

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 279**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06752336 .5**
96 Fecha de presentación: **05.05.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1877581**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2008**

54 Título: **Métodos y productos para la captura de ácido nucleico diana**

30 Prioridad:
06.05.2005 US 678507 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2012

73 Titular/es:
**GEN-PROBE INCORPORATED
PATENT DEPARTMENT, 10210 GENETIC
CENTER DRIVE
SAN DIEGO, CA 92121-4362, US**

72 Inventor/es:
**POLLNER, Reinhold B.;
BECKER, Michael M. y
MAJLESSI, Mehrdad R.**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 381 279 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

Métodos y productos para la captura de ácido nucleico diana

Campo de la invención

5 Las composiciones y los métodos descritos se refieren a la biología molecular, más particularmente al aislamiento de ácidos nucleicos a partir de mezclas complejas, tales como muestras, mediante el uso de un oligómero de ácido nucleico específico del ácido nucleico diana y un agente químico desnaturizante en la mezcla.

Antecedentes de la invención

10 Muchos procedimientos de biología molecular, tales como la amplificación *in vitro* y la hibridación *in vitro* de ácidos nucleicos, requieren una preparación o purificación de los ácidos nucleicos, para volverlos eficaces en el procedimiento posterior. Se han desarrollado métodos de purificación de ácidos nucleicos que no son específicos y se han aislado todos los ácidos nucleicos presentes en una muestra, o se han aislado diferentes tipos de ácidos nucleicos basándose en características físicas, o se han aislado ácidos nucleicos específicos a partir de una muestra. Muchos de los métodos de aislamiento de ácidos nucleicos implican unos procedimientos complicados o el uso de productos químicos agresivos y requieren mucho tiempo hasta completarse.

15 El documento de patente de EE.UU. 2002/197614 describe un método para aislar un ácido nucleico diana que comprende poner en contacto una muestra que contiene el ácido nucleico diana con un oligonucleótido adaptador para formar un complejo de hibridación y, a continuación, someter el complejo a electroforesis en gel en un gel de captura universal, que comprende una matriz dentro de la cual se inmoviliza una sonda de captura universal. Se menciona que se puede utilizar urea o una temperatura elevada durante la electroforesis, para incrementar la restricción.

20 El documento de patente WO 92/15708 describe un método para mejorar la sensibilidad de los ensayos de hibridación que reduce la unión no específica y la hibridación no específica, que incluye lavar utilizando sales de tetraalquilamonio a temperaturas elevadas y la liberación del complejo sonda-diana desde un soporte sólido y la recaptura.

25 El documento WO 98/50583 describe un método para aislar un ácido nucleico diana que comprende incubar una mezcla del ácido nucleico diana, una sonda de captura y una sonda inmovilizada, con dos tipos de condiciones de hibridación diferentes para controlar el orden de la hibridación, en donde la primera condición de hibridación permite que se hibriden la sonda de captura y la diana, y la segunda condición permite que se hibriden la sonda de captura y la sonda inmovilizada. La primera condición puede incluir la incubación a una temperatura de aproximadamente 60°C y la segunda condición puede incluir la incubación a una temperatura de aproximadamente 40°C.

30 Sigue habiendo una necesidad de un método simple, eficaz y rápido para separar un ácido nucleico de interés a partir de otros componentes de una muestra.

Resumen de la invención

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

35 Se describe un método para aislar un ácido nucleico diana de interés a partir de una muestra, que incluye las etapas de mezclar una muestra que contiene un ácido nucleico diana con una sonda de captura que se hibrida específicamente con una secuencia diana en el ácido nucleico diana, en una fase en solución que contiene un agente químico desnaturizante y una sonda inmovilizada, que se une específicamente a la sonda de captura, para proporcionar una mezcla de reacción, incubar la mezcla de reacción a una primera temperatura en un intervalo de aproximadamente 60°C a 95°C durante aproximadamente 15 minutos o menos, incubar la mezcla de reacción a una segunda temperatura en un intervalo de aproximadamente 25°C a 42°C durante aproximadamente 20 minutos o menos, formándose de este modo un complejo de hibridación formado por la sonda de captura hibridada específicamente con el ácido nucleico diana y la sonda inmovilizada, unida específicamente a la sonda de captura, en donde el complejo de hibridación está fijado a un soporte a través de la sonda inmovilizada, y separar el complejo de hibridación fijado al soporte, de otros componentes de la muestra. En una realización preferida, el agente químico desnaturizante es imidazol, a una concentración de 0,5 M a 4,2 M, y la primera incubación se realiza a aproximadamente 60°C, durante aproximadamente 1 a 15 minutos. Otras realizaciones preferidas, emplean imidazol a una concentración de 3,0 M a 3,5 M, y se incuba a una temperatura de 60°C durante aproximadamente 1 a 15 minutos. En otras realizaciones preferidas, el imidazol tiene una concentración de 2,0 M a 2,7 M y la primera incubación se realiza a aproximadamente 90°C a 95°C, durante aproximadamente 3 a 10 minutos. En algunas realizaciones preferidas, el agente químico desnaturizante es imidazol a una concentración de 2,7 M, la temperatura de la primera incubación es de aproximadamente 75°C a 95°C, durante aproximadamente 3 a 15 minutos, y el método incluye además la incubación de la mezcla de reacción a aproximadamente 60°C, durante aproximadamente 20 minutos entre la primera y la segunda etapa de incubación. En una realización preferida que utiliza imidazol a una concentración de 2,7 M, la temperatura de la primera incubación es de aproximadamente 95°C, durante aproximadamente 3 a 15 minutos, y el método incluye incubar la mezcla de reacción a aproximadamente

60°C durante aproximadamente 20 minutos, entre la primera y la segunda etapa de incubación. En algunas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico total o parcialmente bicatenario, o un ácido nucleico que incluye otra estructura secundaria o terciaria. En una realización, la sonda de captura está formada por una secuencia específica de la diana que se une al ácido nucleico diana y una región de la cola que se une a la sonda inmovilizada a través de un ligando específico. En una realización preferida, la región de cola de la sonda de captura se une a la sonda inmovilizada mediante hibridación específica con una secuencia complementaria de la sonda inmovilizada. Algunas realizaciones preferidas también incluyen detectar el ácido nucleico diana o un producto de la amplificación *in vitro*, preparado a partir del ácido nucleico diana después de separar el complejo de hibridación fijado al soporte, de otros componentes de la muestra.

Se describe un método para aislar un ácido nucleico diana de interés, a partir de una muestra que incluye las etapas de mezclar una muestra que contiene un ácido nucleico diana, con una sonda de captura que se hibrida específicamente con una secuencia diana en el ácido nucleico diana, en una fase en solución que contiene un agente químico desnaturante y una sonda inmovilizada que se une específicamente a la sonda de captura, para proporcionar una mezcla de reacción, incubar la mezcla de reacción a aproximadamente 25°C durante aproximadamente 1 a 60 minutos, formando de este modo un complejo de hibridación formado por la sonda de captura hibridada específicamente con el ácido nucleico diana y la sonda inmovilizada unida específicamente a la sonda de captura, en donde el complejo de hibridación está fijado a un soporte a través de la sonda inmovilizada, y separar el complejo de hibridación fijado al soporte, de otros componentes de la muestra. En una realización preferida, el agente químico desnaturante es imidazol, a una concentración entre 0,05 M y 0,5 M y la incubación es durante aproximadamente 2 a 30 minutos. En una realización preferida, el imidazol tiene una concentración de aproximadamente 0,5 M y la incubación es durante aproximadamente 15 minutos.

Se describe una composición para la captura específica de un ácido nucleico diana, que incluye al menos un ácido nucleico diana, al menos una sonda de captura que se hibrida específicamente con una secuencia diana en el ácido nucleico diana, una sonda inmovilizada que se une específicamente a la sonda de captura, y una mezcla de hibridación en solución que contiene imidazol a una concentración de 0,05 M a 4,2 M. En algunas realizaciones preferidas, la mezcla contiene imidazol de 0,05 a 0,5 M, mientras que en otras realizaciones preferidas, la mezcla contiene imidazol de 1,7 M a 3,5 M. En algunas realizaciones preferidas, la mezcla de hibridación contiene imidazol de 2,0 M a 2,7 M. En una realización preferida, la composición incluye una primera sonda de captura que se hibrida específicamente con una primera secuencia diana y una segunda sonda de captura que se hibrida específicamente con una segunda secuencia diana que es diferente de la primera secuencia diana.

Breve descripción de los Dibujos

La Fig. 1 es un gráfico de barras que muestra los resultados de una captura de la diana en presencia de imidazol 2,7 M en mezclas incubadas a temperatura ambiente, 64°C, 85°C y 95°C para tres dianas de ácido nucleico, VHB subtipo A (barras moderadamente sombreadas), VHB subtipo B (barras fuertemente sombreadas) y VHB subtipo C (barras ligeramente sombreadas), en comparación con la captura de la diana, realizada a temperatura ambiente en mezclas sin imidazol.

La Fig. 2 es un gráfico de barras que muestra los resultados de la captura de la diana de ácido nucleico de VHB subtipo B, a partir de mezclas que contienen imidazol 2,7 M, incubadas durante 1, 3, 5 y 7 min a 95°C, en comparación con los resultados de la captura de la diana realizada en mezclas sin imidazol.

Descripción detallada de la invención

Con los métodos descritos de captura de la diana, se aíslan ácidos nucleicos diana específicos a partir de una muestra, mediante la hibridación de una sonda de captura con el ácido nucleico diana en una mezcla, utilizando unas condiciones de hibridación que incluyen imidazol como un agente químico desnaturante en una solución, y la incubación de la mezcla en un intervalo de temperatura desde aproximadamente 60°C a 95°C, durante aproximadamente 2 a 15 minutos. En realizaciones preferidas, el ácido nucleico diana es ADN total o parcialmente bicatenario. Realizaciones preferidas del método, emplean unas condiciones de hibridación que incluyen imidazol 1,7 M a 3,2 M en una solución que contiene una sonda de captura y su diana que se incubaba a una temperatura de 75°C a 95°C, durante aproximadamente 3 a 7 minutos.

En otro método descrito, se aísla un ácido nucleico diana de interés a partir de una muestra, en una única etapa de incubación empleando una hibridación específica de una sonda de captura con el ácido nucleico diana, y uniendo la sonda de captura a una sonda inmovilizada, en una mezcla que incluye imidazol 0,5 M como agente químico desnaturante en solución, incubada a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante aproximadamente 15 a 60 minutos. En realizaciones preferidas, la sonda de captura es un oligómero de ácido nucleico compuesto por grupos de ARN 2'-metoxi o incluye uno o varios residuos de LNA. En una realización preferida, los 30 minutos de incubación a temperatura ambiente se utilizan para capturar el ácido nucleico diana de interés, utilizando una sonda de captura específica de la diana.

Estos métodos son particularmente útiles para el aislamiento de un ácido nucleico de interés que es total o parcialmente bicatenario, o que contiene otra estructura secundaria o terciaria. Algunas realizaciones emplean un

efecto sinérgico sobre la hibridación lograda, mediante el uso de un agente químico desnaturizante en solución en una mezcla que incluye la sonda de captura y el ácido nucleico diana que se incuba a aproximadamente 60°C a 95°C durante un periodo de tiempo relativamente corto, por ejemplo, aproximadamente 1 a 15 minutos. Las realizaciones preferidas del método de captura de la diana, emplean unas condiciones de hibridación en las que el agente químico desnaturizante es imidazol, a una concentración en un intervalo de aproximadamente 2,1 M a 4,2 M. Otras realizaciones utilizan condiciones de hibridación en las que el imidazol está en un intervalo de concentración de aproximadamente 2,7 M a 3,2 M. Una realización preferida del método de captura de la diana, utiliza una mezcla de hibridación que incluye imidazol aproximadamente 2,7 M en solución y por lo menos una sonda de captura específica de la diana, específica para que al menos un ácido nucleico se una de manera eficaz al ácido nucleico diana, cuando las condiciones de hibridación incluyen la incubación de la mezcla durante 3 a 7 minutos a aproximadamente 75°C a 95°C, o más preferiblemente a aproximadamente 85°C a 95°C.

Los métodos de captura de la diana descritos en esta memoria se pueden utilizar con dos o varias sondas de captura para capturar el mismo ácido nucleico diana procedente de una muestra o para capturar dos o varios ácidos nucleicos diana diferentes, procedentes de la misma muestra, utilizando un conjunto de condiciones de captura de la diana. Es decir, dos o varias sondas de captura diferentes, específicas de la diana, pueden actuar en la misma mezcla de reacción y con las mismas condiciones, siendo cada sonda específica de su secuencia diana deseada, siempre que todas las sondas presentan características de hibridación sustancialmente similares, en las condiciones de captura de la diana utilizadas. Por ejemplo, una realización es un método de captura de una diana que utiliza una primera sonda de captura, específica de un primer ácido nucleico diana y una segunda sonda de captura, específica de un segundo ácido nucleico diana que es diferente del primer ácido nucleico diana, en donde las sondas de captura primera y segunda tienen unas características de hibridación sustancialmente similares para sus respectivas dianas, en una sola mezcla de reacción que incluye imidazol y se incuba a aproximadamente 60°C a 95°C durante un breve periodo de tiempo antes de la separación de los ácidos nucleicos diana capturados, primero y segundo, a partir de otros componentes de la muestra. Otra realización es un método de captura de la diana que utiliza una primera sonda de captura, específica de una primera secuencia en un ácido nucleico diana y una segunda sonda de captura, específica de una segunda secuencia en el mismo ácido nucleico diana, en donde las sondas de captura primera y segunda muestran unas características de hibridación sustancialmente similares para sus secuencias diana respectivas, en una sola mezcla de reacción que incluye imidazol y se incuba a aproximadamente 60°C a 95°C durante un breve periodo de tiempo, antes de la separación del ácido nucleico diana capturado, de otros componentes de la muestra.

