

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 869**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2007 E 07023905 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 1932913**

54 Título: **Aislamiento de ácidos nucleicos mediante la utilización de polidocanol y derivados del mismo**

30 Prioridad:

11.12.2006 EP 06025539

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

09.05.2013

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**ADIE, SIGRID;
LEYING, HERMANN;
NACHBAUR, NICOLE y
RUSSMANN, EBERHARD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 402 869 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

Aislamiento de ácidos nucleicos mediante la utilización de polidocanol y derivados del mismo

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende un agente caotrópico, una sustancia tamponadora, una proteasa y polidocanol al 0,5% a 4,9% (v/v) o un derivado del mismo. La invención se refiere además a usos de dicha composición y a un kit que comprende la composición según la invención. La invención se refiere además a un método para la detección de un ácido nucleico en una muestra biológica, que comprende las etapas de incubar la muestra biológica en presencia de un agente caotrópico, la muestra biológica en presencia de un agente caotrópico, una sustancia tamponadora, una proteasa y polidocanol al 0,5% a 4,9% (v/v) o un derivado del mismo, aislando opcionalmente el ácido nucleico, amplificando opcionalmente el ácido nucleico y detectando el ácido nucleico. La invención se refiere además a un método para la purificación de un ácido nucleico en una muestra biológica, que comprende las etapas de incubar la muestra biológica en presencia de un agente caotrópico, una sustancia tamponadora, una proteasa y polidocanol al 0,5% a 4,9% (v/v) o un derivado del mismo y aislar el ácido nucleico, purificando de esta manera el ácido nucleico.

20 Antecedentes de la invención

Muchas sustancias biológicas, especialmente ácidos nucleicos, presentan retos especiales en términos de su aislamiento a partir de su ambiente natural. Por otra parte, con frecuencia se encuentran presentes en concentraciones muy bajas y, por otra parte, con frecuencia se encuentran en presencia de muchas otras sustancias sólidas y disueltas, por ejemplo tras la lisis de células. Esto dificulta el aislamiento o la medición, en particular en ensayos bioespecíficos que permitan la detección de analitos específicos, por ejemplo ácidos nucleicos, o el análisis específico de propiedades y desempeña un papel importante en el campo del diagnóstico y la bioanalítica en la investigación y el desarrollo. Son ejemplos de ensayos bioespecíficos, los ensayos de hibridación, los inmunoensayos y los ensayos de receptor-ligando. Los ensayos de hibridación utilizan el apareamiento específico de bases para la detección molecular de analitos ácidos nucleicos, por ejemplo ARN y ADN. Por lo tanto, las sondas oligonucleótidas con una longitud de 18 a 20 nucleótidos podrían permitir el reconocimiento específico de una secuencia complementaria seleccionada, por ejemplo en el genoma humano. Otro ensayo que implica la unión selectiva de dos cebadores oligonucleótidos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrito en la patente US nº 4.683.195. Este método permite la amplificación selectiva de una región específica de ácidos nucleicos hasta niveles detectables por una polimerasa termoestable en presencia de desoxinucleótidos trifosfato en varios ciclos.

Tal como se ha indicado anteriormente, antes de que puedan analizarse las sustancias biológicas en uno de los ensayos anteriormente indicados o utilizarse para otros procedimientos, deben aislarse o purificarse a partir de muestras biológicas que contienen mezclas complejas de diferentes componentes, tales como, por ejemplo, componentes proteicos y no proteicos. Con frecuencia, para las primeras etapas, se utilizan procedimientos que permiten el enriquecimiento en el componente de interés, por ejemplo el ácido nucleico. Con frecuencia estos están contenidos en una célula bacteriana, una célula fúngica, una partícula vírica o la célula de un organismo más complejo, tal como una célula sanguínea humana o una célula vegetal. El componente de interés también puede denominarse "componente diana".

Para liberar el contenido de dichas células o partículas, pueden tratarse con enzimas o con compuestos químicos para disolver, degradar o desnaturalizar las paredes celulares de dichos organismos. Este procedimiento se denomina comúnmente lisis. La solución resultante, que contiene dicho material lisado, se denomina lisado. Un problema que aparece con frecuencia durante la lisis es que otros enzimas degradan el componente diana, por ejemplo desoxirribonucleasas o ribonucleasas, que degradan ácidos nucleicos, entran en contacto con el componente de interés durante la lisis. Estos enzimas degradativos también pueden encontrarse presentes fuera de las células o pueden haberse separado especialmente en diferentes compartimientos celulares antes de la lisis y ahora entran en contacto con el componente diana. Otros componentes liberados durante este procedimiento pueden ser, por ejemplo, endotoxinas pertenecientes a la familia de los lipopolisacáridos, que resultan tóxicos para las células y pueden provocar problemas para los productos destinados a la utilización en la terapia humana o animal.

