

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 477**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**B01L 3/00** (2006.01)  
**G01F 23/04** (2006.01)  
**G01N 33/558** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01947639 .9**  
96 Fecha de presentación: **06.07.2001**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1325151**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.07.2003**

54 Título: **INTERACCIONES DE UNIÓN MEJORADA EN ENSAYOS CON TIRAS REACTIVAS.**

30 Prioridad:  
**07.07.2000 GB 0016836**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.01.2012**

73 Titular/es:  
**DIAGNOSTICS FOR THE REAL WORLD, LTD**  
**840 DEL REY AVENUE**  
**SUNNYVALE, CALIFORNIA 94085, US**

72 Inventor/es:  
**LEE, Helen;**  
**DINEVA, Magda, Anastassova y**  
**HU, Hsiang, Yun**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 372 477 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

Interacciones de unión mejorada en ensayos con tiras reactivas.

La presente invención se refiere a la detección mejorada de ácidos nucleicos mediante tiras reactivas. Las tiras reactivas de la invención se usan para detectar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra, por ejemplo para identificar si un paciente está infectado con un microorganismo patógeno, tal como *Chlamydia trachomatis*.

Algunos ensayos convencionales para la detección de la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra se basan en la amplificación del ácido nucleico objetivo mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Aunque esta reacción permite la detección de pequeñas cantidades del ácido nucleico objetivo, puede implicar varias horas antes de que se obtenga un resultado. Esto puede ser una desventaja significativa, debido a que a menudo se desea obtener el resultado tan rápidamente como sea posible, por ejemplo, para mantener al mínimo los tiempos de espera de los pacientes. Otras desventajas adicionales de tales métodos son la necesidad de un equipo especializado costoso para llevar a cabo la reacción, y el coste relativamente elevado de los reactivos.

En contraste, las tiras reactivas detectan el ácido nucleico objetivo sin amplificar sin la necesidad de ningún equipo especializado, y los resultados se pueden obtener mucho más rápidamente que en los métodos basados en PCR. Los pacientes se pueden tratar así en la misma visita. Esto es especialmente ventajoso cuando es poco probable que el paciente vuelva en una fecha posterior, o no pueda hacerlo.

En una tira reactiva convencional típica descrita en el documento US 5.310.650, se inmoviliza una sonda de captura de ADN monocatenario en un filtro de nitrocelulosa en una zona de captura alejada de un extremo del filtro (el extremo de contacto). Parte de la secuencia de la sonda de captura es complementaria a la secuencia de una primera región del ácido nucleico objetivo a detectar. Una sonda de detección de ADN monocatenario marcada está inmovilizada en el filtro de nitrocelulosa en una zona de la sonda localizada entre la zona de captura y el extremo de contacto del filtro. La sonda de detección tiene una secuencia complementaria a la secuencia de una segunda región (distinta de la primera región) del ácido nucleico objetivo.

Para detectar el ADN objetivo en una disolución de muestra que se piensa que contiene el ADN objetivo, el extremo de contacto del filtro de nitrocelulosa se pone en contacto con la disolución de muestra. La disolución de muestra impregna el filtro mediante acción capilar, y pasa por la zona de la sonda y la zona de captura. A medida que la disolución de muestra pasa por la zona de la sonda, moviliza la sonda de detección y provoca que se eleve con la disolución de muestra hacia la zona de captura. La sonda de detección movilizada puede hibridar después a la segunda región de cualquier ADN objetivo presente en la disolución de muestra.

Cuando la sonda de detección hibridada y el ADN objetivo llegan a la zona de captura, la primera región del ADN objetivo puede hibridar a la sonda de captura inmovilizada. Se forma, por tanto, un complejo ternario entre el ácido nucleico objetivo, la sonda de captura y la sonda de detección marcada. La presencia de un marcador en la zona de captura, por lo tanto, indica que el ADN objetivo está presente en la disolución de muestra.

Con un segundo tipo de tira reactiva convencional, la sonda de detección de ADN marcada no está inmovilizada en el filtro de nitrocelulosa. En su lugar, se añade la sonda de detección a la disolución de muestra en condiciones que permiten la hibridación de la sonda de detección a cualquier ácido nucleico objetivo en la disolución de muestra. El extremo de contacto del filtro de nitrocelulosa se pone en contacto después con la disolución de muestra, y a medida que la disolución de muestra impregna la tira reactiva, el ácido nucleico objetivo que está hibridado a la sonda de detección es capturado en la zona de captura por la sonda de captura.

Sin embargo, se ha descubierto que la sensibilidad de la detección de ácidos nucleicos mediante tiras reactivas convencionales puede ser baja. Si el ácido nucleico objetivo es bicatenario, la sensibilidad de la detección mediante tiras reactivas puede ser especialmente baja. Por lo tanto, a veces puede no detectarse la presencia del ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra. Se desea, por lo tanto, mejorar la sensibilidad de la detección de ácidos nucleicos objetivo mediante tiras reactivas.

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona una tira reactiva para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra que comprende:

una tira cromatográfica que tiene un extremo de contacto para su puesta en contacto con la disolución de muestra; y

una sonda de captura inmovilizada en una zona de captura de la tira cromatográfica alejada del extremo de contacto, y la sonda de captura es capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo o a una sonda de captura de enganche unida al ácido nucleico objetivo, en la que la sonda de captura está unida a un separador de la sonda de captura y el separador de la sonda de captura está unido a la zona de captura, por lo que inmoviliza la sonda de captura en la zona de captura y separa la sonda de captura de la zona de captura, caracterizada porque:

- i) el separador de la sonda de captura está unido a un extremo de la sonda de captura, y el extremo de la sonda de captura que no está unido al separador de la sonda de captura está acoplado a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda de captura ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche cuando la sonda de captura ha hibridado a la sonda de captura de enganche;
- 5 ii) el separador de la sonda de captura está unido a una parte de la sonda de captura entre los extremos de la sonda de captura, y uno o ambos extremos de la sonda de captura están acoplados a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda de captura ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche cuando la sonda de captura ha hibridado a la sonda de captura de enganche;
- 10 iii) el separador de la sonda de captura comprende: un nucleótido que comprende una nucleobase capaz de formar una interacción por apilamiento con un par de bases formado cuando la sonda de captura ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche; fosfato de 3-hidroxipropilo; o fosfato de hexaetilen glicol; o
- iv) el separador de la sonda de captura comprende una proteína adsorbida directamente en la zona de captura, y unida covalentemente a la sonda de captura mediante un ligador.
- 15 La expresión "tira cromatográfica" se usa en la presente memoria para significar cualquier tira porosa de un material capaz de transportar una disolución por capilaridad.
- El separador de la sonda de captura puede comprender cualquier componente que separe la sonda de captura de la zona de captura sin impedir que la sonda de captura pueda hibridar al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche. Preferiblemente, el separador de la sonda de captura comprende un biopolímero.
- 20 El separador de la sonda de captura puede comprender una proteína. El término "proteína" se usa en la presente memoria para significar cualquier compuesto que comprende uno o más residuos de aminoácidos. Los ejemplos de proteínas preferidas son las proteínas que se dan de manera natural, preferiblemente albúmina de suero bovino (BSA), tiroglobulina, o derivados de las mismas. Los derivados incluyen proteínas que difieren de BSA o tiroglobulina por la sustitución, adición o delección de aminoácidos, o por la modificación post-traducciona.
- 25 Para unir la sonda de captura al separador proteico será necesario en general funcionalizar la sonda de captura. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de un modificador que comprende un primer grupo reactivo capaz de reaccionar con la sonda de captura y un segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con la proteína. Un modificador adecuado comprende un grupo fosforamidita y un grupo amino primario (o un grupo amino primario protegido que se desprotege antes del uso). El grupo fosforamidita es capaz de reaccionar con un grupo hidroxilo (normalmente el 5'-OH o el 3'-OH de la sonda de captura cuando la sonda de captura es un ácido nucleico) y el grupo amino primario es
- 30 capaz de reaccionar con un grupo carboxilo de la proteína. Un ejemplo de un modificador adecuado es 6-(Trifluoroacetilamino)hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita (C6-TFA). Otros modificadores adecuados serán conocidos para las personas de experiencia habitual en la técnica.
- Una vez que el modificador ha reaccionado con la sonda de captura y la proteína para unir la sonda de captura a la proteína, el modificador reaccionado se denomina en la presente memoria "ligador".
- 35 Preferiblemente, la proteína se adsorbe directamente en la zona de captura.
- En las tiras reactivas convencionales, la sonda de detección o la sonda de captura se inmoviliza en la tira reactiva mediante unión covalente, adsorción, el uso de calor o mediante entrecruzamiento UV. Sin embargo, se ha descubierto que las proteínas se pueden inmovilizar en la tira reactiva de manera más fácil y eficaz que la sonda de
- 40 captura. Por lo tanto, la adsorción directa de la proteína en la zona de captura es un medio más conveniente y eficaz de inmovilizar la sonda de captura en la tira reactiva que la inmovilización convencional.
- El separador de la sonda de captura puede comprender una molécula no proteica. En una disposición preferida, el separador de la sonda de captura comprende una proteína y una molécula no proteica, y la sonda de captura está acoplada a la molécula no proteica y la molécula no proteica está acoplada a la proteína, por lo que separa la sonda de captura de la proteína.
- 45 Para unir la molécula no proteica a la proteína será necesario en general usar un modificador que comprende un primer grupo reactivo capaz de reaccionar con la molécula no proteica y un segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con la proteína.
- Un modificador adecuado para el uso con moléculas no proteicas que comprenden un grupo hidroxilo es 6-(Trifluoroacetilamino) hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita (C6-TFA). Otros modificadores adecuados serán conocidos para las personas de experiencia habitual en la técnica.
- 50 Una vez que el modificador ha reaccionado con la molécula no proteica y la proteína para unir la molécula no proteica a la proteína, el modificador reaccionado en denomina en la presente memoria "ligador".
- Los ejemplos de componentes de separadores no proteicos adecuados incluyen fosfato de 1',2'-didesoxirribosa (dS),

fosfato de 3-hidroxipropilo ( $S_{C3}$ ), y fosfato de hexaetilenglicol (S). Las estructuras químicas de estos compuestos se muestran en la Figura 1.

5 Preferiblemente, sin embargo, la molécula no proteica comprende una nucleobase capaz de formar una interacción por apilamiento con un par de bases formado cuando la sonda de captura ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche. Más preferiblemente, la molécula no proteica comprende un nucleótido. Lo más preferiblemente, la molécula no proteica consiste solamente en uno o más nucleótidos.

10 Preferiblemente, la molécula no proteica tiene una longitud de al menos tres monómeros de nucleótido. La longitud de un monómero de nucleótido (N) es aproximadamente igual a la longitud de un fosfato de 1',2'-didesoxirribosa (dS) o un fosfato de 3-hidroxipropilo ( $S_{C3}$ ). Tres monómeros de nucleótido son aproximadamente iguales a la longitud de un fosfato de hexaetilenglicol (S).

El separador de la sonda de captura se puede unir a cualquier parte de la sonda de captura que no impida que la sonda de captura hibride al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche.

15 La sonda de captura de enganche puede comprender una primera región capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo y una segunda región capaz de hibridar a la sonda de captura, por lo que posibilita la unión indirecta de la sonda de captura al ácido nucleico objetivo. La sonda de captura de enganche puede comprender al menos un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico.

20 Las tiras reactivas del primer aspecto de la invención se pueden usar en métodos para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra en los que una sonda de detección capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo se incuba con la disolución de muestra en condiciones para la hibridación de la sonda de detección al ácido nucleico objetivo. El extremo de contacto de la tira reactiva se pone en contacto con la disolución de muestra, lo que permite que la disolución de muestra suba por la tira reactiva mediante acción capilar. El ácido nucleico objetivo hibridado a la sonda de detección en la disolución de muestra puede ser capturado después por la sonda de captura en la zona de captura. La presencia del ácido nucleico objetivo en la disolución de muestra se indica entonces por la presencia de la sonda de detección en la zona de captura.

25 Por lo tanto, la invención también proporciona un equipo para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra que comprende:

una tira reactiva del primer aspecto de la invención; y

una sonda de detección capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, por lo que permite la detección del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección.

30 En vez de incubar la sonda de detección con la disolución de muestra, la sonda de detección puede estar inmovilizada de manera liberable en la tira reactiva, por ejemplo en una zona de la sonda entre el extremo de contacto y la zona de captura de la tira cromatográfica. Para analizar la presencia del ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra, el extremo de contacto de la tira reactiva se puede poner en contacto con la disolución de muestra, de manera que la disolución de muestra impregne la tira reactiva mediante acción capilar. A medida que la disolución de muestra pasa por la zona de la sonda de la tira reactiva, moviliza la sonda de detección de manera que la sonda de detección puede hibridar al ácido nucleico objetivo de la disolución de muestra y moverse con el ácido nucleico objetivo hacia la zona de captura. El ácido nucleico objetivo hibridado a la sonda de detección es capturado por la sonda de captura a medida que la disolución de muestra pasa por la zona de captura. La presencia del ácido nucleico objetivo en la disolución de muestra se indica entonces por la presencia de la sonda de detección en la zona de captura.

40 La sonda de detección puede estar acoplada a un marcador, por lo que permite la detección directa del ácido nucleico objetivo en la zona de captura. De manera alternativa, la sonda de detección puede estar acoplada a un ligando de detección que permite la detección indirecta del ácido nucleico objetivo mediante el uso de un resto de unión al ligando de detección. El marcador o el ligando de detección puede estar unido a un separador de la sonda de detección que está unido a la sonda de detección, por lo que acopla el marcador o el ligando de detección a la sonda de detección y separa el marcador o el ligando de detección de la sonda de detección.

45 Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona una tira reactiva para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra que comprende:

una tira cromatográfica que tiene un extremo de contacto para su puesta en contacto con la disolución de muestra;

50 un resto de captura, inmovilizado en una zona de captura alejada del extremo de contacto, y el resto de captura es capaz de unirse directamente o indirectamente al ácido nucleico objetivo; y una sonda de detección, inmovilizada de manera liberable en una zona de la sonda localizada entre el extremo de contacto y la zona de captura, y la sonda de detección es capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, y la sonda de detección está acoplada a un marcador que permite la detección directa de la sonda de detección, o la sonda de detección está acoplada a un ligando de

detección que permite la detección indirecta de la sonda de detección;

en la que el marcador o el ligando de detección está unido a un separador de la sonda de detección, y el separador de la sonda de detección está unido a la sonda de detección, por lo que acopla el marcador o el ligando de detección a la sonda de detección y separa el marcador o el ligando de detección de la sonda de detección, y

5 en la que:

i) el separador de la sonda de detección está unido a un extremo de la sonda de detección, y el extremo de la sonda de detección que no está unido al separador de la sonda de detección está acoplado a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo;

10 ii) el separador de la sonda de detección está unido a una parte de la sonda de detección entre los extremos de la sonda de detección, y uno o ambos extremos de la sonda de detección están acoplados a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo;

15 iii) el separador de la sonda de detección comprende: un nucleótido que comprende una nucleobase capaz de formar una interacción por apilamiento con un par de bases formado cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo; fosfato de 3-hidroxiopropilo; o fosfato de hexaetilen glicol; o iv) el separador de la sonda de detección comprende una proteína.

