



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 367 573**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/532 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06764700 .8**

(96) Fecha de presentación : **31.05.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1886141**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2008**

(54) Título: **Procedimiento de marcado o de tratamiento de una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos.**

(30) Prioridad: **01.06.2005 FR 05 51452**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.11.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.11.2011

(73) Titular/es: **BIOMERIEUX S.A.**
chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Etoile, FR

(72) Inventor/es: **Bernal-Mendez, Eloy;**
Laayoun, Ali y
Menou, Lionel

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

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

Procedimiento de marcado o de tratamiento de una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos.

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de purificación de una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos de interés, ácidos ribonucleicos (ARN) o ácidos desoxirribonucleicos (ADN) de síntesis o naturales, que han sido marcados, tal como se define en las reivindicaciones.

Por "ARN o ADN de síntesis", es preciso entender ARN o ADN obtenido mediante una técnica desarrollada por el ser humano, por ejemplo una técnica de amplificación (PCR seguida eventualmente por una transcripción) o de amplificación transcripcional (TMA o NASBA). Por "ARN o ADN natural", es preciso entender ARN o ADN obtenido mediante extracción de una célula, por ejemplo ARN mensajero, ribosómico, de transferencia o ADN genómico.

El estado de la técnica muestra que existen numerosos métodos para marcar dichos nucleótidos, oligonucleótidos o ácidos nucleicos. Los oligonucleótidos y los ácidos nucleicos se designarán todos posteriormente mediante el término polinucleótidos. El marcado puede realizarse durante la síntesis, o mediante incorporación de al menos un nucleótido marcado.

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

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

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

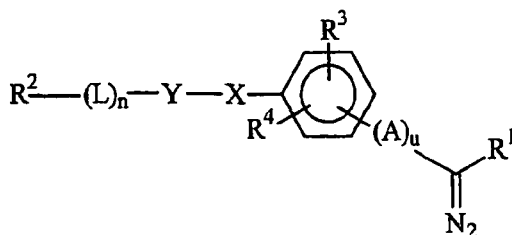
El marcado en el fosfato también se ha utilizado para introducir brazos funcionalizados y marcadores durante la síntesis química de los oligonucleótidos.

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

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

La Solicitante ha desarrollado, desde ahora, una técnica de marcado basada en nuevos reactivos que sean eficaces desde el punto de vista del rendimiento de marcado, que sean específicos a nivel de la posición de marcado y en particular que no afecten a las propiedades de hibridación de las bases implicadas en la formación de la doble hélice, por medio de puentes de hidrógeno, que sean utilizables a la vez para el ADN y el ARM, y finalmente que permiten marcar indistintamente polinucleótidos naturales o preparados mediante amplificación enzimática.

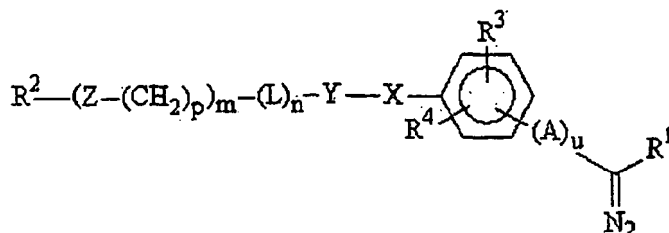
De este modo, en la solicitud de patente WO-A-02/090319 se describen nuevos marcadores que responden a las condiciones mencionadas anteriormente y que utilizan la función diazometilo como función reactiva para el marcado. La función diazometilo (de fórmula $-C(N_2)-$) ya se ha utilizado para la alquilación de los grupos fosfatos, pero se plantean cierto número de problemas. Por un lado, los derivados diazo en general son ellos mismos inestables, lo que plantea problemas para la utilización de estos reactivos de marcado en un kit de marcado, y por otro lado, el producto de acoplamiento es inestable, lo que es redhibitorio si el producto marcado tiene la función de demostrar la presencia de una molécula diana biológica en una muestra cualquiera. Finalmente, los derivados que portan la función diazometilo son insolubles en agua, lo que conduce a utilizar condiciones bifásicas para el acoplamiento con moléculas biológicas, que solamente son solubles y estables en agua o tampones acuosos, pero estas condiciones ralentizan la velocidad de reacción y, por lo tanto, perjudican a la eficacia del acoplamiento. Los nuevos reactivos de marcado de esta invención, descrita en la solicitud WO-A-02/090319, resuelven también estos problemas técnicos. De acuerdo con una realización, el reactivo de marcado estable a la temperatura es de fórmula:



en la que:

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

En una nueva solicitud de patente depositada por la Solicitante con el número FR04/50600 con fecha del 26 de marzo de 2004, y titulada: "Réactifs de marquage, procédés de synthèse de tels réactifs et procédés de détection de molécules biologiques", estas moléculas basadas en la función diazo se han mejorado aún más, siguen siendo estables a la temperatura y de fórmula:



en la que:

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

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

Además, para que este marcado sea aún más eficaz, también es interesante que los polinucleótidos naturales o de síntesis también estén fragmentados. El tamaño reducido de estos ácidos nucleicos los hace más accesibles para el marcado. En lo que concierne a la fragmentación de los ácidos nucleicos, numerosos métodos se describen en el estado de la técnica. En primer lugar, la fragmentación puede ser enzimática, es decir que la fragmentación de los ácidos nucleicos puede realizarse mediante nucleasas (ADNasas o ARNasas). Se generan entonces fragmentos de pequeño tamaño con extremos 3'-OH, 5'-OH, 3'-fosfato, 5'-fosfato.

En segundo lugar, la fragmentación puede ser química. Por ejemplo en el caso de los ADN, puede realizarse la despurinación o la despirimidinación de los ADN, que se fragmentan a continuación en presencia de una base mediante un mecanismo llamado de "beta-eliminación". La fragmentación de los ADN puede realizarse mediante mecanismos de oxidación, de alquilación, de adición de radicales libres, entre otros.

Para fragmentar los ARN o ADN, como se ha descrito respectivamente en la patente US-A-6.376.179 y solicitud de patente WO-A-01/44507 de los inventores, se utilizan cationes metálicos a menudo asociados a moléculas orgánicas utilizadas como catalizadores químicos, por ejemplo imidazol. Esta fragmentación se realiza preferentemente en medio alcalino y genera fragmentos con extremos 3'-fosfato. En este caso, la fijación de un marcador se realiza al nivel del fosfato aislado, de un fragmento de ácido nucleico, liberado durante el corte. No hay ninguna especificidad, pudiendo realizarse la fragmentación en cualquier tipo de ácido nucleico y esto de manera aleatoria. De hecho, el procedimiento de los inventores permite, por ejemplo, la preparación de una sonda de detección. Finalmente, el fosfato solamente es un brazo de unión entre el ácido nucleico y el marcador.

Por "marcador detectable", se entiende al menos un marcador capaz de generar directa o indirectamente una señal detectable. A continuación se da una lista no limitante de estos marcadores:

- las enzimas que producen una señal detectable por ejemplo por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,
- los cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes, colorantes,
- los grupos con densidad electrónica detectable mediante microscopio electrónico o mediante su propiedad eléctrica como conductividad, amperimetría, voltimetría, impedancia,
- los grupos detectables, por ejemplo cuyas moléculas son de un tamaño suficiente para inducir modificaciones detectables de sus características físicas y/o químicas, esta detección puede realizarse mediante métodos ópticos como difracción, resonancia del plasmón superficial, variación de superficie, variación del ángulo de contacto o métodos físicos como espectroscopia de fuerza atómica, efecto túnel,
- las moléculas radiactivas como ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I .

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

Por ejemplo el marcador puede ser un compuesto fluorescente de poco volumen estérico como fluoresceína, dansilo, cromóforos de tipo IR (Li-COR Inc, Lincoln NE, Estados Unidos), derivados de cianinas como Cy5 y Cy3 (Randolph J.B. et al, Nucleic Acids Res., 25(14), p 2923-2929, 1997) y en particular los derivados de Cy5 o bien el rastreador es un hapteno de poco volumen estérico como la biotina o un derivado de abietano (véase la solicitud WO-A-00/07982). Por poco volumen estérico, se entiende un peso molecular inferior a 2000 g/mol (por ejemplo, bis-bioPDAM que tiene un peso de 1064 g/mol). En el caso de un fluoróforo, es preferible trabajar con fluoróforos cuya longitud de onda de excitación sea superior a 450 nm, preferentemente superior a 600 nm.

