reactivo R^1 está constituido por: CH_3 , y R^3 y R^4 representan cada uno: H.

De acuerdo con las siete realizaciones anteriores, la estructura $-(L)_n-$ del reactivo puede estar constituida por:

- espermina o N,N-Bis(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano: $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$, o
- espermidina o N-(3-aminopropil)-1,4-butandiamina: $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$, o
- un derivado que contiene un resto alanina: $\text{NH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$.

De acuerdo con las dos primeras realizaciones, el reactivo de marcado estable a la temperatura puede ponerse en contacto en solución homogénea, en un tampón acuoso, y es de fórmula (13):

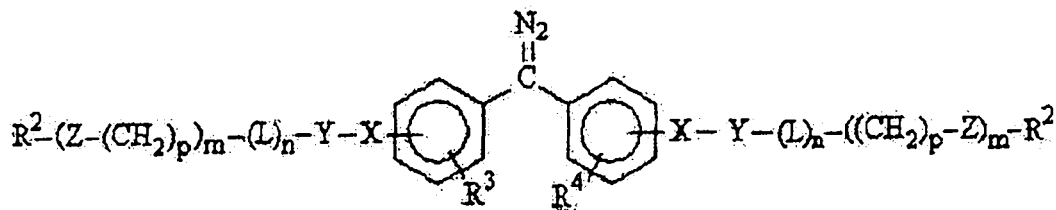


ES 2 320 572 T3

en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- 5 • R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- 10 • R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ con R = alquilo o arilo,
- 15 • A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es un número entero comprendido entre 0 y 2, preferentemente de 0 ó 1,
- 20 • -Y-X- representa -CONH-, -NHCO-, CH_2O -, CH_2S -,
- -Z- representa -NH-, -NHCO-, -CONH- u -O-,
- m es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3, y
- 25 • p es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3.

De acuerdo con la realización anterior, el reactivo puede ser de fórmula (16):



en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- 45 • R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- 50 • R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ con R = alquilo o arilo,
- 55 • -Y-X- representa -CONH-, -NHCO-, CH_2O -, CH_2S -,
- -Z- representa -NH-, -NHCO-, -CONH- u -O-,
- 60 • m es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3, y
- p es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3.

65 De acuerdo con las diez realizaciones anteriores, el constituyente L del reactivo puede comprender un resto $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)$, repetido de 1 a 20 veces, preferentemente de 1 a 10 veces y aún más preferentemente de 2 a 5 veces, estando -Z- representado entonces por -NH-, -NHCO- o -CONH-.

ES 2 320 572 T3

Sea cual sea la realización, el soporte sólido puede estar constituido por partículas de sílice.

Sea cual sea la realización, el soporte sólido puede estar constituido por partículas magnéticas recubiertas de sílice.

5 De acuerdo con las dos realizaciones anteriores, las partículas de sílice que constituyen el soporte sólido pueden tener tamaños de partícula comprendidos entre 0,1 y 500 μm y preferentemente entre 1 y 200 μm .

10 Sea cual sea la realización, uno de los ingredientes suplementarios que permiten el marcado puede estar constituido por un alcohol, preferentemente isopropanol.

De acuerdo con la realización anterior, el isopropanol puede constituir el 70% v/v de la mezcla final.

15 Sea cual sea la realización, uno de los ingredientes suplementarios que permiten la liberación celular y por lo tanto la adsorción de los ácidos nucleicos en el soporte sólido puede estar constituido por un agente caotrópico.

De acuerdo con la realización anterior, el agente caotrópico empleado puede ser una sal de guanidio, yoduro sódico, yoduro potásico, (iso)tiocianato sódico, urea o mezclas de estos derivados.

20 De acuerdo con la realización anterior, la sal de guanidio empleada puede ser (iso)tiocianato de guanidio.

Sea cual sea la realización, pueden separarse los complejos de fase sólida-ácido nucleico de los líquidos mediante sedimentación y rechazo del sobrenadante y a continuación lavado de los complejos con un tampón de lavado que contiene una sustancia caotrópica.

25 De acuerdo con la realización anterior, los complejos de fase sólida-ácido nucleico, lavados con el tampón de lavado, también pueden lavarse a continuación con ayuda de uno o más disolventes orgánicos y a continuación someterse a secado.

30 De acuerdo con la realización anterior, el ácido nucleico presente en los complejos de fase sólida-ácido nucleico, estando los complejos lavados y secados, puede eluirse por medio de un tampón de elución.

35 Sea cual sea la realización, los complejos de fase sólida-ácido nucleico obtenidos de este modo pueden ponerse en contacto con una mezcla en la que están presentes los componentes para amplificar el ácido nucleico, fijado a dicha fase sólida o eluido de ésta.

Sea cual sea la realización, la etapa de incubación puede consistir en mantener la muestra tratada durante de 5 a 45 minutos, preferentemente durante de 15 a 35 minutos y aún más preferentemente durante 25 minutos a una temperatura comprendida entre 45 y 85°C, preferentemente entre 55 y 75°C y aún más preferentemente a 65°C.

40 De acuerdo con la realización anterior, después de la etapa de incubación, la muestra puede llevarse a temperatura ambiente durante al menos varios minutos, preferentemente 5 minutos.

45 Por “estructura multimérica”, se entiende un polímero formado por unidades repetidas de sintones químicos o biológicos. Se menciona un ejemplo en el ejemplo 34.2 de la descripción de la solicitud de patente WO-A-02/090319. Se invita al experto en la materia a remitirse a ese documento si encuentra las informaciones desarrolladas a continuación insuficientes para su completa comprensión de este tema. Se conocen muchas variantes de dichas estructura utilizables en la presente invención, como por ejemplo:

- 50 • polímeros lineales (EP-A 0.561.722, EP-A-0.669.991),
- polímeros ramificados (WO-A-01/92361),
- partículas (EP-A-0 827 552),
- 55 • dendrímeros (US-A-4.507.466; US-A-4.568.737; US-A-6.083.708),
- polinucleótidos, y
- 60 • polipéptidos.

Si fuera necesario, el experto en la materia también puede remitirse a esos documentos para una perfecta comprensión de este tema.

65 Por “marcador detectable”, se entiende al menos un marcador capaz de generar directamente una señal detectable. Por ejemplo la presencia de biotina se considera un marcado directo, ya que es detectable, incluso aunque es posible

ES 2 320 572 T3

asociarla posteriormente con estreptavidina marcada. A continuación se proporciona una lista no limitante de estos marcadores:

- enzimas que producen una señal detectable por ejemplo por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como peroxidasa de rábano rusciano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,
- cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes y colorantes,
- grupos con densidad electrónica detectable por microscopía electrónica o por su propiedad eléctrica como la conductividad, amperometría, voltametría, impedancia,
- grupos detectables, por ejemplo cuyas moléculas son de tamaños suficientes para inducir modificaciones detectables debido a sus características físicas y/o químicas, esta detección puede realizarse mediante métodos ópticos como difracción, resonancia del plasmón superficial, variación superficial, variación del ángulo de contacto o métodos físicos como espectroscopía de fuerza atómica y el efecto túnel,
- moléculas radiactivas como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I .

Preferentemente, el marcador no es un marcador radiactivo para evitar problemas de seguridad vinculados a los marcadores.

En una realización particular de la presente invención, el marcador es detectable electroquímicamente y en particular el marcador es un derivado de un complejo de hierro, como un ferroceno.