Existe una diversidad de medios para resolver dicho problema, mencionado anteriormente. Es frecuente utilizar agentes caotrópicos tales como, por ejemplo, tiocianato de guanidinio o detergentes aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o no iónicos en el caso de que se pretenda liberar ácidos nucleicos. También resulta una ventaja utilizar proteasas que degraden rápidamente estos enzimas o proteínas no deseadas. Sin embargo, esto puede provocar otro problema, ya que dichas sustancias o enzimas pueden interferir con reactivos o componentes en etapas posteriores.

Los enzimas que pueden utilizarse ventajosamente en dichos procedimientos de lisis o preparación de muestras indicados anteriormente son enzimas que cortan los enlaces amida en los sustratos proteicos y que se clasifican como proteasas o (intercambiamente), peptidasas (ver Walsh C., Enzymatic Reaction Mechanisms, capítulo 3,

- 5 W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1979). Las proteasas que han sido utilizadas son, por ejemplo, las proteasas alcalinas (solicitud de patente WO nº 98/04730) o las proteasas ácidas (patente US nº 5.386.024). La proteasa que se utiliza ampliamente para la preparación de muestras para el aislamiento de ácidos nucleicos es la proteinasa K de *Tritirachium album* (ver, por ejemplo, Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor University Press, NY, USA, 1989), que es activa a un pH aproximadamente neutro y pertenece a la familia de las proteasas conocidas por el experto en la materia como subtilisinas. Una subtilisina es una serina proteasa producida por bacterias u hongos Gram-positivos.
- 10 En las etapas siguientes de la preparación de muestras que siguen a la etapa de lisis, se realiza un enriquecimiento adicional en el componente diana. En el caso de que el componente diana sea un ácido nucleico, el ácido nucleico diana normalmente se extrae de las mezclas complejas de lisis antes de utilizarse en un ensayo basado en sondas.
- Existen varios métodos para la extracción de ácidos nucleicos:
- 15 - métodos dependientes de la secuencia o bioespecíficos, tales como, por ejemplo:
- la cromatografía de afinidad
 - la hibridación con sondas inmovilizadas
- 20 - métodos independientes de la secuencia o físico-químicos, tales como, por ejemplo:
- la extracción líquido-líquido con, por ejemplo fenol-cloroformo,
 - la precipitación con, por ejemplo, etanol puro,
 - la extracción con papel de filtro,
 - 25 - la extracción con agentes formadores de micelas tales como, bromuro de cetil-trimetil-amonio,
 - la unión a pigmentos intercalantes inmovilizados, por ejemplo derivados de acridina,
 - la adsorción a gel de sílice o tierras diatomáceas,
 - la adsorción a partículas vítreas magnéticas (PVM) o a partículas de organosilano bajo condiciones caotrópicas.
- 30 Resulta particularmente interesante para la extracción, la adsorción de los ácidos nucleicos a una superficie de vidrio, aunque también resultan posibles otras superficies. En los últimos años se han propuestos muchos procedimientos para el aislamiento de ácidos nucleicos de su ambiente natural a partir de la utilización de su comportamiento de unión a superficies de vidrio o de sílice.
- 35 Por ejemplo, la patente EP nº 0 389 063 da a conocer la unión de ácidos nucleicos a una superficie de sílice en presencia de agentes caotrópicos. Las solicitudes de patente WO nº 96/41811 y WO nº 01/37291 dan a conocer la unión de ácidos nucleicos a la superficie de sílice de partículas vítreas magnéticas. Los sistemas comerciales que se comercializan en el mercado son, por ejemplo, el sistema High Pure y el sistema MagNA Pure, disponibles de Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania.
- 40 Con el fin de incrementar o influir sobre la lisis de la muestra biológica y/o el comportamiento de unión de los ácidos nucleicos a las superficies de sílice, se han utilizado diversos agentes en la técnica anterior.
- 45 La solicitud de patente WO nº 95/01359 da a conocer la utilización de 1% a 50% de diferentes alcoholes, polietilenglicol o ácido tricloroacético en combinación con concentraciones salinas elevadas para la unión de un ácido nucleico a una superficie de sílice.
- 50 La solicitud de patente WO nº 97/05248 da a conocer soluciones para el aislamiento y la extracción de ADN, ARN y proteínas a partir de una muestra biológicas. Las soluciones incluyen un agente caotrópico, un agente reductor y un solvente orgánico, tal como un alcohol.
- 55 La solicitud de patente WO nº 01/37291 da a conocer un tampón de lisis que comprende Tris 50 mM, pH 7,0, polidocanol al 15% (v/v), isotiocianato de guanidinio 5 M y ditiotreitól (DTT) 1 mM.
- 60 La solicitud de patente WO nº 2005/064010 se refiere a una composición que se utiliza para unir ácidos nucleicos en una solución acuosa a una fase sólida. Dicha composición contiene una sal de guanidinio, una sustancia tamponadora y un detergente, tal como Triton-X-100, NP-40, polidocanol y Tween-20. La concentración de detergente puede ser de entre 5% y 30%, preferentemente de entre 10% y 20%.
- 65 Las solicitudes de patente WO nº 00/09746 y WO nº 01/60517 describen un recipiente con una solución que comprende una sal de guanidinio, una sustancia tampón, un agente reductor y un detergente. La concentración de detergente puede ser de entre 5% y 30%.
- Las solicitudes de patente WO nº 2005/012523 y WO nº 2005/034967 describen composiciones que comprenden un agente caotrópico, una sustancia tamponadora y un detergente en un intervalo de entre 0,5% y 4,5% (v/v), en el que dicho detergente puede ser polidocanol o no.

