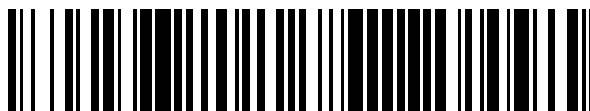


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 117**

51 Int. Cl.:

B01L 7/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2005** **E 05024993 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015** **EP 1666150**

54 Título: **Preparación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

20.11.2004 EP 04027624

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

24.03.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

KOPP, MARTIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 532 117 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

Preparación de ácidos nucleicos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para preparar ácidos nucleicos a partir de un ácido nucleico molde, a un dispositivo diagnóstico para preparar ácidos nucleicos a partir de un molde, a un programa informático para controlar un método para la preparación de ácidos nucleicos a partir de un ácido nucleico molde utilizando ciclos
10 térmicos y a un producto de programa informático que comprende dicho programa, un aparato para preparar ácidos nucleicos y un método para determinar la presencia o la ausencia o la cantidad de un ácido nucleico molde en una muestra.

15 Antecedentes de la invención

Los métodos para la amplificación de ácidos nucleicos a partir de muestras que contienen estos ácidos nucleicos son conocidos. En los métodos *in vivo*, se utilizan microorganismos con un genoma manipulado genéticamente para que contenga el ácido nucleico que debe amplificarse, con el fin de producir grandes cantidades de copias del ácido nucleico. Estos métodos son lentos y requieren mucha experimentación para conseguir una implementación exitosa.
20 Más recientemente, se han establecido métodos *in vitro* para preparar grandes cantidades de ácidos nucleicos sin la participación de microorganismos. El primer método de amplificación *in vitro* es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), descrito en la patente EP nº 201.184. En una realización mu preferente de PCR, la muestra que contiene el ácido nucleico que debe amplificarse se somete repetidamente a un perfil de temperaturas que refleja las etapas de hibridación del cebador con el ácido nucleico diana, el alargamiento de dicho cebador para producir un
25 producto de extensión utilizando el ácido nucleico que debe copiarse como molde y la separación del producto de extensión del ácido nucleico molde. Se aplica el perfil de temperaturas varias veces, repitiendo las etapas, entre las que se incluyen la hibridación y el alargamiento de un segundo cebador capaz de hibridarse con el producto de extensión del primer cebador. Cada perfil de temperaturas realizado repetidamente se denomina ciclo térmico.

Dicho método se ha aplicado a métodos para la determinación de ácidos nucleicos basado en la superior sensibilidad de detección proporcionada por la cantidad incrementada de ácidos nucleicos. En la patente EP nº 200.362 se da a conocer un método que utiliza la adición de una sonda capaz de hibridarse con los ácidos nucleicos formados en la mezcla de reacción y la detección de la presencia, la ausencia o la cantidad de híbridos formados como medida del ácido nucleico original en la muestra.

Más recientemente se ha encontrado que los métodos para la amplificación de ácidos nucleicos resultan tan eficaces que existe un riesgo de contaminación del medio ambiente, por ejemplo del laboratorio en el que se lleva a cabo la reacción de amplificación. Lo anterior puede producir resultados falsos positivos de detecciones posteriores. En la patente EP nº 543.942 se da a conocer un método que no requiere abrir la cámara, recipiente o tubo de
40 reacción entre la amplificación y la detección de híbridos, para la adición de la sonda. Estos métodos se denominan métodos de amplificación y detección homogénea.

El tiempo necesario para llevar a cabo una reacción de amplificación depende en gran medida del volumen de reacción utilizado. Por ejemplo, al llevar a cabo una reacción de PCR en un volumen de 50 a 100 µl en un
45 instrumento termociclador como el instrumento PCR System 9700 (Applied Biosystems), se requiere un tiempo de reacción de dos a cuatro horas. La mayor parte de este tiempo resulta necesario para modificar la temperatura de la mezcla de reacción para llevar a cabo los ciclos térmicos. Esta modificación puede acelerarse por varios medios. En primer lugar, puede modificarse la forma del recipiente de reacción para obtener una superficie incrementada que permita un régimen de calentamiento y enfriamiento más rápido. En segundo lugar, puede reducirse el volumen de
50 reacción de manera que se requiera calentar y enfriar un volumen menor. Por estos medios algunos termocicladores como el LightCycler® (Roche Diagnostics) permiten reducir el tiempo de reacción a varios minutos en lugar de horas. Sin embargo, la utilización de volúmenes de reacción reducidos presenta la desventaja de que únicamente pueden añadirse a la reacción volúmenes reducidos de muestra, lo que reducirá proporcionalmente el límite de detección (LDD). Alternativamente, podría mantenerse el volumen de reacción y podría minimizarse la distancia de difusión
55 térmica utilizando una celda de amplificación grande muy plana. Sin embargo, ello conduciría a un área de amplificación y un área de detección drásticamente incrementados y por ello un termociclador muy caro y cantidades enormes de desechables. Además, la superficie incrementada de dichas cámaras de reacción puede inhibir la reacción.

En el documento nº WO2004/51218 se da a conocer un método para detectar diferentes analitos, en el que tras una amplificación multiplex de todos los ingredientes de la mezcla de reacción, ésta se divide en alícuotas y la alícuotas se tratan con reactivos para la amplificación específica de analitos específicos en reacciones separadas. Este método presenta la desventaja de que requiere reactivos adicionales para la segunda amplificación.

En el documento nº WO 02/20845 se da a conocer un método para evitar la formación de dímeros de cebadores mediante la utilización de una primera reacción de amplificación con una baja concentración de cebador, añadiendo

después más cebadores y realizando más etapas de amplificación. Nuevamente, este método adolece de la desventaja de que en una determinada etapa durante la amplificación, debe abrirse el tubo de reacción para añadir más reactivos. Ello resulta tanto poco conveniente para el flujo de trabajo en un laboratorio como problemático por motivos de contaminación. Además, la utilización de un termociclador estándar no permite velocidades de ciclado muy elevadas.

