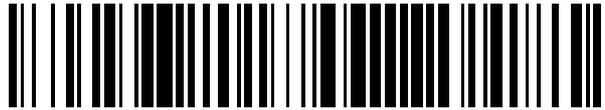


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 817**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2008 E 08788066 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2129804**

54 Título: **Método de descontaminación de una solución de ácidos nucleicos indeseables**

30 Prioridad:

30.03.2007 FR 0754165

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

06.07.2015

73 Titular/es:

**BIOMERIEUX SA (100.0%)
CHEMIN DE L'ORME
69280 MARCY L'ETOILE, FR**

72 Inventor/es:

**PARANHOS-BACCALA, GLAUCIA;
LAURENT, ALAIN y
LAAYOUN, ALI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 539 817 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

Método de descontaminación de una solución de ácidos nucleicos indeseables

5 La presente invención se refiere a un método de descontaminación de una solución de ácidos nucleicos indeseables. La presente invención se refiere también a la utilización de tal solución así tratada.

El desarrollo de la biología molecular ha hecho posible la manipulación de los ácidos nucleicos. Los métodos de
10 amplificación se han convertido entonces una herramienta indispensable, permitiendo obtener a partir de una muy baja cantidad de ácidos nucleicos, una mayor cantidad en un tiempo relativamente corto. Un inconveniente principal de estas técnicas reside en la amplificación de ácidos nucleicos indeseables, produciendo unos resultados erróneos, incluso unos falsos positivos en unos ensayos clínicos. Es lo que se denomina contaminación.

15 Esta contaminación puede provenir de varias fuentes: mesas de laboratorio mal limpiadas, el personal, el entorno, equipamientos y dispositivos de pipeteo, muestras no estériles.

Se ha establecido un cierto número de recomendaciones que pretenden limitar estas contaminaciones. Se trata de métodos preventivos que se refieren, por ejemplo, a la manipulación de las muestras (técnicas de esterilización, en particular) o también a los equipos de laboratorio (zonas de trabajo físicamente delimitadas, utilización de campanas de extracción, gradiente de presión entre el exterior y el interior, a fin de que el flujo permita siempre la evacuación en la dirección deseada, etc.).

20

La contaminación puede también provenir de los amplicones procedentes de amplificaciones anteriores o de una contaminación cruzada entre muestras.

25

Otra fuente no desdeñable de contaminación reside en la materia prima (enzimas, reactivos) utilizada en la reacción de amplificación. Así, Corless *et al.* exponen las consecuencias de la contaminación de la *taq* polimerasa sobre la sensibilidad de la PCR en tiempo real para la detección del ARN 16S (J. Clin. Microbiol., 38(5), 1747-1752 (2000)).

30

Una primera forma de remediar la contaminación de las enzimas necesarias para la amplificación, consiste en unos métodos de descontaminación enzimática.

Así, la patente US-A-5,418,149 describe un método que utiliza la uracil-ADN-glicosilasa, que permite degradar los ácidos nucleicos que provienen de la célula productora de la enzima. Esta técnica utiliza la sobreexpresión de una proteína deseada, en este caso una polimerasa, en unas células de *E. coli* deficientes en uracil-ADN-glicosilasa (UNG) y una desoxiuridina trifosfatasa (dUTPasa). Gracias a la deficiencia en UNG, la célula no elimina las bases desoxiuracilo incorporadas. Por la deficiencia en dUTPasa, la célula aumenta su pool de desoxiuridina. Así, el medio de cultivo permite la producción de la proteína deseada (polimerasa) y la incorporación de desoxiuridina en los ácidos nucleicos. Las proteínas sintetizadas son entonces purificadas mediante técnicas estándar de purificación y mediante un tratamiento por uracil-ADN-glicosilasa, que fragmenta el residuo uracilo de los ácidos nucleicos residuales. La glicosilasa se inactiva después por calor a fin de evitar la destrucción del ADN diana durante una reacción de amplificación.

35

40

Siendo este método específico de la producción de proteínas recombinantes, su principal inconveniente se debe a su utilización. Además, la descontaminación está limitada a los ácidos nucleicos que contienen uracilo. Finalmente, otro inconveniente eventual es que el tratamiento por calor induce sólo una inactivación parcial de la uracil-ADN-glicosilasa. El ADN diana puesto en contacto con la proteína puede entonces eventualmente ser destruido.

45

Otro método enzimático descrito por Ashkenas *et al.* (Biotechniques; julio de 2005; 39(1):69-73), consiste en descontaminar una solución que contiene el conjunto de los elementos necesarios para una amplificación. Se trata aquí de un cóctel de enzimas de restricción utilizado en el ámbito de una RT-PCR. Estas enzimas degradan el ADN bicatenario presente en el medio de reacción de amplificación que contiene el ARN diana a amplificar. Después, se inactivan por calor cuando se produce la transcripción inversa. Una alternativa a este método para una aplicación PCR, por lo tanto en presencia de ADN diana bicatenario, es asimismo descrita pero está limitada a la utilización de un solo tipo de enzima de restricción (tipo IIS RE). Sin embargo, la utilización de enzimas de restricción presenta el inconveniente de escindir sólo unos ácidos nucleicos bicatenarios que además deben presentar el sitio de reconocimiento. De este modo, los contaminantes en forma monocatenaria y/o que presentan pocos o ninguno de tales sitios no son entonces eliminados.