Las composiciones descritas en esta memoria, incluyen una sonda de captura específica de la diana, en una mezcla de reacción de hibridación que incluye imidazol como agente químico desnaturizante, para aumentar la eficacia de la hibridación específica del oligómero de la sonda de captura, con su secuencia diana, particularmente cuando la secuencia diana se encuentra en un ácido nucleico que es parcial o totalmente bicatenario, o que contiene otra estructura secundaria o terciaria. Las composiciones incluyen componentes para la preparación de una mezcla de reacción de hibridación que incluye un agente químico desnaturizante, preferiblemente imidazol, en una solución que puede contener uno o varios componentes de la reacción de captura de una diana, tal como al menos una sonda de captura específica del ácido nucleico diana deseado, un ligando inmovilizado que se une a la sonda de captura, o componentes químicos en una solución de hibridación (por ejemplo, sales, agentes amortiguadores). Estas composiciones incluyen equipos de reactivos para realizar la captura específica del polinucleótido diana que incluyen al menos una sonda de captura, específica de un ácido nucleico diana deseado y un agente químico desnaturizante, preferiblemente imidazol, en una mezcla en solución. Realizaciones preferidas del equipo de reactivos contienen una solución que contiene imidazol, un oligómero de sonda de captura, específico del ácido nucleico diana deseado, y un ligando inmovilizado para la sonda de captura. Otras realizaciones del equipo de reactivos también incluyen uno o varios componentes utilizados en el tratamiento de los ácidos nucleicos diana, capturados e aislados, en un ensayo en el que se detecta el ácido nucleico diana en una muestra, tal como una solución de lavado para purificar el ácido nucleico diana capturado, a partir de otros componentes de la muestra, o componentes utilizados en la amplificación *in vitro* de una secuencia contenida en el ácido nucleico diana capturado, y/o componentes utilizados en la detección del ácido nucleico diana capturado o productos de la amplificación, preparados a partir del ácido nucleico diana capturado.

Los reactivos preferidos para la captura de la diana incluyen al menos una sonda de captura que se hibrida específicamente con una secuencia en el ácido nucleico de interés (es decir, el ácido nucleico diana) y suficiente agente químico desnaturizante para hacer que una mezcla de hibridación, cuando se mezcla con una muestra que contiene el ácido nucleico diana, produzca el efecto sinérgico cuando la mezcla se incuba durante un breve periodo de tiempo, a temperaturas en un intervalo de aproximadamente 60°C a 95°C. Una mezcla tal, se puede producir, por ejemplo, combinando una cantidad predeterminada de un reactivo de captura de la diana que contiene la sonda de captura, con una muestra que contiene el ácido nucleico diana. La mezcla para lograr estas condiciones de hibridación se puede preparar mezclando el agente químico desnaturizante con la muestra que contiene el ácido nucleico diana, simultáneamente con la introducción de la sonda de captura, o el agente químico desnaturizante se puede añadir antes o después de que se mezcle la sonda de captura con la muestra. Realizaciones preferidas utilizan un mínimo de etapas de adición para preparar la mezcla final, utilizada con las condiciones de hibridación para la captura de la diana. Un reactivo de captura de la diana preferido incluye tanto la sonda de captura específica de la diana como un ligando inmovilizado que se une a la sonda de captura para separar de manera eficaz el

complejo de ácido nucleico diana – sonda de captura, de otros componentes de la muestra. Se apreciará que los reactivos pueden incluir una o varias sondas de captura específicas de la diana, por ejemplo, dos o varias sondas de captura específicas de la diana, siempre y cuando las sondas tengan sustancialmente las mismas características de hibridación para producir una captura eficaz de la diana, para sus secuencias diana respectivas deseadas, con las mismas condiciones de hibridación que incluyen el agente químico desnaturante y las temperaturas de incubación elegidas. Una realización preferida del reactivo incluye una primera sonda de captura, específica de un primer ácido nucleico diana y una segunda sonda de captura, específica de un segundo ácido nucleico diana, que es diferente del primer ácido nucleico diana, en donde las sondas de captura primera y segunda muestran cinéticas de hibridación sustancialmente similares para sus dianas respectivas, en una condición de hibridación única que incluye imidazol y la incubación de la mezcla de hibridación a una temperatura entre 25°C y 95°C, durante aproximadamente 30 minutos o menos. Otra realización del reactivo incluye una primera sonda de captura, específica de una primera secuencia en un ácido nucleico diana y una segunda sonda de captura, específica de una segunda secuencia en el mismo ácido nucleico diana, en donde las sondas de captura primera y segunda muestran cinéticas de hibridación sustancialmente similares, para sus respectivas secuencias diana, en una condición de hibridación única, utilizada en la captura de la diana.

Las composiciones y los métodos descritos en esta memoria, son particularmente útiles para el aislamiento de ácidos nucleicos diana que son parcial o completamente bicatenarios (por ejemplo, ADNbc) o que contienen una estructura secundaria (por ejemplo, estructuras de horquilla) en condiciones relativamente suaves. Otros métodos de aislamiento conocidos incluyen frecuentemente una etapa de desnaturalización del ácido nucleico diana (por ejemplo, hirviendo durante 5-10 min) para volver el ácido nucleico diana monocatenario, pero tales tratamientos son difíciles de realizar, pueden provocar una contaminación del personal del laboratorio o del equipo, si un recipiente se abre o explota, y pueden producir estructuras que vuelvan poco eficaz el aislamiento de los ácidos nucleicos, p. ej., agregados de coagulación o ácidos nucleicos dañados. Además, una desnaturalización insuficiente o una renaturalización de los ácidos nucleicos desnaturalizados, antes de la captura de la diana, puede dar como resultado una captura defectuosa.

Los métodos y las composiciones descritas en esta memoria, son útiles para purificar secuencias deseadas de ácidos nucleicos, a partir de una mezcla compleja, tal como a partir de una muestra que contiene ácidos nucleicos o células, que se pueden tratar empleando métodos convencionales para liberar los ácidos nucleicos intracelulares en una solución. Los métodos son útiles para la preparación de ácidos nucleicos para uso en ensayos o procedimientos de biología molecular, tales como ensayos de diagnóstico que detectan una secuencia específica, pruebas forenses que detectan la presencia de material biológico, o ensayos para detectar contaminantes en el agua, en el medio ambiente o en alimentos. Los métodos y las composiciones descritos en esta memoria, son útiles para la preparación de ácidos nucleicos para amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos, que se utilizan en muchas aplicaciones. Debido a que los métodos concentran los ácidos nucleicos diana y los separan de otros componentes de la muestra que podrían interferir con las etapas siguientes del ensayo, estos métodos son útiles para mejorar la especificidad y/o la sensibilidad del ensayo. Los métodos son relativamente simples de realizar, haciéndolos útiles para escrutar especímenes de forma manual o automática.

Una "muestra" o "especimen" se refiere a cualquier composición en la que puede existir un ácido nucleico diana, como parte de una mezcla de componentes, por ejemplo, en muestras de agua o ambientales, en productos alimenticios, en materiales recogidos para análisis forense o en muestras de biopsias para pruebas de diagnóstico. "Muestra biológica" se refiere a cualquier tejido o material obtenido a partir de un organismo vivo o muerto que puede contener un ácido nucleico diana, incluyendo, por ejemplo, células, tejidos, material lisado procedente de células o tejidos, esputo, sangre periférica, plasma, suero, muestras de frotis cervicales, tejidos de biopsias (por ejemplo, ganglios linfáticos), tejido respiratorio o exudados, tejido gastrointestinal, orina, heces, semen u otros fluidos o materiales. Una muestra se puede tratar para destruir físicamente un tejido y/o una estructura de la célula para liberar componentes intracelulares en una solución que puede contener enzimas, amortiguadores, sales, detergentes y otros compuestos, tales como los que se usan para preparar una muestra para análisis empleando métodos convencionales.

"Ácido nucleico" se refiere a un compuesto multímero que comprende nucleótidos o análogos que tienen bases nitrogenadas heterocíclicas o análogos de bases, unidos entre sí para formar un polinucleótido, que incluye ARN, ADN, ARN-ADN mixtos convencionales, y polímeros que son análogos a los mismos. Un ácido nucleico "de cadena principal" puede estar formado por una variedad de enlaces, que incluyen uno o varios enlaces azúcar-fosfodiéster, uniones péptido-ácido nucleico ("ácidos nucleicos peptídicos" o ANP; documento de patente PCT núm. WO 95/32305), enlaces fosforotioato, enlaces metilfosfonato o combinaciones de los mismos. Los restos de azúcar de un ácido nucleico pueden ser ribosa, desoxirribosa o compuestos similares con sustituciones, por ejemplo, sustituciones 2' metoxi o 2' haluro. Las bases nitrogenadas pueden ser bases convencionales (A, G, C, T, U), análogos de las mismas (por ejemplo, inosina u otras; véase "The Biochemistry of the Nucleic Acids" 5-36, Adams y col., compiladores, 11ª ed., 1992), derivados de purinas o pirimidinas (p. ej., N⁴-metil desoxigaunosina, deaza- o aza-purinas, deaza- o aza-pirimidinas, bases de pirimidina con grupos sustituyentes en la posición 5 o 6, bases de purina con un sustituyente en las posiciones 2, 6 u 8, 2-amino-6-metilaminopurina, O⁶-metilguanina, 4-tio-pirimidinas, 4-amino-pirimidinas, 4-dimetilhidrazina-pirimidinas y O⁴-alquil-pirimidinas; documentos de Patente de EE.UU. núm. 5378825 y PCT núm. WO 93/13121). Los ácidos nucleicos pueden incluir uno o varios residuos "sin bases", en donde la cadena principal no incluye ninguna base nitrogenada en una o en varias posiciones (documento Patente

de EE.UU. núm. 5.585.481). Un ácido nucleico puede incluir solo azúcares, bases y enlaces de ARN o ADN, o puede incluir ambos, componentes convencionales y sustituciones (por ejemplo, bases convencionales con enlaces 2' metoxi, o polímeros que contienen bases convencionales y análogos). La expresión incluye un "ácido nucleico bloqueado" (LNA, en inglés), un análogo que contiene uno o varios monómeros de nucleótidos de LNA con una unidad de furanosa bicíclica, bloqueada en una conformación de azúcar que imita ARN, que mejoran la afinidad de la hibridación de secuencias de ARN y de ADN complementarios (Vester, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41). Realizaciones de oligómeros que pueden afectar a la estabilidad de un complejo de hibridación, incluyen oligómeros de PNA, oligómeros que incluyen ARN sustituido con 2'-metoxi o 2'-fluoro, u oligómeros que afectan a la carga total, a la densidad de la carga, o asociaciones estéricas de un complejo de hibridación, que incluyen oligómeros que contienen enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos) o grupos neutros (por ejemplo, metilfosfonatos).

Un "oligómero" o un "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico, generalmente con menos de 1.000 nucleótidos (nt), que los incluye en una escala de tamaño que tiene un límite inferior de aproximadamente 2 a 5 nt y un límite superior de aproximadamente 500 a 900 nt. Algunas realizaciones preferidas son oligómeros en un intervalo de tamaño con un límite inferior de aproximadamente 5 a 15 nt y un límite superior desde aproximadamente 50 a 600 nt, y otras realizaciones preferidas tienen un intervalo de tamaño con un límite inferior de aproximadamente 10 a 20 nt y un límite superior de aproximadamente 22 a 100 nt. Los oligómeros se pueden purificar a partir de fuentes naturales, pero preferiblemente se sintetizan utilizando cualquier método enzimático o químico bien conocido. A los oligómeros se puede hacer referencia mediante nombres funcionales (por ejemplo, sonda de captura, cebador o cebador del promotor) que se entiende que se refieren a oligómeros.

"Sonda de captura", "oligonucleótido de captura" u "oligómero de captura" se refieren a un oligómero de ácido nucleico que se hibrida específicamente a una secuencia diana en un ácido nucleico diana, mediante el apareamiento de bases y se une a un ligando sobre una sonda inmovilizada, para capturar el ácido nucleico diana en un soporte. Una realización preferida de un oligómero de captura incluye dos regiones de unión: una región específica de la diana y una región que se une a la sonda inmovilizada, por lo general en el mismo oligómero, aunque las dos regiones pueden estar presentes en dos oligómeros diferentes, unidos entre sí con uno o varios enlazadores.