Ambos documentos de la técnica anterior mencionados anteriormente no presentan como objetivo acortar el tiempo de amplificación en modo alguno; de esta manera, el objetivo de la presente invención es mejorar la velocidad de la amplificación.

Descripción resumida de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método de preparación de ácidos nucleicos a partir de un ácido nucleico molde en el que se somete una muestra a ciclos térmicos que comprende las etapas siguientes:

- a) someter una primera cantidad de dicha muestra en una primera cámara de amplificación a un primer número de ciclos térmicos con el fin de preparar una primera cantidad de una primera mezcla de reacción, y
- b) someter una cantidad parcial de dicha mezcla de reacción en una segunda cámara de amplificación a un segundo número de ciclos térmicos con el fin de preparar una segunda cantidad de una segunda mezcla de reacción,

en el que el volumen de dicha segunda cámara de amplificación es menor que el volumen de dicha primera cámara de amplificación.

La velocidad de calentamiento y enfriamiento integral preferentemente es de por lo menos 2 Kelvin/segundo (K/s) en la etapa a) y superior en la etapa b), preferentemente de por lo menos 5 K/s.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un dispositivo diagnóstico para la preparación de ácidos nucleicos a partir de un molde, que comprende:

- una primera cámara de amplificación, y
- una segunda cámara de amplificación,
- medios para calentar y enfriar las cámaras,
- medios para controlar la temperatura de los ciclos de amplificación durante los ciclos térmicos,

en el que el volumen de dicha segunda cámara de amplificación es inferior al volumen de dicha primera cámara de amplificación, la velocidad de calentamiento y enfriamiento integral preferentemente es de por lo menos 2 Kelvin/segundo (K/s) en la etapa a) y superior en la etapa b), preferentemente de por lo menos 5 K/s.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un programa informático para controlar un método para la preparación de ácidos nucleicos a partir de un ácido nucleico molde utilizando ciclos térmicos, caracterizado por que el programa informático se configura para aplicar un primer número de ciclos térmicos a la muestra y posteriormente un segundo número de ciclos térmicos con un tiempo de ciclado más corto en un volumen inferior de una mezcla de reacción originada a partir de la misma muestra.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un producto de programa informático que comprende dicho programa en un medio de almacenamiento físico.

En un quinto aspecto, la invención se refiere a un aparato para la preparación de ácidos nucleicos, que comprende:

- el dispositivo diagnóstico anteriormente indicado, y
- una unidad para controlar el dispositivo diagnóstico,

en el que la unidad para controlar el dispositivo diagnóstico presenta el programa informático cargado.

Se da a conocer además un método para determinar la presencia, la ausencia o la cantidad de un ácido nucleico molde en una muestra que comprende el método de preparación de ácidos nucleicos anteriormente descrito y la detección de la formación de ácidos nucleicos como medida de la presencia, la ausencia o la cantidad de ácidos nucleicos que deben determinarse.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 ilustra el principio subyacente a la presente invención. Mediante la reducción del volumen de reacción en una segunda etapa, puede reducirse el tiempo de reacción necesario sin modificar el límite de detección (LDD).

La fig. 2 muestra un cálculo de un método optimizado de amplificación de alícuotas.

La fig. 3 muestra un dispositivo de termociclado que comprende dos cámaras de amplificación útiles para llevar a cabo los métodos de preparación de ácidos nucleicos descritos.

La fig. 4 muestra un desechable capilar para llevar a cabo los métodos de la presente invención (ver también el Ejemplo 3).

La fig. 5 muestra un posible dispositivo para llevar a cabo los métodos de preparación de ácidos nucleicos descritos en un modo multiplex (ver también el Ejemplo 4).

Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un método de preparación de ácidos nucleicos a partir de un ácido nucleico molde. En este método se somete una primera cantidad de una muestra a un primer número de ciclos térmicos para preparar una primera cantidad de una primera mezcla de reacción. A continuación, una alícuota/cantidad parcial de dicha primera mezcla de reacción se somete a un segundo número de ciclos térmicos con el fin de preparar una segunda cantidad de una segunda mezcla de reacción. Al someter únicamente una alícuota de la primera mezcla de reacción a un segundo número de ciclos térmicos, puede reducirse el tiempo por cada ciclo térmico en comparación con el tiempo necesario para el termociclado de la primera mezcla de reacción debido a que la distancia de difusión térmica es más reducida. Los primeros pocos ciclos térmicos son los más críticos para la especificidad de la amplificación y por lo tanto requieren niveles de temperatura muy precisos sin desviaciones excesivas tanto por defecto como por exceso. Además, un volumen de reacción de aproximadamente 5 a 200 μ l en la primera etapa de reacción proporciona un volumen suficiente para añadir suficiente preparación de ácidos nucleicos derivada de un material de muestra que debe analizarse de manera que también resulten posibles métodos de amplificación muy sensibles. La segunda parte de 40 a 50 ciclos adicionales se requiere principalmente para crear un nivel de señal detectable. De acuerdo con estas necesidades, el ciclador, la cámara de amplificación y el control de retroalimentación pueden ajustarse a niveles o velocidades térmicas muy exactas. Además, el segundo volumen de amplificación compacto y confinado a un pocillo permite una configuración óptica altamente sensible. Este principio se ilustra en la figura 1.

Dicho método preferentemente se basa en el método de la PCR, aunque también pueden utilizarse otros métodos, tales como los métodos de amplificación de ácidos nucleicos lineales o exponenciales. Los métodos de amplificación exponencial son bien conocidos de la técnica. Resultan especialmente adecuados algunos métodos como la PCR (patente US nº 4.683.202) y la RCL (patentes US nº 5.185.243, nº 5.679.524 y nº 5.573.907), en las que la mezcla de reacción se somete repetidamente a diferentes temperaturas (ciclos térmicos).