50

55

Otros métodos enzimáticos de descontaminación consisten, en sí mismos, en eliminar los ácidos nucleicos indeseables de una solución antes de la puesta en contacto con los ácidos nucleicos dianas. La solicitud de patente WO-A-99/07887 describe la utilización de una ADNasa termolábil que permite degradar los ácidos nucleicos bicatenarios contenidos en el medio de reacción antes de la puesta en contacto con los ácidos nucleicos dianas. La enzima se inactiva después por calor.

60

65

El inconveniente principal de esta técnica es que esta enzima no permite la degradación de contaminantes en forma

de ARN, de ADN monocatenario o de heterodúplex ARN/ADN. Además, la inactivación de esta enzima por calor en el medio de reacción necesita la utilización de polimerasas termoestables.

La técnica anterior tiene en cuenta también unos métodos no enzimáticos.

5 Así, Mohammadi *et al.* (J. Clin. Microbiol. Oct. de 2003; 41(10):4796-8) describe una técnica que consiste en la filtración sobre columnas de los reactivos de extracción y, eventualmente, de la digestión por una enzima de restricción, Sau3AI, de los reactivos de la PCR antes de la amplificación. El inconveniente de las técnicas de filtración reside en el hecho de que estas técnicas no se pueden aplicar a medios complejos sin cambiar la
10 concentración ni las propiedades. Además, esta etapa suplementaria de filtración puede ser, en sí misma, fuente de contaminación.

15 La solicitud de patente WO-A-94/12515 describe un método de tratamiento por un compuesto fotorreactivo de una solución que contiene la *Taq* polimerasa y potencialmente unos ácidos nucleicos contaminantes. Este compuesto fotorreactivo, por ejemplo un derivado furocumarina, es activado por una exposición a la radiación ultravioleta. Un inconveniente principal de esta técnica, además de sus dificultades de utilización, es el efecto perjudicial de las radiaciones sobre las proteínas. Además, este método sigue siendo poco eficaz debido a la degradación aleatoria de dichos ácidos nucleicos, y puede generar unos fragmentos también amplificables.

20 Otro método no enzimático descrito por Chang *et al.*, (RNA. mayo de 2005; 11(5):831-6) utiliza un complejo de cobalto para la inhibición de la traducción. Este complejo permite la hidrólisis de los enlaces fosfatodiesteres del ADN y del ARN.

25 Los inconvenientes principales de esta técnica son la degradación incompleta de los ácidos nucleicos y la lentitud de la reacción de descontaminación (24 horas).

También se han descrito unos complejos metálicos en la solicitud de patente WO-A-2006/034009 a fin de purificar unas moléculas biológicas contaminadas por unos ácidos nucleicos. Así, un complejo de fragmentación constituido de dos moléculas de fenantrolina asociadas a un átomo de cobre (bis(1,10-fenantrolina)/Cu) es utilizado para purificar una solución que contiene la *taq* polimerasa. Esta solución es después purificada por unas técnicas estándar de cromatografía a fin de eliminar los ácidos nucleicos contaminantes y/o las moléculas de fragmentación.

35 El principal inconveniente de este método es la presencia de una etapa de purificación, que hace difícil su realización y que aumenta el riesgo de nuevas contaminaciones.

40 La patente EP-B-0.646.180 describe un procedimiento que permite inactivar unas secuencias de nucleótidos por unos quelatos metálicos. Un complejo de fragmentación tal como el bi(1,10-fenantrolina)/Cu se utiliza para descontaminar las soluciones, después de la etapa de amplificación, de todos los ácidos nucleicos presentes. Esto permite evitar la contaminación de nuevas muestras por unos amplicones procedentes de una reacción de amplificación anterior. Este documento describe también la utilización de una molécula de fragmentación para descontaminar unas preparaciones de productos biológicos.

45 En el caso de la primera utilización, un principal inconveniente de este método es que no permite la degradación de todos los ácidos nucleicos contaminantes, sino sólo de los amplicones procedentes de una reacción de amplificación anterior. En el segundo caso, el principal inconveniente es la presencia de una etapa de purificación (ultrafiltración, precipitación, cromatografía) que hace difícil su utilización y que aumenta el riesgo de nuevas contaminaciones.

50 Debido a los inconvenientes de la técnica anterior, los inventores proponen un nuevo método simple y rápido de descontaminación de una solución de ácidos nucleicos indeseables.

