



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 146**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06735404 .3**

96 Fecha de presentación : **17.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1853706**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.11.2007**

54 Título: **Procedimiento para preparar una muestra que incorpora un choque alcalino.**

30 Prioridad: **18.02.2005 US 654199 P**  
**06.04.2005 US 669192 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.04.2011**

73 Titular/es: **GEN-PROBE INCORPORATED**  
**Patent Dept. 10210 Genetic Center Drive**  
**San Diego, California 92121-4362, US**

72 Inventor/es: **Gao, Kui;**  
**Becker, Michael M.;**  
**Wu, Wen y**  
**Linnen, Jeffrey M.**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 357 146 T3

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

## DESCRIPCIÓN

### CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a una tecnología de amplificación de ácido nucleico. Más específicamente, la invención se refiere a un procedimiento de preparación de una muestra de manera preliminar a la realización de una reacción de amplificación de ácido nucleico *in vitro*.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las técnicas de amplificación de ácido nucleico *in vitro* se utilizan actualmente para sintetizar y quizás para detectar pequeñas cantidades evanescentes de una diana ácido nucleica. Estas técnicas utilizan convencionalmente uno o más cebadores oligonucleótidos y una enzima polimerizante del ácido nucleico para sintetizar copias de una o de las dos cadenas de una matriz del ácido nucleico. Antes de llevar a cabo el procedimiento de amplificación, se han utilizado muchos procedimientos distintos para preparar las muestras biológicas.

15 Los ensayos múltiples, que pueden amplificar cualquiera de entre una pluralidad de distintas dianas ácido nucleicas a partir de una muestra de ensayo en una reacción única, presentan retos especiales de diseño. Por ejemplo, las dianas que pueden amplificarse en un ensayo múltiple, pueden ser dianas de ARN, dianas de ADN, o incluso una combinación de dianas ARN y ADN. Una dificultad proviene de que los ácidos nucleicos ARN y ADN muestran distintas estabilidades químicas. Otra dificultad proviene de un deseo habitual de detectar, con una sensibilidad máxima, cualquiera de las variedades de los subtipos relacionados con una especie única de diana. Incluso cuando se utilizan en las reacciones cebadores específicos de subtipos, puede ser difícil alcanzar una  
20 sensibilidad detectora sustancialmente similar para los distintos subtipos de un único tipo de organismo.

De acuerdo con esto, es necesaria una técnica general que pueda potenciar la capacidad de detección de dianas particulares en las reacciones de amplificación ácido nucleicas. Existe una necesidad posterior de potenciar la capacidad de detección de una o más dianas en reacciones múltiples de amplificación, sin sacrificar sustancialmente la capacidad de detección de otras dianas en la misma reacción. La presente invención se refiere a estos requerimientos.  
25

En verdad, la invención que se da a conocer en la presente memoria, proporciona un procedimiento conveniente para preparar muestras biológicas para que puedan ensayarse en cuanto a la presencia de dianas ácido nucleicas, utilizando una amplificación ácido nucleica *in vitro*. Este procedimiento proporciona ventajosamente resultados fiables con distintas muestras biológicas que contienen ácidos nucleicos, mientras se mejora de forma importante la capacidad de detección de dianas que contienen ciertos ácidos nucleicos.  
30

### SUMARIO DE LA INVENCION

Hablando en general, la invención se refiere a un procedimiento para tratar una muestra biológica. Este procedimiento empieza con una etapa que consiste en combinar la muestra biológica con un tampón de pH y un detergente, para dar lugar a una primera composición líquida que presenta un primer pH del orden de 6,5 a 8,0. Para simplificar la etapa combinatoria, es conveniente que el tampón de pH y el detergente se encuentren en forma líquida. A continuación, existe una etapa que consiste en mezclar, con la primera composición líquida, una composición alcalina, que dará lugar a una segunda composición líquida que tendrá un segundo pH en el intervalo de entre 8,0 y 9,2, donde este segundo pH es superior en por lo menos, 0,2 unidades, al primero, debiéndose esto al álcali añadido. Esto es seguido por una etapa de captura de uno o más ácidos nucleicos, a partir de la segunda  
40 composición líquida, en un soporte sólido. Finalmente, existe una etapa de aislamiento del soporte sólido, que captura cualquiera o más ácidos nucleicos. Esto puede, por ejemplo, implicar la aspiración de materiales que no estén unidos (y) que permanecen en la fase líquida, aislando físicamente de esa manera el soporte sólido y cualquiera de los ácidos nucleicos en él capturados.

45 En una forma de realización, el tampón de pH y el detergente que se utiliza en la etapa de combinación, constituyen cada uno componentes de una solución de detergente tamponada, y la etapa de combinación, implica la combinación de la muestra biológica con una alícuota de la solución de detergente tamponada.

Preferentemente, cuando el segundo pH está comprendido entre 8,0 y 9,2, la etapa de captura implica la captura de una o más especies de ARN o la de una o más especies de ADN sobre el soporte sólido. En otra forma de realización preferida, cuando el segundo pH está comprendido entre 8,0 y 9,2, el primer pH se encuentra en el intervalo de 6,5 a 8,0.  
50

En aún otra forma de realización preferida, cuando el segundo pH está comprendido entre 8,0 y 9,2, la etapa de captura puede implicar la hibridación de uno o más ácidos nucleicos de la segunda composición líquida a uno o más oligonucleótidos inmovilizados o inmovilizables complementarios. Más preferentemente, el tampón de pH y el detergente en la etapa de combinación, son componentes cada uno de una solución de detergente tamponada, y la etapa de combinación implica la combinación de la muestra biológica con una alícuota de la solución de detergente tamponada. Todavía más preferentemente, la solución de detergente tamponada que incluye el tampón de pH y el detergente, incluye además los oligonucleótidos inmovilizables o inmovilizados que pueden utilizarse para hibridar y captar los ácidos nucleicos de la segunda composición líquida, procedente de la etapa de la  
55

mezcla.

5 Preferentemente, cuando el primer pH, que hace referencia al pH de la combinación de la muestra biológica, del tampón y del detergente, se encuentra en el intervalo de 6,5 a 8,0, la etapa de captura implica la hibridación de uno o más ácidos nucleicos que van a ser capturados por uno o más oligonucleótidos inmovilizados o inmovilizables complementarios a los mismos. Más preferentemente, el tampón pH y el detergente que se utilizan en la etapa de combinación, constituyen cada uno componentes de una solución de detergente tamponada, y la etapa de combinación implica la combinación de la muestra biológica con una alícuota de la solución de detergente tamponada. Más preferentemente todavía, la solución de detergente tamponada incluye además los oligonucleótidos inmovilizables o inmovilizados que se utilizan para capturar los ácidos nucleicos de la segunda composición líquida. Todavía más preferentemente, la etapa de aislamiento implica la separación del soporte sólido del material que no se ha capturado, lavando entonces el soporte sólido en el que haya quedado capturado algún ácido nucleico. Más preferentemente todavía incluso, la totalidad de las etapas anteriormente descritas se llevan a cabo en un recipiente de reacción único.

15 En otra forma de realización preferida, la etapa de captura implica la hibridación del o de los ácidos nucleicos que van a ser capturados, a uno o a los oligonucleótidos inmovilizados o inmovilizables, que sean complementarios. Cuando es el caso, resulta preferido que el tampón de pH y el detergente que se utilizan en la etapa combinatoria, constituyan cada uno componentes de una solución de detergente tamponada, y que la etapa de combinación implique la de la muestra biológica con una alícuota de la solución de detergente tamponada. Más preferentemente, la solución de detergente tamponada incluye además los oligonucleótidos inmovilizados o inmovilizables que pueden utilizarse para capturar ácidos nucleicos a partir de la segunda composición líquida.

20 En otra forma de realización preferida, el detergente utilizado en la etapa de combinación es un detergente aniónico o un detergente no iónico. Cuando este es el caso, la composición alcalina que se utiliza en la etapa de mezcla, es preferentemente una base fuerte, tal como NaOH o LiOH.

25 En otra forma de realización, la totalidad de las etapas de combinación, mezcla, captura y aislamiento, se llevan a cabo en un recipiente de reacción único. Cuando esto ocurre, la etapa de mezcla implica preferentemente la agitación mediante sacudida orbital o agitación vertical.

En otra forma de realización, el soporte sólido en la etapa de captura incluye una perla, tal como una perla magnética.

30 En otra forma de realización, el pKa del tampón de pH que se utiliza en la etapa combinatoria, está entre 6,0 y 9,0.

En otra forma de realización, por lo menos uno de dichos uno o más ácidos nucleicos capturados en la etapa de captura, es una molécula de ARN.

35 En otra forma de realización, por lo menos uno del o de los ácidos nucleicos capturados en la etapa de captura, es una molécula de ADN. En otra forma de realización preferida, el primer pH se encuentra en el intervalo de entre 6,5 a 8,0, y el segundo pH se encuentra en el intervalo de entre 8,2 a 9,2. Esta relación ha procurado universalmente buenos resultados para el tratamiento tanto de las matrices de ADN como de las del ARN. Así, esta combinación de intervalos es muy preferida para llevar a cabo esta invención.

40 En otra forma de realización preferida, el procedimiento comprende la etapa que consiste en llevar a cabo una reacción de amplificación *in vitro* del ácido nucleico, utilizando como matriz por lo menos uno de los ácidos nucleicos capturados en el soporte sólido y que se aísla en la etapa de aislamiento.

45 Cuando el primer pH se encuentra en el intervalo de entre 6,5 a 8,0, resulta muy deseable que el segundo pH se encuentre en el intervalo de entre 8,2 a 9,2. En verdad, este conjunto de intervalos ha proporcionado siempre buenos resultados para el tratamiento tanto de las matrices del ADN como las del ARN. De este modo, esta combinación de intervalos es muy preferida para llevar a cabo la invención.

50 En otra forma de realización preferida, la reacción de amplificación *in vitro* del ácido nucleico constituye una reacción múltiple que puede amplificar más de una secuencia ácido nucleica. Cuando esto se produce, el o los ácidos nucleicos capturados en la etapa de captura, incluyen dos o más ácidos nucleicos capturados; el o los ácidos nucleicos aislados en la etapa de aislamiento, incluyen dos o más ácidos nucleicos aislados; y la reacción múltiple utiliza como matrices dos de los ácidos nucleicos capturados y aislados. Verdaderamente, resulta muy preferido que los dos ácidos nucleicos que se utilizan como matrices en la reacción múltiple, incluyan una molécula de ARN y una molécula de ADN.

55 En otra forma de realización preferida, la totalidad de las etapas de combinación, mezcla, captura, aislamiento y realización de la reacción amplificadora del ácido nucleico, se llevan a cabo en un recipiente de reacción único. Cuando esto tiene lugar, resulta preferido que la etapa de mezcla implique agitación mediante sacudida orbital o agitación vorticial.

**DEFINICIONES**

Los términos siguientes presentan los significados siguientes con respecto al objetivo de la presente exposición, si no se expresa lo contrario en la presente memoria.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, "choque alcalino" se refiere a un pH transitorio alto producido por la combinación, en primer lugar, de una muestra biológica con un tampón de pH y un detergente, lo que da lugar a una primera composición, y la mezcla entonces de esta primera composición con una cantidad de una composición alcalina, suficiente para aumentar el pH de la mezcla resultante. En la presente memoria se describen los intervalos de inicio útiles para el pH de la primera composición, y los intervalos finales útiles para el pH de la mezcla subsiguiente a la adición de la composición alcalina.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, "muestra biológica" es cualquier tejido o material que contiene polinucleótidos, que se obtiene de una muestra humana, animal o ambiental. Las muestras biológicas de acuerdo con la invención incluyen sangre periférica, plasma, suero u otro fluido corporal, médula ósea u otro órgano, tejidos biópsicos u otros materiales de origen biológico. Una muestra biológica puede ser tratada para romper el tejido o la estructura celular, que libera, por lo tanto, componentes intracelulares en una solución que puede contener enzimas, tampones, sales, detergentes y similares.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, "polinucleótido" significa ARN o ADN, junto con cualquier análogo nucleótido sintético u otras moléculas que puedan encontrarse en la secuencia y que no evitan la hibridación del polinucleótido con una segunda molécula que posee una secuencia complementaria.

20 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "marcador detectable" es una especie química que puede detectarse o puede conducir a una respuesta capaz de ser detectada. Los marcadores detectables de acuerdo con la invención pueden relacionarse directa o indirectamente con sondas polinucleótidas, e incluyen radioisótopos, enzimas, haptenos, cromóforos tales como colorantes o partículas que produzcan color detectable (por ejemplo, perlas de látex o partículas metálicas), compuestos luminiscentes (por ejemplo, partes bioluminiscentes, fosforescentes o quimioluminiscentes) y compuestos fluorescentes.

25 Un "marcador detectable homogéneo" se refiere a un marcador que puede detectarse de forma homogénea, determinando si se encuentra en una sonda que está hibridada a una secuencia diana. Es decir, los marcadores detectables homogéneos pueden detectarse sin eliminar físicamente las formas hibridadas de las no hibridadas del marcador o de la sonda marcada. Resultan preferidos los marcadores detectables homogéneos cuando se utilizan sondas marcadas para detectar ácidos nucleicos amplificados. Se han descrito con detalle los ejemplos de marcadores homogéneos por Arnold *et al.*, patente US nº 5.283.174; Woodhead *et al.*, patente US nº 5.656.207; y Nelson *et al.*, patente US nº 5.658.737. Los marcadores preferidos para la utilización en ensayos homogéneos incluyen compuestos quimioluminiscentes (por ejemplo, véase Woodhead *et al.*, patente US nº 5.656.207; Nelson *et al.*, patente US nº 5.658.737; y Arnold, Jr., *et al.*, patente US nº 5.639.604). Los marcadores quimioluminiscentes preferidos son los compuestos de éster de acridinio ("AE"), tales como el AE estándar o sus derivados (por ejemplo, naftil-AE, orto-AE, 1- o 3-metil-AE, 2,7-dimetil-AE, 4,5-di-metil-AE, orto-dibromo-AE, orto-dimetil-AE, meta-dimetil-AE, orto-metoxi-AE, orto-metoxi(cinnamilo)-AE, orto-metil-AE, orto-fluoro-AE, 1- o 3-metil-orto-fluoro-AE, 1- o 3-metil-meta-difluoro-AE, y 2-metil-AE).

30 Un "ensayo homogéneo" se refiere a un procedimiento de detección que no requiere separación física de la sonda hibridada de la sonda no-hibridada, antes de determinar el alcance de la hibridación específica de dicha sonda. Los ejemplos de ensayos homogéneos tal como los que se describen en la presente memoria, pueden utilizar balizas moleculares u otras sondas "autoinformantes" que emiten señales fluorescentes cuando están hibridadas a una diana apropiada, marcadores quimioluminiscentes de éster de acridinio que pueden destruirse selectivamente mediante medios químicos a no ser que se encuentren en un dúplex híbrido, y otros marcadores homogéneamente detectables que serán conocidos para los expertos ordinarios en la materia.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, "amplificación ácido nucleica", o simplemente, "amplificación", se refiere a un procedimiento *in vitro* para obtener copias múltiples de una secuencia ácida nucleica diana, o de sus fragmentos, o de su complemento.

40 Mediante "ácido nucleico diana" o "diana" se hace referencia a un ácido nucleico que contiene una secuencia diana ácido nucleica. En general, una secuencia diana ácido nucleica que va a amplificarse, se dispondrá entre dos oligonucleótidos de amplificación que se sitúan opuestamente, e incluirá la porción del ácido nucleico diana que es completamente complementaria a cada uno de los oligonucleótidos de amplificación.

45 Mediante "secuencia diana ácido nucleica" o "secuencia diana" o "región diana" se hace referencia a una secuencia desoxirribonucleótida o ribonucleótida específica, que comprende la totalidad o parte de la secuencia nucleótida de una molécula ácido nucleica monocatenaria, y su secuencia desoxirribonucleótida o ribonucleótida complementaria.