La expresión “ácido nucleico” significa una cadena de al menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que comprende opcionalmente al menos un nucleótido modificado, por ejemplo al menos un nucleótido que comprende una base modificada, tal como inosina, metil-5-desoxicitidina, dimetilamino-5-desoxiuridina, desoxiuridina, diamino-2,6-purina, bromo-5-desoxiuridina o cualquier otra base modificada que permite la hibridación. Este polinucleótido también puede modificarse a nivel de la unión internucleotídica como por ejemplo fosforotioatos, H-fosfonatos, alquil-fosfonatos, a nivel del esqueleto como por ejemplo alfa-oligonucleótidos (FR 2 607 507) o PNA (M. Egholm *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 114, 1895-1897 o 2' O-alkil ribosa y LNA (BW, Sun *et al.*, Biochemistry, 4160-4169, 43, 2004). El ácido nucleico puede ser natural o sintético, un oligonucleótido, un polinucleótido, un fragmento de ácido nucleico, un ARN ribosómico, un ARN mensajero, un ARN de transferencia, un ácido nucleico obtenido mediante una técnica de amplificación enzimática tal como:

- PCR (Polymerase Chain Reaction) [*Reacción en Cadena de la Polimerasa*], descrita en las patentes US-A-4.683.195, US-A-4.683.202 y US-A-4.800.159, y su derivada RT-PCR (Reverse Transcription PCR) [*Transcripción Inversa seguida de PCR*], particularmente en un formato de una etapa, tal como se describe en la patente EP-B-0.569.272,
- LCR (Ligase Chain Reaction) [*Reacción en Cadena de la Ligasa*], expuesta por ejemplo en la solicitud de patente EP-A-0.201.184,
- RCR (Repair Chain Reaction) [*Reacción de Reparación en Cadena*], descrita en la solicitud de patente WO-A-90/01069,
- 3SR (Self Sustained Sequence Replication) [*Replicación de Secuencia Autosostenida*] con la solicitud de patente WO-A-90/06995,
- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) [*Amplificación Basada en la Secuencia de Ácidos Nucleicos*] con la solicitud de patente WO-A-91/02818, y
- TMA (Transcription Mediated Amplification) [*Amplificación Mediada por Transcripción*] con la patente US-A-5.399.491.
- RCA (Rolling Circle Amplification) [*Amplificación Rotativa en Círculo*] (US-6.576.448).

Se habla entonces de amplicones para designar a los ácidos nucleicos generados mediante una técnica de amplificación enzimática.

Cada una de estas modificaciones puede combinarse siempre que al menos un fosfato esté presente en el ácido nucleico.

Por “polipéptido”, se entiende una cadena de al menos dos aminoácidos,

Por “aminoácidos”, se entiende:

- aminoácidos primarios que codifican proteínas,
- 5 • aminoácidos derivados después de la acción enzimática, como trans-4-hidroxiprolina,
- aminoácidos naturales, pero no presentes en las proteínas como norvalina, N-metil-L leucina, estalina (véase Hunt S. en Chemistry and Biochemistry of the amino acids, Barrett G.C., ed., Chapman and Hall, Londres, 1985), y
- 10 • aminoácidos protegidos por funciones químicas utilizables en síntesis en soporte sólido o en fase líquida y aminoácidos no naturales.

15 Por “etapa de purificación”, se entiende particularmente la separación entre los ácidos nucleicos de los microorganismos y los constituyentes celulares liberados en la etapa de lisis que precede a la purificación de los ácidos nucleicos. Estas etapas de lisis se conocen bien, como ejemplo indicativo, pueden utilizarse métodos de lisis tales como los descritos en las solicitudes de patente:

- 20 - WO-A-00/60049 sobre la lisis por sonicación
- WO-A-00/05338 sobre la lisis mixta magnética y mecánica,
- 25 - WO-A-99/53304 sobre la lisis eléctrica, y
- WO-A-99/15621 sobre la lisis mecánica.

30 El experto en la materia podrá utilizar otros métodos de lisis bien conocidos tales como choques térmicos u osmóticos o tratamientos con agentes caotrópicos, tales como sales de guanidinio (patente US-A-5.234.809).

Esta etapa permite generalmente concentrar los ácidos nucleicos. Como ejemplo, pueden utilizarse partículas magnéticas (véase a este respecto las patentes US-A-4.672.040 y US-A-5.750.338) y de este modo purificar los ácidos nucleicos, que se han fijado a estas partículas magnéticas, mediante una etapa de lavado. Esta etapa de purificación de los ácidos nucleicos es particularmente interesante si se desea amplificar posteriormente dichos ácidos nucleicos. Una realización particularmente interesante de estas partículas magnéticas se describe en las solicitudes de patente WO-A-97/45202 y WO-A-99/35500.

40 La expresión “soporte sólido” tal como se utiliza en este documento, incluye todos los materiales en los que puede fijarse un ácido nucleico. Pueden utilizarse materiales de síntesis o materiales naturales, opcionalmente modificados químicamente, como soporte sólido, particularmente polisacáridos, tales como materiales a base de celulosa, por ejemplo papel, derivados de celulosa tales como acetato de celulosa y nitrocelulosa o dextrano; polímeros, copolímeros, particularmente a base de monómeros de tipo estireno, fibras naturales tales como algodón y fibras sintéticas tales como nylon; materiales minerales tales como sílice, cuarzo, vidrios, cerámica; látex; partículas magnéticas; derivados metálicos, geles, etc. El soporte sólido puede estar en forma de placa de microtitulación, de membrana, de partícula o de placa prácticamente plana de vidrio o silicio o derivados.

50 Los ejemplos adjuntos representan realizaciones particulares y no pueden considerarse como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

55 *Marcado y escisión en fase sólida del producto de amplificación por PCR seguido de un análisis en chip Affymetrix*

A - PCR Myco 16 S

Este experimento se realiza en un modelo llamado “Myco 16S”.

60 Este nombre designa a los amplicones generados por PCR a partir de una secuencia de 180 bases de un fragmento del gen que codifica el ARN ribosómico 16S de *Mycobacterium tuberculosis*.

65 Las condiciones para el cultivo, la extracción de las micobacterias así como los cebadores de amplificación se dan en la publicación de Alain Troesch: “Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays” publicado en J. Clin. Microbiol. 1999, 37, páginas 49 a 55.

ES 2 320 572 T3

La PCR se realiza utilizando como matriz de partida preparaciones de ADN genómico (10^3 copias por PCR) con el kit FastStart High Fidelity PCR System (Roche Diagnostic Corporation, Basilea, Suiza, Referencia: 03 553 426 001) con 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido, 03 μ M de cebadores y 0,4 μ l de enzima.

5 Los parámetros del ciclo de PCR son los siguientes: 95°C durante 4 minutos y después 35 ciclos de acuerdo con el siguiente protocolo: 95°C durante 30 segundos y después 55°C durante 30 segundos y finalmente 72°C durante 30 segundos. Después se conserva a 4°C hasta la detención del sistema.

10 Los amplicones obtenidos de la PCR descrita anteriormente se designan en lo sucesivo mediante la expresión “PCR 16S”.

B - Marcado en fase homogénea (Control)

15 El marcado en fase homogénea se utilizará como técnica de referencia con respecto a la invención, se le denominará “control”.

20 Un volumen de 50 μ l de PCR 16S diluido al 1/5 en el tampón de amplificación proporcionado en el kit, se mezcla con 75 μ l de *meta*-Biotin-fenilmetildiazometano, en lo sucesivo denominado “m-BioPMDAM”, (a 50 mM de Di-Metilsulfóxido, en lo sucesivo designado “DMSO”) y 102,5 μ l de H₂O y después se incuban durante 25 minutos a 95°C. A continuación se añaden 22,5 μ l de HCl a 0,1 M en el medio de reacción y después se incuba de nuevo a 95°C durante 5 minutos.