La presente divulgación se refiere a un método de descontaminación de una solución de cualquier ácido nucleico presente en esta solución que comprende las etapas siguientes:

55 - someter, durante un tiempo suficiente, la solución a la acción de al menos un tipo de molécula que tiene la propiedad de degradar los ácidos nucleicos por fragmentación, denominada molécula de fragmentación, y esto hasta la degradación total de dichos ácidos nucleicos, denominados ácidos nucleicos contaminantes, y

- detener la actividad de la molécula de fragmentación.

60 La invención se refiere a un método de descontaminación de una solución de cualquier ácido nucleico presente en esta solución, que comprende las etapas siguientes:

65 - someter, durante un tiempo suficiente, la solución a la acción de al menos una molécula de fragmentación, formada por un complejo constituido de dos moléculas de 1,10-fenantrolina asociadas a un átomo metálico que forma el complejo bis(1,10-fenantrolina)/metal, en presencia de reductor orgánico, hasta la degradación total de dichos ácidos nucleicos, y

- detener la actividad de la molécula de fragmentación mediante la adición:

* de un exceso de reductor orgánico, o

* de un agente complejante, tal como el EDTA.

Una de las ventajas de la presente invención es que este método de descontaminación no necesita ninguna etapa de purificación para eliminar las moléculas de fragmentación.

Los ácidos nucleicos tratados son el ARN o el ADN, que se presentan en forma mono o bicatenaria, así como los heterodúplex ARN/ADN.

Este método es particularmente útil en la descontaminación de materias primas tales como, por ejemplo, las enzimas procedentes de fuentes naturales, como las bacterias. Estas enzimas son entonces fuertemente contaminadas por los ácidos nucleicos naturales procedentes de estas bacterias.

Otro objeto es un método de descontaminación de una solución, que contiene unos ácidos nucleicos contaminantes y unos ácidos nucleicos de interés, y que comprende las mismas etapas vistas anteriormente, a saber:

- someter, durante un tiempo suficiente, la solución a la acción de al menos un tipo de molécula que tiene la propiedad de degradar los ácidos nucleicos por fragmentación, denominada molécula de fragmentación, y esto hasta la degradación total de dichos ácidos nucleicos, conservando al mismo tiempo los ácidos nucleicos de interés,

- detener la actividad de la molécula de fragmentación.

Los ácidos nucleicos contaminantes pueden ser ADN genómico humano y los ácidos nucleicos de interés pueden ser unos ácidos nucleicos virales o bacterianos presentes en la mezcla en cantidad muy pequeña. Estos ácidos nucleicos de interés pueden estar protegidos de la acción de la molécula de fragmentación. Pueden, por ejemplo, estar naturalmente protegidos por una envoltura exterior (cápside, pared bacteriana, etc.) mientras que los ácidos nucleicos contaminantes no lo están.

La invención tiene por objeto un método de descontaminación de una solución, que contiene unos ácidos nucleicos contaminantes y unos ácidos nucleicos de interés que comprenden las etapas siguientes:

- someter, durante un tiempo suficiente, la solución con la acción de al menos una molécula de fragmentación formada por un complejo constituido de dos moléculas de 1,10-fenantrolina asociadas a un átomo metálico que forma el complejo bis(1,10-fenantrolina)/metal, en presencia de reductor orgánico, y esto hasta la degradación de dichos ácidos nucleicos contaminantes, conservando al mismo tiempo los ácidos nucleicos de interés que están protegidos de la acción de la molécula de fragmentación por una envoltura exterior, y

- detener la actividad de la molécula de fragmentación por adición:

* de un exceso de reductor orgánico, o

* de un agente complejante, tal como EDTA.

En un modo ventajoso de realización de la invención, el método comprende, después de la detención de la actividad de la molécula de fragmentación, una etapa suplementaria que consiste en una reacción de amplificación.

Preferiblemente, el método de descontaminación según la invención se caracteriza por que la molécula de fragmentación utilizada tiene la propiedad de hidrolizar de manera aleatoria los enlaces fosfatodiestéres de los ácidos nucleicos contaminantes.

Según un modo de realización, la molécula de fragmentación es un complejo constituido de dos moléculas de 1,10-fenantrolina asociadas a un átomo metálico que forma el complejo bis-(1,10-fenantrolina)/metal. Preferiblemente, el metal es un metal de transición tal como el cobre, el rutenio, el níquel, el hierro, el zinc, el rodio, el cobalto o el manganeso.

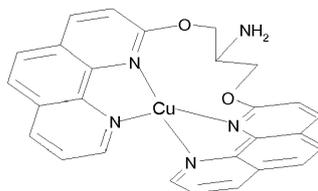
De manera ventajosa, los dos núcleos fenantrolina de la molécula de fragmentación están unidos el uno al otro mediante unos miembros de unión para formar una molécula clipPhen.