"Sonda inmovilizada", "oligómero inmovilizado" o "ácido nucleico inmovilizado" se refieren a un ligando de ácidos nucleicos que une un oligómero de captura a un soporte, directa o indirectamente. Una sonda inmovilizada unida a un soporte facilita la separación de una diana unida a una sonda de captura, a partir de material no unido en una muestra. Se puede utilizar cualquier soporte (por ejemplo, matrices o partículas en solución), que puede estar compuesto de cualquiera entre una variedad de materiales (por ejemplo, nilón, nitrocelulosa, vidrio, poliacrilato, polímeros mixtos, poliestireno, polipropileno silano o metal). Los soportes preferidos son partículas magnéticamente atraíbles, por ejemplo, perlas monodispersas paramagnéticas (tamaño uniforme \pm 5%) a las que se une una sonda inmovilizada directamente (por ejemplo, a través de un enlace covalente, una quelación o una interacción iónica) o indirectamente (por ejemplo, a través de un enlazador), en donde la unión es estable durante las condiciones de hibridación de los ácidos nucleicos.

"Separación" o "purificación" se refiere a la eliminación de uno o varios componentes de una muestra, a partir de uno o varios componentes de otra muestra, por ejemplo, eliminando algunos ácidos nucleicos a partir de una solución generalmente acuosa que también puede contener proteínas, carbohidratos, lípidos u otros ácidos nucleicos. En realizaciones preferidas, una etapa de separación o de purificación elimina el ácido nucleico diana al menos de aproximadamente 70%, más preferiblemente al menos de aproximadamente 90% y, aún más preferiblemente, al menos de aproximadamente 95% de los otros componentes de la muestra.

"Las condiciones de hibridación" se refieren a las condiciones físicas y químicas acumuladas con las que las secuencias de ácidos nucleicos que son total o parcialmente complementarias, forman un dúplex o un complejo de hibridación, por lo general mediante el apareamiento convencional de bases. Tales condiciones son bien conocidas por los expertos en la técnica, son predecibles basándose en la composición de la secuencia de los ácidos nucleicos implicados en la formación de un complejo de hibridación, o se pueden determinar empíricamente utilizando ensayos de rutina (por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989) en las secciones 1.90-1.91, 7.37-7.57, 9.47-9.51 y 11.47-11.57, en particular las secciones 9.50-9.51, 11.12-11.13, 11.45-11.47 y 11.55 a 11.57).

"Suficientemente complementaria" significa que una secuencia de bases de ácido nucleico contigua, es capaz de hibridarse con otra secuencia de bases mediante un apareamiento convencional de bases (enlaces de hidrógeno) entre una serie de bases complementarias. Las secuencias complementarias pueden ser completamente complementarias en cada posición en una secuencia de oligómero, en relación con su secuencia diana, empleando el apareamiento convencional de bases (por ejemplo, el emparejamiento de G:C, A:T o A:U) o las secuencias pueden contener una o varias posiciones que no son complementarias mediante el apareamiento de bases (incluidos los residuos sin bases), pero tales secuencias son suficientemente complementarias porque la secuencia completa de oligómeros es capaz de hibridarse específicamente con su secuencia diana en condiciones de hibridación adecuadas. Las bases contiguas en un oligómero son al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, y más preferiblemente completamente complementarias a la secuencia diana deseada.

Una "amplificación del ácido nucleico" se refiere a cualquier procedimiento *in vitro*, bien conocido que produce múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico diana, o de su secuencia complementaria, o de fragmentos de las mismas (es decir, una secuencia amplificada que contiene menos del ácido nucleico diana completo). Ejemplos de procedimientos bien conocidos, incluyen los métodos de transcripción asociados, tales como la amplificación mediada por transcripción (TMA), la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA) y otros (documentos de Patente de EE.UU. núm. 5.399.491, 5.554.516, 5.437.990, 5.130.238, 4.868.105 y 5.124.246), la amplificación mediada por replicasa (documento de Patente de EE.UU. núm. 4.786,600), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (documentos de Patente de EE.UU. núm. 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159), la reacción de cadena de la ligasa (LCR) (documento de solicitud de patente EP 0320308) y la amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA) (documento de Patente de EE.UU. núm. 5.422,252).

La "sonda de detección" se refiere a un oligómero de ácido nucleico que se hibrida específicamente con una secuencia de ácido nucleico diana, que incluye una secuencia amplificada, en condiciones que promueven la hibridación, para permitir la detección del ácido nucleico diana. La detección puede ser directa (es decir, una sonda hibridada directamente con la diana) o indirecta (es decir, una sonda hibridada con una estructura intermedia que conecta la sonda con la diana). Una secuencia diana de la sonda, se refiere en general a la secuencia específica dentro de una secuencia más larga, con la que la sonda se hibrida específicamente. Una sonda de detección puede incluir secuencias específicas de la diana y otras secuencias o estructuras que contribuyen a la estructura tridimensional de la sonda, dependiendo de si la secuencia diana está presente (documentos de Patente de EE.UU. núm. 5.118.801, 5.312.728, 6.835.542, y 6.849.412).

Un "marcador" se refiere a un resto o a un compuesto que se detecta o que conduce a una señal detectable, que puede estar unido directa o indirectamente a una sonda de ácido nucleico. Realizaciones que utilizan la unión directa, incluyen el uso de enlaces covalentes o interacciones no covalentes, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas o iónicas y la formación de quelatos o complejos de coordinación. Realizaciones que utilizan la unión indirecta, incluyen el uso de un resto que conecta o de un enlazador, por ejemplo, a través de un anticuerpo u oligonucleótido(s) adicional(es), que se pueden utilizar para amplificar una señal detectable. Cualquier resto detectable puede ser un marcador, por ejemplo, radionúclido, ligando tal como biotina o avidina, enzima, sustrato enzimático, grupo reactivo, cromóforo tal como un tinte o una partícula (por ejemplo, látex o perlas metálicas) que imparte un color detectable, un compuesto luminiscente (por ejemplo un compuesto bioluminiscente, fosforescente o quimioluminiscente), y un compuesto fluorescente. Realizaciones preferidas incluyen un "marcador detectable homogéneo" que es detectable en un sistema de ensayo homogéneo en el que, en una mezcla, una sonda marcada y unida muestra un cambio detectable, en comparación con una sonda marcada no unida, lo que permite que se detecte el marcador en una forma homogénea, sin tener que retirar físicamente la sonda marcada hibridada de la no hibridada (documentos de Patente de EE.UU. núm. 5.283.174, 5.656.207 y 5.658.737). Los marcadores homogéneos detectables preferidos incluyen compuestos quimioluminiscentes, más preferiblemente compuestos de éster de acridinio ("AE"), tales como AE convencional o derivados de AE que son bien conocidos (documentos de Patente de EE.UU. núm. 5.656.207, 5.658.737 y 5.639.604). Métodos de síntesis de los marcadores, fijación de los marcadores a los ácidos nucleicos y señales detectoras procedentes de los marcadores, son bien conocidos (por ejemplo, Sambrook, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2^a ed., cap. 10, y los documentos de Patente de EE.UU. núm. 5.658.737, 5.656.207, 5.547.842, 5.283.174 y 4.581.333).

A no ser que se defina de otro modo, los términos técnicos utilizados en esta memoria tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la técnica o en definiciones que se encuentran en la bibliografía técnica, por ejemplo, el Diccionario de Microbiología y Biología Molecular, 2^a ed. (Singleton y col., 1994, John Wiley & Sons, New York, NY), El Diccionario de Biología de Harper Collins (Hale y Marham, 1991, Harper Perennial, Nueva York, NY) y publicaciones similares. A menos que se describa de otro modo, las técnicas empleadas o contempladas en esta memoria son métodos convencionales bien conocidos.

Los métodos de captura de la diana descritos, pueden ser el resultado de aumentar la eficacia de la hibridación entre una sonda de ácido nucleico y un ácido nucleico diana, en una solución que incluye otros componentes. Estos métodos pueden utilizar un efecto sinérgico que se produce cuando una mezcla de hibridación que contiene un agente químico desnaturalizante, por ejemplo, imidazol, se incuba durante un breve periodo de tiempo a temperatura elevada, por ejemplo, 60°C a 95°C, antes de la separación de un complejo de hibridación que incluye la sonda de captura y el ácido nucleico diana, de otros componentes de la mezcla. Realizaciones preferidas utilizan temperaturas de incubación de aproximadamente 75°C a 95°C e imidazol en la mezcla de hibridación, para aumentar la eficacia y la tasa de hibridación específica entre la sonda de captura y su secuencia diana. Otras realizaciones preferidas son composiciones que consisten en una solución que contiene al menos un oligómero de sonda de captura y su ácido nucleico diana deseado, en una solución que incluye imidazol aproximadamente de 1,7 M a 2,7 M.

Otro método de captura de la diana, referido como un método "convencional", utiliza etapas similares, pero no incluye un agente químico desnaturalizante en la mezcla (documentos de Patente de EE.UU. núm. 6.110.678, 6.280.952 y 6.534.273). Los métodos descritos en esta memoria proporcionan una captura eficaz de la diana, en condiciones relativamente suaves, en particular para ácidos nucleicos diana parcial o totalmente bicatenarios (por ejemplo, ADNbc, ARNds o híbridos de ADN/ARN). Los métodos descritos son útiles para mejorar el rendimiento y la sensibilidad del ensayo, en particular para ensayos que utilizan los ácidos nucleicos diana aislados en procedimientos posteriores, tales como la amplificación y/o la detección *in vitro*. Las condiciones relativamente

suaves descritas en esta memoria, incluyen un agente químico desnaturalizante en una mezcla de hibridación que se puede utilizar a temperatura ambiente o calentada durante un breve periodo de tiempo, por ejemplo, aproximadamente 60-95°C durante 15 minutos o menos.

5 Los oligómeros preferidos de la sonda de captura incluyen una secuencia específica de la diana que se une específicamente a una secuencia en el ácido nucleico diana, y un resto que se une a una sonda inmovilizada, para la separación del complejo de hibridación que incluye el ácido nucleico diana del resto de la mezcla. Algunas realizaciones preferidas de oligómeros de captura incluyen una secuencia de cola (por ejemplo, una secuencia sustancialmente homopolímera) que se hibrida con una secuencia complementaria inmovilizada sobre un soporte. 10 Otras realizaciones de la sonda de captura, se unen a una sonda inmovilizada empleando un resto que es un miembro de un ligando (por ejemplo, ADN biotinilado y avidina o estreptavidina inmovilizadas). En una realización que utiliza una sonda de captura con una secuencia específica de la diana y una secuencia de cola, la sonda de captura se mezcla con una muestra que contiene el ácido nucleico diana y, en condiciones de hibridación que incluyen el agente químico desnaturalizante, la porción de la sonda de captura específica de la diana, se hibrida específicamente con su secuencia diana y la porción de cola se hibrida con una secuencia complementaria 15 inmovilizada, para permitir que la secuencia diana unida al soporte, se separe de otros componentes. En realizaciones preferidas, la porción específica de la diana se hibrida con el ácido nucleico diana en una primera etapa y la porción de cola se hibrida con la secuencia inmovilizada en una segunda etapa, que se sirve de cinéticas de hibridación favorables en solución en la primera etapa. En realizaciones preferidas, las condiciones de hibridación incluyen un agente químico desnaturalizante soluble, en la mezcla que contiene la sonda de captura y el ácido 20 nucleico diana, y la incubación de la mezcla a una temperatura de 60°C a 95°C, preferiblemente de 75°C a 95°C, durante aproximadamente 15 minutos o menos para permitir la formación de un dúplex de hibridación de la sonda de captura y el ácido nucleico diana, seguido de incubación a una temperatura más baja (por ejemplo, aproximadamente 25°C a 42°C) para permitir la formación de un complejo de hibridación, formado por el ácido nucleico diana, el oligómero de captura y la sonda inmovilizada. En realizaciones en las que la sonda de captura y la 25 sonda inmovilizada se unen a través de los ligandos de ácido no nucleico, las condiciones de la hibridación permiten la formación del dúplex de hibridación sonda de captura-diana y la unión de la sonda de captura y la sonda inmovilizada a través de los ligandos.

Una sonda inmovilizada se puede conectar a un soporte mediante cualquier enlace que sea estable en las condiciones de hibridación utilizadas en el método de captura de la diana. Realizaciones preferidas utilizan un 30 soporte de partículas monodispersas que se puede recuperar de la solución, empleando métodos conocidos, por ejemplo, centrifugación, filtración, atracción magnética u otros métodos de separación física o electroquímica. El soporte con el complejo de hibridación fijado que incluye la sonda de captura y el ácido nucleico diana, se separa de otros componentes de la muestra. En algunas realizaciones, los complejos de hibridación unidos al soporte se lavan una o varias veces, en condiciones que mantienen los complejos sobre el soporte, para separar adicionalmente 35 otros componentes, que incluyen otros ácidos nucleicos, del ácido nucleico diana capturado. El ácido nucleico diana se aísla y se concentra sobre el soporte, es decir, la concentración de ácido nucleico diana sobre el soporte es superior a la de la muestra inicial. El ácido nucleico diana aislado, fijado al soporte o que se eluye desde el soporte, se puede utilizar en una variedad de procedimientos posteriores, tales como amplificación y/o detección *in vitro*.