El separador de la sonda de detección puede comprender cualquier componente que separe la sonda de detección del marcador o del ligando sin impedir que la sonda de detección pueda hibridar al ácido nucleico objetivo. Preferiblemente, el separador de la sonda de detección comprende un biopolímero.

20 El separador de la sonda de detección puede comprender una proteína. El término "proteína" se usa en la presente memoria para significar cualquier compuesto que comprende uno o más residuos de aminoácidos. Los ejemplos de proteínas preferidas son las proteínas que se dan de manera natural, tales como albúmina de suero bovino (BSA), tiroglobulina, o derivados de las mismas. Los derivados incluyen proteínas que difieren de BSA o tiroglobulina por la sustitución, adición o deleción de aminoácidos, o por la modificación post-traducciona.

25 Para unir la sonda de detección al separador proteico será necesario en general funcionalizar la sonda de detección. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de un modificador que comprende un primer grupo reactivo capaz de reaccionar con la sonda de detección y un segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con la proteína.

Un ejemplo de un modificador adecuado es 6-(Trifluoroacetilamino)hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita (C6-TFA). Otros modificadores adecuados serán conocidos para las personas de experiencia habitual en la técnica.

30 Una vez que el modificador ha reaccionado con la sonda de detección y la proteína para unir la sonda de detección a la proteína, el modificador reaccionado se denomina en la presente memoria "ligador".

El marcador o el ligando de detección pueden ser parte de, o estar unidos a, una partícula tal como una microesfera. En tales casos, preferiblemente, la proteína está adsorbida directamente en el marcador o el ligando de detección.

35 El separador de la sonda de detección puede comprender una molécula no proteica. En una disposición preferida, el separador de la sonda de detección comprende una proteína y una molécula no proteica, y la sonda de detección está acoplada a la molécula no proteica y la molécula no proteica está acoplada a la proteína, por lo que separa la sonda de detección de la proteína.

40 Para unir la molécula no proteica a la proteína será necesario en general usar un modificador que comprende un primer grupo reactivo capaz de reaccionar con la molécula no proteica y un segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con la proteína. Un ejemplo de un modificador adecuado para el uso con moléculas no proteicas que comprenden un grupo hidroxilo es 6-(Trifluoroacetilamino) hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita (C6-TFA). Otros modificadores adecuados serán conocidos para las personas de experiencia habitual en la técnica.

Una vez que el modificador ha reaccionado con la molécula no proteica y la proteína para unir la molécula no proteica a la proteína, el modificador reaccionado en denomina en la presente memoria "ligador".

45 En otras disposiciones, el separador de la sonda de detección comprende una molécula no proteica únicamente. Con tales disposiciones, será necesario en general funcionalizar la molécula no proteica para unir la molécula no proteica al marcador o al ligando de detección. Esto se puede llevar a cabo mediante el uso de un modificador que comprende un primer grupo reactivo capaz de reaccionar con la molécula no proteica y un segundo grupo reactivo capaz de reaccionar con el marcador o el ligando de detección.

50 Si la molécula no proteica comprende un grupo hidroxilo y el marcador o el ligando de detección comprende un grupo carboxilo, un modificador adecuado comprende un grupo fosforamidita y un grupo amino primario (o un grupo amino primario protegido que se desprotege antes del uso). 6-(Trifluoroacetilamino)hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita (C6-TFA) es un ejemplo adecuado. Otros modificadores adecuados serán conocidos para

las personas de experiencia habitual en la técnica.

Los ejemplos de componentes separadores de la sonda de detección no proteicos adecuados incluyen fosfato de 1',2'-Didesoxirribosa (dS), fosfato de 3-Hidroxipropilo (S<sub>C3</sub>), y fosfato de Hexaetilenglicol (S).

5 Preferiblemente, sin embargo, la molécula no proteica comprende una base capaz de formar una interacción por apilamiento con un par de bases formado cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo. Más preferiblemente, la molécula no proteica comprende un nucleótido. Lo más preferiblemente, la molécula no proteica consiste solamente en uno o más nucleótidos.

Preferiblemente, la molécula no proteica tiene una longitud de al menos tres nucleótidos.

10 El separador de la sonda de detección se puede unir en cualquier parte de la sonda de detección que no impida que la sonda de detección hibride al ácido nucleico objetivo.

El resto de captura puede ser capaz de unirse directamente o indirectamente al ácido nucleico objetivo mediante emparejamiento de bases o una interacción que no sea por emparejamiento de bases.

15 Por ejemplo, el resto de captura puede comprender una sonda de captura capaz de hibridar directamente al ácido nucleico objetivo. De manera alternativa, el resto de captura puede comprender una sonda de captura capaz de hibridar a una sonda de captura de enganche unida al ácido nucleico objetivo.

20 El resto de captura puede ser capaz de unirse a un ligando de captura acoplado a una sonda de captura unida al ácido nucleico objetivo, por lo que permite la unión indirecta del resto de captura al ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, el resto de captura puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Si la sonda de captura está acoplada a un ligando de captura, la sonda de captura puede estar unida a un separador de la sonda de captura que está unido al ligando de captura para separar el ligando de captura de la sonda de captura.

La sonda de captura de enganche se puede añadir a la disolución de muestra de manera que se pueda unir al ácido nucleico objetivo en la disolución de muestra y pueda ser capturada por la sonda de captura a medida que la disolución de muestra impregne la tira reactiva mediante acción capilar.

25 La sonda de captura, la sonda de captura de enganche y la sonda de detección pueden comprender cada una al menos un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico. Cuando una sonda comprende más de un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico, preferiblemente están hibridados entre sí.

La invención también proporciona un equipo para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra que comprende:

30 una tira reactiva según el segundo aspecto de la invención en la que el resto de captura es capaz de unirse a un ligando de captura acoplado a una sonda de captura unida al ácido nucleico objetivo; y

una sonda de captura capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo o a una sonda de captura de enganche unida al ácido nucleico objetivo, en la que la sonda de captura está acoplada a un ligando de captura que se puede unir al resto de captura.

35 Los ejemplos de marcadores adecuados incluyen colorantes textiles, una solución coloidal metálica tal como oro coloidal, y partículas coloreadas tales como partículas de látex coloreadas. Tales marcadores se pueden acoplar directamente a la sonda de detección o, si la sonda de detección está acoplada a un ligando de detección, al resto de unión al ligando de detección.

40 Los ejemplos de ligandos de captura o detección adecuados incluyen biotina (capturada o detectada, por ejemplo, mediante un anticuerpo anti-biotina, avidina, estreptavidina o un derivado de los mismos), fluoresceína (capturada o detectada, por ejemplo, mediante un anticuerpo anti-fluoresceína) y 2,4-dinitrofenol (DNP) (capturado o detectado, por ejemplo, mediante un anticuerpo anti-DNP).

La sonda de detección puede comprender una sonda de detección universal que es capaz de hibridar a una sonda de detección de enganche unida al ácido nucleico objetivo. La sonda de detección universal puede estar unida a un marcador o un ligando de detección, por lo que permite la detección de la sonda de detección.

45 Se apreciará que los equipos y las tiras reactivas de la invención pueden comprender además cualquier reactivo necesario para usar el equipo para detectar un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra. Por ejemplo, los equipos de la invención que comprenden una sonda de detección acoplada a un ligando de detección pueden comprender además un resto de unión al ligando de detección. Este puede estar por separado respecto de la tira reactiva o inmovilizado de manera liberable en la tira reactiva entre el extremo de contacto y la zona de captura.

50 El resto de unión al ligando de detección puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, o una molécula que no es un anticuerpo. Por ejemplo, si el ligando de detección comprende biotina, el resto de unión al ligando

de detección puede comprender un anticuerpo anti-biotina, estreptavidina, avidina o un derivado del mismo que mantiene la actividad de unión a biotina. Preferiblemente, el resto de unión al ligando de detección está marcado, por lo que permite la detección indirecta del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección y el resto de unión al ligando de detección.

- 5 Se entenderá que la invención se refiere al uso de sondas de detección y/o sondas de captura unidas a un separador, y que la sonda de detección o la sonda de captura puede estar inmovilizada en la tira reactiva o se puede incubar con la disolución de muestra, dependiendo del método de detección del ácido nucleico objetivo.

También se proporciona según la invención un equipo para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra que comprende:

- 10 i) una tira reactiva que comprende una tira cromatográfica que tiene un extremo de contacto para su puesta en contacto con la disolución de muestra y una sonda de captura capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, o a una sonda de captura de enganche unida al ácido nucleico objetivo, y la sonda de captura está inmovilizada en una zona de captura de la tira cromatográfica alejada del extremo de contacto; y

- 15 ii) una sonda de detección capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, y la sonda de detección está acoplada a un marcador que permite la detección directa del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección, o la sonda de detección está acoplada a un ligando que permite la detección indirecta del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección, en la que el marcador o el ligando de detección está unido a un separador de la sonda de detección, y el separador de la sonda de detección está unido a la sonda de detección, por lo que acopla del marcador o el ligando de detección a la sonda de detección y separa el marcador o el ligando de detección de la sonda de detección y en la que:

- 20 i) el separador de la sonda de detección está unido a un extremo de la sonda de detección, y el extremo de la sonda de detección que no está unido al separador de la sonda de detección está acoplado a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo;

- 25 ii) el separador de la sonda de detección está unido a una parte de la sonda de detección entre los extremos de la sonda de detección, y uno o ambos extremos de la sonda de detección están acoplados a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo;

- 30 iii) el separador de la sonda de detección comprende: un nucleótido que comprende una nucleobase capaz de formar una interacción por apilamiento con un par de bases formado cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo; fosfato de 3-hidroxipropilo; o fosfato de hexaetilen glicol; o iv) el separador de la sonda de detección comprende una proteína.

También se proporciona según la invención un equipo para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra que comprende:

- 35 i) una tira reactiva que comprende una tira cromatográfica que tiene un extremo de contacto para su puesta en contacto con la disolución de muestra y un resto de captura inmovilizado en una zona de captura de la tira cromatográfica alejada del extremo de contacto, y el resto de captura es capaz de unirse directamente o indirectamente al ácido nucleico objetivo;

ii) una sonda de captura capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, o a una sonda de captura de enganche unida al ácido nucleico objetivo, en la que la sonda de captura está acoplada a un ligando de captura que se puede unir al resto de captura; y

- 40 iii) una sonda de detección capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, y la sonda de detección está acoplada a un marcador que permite la detección directa del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección, o la sonda de detección está acoplada a un ligando de detección que permite la detección indirecta del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección, en la que el marcador o el ligando de detección está unido a un separador de la sonda de detección, y el separador de la sonda de detección está unido a la sonda de detección, por lo que acopla el marcador o el ligando de detección a la sonda de detección y separa el marcador o el ligando de detección de la sonda de detección en la que:

- 45 i) el separador está unido a un extremo de la sonda, y el extremo de la sonda que no está unido al separador está acoplado a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche;

- 50 ii) el separador está unido a una parte de la sonda entre los extremos de la sonda, y uno o ambos extremos de la sonda están acoplados a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche;

iii) el separador comprende: un nucleótido que comprende una nucleobase capaz de formar una interacción por

apilamiento con un par de bases formado cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche; fosfato de 3-hidroxipropilo; o fosfato de hexaetilen glicol; o iv) el separador comprende una proteína.

5 También se proporciona según la invención un equipo para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra que comprende:

i) una tira reactiva que comprende una tira cromatográfica que tiene un extremo de contacto para poner en contacto la disolución de muestra y un resto de captura inmovilizado en una zona de captura de la tira cromatográfica alejada del extremo de contacto;

10 ii) una sonda de captura capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, o a una sonda de captura de enganche unida al ácido nucleico objetivo, en la que la sonda de captura está unida a un separador de la sonda de captura y el separador de la sonda de captura está unido a un ligando de captura, por lo que acopla el ligando de captura a la sonda de captura y separa el ligando de captura de la sonda de captura; y

15 iii) una sonda de detección capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, y la sonda de detección está acoplada a un marcador que permite la detección directa del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección, o la sonda de detección está acoplada a un ligando de detección que permite la detección indirecta del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección,

en el que:

20 i) el separador está unido a un extremo de la sonda, y el extremo de la sonda que no está unido al separador está acoplado a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche;

ii) el separador está unido a una parte de la sonda entre los extremos de la sonda, y uno o ambos extremos de la sonda están acoplados a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche;

25 iii) el separador comprende: un nucleótido que comprende una nucleobase capaz de formar una interacción por apilamiento con un par de bases formado cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche; fosfato de 3-hidroxipropilo; o fosfato de hexaetilen glicol; o

iv) el separador comprende una proteína.

30 Según la invención, también se proporciona una sonda de ensayo de tira reactiva para la detección o la captura de un ácido nucleico objetivo en un ensayo de tira reactiva tal como se define en la presente memoria, y la sonda comprende un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, y un marcador que permite la detección directa del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda, o un ligando que permite la captura o la detección indirecta del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda, en la que el marcador o el ligando está unido a un separador y el separador está unido al ácido nucleico o análogo de ácido nucleico, por lo que separa el marcador o el ligando del ácido nucleico o análogo de ácido nucleico, caracterizada porque:

35 i) el separador está unido a un extremo de la sonda, y el extremo de la sonda que no está unido al separador está acoplado a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo;

40 ii) el separador está unido a una parte de la sonda entre los extremos de la sonda, y uno o ambos extremos de la sonda están acoplados a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo;

iii) el separador comprende: un nucleótido que comprende una nucleobase capaz de formar una interacción por apilamiento con un par de bases formado cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo; fosfato de 3-hidroxipropilo; o fosfato de hexaetilen glicol; o

45 iv) el separador comprende una proteína.