La cantidad de muestra, y el primer y segundo números y duración de los ciclos térmicos dependen del propósito y método de amplificación concretos utilizados. La primera cantidad de muestra típicamente presenta un volumen de 5 a 200 μ l, preferentemente 5 a 50 μ l. El reactivo adicional necesario para llevar a cabo una reacción de amplificación puede añadirse a la muestra en forma seca, por ejemplo como un depósito en la primera cámara de amplificación, solubilizando dicho depósito mediante la adición de la muestra. Estos reactivos también pueden añadirse en solución, típicamente en un volumen de 2,5 a 100 μ l, más preferentemente en un volumen de 2,5 a 25 μ l. A continuación, la muestra en una primera cámara de amplificación se somete a un primer número de ciclos térmicos, que típicamente son 3 a 15 ciclos térmicos, más preferentemente 5 a 8. La longitud de un ciclo térmico varía mucho en los diferentes métodos de amplificación. Para la PCR típicamente varía entre 20 segundos y 5 minutos, más preferentemente entre 20 y 120 segundos. En la presente etapa preferentemente se utiliza una cámara de amplificación que presenta una velocidad de calentamiento y enfriamiento integral de por lo menos 2 Kelvin/segundo, más preferentemente de entre 4 y 7 K/s.

La velocidad integral de calentamiento o enfriamiento, respectivamente, puede describirse como el intervalo de temperatura dividido por el tiempo necesario para cambiar de un nivel de temperatura al siguiente nivel de temperatura. Éste es el parámetro relevante en los instrumentos de termociclador que puede conducir a protocolos de PCR más rápidos. Típicamente estos intervalos son de 95°C a 60°C, de 60°C a 72°C y de 72°C a 95°C. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, se entiende la velocidad de calentamiento y enfriamiento integral como la velocidad de una cámara de amplificación dada y de un volumen de reacción dado en el intervalo de temperaturas de aproximadamente 60°C y 95°C.

Esta velocidad de calentamiento y enfriamiento integral resulta afectado por los medios utilizados en el termociclador para el calentamiento y el enfriamiento, así como por el tamaño de la cámara de amplificación, lo que determina el volumen de la mezcla de reacción que debe amplificarse. La utilización de un termociclador rápido con una cámara de amplificación con un volumen pequeño permite tiempos de ciclado cortos.

Los termocicladores convencionales, basados en tecnología Peltier (Applied Biosystems 9700) con un bloque de aluminio montado típicamente presentan velocidades de rampa integrales inferiores a 2-3 K/s y por sí solas por lo tanto no permiten aprovechar totalmente el beneficio del concepto propuesto en la presente memoria. Con un termociclador que proporciona una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 5-6 K/s como el LightCycler o instrumentos dotados de elementos de Peltier de alto rendimiento, podrían observarse los primeros beneficios. Pueden conseguirse todavía más beneficios utilizando termocicladores que permitan velocidades de rampa superiores a 10 K/s, en particular para la tasa de enfriamiento.

A continuación, una cantidad parcial de dicha primera cantidad de mezcla de reacción se somete en una segunda cámara de amplificación a un segundo número de ciclos térmicos con el fin de preparar una segunda cantidad de una segunda mezcla de reacción. El volumen de dicha cantidad parcial de dicha primera cantidad de mezcla de reacción típicamente presenta un volumen de 0,5 a 5 µl, más preferentemente de 0,1 a 2 µl. Típicamente, la cantidad parcial de dicha mezcla de reacción se somete a menos de 50 ciclos térmicos, más preferentemente entre 20 y 40 ciclos térmicos. El volumen más reducido de dicha cantidad parcial de dicha primera mezcla de reacción permite una velocidad de calentamiento y enfriamiento integral más elevada de dicha segunda cámara de amplificación (por lo menos 5 K/s, preferentemente de entre 8 y 12 K/s) y la duración de un ciclo térmico puede ser inferior a la duración del ciclo térmico en la primera ronda de amplificación y habitualmente varía entre 5 y 30 segundos.

La muestra puede derivarse de seres humanos, animales y de otros sitios en la naturaleza. Preferentemente las muestras son, especialmente en enfoques diagnósticos, de sangre, suero, plasma, médula ósea, tejido, esputo, efusiones y suspensiones pleurales y peritoneales, orina, esperma y heces.

Preferentemente, los ácidos nucleicos se purificaron a partir de las muestras antes de la amplificación, de manera que puede añadirse una muestra de ácidos nucleicos más o menos pura a la reacción de amplificación. Los métodos para la purificación de ácidos nucleicos son bien conocidos de la técnica. Aparte de los laboriosos métodos descritos en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Coldspring Harbour Laboratory Press, 1989), también se encuentran disponibles kits comerciales con este fin (por ejemplo MagNAPure[®], Roche Diagnostics).

Por lo tanto, la muestra según la presente invención puede ser una muestra derivada directamente de un donante, especialmente para casos en los que no resulta necesaria una purificación adicional de los ácidos nucleicos presentes en la muestra, así como muestras purificadas que contienen ácidos nucleicos preparadas a partir de una muestra del donante.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar y/o detectar ácidos nucleicos de una muestra tal como se ha indicado anteriormente en la que la purificación de los ácidos nucleicos presentes en una muestra se integra preferentemente en la primera cámara de amplificación del dispositivo. Los dispositivos y métodos en los que los ácidos nucleicos presentes en una muestra se purifican en la misma cámara de reacción utilizada para llevar a cabo la reacción de amplificación de ácidos nucleicos son conocidos de la técnica. Por ejemplo, en el documento nº WO 03/106031 se describen dispositivos integrados en los que las matrices de unión, tales como vellón de vidrio, se utilizan para capturar los ácidos nucleicos presentes en una muestra. Tras la preparación de muestras, la reacción de amplificación puede llevarse a cabo en la misma cámara de reacción utilizada para la preparación de muestras de ácidos nucleicos. Dicho enfoque puede combinarse con los métodos y dispositivos de la presente invención. Los ácidos nucleicos de una muestra pueden purificarse y pueden someterse a un primer número de ciclos térmicos para preparar una primera cantidad de una primera mezcla de reacción en una primera cámara de amplificación de un dispositivo. A continuación, puede transmitirse una alícuota de dicha primera mezcla de reacción a la segunda cámara de amplificación para el segundo número de ciclos térmicos con el fin de preparar una segunda cantidad de una segunda mezcla de reacción. Dichos métodos y dispositivos presentan varias ventajas inesperadas. En primer lugar, tal como ya se ha indicado, la segunda etapa de amplificación permite realizar un termociclado mucho más rápido debido al volumen de reacción más pequeño. En segundo lugar, también en el caso de que los ácidos nucleicos de la muestra todavía se encuentren parcialmente unidos a la matriz de unión utilizada para la preparación de muestras y no hayan sido completamente eluidos de dicha matriz, estos ácidos nucleicos todavía pueden amplificarse porque la matriz de unión todavía se encuentran presentes durante el primer número de ciclos térmicos. Y en tercer lugar, en el caso de que dicha matriz de unión inhiba la reacción de amplificación en cierto grado, dicho efecto de inhibición ya no se encuentra presente al someter la reacción al segundo número de ciclos térmicos, debido a que la alícuota de la primera mezcla de reacción utilizada para llevar a cabo el segundo número de ciclos térmicos ya no se encuentra en contacto con dicha matriz de unión.