Los métodos de captura de dianas descritos en esta memoria, se pueden utilizar para aislar dos o varios ácidos 40 nucleicos diana a partir de la misma muestra de forma simultánea, incluyendo dos o varias sondas de captura en la mezcla de hibridación, siendo cada sonda de captura específica de una secuencia diana. Por ejemplo, una mezcla de hibridación puede incluir una primera sonda de captura específica de una primera diana, y una segunda sonda de captura específica de una segunda diana, en donde cada sonda de captura se hibrida con su diana deseada, con las mismas condiciones de hibridación. Cada sonda de captura se puede unir a la misma sonda inmovilizada o se puede 45 unir a una sonda inmovilizada, específica de la sonda de captura individual. En una realización, las sondas de captura primera y segunda contienen ambas una región de cola poli-A y se unen a la misma sonda inmovilizada, que incluye una secuencia poli-T complementaria, purificándose de este modo las dianas primera y segunda sobre el mismo soporte. En una realización, la primera sonda de captura se une a una primera sonda inmovilizada sobre un primer soporte, y la segunda sonda de captura se une a una segunda sonda inmovilizada sobre un segundo soporte, 50 purificándose de este modo la primera diana sobre el primer soporte y la segunda diana sobre el segundo soporte. Cuando el primer y el segundo soporte muestran características de separación diferentes, la primera diana sobre el primer soporte se separa fácilmente de la segunda diana sobre el segundo soporte, aunque todos los complejos de captura se formen en la misma mezcla de reacción. Estos métodos se pueden utilizar para aislar muchas dianas a partir de una sola muestra, empleando combinaciones de diferentes sondas de captura, actuando todas ellas en las 55 condiciones de hibridación sustancialmente iguales para aislar muchas dianas a partir de una mezcla.

Las pruebas iniciales para la captura de dianas se realizaron empleando muestras que contenían una cantidad conocida de un ARN diana (ARNr 23S de *Chlamydia trachomatis*), el cual se hibridó con una sonda de detección 60 marcada, para formar un complejo diana marcado. La captura de la diana se realizó sobre el complejo marcado de la diana, empleando una sonda de captura que contiene una secuencia 5' específica de la diana, complementaria a una secuencia contenida en el ARNr y una secuencia 3' de cola, complementaria a oligonucleótidos inmovilizados sobre perlas magnéticas. Las mezclas de captura de la diana se incubaron con diferentes condiciones de hibridación, incluyendo en soluciones con y sin un agente químico desnaturalizante (urea o imidazol), desde temperatura ambiente hasta 60°C, durante distintos espacios de tiempo desde 1 hasta 60 min. El complejo de la

diana marcado, capturado sobre las perlas se separó de los otros componentes de la mezcla y la diana se detectó midiendo una señal procedente de la sonda marcada y fijada. Muchas sondas de captura específicas para diferentes secuencias diana en el ARNr, se sometieron a ensayo para determinar la eficacia de la captura de la diana a temperatura ambiente y la mayoría mostraba mayor eficacia de la captura cuando se incluía imidazol (por ejemplo, 0,05 M a 1 M). Algunas de las sondas de captura que eran eficaces en la captura de la diana a temperatura ambiente, se sometieron posteriormente a ensayo con diferentes condiciones para determinar las condiciones de hibridación que aumentaban la eficacia y/o la cinética de la captura de la diana. Por ejemplo, algunos ensayos de captura de la diana también incluían uno o varios oligonucleótidos auxiliares, complementarios a una secuencia en el ARNr para facilitar la unión de otra secuencia complementaria al ARN diana (documento de Patente de EE.UU. núm. 5.030,557). Generalmente, las sondas de captura se sintetizaron con ARN 2' metoxi en la porción específica de la diana y el ADN en la porción de cola. Las eficacias relativas de las condiciones de captura de la diana, se determinaron midiendo la señal producida a partir de sondas de detección unidas a la diana capturada, después de que se separara de la mezcla. Se realizaron diferentes sondas de captura con diferentes eficacias, en las mismas condiciones, pero casi la totalidad de las sondas de captura sometidas a ensayo mostraron un incremento en la eficacia de la captura de la diana, cuando se incluyó imidazol en la mezcla de reacción. Por ejemplo, la captura eficaz del ARNr diana (75% a 90%) con una cinética relativamente rápida, se observó cuando las mezclas de captura de la diana contenían imidazol 0,5 M y se incubaron a 60°C durante 1 minuto, a 42°C durante 10 minutos o a temperatura ambiente durante 15 minutos. Estos experimentos mostraron que las condiciones de hibridación que incluían un agente químico desnaturalizante, aumentaban generalmente la eficacia y la cinética de la captura de la diana, en comparación con condiciones de hibridación similares que no incluyeron un agente químico desnaturalizante en la mezcla de reacción. Muchos de estos ensayos mostraron señales de fondo mayores (por ejemplo, en los testigos que no contenían la sonda de captura de la diana) cuando estaba presente imidazol, comparando con ensayos similares realizados sin imidazol, pero este fue eliminado sustancialmente en ensayos posteriores, modificando las condiciones de detección (es decir, aumentando el pH del reactivo de selección a pH 9,2 e incubando más tiempo la etapa de selección, por ejemplo, 5-10 min). Los ensayos realizados con imidazol en la reacción de captura de la diana, incubados a temperaturas más bajas (25°C a 42°C) dieron como resultado típicamente una señal total menor detectable, en comparación con los ensayos de captura de la diana realizados empleando la misma sonda de captura, en una mezcla de reacción sin imidazol, incubada a una temperatura más elevada (60°C). Sin embargo, un aumento de la eficacia de captura de la diana se observó repetidamente cuando las mezclas de reacción contenían imidazol, en comparación con reacciones equivalentes que no incluían imidazol en la mezcla, para sondas y condiciones de incubación muy diferentes que se sometieron a ensayo.

Realizaciones de métodos de captura de diana eficaces se mostraron en un sistema modelo que utilizaba un ADNbc diana parcialmente sintético que fue capturado empleando una sonda de captura que incluía una secuencia específica de la diana y una porción de cola que era complementaria de un oligómero inmovilizado sobre un soporte particulado. Estos componentes se mezclaron en una solución que contenía sales y agentes amortiguadores con diferentes concentraciones de agente químico desnaturalizante y se incubaron durante un breve período de tiempo (10 minutos o menos) a diferentes temperaturas (por ejemplo, aproximadamente 60°C a 95°C) para la hibridación de la porción específica de la diana de la sonda de captura, con su ácido nucleico diana, y a continuación a una temperatura inferior (por ejemplo, TA a 42°C) para la hibridación de la porción de cola con el oligómero inmovilizado. Las partículas con los complejos fijados se separaron de los otros componentes en la mezcla y el ácido nucleico diana capturado se detectó mediante la localización de una sonda marcada para la detección, hibridada con el ácido nucleico diana o un producto de la amplificación, formado a partir de la diana capturada, medido en un ensayo homogéneo. El sistema modelo mostraba el resultado inesperado de que la hibridación entre la región específica de la diana de la sonda de captura y su secuencia diana, era eficaz en condiciones de incubación relativamente suaves, cuando un agente químico desnaturalizante se incluía en la mezcla de hibridación, pero el agente químico desnaturalizante no interfería en la hibridación entre la cola de la sonda de captura y la sonda inmovilizada, dando como resultado una captura eficaz de la diana. Aunque no se desea estar ligado a una teoría o mecanismo particular, esto puede ser el resultado de la desnaturalización incrementada de la porción bicatenaria del ADN diana, con lo que la secuencia diana se vuelve accesible para la hibridación con la sonda de captura, mientras que no se inhiben otras etapas de la captura de la diana.

Las dianas víricas también se emplearon para mostrar una mayor eficacia de la captura de la diana, empleando las composiciones y los métodos de captura de la diana descritos en esta memoria. Una de las dianas era el virus BK (BKV), que contiene un genoma de ADN totalmente bicatenario y otra diana era el virus de la hepatitis B (VHB), que tiene un genoma total o parcialmente bicatenario, dependiendo de su fase de replicación. Cuando estos virus diana se sometieron a ensayo utilizando un procedimiento convencional de captura de la diana que no incluía un agente químico desnaturalizante (descrito en los documentos de patente de EE.UU. núm. 6.110.678, 6.280.952 y 6.534.273), la captura de los genomas víricos fue defectuosa, por ejemplo, recuperando menos del 60% del ácido nucleico diana en la muestra. Los ensayos para los virus en los que se utilizaba el método de captura de la diana convencional, eran relativamente insensibles, incluso cuando los ácidos nucleicos víricos capturados se amplificaron *in vitro* y se detectaron las secuencias amplificadas. Incluso cuando la muestra que contenía el ADN vírico se calentó a una temperatura elevada (95°C) para desnaturalizar el ADN diana antes de utilizar el procedimiento de captura de la diana convencional, la sensibilidad del ensayo mostraba sólo una mejora menor. Por el contrario, cuando se empleaban realizaciones del método de captura eficaz de la diana que se describe en esta memoria, que incluían imidazol en las reacciones de captura de la diana, la sensibilidad del ensayo mejoró. Las realizaciones del

procedimiento de captura de la diana eficaz incluían una combinación con un agente químico desnaturalizante, imidazol o urea, en la mezcla de reacción y el calentamiento de la mezcla a una fase inicial en el procedimiento de captura de la diana, lo que resultó en un sorprendente efecto sinérgico que mejoraba mucho la eficacia de la captura de la diana y la sensibilidad del ensayo. Por ejemplo, una realización que incluía imidazol en el procedimiento de captura de la diana, antes de la amplificación *in vitro* del ácido nucleico, daba como resultado tasas de detección del 95% para el VHB en muestras que contenían los subtipos B, C y A de HBV (tasas de detección incrementadas 28 veces, 4 veces y 2 veces, respectivamente, en comparación con los ensayos que no incluyeron el método de captura de la diana eficaz). Otra realización empleaba urea en la mezcla de captura de la diana que se incubó a 95°C durante una etapa inicial del procedimiento de captura de la diana, después de lo cual se amplificó el ADN de VHB capturado *in vitro* y se detectaron las secuencias amplificadas. Otra realización para la captura de ADN de VBK incluía imidazol en la mezcla de captura de la diana que se incubó durante un breve periodo de tiempo a alta temperatura, seguido de una temperatura más baja, y la separación del ADN de VBK capturado, de otros componentes, lo que mejoraba 10 veces la sensibilidad del ensayo, en comparación con un ensayo similar que utilizaba un método de captura de la diana convencional. En los ensayos comparativos, el ADN de VBK capturado fue amplificado *in vitro* y se detectaron las secuencias de BKV amplificado, empleando una sonda de detección marcada.