Según un aspecto adicional, se proporciona un método para la inmovilización de una sonda en una fase sólida que comprende proporcionar una sonda acoplada a una proteína y adsorber la proteína en la fase sólida.

Los métodos para la inmovilización de una sonda en una fase sólida pueden comprender además el acoplamiento de la sonda a la proteína.

50 La sonda se acopla preferiblemente a un ligador, y el ligador se acopla a la proteína. La sonda se acopla preferiblemente al ligador antes de acoplar el ligador a la proteína.

La sonda puede comprender un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico.

El ligador se acopla preferiblemente a una parte que no es una nucleobase de la sonda. Cuando la sonda comprende un ácido nucleico, el ligador se acopla preferiblemente a un grupo carbohidrato o fosfato de la sonda. Cuando la sonda comprende un análogo de ácido nucleico APN (ácido peptidonucleico), el ligador se acopla preferiblemente a un grupo amino de la sonda. Esto se da de manera que el ligador no interfiere con el emparejamiento de bases de la nucleobase. De manera alternativa, el ligador se puede acoplar al extremo 5' o 3' de la parte de la sonda que es capaz de hibridar a la molécula de unión de la sonda (por ejemplo, el ácido nucleico objetivo) para evitar la interferencia del ligador con las interacciones por emparejamiento de bases de la sonda y su molécula de unión.

5 La sonda se acopla preferiblemente al ligador mediante la reacción de un grupo fosforamidita unido al ligador con un grupo hidroxilo de la sonda, o mediante la reacción de un grupo hidroxilo del ligador con un grupo fosforamidita unido a la sonda.

El ligador se acopla preferiblemente a la proteína mediante la reacción de un grupo amino primario unido al ligador con un grupo carboxilo de la proteína.

15 La fase sólida puede comprender una membrana, preferiblemente una membrana de nitrocelulosa. De manera alternativa, la fase sólida puede comprender una partícula, tal como una microesfera.

También se proporciona una sonda inmovilizada en una fase sólida mediante la adsorción en la fase sólida de una proteína acoplada a la sonda.

20 También se proporciona según la invención el uso de una tira reactiva, equipo, o sonda de la invención en un ensayo de tira reactiva para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra.

Se cree que la sensibilidad de las tiras reactivas de la invención que tienen un separador de la sonda de captura se mejora debido a que la sonda de captura unida al separador de la sonda de captura es más accesible para la hibridación al ácido nucleico objetivo. La sensibilidad de las tiras reactivas o de los equipos de la invención en los que la sonda de captura está acoplada a un ligando de captura mediante un separador de la sonda de captura puede mejorarse debido a que la sonda de captura, en consecuencia, es más accesible para la hibridación al ácido nucleico objetivo y el ligando de captura es más accesible para la unión al resto de captura.

25 De forma similar, se cree que la sensibilidad de las tiras reactivas o de los equipos de la invención que tienen un separador de la sonda de detección que acopla la sonda de detección a un marcador se mejora debido a que el separador de la sonda de detección hace que la sonda de detección sea más accesible para la hibridación al ácido nucleico objetivo. Si la sonda de detección se acopla a un ligando de detección mediante un separador de la sonda de detección, se cree que la sonda de detección es más accesible para la hibridación al ácido nucleico objetivo, y el ligando de la sonda de detección también puede ser más accesible para el resto de unión al ligando de detección.

30 Se cree que el uso de separadores que comprenden nucleobases de acuerdo con la invención es especialmente eficaz, debido a que el nucleótido o la nucleobase es capaz de formar interacciones por apilamientos con los pares de bases formados entre la sonda de captura o la sonda de detección y el ácido nucleico objetivo. Se cree que la formación de las interacciones por apilamientos aumenta la hibridación de la sonda de captura o la sonda de detección al ácido nucleico objetivo, por lo que se mejora la eficacia de la captura o la detección del ácido nucleico objetivo en la zona de captura de la tira reactiva.

35 Cuando sea adecuado, las tiras reactivas y los equipos de la invención se pueden usar en los siguientes tipos de ensayos de tiras reactivas para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra:

1) Se proporciona una tira reactiva que comprende una tira cromatográfica que tiene un extremo de contacto y una sonda de captura inmovilizada en una zona de captura alejada del extremo de contacto, y la sonda de captura es capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo. Se pone en contacto una sonda de detección con la disolución de muestra en condiciones para la hibridación de la sonda de detección al ácido nucleico objetivo. La disolución de muestra se pone en contacto con el extremo de contacto de la tira reactiva para provocar que la disolución de muestra se mueva mediante acción capilar hacia la zona de captura, por lo que se permite que el ácido nucleico objetivo y la sonda de detección se muevan con la disolución de muestra hacia la zona de captura, y que el ácido nucleico objetivo sea capturado en la zona de captura. La sonda de detección se puede detectar entonces en la zona de captura. La presencia de la sonda de detección en la zona de captura indica que el ácido nucleico objetivo estaba presente en la disolución de muestra.

45 En una variación de este ensayo, la sonda de detección puede estar inmovilizada de manera liberable en la tira reactiva entre el extremo de contacto y la zona de captura, en vez de estar por separado de la tira reactiva. Cuando el extremo de contacto de la tira reactiva se pone en contacto con la disolución de muestra, lo que provoca que la disolución de muestra se mueva mediante acción capilar hacia la zona de captura, la sonda de detección se libera en la disolución de muestra de manera que la sonda de detección liberada puede hibridar al ácido nucleico objetivo

en la disolución de muestra a medida que se mueve hacia la zona de captura.

En variaciones adicionales de este ensayo, la sonda de detección puede estar separada de la disolución de muestra y se puede poner en contacto con la zona de captura de la tira reactiva. Esto se realizará normalmente después de que el extremo de contacto de la tira reactiva se haya puesto en contacto con la disolución de muestra. La sonda de detección se puede poner en contacto directamente con la zona de captura, o la sonda de detección puede estar en una disolución de sonda distinta que se pone en contacto con el extremo de contacto de la tira reactiva para provocar que la disolución de sonda se mueva mediante acción capilar hacia la zona de captura.

2) Se proporciona una tira reactiva que comprende una tira cromatográfica que tiene un extremo de contacto y un resto de captura inmovilizado en una zona de captura alejada del extremo de contacto, y el resto de captura es capaz de unirse a una sonda de captura hibridada al ácido nucleico objetivo. La sonda de captura se pone en contacto con la disolución de muestra en condiciones para la hibridación de la sonda de captura al ácido nucleico objetivo. La disolución de muestra se pone en contacto con el extremo de contacto de la tira reactiva para provocar que la disolución de muestra se mueva mediante acción capilar hacia la zona de captura, por lo que se permite que el ácido nucleico objetivo y la sonda de captura se muevan con la disolución de muestra hacia la zona de captura, y que se capture el ácido nucleico objetivo en la zona de captura mediante la unión del resto de captura a la sonda de captura. El ácido nucleico objetivo se puede detectar entonces en la zona de captura. El ácido nucleico objetivo se puede detectar mediante el uso de una sonda de detección como se describió para el ensayo (1). La sonda de detección se puede añadir a la disolución de muestra con la sonda de captura o por separado respecto de la sonda de captura (en cualquier orden). De manera alternativa, la sonda de detección puede estar inmovilizada de manera liberable en la tira reactiva entre el extremo de contacto y la zona de captura, o se puede poner en contacto por separado con la zona de captura como se describió para el ensayo (1).

En una variación del ensayo (2), en vez de mezclar la sonda de captura con la disolución de muestra, puede estar inmovilizada de manera liberable en la tira reactiva entre el extremo de contacto y la zona de captura. Cuando el extremo de contacto de la tira reactiva se pone en contacto con la disolución de muestra, lo que provoca que la disolución de muestra se mueva mediante acción capilar hacia la zona de captura, la sonda de captura se libera en la disolución de muestra de manera que la sonda de captura liberada se libera en la disolución de muestra de forma que la sonda de captura puede hibridar al ácido nucleico objetivo en la disolución de muestra a medida que se mueve hacia la zona de captura. El ácido nucleico objetivo se puede detectar mediante el uso de una sonda de detección que se puede poner en contacto con la disolución de muestra, inmovilizada de manera liberable en la tira reactiva entre el extremo de contacto y la zona de captura, o se puede poner en contacto por separado con la zona de captura.

En una variación adicional del ensayo (2), la sonda de captura se puede poner en contacto con la zona de captura antes (o, de manera excepcional, al mismo tiempo) que la disolución de muestra alcance la zona de captura mediante acción capilar. Esto permitirá que la sonda de captura se una al resto de captura en la zona de captura, de manera que el ácido nucleico objetivo pueda ser capturado. La sonda de captura puede estar en una disolución de sonda de captura diferente que se pone en contacto por separado con la zona de captura aplicándola directamente en la zona de captura, o poniendo en contacto la disolución de sonda de captura con el extremo de contacto de la tira reactiva para provocar que la sonda de captura se mueva mediante acción capilar hacia la zona de captura. El contacto posterior del extremo de contacto de la tira reactiva con la disolución de muestra permitirá que el ácido nucleico objetivo alcance la zona de captura mediante acción capilar para ser capturado allí. De nuevo, el ácido nucleico objetivo se puede detectar mediante el uso de una sonda de detección que se puede poner en contacto con la disolución de muestra, inmovilizada de manera liberable en la tira reactiva entre el extremo de contacto y la zona de captura, o se puede poner en contacto por separado con la zona de captura. Como alternativa al uso de una sonda de detección en el ensayo (2), el ácido nucleico objetivo se puede marcar directamente en la disolución de muestra, por ejemplo mediante la unión covalente de un marcador al ácido nucleico objetivo. Esto se puede llevar a cabo mediante el contacto de un marcador precursor con la disolución de muestra e incubación de la disolución de muestra y el marcador precursor en condiciones para la unión covalente del marcador al ácido nucleico objetivo.

El resto de captura del ensayo (2) puede ser una sonda de captura universal capaz de hibridar a la sonda de captura, o el resto de captura puede ser capaz de unirse mediante una interacción que no es por emparejamiento de bases a la sonda de captura. Por ejemplo, cuando la sonda de captura comprende uno o más ligandos de captura, el resto de captura es un resto de unión al ligando de captura.

Cuando el ensayo de tira reactiva usa más de una sonda capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, se prefiere que todas las sondas se añadan a la disolución de muestra y que se lleve a cabo la hibridación en una única etapa. Esto simplifica el ensayo, y lo hace más sencillo y rápido de llevar a cabo. Se ha descubierto que la sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo mediante el uso de un ensayo de hibridación de una etapa es aproximadamente igual a la sensibilidad de la detección cuando la hibridación se lleva a cabo en etapas múltiples. La hibridación de etapas múltiples se puede llevar a cabo mediante la hibridación secuencial de las diferentes sondas al ácido nucleico objetivo en la disolución de muestra, o poniendo en contacto la tira reactiva con diferentes disoluciones, cada una de las cuales contiene una sonda diferente. Normalmente, el segundo método de hibridación de etapas múltiples implicará el lavado de la tira reactiva entre cada contacto con una disolución de sonda diferente. Aunque puede haber

circunstancias en las que se prefiera la hibridación de etapas múltiples, se apreciará que normalmente se preferirá el formato más simple y rápido de hibridación de una etapa.

Lo más preferido es que la disolución de muestra sea de una composición adecuada para permitir que tengan lugar las reacciones de hibridación en una única etapa de hibridación, y también para permitir que tengan lugar interacciones que no son por emparejamiento de bases (por ejemplo, entre un ligando de detección y un resto de unión al ligando de detección, y entre un ligando de captura y un resto de unión al ligando de captura) y para transportar un complejo que comprende el ácido nucleico objetivo y una o más sondas hibridadas y (opcionalmente) restos de unión al ligando mediante acción capilar por la tira reactiva. Mediante el uso de tal disolución de muestra, se apreciará que las reacciones de hibridación se pueden llevar a cabo en una única etapa, y puede tener lugar cualquier interacción ligando-resto de unión al ligando, antes de que la disolución de muestra se ponga en contacto directamente con el extremo de contacto de la tira reactiva (sin necesidad de diluir o alterar primero la disolución de muestra). Las interacciones ligando-resto de unión al ligando pueden tener lugar además o de manera alternativa en la tira reactiva si se desea, ya que la disolución de muestra se desplaza hacia la zona de captura. Por lo tanto, se facilita una detección mediante tira reactiva simple y rápida del ácido nucleico objetivo.

Se ha descubierto que tales resultados se consiguen con disoluciones de muestra que comprenden un tampón de hibridación estándar (tal como tampón SSPE o tampón Tris) con sales, detergente y una proteína bloqueante tal como BSA o leche en polvo. Se ha descubierto que la sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo mediante el uso de tales ensayos es aproximadamente igual o mejor que la de otros ensayos de tiras reactivas.

Las realizaciones de la invención se describen a continuación a modo de ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra la estructura química de componentes no proteicos adecuados como componentes del separador de la sonda de captura o del separador de la sonda de detección de la invención;

la Figura 2 muestra la detección del ácido nucleico objetivo de *Chlamydia trachomatis* mediante el uso de una realización de la invención;

la Figura 3 muestra el sistema experimental para el Ejemplo 1;

la Figura 4 muestra el sistema experimental para el Ejemplo 2;

la Figura 5 muestra el sistema experimental para el Ejemplo 3;

la Figura 6 muestra el sistema experimental para el Ejemplo 4;

la Figura 7 muestra el sistema experimental para el Ejemplo 6;

la Figura 8 muestra el sistema experimental para el Ejemplo 7;

la Figura 9 muestra el sistema experimental para el Ejemplo 9;

la Figura 10 muestra el sistema experimental para el Ejemplo 10;

la Figura 11 muestra el sistema experimental para el Ejemplo 11; y

la Figura 12 muestra esquemáticamente las estructuras de diferentes sondas de detección acopladas a un ligando de detección de biotina usado en los ejemplos.

Los ejemplos se refieren a la detección de un fragmento de ADN del plásmido críptico de *Chlamydia trachomatis* (CT). CT es una de las causas más habituales de enfermedades de transmisión sexual. Las infecciones por CT pueden provocar infertilidad y, durante el embarazo, pueden dar como resultado un aborto espontáneo, muerte fetal o endometritis posparto. En los neonatos, la infección por CT puede provocar ceguera y enfermedad respiratoria crónica. Aproximadamente un 10% de los hombres infectados y hasta un 70% de las mujeres infectadas no muestran síntomas de la infección por CT. Por lo tanto, el diagnóstico preciso de la infección por CT es importante para que se pueda iniciar el tratamiento temprano de la enfermedad.