Las moléculas ClipPhen se han descrito ampliamente en la bibliografía. Los miembros de unión que unen los dos núcleos fenantrolina son variados. De manera ventajosa, el miembro de unión entre los dos núcleos fenantrolina está constituido por una cadena de tres átomos de carbono sucesivos, cuyo átomo de carbono en la posición central está sustituido y del que cada átomo de carbono terminal está unido a un núcleo fenantrolina por un átomo de

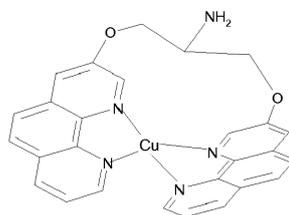
oxígeno, tal como el serinol. Preferiblemente, el átomo de carbono en la posición central está sustituido por NH₂ o NH-CO-CH₃, y cada átomo de carbono terminal está unido a un núcleo fenantrolina por un átomo de oxígeno en la posición 2 o 3 de dicho núcleo.

- 5 Son posibles otros numerosos miembros, como por ejemplo un diamino-ciclohexano (Chemistry letters, Vol 33, n°6, p 684-985, Hayashi *et al*), o también un etanodiol, un propanodiol, o un pentanodiol (Synlett 2001, n°10, 1629-1631, Boldron *et al*).

10 La actividad de fragmentación de la molécula ClipPhen asociada a un metal es también conocida por el experto en la materia (Chemical Review, 1993, 93, 2295-2316. D. Sigman *et al.* ; J. Chem. Soc. 1961, 2007-2019 James *et al.*). Esta molécula ha sido objeto de numerosos trabajos con el objetivo de mejorar sus propiedades de hidrólisis. Presenta la ventaja degradar todos los ácidos nucleicos, es decir el ADN y el ARN en forma mono o bicatenaria, así como los heterodúplex ARN/ADN. Así, la 2-ClipPhen/metal (1,3-bis(1,10-fenantrolin-2-iloxi)propan-2-amina)/metal y la 3-ClipPhen/metal (1,3-bis(1,10-fenantrolin-3-iloxi)propan-2-amina)/metal han mostrado una actividad nucleásica
15 ampliamente aumentada con respecto al complejo bis-(1,10-fenantrolina)/metal (Inorganic Chemistry 1998, 3486-3489, Pitié *et al.*; Chem. Commun. 1998, 2597-2598, Pitié *et al.*; Eur. J. Inorg. Chem. 2003, 528-540, Pitié *et al.* y Bioconjugate Chemistry 2000, 11, 892-900 Pitié M. *et al.*). Asimismo, una molécula ClipPhen complejada con cobre tiene la propiedad de hidrolizar muy eficazmente y de manera aleatoria los enlaces fosfatodiesteres del ADN o del ARN. Puede complejarse con un átomo de cobre para dar unos complejos de estado de oxidación I o II, tales como
20 se muestran en la publicación J. Chem. Soc. 1961, 2007-2019 James *et al.* Las moléculas 2-ClipPhen-Cu y 3-ClipPhen-Cu se representan a continuación:



2-ClipPhen-Cu



3-ClipPhen-Cu

25 Así, la presente divulgación tiene también como objeto un método de descontaminación de una solución de cualquier ácido nucleico presente en esta solución, que consiste en someter, durante un tiempo suficiente, la solución a la acción de la molécula ClipPhen/metal, y esto hasta la degradación total de los ácidos nucleicos contaminantes.

30 Otro objeto de la presente divulgación consiste en un método de descontaminación de una solución, que contiene unos ácidos nucleicos contaminantes y unos ácidos nucleicos de interés, que consiste en someter, durante un tiempo suficiente, la solución a la acción de la molécula ClipPhen/metal, y esto hasta la degradación de dichos ácidos nucleicos contaminantes, conservando al mismo tiempo los ácidos nucleicos de interés.

35 Según un modo de realización de la presente invención, la actividad de fragmentación de la molécula de fragmentación se detiene mediante la adición de un exceso de reductor orgánico. Cuando el reductor orgánico está constituido por un tiol, la relación entre la molécula de fragmentación y el reductor orgánico que detiene la reacción es superior a 1 por 100, y preferiblemente superior a 1 por 1000.

40 Una ventaja de este modo de realización es que las moléculas de fragmentación son inactivadas *in situ*. Estas moléculas no necesitan entonces ser retiradas de la solución. Esta última podrá ser utilizada, tal cual, en diversas aplicaciones, como por ejemplo una amplificación.

45 Así, en función de la concentración del reductor orgánico presente, las moléculas de fragmentación pueden ser activadas o desactivadas.

Según otro modo de realización de la presente invención, la actividad de fragmentación de la molécula de fragmentación se detiene por adición de un agente complejante (AC) como por ejemplo EDTA, o cualquier otro complejante que posea más afinidad para el metal que la ClipPhen y que permita un desplazamiento del equilibrio:



En un modo de realización particular de la presente invención, la molécula de fragmentación es un complejo cuproso de tipo I asociado a un peróxido de hidrógeno H_2O_2 y, eventualmente, a otro reductor preferiblemente orgánico. Preferentemente, la molécula de fragmentación es una molécula ClipPhen/CuI.