25 A continuación se purifica el medio de reacción con el kit QIAQuick (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania. Referencia: 28 306) utilizando el protocolo del fabricante y después se hibrida en chip de ADN (Affymetrix, Santa Clara, CA). El chip de ADN utilizado está diseñado para el análisis de la región 213-415 de la secuencia M20940 (Referencia del GenBank) del ADN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Este chip de ADN se describe, con el protocolo de hibridación correspondiente, en el artículo de A. Troesch *et al.*: “Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays” publicado en J. Clin. Microbiol. 1999, 37, páginas 49 a 55.

30 C - Marcado y escisión en fase heterogénea

Paralelamente, la PCR se trata siguiendo el protocolo descrito a continuación.

35 Un volumen de 10 μ l de PCR (para utilizar la misma cantidad de PCR que para el control descrito en el párrafo B) se mezcla con 25 μ l de *m*-BioPMDAM (50 mM en DMSO), 5 μ l de HCl 0,2 M, 140 μ l de isopropanol (% final = 70% v/v) y 20 μ l de perlas de sílice magnéticas MagPrep (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania. Referencia: 1.01193.0001).

40 Esta mezcla se incuba durante 25 minutos a 65°C y después 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lava el sedimento magnético tres veces con 250 μ l de isopropanol al 70% (en H₂O al 30% v/v) y después los ácidos nucleicos adsorbidos en la sílice se eluyen en una mezcla de 100 μ l de tampón EB (Elution Buffer, QIAGEN. Referencia: 19086), a la que se añaden 400 μ l de tampón de hibridación (6x SSPE (NaCl 0,9 M, NaH₂PO₄ 60 mM, EDTA 6 mM, pH 7,4), Triton x 100 al 0,05% (v/v)). Este tampón se prepara siguiendo el protocolo descrito en la publicación de A Troesch *et al.*, descrita en el párrafo anterior, para reproducir las condiciones utilizadas para el control.

45 D - Resultados y conclusión

Los resultados en términos de porcentaje de homología, de intensidad de la señal (I) y de ruido de fondo (B) se agrupan en la tabla 1 siguiente:

50 TABLA 1

55 *Estudio comparativo del porcentaje de homología, de intensidad de la señal (I) y de ruido de fondo (B) de un procedimiento que utiliza la invención con respecto a un control que no la utiliza*

Experimento	% de homología	I	B	I/B
Control	99,3	3710	377	9,8
Marcado y Escisión en Fase Sólida (Invención)	99,3	4455	404	11,0

ES 2 320 572 T3

En conclusión, los resultados obtenidos con un procedimiento de reacción de acuerdo con la invención son comparables a los obtenidos con un procedimiento más “convencional” en dos etapas separadas de purificación y marcado. Además, el procedimiento de reacción es mucho más corto, aproximadamente un 50% menos de tiempo, en el caso del marcado y escisión en fase sólida (es decir 15 minutos en lugar de media hora).

Se observa también que los valores de intensidades medidas son prácticamente similares. Esto indica que el rendimiento de purificación es similar siguiendo los dos métodos de purificación (QIAquick o perlas magnéticas).

Ejemplo 2

Marcado y escisión en fase sólida en presencia de molécula marcadora que tiene dos grupos de biotina

A - Marcado en fase homogénea (Control)

Un volumen de 50 μ l de PCR 16S diluido a 1/10 en tampón de amplificación (se realiza esta dilución para poner a prueba la sensibilidad del ensayo, reduciendo la concentración de amplicones) se mezcla con 39,5 μ l de *N,N'*-Bis (13-biotinoilamino-4,7,10-trioxatridecil)-5-(diazometil)isofalamida (en lo sucesivo denominado “bisBioPDAM”) 190 mM en DMSO, 110,5 μ l de DMSO y 15 μ l de H₂O y después se incuban durante 25 minutos a 95°C. A continuación se añaden 35 μ l de HCl 0,1 M en el medio de reacción y después se incuba de nuevo a 95°C durante 5 minutos.

El medio de reacción se purifica a continuación con el kit QIAquick utilizando el protocolo del fabricante y después se hibrida en chip de ADN (Affymetrix, Santa Clara, CA) de la misma manera que en el ejemplo 1.

B - Marcado y escisión en Fase Heterogénea

Paralelamente, la misma PCR diluida a 1/10 se trata siguiendo otro protocolo. El volumen de 50 μ l de PCR se mezcla con 39,5 μ l de bisBioPDAM 190 mM en DMSO, 5 μ l de HCl 0,4 M, 175 μ l de isopropanol (% final = 70% v/v), 6,5 μ l de DMSO y un sedimento de 20 μ l de perlas de sílice magnéticas MagPrep.

Esta mezcla se incuba durante 15 minutos a 80°C y después 5 minutos a temperatura ambiente. El sedimento magnético se lava a continuación tres veces con 250 μ l de isopropanol al 70% (en H₂O al 30% v/v) y después los ácidos nucleicos adsorbidos en la sílice se eluyen en una mezcla de 100 μ l de tampón de elución EB (véase anteriormente), a los que se añaden 400 μ l de tampón de hibridación. La hibridación se realiza de la misma manera que en el ejemplo 1.

C - Resultados y conclusiones

Los resultados en términos de porcentaje de homología, de intensidad de la señal (I) y de ruido de fondo (B) se agrupan en la tabla 2 siguiente:

TABLA 2

Estudio comparativo del porcentaje de homología, de intensidad de la señal (I) y de ruido de fondo (B) de un procedimiento que utiliza la invención con respecto a un control que no la utiliza

Experimento	% de homología	I	B	I/B
Control	99,1	1051	232	4,5
Marcado y Escisión en Fase Sólida (Invención)	99,1	4071	437	9,3

En conclusión, los resultados obtenidos con un procedimiento de reacción de acuerdo con la invención son mejores que los obtenidos con un procedimiento más “convencional” en dos etapas separadas de purificación y marcado cuando se utiliza bisBioPDAM, en una PCR diluida.

Esta molécula, más soluble que el *m*-BioPDAM, que tiene dos grupos de biotina, permite por otro lado mejorar la sensibilidad del ensayo utilizando el marcado en soporte sólido. Esto es visible en la mejora de los valores de intensidad (I) y de proporción de señal con respecto a ruido (I/B) que mejoran con respecto al procedimiento “convencional”.

ES 2 320 572 T3

La utilización del procedimiento de reacción y de bisBioPDAM permite por lo tanto obtener un ensayo muy robusto (gran valor de intensidad, poca sensibilidad a las variaciones entre ensayos) para un menor número de copias.

5 Ejemplo 3

Marcado en fase sólida de productos de amplificación por PCR seguido de un análisis cuantitativo en chip Agilent

A - PCR VHB

10 La expresión "PCR VHB" designa en lo sucesivo en el texto el producto de amplificación por PCR de un fragmento de 3200 pares de bases del genoma del virus de la hepatitis B, que se genera de la siguiente manera:

15 Aproximadamente 10^3 copias de ADN de virus de la hepatitis B (VHB), contenidos en un volumen de $15 \mu\text{l}$ de sobrenadante de un cultivo celular, se amplifican por PCR utilizando el kit Expand High Fidelity (Roche Diagnostic Corporation, Basilea, Suiza. Referencia: 1732 641).

20 Como información, el medio de reacción final utilizado en el kit contiene $1,5 \text{ mM}$ de MgCl_2 , $200 \mu\text{M}$ de cada dNTP y $2,6$ Unidades de una mezcla de ADN polimerasas *Taq* y *Pow*; $0,3 \mu\text{M}$ de cebadores P1 y P2 cuyas secuencias son:

P1: 5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCTTTTTCACCTCTGCTAATCA-3'

P2: 5'-CCGGAAAGCTTGAGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGG-3',

25 se añaden a la mezcla, para permitir la amplificación del fragmento de 3200 nucleótidos esperado.