50 Mediante "amplificación asociada a la transcripción", se hace referencia a cualquier tipo de amplificación ácido nucleica que utilice una ARN polimerasa para producir transcritos múltiples de ARN a partir de una matriz ácido nucleica. Un ejemplo de un procedimiento de amplificación asociado a una transcripción, denominado "Amplificación mediada por la transcripción" (TMA), utiliza generalmente una ARN polimerasa, un ADN polimerasa,

desoxirribonucleósidos trifosfato, ribonucleósidos trifosfato, y un oligonucleótido complementario a un promotor-matriz, pudiendo incluir opcionalmente uno o más oligonucleótidos análogos. Bien conocidas en la técnica son las variaciones de la TMA, que se dan a conocer detalladamente en Burg *et al.*, patente US nº 5.437.990; Kacian *et al.*, patentes US nº 5.399.491 y nº 5.554.516; Kacian *et al.*, documento PCT nº WO 93/22461; Gingeras *et al.*, documento PCT nº WO 88/01302; Gingeras *et al.*, documento PCT nº WO 88/10315; Malek *et al.*, patente US nº 5.130.238; Urdea *et al.*, patente US nº 4.868.105 y nº 5.124.246; McDonough *et al.*, documento PCT nº WO 94/03472; y Ryder *et al.*, documento PCT nº WO 95/03430. Los métodos de Kacian *et al.* resultan preferidos para llevar a cabo los procedimientos de amplificación del tipo que se dan a conocer en la presente memoria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "oligonucleótido" u "oligómero" es una cadena polimérica de, por lo menos, dos, y generalmente, de entre cinco y aproximadamente 100 subunidades químicas, comprendiendo cada subunidad una fracción de bases nucleótidas, una fracción azucarada, y una fracción que une las subunidades en una configuración espacial lineal. Las fracciones habituales de bases nucleótidas son guanina (G), adenina (A), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), aunque otras bases nucleótidas modificadas o raras que pueden unirse al hidrógeno, son bien conocidas por los expertos en la materia. Los oligonucleótidos pueden opcionalmente incluir análogos de cualquiera de las fracciones azucaradas, de las fracciones de bases, y de los constituyentes de esqueleto. Los oligonucleótidos de la presente invención son de un tamaño en el intervalo de aproximadamente 10 a 100 residuos. Los oligonucleótidos pueden purificarse a partir de las fuentes en las que se encuentran de forma natural, pero preferentemente se sintetizan utilizando cualesquiera de entre un conjunto de procedimientos químicos o enzimáticos bien conocidos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "sonda" es un oligonucleótido que se hibridiza específicamente a una secuencia diana en un ácido nucleico, preferentemente en un ácido nucleico amplificado, bajo condiciones que promuevan la hibridación, para formar un híbrido detectable. Una sonda puede contener opcionalmente una fracción detectable que puede estar unida al extremo (o extremos) de la sonda, o puede ser interna. Los nucleótidos de la sonda que se combina con el polinucleótido diana no deben ser estrictamente contiguos, como puede ocurrir con una fracción detectable interna con respecto a la secuencia de la sonda. La detección puede ser directa (esto es, que proceda de una sonda que se hibride directamente a la secuencia diana o a un ácido nucleico amplificado), o indirecta, (es decir, que proceda de una sonda que se hibride a una estructura molecular intermedia que una la sonda a la secuencia diana o al ácido nucleico amplificado). La "diana" de una sonda se refiere generalmente a una secuencia que está contenida en el interior de una secuencia ácido nucleica amplificada que se hibridiza específicamente a, por lo menos, una parte de una sonda oligonucleótida, utilizando enlaces estándares de hidrógeno (por ejemplo, el emparejamiento de las bases). Una sonda puede incluir secuencias específicas de diana y opcionalmente, otras secuencias que no sean complementarias para la secuencia diana que va a detectarse. Estas secuencias no complementarias pueden comprender una secuencia promotora, un sitio de reconocimiento de una endonucleasa de restricción, o secuencias que contribuyan a la conformación tridimensional de la sonda (por ejemplo, tal como se describe en Lizardi *et al.*, patentes US nº 5.118.801 y nº 5.312.728). Las secuencias que son "suficientemente complementarias" permiten la hibridación estable de un oligonucleótido sonda a una secuencia diana que no sea "suficientemente complementaria" con respecto a la secuencia diano-específica de la sonda.

Mediante "oligonucleótido de amplificación" se hace referencia a un oligonucleótido que puede participar en una reacción de amplificación de un ácido nucleico, para llevar a cabo la síntesis de múltiples copias de una secuencia ácido nucleica matriz, o de su complemento. Es habitual para las reacciones de amplificación, utilizar por lo menos, dos oligonucleótidos de amplificación, con, por lo menos, uno de los oligonucleótidos amplificadores que actúa como un cebador de la amplificación.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "cebador de amplificación", o más simplemente "cebador", es un oligonucleótido que se hibridiza a un ácido nucleico diana, o su complemento, y que puede ampliarse a una reacción (dependiente de la matriz), de alargamiento del cebador. Por ejemplo, los cebadores de amplificación pueden ser oligonucleótidos modificados opcionalmente que pueden hibridarse a un ácido nucleico matriz, y que presentan un extremo 3' y que pueden ampliarse mediante una actividad ADN polimerásica. En general, un cebador tendrá una secuencia complementaria de diana en dirección 3', y opcionalmente una secuencia en dirección 5' que no sea complementaria para los ácidos nucleicos diana. La secuencia opcional en dirección 5' puede, por ejemplo, servir como un promotor ARN polimerásico o contener sitios endonucleásicos de restricción de fragmentación.

Mediante "sustancialmente homólogo", "que corresponde sustancialmente a", o "corresponde sustancialmente", se hace referencia a que el oligonucleótido objeto presenta una secuencia de bases que contiene por lo menos una región de 10 bases contiguas que es, por lo menos, homóloga en un 70%, preferentemente homóloga, por lo menos, en un 80%, más preferentemente homóloga, por lo menos, en un 90%, y muy preferentemente homóloga en un 100%, a una región de, por lo menos, 10 bases contiguas que se encuentra en una secuencia básica de referencia (excluyendo los equivalentes de ARN y ADN). Los expertos en la materia, con el fin de permitir la hibridación del oligonucleótido a la secuencia diana, apreciarán fácilmente modificaciones en los diversos porcentajes de homología que puedan ser debidas a las condiciones del ensayo de hibridación, evitando de este modo niveles inaceptables de hibridación no específica. El grado de similitud se determina comparando el orden de bases nucleótidas, considerando las dos secuencias y sin considerar otras diferencias estructurales que puedan existir entre ellas, siempre que las diferencias estructurales no eviten los enlaces de hidrógeno con las bases complementarias. El grado de homología entre dos secuencias puede también expresarse en términos del

número de emparejamientos incorrectos entre las bases que se encuentran en cada conjunto de por lo menos 10 bases contiguas que se comparen, que puede estar comprendido entre 0 y 2 diferencias entre bases.

Mediante "sustancialmente complementario" se hace referencia a que el oligonucleótido objeto posee una secuencia de bases que contiene una región de, por lo menos, 10 bases contiguas que es por lo menos, complementaria en un 70%, preferentemente complementaria, por lo menos, en un 80%, más preferentemente complementaria, por lo menos, en un 90%, y muy preferentemente complementaria, en un 100%, a una región de, por lo menos, 10 bases contiguas, que se encuentra en una secuencia ácido nucleica diana (excluyendo los equivalentes de ARN y ADN). (Los expertos en la materia, con objeto de permitir la hibridación del oligonucleótido a la secuencia diana, apreciarán fácilmente modificaciones en los diversos porcentajes de complementariedad, que puedan ser debidas a las condiciones del ensayo de hibridación, evitando de este modo niveles inaceptables de hibridación no específica). El grado de complementariedad se determina comparando el orden de bases nucleótidas, teniendo en cuenta las dos secuencias y no toma en consideración otras diferencias estructurales que puedan existir entre ellas, siempre que las diferencias estructurales no eviten los enlaces de hidrógeno con las bases complementarias. El grado de complementariedad entre dos secuencias puede también expresarse en términos del número de emparejamientos incorrectos entre las bases que se encuentran en cada conjunto de por lo menos 10 bases contiguas que se comparen, que puede estar comprendido entre 0 y 2 diferencias entre bases.

Mediante "suficientemente complementario" se hace referencia a una secuencia ácido nucleica contigua de bases que puede hibridarse a otra secuencia de bases mediante enlaces de hidrógeno entre una serie de bases complementarias. Las secuencias de bases complementarias pueden ser complementarias en cada posición en la secuencia de bases de un oligonucleótido utilizando el emparejamiento de bases estándar (por ejemplo, el emparejamiento G:C, A:T o A:U), o pueden contener uno o más residuos que no son complementarios utilizando enlaces estándares de hidrógeno (que incluyen "nucleótidos" no básicos), pero en los que la secuencia completa de bases complementarias puede hibridarse específicamente con otra secuencia de bases bajo condiciones de hibridación apropiadas. Las bases contiguas son preferentemente de por lo menos aproximadamente 80%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, y muy preferentemente complementarias en un 100% aproximadamente a una secuencia a la cual un oligonucleótido debe hibridarse específicamente. Las condiciones apropiadas de hibridación son bien conocidas por los expertos en la materia, y pueden predecirse fácilmente basándose en la composición de la secuencia de bases, o pueden determinarse empíricamente utilizando el ensayo rutinario (por ejemplo, véase Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) en § 1.90-1.91, 7.37-7.57, 9.47-9.51 y 11.47-11.57, particularmente § 9.50-9.51, 11.12-11.13, 11.45-11.47 y 11.55-11.57).

Mediante "oligonucleótido de captura" se hace referencia a por lo menos un oligonucleótido ácido nucleico que proporcione unos medios para unirse específicamente a una secuencia diana y a un oligonucleótido inmovilizado debido a la hibridación de los pares de bases. Un oligonucleótido de captura incluye preferentemente dos regiones de unión: una región que se une a la secuencia diana y una región que se une a una sonda inmovilizada, contigua habitualmente en el mismo oligonucleótido, aunque el oligonucleótido de captura puede incluir una región que se une a la secuencia diana y una región que se une a una sonda inmovilizada que se encuentren en dos oligonucleótidos distintos unidos conjuntamente mediante uno o más engarces. Por ejemplo, una región que se une a una sonda inmovilizada puede encontrarse en un primer oligonucleótido, y la región de unión a la secuencia diana puede encontrarse en un segundo oligonucleótido, uniéndose los dos distintos oligonucleótidos mediante enlaces de hidrógeno con un engarce que es un tercer oligonucleótido que contiene secuencias que se hibridan específicamente a las secuencias de los primer y segundo oligonucleótidos.

Mediante "oligonucleótido inmovilizado" o "ácido nucleico inmovilizado", y sus variantes, se hace referencia a un ácido nucleico que une directa o indirectamente un oligonucleótido de captura a un soporte inmovilizado. Una sonda inmovilizada es un oligonucleótido que se une a un soporte sólido que facilita, en una muestra, la separación del material no unido, de la secuencia diana unida. Un nucleótido "inmovilizable" es un oligonucleótido que, mediante interacciones de las bases complementarias con un oligonucleótido inmovilizado directamente en un soporte sólido, puede inmovilizarse en este soporte sólido.

Mediante "separación" o "purificación" se hace referencia a que uno o más componentes de la muestra biológica se separan de uno o de otros varios componentes de la misma. Los componentes de la muestra incluyen ácidos nucleicos en una fase de una solución generalmente acuosa que puede incluir también materiales tales como proteínas, hidratos de carbono, lípidos y sondas marcadas. Preferentemente, la etapa de separación o purificación elimina por lo menos aproximadamente 70%, más preferentemente aproximadamente 90%, e, incluso, más preferentemente, por lo menos aproximadamente 95%, de otros componentes que se encuentran en la muestra.

Mediante "equivalentes de ARN y ADN" o "bases equivalentes de ARN y ADN", se hace referencia a moléculas tales como ARN y ADN, que poseen las mismas propiedades de hibridación de los pares de bases complementarias. Los equivalentes de ARN y ADN poseen distintas fracciones azucaradas (es decir, ribosa con respecto a desoxirribosa) y pueden diferir por la presencia de uracilo en el ARN y de timina en el ADN. Las diferencias entre los equivalentes de ARN y ADN no contribuyen a diferencias en la homología, a causa de que los equivalentes tienen el mismo grado de complementariedad con respecto a una secuencia particular.

"Constituido esencialmente por" hace referencia a que el componente o componentes, composición o

composiciones o etapa u etapas de procedimiento, adicionales, que no cambian materialmente las características nuevas y básicas de la presente invención, pueden incluirse en las composiciones, kits o procedimientos de la presente invención. Dichas características incluyen la capacidad para detectar selectivamente ácidos nucleicos diana en las muestras biológicas tales como la sangre entera o el plasma. Cualesquier componente o componentes, composición o composiciones, o etapa o etapas de procedimiento, que presenten un efecto material sobre las características nuevas y básicas de la presente invención, deberán excluirse de este término.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La figura 1 es un diagrama esquemático que representa los diversos polinucleótidos que pueden utilizarse para detectar una región diana en el interior de un ácido diana modelo (representado por una línea horizontal gruesa). Se representan, con respecto a la región diana, las posiciones de los ácidos siguientes: "Oligonucleótido de captura" se refiere al ácido nucleico que se utiliza para hibridizar y capturar el ácido nucleico diana antes de la amplificación, en el que "T" se refiere a una secuencia de cola que se utiliza para hibridizar un oligonucleótido inmovilizado que posee una secuencia complementaria (no representada); "Cebador No-T7" e "Cebador-Promotor T7" representan dos cebadores de amplificación que se utilizan para llevar a cabo TMA, en el que "P" indica la secuencia promotora del cebador-promotor T7; y "Sonda" se refiere a la sonda utilizada para detectar el ácido nucleico amplificado.

Las figuras 2A-2C constituyen una serie de gráficos de barras que muestran resultados de ensayos llevados a cabo utilizando distintas concentraciones de una solución de NaOH. La figura 2A presenta los resultados medidos como porcentaje de positividad como función de la concentración de NaOH utilizado en la etapa de choque alcalino. La figura 2B presenta los resultados medidos como porcentaje de CV (coeficiente de variabilidad) como función de la concentración del NaOH utilizado en la etapa de choque alcalino. La figura 2C presenta los resultados medidos como RLU Media, como función de la concentración de NaOH utilizado en la etapa de choque alcalino.

Las figuras 3A-3C constituyen una serie de gráficos de barras que muestran los resultados medidos como porcentaje Reactivo para distintos niveles de la entrada del virus HBV. La figura 3A representa los resultados para el subtipo B de HBV. La figura 3B muestra resultados para el subtipo C de HBV. La figura 3C muestra resultados para el subtipo A de HBV. Los ensayos de control son representados mediante barras vacías. Los resultados de los ensayos que recibieron un choque alcalino son representados mediante barras rellenas.

Las figuras 4A-4C constituyen una serie de gráficos de barras que representan los resultados medidos como porcentaje Reactivo para distintos niveles de la entrada de los virus ARN. La figura 4A representa los resultados para el virus HCV-1a. La figura 4B muestra resultados para el virus HCV-2b. La figura 4C representado los resultados para el virus HIV-1b. Los ensayos de control se indican mediante barras vacías. Los resultados de los ensayos que reciben un choque alcalino se indican mediante barras rellenas.

La figura 5 representa una serie de gráficos de barras que muestran un porcentaje de positividad determinado en reacciones de amplificación que utilizan ácidos nucleicos matriciales aislados a partir de distintas cantidades de bacterias GBS. Los ensayos que utilizan matrices ácido nucleicas tratadas sin un choque alcalino, se indican mediante barras vacías. Los ensayos que utilizan matrices ácido nucleicas tratadas con un choque alcalino, se representan mediante barras rellenas.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

En la presente memoria se da a conocer un procedimiento para preparar una muestra biológica que contiene un ácido nucleico. El procedimiento puede utilizarse para preparar matrices, tanto de ADN como de ARN a partir de orígenes víricos, bacterianos o eucarióticos, y pueden utilizarse para potenciar la sensibilidad de las reacciones de amplificación que se llevan a cabo utilizando los ácidos nucleicos preparados como matrices. Sorprendentemente, todas estas ventajas pueden obtenerse sin volver a diseñar ninguno de los oligonucleótidos utilizados en las etapas de captura de dianas, amplificación o detección, de un procedimiento de detección de un ácido nucleico.