Descripción resumida de la invención

5 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar una nueva composición para la lisis de una muestra biológica y/o para incrementar o influir sobre el comportamiento de unión de los ácidos nucleicos a superficies de sílice.

10 Dicho problema se resolvió a partir de los resultados de la presente invención, que se relaciona con una composición que comprende un agente caotrópico, una sustancia tamponadora, una proteasa y polidocanol al 0,5% a 4,9% (v/v) o un derivado del mismo.

En otra realización de la invención, la composición según la invención se utiliza para la purificación de un ácido nucleico, para la unión de un ácido nucleico a una superficie sólida o para la detección de un ácido nucleico.

15 En todavía otra realización de la invención, se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

- 20 a) incubar la muestra biológica en presencia de un agente caotrópico, una sustancia tamponadora, una proteasa y polidocanol al 0,5% a 4,9% (v/v) o un derivado del mismo,
 b) opcionalmente aislar el ácido nucleico,
 c) opcionalmente amplificar el ácido nucleico, y
 d) detectar el ácido nucleico.

25 En todavía otra realización de la invención, se proporciona un método para la purificación de un ácido nucleico en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

- 30 a) incubar la muestra biológica en presencia de un agente caotrópico, una sustancia tamponadora, una proteasa y polidocanol al 0,5% a 4,9% (v/v) o un derivado del mismo,
 b) aislar el ácido nucleico, purificando de esta manera el ácido nucleico.

35 El término "polidocanol" se refiere a un compuesto o composición química que consiste de una mezcla de monododecil-éteres de polietilenglicol con una medida de aproximadamente 9 grupos de óxido de etileno en cada molécula. Podría describirse mediante la fórmula molecular $(C_2H_4O)_n C_{12}H_{26}O$ ó $HO(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_{11}CH_3$, en las que n es aproximadamente 9, es decir, la mediana del número de fracciones de etilenglicol es aproximadamente 9 como resultado del método de producción, en el que se hace reaccionar alcohol laurílico con óxido de etileno (etoxilación). Lo anterior implica que el peso molecular es de aproximadamente 600 g/mol. Otros nombres para este compuesto son 3,6,9,12,15,18,21,24,27-nonaoxanonatriacontán-1-ol, éter de dodecilonnaetilenglicol, dodecilonnaglicol, éter polioxietileno-9-laurílico o laureth-9. El compuesto también es un agente emulsionante y solubilizador adecuado para las emulsiones cosméticas y dermatológicas de tipo aceite/agua (O/W), un anestésico tópico, un espermicida y surfactante o un agente esclerosante en el tratamiento de las venas varicosas. El compuesto puede obtenerse, por ejemplo, de Kolb, Hedingen, Suiza (Sympatens-AL/090 P). Según la invención, el término "polidocanol", sin embargo, se refiere también a los compuestos químicamente definidos de fórmula $(C_2H_4O)_9 C_{12}H_{26}O$ ó $HO(CH_2CH_2O)_9(CH_2)_{11}CH_3$. El "polidocanol" es una sustancia blanca de tipo pomada a temperatura ambiente y que se convierte en un líquido claro, incoloro a ligeramente amarillo a aproximadamente 40 45 30°C. Por lo tanto, para la preparación de las composiciones que contiene polidocanol, éste puede pipetarse al calentarse en, por ejemplo, un baño de agua a aproximadamente 37°C ó 40°C, o añadirse en forma de sustancia sólida a temperatura ambiente. Por lo tanto, según la invención, 2.371 kg de polidocanol (líquido) (a poco más de 30°C, preferentemente a 37°C) son iguales a 2.365 kg de polidocanol sólido (a poco menos de 30°C, preferentemente a temperatura ambiente, es decir, entre 20°C y 25°C). Las composiciones o soluciones resultantes se refieren al contenido de polidocanol en % (v/v) o en % (p/v). El término "(v/v)" se refiere a volumen en volumen y "(p/v)" se refiere a peso en volumen. El solvente preferente o componente principal de la composición es agua, es decir, preferentemente son composiciones acuosas o soluciones acuosas.