Se define un ciclo térmico como una secuencia de por lo menos dos temperaturas a las que se somete la mezcla de reacción durante un periodo de tiempo definido. Este ciclo térmico puede repetirse. En los métodos de PCR habitualmente se utilizan tres temperaturas diferentes. A aproximadamente 45°C-70°C, se hibridan los cebadores con los ácidos nucleicos diana. A una temperatura de aproximadamente 72°C, los cebadores unidos a la diana son alargados por una polimerasa termoestable y posteriormente, a aproximadamente 90°C-100°C, se separan los ácidos nucleicos de doble cadena. En el método de PCR, habitualmente se repite este ciclo térmico aproximadamente 30 a 50 veces. El tiempo necesario para modificar la temperatura en la mezcla de reacción depende principalmente del volumen y la forma del recipiente de reacción y habitualmente varía entre varios minutos y una fracción de un segundo.

Antes de someter una cantidad parcial de la primera mezcla de reacción a un segundo número de ciclos térmicos, resulta preferente transferir dicha cantidad parcial de la mezcla de reacción a una segunda cámara de amplificación. Ello puede llevarse a cabo manualmente mediante la utilización de una pipeta. Sin embargo, en vista del riesgo de contaminación, resulta preferente que lo anterior se automatice en el dispositivo, por ejemplo mediante bombas y válvulas. La primera y segunda cámaras de amplificación pueden separarse una de otra mediante canales, válvulas, barreras hidrofóbicas y otros medios. Los medios técnicos para dichos dispositivos integrados son conocidos del experto (ver, por ejemplo, Lee *et al.*, J. Micromech. Microeng. 13:89-97, 2003; Handique *et al.*, Anal. Chem. 72:4100-9; Hosokawa *et al.*, Anal. Chem. 71:4781-5; Puntambekar *et al.*, Proc. Transducers'01 (Berlin: Springer), páginas 1240 a 1243; Zhao *et al.*, Science 291:1023-6; Andersson *et al.*, Sensors Actuators B75:136-41).

También es una opción que la primera y segunda cámaras de reacción de amplificación sean dos compartimientos en una cámara de reacción no separada sin separación física entre ambas mezclas de reacción. Sin embargo, en este caso resulta necesario evitar/minimizar la difusión de los productos de reacción al llevar a cabo el segundo número de ciclos térmicos, especialmente con respecto a los ácidos nucleicos amplificados preparados en el primer y segundo compartimientos de reacción. Lo anterior puede llevarse a cabo por varios medios, por ejemplo con cebadores unidos a la fase sólida.

En el caso de que se interponga un canal entre la primera y segunda cámaras de amplificación, también puede evitarse la separación física con válvulas, aberturas o barreras hidrofóbicas en el caso de que se minimice la difusión entre ambas cámaras.

La mezcla de reacción contiene todos los ingredientes necesarios para llevar a cabo la método de amplificación de elección. Habitualmente, estos son los cebadores que permiten la unión específica del ácido nucleico que debe amplificarse, enzimas como polimerasas, transcriptasas inversas, etc., nucleótidos trifosfato, tampones, cationes monovalentes y divalentes como el magnesio. Los ingredientes dependen del método de amplificación y son bien conocidos por el experto.

Los productos de ácidos nucleicos preparados en la primera y segunda mezclas de reacción pueden detectarse mediante procedimientos conocidos de la técnica, por ejemplo mediante la detección de la longitud de los productos en un gel de agarosa. Mediante la utilización de sondas oligonucleótidas específicas de secuencia puede conseguirse un nivel adicional de especificidad, por ejemplo llevando a cabo técnicas de transferencia southern o de transferencia por puntos. En los métodos de amplificación detección homogénea, la sonda de detección u otros medios de detección ya se encuentran presentes en la mezcla de reacción durante la generación de los ácidos nucleicos amplificados. En el método descrito en la patente EP nº 0 543 942, la sonda está siendo degradada por la polimerasa de procesamiento durante el alargamiento de los cebadores. Para la detección habitualmente pueden utilizarse marcajes bien conocidos. Son ejemplos de marcajes de fluorescencia, la fluoresceína, la rodamina, etc.

Por lo tanto, otro aspecto se refiere a un método para determinar la presencia o la ausencia o la cantidad de un ácido nucleico molde en una muestra, que comprende:

- a) someter una primera cantidad de dicha muestra en una primera cámara de amplificación a un primer número de ciclos térmicos con el fin de preparar una primera cantidad de una mezcla de reacción,
- b) someter una cantidad parcial de dicha primera mezcla de reacción en una segunda cámara de amplificación a un segundo número de ciclos térmicos con el fin de preparar una segunda cantidad de una segunda mezcla de reacción, y
- c) determinar la formación de ácidos nucleicos como medida de la presencia o la ausencia o la cantidad de ácidos nucleicos que debe determinarse,

en el que el volumen de dicha segunda cámara de amplificación es menor que el volumen de dicha primera cámara de amplificación, La velocidad de calentamiento y enfriamiento integral es preferentemente por lo menos 2 Kelvin/segundo (K/s) en la etapa a) y más elevada en la etapa b), preferentemente de por lo menos 5 K/s.