Generalmente hablando, el objeto de la invención se refiere al inesperado descubrimiento de que la adición de una solución alcalina a una solución tamponada de detergente que contiene una muestra biológica, tal que el pH después de la mezcla está comprendido en un intervalo específico, proporciona ciertas ventajas cuando la muestra procesada a continuación sirve como una fuente de matrices en una reacción de amplificación de un ácido nucleico. Preferentemente, el procedimiento de la invención de tratamiento de la muestra, implica un componente de captura de dianas en el que las condiciones después de la adición del álcali son compatibles con la formación de híbridos polinucleótidos que incluyen un oligonucleótido de captura inmovilizado, y un polinucleótido liberado a partir de la muestra biológica. Tal como se indica por la evidencia que se presenta a continuación, las ventajas de la invención no se obtienen cuando las soluciones de álcali y de detergente tamponada se combinan en primer lugar, y se añaden entonces a la muestra biológica.

Una observación que promovió el desarrollo de la invención, se relacionó con la capacidad diferencial del ensayo de amplificación para detectar los distintos subtipos de HBV. Más específicamente, se descubrió que un ensayo múltiple que puede amplificar y detectar cualesquiera dianas de los ácidos nucleicos HIV-1, HCV y HBV, exhibía ampliamente distintas sensibilidades para los distintos subtipos de HBV. Tal como se indica a continuación, el ensayo dio lugar a sensibilidades aproximadamente equivalentes para los subtipos -A y -C, pero para el subtipo -

B, una sensibilidad estaba reducida aproximadamente 16 veces. Esto se produjo a pesar del hecho de que los tres subtipos de HBV compartían una relación filogenética próxima, y a pesar del hecho de que un conjunto común de cebadores y sondas puede utilizarse en el procedimiento de ensayo. A causa de que resultaba deseable detectar la totalidad de los distintos subtipos con gran sensibilidad, fue interesante potenciar la sensibilidad del ensayo para la detección de un subtipo vírico sin comprometer sustancialmente la detección de los otros subtipos.

La potenciación de la sensibilidad de la detección del subtipo -B de HBV, se podría haber llevado a cabo, de forma concebible, mediante cualquiera de distintos enfoques. Por ejemplo, el rediseño de los componentes oligonucleótidos que se utilizaron en el ensayo, podría haber conducido a mejoras. Sin embargo, incluso si esto se hubiera podido llevar a buen puerto, la solución hubiera sólo sido específica para el ensayo rediseñado. Una solución más deseable proporcionaría un medio general para mejorar la detectabilidad del subtipo -B de HBV, y quizás también la realización de otros ensayos. Por lo tanto, constituye un objeto de la invención relacionado con un procedimiento para potenciar la detectabilidad de, por lo menos, una diana, un ensayo múltiple.

#### Tampones preferidos e intervalos de pH

Los tampones que son útiles para llevar a cabo el procedimiento de la invención de la preparación de una muestra, (preparación que se basa) en un choque alcalino, tienen preferentemente valores pKa en el intervalo de entre 6,0 a 9,0 aproximadamente. Un tampón de ejemplo que se utiliza para demostrar la utilidad de la invención es HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-Etano Sulfónico), que tiene un pKa de 7,55 a 20°C, y que posee su capacidad tamponadora más intensa en el intervalo de pH de entre 6,8 a 8,2. Por supuesto, el éxito de esta técnica no está limitado por la utilización de cualquier tampón en particular.

Según un procedimiento preferido para llevar a cabo la invención, se combina en primer lugar una muestra biológica con un tampón de pH y un detergente, para dar lugar a una primera composición, que se combina entonces con una alícuota de una solución concentrada de hidróxido, para efectuar el choque alcalino. El tampón y el detergente pueden combinarse convenientemente entre sí, de modo que una alícuota única de una solución tamponada de detergente pueda dispensarse en una etapa de adición del reactivo. Resulta preferido que la solución tamponada de detergente contenga adicionalmente uno o varios oligonucleótidos inmovilizables o inmovilizados opcionales, con el fin de reducir posteriormente la complejidad de las etapas de adición reactiva, adaptando particularmente, por tanto, el procedimiento a la automatización, utilizando pipetas robotizadas. Cuando el procedimiento de preparación de la muestra de choque alcalino se lleva a cabo combinando una alícuota de un líquido, o una muestra biológica licuada con una composición reactiva única que contiene el tampón, el detergente, y el oligonucleótido de captura y un soporte sólido (es decir, un lecho), para llevar a cabo la captura, la composición reactiva se denomina "reactivo de lisis/captura". Se han obtenido resultados excelentes utilizando reactivos lisis/captura que poseen concentraciones de tampón en el intervalo de entre 200 mM a 800 mM aproximadamente, lo que, después de combinar el reactivo lisis/captura con una muestra biológica, dio lugar a concentraciones finales del tampón en el intervalo de 90 mM a 355 mM aproximadamente. Por supuesto, cambios de la fuerza del tampón requieren que la cantidad del hidróxido alcalino que se añade se ajuste para llevar el pH final de la mezcla a uno de los intervalos especificados en la presente memoria. De este modo, el éxito de la técnica no está limitado por las cantidades o concentraciones del tampón en la mezcla antes de la adición de la solución alcalina que produce el choque alcalino.

El intervalo de pH de inicio para la combinación de una solución tamponada de detergente, mezclada con una muestra biológica antes de la adición del álcali, para producir el choque alcalino, se encuentra en el intervalo de pH 6,5 a 8,0, todavía más preferido en el intervalo de pH 7,0 a 8,0, todavía más preferentemente en el intervalo pH 7,0 a 7,5. Los ensayos que se llevaron a cabo utilizando soluciones tamponadas de detergente, con un pH inicial de 7,0, 7,5 u 8,0, proporcionaron en su totalidad buenos resultados cuando se prepararon las matrices ácido nucleicas según el protocolo del choque alcalino, y amplificando y detectando entonces estas matrices. Estos resultados fueron compatibles con intervalos útiles para el pH inicial de una primera composición, que incluyó la muestra biológica que experimentó el tratamiento, el tampón de pH, y el detergente previo a la adición de la composición alcalina. Se concluyó especialmente que, a causa de que este ensayo se llevó a cabo utilizando un control interno del ARN co-amplificable, y debido a que todos los ensayos dieron lugar a resultados válidos, el ARN era estable en este intervalo de condiciones del pH inicial. Para simplificar la descripción de la invención, los ejemplos que se presentan a continuación utilizaron todos una combinación muestra biológica/tampón/detergente con un pH inicial de aproximadamente 7,5, antes de la adición de un hidróxido alcalino. Tal como se ha mencionado anteriormente, el éxito de la muestra de la técnica de tratamiento del choque alcalino puede alcanzarse en un amplio intervalo de pH inicial.

#### Procedimientos de tratamiento - Condiciones alcalinas y del detergente

Una primera composición que incluye una muestra biológica, un tampón de pH y un detergente, se combina con una segunda composición que incluye una composición alcalina. La combinación se mezcla y se deja incubar preferentemente con una sonda inmovilizada de captura, y quizás también con una sonda soluble de captura, que puede formar un puente entre una sonda inmovilizada y un ácido nucleico diana de interés. Tal como el procedimiento se lleva a cabo típicamente, se añade un hidróxido alcalino a un tubo de ensayo o a otro recipiente de reacción que ya contiene la primera composición. En una forma de realización muy preferida, la primera composición incluye también o se combina, con la sonda soluble de captura y la sonda inmovilizada de captura, antes de añadir el hidróxido alcalino.

Las sustancias que pueden utilizarse como composición alcalina, para llevar a cabo el choque alcalino, pueden ser cualquier agente sólido, líquido o gaseoso que cree una intensa solución alcalina cuando se disuelva en una solución acuosa. Las bases fuertes constituyen composiciones alcalinas preferidas (a las que se hará referencia en adelante generalmente como "hidróxidos alcalinos"), útiles en el contexto de la presente invención.

5 Los ejemplos de hidróxidos alcalinos preferidos que pueden utilizarse para llevar a cabo el procedimiento de preparación de la muestra de la invención incluyen hidróxido sódico, hidróxido de litio, hidróxido potásico, y similares. Aunque se considera que las composiciones alcalinas sólidas pueden combinarse con la primera composición, que incluye la solución tamponada de detergente y de la muestra biológica (como podría alcanzarse añadiendo la primera composición a un tubo de ensayo que ya contuviera una cantidad medida del reactivo hidróxido alcalino seco), resulta preferido utilizar composiciones alcalinas en forma de solución.

10 Para conseguir los beneficios de la invención, la cantidad de composición alcalina que se añade a la composición que incluye la muestra biológica, el tampón de pH y la (solución) detergente, es crítica, y puede fácilmente juzgarse por el pH final de la mezcla completa. La cantidad de hidróxido alcalino que se añada, deberá ser suficiente para aumentar el pH de la mezcla resultante en, por lo menos 0,2 unidades de pH, pero no tanto como para aumentar el pH por encima de 9,2, preferentemente no por encima de 9,0, más preferentemente no por encima de 8,8. Los resultados de los ensayos confirman que las cantidades útiles del hidróxido alcalino añadido son las cantidades que provocan que el pH final de la mezcla esté comprendido en un intervalo específico. El intervalo del pH final es de entre 8,0 a 9,2, más preferentemente de entre 8,2 a 9,2, y aún más preferentemente de entre 8,2 a 8,8. Tal como se menciona a continuación, se alcanzaron resultados uniformemente buenos cuando el pH final de la mezcla después del choque alcalino se encontró en el intervalo de 8,2 a 9,2. Esto resultó cierto para las matrices tanto de ADN como del ARN. Cuando la cantidad del hidróxido alcalino añadido provocó que la mezcla excediera de un pH final de 9,5, los resultados que se obtuvieron no fueron buenos.

#### Detergentes preferidos

25 Los detergentes que pueden utilizarse en el contexto de la invención, pueden ser detergentes aniónicos, detergentes no iónicos, detergentes iónicos dipolares, o detergentes catiónicos. De estos, los detergentes aniónicos y no iónicos, son los más preferidos. La concentración del detergente en el reactivo de lisis/captura está preferentemente comprendida entre 0,01 y 15 % en peso, estando la concentración particularmente preferida comprendida entre 0,05 y 10%. Basándose en la utilización demostrada de 400 µl de reactivo de lisis/captura y de 500 µl de la muestra biológica, la concentración final del detergente en la composición de la mezcla que incluye tampón, detergente y muestra biológica, está preferentemente comprendida entre el 0,01% y 6,7% en peso, aproximadamente. Los detergentes aniónicos fuertes, que incluyen sulfatos de alcoholes alquílicos y N-acil-aminoácidos, resultan muy preferidos. Aunque no se cree que sea crítica la naturaleza precisa del detergente utilizado para llevar a cabo el procedimiento de preparación de la muestra, basado en el choque alcalino, ejemplos de detergentes particularmente preferidos incluyen el sulfato lauril de litio (LLS), y el sulfato dodecil sódico (SDS).

#### Período de tratamiento

35 En una forma de realización preferida, una alícuota de la solución hidróxido alcalina se combina en una recipiente de reacción con una composición que incluye una muestra biológica, un tampón, un detergente, y, si se va a llevar a cabo la captura de una diana de secuencia específica, uno o varios oligonucleótidos inmovilizables de captura. Después de un tiempo de entre un segundo y aproximadamente una hora, se agitan los contenidos para asegurar una mezcla uniforme, y el proceso de captura de la diana, que implica la inmovilización, directa o indirecta, de un polinucleótido liberado a partir de la muestra biológica, siguiendo un oligonucleótido inmovilizado. Por supuesto, también puede utilizarse una captura de una diana no específica. Para facilitar la productividad del laboratorio, el tiempo durante el cual se lleva a cabo la etapa de captura de la diana, no es, de forma deseable, más largo de lo necesario. Sin embargo, a causa de que los ácidos nucleicos liberados de la muestra biológica serán estables en la composición de la mezcla subsiguiente a la adición del hidróxido alcalino, no se cree que sea dañino para los ácidos nucleicos diana permitir que las mezclas permanezcan, por lo menos durante algunas horas. De este modo, se cree que las condiciones de tratamiento asociadas con el choque alcalino son completamente suaves.

#### Recipientes de plástico dispuestos en un analizador automatizado

50 El procedimiento de la invención de preparación de las muestras se lleva a cabo preferentemente en un recipiente de reacción del que se dispone, tal como un tubo de ensayo de plástico, o una unidad disponible que comprende diversos tubos de ensayo que se mantienen en una configuración dispuesta de forma espaciada. Por ejemplo, el recipiente de reacción disponible, se dispone preferentemente en el interior de un dispositivo analítico en el momento en el que se añade la solución hidróxido alcalina, llevándose la etapa de adición a cabo preferentemente mediante un dispositivo de pipeteo manual, automático o robotizado. En una forma de realización muy preferida, el recipiente de reacción disponible se carga en el dispositivo analítico, y un dispositivo de pipeteo manual, automático o robotizado se añade al recipiente una alícuota de la muestra biológica y una alícuota del reactivo de lisis/captura que incluye un tampón de pH y un detergente, para lisar o romper las membranas biológicas, tales como las membranas celulares, envolturas víricas y similares. El reactivo de lisis/captura contiene también preferentemente un oligonucleótido inmovilizable de captura y perlas insolubles para capturar los polinucleótidos liberados de la muestra biológica. Entonces un dispositivo de pipeteo idéntico o uno automático o robotizado añade al tubo de ensayo una alícuota de la solución hidróxido alcalina. El contenido del tubo de ensayo

puede entonces agitarse para asegurar un mezclado completo, incubándose la muestra mezclada a una temperatura y durante el tiempo suficiente, para permitir la captura de los polinucleótidos liberados. A causa de que las condiciones del choque alcalino son suaves, no existe una degradación química sustancial que es conocido que tiene lugar durante períodos de tiempo variables o que se prolongan, como puede ocurrir cuando distintos protocolos analíticos se realizan en el analizador automático en un único ciclo diario de los ensayos del laboratorio.

#### Captura de la diana - Procedimientos y oligonucleótidos

Se ha demostrado que el procedimiento de preparación de la muestra, que se basa en el choque alcalino dado a conocer, posee un particular valor cuando se acopla con un procedimiento de captura de la diana que enriquece la muestra en los ácidos nucleicos. Distintas formas de realización preferidas se basan en la captura de dianas no específicas (es decir, si los ácidos nucleicos son capturados de una forma sustancialmente independiente de la secuencia de bases de los ácidos nucleicos), y en la captura de dianas secuencio-específicas. Cualquiera de o los dos procedimientos pueden utilizar un oligonucleótido inmovilizable o inmovilizado de captura.

Los oligonucleótidos de captura preferidos incluyen una primera secuencia que es complementaria a un polinucleótido que contiene una secuencia diana que va a amplificarse, que se une covalentemente a una segunda secuencia (es decir, una secuencia "de cola") que actú como una diana para la inmovilización en un soporte sólido. Para unir la secuencia de bases de un oligonucleótido de captura, puede utilizarse cualquier esqueleto. En ciertas formas de realización preferidas el oligonucleótido de captura incluye por lo menos una unión metoxi en el esqueleto. La secuencia de cola, que se encuentra preferentemente en el extremo 3' de un oligonucleótido de captura, se utiliza para hibridarse a una secuencia complementaria de bases con el fin de proporcionar unos medios para capturar el ácido nucleico hibridado de la diana con preferencia a otros componentes en la muestra biológica.

Aunque en la secuencia de cola puede utilizarse cualquier secuencia de bases que se hibride a una secuencia complementaria de bases, resulta preferido que la secuencia que se hibridiza se extienda en una longitud de 5-50 residuos nucleótidos. Las secuencias "de cola" preferidas son sustancialmente homopoliméricas, conteniendo de aproximadamente 10 a 40 residuos nucleótidos, o más preferentemente, de aproximadamente 14 a aproximadamente 30 residuos. Un oligonucleótido de captura según la presente invención, puede incluir una primera secuencia que se una específicamente a un polinucleótido diana, y una segunda secuencia que se una específicamente a un alargamiento oligo(dT) inmovilizado en un soporte sólido.