Los ejemplos se incluyen para describir las realizaciones de los métodos de captura de la diana descritos y las composiciones. En algunos casos, después de la captura de la diana, los ácidos nucleicos capturados fueron sometidos a etapas adicionales, por ejemplo, la amplificación *in vitro* y/o la detección utilizando una sonda marcada, utilizando métodos conocidos (por ejemplo, documentos de Patente de EE.UU. núm. 5.399.491 y 5.554.516, para la amplificación; documentos de Patente de EE.UU. núm. 5.283.174, 5.656.207 y 5.658.737, para detectar la sonda marcada, la hibridación y las etapas de detección). Algunos ejemplos describen ensayos realizados con diferentes realizaciones de un procedimiento de captura de la diana que incluyen un agente químico desnaturalizante, que se pueden comparar con los ensayos realizados con un procedimiento de captura de la diana convencional que no incluye un agente químico desnaturalizante (documentos de Patente de EE.UU. núm. 6.110.678, 6, 280.952 y 6.534.273). A menos que se especifique lo contrario, los reactivos utilizados en general en los ensayos descritos a continuación, son los siguientes. Reactivo de transporte de la muestra: laurilsulfato de litio 110 mM (LLS), NaH₂PO₄ 15 mM, Na₂HPO₄ 15 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, pH 6,7. Reactivo de captura de la diana (TCR): HEPES 789 mM, ácido succínico 230 mM, 10% p/v de LLS, LiOH 679 mM, 0,03% de agente anti-espumante, pH 6,4 y 100 µg/ml de partículas paramagnéticas (partículas de 0,7 -1,05 µ de SERA-MAG[®] MG-CM, Seradyne, Inc., Indianápolis, IN) con oligómeros (dT)₁₄ unidos covalentemente al mismo, o HEPES (tipo C) 250 mM, LiCl 1,88 M, LiOH 310 mM, EDTA 100 mM, pH 6,4, y 250 µg/ml de partículas paramagnéticas (partículas de 0,7-1,05 µ de Sera-Mag[®] MG-CM) con oligómeros (dT)₁₄ unidos covalentemente al mismo. Solución de lavado: HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, NaOH 6,5 mM, EDTA 1 mM, 0,3% (v/v) de etanol, 0,02% (p/v) de metilparabeno, 0,01% (p/v) de propilparabeno, y 0,1% (p/v) de laurilsulfato de sodio, pH 7,5. Reactivo de amplificación: una solución concentrada mezclada con otros componentes de la reacción TMA para producir una mezcla que contiene Na-HEPES 47,6 mM, N-acetil-L-cisteína 12,5 mM, 2,5% de Triton[®] X-100, KCl 54,8 mM, MgCl₂ 23 mM, NaOH 3 mM, cada dNTP 0,35 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), rATP 7,06 mM, rCTP 1,35 mM, UTP 1,35 mM, rGTP 8,85 mM, Na₂EDTA 0,26 mM, 5% v/v de glicerol, 2,9% de trehalosa, 0,225% de etanol, 0,075% de metilparabeno, 0,015% de propilparabeno y 0,002% de rojo fenol, pH 7,5-7,6. Los cebadores y/o las sondas pueden estar en el reactivo de amplificación o se añaden por separado a una mezcla. Enzimas para TMA: aproximadamente 90 U/µl de transcriptasa inversa de MMLV (RT) y aproximadamente 20 U/µl de ARN-polimerasa de T7 por reacción (1 U de TA incorpora 1 nmol de dTTP en 10 min a 37°C, utilizando un molde de poli A cebado con oligo dT 200-400 µM y 1 U de ARN-polimerasa de T7 incorpora 1 nmol de ATP en el ARN en 1 hora a 37°C, utilizando un promotor de T7 en un molde de ADN). Reactivo de la sonda: sondas de detección marcadas con AE en una solución de (a) Li-succinato 100 mM, 3% (p/v) de LLS, mercaptoetanosulfonato (MES) 10 mM, y 3% (p/v) de polivinilpirrolidona, o (b) Li-succinato 100 mM, 0,1% (p/v) de LLS y MES 10 mM. Reactivo de hibridación: (tipo C) ácido succínico 100 mM, 2% (p/v) de LLS, LiOH 100 mM, aldritol-2 15 mM, LiCl 1,2 M, EDTA 20 mM y 3,0% (v/v) de etanol, pH 4,7; o (tipo P) ácido succínico 190 mM, 17% (p/v) de LLS, EDTA 3 mM, y EGTA 3 mM, pH 5,1. Reactivo de selección: ácido bórico 600 mM, NaOH 182,5 mM, 1% (v/v) de octoxinol (TRITON[®] X-100), pH 8,5 o pH 9,2, para hidrolizar los marcadores de AE sobre oligómeros de sondas de detección no hibridados. Los Reactivos de detección comprenden el Reactivo de Detección I: ácido nítrico 1 mM y H₂O₂ 32 mM, y el Reactivo de Detección II: NaOH 1,5 M, para producir quimioluminiscencia de los marcadores de AE (ver documentos de patente de EE.UU. núm. 5.283.174, 5.656.744 y 5.658.737).

Para la comparación con los métodos de captura de la diana que incluyen un agente químico desnaturalizante, se describe brevemente el procedimiento de captura de la diana convencional. En el procedimiento convencional normalmente se mezcla una muestra que contiene el ácido nucleico diana (ARN o ADN) con aproximadamente 1,75 pmoles de una sonda de captura, específica del ácido nucleico diana (es decir, una sonda que se hibrida específicamente con una secuencia contenida en el ácido nucleico diana en las condiciones de hibridación utilizadas) y aproximadamente 100 µg de sonda inmovilizada, fijada a partículas paramagnéticas (sondas dT₁₄ fijadas a partículas de 0,7-1,05 µ (Seradyne), empleando química de carbodiimidas (Lund y col., 1988, *Nuc. Acids Res.* 16:10861-10880)) en el reactivo de captura de la diana. La mezcla puede incluir un oligómero de amplificación (por ejemplo, un cebador) que se hibrida con el ácido nucleico diana (documento de patente de EE.UU. núm. 6.534.273). La mezcla de captura de la diana convencional se calentó a una temperatura de 55°C a 60°C durante aproximadamente 15 a 30 minutos, luego se enfrió a temperatura ambiente (TA) durante 5 a 15 minutos, para

5 permitir la hibridación secuencial de la sonda de captura y del ácido nucleico diana y, a continuación la sonda inmovilizada con el complejo de la sonda de captura:ácido nucleico diana. Se aplicó un campo magnético para separar las partículas con complejos fijados, de la fase en solución y se concentraron en el recipiente (documento de Patente de EE.UU. núm. 4.895,650) y el material sobrenadante se eliminó. Las partículas se lavaron suspendiéndolas en la Solución de lavado (por ejemplo, 1 ml a TA) y repitiendo la separación magnética.

10 Los ácidos nucleicos diana capturados se pueden detectar empleando un procedimiento de detección o se pueden tratar mediante amplificación *in vitro* del ácido nucleico, para amplificar parte de la secuencia de ácido nucleico diana que se detecta. Por ejemplo, para la amplificación mediada con transcripción (TMA), las partículas lavadas se suspendieron en 75 μ l de reactivo de amplificación con los cebadores y las enzimas añadidas, para preparar una mezcla que se incubaba a 41,5-42°C durante 1-2 horas (documentos de Patente de EE.UU. núm. 5.399.491 y 5.554.516). Las secuencias amplificadas se pueden detectar utilizando una sonda marcada con AE que se hibrida específicamente con una secuencia amplificada y se detecta la quimioluminiscencia procedente del marcador AE en las sondas unidas, expresada como unidades de luz relativas (ULR) (documento de Patente de EE.UU. n° 5.658.737, véase la columna 25, líneas 27-46, Nelson y col., 1996, *Biochem.* 35:8429-8438 en 8432), aunque se puede utilizar cualquiera entre una variedad de métodos de amplificación y/o métodos de detección *in vitro*.

15 Los métodos de captura de la diana que se describen en esta memoria incluyen un agente químico desnaturizante, preferiblemente imidazol, en una mezcla en fase de solución que incluye una sonda de captura específica del ácido nucleico diana deseado, reactivos para preparar una mezcla para facilitar la hibridación del ácido nucleico (por ejemplo, sales, agentes amortiguadores), un ácido nucleico diana (añadido generalmente a partir de una muestra), y una sonda inmovilizada añadida, preferiblemente en una suspensión. Una mezcla de captura de la diana puede incluir oligómeros adicionales utilizados en un ensayo, por ejemplo, oligómeros auxiliares, oligómeros cebadores de la amplificación *in vitro* y/u oligómeros de la sonda de detección. En algunas realizaciones, el agente químico desnaturizante está en los reactivos de captura de la diana que incluyen la sonda de captura, los cuales se mezclan con la muestra que contiene el ácido nucleico diana para formar una mezcla que se incubaba a una temperatura elevada (por ejemplo, de 60°C a 95°C) durante un breve espacio de tiempo (por ejemplo, 1 a 15 minutos). En una realización preferida, la mezcla se incubaba a una temperatura de 75°C a 95°C durante aproximadamente 3 min, y a continuación se realiza el procedimiento de captura de la diana. Aunque las temperaturas específicas y los tiempos de incubación utilizados en realizaciones particulares del método eficaz de captura de la diana, pueden variar basándose en la combinación elegida de una sonda de captura particular y un ácido nucleico diana, el método incluye un agente químico desnaturizante en la mezcla de captura de la diana, que se incubaba durante un breve periodo de tiempo (por ejemplo, 1 a 30 min, preferiblemente 1 a 15 minutos) a la temperatura de hibridación (por ejemplo, desde la temperatura ambiente hasta 95°C) antes de la etapa de separación que retira la diana capturado de la mezcla. Además de aumentar la sensibilidad del ensayo, los métodos de captura de la diana descritos en esta memoria, son fáciles de llevar a cabo, de forma manual o en un sistema automático y añaden sólo unos pocos minutos al tiempo total del ensayo. Las realizaciones del método de captura de la diana eficaz, descrito en esta memoria, son útiles para mejorar la sensibilidad del ensayo hacia los ácidos nucleicos diana que son parcial o totalmente bicatenarios, o contienen regiones con estructura secundaria o terciaria.

EJEMPLO 1: Captura de la diana de ARN de la cual es conocida una estructura secundaria y terciaria

40 Este ejemplo muestra que las condiciones de hibridación que incluyen imidazol generalmente aumentan la eficacia y la cinética de la captura de la diana en un ARN del que se conoce que tiene una estructura secundaria y terciaria (ARNr 23S), a temperaturas de incubación relativamente bajas, por ejemplo, desde TA hasta aproximadamente 42°C, para muchas sondas de captura. La estructura secundaria y/o terciaria en el ARN diana puede inhibir la interacción con una sonda de captura y limitar la captura de la diana. Se han realizado experimentos mediante el uso de una cantidad conocida de ARNr 23S de *Chlamydia trachomatis* que se había hibridado con una sonda de detección marcada, complementaria a una secuencia en el ARNr para marcar el ARN diana antes de que fuera capturado. Típicamente, se hibridaron 200 fmol de ARNr 23S con 1 pmol de un oligonucleótido sintético marcado con AE en el reactivo de hibridación (60°C durante 30 min, seguido por enfriamiento a TA). Una parte alícuota de la mezcla hibridada de sonda de detección: diana, se mezcló con el reactivo de captura de la diana (TCR) que contenía una sonda de captura, una sonda inmovilizada, con o sin una concentración conocida de agente químico desnaturizante, y la mezcla se incubó desde TA (aproximadamente 25°C) hasta 60°C durante 1 a 60 min, antes de la recogida de la diana capturada. Las sondas de captura (SEQ ID NOS. 6 a 30) contenían cada una, una secuencia 5' específica de la diana, complementaria a una secuencia contenida en el ARNr y una secuencia 3' de cola A₃₀, sintetizada con ARN 2' metoxi en la región específica de la diana y una región de cola de ADN. Sondas inmovilizadas eran oligonucleótidos dT₁₅ fijados a micropartículas magnéticas como soportes (SERA-MAG[®]). Algunos ensayos incluían en la mezcla de reacción de captura de la diana, uno o varios oligonucleótidos auxiliares, complementarios a una secuencia separada en el ARNr, para facilitar la unión de otra secuencia complementaria al ARNr diana (documento de patente de EE.UU. núm. 5.030.557, Hogan y col.). Los agentes químicos desnaturizantes eran urea 1 M o imidazol 0,05 M a 1,8 M. Tras la captura de la diana, las dianas de ARNr marcado fijadas a las partículas magnéticas, se separaron de la fase en solución empleando atracción magnética, se eliminó el material sobrenadante, las partículas con complejos fijados se lavaron varias veces con una solución de lavado, y la quimioluminiscencia procedente de la sonda marcada unida a la diana, seguido de la hidrólisis de los marcadores AE en las sondas de detección no hibridadas, utilizando el reactivo de selección, se detectó en un luminómetro

(como unidades de luz relativa (ULR), sustancialmente, tal y como se describe en el documento de Patente de EE.UU. núm. 5.658.737).

Ensayos de captura de la diana realizados a TA o 60°C en presencia de urea 1 M, aumentaban las ULR detectadas desde el ARNr capturado (de 2,2 a 3,1 veces superiores) en comparación con las señales detectadas desde muestras equivalentes que se trataron de forma idéntica, excepto que no había urea en la mezcla de captura de la diana. Dado que las soluciones acuosas de urea pueden descomponerse por el calor (desprendimiento de NH₃), se realizaron experimentos adicionales empleando imidazol en las mezclas de captura de la diana.

En una serie de ensayos, las sondas de captura (SEQ ID NOs. 6 a 29) específicas de diferentes secuencias diana en el ARNr 23S se sometieron a ensayo individualmente para estudiar la eficacia de la captura de la diana a TA, en presencia de imidazol (0,05-1 M) y todas, excepto una, mostraron una captura incrementada de la diana cuando estaba presente el imidazol, comparado con reacciones equivalentes en las que las mezclas no contenían imidazol (por ejemplo, de 1,3 a 8,8 veces de incremento en las ULR detectadas en la porción inmovilizada). Algunas de las sondas de captura (SEQ ID NOs. 6, 8, 17, 20-22, 24 y 27) se sometieron a ensayo posteriormente empleando diferentes condiciones de hibridación (incubadas a 25°C, 42°C y 60°C, con y sin presencia de imidazol). Las eficacias relativas de la captura de la diana se determinaron para cada sonda de captura y cada condición, midiendo la quimioluminiscencia producida a partir de sondas de detección unidas a la diana capturada, separadas de la fase en solución. Las sondas de captura diferentes sometidas a ensayo individualmente a TA en reacciones que no contenían imidazol, capturaban el ARNr con diferentes eficacias (0% a 70% de diana inicial), mientras que todas las sondas de captura, excepto una, capturaban más ARNr cuando en la reacción estaba presente imidazol 0,5 M (2,6% a 89% de la diana inicial). Por ejemplo, una sonda de captura mostraba altos niveles de captura de ARNr cuando las reacciones que contenían imidazol 0,5 M, se incubaron a TA (aproximadamente 75% de diana capturada en 15 min), o 42°C (aproximadamente 90% de diana capturada en 10 min), o 60°C (aproximadamente 90% de la diana capturada en 1 min). En contraste, en ausencia de imidazol, a TA, la captura de la diana era ineficaz (11% de la diana se capturó en 60 min).