55 La expresión "derivado de polidocanol" se refiere a "polidocanol" que ha sido derivatizado químicamente pero que presenta propiedades, en particular propiedades en los métodos según la invención, que son idénticas o muy similares a las propiedades del "polidocanol".

Otro término para "composición" es solución, en el contexto de la invención.

60 Las "muestras biológicas" son muestras que se han obtenido de una planta o de un animal (incluyendo un ser humano) y que son sólidas o líquidas. Se describen ejemplos específicos en mayor detalle a continuación.

Descripción detallada de la invención

65 En una realización de la invención, se proporciona una composición que comprende:

- un agente caotrópico,
- una sustancia tamponadora,
- una proteasa, y
- polidocanol al 0,5% a 4,9% (v/v) o un derivado del mismo.

5 En una realización preferente de la invención, la composición según la invención comprende polidocanol al 0,5% a 4,5% (v/v), polidocanol al 0,5% a 3% (v/v) o un derivado del mismo, preferentemente la composición comprende polidocanol al 0,75% a 1,75% (v/v) o un derivado del mismo.

10 En otra realización preferente de la invención, la composición según la invención comprende polidocanol al 1% a 4,5% (v/v) o un derivado del mismo, preferentemente la composición comprende polidocanol al 1,5% a 3% (v/v) o un derivado del mismo.

15 En otra realización preferente de la invención, en la composición según la invención, el agente caotrópico es tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio, cloruro de guanidinio o urea. Sin embargo, también resulta posible clorato potásico (KClO₄) o yoduro potásico (KI).

20 En otra realización preferente de la invención, en la composición según la invención, la sustancia tamponadora es Tris-(hidroximetil)aminometano (TRIS), fosfato, ácido N-(2-hidroxietil)-piperazín-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES), acetato o citrato.

En otra realización preferente de la invención, en la composición según la invención, el pH de la composición es ácido, preferentemente el pH de la composición es de entre 3 y 5.

25 En todavía otra realización preferente de la invención, la composición comprende además un agente reductor, preferentemente ditiotreitól (DTT).

En una realización muy preferente de la invención, la composición comprende tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 50 mM, DTT al 1% (p/v), polidocanol al 3% (v/v), pH 4.

30 En una realización preferente de la invención, se utiliza la composición según la invención para la purificación de un ácido nucleico, para la unión de un ácido nucleico a una superficie sólida o para la detección de un ácido nucleico.