En el caso en el que el rastreador es un hapteno que no produce ninguna señal por sí mismo como, por ejemplo, biotina, la detección se realiza mediante el reconocimiento de un anti-ligando marcado como se ha descrito anteriormente. En el caso de la biotina, se utiliza preferentemente estreptavidina o un anticuerpo anti-biotina acoplado a un compuesto fluorescente como fluoresceína, Cy5 o ficoeritrina. En el caso del abietano, se utiliza un anticuerpo monoclonal como se describe en la solicitud de patente WO-A-00/07982.

Esto es lo que se llama precursores de marcado. Por "precursor de marcado", se entiende un compuesto que tiene al menos una función reactiva eventualmente protegida diferente de la función diazometilo y compatible con dicha función que permite la fijación de un marcador posteriormente, es decir después de una cualquiera de las etapas del procedimiento y en particular después de la etapa de oxidación con MnO_2 . En particular, el precursor de marcado puede comprender el brazo de unión L, descrito en las fórmulas químicas anteriormente. Un ejemplo de estrategia que utiliza un precursor de marcador está asociado a menudo al caso de la amplificación de señal, pero otras variantes son posibles utilizando los diferentes grupos protectores que son bien conocidos por el experto en la

materia.

También pueden utilizarse sistemas indirectos, como por ejemplo ligandos capaces de reaccionar con un anti-ligando.

5 Los pares ligando/anti-ligando son bien conocidos por el experto en la materia, como es el caso, por ejemplo, de los siguientes pares:

- biotina/estreptavidina,
- hapteno/anticuerpo,
- antígeno/anticuerpo,
- péptido/anticuerpo,
- 10 • azúcar/lectina,
- polinucleótido/complementario del polinucleótido.

En este caso, es el ligando el que porta el agente de unión. El anti-ligando puede ser detectable directamente por los marcadores descritos en el párrafo anterior o ser, el mismo, detectable por un ligando/anti-ligando.

15 Estos sistemas de detección indirectos pueden conducir, en algunas condiciones, a una amplificación de la señal, por ejemplo mediante la utilización de estructura multimérica. Esta técnica de amplificación de la señal es bien conocida por el experto en la materia, y podremos remitirnos a las solicitudes de patente anteriores FR98/10084 o WO-A-95/08000 de la Solicitante o al artículo J. Histochem. Cytochem. 45: 481-491, 1997.

20 Por "estructura multimérica", se entiende un polímero formado por unidades repetidas de sintones químicos o biológicos. Se conocen numerosas variantes de dichas estructuras utilizables en la presente invención, como por ejemplo:

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

30 Otro ejemplo de sistemas indirectos utiliza un enlace covalente específico entre el ligando y el anti-ligando, por ejemplo metilcetona y alcóxiamina. Ejemplos de este sistema se describen en las solicitudes de patente WO-A-00/40590 y WO-A-98/05766. Estos sistemas de detección indirectos pueden conducir, en ciertas condiciones, a una amplificación de la señal y podremos remitirnos a las solicitudes de patente anteriores WO-A-00/07982, WO-A-01/92361 y WO-A-95/08000 para ejemplos de amplificación química utilizando polímeros o a la solicitud WO-A-01/44506 para sistemas de amplificación química mediante apilamiento.

En un modo particular de la amplificación de señal, al menos dos marcadores están presentes en el reactivo de marcado.

35 Además, los reactivos de marcado de la invención son solubles en disolventes polares y miscibles con agua como DMF, DMSO, CH₃CN, THF, DMA (dimetilacetamida), NMP (N-metilpirrolidona), DME (dimetoxietano).

Preferentemente, los reactivos de marcado son solubles en DMSO o agua.

Por disolvente miscible con agua, se entiende un disolvente que es miscible en una proporción de al menos el 5% en volumen con agua o un tampón acuoso que contiene sales.

40 Por "molécula biológica", se entiende un compuesto que posee al menos un sitio de reconocimiento que le permite reaccionar con una molécula diana de interés biológico. Como ejemplo, pueden mencionarse como moléculas biológicas ácidos nucleicos, antígenos, anticuerpos, polipéptidos, proteínas y haptenos. Para la invención, las moléculas biológicas son ácidos nucleicos.

45 La expresión "ácido nucleico" significa una sucesión de al menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que comprenden eventualmente al menos un nucleótido modificado, por ejemplo al menos un nucleótido que comprende

una base modificada, tal como inosina, metil-5-desoxicitidina, la dimetilamino-5-desoxiuridina, desoxiuridina, diamino-2,6-purina, bromo-5-desoxiuridina o cualquier otra base modificada que permita la hibridación. Este polinucleótido también puede estar modificado a nivel del enlace internucleotídico como por ejemplo fosforotioatos, H-fosfonatos, alquil-fosfonatos, a nivel del esqueleto como por ejemplo alfa-oligonucleótidos (FR-A-2 607 507) o PNA (M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc., 114, 1895-1897, 1992 o 2'O-alquil ribonucleótidos. El ácido nucleico puede ser natural o sintético, un oligonucleótido, un polinucleótido, un fragmento de ácido nucleico, un ARN ribosómico, un ARN mensajero, un ARN de transferencia, un ácido nucleico obtenido mediante una técnica de amplificación enzimática tal como:

- 5
- 10
 - PCR (*Polymerase Chain Reaction* [reacción en cadena de la polimerasa]), descrita en las patentes US-A-4.683.195, US-A-4.683.202 y US-A-4.800.159, y su derivada RT-PCR (*Reverse Transcription PCR* [PCR de transcripción inversa]), particularmente en un formato en una etapa, tal como se describe en la patente EP-B-0.569.272,
 - LCR (*Ligase Chain Reaction* [reacción en cadena de la ligasa]), expuesta, por ejemplo, en la solicitud de patente EP-A-0.201.184,
- 15
 - RCR (*Repair Chain Reaction* [reacción de reparación en cadena]), descrita en la solicitud de patente WO-A-90/01069,
 - 3SR (*Self Sustained Sequence Replication* [replicación de secuencia autosostenida]) con la solicitud de patente WO-A-90/06995,
- 20
 - NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification* [amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico]) con la solicitud de patente WO-A-91/02818, y
 - TMA (*Transcription Mediated Amplification* [amplificación mediada por transcripción]) con la patente US-A-5.399.491.

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

- 25 Cada una de estas modificaciones puede tomarse en combinación a poco que al menos un fosfato esté presente en el ácido nucleico.

- 30 El término "hapteno" designa compuestos no inmunógenos, es decir incapaces por sí mismos de promover una reacción inmunitaria mediante producción de anticuerpos, pero capaces de ser reconocidos por anticuerpos obtenidos mediante inmunización de animales en condiciones conocidas, en particular mediante inmunización con un conjugado hapteno-proteína. Estos compuestos tienen generalmente una masa molecular inferior a 3000 Da, y de forma general inferior a 2000 Da y pueden ser, por ejemplo, péptidos glicosilados, metabolitos, vitaminas, hormonas, prostaglandinas, toxinas o diversos medicamentos, nucleósidos y nucleótidos.

- 35 Por "etapa de purificación", se entiende particularmente la separación entre los ácidos nucleicos de los microorganismos y los constituyentes celulares liberados en la etapa de lisis que precede a la purificación de los ácidos nucleicos. Estas etapas de lisis son bien conocidas como ejemplo indicativo, pueden utilizarse los métodos de lisis tales como se describen en las solicitudes de patente:

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

El experto en la materia podrá utilizar otros métodos de lisis bien conocidos tales como los choques térmicos u osmóticos o los tratamientos con agentes caotrópicos, tales como las sales de guanidio, particularmente descrito en la patente US-A-5.234.809, que pertenece a la Solicitante.

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

- 50 La expresión "soporte sólido" tal como se utiliza en este documento incluye todos los materiales sobre los cuales pueden fijarse moléculas que portan la función diazometilo o una función derivada de ésta, tal como productos de

degradación o de reorganización del diazo, azinas por ejemplo, liberadas durante la reacción de marcado y que es necesario eliminar. Pueden utilizarse materiales de síntesis o materiales naturales, eventualmente modificados químicamente, como soporte sólido:

- 5
 - particularmente los polisacáridos, tales como los materiales a base de celulosa, por ejemplo papel, derivados de celulosa tales como acetato de celulosa y nitrocelulosa, o dextrano,
 - particularmente a base de monómeros de tipo estireno, fibras naturales tales como algodón, fibras sintéticas tales como nylon; materiales minerales tales como sílice, cuarzo, vidrios, cerámicas; látex ; partículas magnéticas; derivados metálicos, geles, etc. El soporte sólido puede estar en forma de una placa de microvaloración, de una membrana, de una partícula o de una placa prácticamente plana de vidrio o silicio o derivados. Estos soportes también pueden funcionalizarse mediante grupos de interés, aniónicos y/o ácidos como se explicará posteriormente, que pueden reaccionar con la función diazo o funciones derivadas de ésta.