30 Una descripción de esta PCR se presenta en el artículo de Gunther S. *et al.*, "A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genome permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients", Journal of Virology, septiembre de 1995, páginas 5437 a 5444.

35 Este PCR VHB se utiliza para disponer de una PCR que actúa sobre secuencias de ácidos nucleicos mucho más largas que con el modelo myco (3200 bases en lugar de 180 para myco 16S) para estudiar el rendimiento de captura de las perlas magnéticas en dos modelos muy diferentes.

B - Determinación de los rendimientos de captura:

40 Un producto de amplificación por PCR de una parte del gen 16S de *Mycoplasma tuberculosis*, amplificado de la misma manera que se ha descrito en el ejemplo 1, y paralelamente un producto de PCR VHB se tratan de la siguiente manera:

45 Un volumen de $10 \mu\text{l}$ de PCR se mezcla con $25 \mu\text{l}$ de *m*-BioPMDAM (50 mM en DMSO), $5 \mu\text{l}$ de H_2O , $140 \mu\text{l}$ de isopropanol (% final = $70\% \text{ v/v}$) y $20 \mu\text{l}$ de perlas de sílice magnética MagPrep.

50 Esta mezcla se incuba durante 25 minutos a 65°C y después 5 minutos a temperatura ambiente. El sedimento magnético se lava a continuación tres veces con $250 \mu\text{l}$ de isopropanol al 70% (en H_2O al $30\% \text{ v/v}$) y después los ácidos nucleicos adsorbidos en la sílice se eluyen en $50 \mu\text{l}$ de tampón EB.

55 Paralelamente las mismas soluciones de PCR se marcan siguiendo el mismo protocolo (isopropanol sustituido por H_2O) y después se purifican siguiendo el protocolo QIAquick y se eluyen en un volumen final de $50 \mu\text{l}$.

Los productos de purificación así como las PCR iniciales se analizan en un aparato BioAnalyser 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, Estados Unidos, Referencia: G2940CA) utilizando el protocolo del fabricante, para cuantificarlos.

60

65

C - Resultados y conclusión

Los valores obtenidos se reproducen en la tabla 3 reproducida a continuación:

TABLA 3

Comparación del rendimiento de captura de ácidos nucleicos en el medio de reacción mediante un procedimiento convencional del estado de la técnica y un procedimiento de acuerdo con la invención

	Inicial	QIAgen	Invención
VHB (ng/μl)	8,2	3,6	7,7
% de Rendimiento		44	94
Myco (ng/μl)	2,7	0,94	2,6
% de Rendimiento		35	96

Para concluir, estos resultados añadidos a los obtenidos en chip, muestran que la liberación de ácidos nucleicos en el medio de reacción es reducida. En el marco del kit QIAgen, la parte esencial de la captura se realiza en fragmentos de pequeño tamaño, lo que permite su utilización con los productos de escisión hibridados, necesitando la hibridación en chip de ADN en algunos casos una escisión de los productos de PCR (véase por ejemplo Zhang *et al.*, "Reproducible and inexpensive probe preparation for oligonucleotide arrays", publicado en Nucleic Acid Res. 2001, 29, e66. Los resultados presentados en este ejemplo permiten mostrar que el protocolo utilizado con las perlas magnéticas permite capturar una gama más amplia de tamaño de fragmentos. Esto permite una mayor flexibilidad de la tecnología, ya que es posible, a partir del producto de PCR de tamaños muy variados, obtener, mediante modulación de la escisión, fragmentos de ADN marcados de tamaño adaptado a la aplicación prevista, sin coacción técnica notable.

Ejemplo 4

Marcado y escisión en fase sólida de ADN genómico seguido de un análisis en chip Affymetrix

A - Preparación del ADN genómico

El ADN genómico, que en lo sucesivo se denominará "ADNg", se extrae a partir de un cultivo líquido de *Staphylococcus aureus* de 18 horas en medio Tripticasa de soja (bioMérieux, Marcy, Francia. Referencia: 41 146).

El ADNg se purifica con columna de intercambio iónico "Genomic Tips 500" (QIAgen. Referencia: 10262) siguiendo el protocolo del fabricante y se cuantifica mediante medición de la adsorbancia a 260 nm.

B - Marcado e hibridación del ADNg

Un volumen de 10 μl de ADNg que contiene aproximadamente 10⁹ copias de genomas bacterianos se mezcla con 25 μl de *m*-BioPMDAM (50 mM en DMSO), 5 μl de acetato sódico pH = 3, 40 μl de isopropanol (% final = 70% v/v) y 20 μl de perlas de sílice magnéticas MagPrep (Merck).

Esta mezcla se incuba durante 25 minutos a 65°C y después 5 minutos a temperatura ambiente. El sedimento magnético se lava a continuación tres veces con 250 μl de isopropanol al 70% (en H₂O al 30% v/v) y después los ácidos nucleicos adsorbidos en la sílice se eluyen en una mezcla de 100 μl de tampón EB al que se añaden 400 μl de tampón de hibridación (Cloruro de Tetrametilamonio, 3 M; Tris, pH 7,8, 10 mM; Tween-20 al 0,01%; Albúmina de Suero Bovino Acetilada, 500 μg/ml; ADN de Esperma de Arenque, 100 μg/ml. Este tampón se prepara siguiendo el protocolo proporcionado por Affymetrix en su manual del usuario: CustomSeq resequencing Array protocol Versión 2.0).

La mezcla se hibrida en un chip Affymetrix diseñado para el análisis del gen 16S cuyas características y protocolo operatorio se describen en el artículo de G. Vernet *et al.*, "Species differentiation and antibiotic susceptibility testing with DNA microarrays", publicado en J. Appl. Microbiol., 2004, 96, páginas 59 a 68 y C. Jay *et al.*, "16S rRNA gene-based identification of Staphylococcus species using high density DNA probe array", 10th International Symposium on staphylococci and Staphylococcal infections Tsukuba, de octubre de 2002.

ES 2 320 572 T3

C - Resultados y conclusión

Los resultados en términos de porcentaje de homología, de intensidad de la señal (I) y de ruido de fondo (B) se agrupan en la tabla 4 siguiente:

TABLA 4

Resultados de porcentaje de homología, de intensidad de la señal (I) y de ruido de fondo (B) de un procedimiento de tratamiento del ADNg que utiliza la invención

Experimento	% de homología	I	B	I/B
Marcado y escisión en fase sólida (Invención)	92,9	2799	599	4,7

En conclusión, este resultado es muy satisfactorio. El porcentaje de homología del 93% permite identificar de manera ideal la especie bacteriana analizada y diferenciarla de las demás especies que pueden identificarse en el chip.

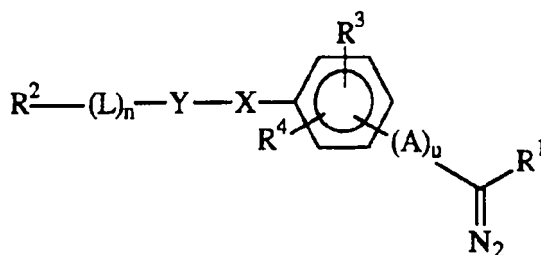
Sabiendo que es posible purificar el ADNg en las mismas perlas magnéticas que las utilizadas para la purificación del ADN marcado, puede realizarse el conjunto del protocolo (de la colonia bacteriana al ADN listo para hibridar) en un único y mismo tubo, tratado manualmente o en un autómata.