35 La invención contempla además un kit de partes caracterizado porque contiene la composición según la invención. Dichos kits conocidos de la técnica comprenden además partes plásticas que pueden utilizarse durante el procedimiento de preparación de muestras, tales como, por ejemplo, placas de microtitulación en el formato de 96 ó 384 pocillos o sólo tubos de reacción ordinarios fabricados por, por ejemplo, Eppendorf, Hamburg, Alemania, y todos los demás reactivos para llevar a cabo el método según la invención. Por lo tanto, el kit puede contener además un material con una afinidad para los ácidos nucleicos, preferentemente el material con una afinidad para los ácidos nucleicos comprende un material con una superficie de sílice. Preferentemente, el material con una superficie de sílice es un vidrio. Más preferentemente, el material con una afinidad para los ácidos nucleicos es una composición que comprende partículas vítreas magnéticas. Estos componentes del kit según la invención pueden proporcionarse separadamente en tubos o recipientes de almacenamiento. Dependiendo de la naturaleza de los componentes, estos incluso pueden proporcionarse en un único tubo o recipiente de almacenamiento. El kit puede comprender además o adicionalmente una solución de lavado que resulte adecuada para la etapa de lavado de las partículas vítreas magnéticas tras la unión a las mismas de ADN o ARN. Esta solución de lavado puede contener etanol y/o agentes caotrópicos en una solución o soluciones tamponadas con un pH ácido sin etanol y/o agentes caotrópicos tal como se ha indicado anteriormente. Con frecuencia, la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan en forma de soluciones madre que deben diluirse antes de la utilización. El kit puede comprender además o adicionalmente un eluyente o tampón de elución, es decir, una solución o un tampón (por ejemplo Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) o agua pura para eluir el ADN o ARN unido a las partículas vítreas magnéticas. Además, pueden encontrarse presentes reactivos adicionales o soluciones tamponadas que pueden utilizarse para el procedimiento de purificación de un ácido nucleico, es decir, ADN o ARN. Por lo tanto, en una realización de la invención se proporciona un kit que comprende una composición según la invención. Preferentemente el kit contiene además un material con una afinidad para los ácidos nucleicos, preferentemente un material con una superficie de sílice. Más preferentemente, el material con una afinidad para los ácidos nucleicos es una composición que comprende partículas vítreas magnéticas. Preferentemente, el kit según la invención comprende además un tampón de lavado y un tampón de elución.

60 En realizaciones preferentes de la invención, el kit según la invención se utiliza para la purificación de ácidos nucleicos en investigación, en la bioanalítica o en el diagnóstico. En realizaciones preferentes según la invención, el kit según la invención o el método según la invención se utiliza en un formato de alto rendimiento, es decir, en un método automatizado que permite el análisis de un elevado número de muestras diferentes.

65 En una realización de la invención, se proporciona un método para la detección de un ácido nucleico en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

a) incubar la muestra biológica en presencia de un agente caotrópico, una sustancia tamponadora, una proteasa y polidocanol al 0,5% a 4,9% (v/v) o un derivado del mismo,

b) opcionalmente aislar el ácido nucleico,

c) opcionalmente amplificar el ácido nucleico, y

d) detectar el ácido nucleico.

En la etapa a) del método según la invención, la muestra biológica se lisa, liberando las sustancias biológicas, incluyendo los ácidos nucleicos contenidos en la muestra biológica. Con respecto a los parámetros generales para un procedimiento de lisis para la obtención de ácidos nucleicos, se hace referencia especial a Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory press, NY, USA, 1989, y Ausubel F. *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, USA, 1987. También es aplicable una combinación de procedimientos para la lisis utilizando la composición según la invención. Por ejemplo, la lisis puede llevarse a cabo utilizando ultrasonidos, presiones elevadas y fuerzas de cizalla. Con frecuencia se añaden proteasas que degradan las proteínas presentes en la muestra biológica. La proteasa según la presente invención puede añadirse en forma sólida, por ejemplo en forma de tableta o de polvos, o en una forma disuelta en una solución tamponada o no tamponada. Son ejemplos de proteasas, la proteinasa K u otra proteasa de *Bacillus subtilis* descrita en la patente EP nº 1 201 753.

El ácido nucleico preferentemente se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa, que amplifica específicamente secuencias diana hasta cantidades detectables. Por lo tanto, en una realización preferente de la invención, en la etapa de amplificación c) del método según la invención, se amplifica el ácido nucleico mediante la reacción encadena de la polimerasa. Otras posibles reacciones de amplificación son la reacción en cadena de la ligasa (RCL; Wu D.Y. y Wallace R.B., Genomics 4:560-569, 1989, y Barany F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193, 1991); la reacción en cadena de la polimerasa-ligasa (Barany F., PCR Methods and Appl. 1:5-16, 1991), la Gap-RCL (solicitud publicada de patente PCT nº WO 90/01069); la reacción de reparación de cadena (patente EP nº 0 439 185), 3SR (Kwoh D.Y. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177, 1989; Guatelli C.J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990; la solicitud publicada de patente PCT nº WO 92/08808) y NASBA (patente US nº 5.130.238). Además, existe la amplificación por desplazamiento de cadena (ADC), la amplificación mediada por la transcripción (AMT) y la amplificación Q β (para una revisión ver, por ejemplo, Whelen A.C. y Persing D.H., Annu. Rev. Microbiol. 50:349-373, 1996; Abramson R.D. y Myers T.W., Current Opinion in Biotechnology 4:41-47, 1993).