Como se ha mencionado anteriormente, la técnica anterior también describe la utilización de compuestos que portan funciones diazo con el objetivo de marcar los ácidos nucleicos, mediante unión a sus grupos fosfato, con el fin de hacerles detectables, particularmente mediante lectura de fluorescencia. En este caso, el compuesto diazo porta un grupo fluorescente (Fluoresceína, Cy5) o un grupo (de tipo biotina, hapteno o función reactiva) que permite el enlace covalente o no covalente con una molécula fluorescente.

La técnica anterior describe la utilización de numerosos medios de purificación vinculados a los procesos de marcado. Entre estos medios, puede mencionarse la extracción mediante una fase orgánica, la filtración y la filtración en gel. Sin embargo, la técnica de referencia es la utilización de sílice, en forma de polvo, de gel o de partículas magnéticas, para purificar los ácidos nucleicos antes o después del marcado, en un proceso que desemboca en una detección mediante hibridación específica (concerniente a los chips de ADN, pero también a las placas de ELISA o formas de ensayos rápidos). La purificación antes del marcado permite mejorar considerablemente el rendimiento de marcado, la purificación post-marcado permite mejorar de forma determinante el rendimiento de hibridación y, por lo tanto, la proporción de señal/ruido, necesaria para una buena sensibilidad del ensayo. En efecto, el exceso de marcador utilizado durante el marcado y que no ha reaccionado puede afectar considerablemente a la hibridación.

La purificación sobre sílice impone una etapa de lavado y de elución de la fase sólida. La presencia de tres etapas (fijación/lavado/elución) impone, por lo tanto, transferencias de líquidos, potencialmente factores de contaminación, de pérdida de material, y de forma general, moderadamente automatizable.

Además, este proceso impone la intervención de un operador durante toda la duración de la operación, y la utilización de sales caotrópicas (irritantes).

Para resumir, el problema esencial con el conjunto de estos procedimientos de marcado con etapa de purificación reside en que, para que el marcado sea realmente eficaz, es necesario utilizar un exceso de marcadores para que todos los ácidos nucleicos tengan la posibilidad de estar marcados. La presencia en la solución líquida tratada de ácidos nucleicos marcados pero también de marcadores que no han reaccionado implica que la muestra líquida no puede utilizarse a continuación en una etapa de detección específica. Previamente tiene lugar la eliminación de los marcadores presentes en exceso. Para ello, es posible fijar los ácidos nucleicos sobre partículas de sílice, que contienen eventualmente un material magnético para inmovilizar los ácidos nucleicos, marcados o no, y proceder a su lavado mediante eliminación de los constituyentes no deseables. La patente US-A-5.234.809 de la Solicitante, ya mencionada anteriormente, permite este tipo de procedimiento. Sin embargo, esto genera etapas suplementarias que son onerosas en tiempo de trabajo de los facultativos y en material.

La presente invención consiste, por lo tanto, en utilizar las características químicas de un marcador o de un precursor de marcado para permitir su fijación preferentemente a un ácido nucleico de interés y eventualmente, si dicha fijación no ha tenido lugar, permitir la captura de éste sobre una fase sólida que no conlleva ninguna fase de lavado. Además, los agentes caotrópicos, irritantes, no son necesarios para los procesos de purificación. Del mismo modo, el procedimiento de acuerdo con la invención no necesita ningún sistema suplementario de tipo bomba o centrífuga, para hacer pasar el líquido a través de la fase sólida. El proceso puede necesitar un sistema de imantado o de filtración, si la fase de purificación está compuesta por partículas (magnéticas o no), sin embargo, este dispositivo no es obligatorio y puede utilizarse un proceso totalmente pasivo (paso del medio de marcado sobre la fase sólida). Finalmente el procedimiento es fácilmente automatizable, debido a la utilización de fases sólidas, y a su sencillez (puesta en contacto, incubación, pase a hibridación). El procedimiento puede utilizarse en un sistema que utiliza un flujo continuo, que permite simplificar la integración en un dispositivo autónomo, de tipo "Lab on Card", o completamente integrado en un solo tubo, de la purificación del ácido nucleico a la hibridación en chip. Esto implica la reducción de los riesgos de contaminación, y la disminución del número de consumibles empleados.

A tal efecto, la presente invención se refiere, de acuerdo con una primera realización, a un procedimiento de marcado de ácidos nucleicos de interés contenidos en una muestra biológica, que consiste en:

- a) disponer de un recipiente de reacción,
- b) inmovilizar en toda o parte de la superficie interna del recipiente o de un soporte sólido introducido en este recipiente, moléculas de captura que portan funciones aniónicas y/o ácidas que pueden fijar un marcador o precursor de marcado de los ácidos nucleicos de interés,
- 5 c) introducir en dicho recipiente de reacción la muestra biológica, pero también:
 - 1) al menos un marcador o precursor de marcado de los ácidos nucleicos de interés que comprende una función diazo, y
 - 2) eventualmente cualquier ingrediente necesario para el marcado o pre-marcado de los ácidos nucleicos de interés,
- 10 d) incubar el contenido del recipiente de reacción,
- e) inmovilizar el marcador o precursor de marcado que no ha reaccionado con los ácidos nucleicos de interés mediante reacción de la función diazo con las funciones aniónicas y/o ácidas de las moléculas de captura para formar un enlace covalente, y
- 15 f) utilizar los ácidos nucleicos de interés marcados, es decir aquellos que han reaccionado con dicho marcador o precursor de marcado, para etapas posteriores.

De acuerdo con una segunda realización, la invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de una muestra biológica que contiene una mezcla de ácidos nucleicos de interés y de al menos un marcador o precursor de marcado de los ácidos nucleicos de interés, eventualmente asociado a cualquier ingrediente necesario para el marcado de los ácidos nucleicos de interés, que consiste en:

- 20 a) disponer de un recipiente de reacción,
- b) inmovilizar en toda o parte de la superficie interna del recipiente o de un soporte sólido introducido en este recipiente, moléculas de captura que portan funciones aniónicas y/o ácidas que pueden fijar el marcador o precursor de marcado de los ácidos nucleicos de interés,
- c) introducir en dicho recipiente de reacción la muestra biológica,
- 25 d) incubar el contenido del recipiente de reacción,
- e) inmovilizar el marcador o precursor de marcado que no ha reaccionado con los ácidos nucleicos de interés mediante fijación sobre las moléculas de captura, realizándose la fijación del marcador o precursor de marcado que no ha reaccionado con los ácidos nucleicos de interés, sobre las moléculas de captura, mediante un enlace covalente, y
- 30 f) utilizar los ácidos nucleicos de interés marcados, es decir aquellos que han reaccionado con dicho marcador o precursor de marcado, para etapas posteriores.

En los dos casos particulares descritos anteriormente, la fijación del marcador o precursor de marcado, que no ha reaccionado con las moléculas biológicas de interés, a las moléculas de captura se realiza mediante un enlace covalente.

- 35 En una realización particular, y previamente a la etapa a) descrita anteriormente, la muestra biológica es tratada de acuerdo con al menos una de las siguientes etapas:
 - la transferencia desde otro recipiente de reacción aguas arriba,
 - la lisis de un material biológico complejo para hacer a las moléculas biológicas de interés accesibles y/o detectables,
 - 40 • la captura o aislamiento de las moléculas biológicas de interés, y/o
 - el tratamiento de las moléculas biológicas de interés para hacer posible su detección o mejorar su detección; este tratamiento puede consistir, por ejemplo, en un tratamiento térmico.

En otra realización particular, la etapa f) descrita anteriormente viene seguida por al menos una etapa posterior siguiente:

- 45 • la transferencia a otro recipiente de reacción aguas abajo,
- el marcado de las moléculas biológicas de interés pre-marcadas,

- la purificación de las moléculas biológicas de interés marcadas o pre-marcadas, y/o
- la detección de las moléculas biológicas de interés marcadas e hibridadas a sondas de captura.