La formación de ácidos nucleicos puede determinarse tras completar las etapas a) y b), o durante las etapas de amplificación a) y/o b).

Al transferir la cantidad parcial de la primera mezcla de reacción a la segunda cámara de amplificación, habitualmente no se añaden componentes de reacción adicionales. Ello evita cualquier apertura de las cámaras de reacción, por lo menos al llevarla a cabo automáticamente, y evita cualquier riesgo de contaminación. Sin embargo, para aplicaciones específicas podría resultar útil la adición de reactivos adicionales. Por ejemplo, podría resultar útil añadir cebadores adicionales al llevar a cabo un protocolo de PCR anidada o una sonda adicional que permita la detección de un determinado producto de amplificación. Estos reactivos pueden añadirse manualmente, aunque también pueden almacenarse en el dispositivo de reacción en forma líquida o sólida antes de la reacción y mezclarse al transferir la cantidad parcial de la primera mezcla de reacción a la segunda cámara de amplificación. En una realización específica de la presente invención, estos reactivos, especialmente los cebadores y sondas, se encuentran unidos a la fase sólida.

Debido a que sólo se utiliza una cantidad parcial de la primera mezcla de reacción para preparar la segunda mezcla de reacción, en principio pueden derivarse múltiples segundas mezclas de reacción a partir de la primera mezcla de reacción. Ello permite someter más que una cantidad parcial de la primera mezcla de reacción a un segundo número de ciclos térmicos y por lo tanto permite un protocolo de reacción múltiplex. Éste puede ser, en el caso más simple, una reacción paralela de la misma mezcla que satisfaga los resultados obtenidos en el presente método. En el caso de que se añadan diferentes cebadores y/o sondas a la cantidad parcial de la primera mezcla de reacción, resulta posible un método de detección múltiplex real, por ejemplo para detectar diferentes alelos de una diana.

Un posible dispositivo para los métodos de la presente invención se describe en el Ejemplo 3. Tal como ya se ha comentado anteriormente, el método de la presente invención no se encuentra limitado a determinados dispositivos. Puede llevarse a cabo manualmente utilizando termocicladores disponibles comercialmente, tales como el sistema Applied Biosystems 9700 y el LightCycler (Roche Diagnostics). Sin embargo, el presente método resulta especialmente adecuado para dispositivos funcionalmente integrados basados en tecnologías tales como las descritas en, por ejemplo, Micro Total Analysis Systems, Proceedings u TAS'94, A van den Berg, P. Berveld, 1994; Integrated Microfabricated Biodevices, M.J. Heller, A. Guttman, 2002; Microsystem Engineering of Lab-on-a-Chip devices, O. Geschke, H. Klank, P. Tellemann, 2004; y los documentos nº US2003/0152492 y nº US 5.639.423. Dichos dispositivos habitualmente presentan un transporte de líquidos automatizado, que permite el transporte de una muestra entre cámaras de reacción, medios para el termociclado, reactivos que se precargan en el dispositivo o que pueden añadirse automáticamente, y medios para detectar el producto de reacción. La reacción está controlada por medios informáticos y un programa informático de control.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es un dispositivo diagnóstico para preparar ácidos nucleicos a partir de un molde, que comprende:

- una primera cámara de amplificación, y
 - una segunda cámara de amplificación,
 - medios para calentar y enfriar las cámaras,
 - medios para controlar la temperatura de los ciclos de amplificación durante los ciclos térmicos,
- en el que el volumen de dicha segunda cámara de amplificación es inferior al volumen de dicha primera cámara de amplificación. La velocidad de calentamiento y enfriamiento integral preferentemente es de por lo menos 2 Kelvin/segundo (K/s) en la etapa a) y superior en la etapa b), preferentemente de por lo menos 5 K/s.

El menor volumen de la segunda cámara de amplificación permite reducir el tiempo necesario para cada ciclo térmico. En los termocicladores convencionales como el PCR System 9700 (Applied Biosystems), el volumen de las cámaras de amplificación no se modificada y, además, con frecuencia se utilizan bloques metálicos para el termociclado, lo que no permite reducir el tiempo necesario para un ciclo térmico a menos de unos cuantos minutos. Por lo tanto, extraer una alícuota de una reacción de amplificación y utilizar un termociclador más rápido como el LightCycler durante una segunda reacción de amplificación permite reducir el tiempo de reacción total sin reducir la sensibilidad del ensayo.

Las cámaras de amplificación adecuadas para un dispositivo diagnóstico de la presente invención son básicamente conocidas de la técnica anterior. Estas cámaras proporcionan espacio para contener la mezcla de reacción. Esta cámara puede ser, por ejemplo, un tubo de plástico de paredes delgadas que se inserta en un orificio perforado en el bloque metálico de un termociclador tal como el instrumento 9700er de Perkin Elmer o el volumen interior del capilar de vidrio que puede introducirse en el instrumento LightCycler. El volumen de la cámara de amplificación está definido por el volumen máximo de una mezcla de reacción que puede utilizarse en la reacción.

Las mezclas de reacción pueden calentarse mediante la utilización de, por ejemplo, elementos calefactores como los elementos calefactores Peltier o de resistencia. Para el enfriamiento pueden utilizarse elementos refrigeradores activos o elementos refrigeradores pasivos tales como sumideros de calor. Para conducir el calor y frío a la mezcla de reacción contenida en la cámara de amplificación se conocen varios medios. En muchos termocicladores convencionales se utilizan bloques metálicos que contienen las cámaras de amplificación para proporcionar calor y frío a la mezcla de reacción. En el formato LightCycler, un flujo de aire caliente que flota en torno al capilar de vidrio proporciona esta función.