Un método de detección particularmente preferente es el método llevado a cabo en el instrumento TaqMan[®] dado a conocer en la solicitud de patente WO nº 92/02638 y las patentes US nº 5.210.015, nº 5.804.375 y nº 5.487.972. Este método explora la actividad de exonucleasa de una polimerasa para generar una señal. En concreto, el componente ácido nucleico diana se detecta mediante un procedimiento que comprende poner en contacto la muestra con un oligonucleótido que contiene una secuencia complementaria a una región del componente ácido nucleico diana y un oligonucleótido marcado que contiene una secuencia complementaria a una segunda región de la misma cadena de secuencia del componente ácido nucleico diana, pero que no incluye la secuencia de ácidos nucleicos definida por el primer oligonucleótido, con el fin de crear una mezcla de dúplex durante las condiciones de hibridación, en las que los dúplex comprenden el ácido nucleico diana hibridado con el primer oligonucleótido y con el oligonucleótido marcado, de manera que el extremo 3' del primer oligonucleótido es contiguo al extremo 5' del oligonucleótido marcado. A continuación, esta mezcla se trata con un ácido nucleico polimerasa dependiente de molde que presenta una actividad de 5' a 3' nucleasas bajo condiciones suficientes para permitir que la actividad de nucleasa 5' a 3' de la polimerasa corte el oligonucleótido marcado e hibridado y libere fragmentos marcados. La señal generada por la hidrólisis del oligonucleótido marcado se detecta y/o se mide. El método llevado a cabo en el instrumento TaqMan[®] elimina la necesidad de formar y convertir en detectable un complejo de reacción unido a fase sólida. En términos más generales, se da a conocer un procedimiento para la purificación de (por lo menos) un componente ácido nucleico diana, seguido de una etapa de detección, en el que la reacción de amplificación y/o detección es una fase de solución homogénea.

El ácido nucleico puede determinarse o detectarse mediante métodos analíticos estándares conocidos por el experto en la materia y descritos en, por ejemplo, Sambrook J. *et al.*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor University Press, NY, USA, 1989, o en Lottspeich F. y Zorbas H., editores, Bioanalytik, 1a edición, 1998, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Alemania. Preferentemente, la cantidad del ácido nucleico se determina utilizando los métodos descritos en la presente memoria. También puede llevarse a cabo etapas de purificación adicionales antes de la etapa de detección del ADN, tales como, por ejemplo, una etapa de precipitación. Los métodos de detección pueden incluirse, aunque sin limitarse a ellos, la unión o intercalado de pigmentos específicos tales como el bromuro de etidio, que se intercala en el ADN de doble cadena y modifica su fluorescencia. El ADN purificado también puede separarse por medios electroforéticos, opcionalmente tras una digestión de restricción y visualizarse posteriormente. También existen ensayos basados en sondas que aprovechan la hibridación de oligonucleótidos con secuencias específicas y la posterior detección del híbrido. También resulta posible secuenciar el ADN tras etapas adicionales conocidas por el experto en la materia. Otros métodos aplican una diversidad de secuencias de ADN a un chip de silicio al que se encuentran unidas sondas específicas y proporcionan una señal al unirse una secuencia complementaria.

En una realización de la invención, se proporciona un método para la purificación de un ácido nucleico en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

- 5 a) incubar la muestra biológica en presencia de un agente caotrópico, una sustancia tamponadora, una proteasa y polidocanol al 0,5% a 4,9% (v/v) o un derivado del mismo,
b) aislar el ácido nucleico, purificando de esta manera el ácido nucleico.

10 Las condiciones de incubación de la etapa a) de ambos métodos según la invención preferentemente se preparan mediante la adición de una composición según la invención a la muestra biológica. En una realización preferente de la invención, en la etapa) del método según la invención, se incuba la muestra biológica en presencia de un agente caotrópico, una sustancia tamponadora, una proteasa y polidocanol al 0,5% a 4,5% (v/v) o un derivado del mismo, polidocanol al 0,5% a 3% (v/v) o un derivado del mismo, preferentemente polidocanol al 0,75% a 1,75% (v/v) o un derivado del mismo.