La detección de las moléculas biológicas de interés puede realizarse, por ejemplo, de manera interesante en fase homogénea, con o sin hibridación con una molécula de detección (por ejemplo una sonda nucleica).

- 5 En todos los casos particulares anteriores, es posible que la superficie interna del recipiente o el soporte sólido introducido en este recipiente porten funciones aniónicas y/o ácidas, y el marcador o precursor de marcado comprenda una función diazo (-N=N).

En esta última realización, las funciones portadas por la superficie interna del recipiente o el soporte sólido introducido en este recipiente están constituidas por funciones carboxílicas y/o sulfónicas.

- 10 En todos los casos particulares, las moléculas biológicas de interés están constituidas por ácidos nucleicos y/o fragmentos de ácidos nucleicos.

En esta última realización, los ácidos nucleicos y/o los fragmentos de ácidos nucleicos están constituidos por ADN, y ARN, polímeros quiméricos de ADN-ARN, que pueden contener opcionalmente al menos un nucleótido tiofosfato, un LNA, un 2'-O-Me y/o un derivado de metilfosfonatos. En la invención, donde las moléculas biológicas de interés son ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico, previamente a la etapa a), definida anteriormente, la muestra biológica es tratada de acuerdo con al menos una de las siguientes etapas:

- 15
- la transferencia desde otro recipiente de reacción aguas arriba,
 - la lisis del material biológico complejo, contenido por la muestra biológica, para hacer accesibles a los ácidos nucleicos,
- 20
- la extracción de los ácidos nucleicos a partir del material biológico complejo,
 - la amplificación específica de los ácidos nucleicos de interés,
 - la fragmentación de dichos ácidos nucleicos de interés o amplicones, y/o
 - la transcripción, o la retrotranscripción de un ácido nucleico de interés, sin fenómeno de amplificación notable.

- 25 Siempre en el mismo caso particular, la etapa f), definida anteriormente, viene seguida por al menos una etapa posterior siguiente:

- la transferencia a otro recipiente de reacción aguas abajo,
 - el marcado de los ácidos nucleicos pre-marcados,
 - la purificación de los ácidos nucleicos marcados o pre-marcados,
- 30
- la detección de los ácidos nucleicos marcados o pre-marcados, hibridados a sondas de captura,
 - la transcripción, o la retrotranscripción de un ácido nucleico de interés, sin fenómeno de amplificación notable, y/o
 - la detección en fase homogénea de los ácidos nucleicos marcados o pre-marcados, con o sin utilización de sondas de detección.

- 35 De acuerdo con otra realización de la invención, las moléculas de captura están presentes en exceso con respecto a los marcadores, y los marcadores están presentes en exceso con respecto a los ácidos nucleicos de interés que se van a marcar.

Más particularmente, las moléculas de captura están presentes en exceso con respecto a los marcadores libres que no reaccionan con los ácidos nucleicos, y los marcadores están presentes en exceso con respecto a los ácidos nucleicos que se van a marcar.

- 40 Para permitir la detección y/o la cuantificación y/o la purificación del ácido nucleico de interés, el ácido nucleico marcado es capaz de formar un complejo suficientemente complementario de la diana para hibridarse específicamente en función de las condiciones de la reacción, y particularmente de la temperatura o de la salinidad del medio de reacción.

- 45 Por su parte, sin que, no obstante, esta reacción sea específica, los marcadores que no han reaccionado o marcadores libres, conservan su función reactiva intacta y son, por lo tanto, adecuados para reaccionar

posteriormente con las moléculas de captura que portan, a su vez, una función reactiva complementaria. La función reactiva y la función reactiva complementaria forman, por lo tanto, un enlace covalente, lo que permite la inmovilización de los marcadores libres, no conteniendo entonces la muestra biológica más que marcadores asociados a los ácidos nucleicos.

- 5 Las figuras adjuntas muestran las diferentes etapas del procedimiento de purificación de acuerdo con la invención. Éstas representan una realización particular y no puede considerarse que limiten el alcance de la presente invención.

10 La figura 1 representa una vista en corte transversal de un recipiente de reacción en el que se realiza el procedimiento de purificación. Este recipiente comprende una tapa superior y un cuerpo inferior ahuecado para crear un espacio en el que el procedimiento, de acuerdo con la invención, puede realizarse. Este espacio comprende un canal de arrastre a la izquierda que permite la entrada de la muestra biológica a tratar y un canal de descarga a la derecha que permite la salida de dicha muestra biológica tratada. El espacio interno del recipiente está tratado o está revestido para exhibir moléculas de captura que portan funciones reactivas carboxílicas. El espacio interno de la tapa también podría someterse también al tratamiento. Como se ha mencionado anteriormente, el canal de arrastre permite la introducción según la flecha de una muestra biológica líquida, que contiene, entre otros, ácidos nucleicos y marcadores, que portan una función diazo. En el caso representado en esta figura, los ácidos nucleicos aún no están marcados, pero también es posible que puedan ponerse previamente en contacto con los marcadores.

20 La figura 2 representa una vista idéntica a la figura 1, en la que la muestra biológica presente en el espacio interno del recipiente de reacción contiene ácidos nucleicos marcados y marcadores libres, es decir que no han reaccionado con los ácidos nucleicos. Debido a que los marcadores están presentes en exceso con respecto a los ácidos nucleicos, todos estos ácidos nucleicos se marcarán, siendo la contrapartida que los marcadores libres son numerosos.

25 La figura 3 sigue siendo idéntica a las figuras 1 y 2, pero se remarca que, después de cierto lapso, en general en el caso de la bis-BioPDAM, de al menos unos diez minutos pero inferior a una hora, los marcadores libres están mayoritariamente unidos a las funciones reactivas carboxílicas presentes en el espacio interno del recipiente. Por mayoritariamente se entiende que los marcadores libres son capturados para descender por debajo de la concentración inhibitoria (inferior a 2 mM). Es muy evidente que estas funciones reactivas están presentes en exceso con respecto a los marcadores libres que no han reaccionado con los ácidos nucleicos.

30 La figura 4 sigue siendo idéntica a las figuras 1 a 3. Como se ha mencionado anteriormente, el canal de salida permite la salida según la flecha a la derecha de la figura de la muestra biológica líquida tratada, que contiene, entre otros, ácidos nucleicos marcados pero no marcadores libres.

La figura 5 representa la fórmula desarrollada de la molécula N,N'-Bis (13-biotinoilamino-4,7,10-trioxatridecil)-5-(diazometil)isofalamida, también llamada en lo sucesivo "bis-BioPDAM" para facilitar la comprensión del texto.

35 Finalmente, la figura 6 representa la fórmula desarrollada de la molécula N,N'-Bis(13-biotinoilamino-4,7,10-trioxatridecil)-5-(dimetoximetil)isofalamida, también llamada en lo sucesivo "acetal" para facilitar la comprensión del texto.

Ejemplo 1 - Marcado y purificación en partículas carboxílicas del producto de amplificación por RT-PCR seguido de un análisis en chip de ADN (Affymetrix, Santa Clara, CA):

40 En el presente ejemplo, la fijación de los marcadores libres no se realiza directamente sobre un soporte sólido, sino que permite controlar la validez del concepto de la invención ensayando la reactividad de los marcadores con partículas magnéticas)

A - PCR Influenza B:

45 Este experimento se realiza en un modelo llamado "Influenza B". Este nombre designa a los amplicones generados mediante RT-PCR a partir de una secuencia de 190 bases de un fragmento del gen del ARN del virus de la gripe (influenza) B.

50 Las condiciones de la preparación de las extracciones, la extracción de los ARN virales, su amplificación y la secuencia de los cebadores se describen en el artículo "Effectiveness of Reverse Transcription-PCR, Virus Isolation, and Enzyme-linked Immunosorbent Assay for diagnosis of Influenza A Virus Infection in different Age Groups", Steining C. et al., J. Clin. Microbiol., (2002); 40(6), 2051-2056.

La RT-PCR se realiza utilizando como matriz de partida preparaciones de ARN viral (10^3 copias por amplificación) con el kit Titan One Tube RT-PCR System (Roche Diagnostic Corporation, Basilea, Suiza, Referencia: 11 855 476 001) con 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido, 0,3 μ M de cebadores y 0,4 μ l de enzima.