Utilizando los componentes representados en la figura 1, un ensayo para detectar secuencias ácido nucleicas en una muestra biológica incluye las etapas de captura del ácido nucleico diana utilizando el oligonucleótido de captura, la amplificación de la región diana capturada, utilizando por lo menos dos oligonucleótidos de amplificación, o por lo menos dos cebadores, y la detección del ácido nucleico amplificado hibridando, en primer lugar, la sonda marcada a una secuencia contenida en el ácido nucleico amplificado y detectando entonces una señal procedente de la sonda marcada unida.

La etapa de captura utiliza preferentemente un oligonucleótido de captura, en el que, bajo condiciones de hibridación, una parte del oligonucleótido de captura se hibridiza específicamente a una secuencia en el ácido nucleico diana y una parte "de cola" actúa como componente de un par de unión, tal como un ligando (por ejemplo, un par de unión biotina-avidina), que permite que la región diana esté separada de otros componentes de la muestra. Preferentemente, la parte "de cola" del oligonucleótido de captura es una secuencia que se hibridiza a una secuencia complementaria inmovilizada a una partícula del soporte sólido. Preferentemente, en primer lugar, el oligonucleótido de captura y el ácido nucleico diana se encuentran disueltos para beneficiarse de la cinética de hibridación de la fase de solución. La hibridación da lugar a un complejo ácido nucleico diana:oligonucleótido de captura que puede unirse a una sonda inmovilizada mediante la hibridación de la parte "de cola" del oligonucleótido de captura con una secuencia complementaria inmovilizada. De este modo, bajo condiciones de hibridación, se forma un complejo que comprende un ácido nucleico diana, el oligonucleótido de captura y la sonda inmovilizada. Preferentemente, la sonda inmovilizada es una secuencia repetitiva, y más preferentemente una secuencia homopolimérica (por ejemplo, poli-A, poli-T, poli-C o poli-G), que es complementaria a la secuencia "de cola" y que se une a un soporte sólido. Por ejemplo, si la parte "de cola" del oligonucleótido de captura, contiene una secuencia poli-A, la sonda inmovilizada, entonces, contendrá una secuencia poli-T, aunque puede utilizarse cualquier combinación de secuencias complementarias. El oligonucleótido de captura puede contener, asimismo, residuos "espaciadores", que consisten en una o más bases localizadas entre la secuencia de bases que se hibridiza a la diana y la secuencia de bases de la "cola" que se hibridiza a la sonda inmovilizada. Cualquier soporte sólido puede utilizarse para unir el complejo oligonucleótido de captura:ácido nucleico diana. Los soportes útiles pueden ser matrices o partículas libres en solución (por ejemplo, nitrocelulosa, nailon, cristal, poliacrilato, polímeros mezclados, poliestireno, silano poliestireno y, preferentemente, partículas que puedan atraerse magnéticamente). Los procedimientos para unir una sonda inmovilizada al soporte sólido son bien conocidos. El soporte es preferentemente una partícula que puede recuperarse de la solución utilizando procedimientos estándares (por ejemplo, centrifugación, atracción magnética de las partículas magnéticas y similares). Los soportes preferidos son las partículas paramagnéticas monodispersas (es decir, de tamaño uniforme  $\pm$  alrededor del 5%).

La recuperación del complejo ácido nucleico diana: oligonucleótido de captura: sonda inmovilizada, concentra de modo efectivo el ácido nucleico diana (respecto a su concentración en la muestra biológica) y purifica el ácido nucleico diana de los inhibidores de amplificación que pueden encontrarse en una muestra biológica. El ácido nucleico diana capturado puede lavarse una o más veces, purificando a continuación la diana, por ejemplo,

volviendo a suspender las partículas con el complejo ácido nucleico diana: oligonucleótido de captura; sonda inmovilizada, unido a una solución de lavado y recuperando entonces, a partir de ésta, tal como se ha descrito anteriormente, las partículas con el complejo unido. En una forma de realización preferida, la etapa de captura se lleva a cabo hibridando secuencialmente el oligonucleótido de captura con el ácido nucleico diana y ajustando, entonces, las condiciones de hibridación para permitir la hibridación de la parte de la "cola" del oligonucleótido de captura con una secuencia complementaria inmovilizada (por ejemplo, tal como se describe en el documento PCT n° WO 98/50583). Después de la etapa de captura y de que hayan finalizado cualesquiera etapas opcionales de lavado, puede entonces amplificarse el ácido nucleico diana. Para limitar el número de etapas de manipulación, el ácido nucleico diana puede amplificarse, opcionalmente, sin liberarlo del oligonucleótido de captura.

Los oligonucleótidos útiles para la captura pueden contener emparejamientos incorrectos con respecto a las secuencias mencionadas anteriormente, siempre que las secuencias desemparejadas hibriden al ácido nucleico que contiene la secuencia que va a amplificarse.

#### Procedimientos útiles de amplificación

Los procedimientos de amplificación que son útiles, y que están relacionados con la presente invención, incluyen: la amplificación mediada por la transcripción (TMA), la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación del desplazamiento de la cadena (SDA), y los procedimientos de amplificación que utilizan moléculas polinucleótidas auto-replicantes y enzimas de replicación, tales como MDV-1 ARN y la enzima Q-beta. Los procedimientos para llevar a cabo estas diversas técnicas de amplificación respectivamente, pueden encontrarse en la patente US n° 5.399.491, la solicitud publicada de la patente europea EP 0 525 882, la patente US n° 4.965.188, la patente US n° 5.455.166, la patente US n° 5.472.840 y en Lizardi *et al.*, *Biotechnology* 6:1197 (1988).

En una forma de realización preferida de la invención, las secuencias ácido nucleicas de la diana son amplificadas utilizando un protocolo TMA. Según este protocolo, la transcriptasa inversa que proporciona la actividad ADN polimerásica, posee también una actividad ARNasa H endógena. Uno de los cebadores que se utilizan en este procedimiento, contiene una secuencia promotora que se sitúa en dirección 5' de una secuencia que es complementaria a una cadena de un ácido nucleico diana que va a ser amplificado. En la primera etapa de la amplificación, un promotor-cebador hibridiza al ARN diana en un sitio definido. La transcriptasa inversa realiza una copia del ADN complementario del ARN diana mediante la extensión desde el extremo 3' del promotor-cebador. Después de la interacción de un cebador de la cadena opuesta con la nueva cadena de ADN sintetizada, se sintetiza una segunda cadena de ADN a partir del extremo del cebador, mediante la transcriptasa inversa, creando por lo tanto una molécula de ADN bicatenario. La ARN polimerasa reconoce la secuencia promotora en esta matriz del ADN bicatenario e inicia la transcripción. Cada uno de los ARN amplicones nuevamente sinterizados reingresa en el proceso TMA y actúa como una matriz para una nueva ronda de replicación, conduciendo de esta forma a una expansión exponencial del amplicón ARN. Ya que cada una de las matrices de ADN puede obtener entre 100 y 1.000 copias del amplicón ARN, esta expansión puede conducir a la producción de 10 billones de amplicones en menos de una hora. El proceso completo es autocatalítico y se lleva a cabo a una temperatura constante.

#### Kits

También se describen los kits que pueden utilizarse para llevar a cabo el procedimiento de preparación de la muestra, el cual se basa en el choque alcalino, que se incluirán en viales o recipientes separados: un reactivo de lisis/captura y un hidróxido alcalino. En ciertas formas de realización, uno o dos de estos reactivos es una composición seca, liofilizada o semisólida, que puede reconstituirse con un componente líquido, tal como agua, antes de utilizarla. En ciertas formas de realización muy preferidas, la composición hidróxido alcalina requiere una reconstitución con un agente líquido antes de su utilización. En otras formas de realización, el hidróxido alcalino se embala en el kit como una composición líquida. El reactivo de lisis/captura incluye preferentemente un detergente y un tampón con un pH inferior a 8,0, después de la reconstitución, si ésta es necesaria.

### **FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS DE LA INVENCION**

Para asegurar el desarrollo de un procedimiento general para potenciar la capacidad de detección de las dianas de ADN sin comprometer sustancialmente la detectabilidad de las dianas de ARN, en los ensayos que se basan en la amplificación de los ácidos nucleicos, ciertos aspectos de la invención se crearon utilizando un modelo de ensayo múltiple tal como se describe esencialmente en el Ejemplo 7 de la solicitud publicada de patente Internacional n° PCT/US03/18993. Este ensayo, que puede amplificar tanto las dianas de ARN (HIV-1 y HCV) y una diana de ADN (HBV), utiliza un conjunto común de cebadores para amplificar todos los subtipos A-C de HBV. De acuerdo con esto, los procedimientos que se describen a continuación, aislaron esencialmente la preparación de las muestras como una variable.

El ensayo del modelo que se utiliza en los procedimientos que se describen en la presente memoria implicó tres etapas principales que se llevaron a cabo en un tubo de ensayo único: preparación de la muestra; amplificación de la diana de HIV-1 o HCV ARN o HBV ADN; y detección de los productos de amplificación (amplicones) mediante el ensayo de protección de la hibridación (HPA). Durante la preparación de la muestra, se aislaron los ARN y ADN víricos a partir de especímenes plasmáticos utilizando la captura de la diana. El plasma se combinó con una solución de detergente tamponada, para facilitar la solubilización de la envuelta viral, la

desnaturalización de las proteínas y la liberación del ARN vírico genómico y/o del ADN a partir de las partículas víricas contenidas en el espécimen. Durante el desarrollo de la invención, un choque alcalino llevado a cabo adicionando a continuación una solución hidróxido alcalina, sirvió como una etapa de prueba. Por simplicidad, la solución tamponada de detergente que se combinó con el espécimen plasmático se denominó "reactivo de lisis/captura". Los oligonucleótidos (oligonucleótidos de captura) que eran homólogos a las regiones que se habían conservado de HIV-1, HCV, y HBV se hibridaron a las dianas de HIV-1, HCV ARN o HBV ADN, si éstas se encontraban en el espécimen del ensayo. Las dianas hibridadas se capturaron entonces sobre micropartículas magnéticas, y se separaron del conjunto plasmático en un campo magnético. Se utilizaron etapas de lavado para eliminar los componentes plasmáticos extraños del tubo de ensayo reactivo. A continuación, cualquier ácido nucleico vírico capturado se utilizó como matriz en una reacción de amplificación *in vitro* de un ácido nucleico cebador-dependiente. La amplificación de la diana en el ensayo de modelo tuvo lugar mediante el TMA, un procedimiento de amplificación de un ácido nucleico que se basa en la transcripción, que utiliza dos enzimas, la transcriptasa inversa MMLV y la T7 ARN polimerasa. El modelo de ensayo pudo amplificar regiones de HIV-1 ARN, HCV ARN, y/o HBV ADN. La detección de los amplicones se alcanzó mediante HPA, utilizando una mezcla de sondas ácido nucleicas monocatenarias únicas que eran complementarias a los amplicones. Cada sonda ácido nucleica alojó un marcador quimioluminiscente, y se hibridó específicamente con uno de los amplicones. Un reactivo de "selección" diferenció entre sondas hibridadas y no hibridadas inactivando el marcador en las sondas no hibridadas. Durante la etapa de detección, la señal quimioluminiscente producida por la sonda hibridada se midió en un luminómetro y se informó de la misma como unidades relativas de luz (RLU).

La integridad de los resultados del ensayo se verificó utilizando un control interno (IC) que se añadió a cada espécimen del ensayo, un control externo, y un tubo de ensayo calibrador del ensayo, mediante el reactivo de trabajo de lisis/captura. El IC en este reactivo controló las etapas de tratamiento del espécimen, amplificación, y detección. La señal IC en cada tubo o reacción de ensayo se discriminó a partir de la señal HIV-1/HCV/HBV mediante la cinética diferencial de la emisión ligera a partir de las sondas con distintos marcadores. El amplicón de IC se detectó utilizando una sonda con una emisión rápida de luz (denominada señal "destellante"). El amplicón específico para HIV-1/HCV/HBV se detectó utilizando sondas con una cinética relativamente más lenta de emisiones ligeras (denominada señal incandescente). Los expertos en la materia apreciarán que el ensayo cinético dual (DKA) constituye un procedimiento estándar que se utiliza para diferenciar entre las señales incandescentes y destellantes. Cuando se utiliza para la detección simultánea de HIV-1, HCV y HBV, el ensayo de modelo diferencia entre las señales de IC y las combinadas de HIV-1/HCV/HBV, pero no discriminó entre las señales individuales HIV-1, HCV y HBV.

La interpretación de los resultados del ensayo se basó en las señales que representaban la detección de uno de los ácidos nucleicos diana, así como la del IC. Más específicamente, se determinaron dos extinciones para cada ensayo: una para la señal analito (señal incandescente) denominada la "extinción del analito" y otra para la señal IC (señal destellante), denominada extinción IC. Para cada muestra, se determinaron un valor RLU de la señal analito y un valor RLU de la señal IC. El valor RLU de la señal analito dividido por la extinción del analito se denominó la señal analito/extinción, o "S/CO". Para una muestra con una señal analito menor que la extinción del analito (es decir, S/CO < 1,00), la señal de control interno (IC) debe ser superior o igual a la extinción del control interno (Extinción de IC) para que el resultado sea válido. En este caso, el resultado del control interno se considerará como válido, y se informará de la muestra como "no reactiva". Para una muestra con la señal analito menor que la extinción del analito (es decir, S/CO < 1,00) y la señal del control interno inferior a la extinción del control interno, el resultado del control interno se considerará como no válido, y la muestra no será válida. Para todas las muestras, la señal de control interno no puede exceder una RLU de 475.000. En tal caso, se informará automáticamente de que la muestra no es válida.

Tal como se ha indicado anteriormente, la técnica de amplificación que se utiliza para ilustrar la invención fue la Amplificación mediada por la transcripción. Sin embargo, el procedimiento de preparación de la muestra que se ha mostrado, puede utilizarse conjuntamente con cualquiera de las técnicas *in vitro* de amplificación del ácido nucleico, técnica que resultará conocida para los expertos ordinarios en la materia. Esto es así, a causa de que el procedimiento de la invención actúa para mejorar las etapas de lisis y de captura de la diana, que son independientes del procedimiento de amplificación del ácido nucleico.

El Ejemplo siguiente describe experimentos preliminares que establecieron empíricamente la cantidad de una solución hidróxido alcalina que pudiera añadirse a una muestra de reactivo de lisis/captura sin exceder completamente la capacidad tamponadora de la mezcla. En este caso, la solución ejemplificativa de detergente tamponada, fue una solución de sulfato lauril de litio HEPES-tamponada, que incluía oligonucleótidos de captura y perlas magnéticas. Estos procedimientos se utilizaron para establecer sólo un perfil del pH, y no implicaron la amplificación ácido nucleica. El componente HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico), componente del reactivo de lisis/captura posee un pKa de aproximadamente 7,5 y se utiliza convencionalmente para solución tamponadas con un pH de aproximadamente entre 6,8 a 8,2. Pueden utilizarse tampones distintos al HEPES para llevar a cabo el procedimiento de la invención de preparación de las muestras, siempre que la solución alcalina que se añada, se encuentra en una cantidad tal que el pH final se encuentre dentro del intervalo mencionado anteriormente. Por supuesto, el pH inicial de la solución de detergente tamponada es de neutro a ligeramente alcalino, lo que significa que el intervalo de pH está entre 6,5 y 8,0, o más preferentemente, entre 7,0 y 8,0 aproximadamente, o incluso más preferentemente entre 7,0 y 7,5.

El Ejemplo 1 describe el efecto de añadir una solución hidróxido alcalina a una solución HEPES-tamponada detergente que incluiría o no, una muestra plasmática añadida. Los resultados de este procedimiento han proporcionado una base empírica para determinar el pH final de las mezclas que se crearon utilizando distintas cantidades de la solución de hidróxido.