En los ejemplos, se usa una tira reactiva 10 para tratar de detectar el ácido nucleico objetivo 12 de CT monocatenario o bicatenario en una disolución de muestra 14 (véase la Figura 2). La tira reactiva 10 comprende una tira de nitrocelulosa 16 que tiene un extremo de contacto 18 para ponerla en contacto con la disolución de muestra 14, y una sonda de captura 20 inmovilizada en una zona de captura 22 de la tira de nitrocelulosa 16 alejada del extremo de contacto 18. Un conjugado anticuerpo anti-biotina-colorante 24 (o un conjugado anticuerpo anti-fluoresceína-colorante en el ejemplo 5) está inmovilizado de manera liberable en una zona de conjugado 26 de la tira de nitrocelulosa localizada entre el extremo de contacto 18 y la zona de captura 22. La sonda de captura 20 es capaz de hibridar a una primera región de una cadena (la primera cadena) del ácido nucleico objetivo 12.

- La disolución de muestra 14 se prepara agregando bacterias *Chlamydia trachomatis* a 1 ml de orina, y después centrifugando la orina a 15.000 rpm durante 30 minutos. Los sedimentos se resuspenden en 100 ml de tampón de hibridación estándar (que incluye un agente bloqueante tal como caseína o BSA). Después se añade una sonda de detección 28 capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo (junto con una sonda auxiliar capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo en posición adyacente a la región reconocida por la sonda de detección y/o la sonda de captura, si se usa). La sonda de detección 28 está acoplada a biotina (o a fluoresceína en el ejemplo 5) (mediante el uso de métodos muy conocidos para los expertos en la técnica). La disolución de muestra 14 se calienta después a 100 °C durante 7 minutos y se enfría.
- El extremo de contacto 18 de la tira reactiva 10 se pone en contacto después con la disolución de muestra 14. La disolución de muestra 14 y cualquier ácido nucleico objetivo 12 hibridado a la sonda de detección 28 sube por la tira reactiva 10 mediante acción capilar. A medida que la disolución de muestra 14 pasa por la zona de conjugado 26, moviliza el conjugado anticuerpo anti-biotina-colorante 24. El conjugado anticuerpo anti-biotina-colorante 24 liberado se puede unir después a la biotina acoplada a la sonda de detección 28 hibridada al ácido nucleico objetivo 12.
- El complejo formado entre el conjugado anticuerpo anti-biotina-colorante 24, la sonda de detección 28 y el ácido nucleico objetivo 12 sube después por la tira reactiva 10 hasta la zona de captura 22, en la que el ácido nucleico objetivo del complejo puede hibridar a la sonda de captura 20 inmovilizada. La sonda de captura 20 está inmovilizada en la zona de captura 22 de tal manera que no se puede movilizar mediante la disolución de muestra 14 la medida que se mueve por la zona de captura 22. Por lo tanto, el complejo unido a la sonda de captura permanece en la zona de captura y se puede detectar mediante la presencia del colorante del conjugado anticuerpo anti-biotina-colorante en la zona de captura.
- Si no hay un ácido nucleico objetivo de CT en la disolución de muestra, la sonda de detección 28 no puede ser capturada en la zona de captura 22, y así el colorante no es visible en la zona de captura. Si hay ácido nucleico objetivo de CT en la disolución de muestra, pero se puede capturar una cantidad insuficiente del ácido nucleico objetivo en la zona de captura, no se detectará la presencia del ácido nucleico objetivo en la disolución de muestra.
- Se ha descubierto que la sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo se puede reducir si la distancia entre la región del ácido nucleico objetivo a la que hibrida la sonda de captura y la región a la que hibrida la sonda de detección es menor de 26 nucleótidos. Así, se prefiere que la distancia entre estas regiones sea de al menos 26 nucleótidos, y preferiblemente al menos 200 nucleótidos.
- La captura del ácido nucleico objetivo descrita anteriormente se denomina captura de sonda directa en los ejemplos siguientes. La intensidad de la detección del ácido nucleico objetivo en los ejemplos se registra en una escala de 0 a 5, y 5 representa la detección más intensa, y 0 representa la ausencia de detección.
- Las secuencias de las sondas usadas en los ejemplos siguientes son:
- SEQ ID N° 1: 5' TGC AAC TCT TGG TGG TAG ACT TTG C
- SEQ ID N° 2: 5' GCG CAC AGA CGA TCT ATT TTT TGC A
- SEQ ID N° 3: 5' CGG GCG ATT TGC CTT AAC CCC ACC A
- SEQ ID N° 4: 5' CCA AGC TTA AGA CTT CAG AGG AGC G
- SEQ ID N° 5: 5' CAT GCG TTT CCA ATA GGA TTC TTG G
- SEQ ID N° 6: 5' CAC AGT CAG AAA TTG GAG TGC TGG C
- SEQ ID N° 7: 5' CTT GCT GCT CGA ACT TGT TTA GTA C
- SEQ ID N° 8: 5' AGA AGT CTT GGC AGA GGA AAC TTT T
- SEQ ID N° 9: 5' CTA GAA TTA GAT TAT GAT TTA AAA GGG
- SEQ ID N° 10: 5' TTC ATA TCC AAG GAC AAT AGA CCA A
- SEQ ID N° 11: 5' TGA TCT ACA AGT ATG TTT GTT GAG T
- SEQ ID N° 12: 5' TGC ATA ATA ACT TCG AAT AAG GAG AAG
- SEQ ID N° 13: 5' TCC CTC GTG ATA TAA CCT ATC CG
- SEQ ID N° 14: 5' CAG GTT GTT AAC AGG ATA GCA CGC
- SEQ ID N° 15: 5' CTC GTT CCG AAA TAG AAA ATC GCA

SEQ ID N° 16: 5' GGT AAA GCT CTG ATA TTT GAA GAC

SEQ ID N° 17: 5' CTG AGG CAG CTT GCT AAT TAT GAG T

Las estructuras de las sondas de detección en los ejemplos descritos más adelante se muestran esquemáticamente en la Figura 12.

5 **Ejemplo 1**

Sistema Experimental

Formato de captura: captura de sonda directa (cp) Seq ID N° 14 inmovilizada en la tira reactiva;

10 Sonda de detección (dp): Seq ID N° 13 o Seq ID N° 15 con biotina acoplada directamente al extremo 5', o mediante un separador de 3 nucleótidos (N<sub>3</sub>), 6 nucleótidos (N<sub>6</sub>), S, o SS, o SEQ ID N° 13 con biotina acoplada directamente al extremo 3'. 10<sup>12</sup> copias de cada uno.

Formato de detección: conjugado anticuerpo anti-biotina-colorante; ADN objetivo: Fragmentos de ADN monocatenario de 73 ó 76 nucleótidos a 5x10<sup>11</sup> - 10<sup>10</sup> copias.

Resultados

dp Seq ID N° 13

Copias del objetivo:	5x10 <sup>11</sup>	10 <sup>11</sup>	5x10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>
Sonda de detección	Señal	intensidad		
dp-B <sup>5</sup>	3,5	3,0	2,0	1,0
dp-N <sub>3</sub> -B <sup>5</sup>	4,5	3,5	3,0	1,5
dp-N <sub>6</sub> -B <sup>5</sup>	5,0	4,0	3,0	2,0
dp-S-B <sup>5</sup>	4,0	3,0	2,0	1,0
dp-SS-B <sup>5</sup>	4,5	3,5	2,5	1,0
3' B-dp	5,0	3,5	3,0	2,0

dp Seq ID N° 15

Copias del objetivo:	5x10 <sup>11</sup>	10 <sup>11</sup>	5x10 <sup>10</sup>
Sonda de detección	Señal	intensidad	
dp-B <sup>5</sup>	3,5	2,0	1,0
dp-N <sub>3</sub> -B <sup>5</sup>	4,0	3,0	2,0
dp-N <sub>6</sub> -B <sup>5</sup>	4,5	3,0	2,0
dp-S-B <sup>5</sup>	4,0	2,5	1,5
dp-SS-B <sup>5</sup>	4,0	2,5	1,5

15

Estos resultados demuestran:

La sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo mediante el uso de sondas de detección con biotina acoplada al extremo 5' mediante un separador N<sub>6</sub>, N<sub>3</sub>, SS o S fue superior que la sensibilidad mediante el uso de una sonda de detección con biotina acoplada directamente al extremo 5'.

20 Los separadores N<sub>3</sub> y N<sub>6</sub> fueron mejores que los separadores S y SS.

Se prefiere que la biotina (u otro ligando de detección) esté acoplada en un extremo de la sonda de detección. En el complejo formado cuando la sonda de captura y la sonda de detección hibridan al ácido nucleico objetivo en la zona

de captura, la biotina (u otro ligando de detección) puede estar en el extremo de la sonda de detección en posición proximal respecto de la región del ácido nucleico objetivo que hibrida a la sonda de captura (orientada internamente) o, preferiblemente, en el extremo de la sonda de detección en posición distal respecto de la región del ácido nucleico objetivo que hibrida a la sonda de captura (orientada externamente). Si no se usa espaciador para acoplar el ligando de detección a la sonda de detección, la sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo es generalmente superior si el ligando de detección está orientado externamente. Por lo tanto, la sonda de detección se elige normalmente de manera que el ligando de detección esté orientado externamente.

Sin embargo, en este ejemplo, la sensibilidad de la detección mediante el uso de una sonda de detección con biotina orientada externamente acoplada directamente al extremo 3' de la sonda de detección fue tan buena como la sensibilidad mediante el uso de una sonda de detección con biotina orientada internamente acoplada al extremo 5' de la sonda de detección mediante un separador de seis nucleótidos. Así, cuando se usan separadores de acuerdo con la invención, la sonda de detección no se tiene que elegir de manera que el ligando de detección esté orientado externamente en el complejo capturado en la zona de captura.

**Ejemplo 2:**

15 Sistema Experimental

Formato de captura: captura de sonda directa (cp) Seq ID N° 14 inmovilizada en la membrana de la tira reactiva;

Sonda de detección: sonda de detección (dp) Seq ID N° 13, Seq ID N° 15 y Seq ID N° 16 con biotina acoplada al extremo 5' mediante un separador de 3 nucleótidos (N<sub>3</sub>), 6 nucleótidos (N<sub>6</sub>), S o SS. 10<sup>12</sup> copias de cada uno.

20 Formato de detección: conjugado anticuerpo anti-biotina-colorante; ADN objetivo: Fragmentos de ADN bicatenario de 214 pb a 10<sup>11</sup> - 10<sup>10</sup> copias.

Resultados

Copias del objetivo:	10 <sup>11</sup>	5x10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>
Sonda de detección	Señal	Intensidad	
dp13-B + dp15-B + dp16-B	1,5	1,0	0,0
dp13-N <sub>3</sub> -B + dp15-N <sub>3</sub> -B + dp16-N <sub>3</sub> -B	3,0	2,0	0,5
dp13-N <sub>6</sub> -B + dp15-N <sub>6</sub> -B + dp16-N <sub>6</sub> -B	4,5	3,0	1,0
dp13-S-B + dp15-S-B + dp16-S-B	3,0	2,0	<0,5
dp13-SS-B + dp15-SS-B + dp16-SS-B	3,5	3,0	0,5
dp13 non-lab + dp15-N <sub>6</sub> -B + dp16-N <sub>6</sub> -B	2,5	1,5	0,5

Estos resultados demuestran:

25 La sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo bicatenario mejoró más de cinco veces mediante el uso de separadores N<sub>3</sub>, N<sub>6</sub>, S o SS.

La sensibilidad de la detección fue superior con los separadores N<sub>6</sub> y SS que con los separadores N<sub>3</sub> y S, lo que indica que la longitud del separador es importante para una sensibilidad de detección mejorada.

30 La sensibilidad de la detección fue superior con el separador N<sub>6</sub> que con el separador SS, a pesar del hecho de que estos separadores son de longitud equivalente, lo que indica que las propiedades fisicoquímicas del separador son importantes para una sensibilidad de detección mejorada.

35 La sensibilidad de la detección mediante el uso de solamente dos sondas de detección, cada una acoplada en el extremo 5' a biotina mediante un separador N<sub>6</sub> (dp13 non-lab + dp15-N<sub>6</sub>-B + dp16-N<sub>6</sub>-B), en las que la biotina está orientada internamente en el complejo capturado por la sonda de captura, fue mayor que la sensibilidad de la detección mediante el uso de tres sondas de detección cada una acoplada en el extremo 5' directamente a biotina (dp13-B + dp15-B + dp16-B) en las que la biotina de una sonda de detección (dp13-B) está orientada externamente en el complejo capturado por la sonda de captura.

Conclusiones de los ejemplos 1 y 2

La sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo se incrementa mediante el uso de un separador para acoplar el ligando de detección a la sonda de detección.

Los separadores más largos son mejores que los separadores más cortos.

5 Los separadores de longitud equivalente pero con propiedades fisicoquímicas diferentes tuvieron efectos diferentes sobre la sensibilidad de la detección. En particular, los separadores en los que el componente no proteico consiste solamente en nucleótidos son mejores que los separadores que incluyen componentes no nucleotídicos. Las posibles explicaciones de esto son:

10 1. Los separadores de nucleótidos pueden mejorar la sensibilidad de la detección aumentando la hibridación de la sonda de detección al ácido nucleico objetivo. No se espera que los nucleótidos de estos separadores emparejen sus bases a los nucleótidos del ácido nucleico objetivo cuando la sonda de detección hibrida al ácido nucleico objetivo. Las nucleobases de estos nucleótidos pueden formar interacciones por apilamiento con los pares de bases formados cuando la sonda de detección hibrida al ácido nucleico objetivo. Estas interacciones por apilamientos pueden aumentar la estabilidad de los híbridos formados entre el ácido nucleico objetivo y la sonda de detección, por lo que aumenta la sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo.

15 2. Los separadores de nucleótidos pueden ser más rígidos que los separadores S y SS. Se espera que los anillos de ribosa de los separadores de nucleótidos proporcionen una rigidez mucho más elevada que los grupos de polietilenglicol de los separadores S y SS. Esta rigidez mayor podría incrementar la disponibilidad del ligando de detección acoplado al separador de nucleótidos para la interacción con el resto de unión al ligando de detección.

20 3. Las diferencias de polaridad entre los separadores nucleotídicos y los separadores no nucleotídicos puede provocar diferencias en la sensibilidad de la detección.