Los parámetros del ciclo de la RT-PCR son los siguientes: 60°C durante 30 minutos para realizar la reacción de

transcripción inversa, a continuación 40 ciclos de acuerdo con el siguiente protocolo: 94°C durante 20 segundos, a continuación 50°C durante 30 segundos y finalmente 72°C durante 30 segundos, a continuación 4°C hasta la detención del termociclador.

- 5 Los amplicones obtenidos de la RT-PCR descrita anteriormente se designan en lo sucesivo mediante los términos "PCR *Influenza B*".

B - Marcado en fase homogénea (protocolo de referencia):

El marcado en fase homogénea se utiliza como técnica de referencia o de "control" con respecto a la invención.

El protocolo se ha desarrollado utilizando una concentración final de marcador suficiente (2 mM) para permitir un marcado suficiente del ADN, pero inferior al umbral a partir del cual el marcador libre afecta a la hibridación.

- 10 Un volumen de 5 µl de PCR *Influenza B*, se mezcla con 5 µl de N,N'-Bis(13-biotinoilamino-4,7,10-trioxatridecil)-5-(diazometil)isofotalamida, en lo sucesivo denominada "bis-BioPDAM", véase la figura 5, se diluye a 6 mM en dimetilsulfóxido, en lo sucesivo designado como "DMSO", y 5 µl de H₂O, y a continuación se incuba 10 minutos a 80°C.

- 15 El medio de reacción se pone en contacto a continuación con el chip de ADN (Affymetrix, Santa Clara, CA) para la etapa de hibridación utilizando el protocolo del proveedor. El chip de ADN utilizado está diseñado para el análisis de la región amplificada durante la RT-PCR. Una descripción del protocolo de hibridación así como una descripción de las tecnologías utilizadas para el análisis de los resultados es descrita por A. Troesch et al.: "Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays" J. Clin. Microbiol. (1999), 37, 49-55.

- 20 La lectura de la fluorescencia emitida en la superficie del chip de ADN después de marcado e hibridación, así como la generación de los datos en términos de intensidad de la señal y del porcentaje de homología, se realizan mediante los sistemas de lectura y el programa informático suministrado por los sistemas Genechip® Instrument system y Genechip Information System® (Affymetrix, Santa Clara, CA).

- 25 El sistema de lectura proporciona intensidades de señal y ruido de fondo expresadas en RFU ("Relative Fluorescent Units" [unidades de fluorescencia relativa]). El porcentaje de homología viene dado con respecto a una secuencia de referencia (correspondiente a la secuencia de la diana amplificada, obtenida mediante secuenciación).

Los resultados en términos de intensidad mediana de la señal (I), del ruido de fondo (B) y del porcentaje de homología (% de homología) se agrupan en una tabla de resultados.

- 30 De manera general, se considera que un porcentaje de homología superior al 90% es un resultado satisfactorio, aunque se busca en general un resultado superior al 95%. Una intensidad elevada con un ruido de fondo reducido (Proporción I/B elevada) es el segundo resultado buscado en los desarrollos.

C - Marcado en fase homogénea a concentración de marcador inhibitoria (control):

En este experimento, se utiliza una mayor concentración final del marcador bis-BioPDAM (5 mM). Esta concentración afecta a la hibridación en ausencia de purificación, pero permite obtener una señal superior (debido a un rendimiento de marcado mayor) cuando este mismo medio de reacción se purifica eficazmente.

- 35 Un volumen de 5 µl de PCR *Influenza B* se mezcla con 5 µl de bis-BioPDAM, se diluye a 15 mM en DMSO, y 5 µl de H₂O, y a continuación se incuba 10 minutos a 80°C.

El medio de reacción se pone en contacto a continuación con el chip para la hibridación y la detección de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo B anteriormente.

D - Marcado en fase homogénea con purificación en membrana de sílice (control):

- 40 En este experimento, se utilizaron columnas de purificación de ácidos nucleicos que contienen una membrana de sílice comercializada por QIAgen GmbH (Hilden, Alemania). Esta técnica constituye el método de referencia. En este caso, el protocolo de marcado se realizó utilizando una mayor concentración final de bis-BioPDAM (5 mM), concentración de marcador que afecta a la hibridación en chip en ausencia de purificación eficaz.

- 45 Un volumen de 5 µl de PCR *Influenza B* se mezcla con 5 µl de bis-BioPDAM, se diluye a 15 mM en DMSO y 5 µl de H₂O, y a continuación se incuba 10 minutos a 80°C.

El medio de reacción se purifica a continuación mediante el kit QIAQuick (QIAgen GmbH, Hilden, Alemania. Referencia: 28 306) utilizando el protocolo recomendado por el proveedor, y a continuación se pone en contacto con el chip de ADN para la hibridación de acuerdo con el protocolo descrito en el párrafo B ya descrito.

E - Marcado en fase homogénea con purificación en partículas carboxílicas (invención):

En este experimento, un producto de marcado, obtenido utilizando una mayor concentración final de bis-BioPDAM (5 mM) se purifica con una fase sólida carboxílica (invención). La concentración de marcador de 5 mM afecta a la hibridación en ausencia de una etapa de purificación eficaz. Esta es, por lo tanto, la concentración retenida para estudiar la eficacia de la purificación.

Un volumen de 5 µl de PCR *Influenza B* se mezcla con 5 µl de bis-BioPDAM, se diluye a 15 mM en DMSO y 5 µl de H₂O, y a continuación se incuba 10 minutos a 80°C.

El medio de reacción se incuba a continuación 10 minutos a temperatura ambiente utilizando 2,5 mg de *Standard Carboxyl-Adembeads* (Referencia: 0213, Ademtech, Pessac, Francia, denominadas en lo sucesivo "partículas carboxílicas"), las partículas se separan a continuación mediante imantado del medio de reacción, y éste se pone en contacto con el chip de ADN para la etapa de hibridación de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente en el párrafo B.

F - Resultados y conclusión:

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

Tabla 1: Estudio comparativo del procedimiento que utiliza la invención con respecto a los controles sin purificación o con purificación en membrana de sílice.

Procedimiento de marcado	% de homología	I	B	I/B
B - Marcado en fase homogénea (referencia)	93,1	1699	308	5,5
C - Marcado en fase homogénea a concentración de marcador (5 mM) que afecta a la hibridación (control):	47,5	135	339	0,3
D - Marcado en fase homogénea con purificación en membrana de sílice (control):	97,9	5905	297	19,9
E - Marcado en fase homogénea con purificación en partículas carboxílicas (invención)	97,9	8167	434	18,7

Los resultados se expresan en porcentaje de homología, en intensidad de la señal (I) y en ruido de fondo (B)

En conclusión, los resultados obtenidos con el procedimiento de referencia son prácticamente idénticos a los obtenidos con la purificación en membrana de sílice. Por otro lado, se observa que los resultados obtenidos utilizando la "purificación carboxílica" son superiores en términos de intensidad (I) a los obtenidos sin purificación, o utilizando una purificación en membrana de sílice. Un aumento de la señal en el chip permite tener un ensayo más robusto, menos dependiente de factores que afectan localmente al ruido de fondo (polvos, precipitados que aparecen en el chip, por ejemplo). Por otro lado, la facilidad operatoria del protocolo de purificación facilita considerablemente el proceso de manipulación.

Ejemplo 2: Marcado y purificación en partículas carboxílicas del producto de amplificación por RT-PCR marcado y contaminado con un equivalente no de reacción del marcador:

Este ejemplo sirve de demostración de que el enlace que se crea entre el soporte sólido y la molécula de marcado

se debe a una captura covalente del marcador y no a su adsorción a dicho soporte.

A - Objetivo:

5 En este experimento, un producto de marcado purificado se contamina con un intermedio de síntesis de bis-BioPDAM, N,N'-Bis(13-biotinoilamino-4,7,10-trioxatridecil)-5-(dimetoximetil)isofalamida, denominada en lo sucesivo "acetal", figura 6. Este reactivo no porta la función Diazometilo y no puede, por lo tanto, reaccionar con las funciones carboxílicas.

Este reactivo presenta, por el contrario, la totalidad de la estructura de bis-BioPDAM, y puede adsorberse, por lo tanto, a las superficies de forma similar a bis-BioPDAM, en el caso en el que los fenómenos de purificación observados son fenómenos de adsorción no específica, en lugar de fenómenos que emplean uniones específicas.