- 10 En el caso de un complejo cuproso de tipo I, la actividad nucleásica procede en dos tiempos:
- a) el complejo cuproso cargado positivamente se compleja con el ácido nucleico,
- 15 b) el ácido nucleico es oxidado por formación de un intermedio Cu-oxo o Cu-OH, con H_2O_2 que lleva, después de una serie de reacciones, a la escisión del ácido nucleico.

Según otro modo de realización, la molécula es un complejo cúprico de tipo II asociado a otro reductor preferiblemente orgánico. En este caso, el peróxido de hidrógeno es generado *in situ* bajo la acción del aire y del reductor. Preferentemente entonces, la molécula de fragmentación es una molécula ClipPhen/CuII.

20 Cuando el otro reductor orgánico es un ácido carboxílico o un derivado de tal ácido, la relación entre la molécula de fragmentación y el reductor orgánico está comprendida entre 1 por 1 y 1 por 100.

25 Según los modos de realización anteriores, el reductor orgánico está constituido por:

* un tiol, tal como el di-tiotreitól (DTT), un tioácido, tal como el ácido mercapto-propiónico, o

* un ácido carboxílico, o

30 * un derivado de un ácido carboxílico tal como el ascorbato, o

* una fosfina como la tri-carboxi-etil-fosfina (TCEP).

35 En un modo de realización particular, la molécula de fragmentación y/o el reductor es inmovilizada en un soporte sólido. Este soporte sólido puede ser una partícula de látex (eventualmente magnética), de vidrio (CPG), de sílice, de poliestireno, de agarosa, de sefarosa, de nylon, etc. Puede tratarse también de un filtro, de una membrana o de una banda o de una película.

40 La actividad de fragmentación de la molécula de fragmentación puede asimismo ser detenida cuando el soporte sólido sobre el cual está fijada la molécula de fragmentación y/o el reductor es retirado de la solución.

45 La molécula de fragmentación puede ser fijada por enlace covalente o por adsorción sobre los soportes considerados. Existen numerosas referencias que se refieren a los reactivos soportados, se podrá referir en particular a Laurent *et al.*, Tetrahedron Letters 45, 8883-8887, 2004.

Otra ventaja de la presente invención con respecto a la técnica anterior es la rapidez de la reacción sufrida por los ácidos nucleicos. La duración del tratamiento está comprendida entre 5 y 60 minutos, preferiblemente entre 10 y 30 minutos para unas concentraciones en moléculas ClipPhen/metal comprendidas entre 1 nM y 100 μM .

50 En un modo preferido de la invención, la solución contiene todos los constituyentes necesarios para una reacción de amplificación, con la excepción de los ácidos nucleicos, es decir las dianas, los cebadores de amplificación y las sondas de detección.

55 Otro objeto de la presente invención es la utilización de una solución tratada según la presente invención, siendo la solución mezclada con una muestra biológica que contiene unos ácidos nucleicos dianas, que se desea amplificar, pero también los cebadores de amplificación y las sondas de detección específicas de los ácidos nucleicos dianas en presencia del reductor orgánico, creando así un exceso de reductor orgánico, lo que detiene la acción de las moléculas de fragmentación.

60 El reductor orgánico que detiene la acción de las moléculas de fragmentación puede ser idéntico o diferente del otro reductor orgánico añadido previamente para activar la reacción nucleásica de la molécula de fragmentación.

Definiciones

65 El término "ácido nucleico" significa una concatenación de al menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos.

El ácido nucleico puede ser natural o sintético, un oligonucleótido, un polinucleótido, un fragmento de ácido nucleico, un ADN genómico, un ARN ribosómico, un ARN mensajero, un ARN de transferencia, un ácido nucleico obtenido mediante una técnica de amplificación enzimática, tal como:

5 * PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa), descrita en las patentes US-A-4,683,195, US-A-4,683,202 y US-A-4,800,159, y su derivada RT-PCR (Trascrición reversa de PCR), en particular en un formato de una etapa, tal como se describe en la patente EP-B-0.569.272,

10 * LCR (Reacción en Cadena de Ligasa), expuesta por ejemplo en la solicitud de patente EP-A-0.201.184,

* RCR (Reacción en Cadena de reparación), descrita en la solicitud de patente WO-A-90/01069,

15 * 3SR (Replicación de la secuencia autosostenida) con la solicitud de patente WO-A-90/06995,

* NASBA (Amplificación de la Secuencia basada en ácido nucleico) con la solicitud de patente WO-A-91/02818, y

* TMA (Amplificación Mediada por Transcripción) con la patente US-A-5,399,491.

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

Mediante "cualquier ácido nucleico" se entienden las secuencias de ARN, de ADN, en forma mono o bicatenaria, así como los heterodúplex ARN/ADN.

25 Se entiende por "detener la actividad de la molécula de fragmentación" el hecho:

- de añadir un exceso de reductor orgánico, o

30 - añadir un agente complejante.