### Ejemplo 3

#### Sistema Experimental

Formato de captura: captura de sonda directa (cp) Seq ID N° 10 inmovilizada en la tira reactiva;

25 Sonda de detección: sonda de detección (dp) Seq ID N° 13 acoplada a biotina en el extremo 5' directamente o mediante un separador N<sub>6</sub>, SS, (dS)<sub>6</sub>, (SC<sub>3</sub>)<sub>6</sub> o SN<sub>3</sub>SN<sub>3</sub>S. 10<sup>12</sup> copias de cada uno. Formato de detección: conjugado anticuerpo anti-biotina-colorante; Sondas auxiliares: SEQ ID N° 5 y SEQ ID N° 6 adyacentes a SEQ ID N° 10; SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 2 adyacentes a SEQ ID N° 13 a 10<sup>12</sup> copias;

ADN objetivo: fragmento de ADN bicatenario de 872 pb a 2x10<sup>11</sup> - 5x10<sup>10</sup> copias.

#### Resultados

30

Copias del objetivo:	2x10 <sup>11</sup>	5x10 <sup>10</sup>
Sonda de detección	Señal	intensidad
dp-B	<1,0	0,0
dp -N <sub>6</sub> -B	2,0	0,5
dp -SS-B	1,0	0,0
dp - (dS) <sub>6</sub> -B	1,0	0,0
dp - (SC <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> -B	1,0	0,0
dp -SN <sub>3</sub> SN <sub>3</sub> S-B	1,5	0,0

#### Estos resultados demuestran:

Los separadores SS, (dS)<sub>6</sub>, y (SC<sub>3</sub>)<sub>6</sub> son de longitud equivalente, y tuvieron un efecto similar en el aumento de la sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo a pesar de sus diferencias estructurales y propiedades.

35 El separador N<sub>6</sub> es de una longitud equivalente a los separadores SS, (dS)<sub>6</sub>, y (SC<sub>3</sub>)<sub>6</sub>. Sin embargo, el separador N<sub>6</sub> tuvo el mayor efecto en la mejora de la sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo.

5 La sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo fue mayor mediante el uso del separador N<sub>6</sub> que con el separador SN<sub>3</sub>SN<sub>3</sub>S (el separador más largo ensayado). Una explicación posible para esto podría ser que el monómero S reduce o elimina la interacción por apilamiento entre las nucleobases de los componentes de N<sub>3</sub> del separador y los pares de bases formados entre la sonda de detección y el ácido nucleico objetivo. Estos datos apoyan la conclusión de que las interacciones por apilamientos entre las nucleobases sin emparejar del separador y la molécula doble formada entre el ácido nucleico objetivo y la sonda de detección son importantes para aumentar la sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo.

#### Ejemplo 4

10 Se estudiaron espaciadores con diferentes propiedades fisicoquímicas y longitudes mediante el ensayo de las tiras reactivas y mediante análisis de transferencia puntual. El análisis mediante transferencia puntual permite analizar la eficacia de la interacción del anticuerpo anti-biotina con la biotina acoplada a la sonda de detección sin la hibridación de la sonda de detección al ácido nucleico objetivo. Se colocaron puntualmente  $5 \times 10^8$  -  $5 \times 10^{11}$  copias de las sondas de detección acopladas a biotina mediante separadores diferentes en lugares diferentes en una membrana de nailon cargada positivamente y se entrecruzaron mediante luz UV a la membrana. La membrana se incubó después con un anticuerpo anti-biotina acoplado a fosfatasa alcalina (capaz de convertir un sustrato cromogénico de Nitro Azul de Tetrazolio/Fosfato de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolilo (NBT/BCIP)), se lavó, y se incubó con el sustrato cromogénico de NBT/BCIP, y la membrana se observó para ver si se formaba color en la zona de captura.

#### Sistema experimental para el ensayo de tiras reactivas

Formato de captura: captura de sonda directa (cp) Seq ID N° 14 inmovilizada en la tira reactiva;

20 Sonda de detección: sonda de detección (dp) Seq ID N° 13 acoplada a biotina en el extremo 5' directamente o mediante un separador de nucleótidos o un separador no nucleotídico.  $10^{12}$  copias de cada uno.

Formato de detección: conjugado anticuerpo anti-biotina-colorante; Sondas auxiliares: SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 3 adyacentes a SEQ ID N° 14 a  $10^{12}$  copias;

ADN objetivo: fragmento de ADN bicatenario de 416 pb a  $5 \times 10^{10}$  -  $5 \times 10^9$  copias.

#### 25 Resultados

Copias del objetivo:	$5 \times 10^{10}$	$5 \times 10^9$
Sonda de detección	Señal	intensidad
dp-B <sup>5'</sup>	3,5	0,5
dp-N <sub>3</sub> -B <sup>5'</sup>	4,5	1,5
dp-N <sub>4</sub> -B <sup>5'</sup>	4,5	1,0
dp-N <sub>5</sub> -B <sup>5'</sup>	4,5	1,0
dp-N <sub>6</sub> -B <sup>5'</sup>	5,0	1,5
dp-(dS) <sub>6</sub> -B <sup>5'</sup>	4,0	0,5
dp-S-B <sup>5'</sup>	3,5	0,0
dp-SS-B <sup>5'</sup>	4,0	0,0
dp-SSS-B <sup>5'</sup>	4,5	0,0
dp-SSSS-B <sup>5'</sup>	4,0	0,0
dp-S N <sub>3</sub> S N <sub>3</sub> S-B <sup>5'</sup>	4,5	0,5

#### Sistema experimental para el análisis mediante transferencia puntual

30 Sondas de detección: sonda de detección Seq ID N° 13 acoplada a biotina en el extremo 5', directamente o mediante un separador de nucleótidos o un separador no nucleotídico.

Formato de detección: anticuerpo anti-biotina acoplado a fosfatasa alcalina, detección mediante sustrato

cromogénico de NBT/BSIP.

Resultados

<b>Separador</b>	<b>Límite de detección</b>
sin separador	5,0 x E11
N <sub>3</sub>	5,0 x E10
N <sub>4</sub>	5,0 x E10
N <sub>5</sub>	5,0 x E10
N <sub>6</sub>	2,5 x E10
(dS) <sub>6</sub>	2,5 x E10
SN <sub>3</sub> SN <sub>3</sub> S	2,5 x E9
SSSS	2,5 x E9
SSS	5,0 x E9
SS	2,5 x E10
S	5,0 x E11

5 Los resultados del ensayo de tiras reactivas demuestran:

No existe una diferencia significativa de sensibilidad en la detección del ácido nucleico objetivo mediante el uso de sondas de detección con separadores de tres, cuatro o cinco nucleótidos.

La sensibilidad de la detección con un separador de seis nucleótidos es ligeramente mejor que la de los separadores de 3-5 nucleótidos.

- 10 La sensibilidad de la detección con los separadores que consisten solamente en nucleótidos fue mejor que con los separadores que incluyen moléculas no nucleotídicas. Por ejemplo, el separador N<sub>3</sub> fue mejor que el separador más largo SN<sub>3</sub>SN<sub>3</sub>S, equivalente a una longitud de 15 nucleótidos.

El separador (dS)<sub>6</sub> es ligeramente mejor que el separador SS.

Los resultados del ensayo mediante transferencia puntual demuestran:

- 15 La sensibilidad de la detección fue mayor con los separadores más largos (SSSS y SN<sub>3</sub>SN<sub>3</sub>S).

La sensibilidad de la detección mediante el uso de separadores de longitudes equivalentes (N<sub>6</sub>, (dS)<sub>6</sub> y SS) con diferentes propiedades fisicoquímicas fue similar.

Conclusiones de los ejemplos 3 y 4

- 20 El componente dS tiene una estructura similar a la de un nucleótido. Ambos tienen un residuo de ribosa, que se espera que proporcione rigidez. Sin embargo, el nucleótido tiene una nucleobase que no está presente en el componente dS. El efecto diferente del separador (dS)<sub>6</sub> sobre la sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo en comparación con el separador N<sub>6</sub> sugiere que el efecto mayor sobre la mejora de la sensibilidad de la detección mediante el uso de un separador de nucleótidos se explica principalmente por la presencia de las nucleobases que no producen un emparejamiento de bases con el ácido nucleico objetivo.

- 25 La composición del separador parece ser más importante que su longitud (compárense los resultados para dp-N<sub>3</sub>-B<sup>5'</sup> y dp-SN<sub>3</sub>SN<sub>3</sub>S-B<sup>5'</sup> en el ensayo de tiras reactivas del ejemplo 4).

- 30 La sensibilidad de la detección mediante el uso de un separador (dS)<sub>6</sub> fue mayor que con un separador SS. Estos separadores tienen una longitud equivalente. Esto sugiere que las propiedades fisicoquímicas del separador, tales como la rigidez o la polaridad, también pueden tener efecto sobre la mejora de la sensibilidad de la detección por el separador.

5 El análisis mediante transferencia puntual del ejemplo 4 demuestra que la longitud del separador es importante para la disponibilidad de la biotina para el anticuerpo anti-biotina. La sensibilidad de reconocimiento de la biotina por parte del anticuerpo anti-biotina fue similar al estar acoplada la biotina a la sonda inmovilizada mediante un espaciador N<sub>6</sub>, (dS)<sub>6</sub> o SS. Sin embargo, el efecto de estos separadores sobre la sensibilidad de la detección en el ensayo de tiras reactivas del ejemplo 4 fue diferente. Esto sugiere que la composición del separador es más importante en la hibridación de la sonda de detección al ácido nucleico objetivo que en el reconocimiento de la biotina mediante el anticuerpo anti-biotina. La longitud del separador parece ser más importante que la composición del separador para el reconocimiento de la biotina (u otro ligando de detección) mediante el anticuerpo anti-biotina (u otro resto de unión al ligando de detección).

10 **Ejemplo 5**

Sistema Experimental

Formato de captura: captura de sonda directa (cp) Seq ID N° 14 acoplada a BSA inmovilizada en la tira reactiva. La sonda de captura está acoplada a BSA directamente o mediante un separador de seis nucleótidos;

Sonda de detección: sonda de detección (dp) Seq ID N° 13 acoplada a fluoresceína. 10<sup>12</sup> copias.

15 Formato de detección: conjugado anticuerpo anti-fluoresceína-colorante; ADN objetivo: fragmentos de ADN monocatenarios de 73 nt o 76 nt a 10<sup>11</sup> copias.

Resultado:

Copias del objetivo:	10 <sup>11</sup>
Sonda de captura	intensidad de la señal
cp-BSA-tira reactiva	4,0
cp-N <sub>6</sub> -BSA-tira reactiva	5,0

20 **Ejemplo 6**

Sistema Experimental

Formato de captura: captura de sonda directa (cp) Seq ID N° 14 acoplada en el extremo 5' a BSA inmovilizada en la tira reactiva. La sonda de captura está acoplada a BSA mediante un separador N<sub>6</sub> o SN<sub>3</sub>SN<sub>3</sub>S;

25 Sondas de detección: sondas de detección (dp) Seq ID N° 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16 y 17 acopladas a biotina. 10<sup>12</sup> copias de cada una;

Formato de detección: conjugado anticuerpo anti-biotina-colorante; Objetivo: ADN bicatenario de 872 pb a 10<sup>11</sup> - 2,5x10<sup>9</sup> copias.

Resultado

Copias del objetivo:	10 <sup>11</sup>	2,5x10 <sup>10</sup>	10 <sup>10</sup>	5x10 <sup>9</sup>	2,5x10 <sup>9</sup>
Sonda de captura	Señal	intensidad			
cp-SN <sub>3</sub> SN <sub>3</sub> S-BSA-tira reactiva	4,0	3,5	2,5	1,0	0,0
cp-N <sub>6</sub> -BSA-tira reactiva	4,5	4,0	3,0	1,5	0,0

30

**Ejemplo 7**

Sistema Experimental

Formato de captura: captura de sonda directa (cp) Seq ID N° 15 acoplada a BSA inmovilizada en la tira reactiva. La sonda de captura está acoplada a BSA mediante un separador N<sub>6</sub>;

Sondas auxiliares: SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4 adyacentes a SEQ ID N° 15;

5 Sonda de detección: En este ejemplo, la sonda de detección comprende una sonda de enganche y una sonda universal. La sonda de enganche tiene una secuencia que corresponde a Seq ID N° 17 (capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo) y una secuencia complementaria a la secuencia de una sonda universal. La sonda universal está acoplada a un colorante textil mediante un separador N<sub>6</sub> o SN<sub>3</sub>SN<sub>6</sub>. Hay 10<sup>12</sup> copias de la sonda de enganche.

Objetivo: ADN bicatenario de 872 pb a 10<sup>11</sup> y 10<sup>10</sup> copias.

Resultado

Copias del objetivo:	10 <sup>11</sup>	10 <sup>10</sup>
Sonda de captura	Señal	intensidad
Sonda universal-SN <sub>3</sub> SN <sub>6</sub> -Colorante	2,0	0,0
Sonda universal-N <sub>6</sub> -Colorante	2,0	0,5

10 Conclusiones de los ejemplos 5, 6, y 7

El uso de separadores que comprenden una proteína inmovilizada en la tira reactiva y una molécula no proteica para acoplar la sonda de captura a la proteína inmovilizada (ejemplos 5 y 6), o el uso de separadores de moléculas no proteicas para acoplar el marcador a la sonda de detección (ejemplo 7) mejora la sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo.

15 La sensibilidad de la detección del ácido nucleico fue mayor cuando el componente no proteico del separador consistió completamente en nucleótidos.

**Ejemplo 8**

20 En este ejemplo se compara la sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo mediante el uso de una sonda de captura inmovilizada en la membrana de la tira reactiva mediante un vehículo proteico o mediante adsorción pasiva.

25 Se mezclaron 10 nmoles de sonda de captura funcionalizada en el extremo 5' o 3' con un grupo amino primario con 1 µl de BSA del 10% y 25 µl de tampón MES 50 mM (pH 6,1) y se llevó hasta 49 µl con agua en un tubo de microcentrífuga de 500 µl. Después se añadió 1 µl de reactivo de acoplamiento (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodii-mida 300 mM recién preparada (EDAC) en agua) y se mezcló bien. La mezcla se dejó a temperatura ambiente du-rante la noche para acoplar BSA a la sonda de captura, y después se almacenó a 2-8 °C. La BSA-sonda de captura se aplicó después a la zona de captura de la tira reactiva, y la tira reactiva se calentó a 80 °C durante 1 hora.