El dispositivo diagnóstico de la presente invención presenta por lo menos dos cámaras de amplificación tal como se ha indicado anteriormente. Estas cámaras pueden situarse en un instrumento o separarse en dos instrumentos diferentes, de manera que la transferencia de una alícuota de la primera mezcla de reacción a la segunda cámara de amplificación puede llevarse a cabo mediante pipeteado manual o, preferentemente, automatizarse. El aparato según la invención presenta un receptáculo para contener el dispositivo. Comprende además medios que calientan y enfrían las cámaras y además para controlar la temperatura de los ciclos de amplificación durante los ciclos térmicos, preferentemente una unidad de control con un programa informático cargado tal como se indica posteriormente.

Por lo tanto, un aspecto adicional de la presente invención es un programa informático para controlar un método para la preparación de ácidos nucleicos a partir de un ácido nucleico molde utilizando ciclos térmicos, caracterizado

porque el programa informático está configurado para aplicar un primer número de ciclos térmicos a la muestra y posteriormente un segundo número de ciclos térmicos con un tiempo de ciclado más corto en un volumen diferente de una mezcla de reacción originada a partir de la misma muestra. Un aspecto más preferente de la presente invención se refiere a un programa informático para controlar los métodos de preparación de ácidos nucleicos descritos anteriormente.

Dichos programas informáticos pueden almacenarse en un medio de almacenamiento físico, tal como un disquete o un CD.

Un aspecto adicional de la presente invención es un aparato para preparar ácidos nucleicos, que comprende:

- el dispositivo diagnóstico anteriormente indicado, y
- una unidad para controlar el dispositivo diagnóstico,

en el que en la unidad de control del dispositivo diagnóstico se ha cargado un programa informático tal como se ha indicado anteriormente.

La presente invención se describe en mayor detalle en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Protocolo de PCR optimizado

Para llevar a cabo una reacción de PCR en 100 µl en una cámara de reacción cúbica, se ha planteado la cuestión de cuántos ciclos deben llevarse a cabo en un método de PCR de alícuotas optimizado en el volumen de 100 µl y después de qué número de ciclos debería añadirse una alícuota y de qué tamaño a la segunda cámara de reacción para llevar a cabo el método en un mínimo de tiempo sin modificar el límite de detección ni perder sensibilidad. Un ciclo de PCR típico en un volumen de 100 µl requiere aproximadamente 130 segundos. En una reacción de PCR óptima, la cantidad de ácido nucleico amplificado aproximadamente se duplica en cada ciclo. Por lo tanto, tras n ciclos, puede utilizarse $1/2^n$ del volumen de la primera reacción como cantidad parcial que se somete a un segundo número de ciclos térmicos, los cuales pueden ciclarse mucho más rápidamente debido al volumen más pequeño. El tiempo exacto necesario para el ciclo térmico acortado se define por una parte por el perfil de temperaturas y, por otra parte, por la distancia de difusión térmica. Para el cálculo real, se ha supuesto que el volumen calefactado presenta una forma cúbica y se encuentra en contacto con la fuente/sumidero de calor a través de una sola pared. La mayor parte del tiempo del PCR se utilizará en la difusión del calor desde esta pared única a través del agua para alcanzar una distribución de temperaturas homogénea. El tiempo de difusión térmica escala con la segunda potencia de la longitud lateral del volumen cúbico, por lo tanto reducir el volumen por un factor de dos reduce el tiempo de difusión en un factor de $2^{2/3}$. Además, se ha supuesto una serie típica de 50 ciclos térmicos.

El resultado de dicho cálculo se muestra en la figura 2. En el caso de que se lleven a cabo 50 ciclos térmicos largos, el tiempo de reacción sería de 110 minutos. Mediante la aplicación del método de la presente invención, esto se puede acortar a un máximo de 20 minutos sin perder sensibilidad. Tal como se muestra, resultaría óptimo extraer una alícuota de la primera mezcla de reacción tras cinco a ocho ciclos térmicos y someter esta cantidad parcial a los ciclos térmicos restantes, que pueden llevarse a cabo más rápido debido al volumen más pequeño. Dependiendo del número de los primeros ciclos térmicos, podrían utilizarse 3,2 a 0,4 µl para la segunda reacción. Debe indicarse además que los volúmenes de reacción de ese tamaño resultan perfectamente adecuados para detectar el ácido nucleico amplificado con métodos de detección estándares como la detección de fluorescencia.

Aunque dicho cálculo se basa en algunas premisas como la duplicación del ácido nucleico diana en cada ciclo (lo que resulta difícil de conseguir en un experimento real), ilustra muy bien las ventajas de la presente invención.

Ejemplo 2

La figura 3 muestra un esquema de un dispositivo que presenta dos cámaras de amplificación y elementos de termociclador, que resulta adecuado para llevar a cabo los métodos de la presente invención. Las dos cámaras se encuentran en contacto físico mediante una sección estrecha que podría implementarse en forma de una válvula hidrofóbica. Por este medio la segunda cámara de amplificación no se llena espontáneamente durante el llenado de la primera cámara de amplificación. Tras varios ciclos térmicos, se transfiere una alícuota de la primera mezcla de reacción a la segunda cámara de amplificación, por ejemplo haciendo girar el dispositivo o mediante la aplicación de presión hidrostática.

Ejemplo 3

La figura 4 ilustra una modificación del tubo Light-Cycler®, caracterizado por el ensanchamiento del tubo estrecho hacia la parte superior del tubo. La sección ancha y la sección estrecha se encuentran separadas por una sección (válvula) hidrofóbica. Tras llevar a cabo los primeros pocos ciclos en la mitad superior del tubo, se pelletiza una

alícuota en la sección inferior del tubo, permitiendo un perfil de ciclado mucho más rápido. Evidentemente ello requiere alguna modificación del instrumento para permitir la realización de una etapa de centrifugación dentro del programa de ciclado. Sin embargo, esta etapa de centrifugación también puede llevarse a cabo utilizando centrífugas disponibles sin requerir modificaciones del presente dispositivo Light-Cycler®.