Pueden obtenerse resultados idénticos desde el punto de vista de la invención, utilizando otras técnicas de amplificación como NASBA o TMA que generan directamente amplicones de ARN.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de marcado y de purificación de ácidos nucleicos de interés presentes en una muestra biológica a tratar, que consiste en:

- disponer de un único recipiente de reacción,
- introducir en el recipiente de reacción:
 - la muestra biológica,
 - al menos un reactivo de marcado de ácidos nucleicos, siendo dicho reactivo de marcado estable a la temperatura y de fórmula (0):



en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2 - (L)_n - Y - X -$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo,
- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es un número entero comprendido entre 0 y 2, preferentemente de 0 ó 1, y
- -Y-X- representa -CONH-, -NHCO-, CH_2O -, CH_2S -.
 - al menos un soporte sólido que permite la adsorción de dichos ácidos nucleicos,
 - cualquier ingrediente necesario para el marcado de los ácidos nucleicos y/o para la inmovilización de dichos ácidos nucleicos en el soporte,
- incubar el contenido del recipiente de reacción, y
- aislar los ácidos nucleicos marcados de este modo.

2. Procedimiento de marcado y de purificación de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque los ácidos nucleicos tratados están constituidos por ADN y/o ARN, de cadena sencilla y/o de cadena doble, sintéticos y/o naturales.

3. Procedimiento de marcado y de purificación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque la introducción del reactivo de marcado permite:

- la fragmentación de los ácidos nucleicos de manera no específica para generar una pluralidad de fragmentos de ácidos nucleicos, y

ES 2 320 572 T3

- marcar una pluralidad de estos fragmentos a nivel del fosfato terminal situado en el extremo 3' y/o 5', habiéndose liberado dicho fosfato terminal durante la fragmentación.

5 4. Procedimiento de marcado y de purificación de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado** porque el marcado del extremo 3' o 5' de un fragmento de ácido nucleico se realiza mediante fijación, en el fosfato en posición 2', en posición 3' o en posición 2'-3'-monofosfato cíclico, con respecto a la ribosa, de una función reactiva portada por un marcador.

10 5. Procedimiento de marcado y de purificación de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado** porque la fragmentación y/o el marcado del extremo 3' o 5' de un fragmento de ácido nucleico se realiza mediante fijación, en el fosfato en posición 2', en posición 3' o en posición 2'-3'-monofosfato cíclico, con respecto a la ribosa, de una función nucleófila, electrófila o halogenuro portada por un marcador.

15 6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizado** porque la fragmentación de los ácidos nucleicos se realiza por vía:

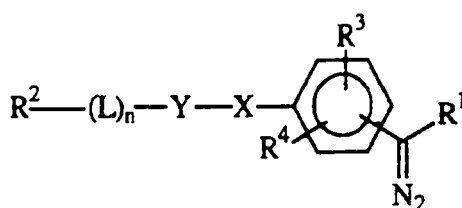
- enzimática (nucleasas),
- 20 - química (cationes metálicos, tales como iones Mg^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} , Co^{++} y/o Zn^{++} , asociados o no a un catalizador químico, por ejemplo N-metil-imidazol o cualquier molécula química que tiene una afinidad por el ARN y que tiene un núcleo imidazol o un análogo sustituido) o
- física (mediante sonicación o mediante radiación).

25 7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, **caracterizado** porque el marcado del extremo 3' o 5' de un fragmento de ARN se realiza mediante fijación, en el fosfato unido a la posición 2', a la posición 3' o a la posición 2'-3'-monofosfato cíclico de la ribosa, de una molécula R-X, donde R está constituido por el marcador y X es el agente de unión entre el marcador y el ARN, tal como un grupo hidroxilo, amina, hidrazina, alcoxilamina, halogenuro de alquilo, fenil-metil halogenuro, yodoacetamida y maleimida.

8. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, **caracterizado** porque el marcado en el grupo fosfato se realiza por medio de 5-(bromometil)-fluoresceína.

35 9. Procedimiento de marcado y de purificación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque el reactivo de marcado se pone en contacto con los ácidos nucleicos en solución homogénea, en un tampón prácticamente acuoso, siendo dicho reactivo de marcado estable a la temperatura y de fórmula (0).

40 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el reactivo de marcado utilizado es de fórmula (1):



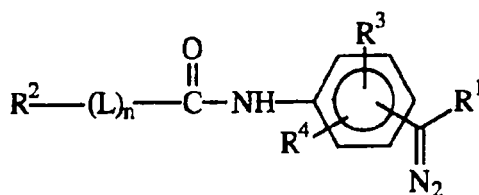
50

en la que:

- 55 • R¹ representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R² representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- 60 • L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- R³ y R⁴ representan independientemente uno de otro: H, NO₂, Cl, Br, F, I, R²-(L)_n-Y-X-, OR, SR, NR₂, R, NHCOR, CONHR, COOR con R = alquilo o arilo, y
- 65 • -Y-X- representa -CONH-, -NHCO-, CH₂O-, CH₂S-.

ES 2 320 572 T3

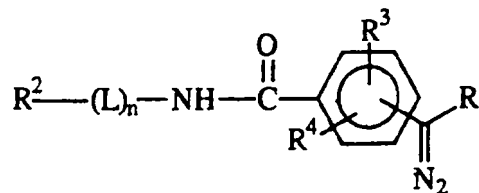
11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, en el que el reactivo es de fórmula (2):



en la que:

- 15
- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
 - R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
 - L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
 - R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR con R = alquilo o arilo.
- 20
- 25

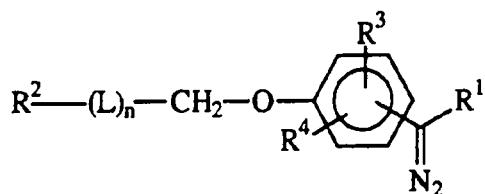
12. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, en el que el reactivo es de fórmula (3):



en la que:

- 40
- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
 - R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
 - L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1, y
 - R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR, CONHR, COOR con R = alquilo o arilo.
- 45
- 50

13. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, en el que el reactivo es de fórmula (4):

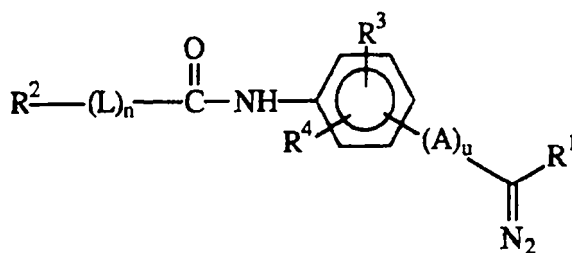


ES 2 320 572 T3

en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1, y
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2\text{-(L)}_n\text{-Y-X-}$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo.

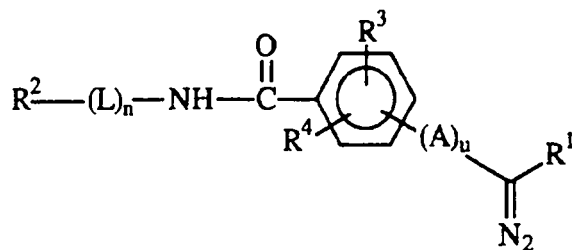
14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el reactivo es de fórmula (21):



en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1, y
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2\text{-(L)}_n\text{-Y-X-}$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo.