10 El acetal afecta a la hibridación de los ácidos nucleicos de la misma forma que bis-bioPDAM, lo que permite juzgar la calidad de su eliminación.

B - Experimento:

15 Un volumen de 5 µl de PCR *Influenza B* se mezcla con 5 µl de bis-BioPDAM, se diluye a 15 mM en DMSO y 5 µl de H₂O, y a continuación se incuba 10 minutos a 80°C. El medio de reacción se purifica a continuación con ayuda del kit QIAQuick (QIAgen GmbH, Hilden, Alemania. Referencia: 28 306) utilizando el protocolo del proveedor.

Esta preparación se realiza en paralelo en varias alícuotas de una muestra que ha sufrido una amplificación por RT-PCR, para tener un volumen de producto purificado suficiente para realizar varios controles. Los productos de purificación se mezclan, para suprimir las variaciones inducidas por la preparación de dicha muestra.

20 Fracciones de 15 µl, correspondientes al volumen de eluato obtenido después de purificación mediante la purificación en membrana de sílice de la mezcla, se tratan a continuación de la siguiente manera:

- a) Hibridación directa en chip Affymetrix como se ha descrito en el ejemplo 1/B (Referencia).
- b) Adición de 5 mM de acetal y a continuación hibridación en chip Affymetrix como se ha descrito en el ejemplo 1/B (Control de la inhibición mediante acetal).
- 25 c) Purificación 10 minutos a temperatura ambiente en partículas carboxílicas, tal como se ha descrito en el ejemplo 1/E y a continuación hibridación en chip Affymetrix como se ha descrito en el ejemplo 1/B (Control de la acción de las partículas sobre el producto de marcado).
- d) Adición de 5 mM de acetal y a continuación purificación 10 minutos a temperatura ambiente en partículas carboxílicas tal como se ha descrito en el ejemplo 1/E e hibridación en chip Affymetrix como se ha descrito en el ejemplo 1/B (control de la acción de las partículas sobre el acetal).

30 C - Resultados y conclusión:

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

Tabla 2: Estudio comparativo del procedimiento que utiliza la invención (C y D) con respecto a dos controles (A y B) que no la utilizan, en presencia de un compuesto inhibidor, que no puede reaccionar en la función carboxílica (B y D)

Procedimiento de marcado	% de homología	I	B	I/B
A - Referencia	93,1	1699	308	5,5
B - Control de la inhibición mediante acetal	39,5	127	260	0,5
C - Control de la acción de las partículas carboxílicas sobre el marcador	97,4	1911	302	6,3
D - Control de la acción de las partículas carboxílicas sobre el acetal	50,0	525	369	1,4

Los resultados también se expresan en porcentaje de homología, en intensidad de la señal (I) y en ruido de fondo (B).

En conclusión, el derivado acetal afecta a la hibridación de los ácidos nucleicos (B y D), haya habido o no pre-tratamiento con partículas carboxílicas (D). Este resultado indica que, en ausencia de reacción con la función carboxílica, el acetal no puede reaccionar. Por lo tanto, no hay supresión notable del compuesto acetal mediante adsorción. Puede concluirse entonces que la reacción Diazometilo-ácido carboxílico que desemboca en un enlace covalente es el principal mecanismo que interviene en la purificación del medio de reacción.

Ejemplo 3: Marcado y purificación en membrana carboxílica del producto de amplificación por RT-PCR marcado:

A - Objetivo:

En este experimento, un producto de marcado, obtenido utilizando una concentración final de bis-BioPDAM de 5 mM, se purifica utilizando una membrana que porta funciones carboxílicas (Biodyne C, Referencia S60314 Pall Gelman Sciences, Nueva York, Estados Unidos, denominada en lo sucesivo Biodyne C). La concentración de marcador de 5 mM afecta a la hibridación en ausencia de una etapa de purificación eficaz. Esta es, por lo tanto, la concentración retenida para estudiar la eficacia de la purificación.

B - Experimento:

Un volumen de 5 µl de PCR Influenza B se mezcla con 5 µl de bis-BioPDAM, se diluye a 15 mM en DMSO y 5 µl de H₂O, y a continuación se incuba 10 minutos a 80°C. Este experimento se realiza por duplicado, y a continuación los productos de marcado se mezclan y se dividen en dos volúmenes iguales para limitar los efectos potencialmente negativos debidos a una variabilidad en el protocolo operatorio. El medio de reacción se incuba a continuación 10 minutos a temperatura ambiente utilizando 6 mm² de Biodyne C (b), o se deja a temperatura ambiente (referencia a), y a continuación este medio tratado de este modo se pone en contacto con el chip de ADN para la etapa de hibridación de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 1/B.

C - Resultados y conclusión:

Los resultados en términos de porcentaje de homología, de intensidad de la señal (I) y de ruido de fondo (B) se agrupan en la siguiente tabla 3:

Tabla 3: Estudio comparativo de un procedimiento que utiliza la invención (b) con respecto a una referencia que no la utiliza (a).

Procedimiento de marcado	% de homología	I	B	I/B
a - Referencia	94,7	4252	564	7,5
b - Purificación por membrana carboxílica	94,7	23811	2174	11,0

Los resultados se expresan una vez más en porcentaje de homología, en intensidad de la señal (I) y en ruido de fondo (B).

En conclusión, la membrana Biodyne C, que porta funciones carboxílicas, permite tener una purificación de la muestra de la misma naturaleza que con partículas magnéticas.

Ejemplo 4: Marcado y purificación con un polímero carboxílico del producto de amplificación por RT-PCR marcado:

A - Objetivo:

En este experimento, un producto de marcado obtenido utilizando una concentración final de bis-BioPDAM de 5 mM se purifica utilizando un polímero que porta funciones carboxílicas (*Poly-Acrylic Acid sodium salt* [sal sódica de ácido poliacrílico]) estándar 28000, Referencia 81124, Fluka, Buchs, Suiza; denominado en lo sucesivo APA). Como se ha descrito anteriormente, la concentración de marcador de 5 mM afecta a la hibridación en ausencia de una etapa de purificación eficaz.

B - PCR Myco 16 S:

Este experimento se realiza en un modelo llamado "Myco 16S", que designa los amplicones generados mediante

PCR a partir de una secuencia de 180 bases de un fragmento del gen que codifica el ARN ribosómico 16S de *Mycobacterium tuberculosis*.

Las condiciones para el cultivo, la extracción de las micobacterias así como los cebadores de amplificación vienen dadas por A. Troesch et al.: "Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays" J. Clin. Microbiol. (1999), 37, 49 - 55.

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

Los parámetros del ciclo de la PCR son los siguientes: 95°C durante 4 minutos y a continuación 35 ciclos de amplificación de acuerdo con el siguiente protocolo: 95°C durante 30 segundos, a continuación 55°C durante 30 segundos y finalmente 72°C durante 30 segundos. Finalmente se mantiene a 4°C hasta la parada del termociclador, para evitar una eventual degradación de los amplicones a temperatura ambiente.

La solución que contiene los amplicones obtenidos de la PCR, descrita anteriormente, se denomina en los sucesivos mediante los términos "PCR 16S".

C - Experimento:

Un volumen de 5 μ l de PCR 16S, se mezcla con 5 μ l de bis-BioPDAM, se diluye a 2,5 mM en DMSO y 15 μ l de H₂O, y a continuación se incuba 10 minutos a 80°C. Este experimento se realiza por duplicado, y a continuación los productos de marcado se mezclan y se dividen en dos volúmenes iguales para limitar los efectos potencialmente negativos debidos a una variabilidad en el protocolo operatorio.

El medio de reacción se incuba a continuación 10 minutos a temperatura ambiente (a), o con un resto de 10 μ l de solución al 20% de APA secado en aire al vacío (b), y a continuación se pone en contacto con el chip de ADN para la etapa de hibridación de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 1/B.

D - Resultados y conclusión:

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

Tabla 4: Estudio comparativo de un procedimiento que utiliza la invención (b) con respecto a una referencia que no la utiliza (a).

Procedimiento de marcado	% de homología	I	B	I/B
a - Referencia	97,9	2313	525	4,4
b - Purificación por APA	94,4	8091	928	8,7

En conclusión, el polímero que porta funciones carboxílicas permite tener una purificación de la muestra comparable a la realizada utilizando partículas magnéticas.