15 Preferentemente, la etapa de aislamiento b) del método según la invención comprende la unión del ácido nucleico a un material con una afinidad para ácidos nucleicos, preferentemente un material con una superficie de sílice, lavando opcionalmente el ácido nucleico unido al material y eluyendo el ácido nucleico del material. Preferentemente, el material con una superficie de sílice es una composición que comprende partículas vítreas magnéticas. En la realización más preferente, la etapa de lavado no es opcional.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende:
- un agente caotrópico,
 - una sustancia tamponadora,
 - una proteasa, y
 - polidocanol al 0,5% a 4,9% (v/v) o un derivado del mismo.
- 10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición comprende polidocanol al 0,5% a 3% (v/v) o un derivado del mismo, preferentemente la composición comprende polidocanol al 0,75% a 1,75% (v/v) o un derivado del mismo.
- 15 3. Composición según la reivindicación 1, en la que la composición comprende polidocanol al 1% a 4,5% (v/v) o un derivado del mismo, preferentemente la composición comprende polidocanol al 1,5% a 3% (v/v) o un derivado del mismo.
- 20 4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el agente caotrópico es tiocianato de guanidinio, cloruro de guanidinio o urea.
- 25 5. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la sustancia tamponadora es Tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), fosfato, ácido N-(2-hidroxi-etil)-piperazín-N'-(2'-etanosulfónico) (HEPES), acetato o citrato.
- 30 6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el pH de la composición es ácido, preferentemente el pH de la composición es de entre 3 y 5.
- 35 7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la composición comprende además un agente reductor.
- 40 8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la composición comprende tiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 50 mM, DTT al 1% (p/v) y polidocanol al 3% (v/v), pH 4.
- 45 9. Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para la purificación de un ácido nucleico, para la unión de un ácido nucleico a una superficie sólida o para la detección de un ácido nucleico.
- 50 10. Kit que comprende una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 55 11. Kit según la reivindicación 10, caracterizado porque el kit contiene además un material con una afinidad para ácidos nucleicos, preferentemente un material con una superficie de sílice.
- 60 12. Kit según la reivindicación 11, caracterizado porque el material con una afinidad para los ácidos nucleicos es una composición que comprende partículas vítreas magnéticas.
- 65 13. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado porque el kit comprende además un tampón de lavado y un tampón de elución.
14. Método para la detección de un ácido nucleico en una muestra biológica, que comprende las etapas de:
- a) incubar la muestra biológica en presencia de un agente caotrópico, una sustancia tamponadora, una proteasa y polidocanol al 0,5% a 4,9% (v/v) o un derivado del mismo,
 - b) opcionalmente aislar el ácido nucleico,
 - c) opcionalmente amplificar el ácido nucleico, y
 - d) detectar el ácido nucleico.
15. Método según la reivindicación 14, en el que, en la etapa de amplificación c), se amplifica el ácido nucleico mediante la reacción en cadena de la polimerasa.
16. Método para la purificación de un ácido nucleico en una muestra biológica, que comprende las etapas de:
- a) incubar la muestra biológica en presencia de un agente caotrópico, una sustancia tamponadora, una proteasa y polidocanol al 0,5% a 4,9% (v/v) o un derivado del mismo,
 - b) aislar el ácido nucleico, purificando de esta manera el ácido nucleico.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que, en la etapa a), la muestra biológica se incuba en presencia de un agente caotrópico, una sustancia tamponadora y polidocanol al 0,5% a 3% (v/v) o un derivado del mismo preferentemente polidocanol al 0,75% a 1,75% (v/v) o un derivado del mismo.
- 5 18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que la etapa de aislamiento b) comprende la unión del ácido nucleico a un material con una afinidad para los ácidos nucleicos, preferentemente un material con una superficie de sílice, opcionalmente lavar el ácido nucleico unido al material y eluir el ácido nucleico del material.
- 10 19. Método según la reivindicación 18, caracterizado porque el material con una superficie de sílice es una composición que comprende partículas vítreas magnéticas.
20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, caracterizado porque la muestra biológica es un líquido procedente del cuerpo humano o animal, preferentemente sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina.
- 15 21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, caracterizado porque el ácido nucleico comprende ADN o ARN o ambos.
- 20 22. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el ADN o ARN o ambos se deriva de un microorganismo o de un virus, preferentemente el virus de la hepatitis A, el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, el virus de la inmunodeficiencia humana o el citomegalovirus.