5

Ejemplo 4

10

15

La figura 5 muestra un esquema de un dispositivo en forma de disco que presenta una cámara de reacción para llevar a cabo el primer número de ciclos térmicos con un volumen de reacción más alto y someter más de una cantidad parcial de dicha primera mezcla de reacción a un segundo número de ciclos térmicos y, por lo tanto, permite un método de reacción múltiplex. En este caso el líquido de reacción puede transportarse haciendo girar el dispositivo de disco y aplicando una fuerza centrífuga, aunque pueden utilizarse otros métodos como la fuerza neumática, el vacío y otros. Habitualmente resulta recomendable bloquear reversiblemente la conexión de líquidos entre la primera y la segunda cámaras de reacción, por ejemplo mediante válvulas, aberturas hidrofóbicas, etc. Sin embargo, tal como ya se ha descrito de manera general anteriormente, en el caso de que se minimice la difusión, también resulta posible utilizar una cámara de reacción con dos compartimientos de reacción, en el que el segundo compartimiento puede utilizarse para el termociclado más rápido. La minimización de la difusión de los ácidos nucleicos amplificados puede llevarse a cabo con, por ejemplo, cebadores y/o sondas unidas a la fase sólida.

REIVINDICACIONES

1. Método de preparación de ácidos nucleicos a partir de un ácido nucleico molde en el que se somete una muestra a ciclos térmicos, que comprende las etapas:

- a) someter una primera cantidad de dicha muestra en una primera cámara de amplificación a un primer número de ciclos térmicos para preparar una primera cantidad de una primera mezcla de reacción, y
- b) someter una cantidad parcial de dicha primera mezcla de reacción en una segunda cámara de amplificación a un segundo número de ciclos térmicos para preparar una segunda cantidad de una segunda mezcla de reacción,

en el que el volumen de dicha segunda cámara de amplificación es inferior al volumen de dicha primera cámara de amplificación.

2. Método según la reivindicación 1, en el que en la etapa a) dicha primera cantidad de muestras se somete a dicho primer número de ciclos térmicos con una velocidad de calentamiento y enfriamiento integral de por lo menos 2 Kelvin/segundo K/s) y en el que en la etapa b) dicha cantidad parcial de dicha primera mezcla de reacción se somete a dicho segundo número de ciclos térmicos con una velocidad de calentamiento y enfriamiento integral que es más alta que en la etapa a) y que es de por lo menos 5 K/s.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la velocidad de calentamiento y enfriamiento integral en la etapa a) es de 4 a 7 K/s y en la etapa b) es de 8 a 12 K/s.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el volumen de dicha primera cantidad de dicha muestra en dicha primera cámara de amplificación presenta un volumen de 5 a 200 µl.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el volumen de dicha cantidad parcial de dicha primera mezcla de reacción presenta un volumen de 0,05 a 5 µl.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho primer número de ciclos térmicos es inferior al segundo número de ciclos térmicos.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la cantidad parcial de la primera mezcla de reacción se separa físicamente del resto de dicha primera mezcla de reacción.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que una o más cantidades parciales adicionales de dicha primera mezcla de reacción se somete a ciclos térmicos en la etapa b).

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la primera cámara de amplificación se utiliza para la purificación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra no purificada antes de llevar a cabo dicho primer número de ciclos térmicos.

10. Método según las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además:

- c) determinar la formación de ácidos nucleicos como medida de la presente, la ausencia o la cantidad de ácidos nucleicos que debe determinarse,

en el que el volumen de dicha segunda cámara de amplificación es inferior al volumen de dicha primera cámara de amplificación y la formación de ácidos nucleicos se determina durante o después de completarse las etapas a) y b).

11. Dispositivo diagnóstico para preparar ácidos nucleicos a partir de un molde, que comprende:

- a. una primera cámara de amplificación, y
- b. una segunda cámara de amplificación,
- c. medios para el calentamiento y el enfriamiento de las cámaras,
- d. medios para controlar la temperatura de los ciclos de amplificación durante los ciclos térmicos,

en el que el volumen de dicha segunda cámara de amplificación es inferior al volumen de dicha primera cámara de amplificación.

12. Dispositivo según la reivindicación 11, en el que el volumen de dicha primera cantidad de dicha primera cámara de amplificación presenta un volumen de 5 a 200 µl.

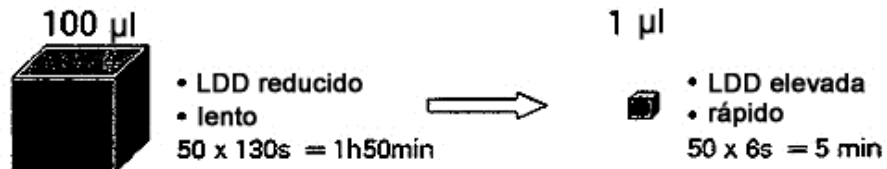
13. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que el volumen de dicha segunda cámara de amplificación es de 0,05 a 5 µl.

14. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 que presenta medios para transportar líquidos de dicha primera cámara de amplificación a dicha segunda cámara de amplificación.
- 5 15. Programa informático para controlar un método para la preparación de ácidos nucleicos a partir de un ácido nucleico molde utilizando ciclos térmicos, caracterizado por que el programa informático se configura para aplicar un primer número de ciclos térmicos en la muestra y posteriormente un segundo número de ciclos térmicos con un tiempo de ciclado más corto en un volumen inferior de una mezcla de reacción originada a partir de la misma muestra.
- 10 16. Producto de programa informático que comprende un programa según la reivindicación 15 en medios de almacenamiento físico.
- 15 17. Aparato para preparar ácidos nucleicos, que comprende:
a. un dispositivo diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, y
b. una unidad para controlar el dispositivo diagnóstico,
- en el que en la unidad para controlar el dispositivo diagnóstico se carga un programa informático según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16.