El término "degradación" significa la degradación o la fragmentación de al menos el 90% de los ácidos nucleicos contaminantes. Preferentemente, la degradación es denominada "total", lo que significa que la degradación de ADN o de ARN, preferiblemente por una hidrólisis de los enlaces fosfatodiestéres, conlleva la formación de secuencias de ácidos nucleicos "no amplificables".

35 Se entiende por ácidos nucleicos "no amplificables" unos ácidos nucleicos que, en presencia de cebadores, cuyo tamaño es preferiblemente al menos de 10 nucleótidos, no se puede amplificar. El tamaño de estos ácidos nucleicos "no amplificables" es por lo tanto inferior a 20 nucleótidos, preferiblemente inferior a 10 nucleótidos.

40 El término "solución" significa una solución acuosa homogénea o heterogénea. Puede tratarse de una solución compleja que contiene unas enzimas, unas moléculas orgánicas (nucleósidos trifosfatos, azúcares, sacáridos, polisacáridos, pequeñas moléculas orgánicas, etc.), unas moléculas inorgánicas (sales, etc.) y esto mezclado o no. La solución puede igualmente contener un soporte sólido, tal como unas partículas que pueden ser de látex eventualmente magnético, de vidrio (CPG), de sílice, de poliestireno, de agarosa, de sefarosa, de nylon, etc. Puede tratarse también de un filtro, de una película, de una membrana o de una banda.

45 La solución puede también estar constituida por una solución en contacto con una superficie sólida, tal como un tubo de plástico (del tipo Eppendorf), que permite así la descontaminación de esta superficie.

50 Las figuras y los ejemplos adjuntos representan unos modos particulares de realización y no pueden considerarse como limitantes del alcance de la presente invención.

El alcance de la invención está limitado por las reivindicaciones 1 a 21.

55 Figura 1: Estudio con Bioanalizador (Agilent, Kit RNA 6000 Pico, USA) de la degradación de un transcrito de 1080 bases (*Salmonella* de tipo salvaje) sometida a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/Ascorbato durante 1 hora a 37°C. La banda sombreada situada a 31 segundos en las columnas 2, 3, 4, 6 y 7 corresponde al transcrito de 1080 bases.

60 - columna 1: escala de tamaño de nucleótidos. Inyección de una gama de ARN de tamaño creciente, que permite la cuantificación y el cálculo del tamaño de los ácidos nucleicos analizados, en función del momento en el que pasan por delante del detector del Bioanalizador. La unidad de medición sobre el eje vertical es el segundo. La conversión entre el tiempo de paso y la masa de los ácidos nucleicos se lleva a cabo por el programa de BioAnalizador.

65 - columna 2: transcrito 5 nM (nanomolar) en presencia de 5 µM (micromolar) ClipPhen-Cu.

- columna 3: transcrito 5 nM en presencia de 500 nM ClipPhen-Cu.

- columna 4: transcrito 5 nM en presencia de 50 nM ClipPhen-Cu.

5 - columna 5: igual que la columna 2 con adición de 500 μ M de ascorbato.

- columna 6: igual que la columna 3 con adición de 50 μ M de ascorbato.

- columna 7: igual que la columna 4 con adición de 5 μ M de ascorbato

10 Figura 2: Inhibición de la fragmentación de los ácidos nucleicos por aumento de la concentración de DTT (de 0 a 16 mM).

15 La curva A corresponde a 0 mM de DTT.

La curva B corresponde a 1 mM de DTT.

La curva C corresponde a 3 mM de DTT.

20 La curva D corresponde a 5 mM de DTT.

La curva E corresponde a 10 mM de DTT.

La curva F corresponde a 16 mM de DTT.

25 La curva G corresponde al control: 0 mM de DTT y 0 mM de ascorbato.

Figura 3: velocidad de fragmentación del oligonucleótido fluorígeno modelo en función de la concentración de DTT en la mezcla (en unidad de fluorescencia relativa (RFU) por minuto).

30 Figura 4: Efecto de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato sobre una solución acuosa que contiene unos ácidos nucleicos (100 equivalentes célula/ μ l de ARN totales de *B. Cereus*).

35 La curva A corresponde al control de amplificación que no ha sufrido ningún tratamiento (control +).

La curva B corresponde a la mezcla 50 μ M de ClipPhen-Cu/500 μ M de ascorbato cuya actividad es inmediatamente inhibida por adición de 17 mM de DTT y que es incubado durante 30 minutos.

40 La curva C corresponde a la mezcla 50 μ M de ClipPhen-Cu/500 μ M de ascorbato incubado durante 30 minutos con detención de la fragmentación con DTT al final de este tiempo.

Figura 5: Comparación de la fragmentación del ADN o del ARN monocatenario por la ClipPhen-Cu (con o sin ascorbato). Curvas normalizadas a 1.

45 Curva a: Oligonucleótido fluorígeno (ADN) n° 16025 sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato.

Curva b: Oligonucleótido fluorígeno (ARN) n° 16027 sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato.

50 Curva c: Control negativo del experimento a: Oligonucleótido fluorígeno (ADN) n° 16025 sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu solo.