Fig. 1

tampon de lisis utilizado	+ 1% (W/V) DTT					Tasa de acierto	tampón de lisis / formulación utilizado
	Tgt CT	IQS CT	TgtInc AbsNorm	IQSInc AbsNorm	Δ CT		
RL 8.1b	media	40,07	31,28	4,274	26,206	-8,79	GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 1% (p/v) Polidocanol al 15% (p/v)
	sd	2,22	0,14	2,675	1,635	2,25	
	cv%	5,55	0,45	62,58	6,24	-25,60	
Repetición	media	40,12	31,28	4,33	25,89	-8,81	
	sd	1,94	0,19	2,63	1,85	1,93	
	cv%	4,82	0,62	60,86	7,16	-21,95	
RL 8.2b	media	40,05	30,93	5,389	28,125	-9,12	GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 1% (p/v) Polidocanol al 10% (p/v)
	sd	3,11	0,21	3,130	1,925	3,05	
	cv%	7,77	0,69	58,09	6,85	-33,43	
Repetición	media	40,26	31,04	3,98	26,83	-9,23	
	sd	2,14	0,16	2,26	1,87	2,13	
	cv%	5,31	0,52	56,78	6,96	-23,10	
RL 8.3b	media	39,63	30,81	5,70	28,53	-8,83	GuSCN 4 mM Citrato Na 50 mM DTT al 1% (p/v) Polidocanol al 5% (v/v)
	sd	1,87	0,26	2,96	1,28	1,84	
	cv%	4,72	0,84	51,90	4,49	-20,83	
RL 8.4b	media	39,28	30,30	5,901	28,899	-8,98	GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 1% (p/v) Polidocanol al 1% (p/v)
	sd	1,17	0,18	2,552	1,291	1,18	
	cv%	2,97	0,58	43,25	4,47	-13,15	
RL 8.5b	media	44,23	35,03	6,836	28,771	-9,13	GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 1% (p/v) Polidocanol al 0,1% (v/v)
	sd	3,31	0,22	6,316	1,786	3,35	
	cv%	7,48	0,62	92,39	6,21	-36,73	

Fig. 2

Tampón de lisis utilizado	-DTT					Tasa de acierto	tampón de lisis / formulación utilizado
	Tgt CT	IQS CT	TgtInc AbsNorm	IQSInc AbsNorm	Δ CT		
RL 8.1a	media sd cv%	40,75 2,06 5,06	31,21 0,23 0,75	2,005 0,822 41,01	19,716 1,871 9,49	-9,35 2,09 -22,34	6/24 25% GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 0% (p/v) Polidocanol al 15% (v/v)
RL 8.2a	media sd cv%	44,51 3,20 7,18	31,11 0,20 0,63	1,182 0,684 57,86	19,759 1,808 9,15	-13,49 3,18 -23,55	7/24 29.17% GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 0% (p/v) Polidocanol al 10% (v/v)
RL 8.3a	media sd cv%	42,67 3,69 8,66	30,88 0,25 0,81	1,571 0,892 56,79	21,183 1,777 8,39	-11,75 3,73 -31,75	11/24 45.83% GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 0% (p/v) Polidocanol al 5% (v/v)
RL 8.4a	media sd cv%	43,23 3,04 7,04	30,76 0,22 0,71	1,547 1,062 68,68	21,816 1,943 8,91	-12,48 3,17 -25,37	15/24 62.50% GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 0% (p/v) Polidocanol al 1% (v/v)
RL 8.5a	media sd cv%	N/A N/A N/A	36,16 0,28 0,78	N/A N/A N/A	23,885 1,990 8,33	N/A N/A N/A	0/24 0% GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 0% (p/v) Polidocanol al 0,1% (v/v)

Fig. 3

Tampón de lisis utilizado	Tasa de acierto	Aciertos (x / 23)	Aciertos (x / 23)	Tampón de lisis / Formulación utilizada
RL 8.3a	60.87%	14	14	GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 0% (p/v) Polidocanol al 5% (v/v)
0170NN	86.97%	20	20	GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 0% (p/v) Polidocanol al 3% (v/v)
RL 6.2	86.97%	20	20	GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 0% (p/v) Polidocanol al 15% (v/v)
RL 8.1a	69.57%	16	16	GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 0% (p/v) Polidocanol al 1% (v/v)
RL 8.5a	4.35%	1	1	GuSCN 4 M Citrato Na 50 mM DTT al 0% (p/v) Polidocanol al 0,1% (v/v)

Fig. 4