Para medir la cinética de la captura de la diana, las sondas de captura (SEQ ID NOs. 6, 20, 21 y 24) se utilizaron a TA en mezclas de hibridación que no contenían imidazol o contenían imidazol 0,05 a 0,1 M para capturar ARNr 23S de *C. trachomatis*. Las sondas mostraron más captura de la diana después de 5 min de incubación en reacciones que contenían imidazol 0,1 M, en comparación con reacciones equivalentes sin imidazol. Las sondas de captura (SEQ ID Nos. 6, 20, 21) se sometieron a ensayo en ensayos similares incubados a TA durante 2, 15 y 30 minutos. El aumento de la captura de la diana se observó en todas las sondas en presencia de imidazol 0,05 M después de sólo 2 minutos de incubación, en comparación con las reacciones equivalentes sin imidazol. Una sonda de captura (SEQ ID NO: 20) se sometió a ensayo posteriormente en reacciones que no contenían imidazol o que contenían imidazol 0,05 M, incubadas a TA, 42°C o 60°C, durante 5, 15 o 30 minutos, antes de medir la señal de la diana capturada. La eficacia de la captura de la diana aumentó en todas las condiciones que incluían imidazol en las mezclas, en comparación con las reacciones equivalentes sin imidazol, observándose los mayores incrementos después de 5 minutos (incremento de 2,2 veces a TA, incremento de 1,7 veces a 42°C y 60°C), en comparación con incubaciones más largas (incremento de 1,7 veces a TA, incremento de 1,3 veces a 42°C y 60°C durante 15 min; incremento de 1,4 veces a TA, incrementos de 1,1 a 1,2 veces a 42°C y 60°C durante 30 min). Los resultados muestran el aumento de la cinética de la captura de la diana en presencia de imidazol.

EJEMPLO 2: Captura de una diana sintética presente en un ADN parcialmente bicatenario

Este ejemplo muestra la eficacia de la captura de la diana cuando las mezclas de reacción contenían diferentes concentraciones de imidazol, todas incubadas a 60°C durante 15 min, seguido por la incubación a TA durante 30 min. Para estos ensayos, se preparó un ADN parcialmente bicatenario sintetizando una hebra de SEQ ID NO: 1 y su hebra complementaria (SEQ ID NO: 2), hibridando las dos hebras entre sí (35 pmol de cada una en 20 µl de reactivo de hibridación (tipo P), incubando a 60°C durante 1 hora, y enfriando a TA). El ADNbc resultante contenía, en un extremo, un ADN monocatenario de 30 nt que es complementario a una sonda de detección (SEQ ID NO: 4). Cada mezcla de reacción de captura de la diana contenía 10 fmoles de ADNbc diana en 0,2 ml de reactivo de transporte de la muestra, al que se añadieron 0,2 ml de reactivo de captura de la diana (TCR, de tipo C) que contenía imidazol de 0 a 3,18 M, 0,1 ml de TCR que contenía 50 µg de partículas paramagnéticas (Sera-Mag[®]) con oligómeros dT₁₄ fijados covalentemente, y 20 pmoles de una sonda de captura (SEQ ID NO: 3) que contiene una región 5' específica de la diana (25 nt de LNA complementarios a una secuencia en la cadena diana del ADNbc) y una región 3' de cola poli A. Las reacciones se incubaron a 60°C durante 15 minutos, a continuación, a TA durante 30 min, y el ADN diana capturado, fijado a los soportes magnéticos se separó del material sobrenadante, tal y como se describió anteriormente. El sedimento se lavó una vez (utilizando 0,5 ml de reactivo de hibridación, de tipo P) y, a continuación se mezcló una sonda de detección marcada con AE (100 fmoles de SEQ ID NO: 4 en 0,1 ml de reactivo de hibridación, de tipo P) con el sedimento y la mezcla se incubó a 60°C durante 15 minutos para hibridar la sonda con la hebra capturada. La quimioluminiscencia de las sondas de detección unidas se detectó sustancialmente tal y como se ha descrito anteriormente (0,2 ml de reactivo de selección, pH 9,2, añadido a cada mezcla, se incubó a 60°C durante 7 minutos, y se añadieron secuencialmente los Reactivos de detección I y II para producir quimioluminiscencia detectada en un luminómetro durante 5 segundos). Un testigo de fondo que no contenía diana, se trató de manera similar. Los resultados se muestran en la Tabla 1, descritos como ULR neta (ULR total detectada menos ULR de fondo) y el porcentaje de la diana inicial capturada. Los resultados muestran que la presencia de

imidazol 2,38 M y 3,18 M en las mezclas de reacción, aumentó considerablemente la captura de la diana desde la muestra, en comparación con reacciones que incluían cantidades menores o no contenían imidazol en las mismas condiciones.

Tabla 1: Captura de una cadena diana a partir de ADNbc con diferentes concentraciones de imidazol

Imidazol (M)	Diana Capturada Detectada (URL)	Diana Capturada (%)
0	442	0,6
0,24	446	0,6
0,48	574	0,76
0,96	607	0,81
1,43	1010	1,34
1,91	2342	3,1
2,38	17621	24
3,18	50109	67

5

Se realizaron ensayos adicionales empleando las mismas condiciones, excepto que las mezclas de captura de la diana contenían imidazol 0 a 3,4 M. Los resultados se muestran en la Tabla 2, que muestra que aproximadamente un tercio o más de la diana inicial fue capturada a partir de las reacciones incubadas a 60°C que contenían imidazol 2,6 M a 3,4 M, y 65% o más de la diana fue capturada a partir de mezclas que contenían imidazol 3 M a 3,4 M.

10 Tabla 2: Captura de una cadena diana de ADNbc

Conc. de imidazol (M)	ULR Neta Detectada	% de Diana Capturada
0	688	0,92
1,5	1957	2,6
2,0	5283	7,0
2,2	10856	14,5
2,4	15812	21,0
2,6	24366	32,5
2,8	36872	49,2
3,0	51127	68,2
3,2	56916	76,0
3,4	48971	65,2

EJEMPLO 3: Captura de la diana de una cadena diana presente en ADNbc sintético

15 Ensayos adicionales se realizaron utilizando condiciones sustancialmente como las descritas en el Ejemplo 2, pero usando diferentes versiones sintéticas de la sonda de captura que contenía residuos de LNA o ADN en la región 5' específica de la diana (nt 1-25 de SEQ ID NO: 3). Cada reacción de captura de la diana incluía 20 fmoles de la diana de ADNbc en 0,2 ml de reactivo de transporte de la muestra, a los que se añadió 0,2 ml de TCR (tipo C) que contenía imidazol de 0 a 4,2 M, 0,1 ml de TCR que contenía 50 µg de partículas magnéticas (Sera-Mag®) con oligómeros dT₁₄ fijados covalentemente y 20 pmoles de la sonda de captura que contenía residuos de LNA o ADN en la secuencia 5' específica de la diana. Las reacciones se incubaron a 60°C durante 15 min, luego a TA durante 30 min, y se trataron como se ha descrito anteriormente para la captura, el lavado y las etapas de detección. Los testigos fueron tratados de manera similar, pero no contenían diana (testigo de fondo) o no contenían la sonda de captura (URL neta: 92). Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 3, descritos como URL neta (URL de fondo sustraída de la URL detectada total) y el porcentaje de diana capturada en cada condición de reacción. Los resultados muestran que el imidazol 3,5 M y 4,2 M presente en las mezclas de reacción, aumentó la eficacia de la captura de la diana, en comparación con reacciones que contenían imidazol 2,1 M. El aumento de la eficacia de la captura de la diana se observó para las sondas de captura de LNA y de ADN, capturándose más diana con la sonda de LNA que con la sonda de ADN.

25 Tabla 3: Captura de una cadena diana a partir de ADNbc empleando sondas de LNA y ADN

Sonda de captura	Conc. de imidazol (M)	URL neta detectada	% de diana capturada
ADN	2,1	6781	4,4
	3,5	92189	61
	4,2	33378	22
LNA	2,1	8101	5,4
	3,5	100277	66,4
	4,2	43007	28,5

Ensayos adicionales de captura de la diana se realizaron utilizando sustancialmente las mismas condiciones descritas anteriormente, pero usando imidazol 3,2 M en las mezclas de reacción, y las sondas de captura que contenían diferentes porciones de LNA se compararon con sondas de captura de ADN de la misma secuencia. En estos ensayos, una sonda de captura que era completa o parcialmente de LNA en la región específica de la diana de 25 nt, era más eficaz para la captura de la diana que la sonda de captura de ADN (64-65% comparado con 57,4% para la sonda de ADN). Una sonda de captura que era de LNA en la región específica de la diana y parte de la región de la cola (10 de 30 nt poliA), aumentó aún más la eficacia de captura de la diana (86%), en comparación con la sonda de ADN (57,4%).

Usando sustancialmente las mismas condiciones de captura de la diana, con o sin imidazol 3,2 M en las reacciones, se emplearon dos sondas de detección diferentes, específicas para la hebra diana (SEQ ID NO: 1) para determinar si la diana de ADN parcialmente bicatenario (SEQ ID NO: 1 hibridado con SEQ ID NO: 2) se desnaturalizó durante el procedimiento de captura de la diana. Una sonda de detección (SEQ ID NO: 4, marcada con AE en el nt 18-19) era específica de una secuencia diana en el extremo 5' de la hebra diana, es decir, la porción del ADN parcialmente bicatenario que es monocatenaria en todas las condiciones. La segunda sonda de detección (SEQ ID NO: 5, marcada con AE en el nt 18-19) era específica de una secuencia diana en el extremo 3' de la hebra diana, es decir, en la porción del ADN parcialmente bicatenario que es bicatenaria cuando se añade a la mezcla de captura de la diana. Las mezclas de la reacción de captura de la diana que contenían la sonda de captura de LNA (nt 1-25) o la sonda de captura ADN, se incubaron a 60°C durante 20 min, luego a TA durante 20 min, y se trataron tal y como se describió anteriormente para la captura magnética, el lavado y las etapas de detección utilizando partes alícuotas separadas para las dos sondas de detección. Para comparar, se detectó una cadena de ADN de SEQ ID NO: 1 con cada sonda de detección para determinar la señal de una diana completamente monocatenaria. Sin imidazol en las reacciones de captura de la diana, la captura de la cadena diana a partir de la diana de ADN parcialmente bicatenario, fue relativamente ineficaz (3,8-9,2%), mientras que con imidazol en las reacciones de captura de la diana, la captura de la cadena diana fue eficaz (79-100%). Cuando había imidazol en las reacciones de captura de la diana, las señales de detección procedente de ambas sondas de detección fueron similares, es decir, para una mezcla de captura de la diana después de la captura, la URL detectada empleando la sonda de detección 3' era similar a la URL detectada utilizando la sonda de detección 5'. Estos resultados muestran que la hebra capturada era monocatenaria a partir de mezclas que incluían imidazol y que se incubaron a 60°C.