Curva d: Control negativo del experimento b: Oligonucleótido fluorígeno (ARN) n° 16027 sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu solo.

55 Figura 6: Comparación de la fragmentación de ADN mono o bicatenario por la mezcla ClipPhen-Cu (con o sin ascorbato). Las curvas representan una velocidad de fragmentación que corresponde a un aumento de la fluorescencia por minuto (RFU/min).

60 Curva a: Dúplex oligonucleótido fluorígeno (ADN) n° 16025 /diana complementaria ADN (n° 16026) sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu (control negativo).

Curva b: Dúplex oligonucleótido fluorígeno (ADN) n° 16025 /diana complementaria ADN (n° 16026) sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato.

65 Curva c: Oligonucleótido fluorígeno (ADN) n° 16025 sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu (control negativo).

Curva d: Oligonucleótido fluorígeno (ADN) n° 16025 sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato.

5 Figura 7: comparación de la fragmentación de dúplex ADN o ARN o de un héterodúplex ARN/ADN por la ClipPhen-Cu (con o sin ascorbato). Curvas normalizadas a 1.

Curva a: Dúplex oligonucleótido fluorígeno (ADN) n° 16025 /diana complementaria ADN (n° 16026) sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu (control negativo).

10 Curva b: Dúplex oligonucleótido fluorígeno (ARN) n° 16027 /diana complementaria ARN (n° 16028) sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu (control negativo).

15 Curva c: Dúplex oligonucleótido fluorígeno (ADN) n° 16025 /diana complementaria ADN (n° 16026) sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato.

Curva d: Dúplex oligonucleótido fluorígeno (ARN) n° 16027 /diana complementaria ARN (n° 16028) sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato.

20 Curva e: Heterodúplex oligonucleótido fluorígeno (ARN) n° 16027 /diana complementaria ADN (n° 16026) sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu (control negativo).

Curva f: Heterodúplex oligonucleótido fluorígeno (ARN) n° 16027 /diana complementaria ADN (n° 16026) sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato.

25 Figura 8: Observación con Bioanalizador (Agilent) de la escisión del ARN 16s (13 ng/μl) por la ClipPhen-Cu inmovilizada sobre una bola TentaGel en presencia de 5mM de ascorbato.

Electroforegrama A: Diana ARN antes de la degradación en agua;

30 Electroforegrama B: Diana ARN antes de la degradación en presencia de ascorbato;

Electroforegrama C: Diana ARN degradada en presencia de ascorbato y de la ClipPhen-Cu inmovilizada sobre resina Tentagel (1 bola de Tentagel, 30 min.);

35 Ejemplo 1: hidrólisis de un transcrito por la molécula ClipPhen-Cu y efecto iniciador del ascorbato

Objetivo:

40 Este ejemplo demuestra la acción de fragmentación de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato sobre un ácido nucleico modelo (Transcrito ARN salmonela: 1080 bases). Demuestra también el efecto del ascorbato sobre la iniciación de la reacción de fragmentación. El transcrito está sometido a la acción de diferentes concentraciones de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato. El control está sometido también a la acción de la ClipPhen-Cu pero en ausencia de ascorbato.

45 Los fragmentos son después analizados con la ayuda del Bioanalizador de Agilent (figura 1).

Modo de realización:

50 Una solución de transcrito (Salmonela salvaje 1080 bases) está constituida a partir de 2 μl de transcrito en 1 μM de agua y de 18 μl de tampón fosfato 80 mM (milimolar) pH 7,2, MgCl₂ 20 mM, NaCl 100 mM. Esta solución es llevada a 70°C durante 2 minutos y después colocada en hielo.

55 Se extraen entonces 5 μl de esta solución a la que se añade 1 μl de ClipPhen-Cu (500, 50 y 5 μM) y 4 μl del tampón utilizado anteriormente. Se obtiene la solución 2 que se deja durante 1h a 37°C.

Se coge entonces 5 μl de la solución 2 y se añaden 42,5 μl de tampón y 2,5 μl de una solución de ascorbato recién preparada (100 eq. con respecto a la [ClipPhen-Cu]) o de agua en el caso de los controles.

60 Así, se queda con una serie de tubos que comprenden respectivamente 5 nM de transcrito, (5 μM, 500 nM y 50 nM) de ClipPhen-Cu y (500, 50 y 5 μM) de ascorbato o de agua para los controles.

Se inyectan inmediatamente 1 μl de las 6 soluciones sobre chip de ARN 6000 Pico (Kit comercial referenciado 5067-1512, Agilent, USA), utilizado sobre el sistema del BioAnalizador de Agilent ,USA) para observar los productos de fragmentación.