Ejemplo 5: Marcado y purificación con un polímero sulfónico, del producto de amplificación por RT-PCR marcado y contaminado con un equivalente no de reacción del marcador;

A - Objetivo:

En este experimento, un producto de marcado, obtenido utilizando una concentración final de bis-BioPDAM de 5 mM, se purifica utilizando un polímero que porta funciones sulfónicas (Referencia 29 256-7, Sigma-Aldrich, Saint-Louis; MI, Estados Unidos, en lo sucesivo denominado Nafion).

B - Experimento:

Un volumen de 5 μ l de PCR 16S, se mezcla con 5 μ l de bis-BioPDAM, se diluye a 2,5 mM en DMSO, y 15 μ l de H₂O, y a continuación se incuba 10 minutos a 80°C. Este experimento se realiza por duplicado, y a continuación los productos de marcado se mezclan y se dividen en dos volúmenes iguales para limitar los efectos potencialmente negativos debidos a una variabilidad en el protocolo operatorio.

El medio de reacción se incuba a continuación:

- 10 minutos a temperatura ambiente (a) o
- con un resto de 10 µl de Nafion al 5% en metanol, secado en aire al vacío (b),

y a continuación se pone en contacto con el chip de ADN para la etapa de hibridación de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 1/B.

5 C - Resultados y conclusión:

Los resultados en términos de porcentaje de homología, de intensidad de la señal (I) y de ruido de fondo (B) se agrupan en la siguiente tabla 5:

Tabla 5: Estudio comparativo de un procedimiento que utiliza la invención (b) con respecto a una referencia que no la utiliza (a).

Procedimiento de marcado	% de homología	I	B	I/B
a - Referencia	97,9	2313	525	4,4
b - Purificación por Nafion	97,2	8887	1002	8,9

Los resultados se expresan, una vez más, en porcentaje de homología, en intensidad de la señal (I) y en ruido de fondo (B).

En conclusión, el polímero que porta funciones sulfónicas permite tener una purificación de la muestra comparable a las obtenidas con partículas magnéticas.

15 Conclusión general:

El procedimiento de acuerdo con la invención se basa en la utilización de la reactividad de la función diazometilo frente a ácidos (función carboxílica en particular) con intención de capturar el exceso de marcador después de la etapa de marcado. Esta reactividad es conocida por el experto en la materia. Puede mencionarse, como ejemplo, 4-(Diazometil)fenoximetil-poliestireno (Referencia 17338, Fluka, Buchs, Suiza) utilizado para enlazar de forma covalente a las proteínas mediante sus enlaces carboxílicos. Esta resina ha sido utilizada por la Solicitante en el marco de experimentos de captura de ácidos nucleicos. La idea de utilizar la reactividad de las funciones diazometilo con respecto al soporte sólido en un proceso de purificación post-marcado es desconocida actualmente.

La reacción se basa en la conservación de la reactividad de la función diazo después de la etapa de marcado. Esta conservación de la reactividad no es en absoluto evidente, ya que una parte de las funciones podía hidrolizarse en el medio de reacción durante la etapa de marcado inicial. El hecho de que una parte no despreciable de los marcadores que no han reaccionado con los ácidos nucleicos sea todavía reactiva, y de que la inmovilización en una fase sólida se realice con un rendimiento suficiente para permitir una hibridación de la muestra, es un resultado sorprendente.

La fuerte reactividad de la función diazo sobre la función carboxílica permite realizar la reacción a temperatura ambiente durante un tiempo limitado a varios minutos. Esta estrategia basada en un enlace covalente es una innovación con respecto a técnicas equivalentes.

Al estar las moléculas de marcadores secuestradas covalentemente en un soporte sólido o en un polímero soluble, no es necesario lavar después de la purificación. La supresión de la etapa de lavado es una innovación con respecto a los procedimientos de purificación existentes.

Al estar basado el procedimiento, que es el objeto de la invención, en una reacción química, es más específico y selectivo que una filtración, que una purificación por exclusión de fase, o que una adsorción sobre soporte sólido. Los riesgos de pérdida de la muestra biológica mediante adsorción se reducen.

Finalmente, el soporte de purificación puede integrarse fácilmente en un consumible, ya sea éste un tubo, en el caso de un procedimiento manual, o un componente de tipo tarjeta, para un protocolo automatizado.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de marcado de ácidos nucleicos de interés contenidos en una muestra biológica, que consiste en:
 - a) disponer de un recipiente de reacción,
 - 5 b) inmovilizar en toda o parte de la superficie interna del recipiente o de un soporte sólido introducido en este recipiente, moléculas de captura que portan funciones aniónicas y/o ácidas, que pueden fijar un marcador o precursor de marcado de los ácidos nucleicos de interés,
 - c) introducir en dicho recipiente de reacción la muestra biológica, pero también:
 - 10 1) al menos un marcador o precursor de marcado de los ácidos nucleicos de interés que comprende una función diazo, y
 - 2) eventualmente cualquier ingrediente necesario para el marcado o pre-marcado de los ácidos nucleicos de interés,
 - d) incubar el contenido del recipiente de reacción,
 - 15 e) inmovilizar el marcador o precursor de marcado que no ha reaccionado con los ácidos nucleicos de interés mediante reacción de la función diazo con las funciones aniónicas y/o ácidas de las moléculas de captura para formar un enlace covalente, y
 - f) utilizar los ácidos nucleicos de interés marcados, es decir los que han reaccionado con dicho marcador o precursor de marcado, para etapas posteriores.
- 20 2. Procedimiento de tratamiento de una muestra biológica que contiene una mezcla de ácidos nucleicos de interés y de al menos un marcador o precursor de marcado de los ácidos nucleicos de interés que comprende una función diazo, eventualmente asociado a cualquier ingrediente necesario para el marcado de los ácidos nucleicos de interés, que consiste en:
 - a) disponer de un recipiente de reacción,
 - 25 b) inmovilizar en toda o parte de la superficie interna del recipiente o de un soporte sólido introducido en este recipiente, moléculas de captura que portan funciones aniónicas y/o ácidas que pueden fijar el marcador o precursor de marcado de los ácidos nucleicos de interés,
 - c) introducir en dicho recipiente de reacción la muestra biológica,
 - d) incubar el contenido del recipiente de reacción,
 - 30 e) inmovilizar el marcador o precursor de marcado que no ha reaccionado con los ácidos nucleicos de interés mediante fijación sobre las moléculas de captura, realizándose la fijación del marcador o precursor de marcado que no ha reaccionado con los ácidos nucleicos de interés, en las moléculas de captura mediante un enlace covalente, y
 - f) utilizar los ácidos nucleicos de interés marcados, es decir los que han reaccionado con dicho marcador o precursor de marcado, para etapas posteriores.
- 35 3. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado porque**, previamente a la etapa a), la muestra biológica es tratada de acuerdo con al menos una de las siguientes etapas:
 - la transferencia desde otro recipiente de reacción aguas arriba,
 - la lisis de un material biológico complejo para hacer a los ácidos nucleicos de interés accesibles y/o detectables,
 - 40 • la captura o aislamiento de los ácidos nucleicos de interés, y/o
 - el tratamiento de los ácidos nucleicos de interés para hacer posible su detección o mejorar su detección.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** la etapa f) viene seguida por al menos una etapa posterior siguiente:
 - la transferencia a otro recipiente de reacción aguas abajo,
 - 45 • el marcado de los ácidos nucleicos de interés pre-marcados,

- la purificación de los ácidos nucleicos de interés marcados o pre-marcados, y/o
 - la detección de los ácidos nucleicos de interés marcados e hibridados en sondas de captura.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la superficie interna del recipiente o el soporte sólido introducido en este recipiente están constituidas por funciones carboxílicas y/o sulfónicas.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** los ácidos nucleicos de interés están constituidos por ácidos nucleicos y/o fragmentos de ácidos nucleicos.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** los ácidos nucleicos y/o los fragmentos de ácidos nucleicos están constituidos por ADN, ARN, polímeros quiméricos de ADN-ARN.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado porque** los ácidos nucleicos y/o los fragmentos de ácidos nucleicos están constituidos por ADN, ARN, polímeros quiméricos de ADN-ARN, que contienen al menos un nucleótido de tiofosfato, un LNA, un 2'-O-Me y/o un derivado de metilfosfonato.
9. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizado porque**, previamente a la etapa a), definida en las reivindicaciones 1 ó 2, la muestra biológica es tratada de acuerdo con al menos una de las siguientes etapas:
- la transferencia desde otro recipiente de reacción aguas arriba,
 - la lisis del material biológico complejo, contenido por la muestra biológica, para hacer accesibles a los ácidos nucleicos,
 - la extracción de los ácidos nucleicos a partir del material biológico complejo,
 - la amplificación específica de los ácidos nucleicos de interés,
 - la fragmentación de dichos ácidos nucleicos de interés o amplicones, y/o
 - la transcripción, o la retrotranscripción de un ácido nucleico de interés, sin fenómeno de amplificación notable.
10. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizado porque** la etapa f), definida en las reivindicaciones 1 ó 2, viene seguida por al menos una etapa posterior siguiente:
- la transferencia a otro recipiente de reacción aguas abajo,
 - el marcado de los ácidos nucleicos pre-marcados,
 - la purificación de los ácidos nucleicos marcados o pre-marcados,
 - la detección de los ácidos nucleicos marcados o pre-marcados, hibridados a sondas de captura,
 - la transcripción, o la retrotranscripción de un ácido nucleico de interés, sin fenómeno de amplificación notable, y/o
 - la detección en fase homogénea de los ácidos nucleicos marcados o pre-marcados, con o sin utilización de sondas de detección.