30 Se optimizó la proporción molar de la sonda de captura respecto de BSA y la concentración del reactivo de acopla-miento EDAC. Se estudiaron las proporciones de sonda de captura:BSA de 2,7:1, 3,2:1, 4,1:1, 5,2:1, 6,6:1, 10,9:1. Se estudiaron las concentraciones de EDAC de 1, 1,5, 2, 4, 5 y 20 mM. Las concentraciones mayores de 5 mM provocaron que la BSA-sonda de captura precipitara de la disolución.

Sistema Experimental

Formato de captura: captura de sonda directa mediante Seq ID N° 14 inmovilizada directamente en la membrana de la tira reactiva o mediante un espaciador proteico de BSA. La sonda de captura y la sonda de captura-BSA se aplica-ron a la tira reactiva y se inmovilizaron tratando la tira reactiva durante 1 h a 80 °C.

35 Sonda de detección: sonda de detección marcada con biotina (dp) Seq ID N° 13 a 10<sup>12</sup> copias.

Formato de detección: conjugado anticuerpo anti-biotina-colorante; ADN objetivo: fragmentos de ADN monocatena-rios de 73 nucleótidos a 1x10<sup>11</sup> copias.

Resultados

Sonda de captura: Señal

sonda de captura-BSA	4,0
Sonda de captura	0,0

Conclusión

5 El ácido nucleico objetivo no se detectó mediante el uso de una sonda de captura directamente inmovilizada a la tira reactiva. Sin embargo, se obtuvo una señal de detección intensa si la sonda de captura estaba acoplada a BSA y la BSA estaba inmovilizada en la tira reactiva.

Los ejemplos siguientes se refieren a la detección del ácido nucleico objetivo mediante el uso de una sonda acoplada a una partícula coloreada mediante un separador proteico. Las partículas de colorante se revistieron con la sonda acoplada a BSA. La proteína se adsorbe en las partículas de colorante, por lo que acoplan la sonda a las partículas de colorante. El procedimiento usado fue el siguiente:

10 Diluir 11 µl de colorante lavado ( $A_{575} = 900$ ) en 434 µl de tampón fosfato 10 mM que contenía NaCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5.

Añadir 5 µl de sonda-BSA (2 mg/ml), mezclar bien y rotar a temperatura ambiente durante 1 hora;

Añadir 50 µl de caseína del 20% con tratamiento alcalino. Mezclar bien y rotar a temperatura ambiente durante 1 hora;

15 Centrifugar a 4000 rpm en una microcentrífuga a temperatura ambiente durante 15 min;

Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 500 µl de tampón de conjugación que contiene un 5% de sacarosa y un 2% de caseína con tratamiento alcalino, y un 0,02% de azida Na.

**Ejemplo 9:**

Sistema Experimental

20 Formato de captura: Anticuerpo anti-biotina/biotina acoplada a las sondas de captura Seq ID N° 13, N° 14, N° 15, N° 16 y N° 17 a  $10^{12}$  copias por ensayo.

De manera alternativa, se usó el formato de captura de sonda directa (Seq ID N° 14 o Seq ID N° 15) como comparación;

Sonda de detección directa Seq ID N° 10 acoplada a partícula de colorante mediante BSA;

25 Sondas auxiliares: SEQ ID N° 5 y SEQ ID N° 6 adyacentes a SEQ ID N° 10;

Objetivo: ADN ds de 872 pb a  $10^{11}$  a  $10^8$  copias.

Resultado

*Amplificación de la Señal Mediante el Uso de Sondas Múltiples*

Sonda(s) de captura	Seq ID N° 13	Seq ID N° 14	Seq ID N° 15	Seq ID N° 16	Seq ID N° 17	Las 5
Intensidad	1	0	1	1	1	5
de la señal						
$10^{11}$ copias del						
objetivo						

30

*Análisis de Sensibilidad*

Copias del objetivo	$1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^{10}$	$5 \times 10^9$	$1 \times 10^9$	$5 \times 10^8$	$1 \times 10^8$
---------------------	--------------------	--------------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

Captura de Anticuerpo (5 sondas)	5	4,5	4	2,5	2	0,5
Captura de Sonda Directa (Seq ID N° 15)	4,5	3	2,5	1,5	0	0
Captura de Sonda Directa (Seq ID N° 14)	3	2	0,5	0	0	0

Estos resultados demuestran que el conjugado sonda de detección directa - colorante funciona tanto con el formato de captura de anticuerpo como con el formato de captura de sonda directa.

### Ejemplo 10

#### 5 Sistema Experimental

Formato de captura: captura de sonda directa (cp) Seq ID N° 15 acoplada a BSA inmovilizada en la tira reactiva.

Sondas auxiliares: SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4 adyacentes a SEQ ID N° 15;

Región de la sonda de detección Seq ID N° 17. Se usó una "sonda de enganche" con una secuencia complementaria al ADN objetivo en esta región y a la secuencia de sonda universal a  $10^{12}$  copias por ensayo;

10 Formato de detección: Colorante textil acoplado a la sonda universal mediante BSA;

Objetivo: ADN ds de 872 pb a  $10^{11}$  y  $10^{10}$  copias.

#### Resultado:

Copias del objetivo	$10^{11}$	$10^{10}$
señal	2,0	0,0

15 La ventaja de este formato en comparación con el formato de conjugado sonda de detección directa-colorante es que permite la aplicación de un reactivo universal para la detección visual del ácido nucleico cuando una sonda de una secuencia de nucleótidos universal se conjuga a las partículas coloreadas.

### Ejemplo 11

#### Sistema Experimental

20 Formato de captura: captura de sonda directa Seq ID N° 15 acoplada a BSA inmovilizada en la tira reactiva.

Sondas auxiliares: SEQ ID N° 3 y SEQ ID N° 4 adyacentes a SEQ ID N° 15;

Región de la sonda de detección Seq ID N° 17. Se usó una sonda de detección "de enganche" 1, con una secuencia complementaria al ADN objetivo en esta región y a la secuencia de la sonda universal 2, a  $10^{12}$  copias por ensayo;

25 Formato de detección: una sonda de detección de enganche comprende una secuencia complementaria a la secuencia del ácido nucleico objetivo y a la secuencia de una primera sonda de detección universal. La primera sonda de detección universal está acoplada a BSA, y la BSA está adsorbida en una primera partícula coloreada, por lo que acopla la primera sonda de detección universal a la primera partícula coloreada. También hay varias segundas sondas de detección universales acopladas cada una a BSA adsorbida en la primera partícula coloreada. Las segundas sondas de detección universales comprenden secuencias complementarias a la secuencia de una tercera sonda de detección universal. La tercera sonda de detección universal está acoplada a BSA adsorbida en una segunda partícula coloreada. Cuando el ácido nucleico objetivo se detecta mediante el uso de la sonda de detección de enganche, la primera, segunda y tercera sondas de detección universales y la primera y segunda partículas coloreadas, una única primera partícula coloreada forma una primera capa en el ácido nucleico objetivo, y varias segundas partículas coloreadas forman una segunda capa en el ácido nucleico objetivo como se muestra en la Figura 11. Debido a que se pueden unir varias partículas coloreadas a cada ácido nucleico objetivo de esta manera, se cree que la sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo mejora en comparación con el uso de una sonda de detección de enganche y una única sonda de detección universal acoplada a una partícula coloreada.

35 Objetivo: ADN ds de 872 pb a  $10^{11}$  y  $10^{10}$  copias.

#### Resultados:

Copias del objetivo	10 <sup>11</sup>	10 <sup>10</sup>
señal	2,0	0,5

Se obtuvieron resultados similares con un ADN objetivo ds de 1598 pb.

5 **Ejemplo 12: Detección Mediante Ensayo de Tiras Reactivas de Ácidos Nucleicos de una Etapa de *Chlamydia trachomatis***

Sistema Experimental:

Reactivos:

10 Formato de captura: captura mediante sonda oligonucleotídica inmovilizada en la membrana de una tira reactiva por medio de un vehículo de BSA;

Formato de detección: sonda de detección marcada con biotina múltiple; conjugado anticuerpo anti-biotina - oro coloidal;

Preparación de la muestra: Se prepararon células de cuerpos elementales (CE) de *Chlamydia trachomatis* (Ct) a concentraciones de 10<sup>6</sup> copias/μl a 10<sup>3</sup> copias/μl en tampón PBS y se calentaron a 100 °C durante 20 minutos;

15 Tampón de hibridación/funcionamiento de tiras reactivas: Tampón de hibridación estándar que comprende sales, detergente y una proteína bloqueante tal como BSA o leche en polvo.

Método:

20 La sonda de detección, la sonda auxiliar y 5x10<sup>6</sup> - 5x10<sup>3</sup> copias de CE diluidos en tampón de hibridación se llevaron hasta 80 μl y se calentaron a 100 °C durante 7 minutos. La mezcla se centrifugó después brevemente para recoger todo el líquido y se mezcló con 20 μl de Ab anti-biotina y oro coloidal. Los 100 μl de mezcla se impregnaron en la tira reactiva y se dejó desarrollar una señal.

Resultados y Discusión

25 Los resultados presentados en la Tabla y en la Figura 13 demostraron que se podrían detectar alrededor de 10<sup>4</sup> copias de CE de Ct con el ensayo de tira reactiva de ácido nucleico de una etapa en menos de una hora, lo que incluye la etapa de preparación de la muestra.

Aunque el ensayo de detección de tira reactiva así presentado tiene una sensibilidad de detección aproximadamente igual a otros ensayos de hibridación de tipo sándwich, tiene ventajas importantes en cuanto a su velocidad y simplicidad.

30 Un ensayo de hibridación de tipo sándwich para la detección de Ct descrito en el documento PCT WO 93/1322, por ejemplo, es un ensayo complejo con un formato en placa de microtitulación multi-componente, que no se podría llevar a cabo en menos de 5 horas. Este ensayo es un ensayo de múltiples etapas, que requiere la adición gradual de sus componentes en un orden definido con incubaciones y etapas de lavado tras la adición de cada componente nuevo.

35 El ensayo de tira reactiva de ácido nucleico propio de esta invención se podría llevar a cabo en una etapa sin la necesidad de diferentes etapas para la adición de los componentes y los lavados. Este ensayo de hibridación de tipo sándwich no requiere más de una condición de disolución para hacer que sea ventajoso para la hibridación y otras formaciones de emparejamientos por afinidad. Las mismas condiciones de disolución podrían proporcionar una migración libre de los componentes a través de la membrana de la tira reactiva.

40 Se ha descubierto que la sensibilidad de la detección de un ácido nucleico objetivo monocatenario y bicatenario mediante las tiras reactivas se mejora significativamente mediante el uso de separadores de acuerdo con la invención. La sensibilidad de la detección del ácido nucleico objetivo circular bicatenario también se puede incrementar mediante el uso de espaciadores de acuerdo con la invención.

45 Se sabe que el ácido nucleico objetivo monocatenario forma una estructura secundaria por medio de las interacciones de emparejamiento de bases intramoleculares. Tal estructura secundaria puede inhibir la unión de la sonda de captura y la sonda de detección al ácido nucleico objetivo. Por lo tanto, la región del ácido nucleico objetivo a la que se une la sonda de detección y la sonda de captura se elige a menudo como una región que se ha predicho que estará sustancialmente exenta de estructura secundaria.

La sensibilidad de la detección mejorada del ácido nucleico objetivo bicatenario alcanzada mediante el uso de separadores de acuerdo con la invención significa que también se mejorará la sensibilidad de la detección del ácido nu-

cleico objetivo monocatenario mediante el uso de una sonda de captura y/o una sonda de detección que reconoce una región del ácido nucleico objetivo implicada en la estructura secundaria. Una ventaja de esto es que la sonda de captura y/o la sonda de detección no se tienen que elegir basándose en las previsiones de la estructura secundaria formada por el ácido nucleico objetivo, simplificando así la elección de la sonda de captura y de detección.

- 5 Se considera que los métodos convencionales de detección mediante tiras reactivas tienen una calidad muy baja en la detección del ácido nucleico objetivo bicatenario circular. Por lo tanto, tal ácido nucleico objetivo se trata normalmente con una enzima que linealiza el objetivo bicatenario antes de detectarlo. La detección mejorada del ácido nucleico objetivo bicatenario circular mediante el uso de separadores de acuerdo con la invención significa que la linealización del ácido nucleico objetivo puede no ser necesaria, simplificando así los métodos de detección.

10 **Legendas de las Figuras**

Figura 1 - Diseño del Separador

B=biotina acoplada a un ligador

Figura 3

310 - cp

- 15 320 - dp

330 - objetivo

Figura 4

450 - dp Seq ID N° 13

460 - cp Seq ID N° 14

- 20 470 - dp Seq ID N° 15

480 - dp Seq ID N° 16

Figura 5

510 - cp

520 - dp

- 25 540 - sondas auxiliares dp

Figura 6

610 - cp

620 - dp

640 - hp

- 30 Figura 7

710 - cp-N<sub>6</sub>-BSA o cp-SN<sub>3</sub>-SN<sub>3</sub>-S-BSA

Figura 8

810 - cp

821 - enganche de detección

- 35 822 - Sonda universal-N<sub>6</sub>-Colorante o Sonda universal-SN<sub>3</sub>-SN<sub>6</sub>- Colorante

840 - sondas auxiliares

Figura 9

910 - sonda de captura acoplada a ligando

920 - sonda de detección acoplada a partícula de colorante mediante BSA

930 - Objetivo de ADN ds de 872 pb

940 - sondas auxiliares

950 - anticuerpo anti-biotina unido a membrana

Figura 10

5 1010 - cp

1021 - enganche de detección

1022 - Sonda universal- Colorante

1040 - sondas auxiliares

Figura 11

10 1110 - captura de sonda directa

1121 - sonda de enganche

1122 - conjugado de colorante de primera capa

1123 - conjugado de colorante de segunda capa

1130 - objetivo de ADN ds de 872 pb

15 1140 - sondas auxiliares

Figura 12

----- representa el ácido nucleico de la sonda de detección

B representa biotina acoplada a un ligador

x representa el número de nucleótidos

20 y representa el número de monómeros de fosfato de hexaetilenglicol

Figura 13

Detección mediante ensayo de tira reactiva de ácidos nucleicos de una etapa de *Chlamydia trachomatis*

Los números indican el número de cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis*.