5

**EJEMPLO 1**Determinación del efecto pH (resultante) de la adición de álcali a una solución de detergente tamponada que incluye una muestra sanguínea

Se dispusieron en tubos de ensayo para reacción, de plástico, alícuotas (400 µl) de un reactivo de lisis/captura (es decir, una solución de detergente tamponada). El reactivo de lisis/captura contenía oligonucleótidos de captura solubles y aproximadamente 40 µg de partículas paramagnéticas de 0,7-1,05 µ (Seradyn, Indianapolis, IN), unidas covalentemente a poli-(dT). Los oligonucleótidos de captura pudieron hibridarse simultáneamente al poli-(dT<sub>14</sub>) unido a las partículas y a los ácidos nucleicos de los subtipos -A, -B o C de HBV. El reactivo de lisis/captura incluía además una matriz interna de HIV-1 de control interno de amplificación, oligonucleótidos de captura HIV-1 y HCV específicos, aproximadamente 800 mM HEPES (pH 7,5) y aproximadamente 10% p/v de sulfato lauril de litio. La mitad de los tubos de ensayo reactivos recibieron también una alícuota (500 µl) de un plasma de control procesado que no contenía fibrina. Los tubos de ensayo recibieron entonces alícuotas de 100 µl de solución de NaOH con una concentración en el intervalo de entre 1,0 a 2,5 N. Un conjunto de tubos de ensayo que contenían el reactivo de lisis/captura, o la combinación del reactivo de lisis/captura y la muestra plasmática, se reservaron como controles que no recibieron una alícuota de la solución de NaOH. Todas las muestras se mezclaron utilizando un dispositivo mecánico de rotación, determinándose los valores de pH de las mezclas resultantes utilizando un peachímetro modelo 9100 de VWR Scientific Products (Chester, PA). Los resultados de estos procedimientos se presentan en la Tabla 1.

10

15

20

**Tabla 1**Titulación del álcali en una solución de detergente tamponada combinada con una muestra plasmática

Concentración de NaOH añadido	pH después de la mezcla	
	Muestra: reactivo de lisis/captura	Muestra: reactivo de lisis/captura + plasma
Ninguna	7,45	7,45
1,0 N	8,05	8,05
1,4 N	8,31	8,35
1,8 N	8,65	8,76
2,2 N	9,85	10,62
2,5N	13,2	12,6

25

30

Los resultados que se presentan en la Tabla 1 indicaban que la adición de 100 µl de una solución de NaOH con una concentración de 2,2 N o superior, constituyeron el punto de partida de que se excediera la capacidad de tampón de la solución de detergente tamponada, con o sin una muestra de plasma añadida. Esto se basó en la observación de que el pH final de las mezclas aumentó más que una unidad de pH sólo cuando se utilizaron concentraciones 2,2N y superiores de NaOH. Estos resultados proporcionaron una base para estudios adicionales dirigidos a cuantificar el efecto del álcali añadido con respecto a la capacidad para detectar *in vitro* las reacciones de amplificación de las dianas de ADN, y proporcionar una orientación útil para adaptar el procedimiento a la utilización de dianas de ARN que pudieran ser sometidas a hidrólisis bajo condiciones de pH elevado.

35

40

El Ejemplo siguiente describe cómo cantidades variables de álcali añadido influyeron en la detección del subtipo -B de HBV en un sistema de amplificación *in vitro* que implicó las etapas de lisis vírica, captura de los ácidos nucleicos liberados, amplificación y detección. En este procedimiento, los parámetros controlados del ensayo incluyeron el porcentaje de positividad para la detección, el coeficiente CV (coeficiente de variabilidad), y la intensidad media de la señal cuantitativa (medida en unidades lumínicas relativas o "RLU"). Los expertos en la materia apreciarán que los bajos valores de los porcentajes de CV indican ventajosamente unos niveles más altos de la precisión del ensayo, y por lo tanto, resultan más preferidos.

El Ejemplo 2 describe procedimientos que definieron cantidades útiles de álcali que podrían añadirse a una mezcla de plasma que contenía virus y a un reactivo de lisis/captura, antes de llevar a cabo *in vitro* una reacción de amplificación ácido nucleica.

**EJEMPLO 2**La preparación de la muestra que incluye el choque alcalino mejora la realización del ensayo

Una alícuota de 400 µl del reactivo de lisis/captura que se describe en el Ejemplo 1, se combinó en un tubo de ensayo de plástico con 500 µl de una muestra plasmática obtenida a partir de un individuo infectado con el subtipo -B de HBV. Los tubos de ensayo de control incluían muestras de plasma negativas al virus en vez de muestras positivas al virus. Todas las muestras plasmáticas que se utilizaron como fuente de las matrices virales en este procedimiento se habían diluido 1:3 con plasma procesado de control negativo al virus. A continuación, se añadieron alícuotas de 100 µl de soluciones de NaOH con distintas concentraciones, a los diferentes tubos de ensayo que contenían la combinación del reactivo de lisis/captura y del plasma. Las soluciones alcalinas que se utilizaron en el procedimiento tenían concentraciones de NaOH en el intervalo de 0,05 a 2,5 N. Un tubo de ensayo de control incluía agua en lugar de la solución de NaOH. Las mezclas se hicieron rotar brevemente para asegurar la mezcla, que se calentó a 60°C durante aproximadamente 20 minutos, enfriándose entonces a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir la hibridación y la captura de la diana. Se aplicó un campo magnético para recuperar los complejos de partículas que contenían el oligonucleótido de captura inmovilizado y el HVB ADN, utilizando procedimientos tales como los descritos por Wang en la patente US nº 4.895.650. Las partículas se lavaron entonces dos veces con 1 ml de un tampón de lavado (10 mM HEPES a pH 7,5, 6,5 mM NaOH, 1 mM EDTA, etanol al 0,3% (v/v), metil-paraben al 0,02% (peso/vol), propil-paraben al 0,01% (peso/vol), 150 mM NaCl, sulfato lauril sódico al 0,1% (peso/vol)). Las partículas lavadas se volvieron a suspender en 75 µl de un reactivo de amplificación, y el contenido del tubo de ensayo se rellenó con aceite inerte para prevenir la evaporación. El reactivo de amplificación incluía sales, nucleótidos, ribonucleótidos, cebadores HVB específicos, así como cebadores capaces de amplificar las secuencias diana de HIV-1 y HCV. Después de hacer rotar brevemente la mezcla se incubó en primer lugar a 60°C durante 10 minutos, para facilitar la hibridación de los cebadores, equilibrándose entonces durante 10 minutos a 41,5°C. Se añadieron entonces a las mezclas, alícuotas del reactivo enzimático precalentado que incluía la transcriptasa inversa (5.600 unidades/por reacción) del Virus Moloney de la leucemia murina (MMLV) y la T7 ARN polimerasa (3.500 unidades/reacción). Después de una hora de incubación a 41,5°C, la reacción finalizó, y los productos de amplificación de HBV se detectaron utilizando una sonda de hibridación marcada con éster de acridinio en un ensayo de protección homogénea, tal como se describe, esencialmente, en el ejemplo 1 de la solicitud publicada de patente internacional nº PCT/US03/18993. Las reacciones que dieron señales positivas cuando se hibridaron con una sonda específica para el amplicón del control interno, o con una sonda específica para el amplicón de HBV, se clasificaron como tratamientos válidos. Para que un tratamiento válido se considerara como positivo con relación a la presencia de amplicones HBV, la señal quimioluminiscente que indicaba la hibridación de la sonda debía superar los 50.000 RLU en un ensayo. Los resultados de estos procedimientos se presentan en la Tabla 2, y en las figuras 2A-2C.

**Tabla 2**Condiciones de optimización para el choque alcalino

Aditivo	Muestra de plasma	% positivo	% CV	RLU media
Agua (control)	control	0	37	2.231
	HBV-B 1:3	10	144	296.066
0,05N NaOH	control	0	23	2.709
	HBV-B 1:3	10	195	232.295
0,1N NaOH	control	0	33	2.248
	HBV-B 1:3	50	64	721.476
0,3N NaOH	control	0	20	3.546
	HBV-B 1:3	60	34	898.200
0,6N NaOH	control	0	37	4.023
	HBV-B 1:3	60	36	930.407
1,0N NaOH	control	0	17	5.017
	HBV-B 1:3	90	10	1.136.773
1,4N NaOH	control	0	42	4.387
	HBV-B 1:3	100	4	1.183.610
1,8N NaOH	control	0	24	4.216

	HBV-B 1:3	100	5	1.184.132
2,2N NaOH	control	0	16	4.559
	HBV-B 1:3	90	8	1.166.869
2,5N NaOH	control	0	211	13.087
	HBV-B 1:3	0	47	5.931

Los resultados de estos procedimientos indicaron que la preparación de las muestras que incluía una etapa de choque alcalino, condujo ventajosamente a una mejoría importante en la realización del ensayo. Especialmente, el hecho de que todos los ensayos difirieran sólo en la naturaleza de la etapa del choque alcalino, confirmó que los beneficios que pueden ser obtenidos utilizando el choque alcalino, no dependían de los oligonucleótidos particulares que se utilizaran en el procedimiento. En verdad, el ensayo de control que recibió una alícuota de agua en vez de la solución de NaOH, dio lugar a unos niveles relativamente bajos del porcentaje de positividad y a unos valores indeseablemente altos del porcentaje de CV. A la inversa, un choque alcalino llevado a cabo utilizando una solución de NaOH con una concentración en el intervalo de entre 0,1 a 2,2 N, produjo niveles del porcentaje de positividad mucho más altos con un aumento en la precisión, tal como se juzga por los valores reducidos del porcentaje de CV.

De forma importante, estos resultados evidenciaron asimismo un intervalo óptimo de las concentraciones de hidróxido que podrían utilizarse en el procedimiento del choque alcalino. Más específicamente, los datos revelaron que la utilización de la concentración más alta de NaOH comprometió sustancialmente la realización del ensayo al punto en el que el porcentaje de positividad se redujo a cero. Esta cantidad de solución hidróxida, cuando se mezcló con el reactivo de lisis/captura y la muestra plasmática, dio lugar a un pH de 12,6 (véase la Tabla 1). Es decir, la adición de una cantidad de hidróxido alcalino suficiente para dar lugar a un pH de 12,6, eliminaba la capacidad del ensayo para detectar la diana. A la inversa, la adición de una solución de NaOH en una cantidad suficiente para elevar el pH final en un intervalo de entre aproximadamente 8,0 a aproximadamente 10,6, dio buenos resultados. En este experimento, los mejores resultados se alcanzaron añadiendo una solución de NaOH en una cantidad suficiente para aumentar el pH final en el intervalo de 8,3 a 8,8. Notablemente, este intervalo fue casi idéntico al intervalo preferido de entre 8,2 a 9,2, que se establece en el ejemplo 8, a continuación. Estos intervalos definen intervalos preferidos de pH que proceden de la adición de cantidades apropiadas de una solución alcalina, preferentemente de una solución hidróxido alcalina, a una solución de detergente tamponada, que contiene una muestra biológica.

Los procedimientos siguientes probaron que se requirió un pH transitorio alto (es decir, un "choque alcalino") para obtener una mejoría en la sensibilidad del ensayo. En este ejemplo, se modificó el orden en el que se combinaron tres reactivos, para investigar si los efectos beneficiosos que se describen en la presente memoria, procedían del cambio del pH final de la muestra, o de un mecanismo distinto.

El ejemplo 3 describe los procedimientos que probaron que los efectos beneficiosos del procedimiento del choque alcalino proceden de una exposición transitoria a las condiciones alcalinas.

### **EJEMPLO 3**

#### **Se requiere un choque alcalino transitorio para mejorar la realización del ensayo**

Los procedimientos de preparación de la muestra que implicaron la combinación de tres reactivos (hidróxido alcalino, muestra plasmática y reactivo de lisis/captura) en distintos órdenes, se utilizaron para dirigir el mecanismo de acción que subyace a la mejoría en el ensayo observado. Los reactivos y sus cantidades que se utilizaron en los procedimientos fueron: 400 µl de reactivo de lisis/captura, 500 µl de una muestra plasmática que contenía partículas del virus HBV del subtipo -B (es decir, plasma infectado con el virus procedente de un donante humano, diluido 1:10 con plasma procesado negativo al virus), y 100 µl de 1,6 N NaOH. La concentración de la solución hidróxido alcalina se seleccionó, debido a que se encontraba dentro del intervalo de los buenos resultados de rendimiento a los que se ha hecho referencia en el ejemplo anterior. Todos los reactivos se pipetearon en tubos de ensayo reactivos de plástico, y, tal como se describe en los Ejemplos anteriores, se llevaron a cabo la captura de las dianas, la amplificación y la detección. Una reacción de control que se llevó a cabo utilizando plasma HBV positivo diluido 1:10 y reactivo de lisis/captura sin añadir NaOH, dio lugar a una reacción positiva del 40%, definiendo, por lo tanto, un estándar comparativo. Las reacciones negativas de control que se llevaron a cabo utilizando plasma HBV negativo en lugar de las muestras séricas HBV positivas, ("Muestra HBV" en la Tabla 2), para todas las condiciones presentadas en la tabla, dieron lugar uniformemente a una reactividad positiva del 0% en la reacción de amplificación y detección, tal como se esperaba. Los procedimientos que se llevaron a cabo utilizando las muestras plasmáticas HBV positivas diluidas 1:20 en lugar de las muestras diluidas 1:10, dieron lugar a resultados de acuerdo con los que se han presentado en la Tabla 3. El orden de adición de los tres reactivos para cada condición del ensayo, (n=10), se proporciona en la tabla.

Tabla 3

Un choque alcalino transitorio da lugar a resultados beneficiosos

Primer reactivo	Segundo reactivo	Tercer reactivo	% positivos
Reactivo lisis/captura	Muestra de HBV	Álcali	100
	Álcali	Muestra HBV	20
Muestra de HBV	Reactivo de lisis/captura	Álcali	90
	Álcali	Reactivo de lisis/captura	100
Álcali	Reactivo de lisis/captura	Muestra HBV	40
	Muestra de HBV	Reactivo lisis/captura	80

5 Los resultados en la Tabla 3 indicaron que el orden de adición del reactivo influyó profundamente el resultado del ensayo. La combinación en primer lugar del reactivo de lisis/captura y de la solución hidróxido alcalina entre sí, sin preocuparse por el orden de adición de estos reactivos al tubo de ensayo de la reacción, dio resultados similares al control que omitió el choque alcalino. Así, añadiendo la muestra que contenía los virus después de que el reactivo de lisis/captura y el hidróxido alcalino estuvieran ya combinados, no se produjo un beneficio medible mediante el porcentaje de positividad. Al contrario, se obtuvieron resultados excelentes combinando primero el reactivo de lisis/captura y la muestra que contenía partículas víricas de HBV (en cualquier orden), y combinando entonces la solución hidróxido alcalina con la mezcla. Este orden altamente preferido de adición evitó ventajosamente la exposición directa de la muestra biológica a la solución concentrada de hidróxido, y por tanto, minimizaría ventajosamente la hidrólisis alcalina de las matrices de ARN.

10 Aunque sin desear vincularse a ninguna teoría particular con respecto a la operación, los resultados precedentes apoyan un mecanismo en el que un pH transitorio alto y local en el interior del tubo de ensayo de la reacción, que contiene el reactivo de lisis/captura y la muestra vírica, surtió algún efecto que dio lugar a las ventajas que se dan a conocer en la presente memoria. A causa del éxito de este resultado de la técnica de la exposición a un pH transitorio alto, el procedimiento que se da a conocer en la presente memoria se ha denominado "choque alcalino".

15 Los resultados presentados anteriormente indicaron asimismo que el pH final de las mezclas reactivas (tal como se describe en el Ejemplo 1), puede utilizarse para calibrar la cantidad de solución alcalina necesaria para alcanzar buenos resultados, pero que este pH final de la mezcla no predice el éxito del procedimiento. En verdad, si el pH final de la mezcla determinó el resultado del ensayo, entonces, todas las condiciones de la prueba que se presentaron en la Tabla 3 habrían dado lugar a resultados idénticos, y esto no fue así. De acuerdo con esto, los modos preferidos de llevar a cabo la invención implican la adición de una solución alcalina a una muestra que incluye un tampón pH, un detergente y una muestra biológica que va a ensayarse en cuanto a la presencia de un ácido nucleico particular. En una forma de realización muy preferida, la muestra biológica es un líquido corporal, tal como la totalidad de la sangre, el plasma, el suero y similares.

20 El ejemplo siguiente utilizó un análisis estadístico para medir cómo la sensibilidad del ensayo para distintos subtipos de HBV mejoró incluyendo un choque alcalino durante el procedimiento de preparación de la muestra. Para demostrar esto, se llevó a cabo un ensayo múltiple, tal como se da a conocer esencialmente en el ejemplo 7, de la solicitud publicada de patente internacional WO2003/106714, siendo sólo la diferencia sustancial la adición de una etapa de choque alcalino durante el procedimiento de preparación de la muestra.