EJEMPLO 4: Captura de la diana de VHB de subtipo B con imidazol e incubación a 95°C

Este ejemplo muestra que el imidazol presente en el reactivo de captura de la diana (TCR) mejoraba la sensibilidad de la detección del VHB subtipo B, en un formato de ensayo que combina la captura de la diana, la *amplificación in vitro* de secuencias de HBV (TMA) y la detección de la secuencia amplificada mediante el uso de sondas marcadas con quimioluminiscencia (documentos de Patente de EE.UU. n° 5.790.219, McDonough y col., publ. de EE.UU. núm. 20040029111, Linnen y col.; ensayo discriminatorio del virus de la hepatitis B (VHB) (dVHB) de PROCLEIX® Ultrio, Chiron Corp., Emoryville, CA). Este ejemplo muestra que el imidazol presente durante la captura de la diana, junto con una incubación a temperatura elevada, mejoraba significativamente la sensibilidad del ensayo. Estas condiciones se sometieron a ensayo empleando muestras procedentes de un panel de suero clínico, conocido por contener VHB subtipo B (utilizado en una dilución 1:3). Se sometieron a ensayo 20 duplicados para cada condición experimental, para determinar el efecto de las modificaciones de la captura de la diana frente a condiciones de ensayo testigos que utilizaban el procedimiento de captura de la diana convencional, seguido por las mismas etapas del ensayo de amplificación y detección. Los testigos negativos (7 duplicados) contenían suero normal (sin VHB) y fueron tratados de forma idéntica. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando las instrucciones del proveedor (prospecto IN0142 Rev. 1 y Rev. 10-01-07-271 Rev. C.1 del ensayo discriminatorio del virus B de la hepatitis (VHB) (dVHB) de PROCLEIX® Ultrio, resumido del modo siguiente. Imidazol (cristalino, FW 68.08) se añadió directamente al reactivo de captura de la diana (TCR) hasta una concentración final de 1,7 M o 2,7 M. Los tubos con muestra testigo contenían 500 µl de muestra y 400 µl de TCR sin imidazol. En el método de captura de la diana modificado, los tubos recibían 400 µl adicionales de TCR que contenía imidazol hasta tener una concentración final de 1,7 M o 2,7 M en 800 µl de TCR. Los tubos de captura de la diana que no tuvieron una etapa de incubación a 95°, se sellaron, se mezclaron y se mantuvieron a TA durante 15 min, se incubaron a 60°C durante 20 min, y luego a TA durante 15 minutos, antes de la separación de los complejos de hibridación sobre los soportes magnéticos. Los tubos de captura de la diana que habían tenido una etapa de incubación a 95°C, se sellaron, se mezclaron y se incubaron a 95°C durante 15 minutos sin agitación, a continuación, se incubaron a 60°C durante 20 min, y a TA durante 15 min. Los tubos fueron tratados para separar magnéticamente las partículas con ácidos nucleicos capturados, los ácidos nucleicos capturados se lavaron sobre las partículas, y luego se trataron para realizar la amplificación y la detección *in vitro* de las secuencias de VHB. Brevemente, los ácidos nucleicos capturados de VHB, se amplificaron en busca de secuencias específicas mediante el uso de una combinación de cebadores específicos de VHB y TMA para producir productos amplificados que se detectaron mediante hibridación con sondas marcadas que se unían específicamente a las secuencias amplificadas de VHB (documento de publ. de EE.UU. núm. 20040029111). Las señales procedentes de los marcadores asociados con las sondas unidas, se produjeron y se detectaron como quimioluminiscentes (ULR) en un ensayo de detección homogéneo. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Detección de VHB empleando diferentes condiciones de captura de la diana

Muestra (núm. sometido a ensayo)	Etapas de calentamiento inicial	TCR ± imidazol	% de positivos	ULR promedio
Testigo negativo (n=7)	ninguna	400 µl de TCR	0	748
Panel de VHB-B (n=20)	ninguna	400 µl de TCR	30	830.181
Panel de VHB-B (n=20)	ninguna	800 µl de TCR + imidazol 1,7 M	50	803.816
Panel de VHB-B (n=20)	ninguna	800 µl de TCR + imidazol 2,7 M	25	852.630
Testigo negativo (n=7)	95°C durante 15 min	400 µl de TCR	0	1.080
Panel de VHB-B (n=20)	95°C durante 15 min	400 µl de TCR	44	1.078.457
Panel de VHB-B (n=20)	95°C durante 15 min	800 µl de TCR + imidazol 1,7 M	100	971.403
Panel de VHB-B (n=20)	95°C durante 15 min	800 µl de TCR + imidazol 2,7 M	100	1.046.232

Los resultados muestran que el procedimiento de captura de la diana que incluía imidazol en las reacciones y una incubación a 95°C, mejoraba la detección de VHB en los ensayos, en comparación con los ensayos que utilizaban un procedimiento de captura de la diana que no incluían imidazol en la mezcla de reacción y una incubación a 95°C.

5 EJEMPLO 5: Captura eficaz de la diana de los subtipos de VHB A, B y C en un intervalo de temperaturas

Este ejemplo muestra que el método de captura de la diana eficaz descrito en el Ejemplo 4 mejoraba la sensibilidad del ensayo para subtipos de HBV A y C, y la eficacia de la captura de la diana mejorada, asociada con la presencia de imidazol, se produce en un intervalo de temperatura. Los procedimientos de captura de la diana llevadas a cabo con el uso de imidazol, a diversas temperaturas, se sometieron a ensayo utilizando muestras de paneles de suero clínico de VHB para los subtipos A, B y C. Se sometieron a ensayo treinta duplicados de cada subtipo (dilución de 1:3) para determinar el efecto sobre la captura de la diana del TCR que contenía imidazol 2,7 M, incubado durante 12 min a 64°C, 75°C, 85°C, 90°C o 95°C. Los ensayos se realizaron sustancialmente tal y como se describe en el Ejemplo 4, pero a diferentes temperaturas. Algunos de los resultados de los ensayos se muestran en la Fig. 1, incluyendo los de un testigo en el que el TCR no contenía imidazol y la incubación fue a TA ("Temperatura ambiente - Sin imidazol"). Los resultados muestran el efecto de la presencia de imidazol 2,7 M durante la captura de la diana, utilizando tres temperaturas de incubación (64°C, 85°C y 95°C) para tres dianas diferentes de ácido nucleico de VHB: el subtipo A (sombreado medio), el subtipo B (sombreado oscuro) y el subtipo C (ligeramente sombreado). El porcentaje de resultados positivos (eje Y) se muestra para muestras sometidas a ensayo, utilizando diferentes condiciones (eje X), en los ensayos realizados en días diferentes (días 1 y 2). Los números por encima de las barras indican el porcentaje de detección positiva del VHB en las muestras sometidas a ensayo. A partir de estos y otros resultados, el método de captura de la diana eficaz, que incluía imidazol, ha mostrado mejorar la sensibilidad del ensayo en un amplio intervalo de temperaturas para los subtipos de VHB A y C (desde aproximadamente 75°C a 95°C), pero en un menor intervalo de temperaturas para el subtipo B de VHB (desde aproximadamente 90°C hasta 95°C).

25 EJEMPLO 6: Captura de la diana de un virus de ADNbc parcial/ARN, VHB subtipo B

Este ejemplo muestra que el método de captura de la diana eficaz que combina imidazol en la mezcla de reacción e incubación a 95°C puede llevarse a cabo durante un periodo de tiempo más breve que el que se requiere normalmente para la desnaturalización de ácidos nucleicos a temperatura elevada. Es decir, el efecto sinérgico conseguido utilizando imidazol 2,7 M y la incubación a 95°C, se mostró en un breve intervalo de tiempo.

Los ensayos se realizaron sustancialmente tal y como se describe en los Ejemplos 4 y 5, pero usando diferentes tiempos de incubación. El procedimiento de captura de la diana que incluye imidazol en el TCR fue sometido a ensayo en muestras de un panel de suero clínico para VHB subtipo B. Se sometieron a ensayo veinte duplicados (dilución de 1:10) empleando TCR que contenía imidazol 2,7 M en mezclas incubadas a 95°C durante 1, 3, 5 y 7 minutos. El TCR también contenía un ácido nucleico testigo interno, no relacionado con el ácido nucleico diana. Los ensayos se compararon con pruebas similares realizadas mediante el procedimiento de captura de la diana convencional. En ambos grupos de ensayos, los ácidos nucleicos capturados se utilizaron en etapas de amplificación y de detección realizadas sustancialmente tal y como se describe en los Ejemplos 4 y 5. Los resultados mostrados en la Fig. 2 muestran que una etapa de incubación a 95°C, tan corta como 3 minutos, cuando imidazol está presente en la mezcla de captura de la diana, mejoraba significativamente la sensibilidad del ensayo en comparación con el mismo ensayo realizado empleando el método de captura de la diana convencional, que no incluye imidazol en la mezcla o una incubación a 95°C. La Fig. 2 muestra el incremento en porcentaje de detección positiva (eje Y y el número sobre cada barra) para las condiciones sometidas a ensayo (eje X). Los resultados muestran que la incubación durante 3 minutos o más, a 95°C es adecuada para producir el efecto sinérgico que incrementa la eficacia de la captura de la diana, en presencia de imidazol, que se traduce en una mayor sensibilidad del ensayo.

EJEMPLO 7: Captura de la diana realizada con diferentes agentes químicos desnaturizantes

Este ejemplo muestra los efectos sobre la detección de una diana de ADN cuando un procedimiento de captura de la diana incluye la captura de la diana en presencia de urea 8 M o de imidazol 2 M y la incubación a 95°C. El polinucleótido diana era una secuencia específica de HBV genotipo C. Veinte muestras duplicadas se sometieron a ensayo para cada condición, en ensayos realizados sustancialmente tal y como se describe en los Ejemplos 5 y 6, es decir, diferentes procedimientos de captura de la diana seguidos por una amplificación *in vitro* idéntica de los ácidos nucleicos capturados y una detección de las secuencias amplificadas. En estos ensayos se compararon los resultados obtenidos cuando las muestras fueron sometidas a captura de la diana con las siguientes variables: (1) TCR más urea 8 M, (2) incubación a 95°C, (3) TCR más urea 8 M más incubación a 95°C y (4) TCR más imidazol 2 M más incubación a 95°C, todo ello en comparación con un procedimiento de captura de la diana convencional que no incluía urea o imidazol en las reacciones, ni una incubación a 95°C. Brevemente, el protocolo del ensayo fue el siguiente. Se prepararon tres versiones de TCR y después se emplearon inmediatamente: TCR con imidazol 2 M, TCR con urea 8 M y TCR convencional (sin urea ni imidazol). Cada tubo de reacción contenía 400 µl de una versión de TCR, en la que se había añadido 500 µl del genotipo C de VHB (VHB-C) o 500 µl de suero normal (testigos negativos). Los tubos se cerraron herméticamente y se mezclaron. Algunos tubos se incubaron a 95°C durante 10 min, seguido de TA durante 5 minutos, mientras que otros tubos se mantuvieron a TA durante 15 minutos (es decir, sin incubación a 95°C). A continuación, se siguió el protocolo de captura de la diana convencional, tal y como se ha descrito anteriormente (60°C durante 20 min, TA durante 15 min, separación magnética de las partículas con ácidos nucleicos capturados y etapa de lavado). Los polinucleótidos diana capturados se amplificaron empleando TMA con cebadores específicos para VHB y las secuencias amplificadas se detectaron empleando sondas marcadas con AE, específicas de la secuencia amplificada para producir quimioluminiscencia que se detectó (ULR) y se utilizó para determinar si los ensayos producían resultados positivos o negativos (una ULR superior a 50.000 fue considerada positiva). Los resultados de los ensayos se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Detección de VHB de tipo C en ensayos utilizando diferentes condiciones de captura de la diana

Muestras	TCR	Incubación a 95°C	% de resultados positivos
VHB-C	Convencional	No	35%
VHB-C	+ imidazol 2,0 M	Si	100%
VHB-C	+ urea 8,0 M	Si	100%
VHB-C	+ urea 8,0 M	No	25%
VHB-C	Convencional	Si	25%
Testigos negativos	Convencional	No	0%

Los resultados muestran que la presencia de imidazol 2 M o urea 8 M en la mezcla de reacción de captura de la diana, combinada con una incubación a 95°C, incrementaba considerablemente la sensibilidad del ensayo para detectar la diana de VHB. Las condiciones de captura de la diana que incluían un agente químico desnaturizante (imidazol o urea) en las mezclas de reacción, incubadas a 95°C, mostraron el efecto sinérgico de estas condiciones, en comparación con las mezclas de captura de la diana que solo utilizaban la incubación a 95°C o que incluían urea, pero sin la incubación a 95°C.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Gen-Probe Incorporated
Pollner, Reinhold B.
Majlessi, Mehrdad R.
Becker, Michael M.

10 <120> Métodos de captura de ácido nucleico diana
<130> GP179-PCT

15 <140> PCT/US 06/- todavía sin asignar
<141> 2006-05-05

<150> US 60/678,507
<151> 2005-05-06

20 <160> 30
<170> PatentIn versión 3.3

25 <210> 1
<211> 152
<212> DNA
<213> Artificial

30 <220>
<223> Cadena 1 del ácido nucleico diana sintético

<400> 1

cctccattcc gttaccaaca gaactggagg cggtacaatg ggtcttgtca tccggtaaag	60
gccaatata cgagcatcaa catatgtact tatgtatgta tctactatat acatacatat	120
gtacatatat gaataccatc agtctgtgca gt	152

35

40 <210> 2
<211> 121
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cadena 2 del ácido nucleico diana sintético

45 <400> 2

actgcacaga ctgatggat tcatatatgt acatagtat gtatatagta gatacataca	60
taagtacata tgttgatgct cgtatatttg gcctttaccg gatgacaaga cccattgtac	120
c	121

50 <210> 3
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial

55 <220>
<223> Sonda de captura diana para el ácido nucleico diana sintético
<220>

ES 2 381 279 T3

	<221> LNA	
	<222> (1)..(25)	
	<400> 3	
5	cataagtaca tatgttgatg ctcgtaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa	55
	<210> 4	
	<211> 30	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de detección para la porción 5' de la cadena 1 del ácido nucleico diana sintético	
	<400> 4	
15	cctccagttc tgcttgtaa cggaatggag	30
	<210> 5	
	<211> 26	
20	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de detección para la porción 3' de la cadena 1 del ácido nucleico diana sintético	
25	<400> 5	
	actgcacaga ctgatggtat tcatat	26
	<210> 6	
30	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Sonda de captura sintética	
	<400> 6	
	cggcttctct ctccttctgt ctacgtttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa	58
40	<210> 7	
	<211> 62	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Sonda de captura sintética	
	<400> 7	
	ctactcaggt gttgaggtcg gtctttctct ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
	aa	62
50	<210> 8	
	<211> 62	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> Sonda de captura sintética	
	<400> 8	
	cgcgctctagt cctactcagg tgttgaggtt ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
60	aa	62
	<210> 9	