\*CN: Control Negativo

25 Figura 14

Tabla: detección mediante ensayo de tira reactiva de ácidos nucleicos de una etapa de *Chlamydia trachomatis*

## REIVINDICACIONES

1. Una tira reactiva para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra que comprende:

una tira cromatográfica que tiene un extremo de contacto para su puesta en contacto con la disolución de muestra; y una sonda de captura inmovilizada en una zona de captura de la tira cromatográfica alejada del extremo de contacto, y la sonda de captura es capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo o a una sonda de captura de enganche unida al ácido nucleico objetivo, en la que la sonda de captura está unida a un separador de la sonda de captura y el separador de la sonda de captura está unido a la zona de captura, por lo que inmoviliza la sonda de captura en la zona de captura y separa la sonda de captura de la zona de captura, **caracterizada porque:**

i) el separador de la sonda de captura está unido a un extremo de la sonda de captura, y el extremo de la sonda de captura que no está unido al separador de la sonda de captura está acoplado a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda de captura ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche cuando la sonda de captura ha hibridado a la sonda de captura de enganche;

ii) el separador de la sonda de captura está unido a una parte de la sonda de captura entre los extremos de la sonda de captura, y uno o ambos extremos de la sonda de captura están acoplados a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda de captura ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche cuando la sonda de captura ha hibridado a la sonda de captura de enganche;

iii) el separador de la sonda de captura comprende: un nucleótido que comprende una nucleobase capaz de formar una interacción por apilamiento con un par de bases formado cuando la sonda de captura ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche; fosfato de 3-hidroxipropilo; o fosfato de hexaetilen glicol; o

iv) el separador de la sonda de captura comprende una proteína adsorbida directamente en la zona de captura, y unida covalentemente a la sonda de captura mediante un ligador.

2. Una tira reactiva según la reivindicación 1(iii) en la que el separador de la sonda de captura comprende además una proteína, y la sonda de captura está acoplada al nucleótido y el nucleótido está acoplado a la proteína, por lo que separa la sonda de captura de la proteína.

3. Una tira reactiva según la reivindicación 2 en la que el nucleótido está acoplado a la proteína mediante un ligador.

4. Una tira reactiva según cualquier reivindicación precedente en la que la proteína es BSA, tiroglobulina, o un derivado de las mismas.

5. Una tira reactiva según cualquier reivindicación precedente que comprende además una sonda de detección, inmovilizada de manera liberable en una zona de la sonda localizada entre el extremo de contacto y la zona de captura de la tira cromatográfica, y la sonda de detección es capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo para permitir la detección del ácido nucleico objetivo.

6. Una tira reactiva según la reivindicación 5 en la que la sonda de detección está acoplada a un marcador que permite la detección directa del ácido nucleico objetivo cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo.

7. Una tira reactiva según la reivindicación 5 en la que la sonda de detección está acoplada a un ligando de detección que se puede unir a un resto de unión al ligando de detección para permitir la detección indirecta del ácido nucleico objetivo cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo.

8. Una tira reactiva según la reivindicación 6 ó 7 en la que el marcador o el ligando de detección está unido a un separador de la sonda de detección y el separador de la sonda de detección está unido a la sonda de detección, por lo que acopla el marcador o el ligando de detección a la sonda de detección y separa el marcador o el ligando de detección de la sonda de detección.

9. Una tira reactiva para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra que comprende:

una tira cromatográfica que tiene un extremo de contacto para su puesta en contacto con la disolución de muestra;

un resto de captura, inmovilizado en una zona de captura alejada del extremo de contacto, y el resto de captura es capaz de unirse directamente o indirectamente al ácido nucleico objetivo; y

una sonda de detección, inmovilizada de manera liberable en una zona de la sonda localizada entre el extremo de contacto y la zona de captura, y la sonda de detección es capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo y la sonda de detección está acoplada a un marcador que permite la detección directa del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección, o la sonda de detección está acoplada a un ligando de detección que permite la detección indirecta del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección,

5 en la que el marcador o el ligando de detección está unido a un separador de la sonda de detección, y el separador de la sonda de detección está unido a la sonda de detección, por lo que acopla el marcador o el ligando de detección a la sonda de detección y separa el marcador o el ligando de detección de la sonda de detección, y

en la que:

10 i) el separador de la sonda de detección está unido a un extremo de la sonda de detección, y el extremo de la sonda de detección que no está unido al separador de la sonda de detección está acoplado a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo;

15 ii) el separador de la sonda de detección está unido a una parte de la sonda de detección entre los extremos de la sonda de detección, y uno o ambos extremos de la sonda de detección están acoplados a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo;

20 iii) el separador de la sonda de detección comprende: un nucleótido que comprende una nucleobase capaz de formar una interacción por apilamiento con un par de bases formado cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo; fosfato de 3-hidroxipropilo; o fosfato de hexaetilen glicol; o

iv) el separador de la sonda de detección comprende una proteína.

**10.** Una tira reactiva según la reivindicación 9(iv) en la que la proteína es BSA, tiroglobulina, o un derivado de las mismas.

25 **11.** Una tira reactiva según la reivindicación 9(iv) o 10 en la que el marcador o el ligando de detección está unido a, o forma parte de, una microesfera, y la proteína está adsorbida directamente en la microesfera.

**12.** Una tira reactiva según cualquiera de las reivindicaciones 9(iv), 10, o 11 en la que la proteína está unida a la sonda de detección mediante un ligador.

**13.** Una tira reactiva según cualquiera de las reivindicaciones 9(iv), o 10 a 12 en la que el separador de la sonda de detección comprende además una molécula no proteica.

30 **14.** Una tira reactiva según la reivindicación 13 en la que la sonda de detección está acoplada a la molécula no proteica y la molécula no proteica está acoplada a la proteína, por lo que separa la sonda de detección de la proteína.

**15.** Una tira reactiva según la reivindicación 14 en la que la molécula no proteica está acoplada a la proteína mediante un ligador.

35 **16.** Una tira reactiva según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 en la que la molécula no proteica tiene una longitud de al menos tres nucleótidos.

**17.** Una tira reactiva según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 en la que la molécula no proteica comprende un nucleótido.

**18.** Una tira reactiva según la reivindicación 17 en la que la molécula no proteica consiste solamente en uno o más nucleótidos.

40 **19.** Una tira reactiva según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 18 en la que el resto de captura comprende una sonda de captura capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo o a una sonda de captura de enganche unida al ácido nucleico objetivo.

**20.** Una tira reactiva según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 18 en la que el resto de captura es capaz de unirse a un ligando de captura acoplado a una sonda de captura unida al ácido nucleico objetivo.

45 **21.** Un equipo para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra que comprende:

una tira reactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y

una sonda de detección capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, por lo que permite la detección del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección.

22. Un equipo según la reivindicación 21 en el que la sonda de detección está acoplada a un marcador que permite la detección directa de la sonda de detección hibridada al ácido nucleico objetivo, o un ligando de detección que permite la detección indirecta de la sonda de detección hibridada al ácido nucleico objetivo mediante un resto de unión al ligando de detección, en el que el marcador o el ligando de detección está unido a un separador de la sonda de detección, y el separador de la sonda de detección está unido a la sonda de detección, por lo que acopla el marcador o el ligando de detección a la sonda de detección y separa el marcador o el ligando de detección de la sonda de detección.
23. Un equipo para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra que comprende:
- una tira reactiva según la reivindicación 20; y
- una sonda de captura capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, o a una sonda de captura de enganche unida al ácido nucleico objetivo, en la que la sonda de captura está acoplada a un ligando de captura que se puede unir al resto de captura.
24. Un equipo según la reivindicación 23 en el que el ligando de captura está unido a un separador de la sonda de captura y el separador de la sonda de captura está unido a la sonda de captura, por lo que acopla el ligando de captura a la sonda de captura y separa el ligando de captura de la sonda de captura.
25. Un equipo para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra que comprende:
- una tira reactiva que comprende una tira cromatográfica que tiene un extremo de contacto para su puesta en contacto con la disolución de muestra y una sonda de captura capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, o a una sonda de captura de enganche unida al ácido nucleico objetivo, y la sonda de captura está inmovilizada en una zona de captura de la tira cromatográfica alejada del extremo de contacto; y
- una sonda de detección capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, y la sonda de detección está acoplada a un marcador que permite la detección directa del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección, o la sonda de detección está acoplada a un ligando que permite la detección indirecta del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección, en la que el marcador o el ligando de detección está unido a un separador de la sonda de detección, y el separador de la sonda de detección está unido a la sonda de detección, por lo que acopla del marcador o el ligando de detección a la sonda de detección y separa el marcador o el ligando de detección de la sonda de detección, y en la que:
- i) el separador de la sonda de detección está unido a un extremo de la sonda de detección, y el extremo de la sonda de detección que no está unido al separador de la sonda de detección está acoplado a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo;
  - ii) el separador de la sonda de detección está unido a una parte de la sonda de detección entre los extremos de la sonda de detección, y uno o ambos extremos de la sonda de detección están acoplados a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo;
  - iii) el separador de la sonda de detección comprende: un nucleótido que comprende una nucleobase capaz de formar una interacción por apilamiento con un par de bases formado cuando la sonda de detección ha hibridado al ácido nucleico objetivo; fosfato de 3-hidroxipropilo; o fosfato de hexaetilen glicol; o
  - iv) el separador de la sonda de detección comprende una proteína.
26. Un equipo para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra que comprende:
- una tira reactiva que comprende una tira cromatográfica que tiene un extremo de contacto para su puesta en contacto con la disolución de muestra y un resto de captura inmovilizado en una zona de captura de la tira cromatográfica alejada del extremo de contacto, y el resto de captura es capaz de unirse directamente o indirectamente al ácido nucleico objetivo;
- una sonda de captura capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, o a una sonda de captura de enganche unida al ácido nucleico objetivo, en la que la sonda de captura está acoplada a un ligando de captura que se puede unir al resto de captura; y
- una sonda de detección capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, y la sonda de detección está acoplada a un marcador que permite la detección directa del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección, o la sonda de detección está acoplada a un ligando de detección que permite la detección indirecta del

ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda de detección;

en el que la sonda de captura está unida a un separador de la sonda de captura y el separador de la sonda de captura está unido al ligando de captura, por lo que acopla el ligando de captura a la sonda de captura y separa el ligando de captura de la sonda de captura, o el marcador o el ligando de detección está unido a un separador de la sonda de detección, y el separador de la sonda de detección está unido a la sonda de detección, por lo que acopla el marcador o el ligando de detección a la sonda de detección y separa el marcador o el ligando de detección de la sonda de detección; y en el que:

i) el separador está unido a un extremo de la sonda, y el extremo de la sonda que no está unido al separador está acoplado a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche;

ii) el separador está unido a una parte de la sonda entre los extremos de la sonda, y uno o ambos extremos de la sonda están acoplados a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche;

iii) el separador comprende: un nucleótido que comprende una nucleobase capaz de formar una interacción por apilamiento con un par de bases formado cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo o a la sonda de captura de enganche; fosfato de 3-hidroxipropilo; o fosfato de hexaetilen glicol; o

iv) el separador comprende una proteína.

**27.** Una sonda de ensayo de tira reactiva para la detección o la captura de un ácido nucleico objetivo en un ensayo de tira reactiva como se define en la presente memoria, y la sonda comprende un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico capaz de hibridar al ácido nucleico objetivo, y un marcador que permite la detección directa del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda, o un ligando que permite la captura o la detección indirecta del ácido nucleico objetivo mediante la utilización de la sonda, en la que el marcador o el ligando está unido a un separador y el separador está unido al ácido nucleico o análogo de ácido nucleico, por lo que separa el marcador o el ligando del ácido nucleico o análogo de ácido nucleico, **caracterizada porque:**

i) el separador está unido a un extremo de la sonda, y el extremo de la sonda que no está unido al separador está acoplado a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo;

ii) el separador está unido a una parte de la sonda entre los extremos de la sonda, y uno o ambos extremos de la sonda están acoplados a uno o más nucleótidos que no hibridan al ácido nucleico objetivo cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo;

iii) el separador comprende: un nucleótido que comprende una nucleobase capaz de formar una interacción por apilamiento con un par de bases formado cuando la sonda ha hibridado al ácido nucleico objetivo; fosfato de 3-hidroxipropilo; o fosfato de hexaetilen glicol; o

iv) el separador comprende una proteína.

**28.** El uso de una tira reactiva según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, un equipo según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, o una sonda según la reivindicación 27, para analizar la presencia de un ácido nucleico objetivo en una disolución de muestra.