25 El ejemplo 4 da a conocer cómo la técnica del choque alcalino mejoró la realización del ensayo cuantitativo para múltiples subtipos de HBV.

#### 35 **EJEMPLO 4**

##### Efectos de la cuantificación de la técnica de choque alcalino

40 Se constituyeron conjuntos de muestras plasmáticas que contenían cantidades conocidas de partículas del subtipo -A, -B, o -C del virus HBV, mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Las muestras se prepararon utilizando un protocolo de choque alcalino, en el cual 400 µl de reactivo de lisis/captura y 500 µl de elementos individuales del conjunto se combinaron inicialmente en tubos de ensayo de plástico, añadiéndose 100 µl de 1,6 N NaOH, agitándose los tubos entonces para asegurar una mezcla completa. La captura de las dianas, y la amplificación y detección de los productos de amplificación se llevaron a cabo tal como se ha descrito anteriormente. Las reacciones de control que omitieron el procedimiento de choque alcalino se llevaron a cabo en paralelo. Se utilizó el análisis de regresión utilizando la función Probit en el programa del Sistema SAS® (versión 8.02) (Cary, NC), para calcular los niveles de detección del 50% y del 95%. Las reacciones no válidas no se volvieron a ensayar, y no se incluyeron en el análisis de la sensibilidad analítica. Los resultados de estos

procedimientos se presentan en las figuras 3A-3C, y el Análisis Probit se resume en la Tabla 4.

**Tabla 4**

Quantificación de los efectos del choque alcalino en la detección de subtipos de HBV.

Genotipo HBV	Probabilidad de detección	Sensibilidad ensayo (copias/ml)		Nº de veces aumento sensibilidad
		Control	Choque alcalino	
B	95%	1.405 (1.168-1.792)	78 (61-116)	18x
	50%	504 (440-623)	22 (14-29)	23x
C	95%	98 (78-134)	26 (21-35)	3,8x
	50%	37 (29-49)	10 (8-13)	3,7x
A	95%	74 (58-108)	40 (32-57)	1,9x
	50%	26 (20-34)	12 (9-16)	2,2x

Los intervalos de confianza del 95% se muestran entre paréntesis

5 Los resultados que se presentan en la Tabla 4 confirmaron que el procedimiento del choque alcalino mejoró la capacidad de detección de los tres subtipos de HBV, aunque en grados distintos. Utilizando los procedimientos convencionales que no utilizaron un choque alcalino, la sensibilidad del ensayo para la probabilidad detectora a 95% del virus de subtipo -B fue inferior a los otros subtipos en aproximadamente 16 veces. Utilizando el procedimiento mejorado de preparación de la muestra, que incorporaba un procedimiento de choque alcalino antes de la captura de las dianas y la amplificación, mejoró en gran manera la realización del ensayo hasta el punto de que todos los subtipos pudieran ser detectados a niveles inferiores a 100 copias/ml de la muestra. De forma interesante, el procedimiento de preparación de la muestra, aumentó mucho la sensibilidad del ensayo para el virus de subtipo -B. Esta mejoría diferencial no se pudo predecir anteriormente, y puede aclarar el mecanismo que subyace en el efecto del procedimiento de la invención.

15 Los resultados presentados en los ejemplos anteriores, mostraron que un choque alcalino transitorio durante el procedimiento de preparación de la muestra, mejoró la detección subsiguiente de una diana de ácido nucleico. El ensayo que se describe en el ejemplo a continuación se dirige al mecanismo que subyace en esta mejoría. Más específicamente, se llevó a cabo un experimento para investigar si la adición hidróxido alcalina a la mezcla del reactivo de lisis/captura y de la muestra biológica tenía solo un efecto desnaturizante en las proteínas y ácidos nucleicos en la muestra, aumentando, por lo tanto, la disponibilidad de los ácidos nucleicos virales para la subsecuente amplificación y detección. Aunque es conocido que las condiciones de alcalinidad desnaturizan las proteínas y los ácidos nucleicos, los resultados que se presentan a continuación indican que los resultados beneficiosos que se observan mediante los procedimientos descritos en la presente memoria, no fueron explicados totalmente por la desnaturización alcalina.

25 El Ejemplo 5 describe procedimientos que demostraron que el fenómeno del choque alcalino no fue mediado inicialmente por la desnaturización alcalina de las proteínas y/de los ácidos nucleicos.

#### **EJEMPLO 5**

##### El choque alcalino requiere los efectos combinados del álcali y del detergente

30 Se prepararon reactivos especializados lisis/captura para contener 0%, 5% o 10% de detergente sulfato lauril de litio (LLS). De forma notable, todos los otros casos de reactivos lisis/captura que se describieron en la presente memoria, se prepararon utilizando LLS al 10%. Se combinaron alícuotas (400 µl) de uno de los reactivos captura-diana en primer lugar con alícuotas (500 µl) de una dilución 1:10 de una muestra sérica obtenida a partir de un paciente infectado con el subtipo B- de HBV. Todas las pruebas incluían 100 copias aproximadamente del genoma HBV. Entonces, los ensayos que iban a ser tratados con hidróxido alcalino, recibieron 100 µl de 1,6 N NaOH, y se hicieron rotar brevemente. Los ensayos de control recibieron 100 µl de agua en vez de la solución de NaOH. La captura de las dianas, y los productos de amplificación y detección se obtuvieron tal como se ha descrito anteriormente. Todas las pruebas se llevaron a cabo repitiéndolas 10 veces. Los resultados de estos procedimientos se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5**

El choque alcalino requiere la combinación de un detergente y un álcali

% de Detergente en el reactivo lisis/captura	% Detección del HBV	
	Control	Tratamiento alcalino
0	0	0
5	10	80
10	20	90

5 Los resultados que se presentan en la Tabla 5 indicaron que la combinación del detergente y del álcali fue necesaria para que el choque alcalino se produjera. En verdad, las muestras que se prepararon utilizando un reactivo de lisis/captura que omitió el detergente, no pudo detectar el analito HBV, incluso en ensayos que recibieron el hidróxido alcalino. De este modo, el tratamiento con álcali en ausencia del detergente bajo condiciones específicas de pH, no fue suficiente para producir buenos resultados. Esto indicaba que el mecanismo por el cual se llevó a cabo el choque alcalino no se debió completamente a la desnaturalización alcalina, mediada, de las proteínas y de los ácidos nucleicos. En vez de esto, existió un efecto sinérgico que requirió en primer lugar, la combinación de la muestra biológica con el tampón y el detergente, y entonces, la adición del hidróxido alcalino.

10 Además de los procedimientos que se llevaron a cabo utilizando partículas de HBV como una fuente modélica de dianas de ADN, se llevaron a cabo experimentos adicionales para investigar el efecto de un choque alcalino durante la preparación de las muestras sobre las dianas ARN. Como en el ejemplo anterior, se utilizó un ensayo múltiple, que puede amplificar y detectar los ácidos nucleicos de HIV-1, HCV y HBV, para examinar el efecto del choque alcalino en las dianas de ARN. En verdad, la conocida sensibilidad del ARN para la hidrólisis, sugirió que el procedimiento del choque alcalino sería solamente útil en relación con el aislamiento de las dianas ADN de forma preliminar a la amplificación y detección.

15 El ejemplo 6 describe procedimientos que demostraron que las dianas de ARN podrían amplificarse y detectarse utilizando matrices ácido nucleicas preparadas en procedimientos que incluían un choque alcalino.

20

### **EJEMPLO 6**

#### Efecto del choque alcalino en la detección de HIV-1 y HCV

25 Mediante procedimientos estándares se obtuvieron conjuntos de muestras plasmáticas con cantidades conocidas de uno de los virus de ARN siguientes: HCV-1a, HCV-2b y HIV-1b. Las muestras se prepararon utilizando un protocolo de choque alcalino en el que 400 µl de reactivo de lisis/captura y 500 µl de individuos individuales del conjunto se combinaron, en primer lugar, en tubos de ensayo de plástico reactivos, se añadieron 100 µl de 1,6 N NaOH, y se agitaron los tubos entonces para asegurar una mezcla completa. La captura de las dianas, y la amplificación y detección de los productos de ésta se llevaron a cabo de modo esencial, tal como se describe anteriormente, utilizando sondas apropiadas de detección al finalizar el procedimiento de amplificación. Se llevaron a cabo en paralelo las reacciones de control que omitieron el procedimiento del choque alcalino. Excepto para los ensayos realizados utilizando los títulos más altos de virus, todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando copias de 20. Las reacciones que se llevaron a cabo utilizando el equivalente de 300 copias/ml de muestras de plasma, se realizaron utilizando copias de 10. Los resultados de estos procedimientos se presentan en las Tablas 6-8, y en las figuras 4A-4C. La Tabla 9 presenta resultados de un Análisis Probit de los datos en las Tablas 6-8.

30

Tabla 6

Efecto del choque alcalino en la amplificación y detección de HCV-1a

	Muestra HCV-1a (copias de ARN/ml)	% positivos	Nº ensayos	RLU medio de IC	RLU medio amplicones	Nº no vál.
Control	300	100	10	185354	1453346	0
	100	100	20	182303	1368094	0
	30	95	20	185996	1165246	0
	10	52,6	20	199793	458035	1
	3	38,9	20	201781	352694	2
Choque alcalino	300	100	10	162777	1398738	0
	100	100	20	170729	1411556	0
	30	95	20	170932	1157907	0
	10	75	20	179854	865606	0
	3	46,7	20	182010	530033	5

Tabla 7

Efecto del choque alcalino en la amplificación y detección de HCV-2b

	Muestra HCV-2b (copias de ARN/ml)	% positivos	Nº ensayos	RLU medio de IC	RLU medio amplicones	Nº no vál.
Control	300	100	10	265152	1272494	0
	100	100	20	251077	1190681	0
	30	95	20	241570	911405	0
	10	73,7	20	236737	514461	0
	3	15	20	235306	67760	1
Choque alcalino	300	100	10	242148	1287926	0
	100	100	20	260091	1020347	0
	30	90	20	246163	530746	0
	10	55	20	232982	244802	0
	3	5,3	20	224816	43514	1

5

Tabla 8

Efecto del choque alcalino en la amplificación y detección de HIV-1b

	Muestra HCV-1b (copias de ARN/ml)	% positivos	Nº ensayos	RLU medio de IC	RLU medio amplificones	Nº no vál.
Control	300	100	10	11883	35509	0
	100	100	20	11824	103981	0
	30	100	20	22536	179092	1
	10	80	20	7814	115883	0
	3	40	20	4167	52622	0
Choque alcalino	300	100	10	11738	19499	0
	100	100	20	13823	110696	0
	30	90	20	10468	166067	0
	10	68	20	22082	169677	1
	3	21	20	21784	53292	1

5 Los resultados que se presentan en las Tablas 6 a 8 y en las figuras 4A a 4C, indicaron que cualquier efecto del tratamiento con el choque alcalino de las muestras que se trataron, con respecto a la presencia de los virus de ARN, fue muy escaso. Por ejemplo, en el ensayo de sensibilidad para HCV-1a, ésta pareció aumentar ligeramente, mientras la sensibilidad para HCV-2b y HIV-1b puede disminuir ligeramente. Notablemente, no está claro si estas diferencias, que se apreciaron sólo en títulos víricos muy bajos, eran estadísticamente significativas. En conjunto, los resultados confirmaron que un choque alcalino podría integrarse en un procedimiento único de preparación de la muestra, para aislar las dianas de ARN y ADN. Fue algo sorprendente que, mientras resultara adecuado proporcionar una mejoría sustancial de las dianas del ADN, el tratamiento podría ser lo suficiente suave para permitir la detección subsiguiente de las dianas de ARN.

Tabla 9

Cuantificación de los efectos del choque alcalino en la detección de las dianas de ARN

Diana ARN	Probabilidad detección	Sensibilidad del ensayo (copias/ml)	
		Control	Choque alcalino
HCV-1a	95%	32 (22-69)	28 (18-93)
	50%	8 (0-13)	3 (0-8)
HCV-2b	95%	23 (16-52)	31 (23-54)
	50%	8 (4-13)	13 (8-19)
HIV-1b	95%	16 (11-42)	32 (23-65)
	50%	5 (0-8)	9 (3-15)

Entre paréntesis se muestran los intervalos de confianza del 95%

15 Los resultados tabulados del Análisis Probit, que se presenta en la Tabla 9, indicaron que el tratamiento con el choque alcalino no perjudicó sustancialmente la capacidad de detección de las dianas de ARN. Así, las mismas condiciones del choque alcalino que potenciaron la detección del ácido nucleico HBV de tipo -B, no comprometieron sustancialmente la detección de las dianas del ARN.

20 El ejemplo anterior demostró que los procedimientos de preparación de las muestras que incorporaron un choque alcalino, podrían utilizarse para aislar matrices de ARN, además de las matrices del ADN. Este resultado fue algo sorprendente, porque es conocido que el ARN está sujeto a hidrólisis bajo condiciones alcalinas. El

Ejemplo siguiente confirmó esta susceptibilidad cuando varió el procedimiento de preparación de la muestra, de forma que una muestra biológica que contenía una cantidad conocida de viriones HIV-O se combinó en primer lugar con un hidróxido alcalino antes de añadir un tampón pH y un detergente.

5 El Ejemplo 7 describe procedimientos que se llevaron a cabo para evaluar el efecto del tratamiento alcalino sobre la integridad de una diana de ARN. Los resultados de estos procedimientos mostraron que la hidrólisis del ARN fue muy rápida después del contacto entre la muestra biológica que contenía viriones HIV-O y la solución hidróxido alcalina.

**EJEMPLO 7**

El orden de la adición de los reactivos afecta profundamente a la integridad del ARN

10 Las muestras séricas que contenían viriones HIV-O se diluyeron a títulos conocidos utilizando suero virus-negativo. Se depositaron en primer lugar en tubos de ensayo reactivos de plástico alícuotas (500 µl) de suero que contenía viriones (es decir, que contenía 30 copias/ml). Entonces, se añadieron alícuotas de 100 µl de 1,8 N LiOH, dejando que los tubos reposaran durante períodos variables de tiempo. A continuación se añadió una alícuota (400 µl) de reactivo de lisis/captura, haciéndolo rotar brevemente. El tiempo de retraso entre la adición de la solución hidróxido alcalina y la solución pH tamponada detergente (es decir, el reactivo de lisis/captura) estuvo comprendido entre 0 minutos y una hora. Las matrices supervivientes de ARN se capturaron, amplificaron, y detectaron esencialmente, tal como se ha descrito anteriormente. De forma notable, el reactivo tamponado de pH de lisis/captura en este procedimiento incluía un transcrito sintético de HIV-1 que actuó como control interno de amplificación. Todos los ensayos se llevaron a cabo en copias de 10.

20 **Tabla 10**

Evaluación del efecto del álcali sobre la integridad del ARN

Muestra	Retraso temporal (minutos)	% CV IC RLU	# ensayos	# no válido	% positivo
Suero negativo	0	13	10	0	0
HIV-O 30 copias/ml	0	5	10	0	10
	2,5	9	10	0	0
	5	3	10	0	0

25 Los resultados que se presentan en la Tabla 10 indicaron que la hidrólisis de la diana HIV-O ARN fue muy rápida cuando la solución hidróxido alcalina se añadió a la muestra biológica en ausencia de un tampón de pH. De forma notable, los resultados del ensayo preliminar indicaron que la diana HIV-O se detectó con una eficiencia del 100% al nivel de 30 copias/ml, cuando el hidróxido alcalino se omitió del procedimiento o se añadió después de que la muestra que contenía virus se combinara en primer lugar con el reactivo de lisis/captura (es decir, una solución pH tamponada de detergente). Tal como se indica en la Tabla, sólo una de las diez copias produjo matrices ARN detectables cuando el suero que contenía virus se mezcló con la solución hidróxido alcalina y por tanto, fue inmediatamente neutralizada por la adición del reactivo de lisis/captura que incluía un tampón pH. Otros momentos en el tiempo que prolongaron el retraso, en hasta una hora, entre las adiciones de la solución pH tamponada a las muestras víricas tratadas con el álcali, no dieron tampoco lugar a matrices de ARN detectables y por tanto, no figuran en la tabla. Se esperaba el hecho de que el control interno del ARN sobreviviera al procedimiento, juzgándose esto por el hecho de que todos los ensayos se consideraron válidos. Tomados en conjunto, estos resultados confirmaron que la mezcla de una muestra biológica que contenía una diana ARN con una solución hidróxido alcalina, antes de añadir un tampón pH, comprometía completamente la integridad de la matriz de ARN. Por otro lado, combinando primero la matriz de ARN con un tampón pH antes de realizar una mezcla con la solución hidróxido alcalina, preservaba la integridad de la matriz.