15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el reactivo es de fórmula (22):



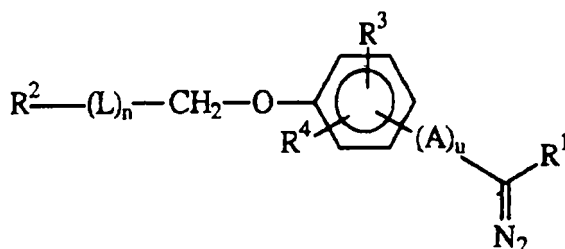
en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,

ES 2 320 572 T3

- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1, y
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo.

16. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el reactivo es de fórmula (23):

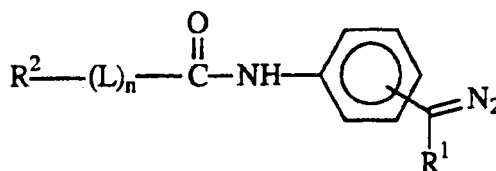


en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1, y
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo.

17. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, **caracterizado** porque, en el que el reactivo de marcado utilizado comprende R^3 y R^4 que representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , OCH_3 , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$.

18. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el reactivo es de fórmula (7):

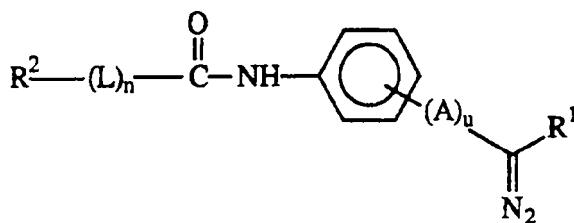


en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica, y
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1.

ES 2 320 572 T3

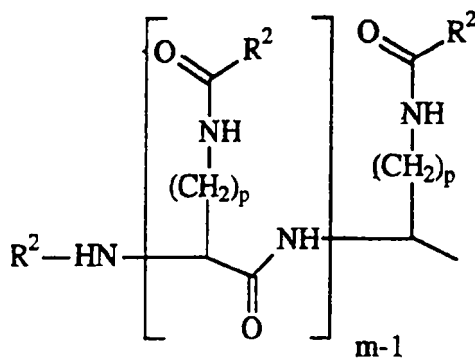
19. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 14, en el que el reactivo es de fórmula (24):



en la que:

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1, y
- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1.

20. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 19, en el que la estructura $\text{R}^2\text{---}(\text{L})_n\text{---}$ del reactivo es de fórmula (5):



en la que:

- R^2 representa un marcador detectable,
- m es un número entero comprendido entre 1 y 100, y
- p es un número entero comprendido entre 1 y 10.

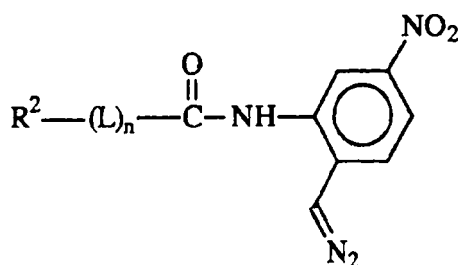
21. Procedimiento de marcado y de purificación de ácidos nucleicos de interés presentes en una muestra biológica a tratar, que consiste en:

- disponer de un único recipiente de reacción,
- introducir en el recipiente de reacción:
 - la muestra biológica,

ES 2 320 572 T3

- R^3 representa H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo,
- 5 • L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1, y
- 10 • $-Y-X-$ representa $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $\text{CH}_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{S}-$,
 - al menos un soporte sólido que permite la adsorción de dichos ácidos nucleicos,
 - 15 - cualquier ingrediente necesario para el marcado de los ácidos nucleicos y/o para la inmovilización de dichos ácidos nucleicos en el soporte,
- incubar el contenido del recipiente de reacción, y
- 20 • aislar los ácidos nucleicos marcados de este modo.

23. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el reactivo es de fórmula (14):

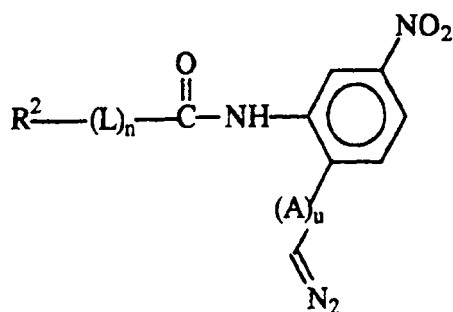


en la que:

- 40
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica, y
 - L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1.

45

24. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 14, en el que el reactivo es de fórmula (26):



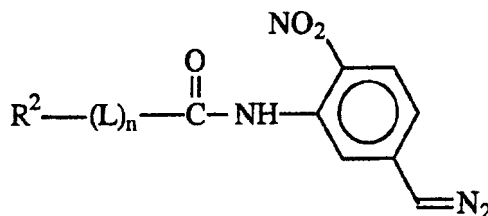
en la que:

- 65
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,

ES 2 320 572 T3

- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1, y
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1.

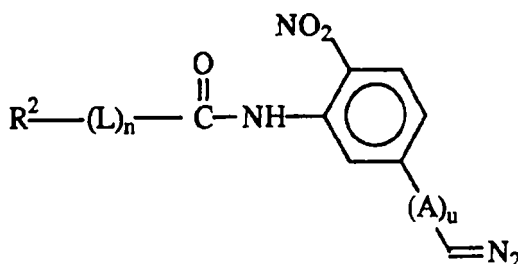
25. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el reactivo es de fórmula (15):



en la que:

- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica, y
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1.

26. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 14, en el que el reactivo es de fórmula (27):



en la que:

- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es igual a 1, y
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1.

27. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 26, **caracterizado** porque el constituyente L del reactivo comprende un resto $-(O-CH_2-CH_2)-$, repetido de 1 a 20 veces, preferentemente de 1 a 10 veces y aún más preferentemente de 2 a 5 veces.

28. Procedimiento de marcado y de purificación de ácidos nucleicos de interés presentes en una muestra biológica a tratar, que consiste en:

- disponer de un único recipiente de reacción,
- introducir en el recipiente de reacción:
 - la muestra biológica,

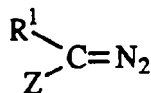
ES 2 320 572 T3

- al menos un reactivo de marcado de ácidos nucleicos, permitiendo el reactivo de marcado el marcado y la fragmentación de un ácido nucleico de cadena sencilla o doble de acuerdo con las siguientes etapas:

5

- o fragmentar el ácido nucleico,
- o unir un marcador en al menos uno de los fragmentos por medio de un reactivo de marcado seleccionado entre los compuestos de fórmula (19):

10



15 en la que:

- R¹ representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido, y
- Z comprende un marcador detectable,

20

acoplándose dicho reactivo de manera covalente y mayoritaria en al menos un fosfato de dicho fragmento,

- al menos un soporte sólido que permite la adsorción de dichos ácidos nucleicos,
- cualquier ingrediente necesario para el marcado de los ácidos nucleicos y/o para la inmovilización de dichos ácidos nucleicos en el soporte,
- incubar el contenido del recipiente de reacción, y
- aislar los ácidos nucleicos marcados de este modo.