Figura 1

PCR de alícuotas

Escalado de volumen $\Rightarrow$ Velocidad de ciclo más alta



Fraccionamiento de volumen $\Rightarrow$ Compensación de la concentración

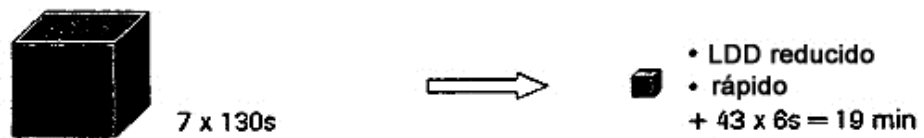


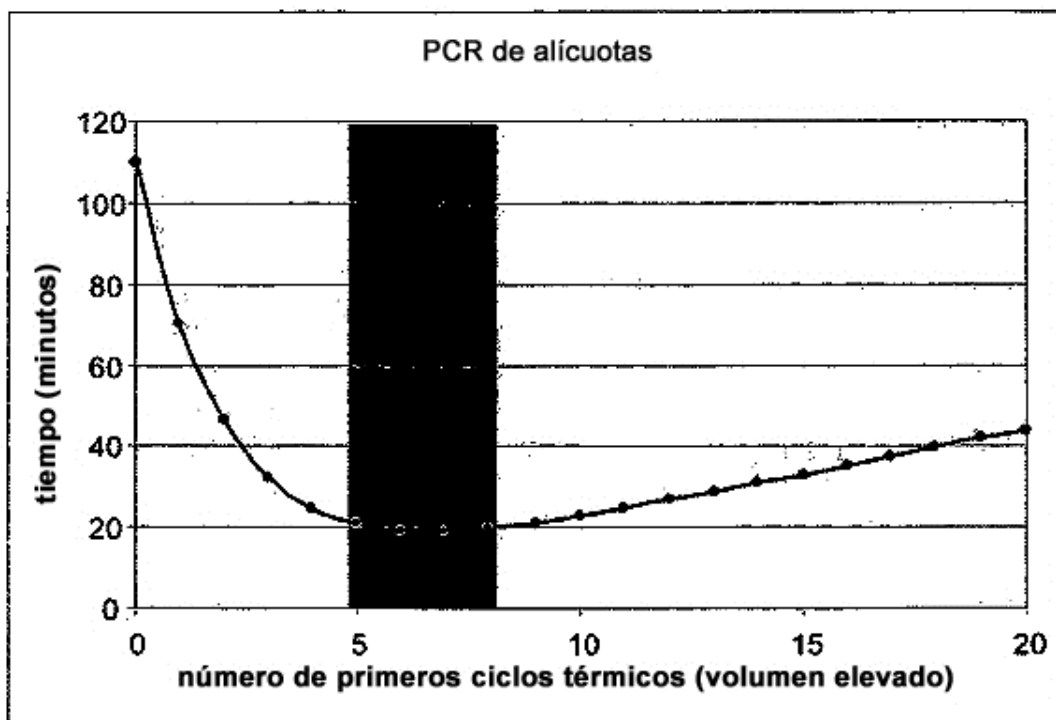
Figura 2

Figura 3

posibilidad de implementación

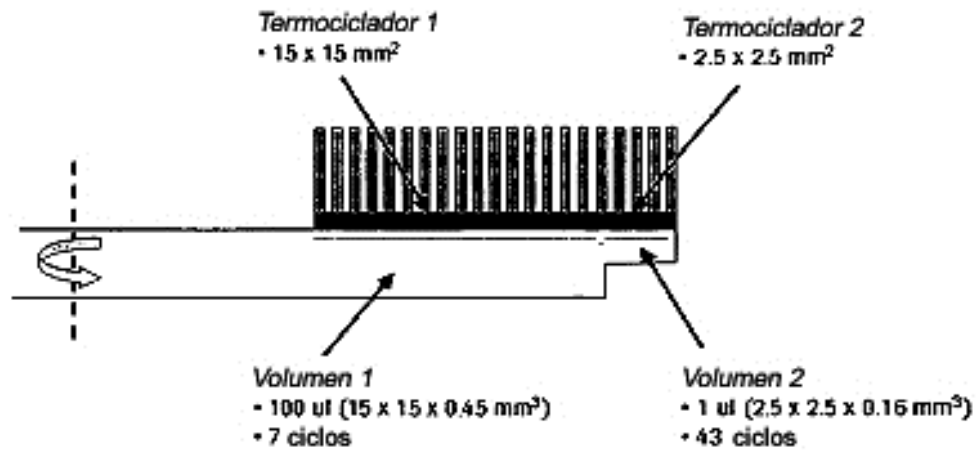


Figura 4

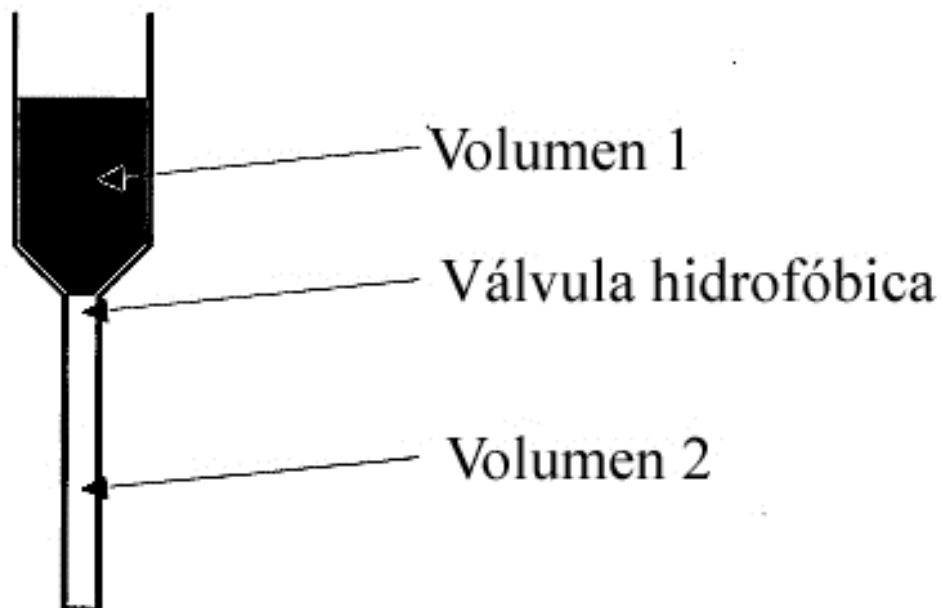


Figura 5