40 Dado lo expuesto, que las dianas ARN y ADN podrían ser detectadas en ensayos múltiples utilizando un procedimiento compartido de preparación de la muestra, que incorporaba un choque alcalino, resultó interesante explorar de forma más completa el efecto del pH durante el procedimiento de preparación de la muestra en la realización del ensayo final. Tal como se indica a continuación, cuando la cantidad de hidróxido alcalino utilizada en el procedimiento de preparación de la muestra dio lugar a un pH final superior a 9,5, el ensayo resultó "pobre". De forma notable, los procedimientos que se describen en el Ejemplo siguiente utilizaron LiOH en lugar de NaOH para conseguir el choque alcalino, y de este modo, mostraron también que la identidad del hidróxido alcalino que se utilizó en el procedimiento no era crítico para el éxito del procedimiento de preparación de la muestra.

45 El Ejemplo 8 describe procedimientos que siguieron para determinar el límite máximo del intervalo de pH útil para llevar a cabo los procedimientos de preparación de la muestra basados en el choque alcalino.

**EJEMPLO 8**Optimización de la cantidad de hidróxido alcalino utilizado para llevar a cabo el choque alcalino

5 Se ensayaron las muestras biológicas que contenían dianas víricas de ARN o ADN con el modelo de ensayo múltiple, para determinar cómo la realización del ensayo estaba influenciada por el pH final de una mezcla que incluía una muestra sérica o plasmática que contenía virus, una solución tamponada de detergente (es decir, un reactivo de lisis/captura), y un hidróxido alcalino durante el procedimiento de preparación de la muestra. En este procedimiento, se utilizó 1,9N LiOH en lugar de 1,6 N NaOH para llevar a cabo el choque alcalino. Los procedimientos preliminares para determinar el pH final que se obtendría de la adición de distintas cantidades de la solución de LiOH se llevaron a cabo en copias de tres, determinándose los intervalos de pH a partir de estas lecturas. En estos procedimientos preliminares, 400 µl del reactivo de lisis/captura se combinaron con 500 µl de suero vírico negativo y distintos volúmenes de 1,9 LiOH, determinándose el pH final de las mezclas, tal como se ha descrito anteriormente. Las muestras biológicas que se ensayaron fueron: (1) plasma grupo HIV-1 O positivo que contenía el equivalente de 30 copias/ml del ARN vírico; (2) plasma HCV-1a positivo que contenía el equivalente de 30 copias/ml del ARN vírico; y (3) subtipo B de HBV diluido en suero de control virus-negativo a un nivel de menos de 200 copias/ml. El suero virus-negativo sirvió como control en el procedimiento. En todos los casos, la muestra biológica se combinó en primer lugar con el reactivo de lisis/captura, añadiéndose una alícuota de la solución hidróxido alcalina y mezclándose conjuntamente. El número de tratamientos válidos y no válidos se clasificó después del procedimiento de detección y amplificación, y el número de ensayos que reaccionó positivamente se determinó como porcentaje de los tratamientos válidos. Todas las reacciones se llevaron a cabo utilizando copias de diez. Un procedimiento separado implicó esencialmente procedimientos similares, pero focalizados en la adición de LiOH en cantidades que dieron lugar a un intervalo de pH ligeramente distinto durante la etapa de preparación de la muestra, y ensayó muestras séricas que contenían el subtipo de HBV B, muestras séricas que contenían el subtipo de HBV C y plasma del grupo HIV-1 O positivo. Los resultados de estos procedimientos se presentan en las Tablas 11 y 12.

**Tabla 11**Establecimiento del límite superior de un intervalo útil de pH

Muestra	Vol. 1,9 N LiOH (µl)	% pos	Nº no vál.	Nº vál.	Nº react.	Promedio pH (n=3)
Grupo HIV-1 O	100	100	0	10	10	8,6
HCV-1a		100	0	10	10	
HBV-B		100	0	10	10	
Suero negativo		0	0	10	0	
Grupo HIV-1 O	120	100	2	8	8	9,2
HCV-1a		100	3	7	7	
HBV-B		100	2	8	8	
Suero negativo		0	0	10	0	
Grupo HTV-1 O	122,5	75	2	8	6	9,5
HCV-1a		88	1	9	8	
HBV-B		100	2	8	8	
Suero negativo		0	5	5	0	
Grupo HIV-1 O	125	0	8	1	0	10,7
HCV-1a		0	10	0	0	
HBV-B		100	7	3	3	
Suero negativo		0	8	2	0	

Tabla 12

Establecimiento del límite superior de un intervalo útil de pH

Muestra	Vol. 1,9N LiOH (µl)	% pos	Nº no vál.	Nº vál.	Promedio pH (n=3)
HBV-B	70	100	0	10	8,02
	85	100	0	10	8,22
	100	90	0	10	8,46
	115	100	0	10	8,73
	130	ninguno	10	0	10,08
HBV-C	70	60	0	10	8,02
	85	70	0	10	8,22
	100	100	0	10	8,46
	115	100	0	10	8,73
	130	ninguno	10	0	10,08
Grupo HIV-1 O	70	80	0	10	8,02
	85	90	0	10	8,22
	100	70	0	10	8,46
	115	80	0	10	8,73
	130	ninguno	10	0	10,08

Los resultados que se presentan en la Tabla 11 confirmaron que el HBV podría detectarse a todos los niveles de pH que se ensayaron, y estableció un límite superior de un intervalo útil de pH para los ensayos que incluían un analito ARN o un control interno de ARN. Más específicamente, la Tabla 11 muestra que las reacciones llevadas a cabo utilizando el subtipo-B HBV como diana dieron lugar a una capacidad de detección del 100% para validar reacciones a todos los niveles de hidróxido alcalino añadido. Sin embargo, el número de ensayos reactivos cayó por debajo de la mitad bajo la condición más alta de pH para el analito HBV. De este modo, resulta menos preferido llevar a cabo la preparación de la muestra que se basa en el choque alcalino cuando la cantidad del hidróxido alcalino añadido provoca que el pH exceda de 10, y cuando el procedimiento incluye una etapa de captura de los ácidos nucleicos analitos de forma preliminar a la amplificación. Los ensayos concebidos para las dianas ARN, o que se basan en controles o calibradores que incluyen ARN, mostraron una sensibilidad diferente de modo distinto a las condiciones de pH cuando se compararon con los resultados utilizando la diana de ADN. Cuando la cantidad de hidróxido alcalino que se utilizó para obtener el choque alcalino dio lugar a una mezcla que tenía un pH final de 9,5 o superior, el número de tratamientos no válidos aumentaron mucho cuando se compararon con los resultados de los ensayos realizados utilizando las condiciones finales de 9,2 del pH e inferiores. Además, el porcentaje de resultados positivos indicó que los ensayos que se llevaron a cabo utilizando el grupo HIV-1 O y las dianas HCV-1a ARN se detectaron en el 100% de las reacciones que daban lugar a resultados válidos cuando el pH final fue de 9,2 o inferior. El porcentaje de valores positivos disminuyó algo cuando el pH final fue de 9,5 y estuvieron completamente comprometidos cuando el pH final fue de 10,7. Aunque sin desear vincularse a ninguna teoría particular con respecto a la operación, estos resultados están de acuerdo con una disminución en la eficiencia de capturar dianas intactas para una amplificación subsiguiente cuando el pH final excedió de aproximadamente 9,5.

Los resultados que se presentan en la Tabla 12 indicaron que todos los tratamientos fueron válidos y que se alcanzaron buenos resultados cuando la cantidad de hidróxido alcalino que se añade a una mezcla de la muestra biológica y de la solución tamponada de detergente (es decir, reactivo de lisis/captura) fue suficiente para dar lugar a un pH en el intervalo de entre un pH de aproximadamente 8,0 hasta menos de aproximadamente 10. Se alcanzaron resultados excelentes cuando la cantidad del hidróxido alcalino que se añadió fue suficiente para dar lugar a un pH en el intervalo de entre un pH de aproximadamente 8,0 hasta aproximadamente 8,7. Los procedimientos que dieron lugar a los resultados presentados en la Tabla 12 no establecieron claramente el límite superior del hidróxido alcalino que pudiera utilizarse para llevar a cabo el choque alcalino. La determinación se realizó basándose en los resultados de la Tabla 11.

Basándose en los resultados adjuntos que se presentan en la presente memoria, existió un límite superior preferido para el pH de una mezcla que incluía una solución de detergente tamponada (es decir, un reactivo de

lisis/captura), una muestra biológica (que es una muestra de sangre, plasma o suero), y un hidróxido alcalino. La cantidad de hidróxido alcalino utilizado en la mezcla, producirá un pH final de entre un pH de 8,0, a un pH de 9,2 (es decir, un pH final del orden de pH 8,0-9,2). Más preferentemente, la cantidad de hidróxido alcalino utilizado en la mezcla, producirá un pH final de por lo menos un pH de 8,0, pero igual o inferior a un pH de aproximadamente 8,73 (es decir, un pH final en el intervalo de pH 8,0 a 8,73). Más preferentemente todavía, la cantidad de hidróxido alcalino utilizado en la mezcla producirá un pH final de por lo menos 8,0, pero igual o inferior a un pH de aproximadamente 8,6 (es decir, un pH final de aproximadamente 8,0-8,6). En todos los casos, la combinación de la muestra biológica, el tampón, y el detergente (es decir, antes de la adición de la composición alcalina llevada a cabo para obtener el choque alcalino), tendrá un pH en el intervalo de entre 6,5 a 8,0, más preferentemente en el intervalo de 7,0 a 8,0, más preferentemente en el intervalo de 7,0 a 7,5. En verdad, cuando la combinación de la muestra biológica, el tampón y el detergente, produjo un pH en el intervalo de 6,5-8,0, al añadir la composición alcalina para obtener el choque alcalino se produjo un aumento de por lo menos 0,2 unidades de pH, y cuando el pH final de la mezcla después del choque alcalino se encontró en el intervalo de un pH de entre 8,2 a 9,2, se alcanzaron resultados excelentes para la preparación de matrices, tanto de ADN como de ARN.

Las demostraciones anteriores centraron la atención en los beneficios de utilizar la técnica del choque alcalino durante la preparación de los ácidos nucleicos a partir de los virus de ADN y ARN. El ejemplo siguiente describe cómo la técnica del choque alcalino se ha extendido a la preparación de los ácidos nucleicos a partir de las bacterias. En esta ilustración, se prepararon los ácidos nucleicos a partir de *Streptococcus agalactiae*, un elemento del Grupo de *Streptococci* B (GBS). Los expertos ordinarios en la materia, apreciarán que es conocida la dificultad en la lisis de las bacterias GBS. Así, la ilustración que se presenta a continuación representa un ensayo riguroso del procedimiento del choque alcalino, de preparación de la muestra, y puede apreciarse como que indica que la técnica es útil para la preparación de ácidos nucleicos a partir de cualquier especie bacteriana.

El Ejemplo 9 detalla procedimientos que se utilizaron para preparar y detectar ácidos nucleicos de bacterias. El procedimiento incluyó una lisis completamente integrada, la captura de la diana, y el protocolo de amplificación y detección llevado a cabo con y sin el choque alcalino. Este aisló el efecto del procedimiento del choque alcalino con respecto a la preparación de las matrices ácido nucleicas de las bacterias. La amplificación *in vitro* se llevó a cabo utilizando un protocolo de Amplificación Mediada por la Transcripción (TMA).

#### **EJEMPLO 9**

##### Preparación y detección de los ácidos nucleicos bacterianos

Se utilizaron bacterias *S. agalactiae* cultivadas para ensayar la eficiencia de la preparación de la muestra utilizando la técnica del choque alcalino. Se recuperaron bacterias que se desarrollaron durante la noche en un medio de cultivo líquido, mediante centrifugación suave, lavándose entonces 10 veces en PBS para eliminar las trazas residuales de ácidos nucleicos que se pudieran haber liberado en el medio de cultivo. El sedimento bacteriano resultante se vertió en PBS, diluyéndose entonces en serie. Se extendieron alícuotas de las distintas diluciones sobre placas de agar sangre para determinar títulos precisos. Las partes restantes de las muestras se utilizaron para la preparación de ácidos nucleicos con y sin el choque alcalino, y las muestras que se prepararon se utilizaron como fuente de matrices ácidos nucleicas en las reacciones de amplificación TMA. Las alícuotas (400 µl) de un reactivo de lisis/captura que contenía 4 pmoles de un oligonucleótido de captura que presentaba SEC ID n°:1, junto con 40 µg de partículas paramagnéticas de un tamaño de 0,7-1,05 µ, (Seradyn, Indianapolis, IN) unido covalentemente a poli-(dT<sub>14</sub>), se combinaron con alícuotas (500 µl) de GBS diluidas, que contenían números conocidos de organismos en tubos de ensayo reactivos de plástico. Los oligonucleótidos de captura pudieron hibridarse simultáneamente al poli-(dT) unido a las partículas y al ARNr bacteriano. Se prepararon las muestras en copias de nueve para cada nivel de bacterias que iba a llevar a cabo el ensayo. Los tubos de ensayo de control que estaban incluidos con cada conjunto, comprendían 500 µl de PBS que contenía 1.000 copias de ARNr purificado bacteriano en vez de células bacterianas. Cada tubo de ensayo recibió entonces 100 µl de un control acuoso, o de 1,6 N NaOH para realizar el choque alcalino. Después de rotar durante 10 segundos, las mezclas se incubaron a 60°C en un baño acuoso durante 15 minutos, seguido por incubación a temperatura ambiente durante otros 15 minutos para permitir la hibridación y la captura de las dianas sobre las partículas magnéticas. Tal como se ha descrito anteriormente, se aplicó un campo magnético para recuperar los complejos de partículas que contenían el oligonucleótido de captura inmovilizado y el ARNr, lavándose dos veces con 1 ml de un tampón de lavado las partículas que se habían recogido. Las partículas lavadas se volvieron a suspender en 75 µl de un reactivo de amplificación que incluía sales, nucleótidos, ribonucleótidos y aproximadamente 5 pmol/reacción de cada uno de los dos cebadores ARNr-específicos que presentaban las secuencias SEC ID n°:3 y SEC ID n°:2. Después de rotar brevemente, la mezcla se incubó a 60°C durante 10 minutos para facilitar la hibridación de los cebadores, equilibrándose entonces a 41,5°C durante 10 minutos. Se añadieron entonces a las mezclas alícuotas del reactivo enzimático precalentado que incluía la transcriptasa inversa (5.600 unidades/por reacción) del Virus Moloney de la leucemia murina (MMLV) y la T7 ARN polimerasa (3.500 unidades/reacción). Después de una hora de incubación a 41,5°C, la reacción finalizó, y los productos de amplificación de ARNr se detectaron utilizando una sonda de hibridación con la secuencia SEC ID n°:4 marcada con éster de acridinio en un ensayo de protección homogénea, tal como se describe, esencialmente, en el Ejemplo 1 de la solicitud publicada de patente internacional n° PCT/US03/18993. Las secuencias de los oligonucleótidos relevantes utilizadas para amplificar y detectar las bacterias de GBS son representadas en la tabla 13.