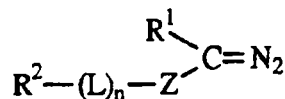
25

30

35

29. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28, **caracterizado** porque el reactivo de marcado se selecciona entre los compuestos de fórmula (20):

40



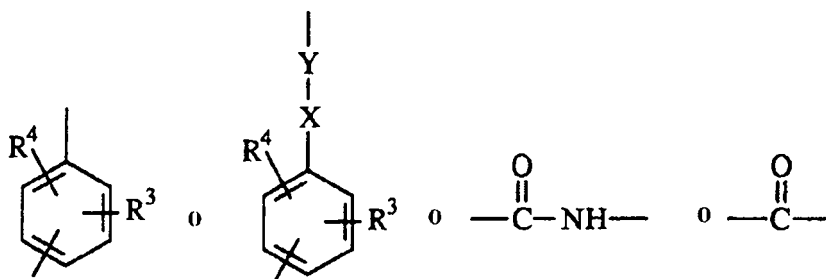
45 en la que:

- R¹ representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R² es un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es igual a 0 ó 1, y
- Z se selecciona entre:

50

55

60

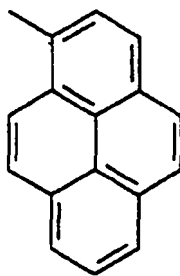


65

en la que:

- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR con R = alquilo o arilo, y
- $-Y-X-$ representa $-\text{CONH}-$, $-\text{NHCO}-$, $\text{CH}_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{S}-$.

30. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 28, **caracterizado** porque Z es:



31. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, **caracterizado** porque la fragmentación y el marcado se realizan en dos etapas.

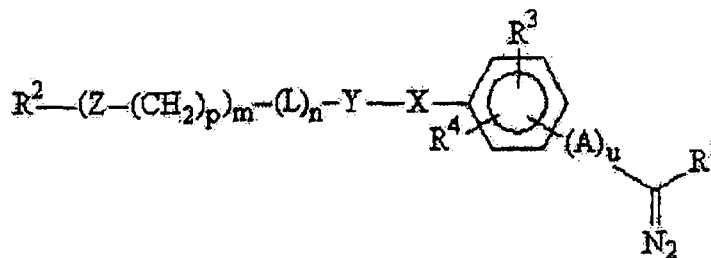
32. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, **caracterizado** porque la fragmentación y el marcado se realizan en una etapa.

33. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, **caracterizado** porque el marcado se realiza en solución homogénea prácticamente acuosa.

34. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, **caracterizado** porque la fragmentación se realiza por vía enzimática, física o química.

35. Procedimiento de marcado y de purificación de ácidos nucleicos de interés presentes en una muestra biológica a tratar, que consiste en:

- disponer de un único recipiente de reacción,
- introducir en el recipiente de reacción:
 - la muestra biológica,
 - al menos un reactivo de marcado de ácidos nucleicos, poniéndose en contacto el reactivo de marcado en solución homogénea, en un tampón prácticamente acuoso, siendo dicho reactivo de marcado estable a la temperatura, y de fórmula (8):



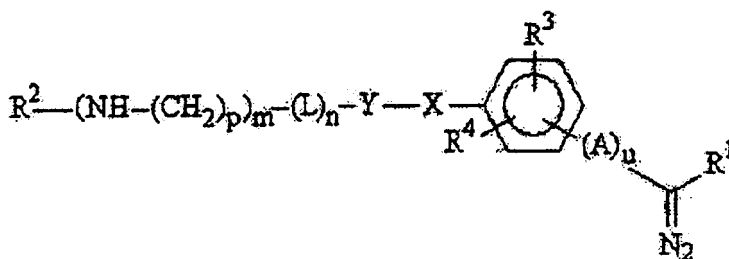
en la que

- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,

ES 2 320 572 T3

- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ con R = alquilo o arilo,
- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es un número entero comprendido entre 0 y 2, preferentemente de 0 ó 1,
- -Y-X- representa -CONH-, -NHCO-, $\text{CH}_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{S}-$,
- -Z- representa -NH-, -NHCO-, -CONH- u -O-,
- m es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3, y
- p es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3,
- al menos un soporte sólido que permite la adsorción de dichos ácidos nucleicos,
- cualquier ingrediente necesario para el marcado de los ácidos nucleicos y/o para la inmovilización de dichos ácidos nucleicos en el soporte,
- incubar el contenido del recipiente de reacción, y
- aislar los ácidos nucleicos marcados de este modo.

36. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 35, en el que el reactivo es de fórmula (9):



en la que:

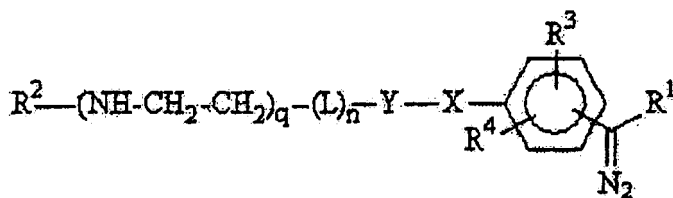
- R^1 representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R^2 representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- R^3 y R^4 representan independientemente uno de otro: H, NO_2 , Cl, Br, F, I, $R^2-(L)_n-Y-X-$, OR, SR, NR_2 , R, NHCOR , CONHR , COOR , $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$, $-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{NH}-R^2$ con R = alquilo o arilo,
- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es un número entero comprendido entre 0 y 2, preferentemente de 0 ó 1,
- -Y-X- representa -CONH-, -NHCO-, $\text{CH}_2\text{O}-$, $\text{CH}_2\text{S}-$,
- m es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3, y
- p es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3.

ES 2 320 572 T3

37. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35 ó 36, **caracterizado** porque en la fórmula del reactivo, p es inferior o igual a m.

5 38. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en el que el reactivo es de fórmula (10):

10



15

en la que:

20

- R¹ representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R² representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- R³ y R⁴ representan independientemente uno de otro: H, NO₂, Cl, Br, F, I, R²-(L)_n-Y-X-, OR, SR, NR₂, R, NHCOR, CONHR, COOR, -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₃-CH₂-NH-R², -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₄-CH₂-NH-R² con R = alquilo o arilo, y
- q es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3.

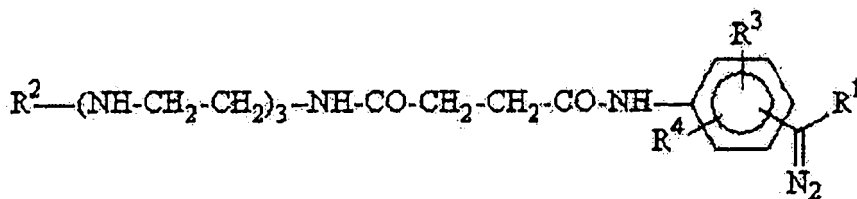
25

30

35

39. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 38, en el que el reactivo es de fórmula (11):

40



45

50 en la que:

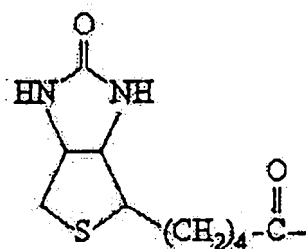
- R¹ representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R² representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1, y
- R³ y R⁴ representan independientemente uno de otro: H, NO₂, Cl, Br, F, I, R²-(L)_n-Y-X-, OR, SR, NR₂, R, NHCOR, CONHR, COOR, -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₃-CH₂-NH-R², -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₄-CH₂-NH-R² con R = alquilo o arilo.

60

65

ES 2 320 572 T3

40. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 39, **caracterizado** porque, en el reactivo, R² está constituido por un resto de D-Biotina de fórmula (12):



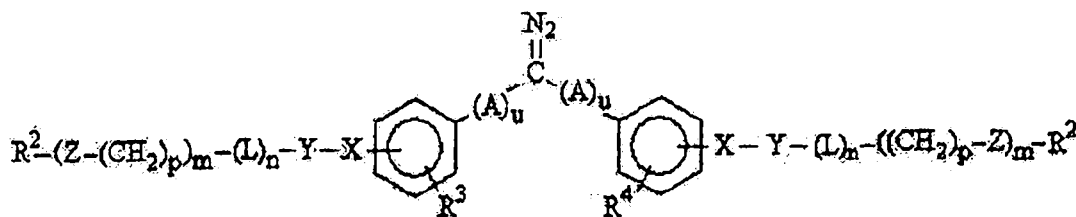
41. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 40, **caracterizado** porque, en el reactivo, R¹ está constituido por: CH₃, y R³ y R⁴ representan cada uno H.

42. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 41, en el cual la estructura -(L)_n- del reactivo está constituida por:

- espermina o N,N-Bis(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano: NH₂-(CH₂)₃-NH-(CH₂)₄-NH-(CH₂)₃-NH₂, o
- espermidina o N-(3-aminopropil)-1,4-butandiamina: H₂N-(CH₂)₄-NH-(CH₂)₃-NH₂, o
- un derivado que contiene un resto de alanina: NH₂-CH₂-CH₂-COOH.

43. Procedimiento de marcado y de purificación de ácidos nucleicos de interés presentes en una muestra biológica a tratar, que consiste en:

- disponer de un único recipiente de reacción,
- introducir en el recipiente de reacción:
 - la muestra biológica,
 - al menos un reactivo de marcado de ácidos nucleicos, el reactivo de marcado estable a la temperatura se pone en contacto en solución homogénea, en un tampón acuoso, y es de fórmula (13):



en la que:

- R¹ representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,
- R² representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,
- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,
- R³ y R⁴ representan independientemente uno de otro: H, NO₂, Cl, Br, F, I, R²-(L)_n-Y-X-, OR, SR, NR₂, R, NHCOR, CONHR, COOR, -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₃-CH₂-NH-R², -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₄-CH₂-NH-R² con R = alquilo o arilo,

ES 2 320 572 T3

- A es un brazo de unión que comprende al menos un doble enlace covalente que permite la conjugación de la función diazo con el anillo aromático y u es un número entero comprendido entre 0 y 2, preferentemente de 0 ó 1,

5

- -Y-X- representa -CONH-, -NHCO-, CH₂O-, CH₂S-,

- -Z- representa -NH-, -NHCO-, -CONH- u -O-,

10

- m es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3, y

- p es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3,

15

- al menos un soporte sólido que permite la adsorción de dichos ácidos nucleicos,

- cualquier ingrediente necesario para el marcado de los ácidos nucleicos y/o para la inmovilización de dichos ácidos nucleicos en el soporte,

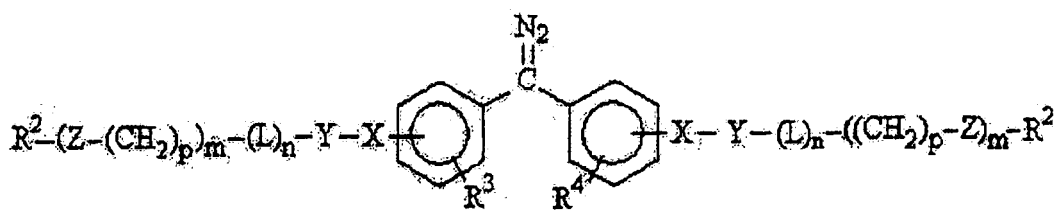
20

- incubar el contenido del recipiente de reacción, y

- aislar los ácidos nucleicos marcados de este modo.

44. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 43, en el que el reactivo es de fórmula (16):

25



30

35

en la que:

- R¹ representa H o un grupo alquilo, arilo o arilo sustituido,

40

- R² representa un marcador detectable o al menos dos marcadores detectables unidos entre sí por al menos una estructura multimérica,

45

- L es un brazo de unión que comprende una cadena lineal de al menos dos enlaces covalentes y n es un número entero igual a 0 ó 1,

- R³ y R⁴ representan independientemente uno de otro: H, NO₂, Cl, Br, F, I, R²-(L)_n-Y-X-, OR, SR, NR₂, R, NHCOR, CONHR, COOR, -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₃-CH₂-NH-R², -CO-NH-(CH₂)₃-(O-CH₂-CH₂)₄-CH₂-NH-R² con R = alquilo o arilo,

50

- -Y-X- representa -CONH-, -NHCO-, CH₂O-, CH₂S-,

- -Z- representa -NH-, -NHCO-, -CONH- u -O-,

55

- m es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3, y

- p es un número entero comprendido entre 1 y 10, preferentemente entre 1 y 3.

60

45. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 35 a 44, **caracterizado** porque el constituyente L del reactivo comprende un resto -(O-CH₂-CH₂)_n, repetido de 1 a 20 veces, preferentemente de 1 a 10 veces y aún más preferentemente de 2 a 5 veces, estando -Z- representado entonces por -NH-, -NHCO- o -CONH-.

65

46. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 45, **caracterizado** porque el soporte sólido está constituido por partículas de sílice.

47. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 46, **caracterizado** porque el soporte sólido está constituido por partículas magnéticas recubiertas de sílice.

ES 2 320 572 T3

48. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 46 ó 47, **caracterizado** porque las partículas de sílice que constituyen el soporte sólido tienen tamaños de partícula comprendidos entre 0,1 y 500 μm y preferentemente entre 1 y 200 μm .
- 5 49. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 48, **caracterizado** porque uno de los ingredientes suplementarios que permiten el marcado está constituido por un alcohol preferentemente isopropanol.
50. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 49, **caracterizado** porque el isopropanol constituye el 70% v/v de la mezcla final.
- 10 51. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 50, **caracterizado** porque uno de los ingredientes suplementarios que permiten la liberación celular y por lo tanto la adsorción de los ácidos nucleicos en el soporte sólido está constituido por un agente caotrópico.
- 15 52. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 51, **caracterizado** porque el agente caotrópico empleado es una sal de guanidio, yoduro sódico, yoduro potásico, (iso)tiocianato sódico, urea o mezclas de estos derivados.
53. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 52, **caracterizado** porque la sal de guanidio es (iso)tiocianato de guanidio.
- 20 54. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, **caracterizado** porque se separan los complejos de fase sólida-ácido nucleico de los líquidos por sedimentación y rechazo del sobrenadante y a continuación lavado de los complejos con un tampón de lavado que contiene una sustancia caotrópica.
- 25 55. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 54, **caracterizado** porque los complejos de fase sólida-ácido nucleico, lavados con el tampón de lavado, se vuelven a lavar a continuación con ayuda de uno o más disolventes orgánicos y a continuación se someten a un secado.
56. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 55, **caracterizado** porque el ácido nucleico presente en los complejos de fase sólida-ácido nucleico, estando los complejos lavados y secados, se eluye por medio de un tampón de elución.
- 30 57. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 53, **caracterizado** porque los complejos de fase sólida-ácido nucleico obtenidos de este modo se ponen en contacto con una mezcla en la que están presentes los componentes para amplificar el ácido nucleico, fijado a dicha fase sólida o eluido de ésta.
- 35 58. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 57, **caracterizado** porque la etapa de incubación consiste en mantener la muestra tratada durante de 5 a 45 minutos, preferentemente durante de 15 a 35 minutos y aún más preferentemente durante 25 minutos a una temperatura comprendida entre 45 y 85°C, preferentemente entre 55 y 75°C y aún más preferentemente a 65°C.
- 40 59. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 58, **caracterizado** porque después de la etapa de incubación, la muestra se lleva a temperatura ambiente durante al menos varios minutos, preferentemente 5 minutos.
- 45 60. Procedimiento de marcado y de purificación, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21, 22, 28, 35 ó 43, **caracterizado** porque los ácidos nucleicos tratados están constituidos por ADN y/o ARN de cadena sencilla y/o de cadena doble, sintéticos y/o naturales.

50

55

60

65