<211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Sonda de captura sintética

<400> 9
 10 tttcacgtgt ctagtctac tcagggttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

<210> 10
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Sonda de captura sintética

<400> 10
 20 ccttcacagt actggtctac tatctttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 57

<210> 11
 <211> 58
 <212> DNA
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda de captura sintética

<400> 11
 30 caggttctat ttactccct taacattaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 58

<210> 12
 <211> 58
 35 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda de captura sintética

<400> 12
 40 ctaagccaac attccaactg tctctttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 58

<210> 13
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 50 <223> Sonda de captura sintética

<400> 13
 tgccttaag ccaacattcc aactgtctt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

<210> 14
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda de captura sintética

<400> 14
 65 actctttaa tgattgctgc ctctaattta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 59

<210> 15

<211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Sonda de captura sintética

<400> 15
 taaatgattg ctgcctctaa gccaatftaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 58

10 <210> 16
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Sonda de captura sintética

<400> 16
 20 ctgttacgca ctctttaa gattgctfta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 59

<210> 17
 <211> 58
 <212> DNA
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda de captura sintética

<400> 17
 30 ggaatattta acctgctgct ccattttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 58

<210> 18
 <211> 58
 35 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda de captura sintética

<400> 18
 40 gtgcaggaat atttaacctg ctgctttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 58

<210> 19
 <211> 58
 45 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 50 <223> Sonda de captura sintética

<400> 19
 taggtgtgc aggaatattt aacctttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 58

<210> 20
 <211> 58
 55 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 60 <223> Sonda de captura sintética

<400> 20
 65 ttttaggtgg tgcaggaata ttttaattta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 58

<210> 21

<211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Sonda de captura sintética

<400> 21
 cgctatagtt ttaggtggg caggtttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 57

10 <210> 22
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Sonda de captura sintética

<400> 22
 20 ttcttcgct atagtttag gtggtttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 58

<210> 23
 <211> 62
 <212> DNA
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> Sonda de captura sintética

30 <400> 23
 ctcttccaat cgtccgctg cttaacttat ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60
 aa 62

<210> 24
 35 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> Sonda de captura sintética

<400> 24
 ctcttccaat cgtccgctg ctatttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 57

45 <210> 25
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Sonda de captura sintética

<400> 25
 55 catcgctcta cggactctc caatcgttta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 59

<210> 26
 <211> 55
 <212> DNA
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Sonda de captura sintética

<400> 26

ES 2 381 279 T3

	tccccttgat cgcgacctga tctttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa	55
	<210> 27	
	<211> 58	
5	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de captura sintética	
10	<400> 27	
	ccacaccatc ggtcccccg aagattttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa	58
	<210> 28	
15	<211> 57	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Sonda de captura sintética	
	<400> 28	
	tatttcttga aagcctcgct ccactttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	57
25	<210> 29	
	<211> 60	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Sonda de captura sintética	
	<400> 29	
35	catcaacagc tagaaattat ttcttgatttaaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
	<210> 30	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Sonda de captura sintética	
	<400> 30	
45	taggtggtgc aggaatattt aacctttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa	58

50

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar un ácido nucleico diana de interés a partir de una muestra, que comprende:
- mezclar una muestra que contiene un ácido nucleico diana con una sonda de captura que se hibrida específicamente con una secuencia diana en el ácido nucleico diana en una fase en solución que contiene imidazol como agente químico desnaturizante y una sonda inmovilizada que se une específicamente a la sonda de captura, para proporcionar una mezcla de reacción,
- incubar la mezcla de reacción a una primera temperatura en un intervalo de aproximadamente 60°C a 95°C durante 1 a 15 minutos,
- incubar la mezcla de reacción a una segunda temperatura en un intervalo de 25°C a 42°C durante 20 minutos o menos, formando de este modo un complejo de hibridación constituido por la sonda de captura hibridada específicamente con el ácido nucleico diana y por la sonda inmovilizada unida específicamente a la sonda de captura, en donde el complejo de hibridación está fijado a un soporte a través de la sonda inmovilizada, y separar el complejo de hibridación fijado al soporte de los otros componentes de la muestra.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente químico desnaturizante es imidazol a una concentración de 0,5 M a 4,2 M, y la incubación a la primera temperatura se realiza a 60°C durante 1 a 15 minutos.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente químico desnaturizante es imidazol a una concentración de 3,0 M a 3,5 M, y la incubación a la primera temperatura se realiza a 60°C durante 1 a 15 minutos.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente químico desnaturizante es imidazol a una concentración de 2,0 M a 2,7 M, y la incubación a la primera temperatura se realiza desde 90°C a 95°C durante 3 a 10 minutos.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente químico desnaturizante es imidazol 2,7 M, la incubación a la primera temperatura se realiza de 75°C a 95°C durante 3 a 15 minutos, y el método incluye adicionalmente la incubación de la mezcla de reacción a 60°C durante 20 minutos entre la primera y la segunda etapas de incubación.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la incubación a la primera temperatura se realiza a 95°C durante 3 a 15 minutos.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico diana es ácido nucleico completa o parcialmente bicatenario, o un ácido nucleico que incluye otra estructura secundaria o terciaria.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sonda de captura se compone de una secuencia específica de la diana que se une al ácido nucleico diana y de una región de cola que se une a la sonda inmovilizada a través de un ligando específico.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la región de cola se une a la sonda inmovilizada mediante hibridación específica con una secuencia complementaria de la sonda inmovilizada.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una etapa de detección del ácido nucleico diana o de un producto de la amplificación *in vitro*, obtenido a partir del ácido nucleico diana después de separar el complejo de hibridación fijado al soporte, de otros componentes de la muestra.
11. Un método para aislar un ácido nucleico diana de interés a partir de una muestra, que comprende:
- mezclar una muestra que contiene un ácido nucleico diana con una sonda de captura que se hibrida específicamente con una secuencia diana en el ácido nucleico diana en una fase en solución que contiene imidazol a una concentración entre 0,05 M y 0,5 M como agente químico desnaturizante, y una sonda inmovilizada que se une específicamente a la sonda de captura, para proporcionar una mezcla de reacción,
- incubar la mezcla de reacción a 25°C durante 1 minuto a 60 minutos, formando de este modo un complejo de hibridación constituido por la sonda de captura hibridada específicamente con el ácido nucleico diana y por la sonda inmovilizada unida específicamente a la sonda de captura, en donde el complejo de hibridación está fijado a un soporte a través de la sonda inmovilizada, y separar el complejo de hibridación fijado al soporte, de otros componentes de la muestra.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la etapa de incubación se realiza durante 2 a 30 minutos.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el agente químico desnaturizante es imidazol a una concentración de 0,5 M y la etapa de incubación se realiza durante 15 minutos.
14. Una composición para realizar el método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 11, que consiste en
- 5 (1) imidazol en una cantidad que, si se mezcla con una muestra, produce una mezcla de hibridación en fase en solución que contiene imidazol a una concentración de 0,05 M a 4,2 M,
- (2) al menos una sonda de captura que se hibrida específicamente con una secuencia diana en el ácido nucleico diana, y
- (3) una sonda inmovilizada que se une específicamente a la sonda de captura.
- 10 15. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la mezcla de hibridación en fase de solución contiene imidazol a una concentración comprendida entre 0,05 y 0,5 M.
16. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la mezcla de hibridación en fase en solución contiene imidazol a una concentración comprendida entre 1,7 M y 3,5 M.
- 15 17. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la mezcla de hibridación en fase en solución contiene imidazol a una concentración comprendida entre 2,0 M y 2,7 M.
18. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la composición incluye una primera sonda de captura que se hibrida específicamente con una primera secuencia diana y una segunda sonda de captura que se hibrida específicamente con una segunda secuencia diana que es diferente de la primera secuencia diana.
- 20 19. La composición de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la mezcla de hibridación en fase en solución contiene imidazol a una concentración seleccionada entre el grupo consistente en: de 0,5 M a 4,2 M; de 3,0 M a 3,5 M; de 2,0 M a 2,7 M; y 2,7.
20. Una mezcla de reacción para aislar un ácido nucleico diana que comprende los siguientes componentes:
- (i) una muestra que contiene un ácido nucleico diana;
- (ii) una fase en solución que contiene imidazol;
- 25 (iii) una sonda de captura que se hibrida específicamente con una secuencia diana en el ácido nucleico diana en una fase en solución que contiene imidazol a una concentración comprendida entre 0,05 M y 4,2 M; y
- (iv) una sonda inmovilizada que se une específicamente a la sonda de captura en la fase en solución.
21. Un equipo de reactivos que contiene componentes útiles para aislar un ácido nucleico diana que comprende:
- 30 (i) al menos una sonda de captura específica del ácido nucleico diana;
- (ii) un soporte que tiene un ligando inmovilizado para la sonda de captura; e
- (iii) imidazol en una fase soluble.

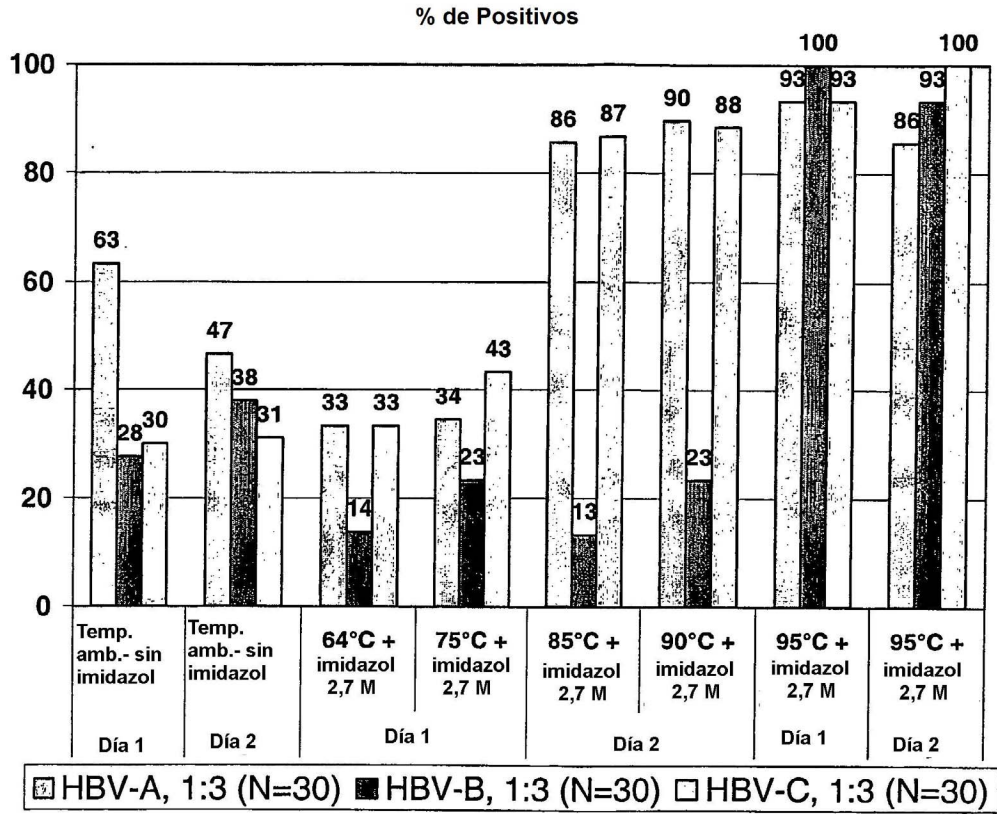


FIG. 1

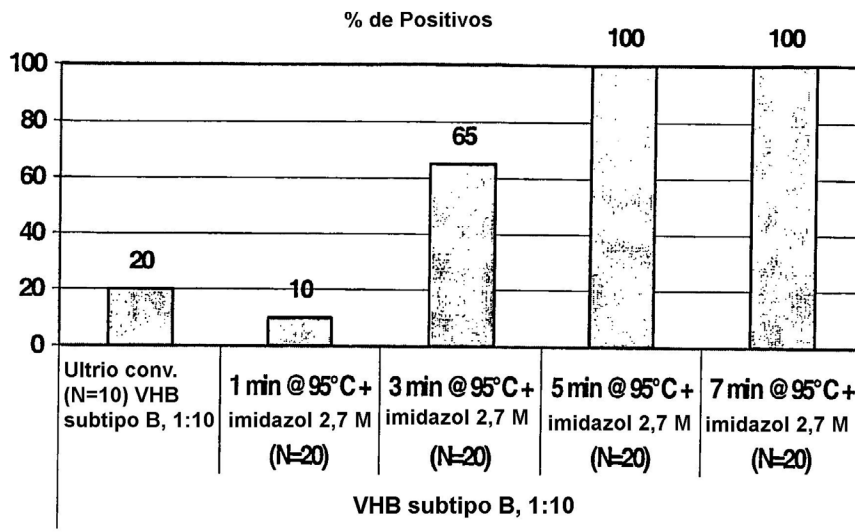


FIG. 2