**Tabla 13**

Oligonucleótidos para detectar un ácido nucleico diana bacteriano

Función oligo	Secuencia oligo	Identificador oligo
Captura de diana	<b>GUUACGGGGCCAUUUUGCCGAGUUCCTTA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</b>	SEC ID n°:1
Promotor T7: cebador	<b>AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGACT ACCTGTGTCGGTTTGCGGT</b>	SEC ID n°:2
Cebador no-T7	GCGAAGTTTAGTAGCGAAGTTAGTGATGT	SEC ID n°:3
Sonda	GCUUCUAGCGAUACAUAUACUCUACCC	SEC ID n°:4

5 Los resultados que se presentan en la figura 5 confirmaron que el procedimiento de preparación de la muestra que incluía un choque alcalino dio lugar a resultados con una mejoría importante respecto a los procedimientos estándares. En cada caso, las muestras se juzgaron como positivas si la señal qmimiluminiscente que indicaba la detección de amplicones de ARNr, sobrepasaba la detectada en los ensayos de control que se llevaron a cabo utilizando 1.000 copias de la matriz de ARNr. Tal como se indica en la figura, los ensayos que se

10 realizaron utilizando por lo menos 20 bacterias GBS como fuente de copias ácido nucleicas, dieron lugar a resultados positivos de forma uniforme, sin tener en cuenta si el choque alcalino estaba incluido en el procedimiento de preparación de la muestra. Sin embargo, aunque el procedimiento de preparación estándar de la muestra fue útil para detectar de modo fidedigno una cantidad de bacterias GBS de 10 aproximadamente, cuando se utilizó conjuntamente con un ensayo *in vitro* de detección y amplificación, el procedimiento que incluía el choque alcalino

15 podría utilizarse para detectar de modo fidedigno una cantidad tan mínima como una simple bacteria. Estas conclusiones se basan en un análisis estadístico, en el que, entre una colección de copias de muestras que recibían una alícuota con el propósito de contener una bacteria, algunas muestras contenían una y otras contenían dos bacterias. Claramente, el procedimiento del choque alcalino de preparación de la muestra mejoró de forma importante la detección del ácido nucleico diana bacteriano.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 20 <110> Gen-Probe Incorporated  
Gao, Kui  
Becker, Michael M  
Wu, Wen  
Linnen, Jeffrey M
- 25 <120> Procedimiento de preparación de una muestra que incorpora un choque alcalino  
<130> GP176  
<150> 60/654.199  
<151> 2005-02-18  
<150> 60/669.192
- 30 <151> 2005-04-06  
<160> 4  
<170> PatentIn versión 3.3  
<210> 1  
<211> 59
- 35 <212> ADN  
<213> *Streptococcus agalactiae*  
<220>  
<221> misc\_feature

	<222> (1)..(26)	
	<223> Secuencia complementaria a ARNr	
	<220>	
	<221> misc_structure	
5	<222> (1)..(26)	
	<400> 1	
	guuacggggc cauuuugccg aguuccttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	59
	<210> 2	
	<211> 50	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus agalactiae</i>	
	<400> 2	
	aatttaatac gactcactat agggagagac tacctgtgtc ggtttgcggt	50
	<210> 3	
15	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus agalactiae</i>	
	<400> 3	
	gcgaagtta gtagcgaagt tagtgatgt	29
20	<210> 4	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> <i>Streptococcus agalactiae</i>	
	<220>	
25	<221> misc_structure	
	<222> (1)..(27)	
	<223> 2' esqueleto 2'metoxi	
	<400> 4	
	gcuucuagcg auacauauac ucuaccc	27

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de tratamiento de una muestra biológica, que comprende las etapas que consisten en:
  - (a) combinar dicha muestra biológica con un tampón pH y un detergente, creándose una primera composición líquida que presenta un primer pH en el intervalo de pH 6,5 a pH 8,0;
  - 5 (b) mezclar con dicha primera composición líquida una composición alcalina, creándose una segunda composición líquida que presenta un segundo pH en el intervalo de pH 8,0 a pH 9,2, en el que dicho segundo pH es por lo menos 0,2 unidades pH superior a dicho primer pH;
  - (c) capturar uno o más ácidos nucleicos a partir de dicha segunda composición líquida sobre un soporte sólido; y
  - (d) aislar el soporte sólido que se presenta capturados en el mismo de dichos uno o más ácidos nucleicos.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho tampón pH y dicho detergente en la etapa (a) son cada uno componentes de una solución de detergente tamponada, y en el que la etapa de combinación comprende la combinación de dicha muestra biológica con una alícuota de dicha solución de detergente tamponada.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa (c) comprende la hibridación de dichos uno o más ácidos nucleicos a uno o más oligonucleótidos inmovilizados o inmovilizables complementarios a los mismos.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicho tampón pH y dicho detergente en la etapa (a), son cada uno componentes de una solución de detergente tamponada, y en el que la etapa de combinación comprende combinar dicha muestra biológica con una alícuota de dicha solución de detergente tamponada.
- 20 5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicha solución de detergente tamponada comprende además dichos uno o más oligonucleótidos inmovilizables o inmovilizados.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la etapa (d) comprende la separación del soporte sólido del material no capturado en el mismo, lavando entonces el soporte sólido que presenta capturado en el mismo cualesquiera de dichos uno o más ácidos nucleicos.
- 25 7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que cada una de las etapas (a)-(d) se lleva a cabo en un recipiente de reacción único.
8. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho detergente es seleccionado de entre el grupo constituido por un detergente aniónico y un detergente no iónico.
- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que dicha composición alcalina comprende una base fuerte seleccionada de entre el grupo constituido por NaOH y LiOH.
10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que cada una de las etapas (a)-(d) se lleva a cabo en un recipiente de reacción único.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que la etapa (b) comprende la agitación (i) mediante sacudida orbital o por agitación vorticial (ii).
- 35 12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho soporte sólido comprende una perla.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicha perla es una perla magnética.
14. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el pKa de dicho tampón de pH se encuentra entre 6,0 y 9,0.
- 40 15. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que por lo menos uno de dichos uno o más ácidos nucleicos capturados en la etapa (c) comprende una molécula de ARN.
16. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que por lo menos uno de dichos uno o más ácidos nucleicos capturados en la etapa (c), comprende una molécula de ADN.
17. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho segundo pH está comprendido en el intervalo de pH 8,2 a pH 9,2.
- 45 18. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la etapa que consiste en:
  - (e) llevar a cabo una reacción de amplificación de ácido nucleico *in vitro*, utilizando como matriz por lo menos uno de dichos uno o más ácidos nucleicos capturados sobre el soporte sólido aislado en la etapa (d).
19. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que dicho segundo pH está comprendido en el

intervalo de pH 8,2 a pH 9,2.

20. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que dicha reacción de amplificación de ácido nucleico *in vitro* es una reacción múltiple.

5 21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dichos uno o más ácidos nucleicos capturados en la etapa (c), comprenden dos o más ácidos nucleicos capturados, en el que dichos uno o más ácidos nucleicos aislados en la etapa (d), comprenden dos o más ácidos nucleicos aislados y en el que dicha reacción múltiple utiliza como matrices dos de dichos dos o más ácidos nucleicos que fueron capturados en la etapa (c) y aislados a continuación en la etapa (d).

10 22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que dichos dos ácidos nucleicos que se utilizan como matrices en dicha reacción múltiple comprenden una molécula de ARN y una molécula de ADN.

23. Procedimiento según la reivindicación 18, en el que cada una de las etapas (a)-(e) se lleva a cabo en un recipiente de reacción único.

24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que dicha etapa (b) comprende la agitación (i) mediante sacudida orbital o (ii) por agitación vorticial.

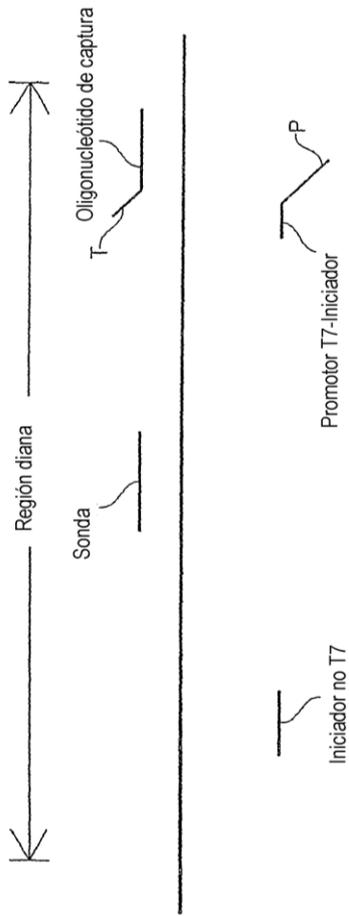


FIG. 1

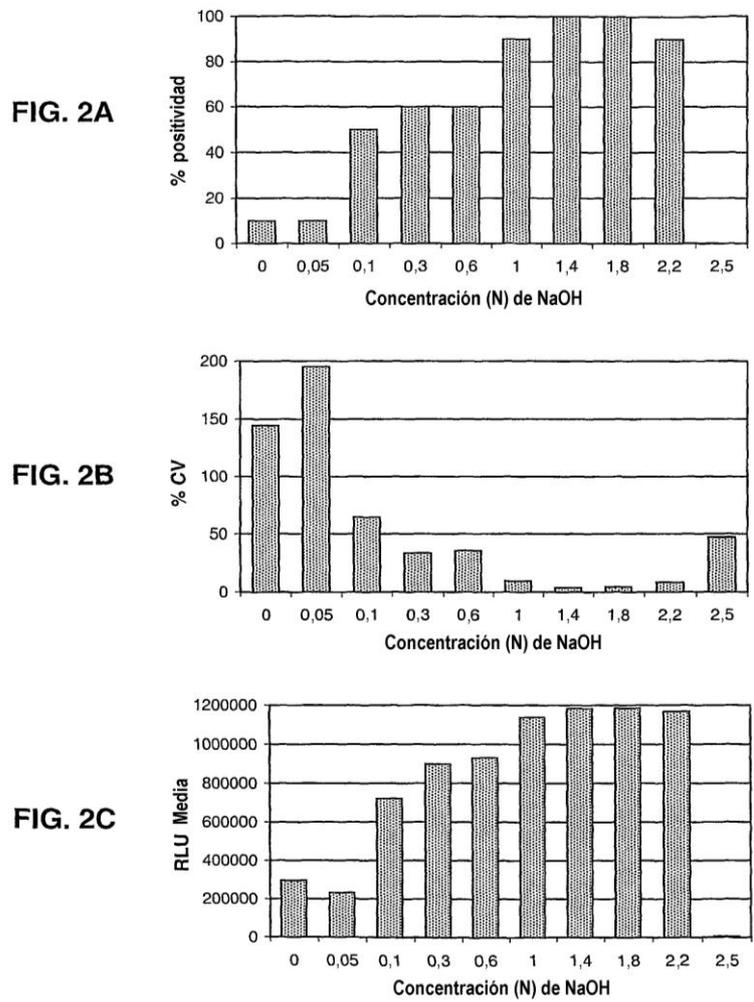


FIG. 3A

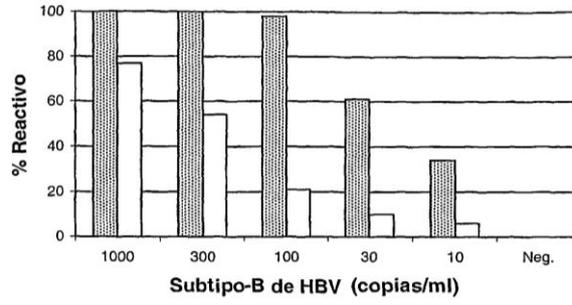


FIG. 3B

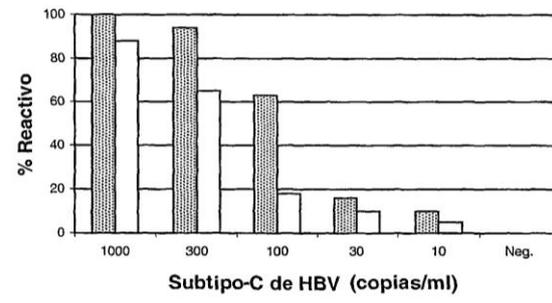


FIG. 3C

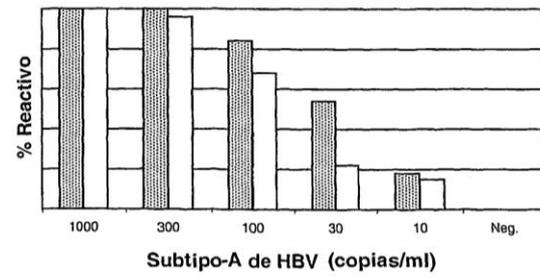


FIG. 4A

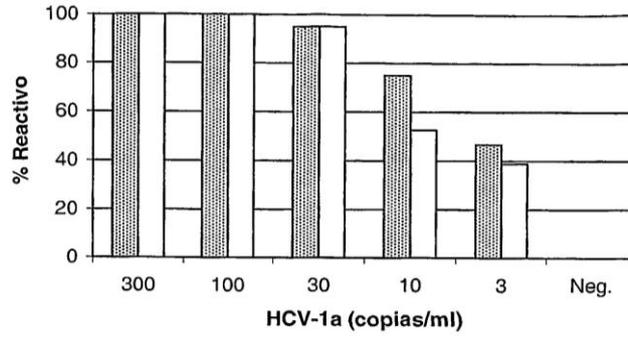


FIG. 4B

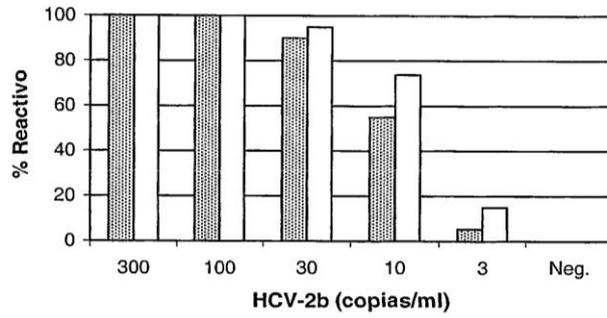
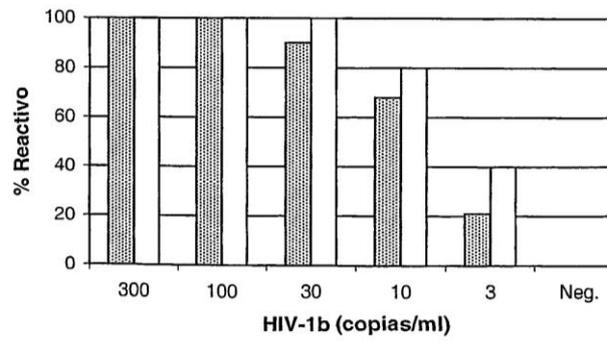


FIG. 4C



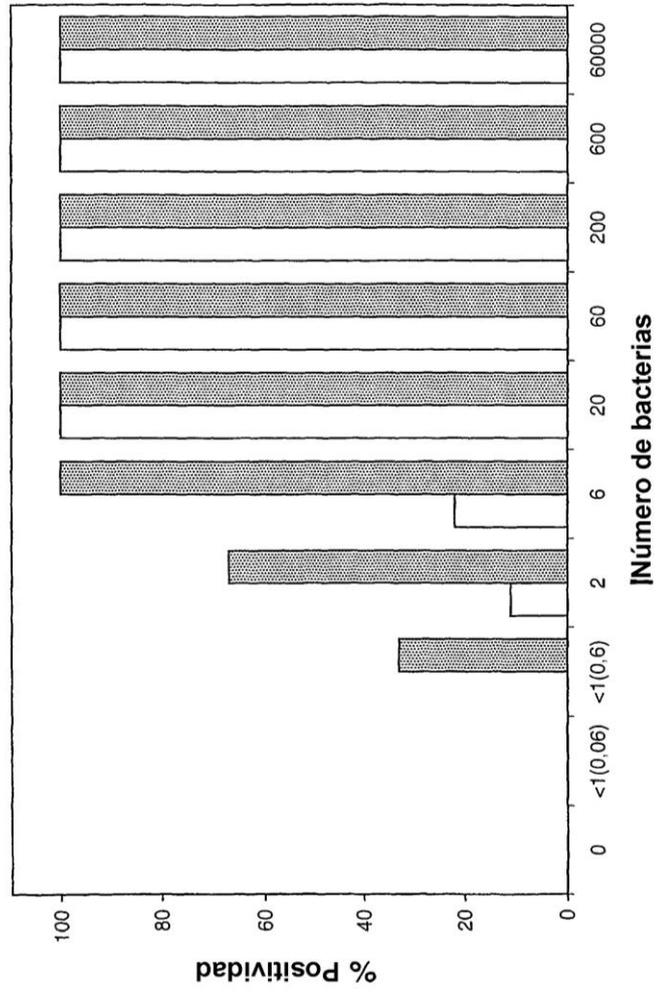


FIG. 5