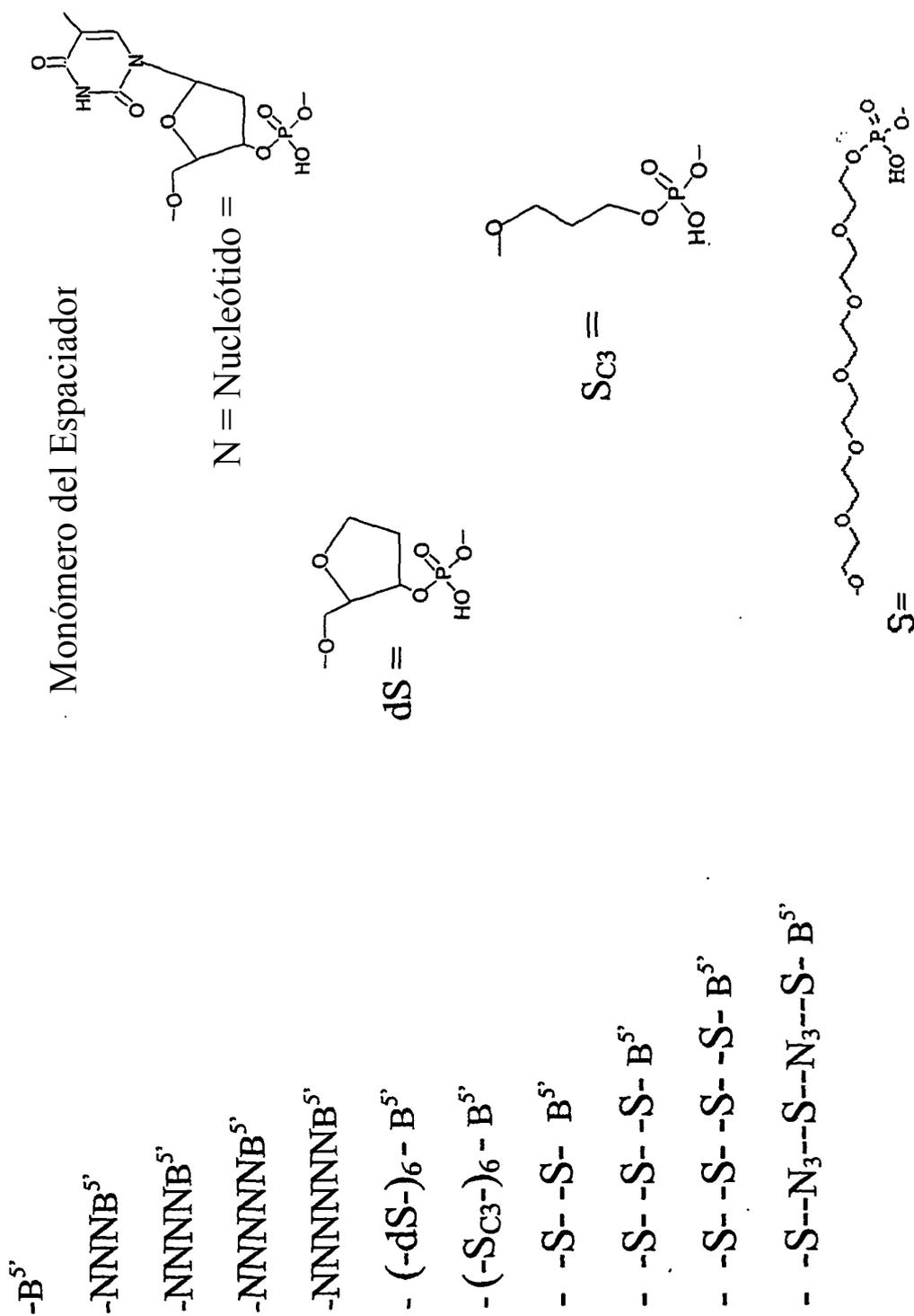


Figura 1

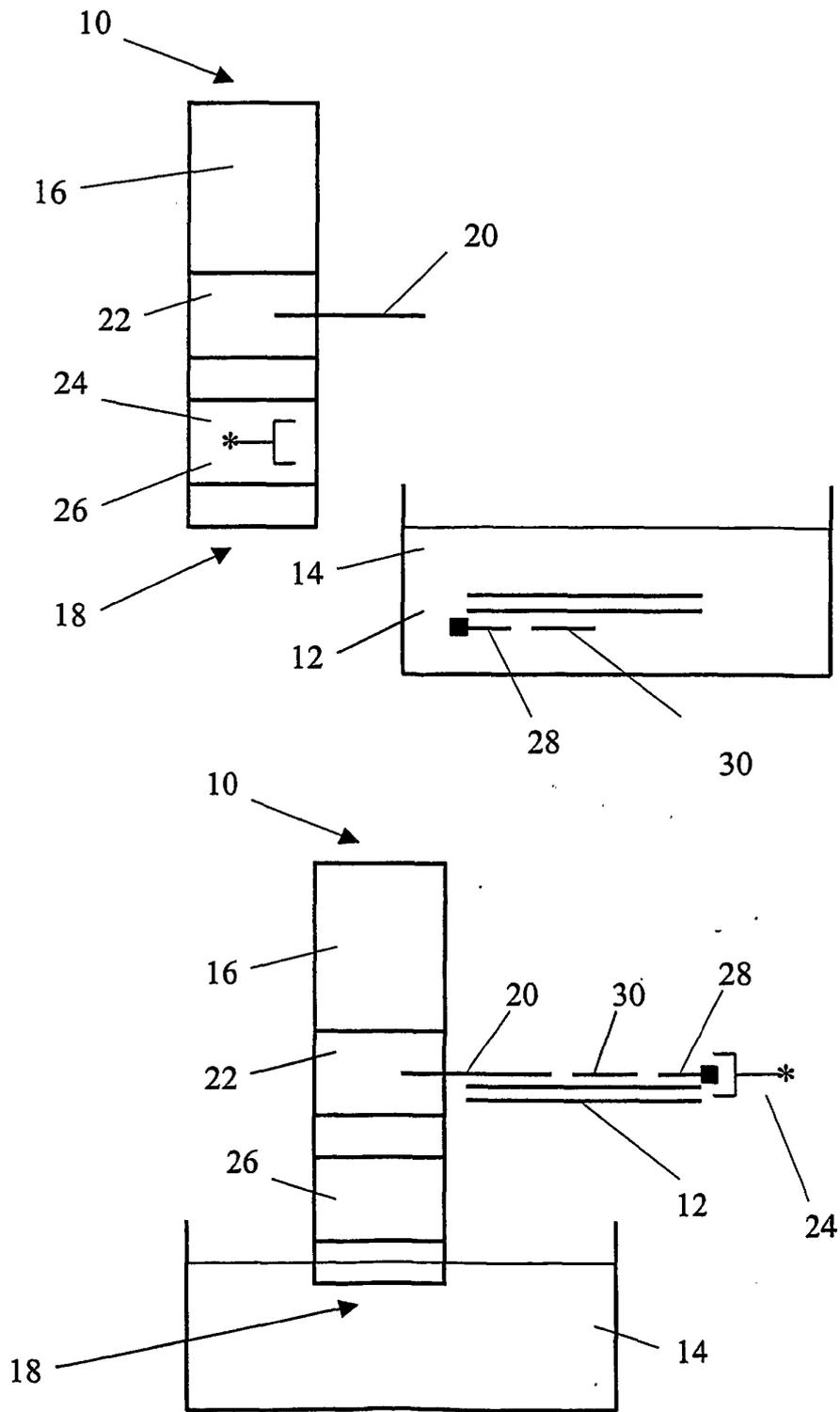


Figura 2

Figura 3

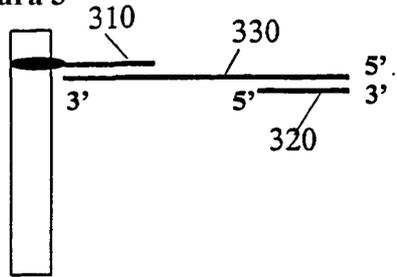


Figura 4

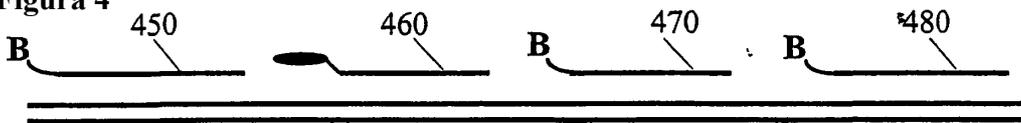


Figura 5

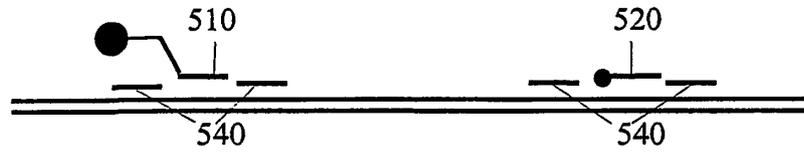


Figura 6



Figura 7

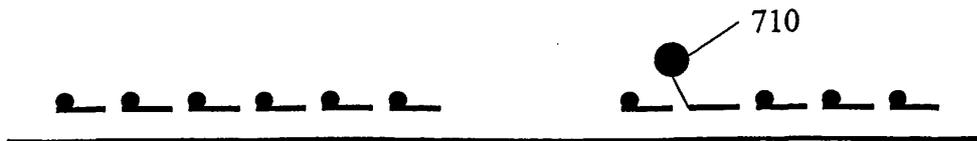


Figura 8

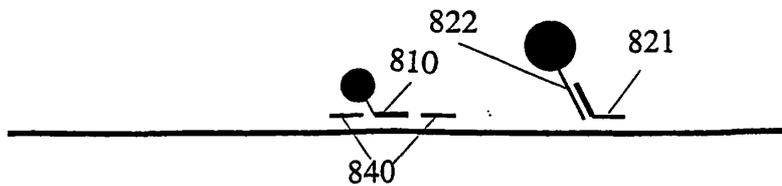


Figura 9

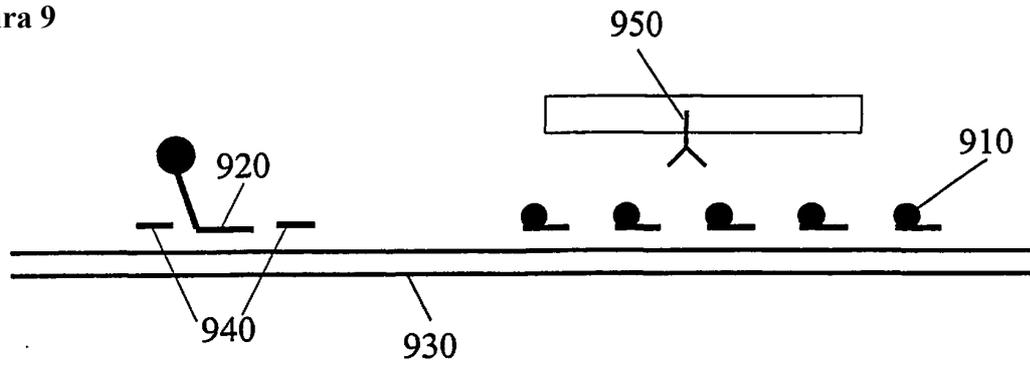


Figura 10

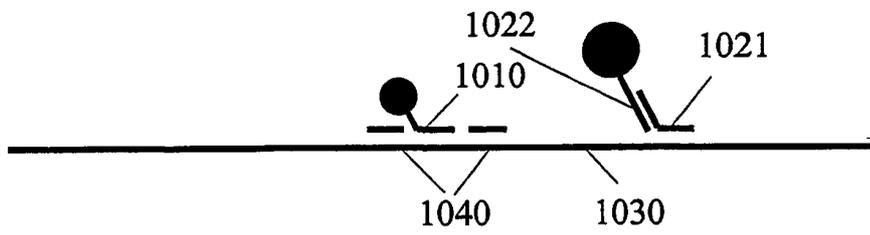


Figura 11

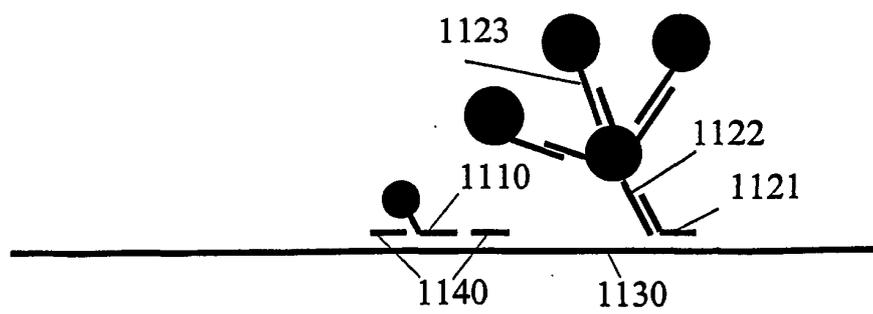


Figura 12

<u>Sonda de Detección</u>	<u>Estructura</u>
<u>Nombre</u>	
dp-B <sup>5'</sup>	$\begin{array}{ccc} 5' & & 3' \\ B & \text{-----} & \end{array}$
dp-(N) <sub>x</sub> -B <sup>5'</sup>	$\begin{array}{ccc} 5' & & 3' \\ B-(N)_x & \text{-----} & \end{array}$
dp-(S) <sub>y</sub> -B <sup>5'</sup>	$\begin{array}{ccc} 5' & & 3' \\ B-(S)_y & \text{-----} & \end{array}$
<sup>3'</sup> B-dp	$\begin{array}{ccc} 5' & & 3' \\ \text{-----} & & B \end{array}$
dp-(dS) <sub>6</sub> -B <sup>5'</sup>	$\begin{array}{ccc} 5' & & 3' \\ B-(dS)_6 & \text{-----} & \end{array}$
dp-(SC <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> -B <sup>5'</sup>	$\begin{array}{ccc} 5' & & 3' \\ B-(SC_3)_6 & \text{-----} & \end{array}$
dp-SN <sub>3</sub> SN <sub>3</sub> S-B <sup>5'</sup>	$\begin{array}{ccc} & & 5' & & 3' \\ B-S-N-N-N-S-N-N-N-S & \text{-----} & \end{array}$

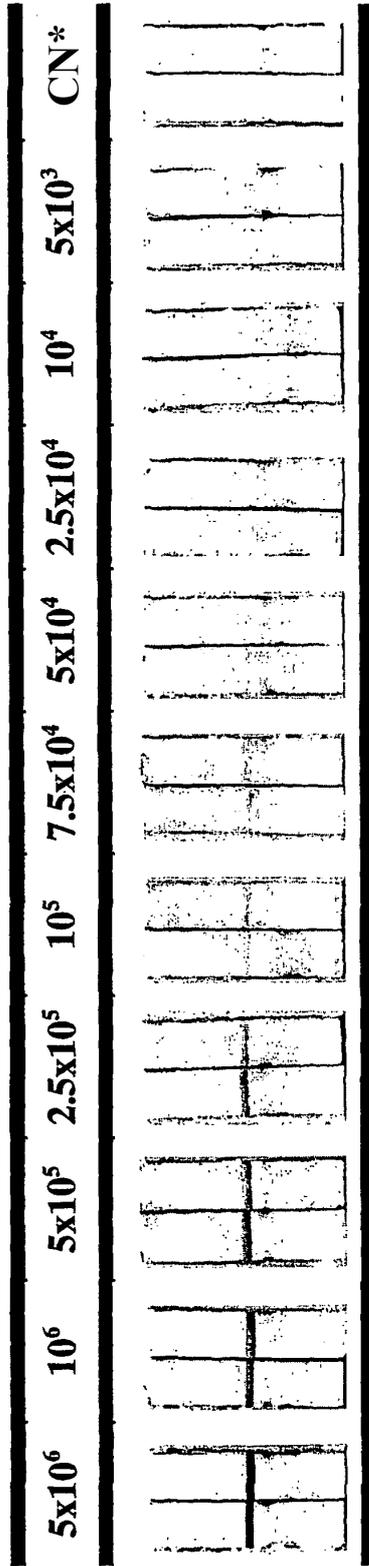


Figura 13

Figura 14

N° CE*	5x10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	2.5x10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	7.5x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>	2.5x10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>3</sup>	CN**
Tiempo de primera señal	2.20'	2.50'	3.30'	4.30'	5.35'	8.10'	8.45'	14.05'	24'	-	-
Señal a 10'	4	3	2.5	2	1.5	1	1	0.5	0	0	0
Señal a 20'	5	4	3.5	3	2.5	2	1.5	1	0.25	0	0
Señal a 30'	5	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.5	1.0	0	0
Señal a 1 h	5	4.5	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0	1.0	0.5	0	0

\*Número de cuerpos elementales (CE) de *Chlamydia trachomatis*

\*\*CN: Control negativo