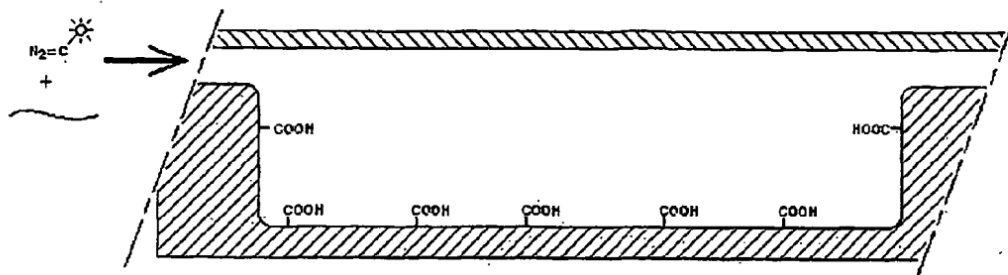


Fig. 1

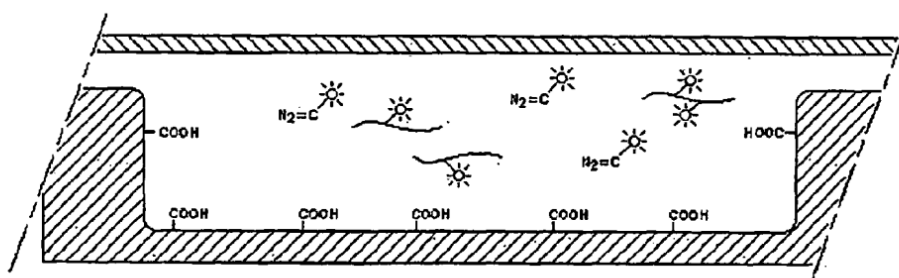


Fig. 2

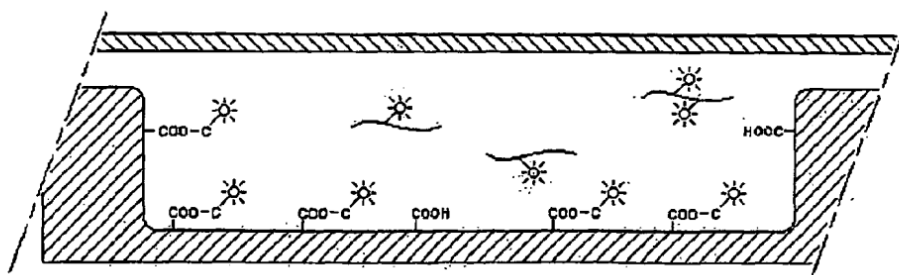


Fig. 3

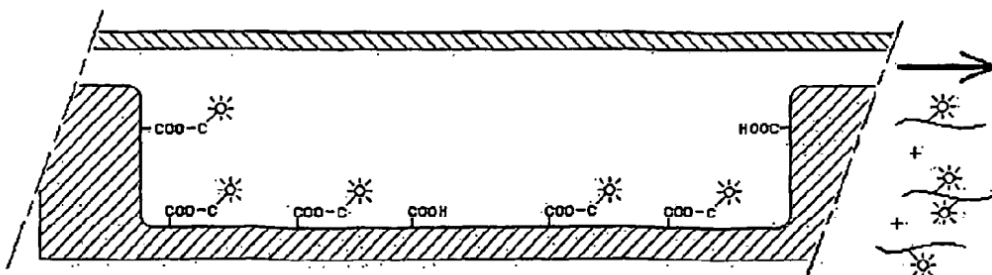


Fig. 4

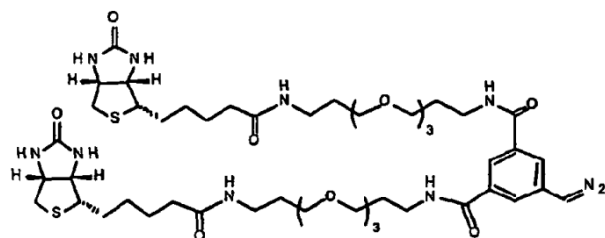


Fig. 5

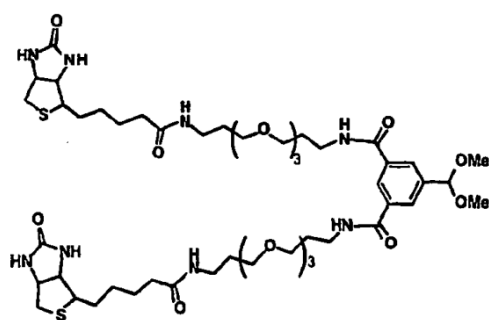


Fig. 6

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente Europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

5 Documentos de patentes citados en la descripción

- EP 0329198 A [0008]
- EP 0302175 A [0008]
- EP 0097373 A [0008]
- EP 0063879 A [0008]
- US 5449767 A [0008]
- US 5328824 A [0008]
- WO 9316094 A [0008]
- DE 3910151 A [0008]
- EP 0567841 A [0008]
- EP 0286898 A [0008]
- WO 02090319 A [0011]
- FR 0450600 [0012]
- US 6376179 A [0015]
- WO 0144507 A [0015]
- WO 0007982 A [0018] [0019] [0026]
- FR 9810084 [0024]
- WO 9508000 A [0024] [0026]
- EP 0561722 A [0025]
- EP 0669991 A [0025]
- WO 0192361 A [0025] [0026]
- EP 0827552 A [0025]
- US 4507466 A [0025]
- US 4568737 A [0025]
- US 6083708 A [0025]
- WO 0040590 A [0026]
- WO 9805766 A [0026]
- WO 0144506 A [0026]
- FR 2607507 A [0032]
- US 4683195 A [0032]
- US 4683202 A [0032]
- US 4800159 A [0032]
- EP 0569272 B [0032]
- EP 0201184 A [0032]
- WO 9001069 A [0032]
- WO 9006995 A [0032]
- WO 9102818 A [0032]
- US 5399491 A [0032]
- WO 0060049 A [0036]
- WO 0005338 A [0036]
- WO 9953304 A [0036]
- WO 9915621 A [0036]
- US 5234809 A [0037] [0044]
- US 4672040 A [0038]
- US 5750338 A [0038]
- WO 9745202 A [0038]
- WO 9935500 A [0038]

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- **Jencks W.P. et al.** *J. Amer. Chem. Soc.*, 1960, vol. 82, 1778-1 785 [0009]
- Reporter groups for the analysis of nucleic acid structure. **O'Donnel; Mc Laughlin.** *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids.* Oxford University Press, 1996, 216-243 [0009]
- **Randolph J.B.** *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25 (14), 2923-2929 [0018]
- *J. Histochem. Cytochem.*, 1997, vol. 45, 481-491 [0024]
- **M. Egholm et al.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, vol. 114, 1 895-1897 [0032]
- **Steininger C. et al.** Effectiveness of Reverse Transcription-PCR, Virus Isolation, and Enzyme-linked Immunosorbent Assay for diagnosis of Influenza A Virus Infection in different Age Groups. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, vol. 40 (6), 2051-2056 [0065]
- **A. Troesch et al.** Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, vol. 37, 49-55 [0072]
- **A. Troesch et al.** Mycobacterium species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, vol. 37, 49-55 [0106]