65 Resultados y conclusiones:

5 Se observa el efecto de la fragmentación sobre el transcrito, columnas 5 a 7, por la aparición de bandas de diferentes tamaños e inferiores a 20 nucleótidos (flecha en el lado derecho a nivel de 20 segundos). Así, el transcrito que ha sufrido el tratamiento por la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato es parcialmente degradado o totalmente degradado en función de la concentración de ClipPhen-Cu. Entre 5 μM y 0,5 μM , se observa la desaparición de la banda inicial. El tiempo de reacción que permite obtener una degradación total de todos los amplicones es del orden de 30-60 minutos con 5 nM de transcrito, 5 μM de ClipPhen-Cu y 500 μM de ascorbato. La cantidad de ClipPhen-Cu para la degradación total del transcrito es del orden del micromolar (columna 5).

10 Por el contrario, el mismo experimento efectuado sin ascorbato (columna 2) muestra claramente una banda intacta.

Se demuestra así que la mezcla ClipPhen-Cu no tiene ninguna actividad cuando el ascorbato no es añadido (exceso del orden de 1-100 equivalentes).

15 Ejemplo 2: inhibición de la molécula ClipPhen-Cu por un reductor

Objetivo:

20 Este ejemplo pretende mostrar que la degradación de los ácidos nucleicos por la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato puede ser totalmente inhibida por la adición de un exceso de reductor como el DTT.

25 Un oligonucleótido fluorígeno modelo (Sec 16025 sintetizado por Eurogentec (Liège, Bélgica): 5' (6-FAM) TGT AAT GAT GAG GGT GTC ACT GCG GTT (TAMRA)) es sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato. Fragmentándose, deja aparecer la fluorescencia a 520 nm ya que el fluoróforo FAM se encuentra alejado físicamente del extintor de fluorescencia TAMRA. La aparición de fluorescencia se mide durante el tiempo con la ayuda de un fluorímetro (NucliSens EasyQ Analyser, Nasba Diagnostic, bioMérieux, Boxtel (NL)). El experimento se efectúa con unas concentraciones crecientes de DTT para una concentración fija de ClipPhen-Cu/ascorbato a fin de medir la inhibición aportada por el DTT por atenuación de la fluorescencia emitida.

30 Modo de realización:

Se pone a incubar una serie de tubos que contienen los elementos siguientes a 37°C durante 5 minutos:

- 35 - el oligonucleótido fluorígeno 16025 a 10 nM (1 μl a 200 nM),
- el DTT (1 μl a una concentración tal como para ser después de 1 a 16 mM en el volumen final), y
- 17 μl de tampón fosfato 80 mM pH 7,2, MgCl_2 20 mM, NaCl 100 mM.

40 Se añade entonces 1 μl de una mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato preparado de la siguiente manera: 200 μM ClipPhen y 200 μM de CuCl_2 en DMF/agua 50/50 y ascorbato 20 mM en agua preparado extemporáneamente (a partir de soluciones concentradas a 10 mM de ClipPhen-Cu y a 1 M de ascorbato).

45 Al final, los 20 μl de solución contienen: 10 nM de oligonucleótido fluorígeno, 10 μM de clip-phen + Cu^{2+} , 1 mM ascorbato y 0/1/3/5/10/16 mM de DTT.

50 Se realiza asimismo un control sin ascorbato y sin ClipPhen-Cu. Se comienza entonces la medición de la fluorescencia emitida durante 60 minutos (figura 2). Las condiciones son las siguientes: filtro exc/em (485/518 nm), intervalo de tiempo (1 min), tiempo de integración (100 minutos).

A partir de las curvas obtenidas, se mide la velocidad de la reacción de fragmentación en los 2 primeros minutos de la reacción y se traza el gráfico, figura 3, que representa la velocidad de fragmentación en función de la concentración en DTT.

55 Resultados y conclusiones:

60 Se constata que para unas concentraciones crecientes en DTT, la fluorescencia ya no aparece, y esto a partir de 10 mM (figuras 2 y 3). Lo que significa que la actividad de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato es totalmente detenida por exceso de reductor. Este experimento demuestra que la adición de 10-16 mM de DTT a la mezcla ácidos nucleicos/ClipPhen-Cu/ascorbato permite detener la reacción y hacer a esta mezcla compatible con una futura utilización en una reacción de amplificación.

Ejemplo 3: efecto descontaminante de la ClipPhen en una solución acuosa

65 Objetivo:

Descontaminación de una solución acuosa contaminada por una mezcla de ARN total de *B-Cereus* a una cantidad de 200 equivalentes célula/μl sometida a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato (50 μM/500 μM) durante 30 minutos. La actividad de la ClipPhen-Cu es después totalmente detenida por adición de DTT en una cantidad de 10 mM. Se efectúa entonces sobre esta mezcla una reacción de amplificación NASBA (Nuclisens Basic Kit V2 de bioMérieux, referenciado 60079136, Boxtel (NL)) para evaluar la eficacia de la fragmentación y mostrar la ausencia de ácidos nucleicos amplificables. No es necesario efectuar sobre esta mezcla una purificación previa a la amplificación. Se efectúa un control en el que la actividad de la ClipPhen-Cu es inhibida a partir de t0 a fin de medir el eventual efecto inhibitor de esta última. Para ello, se añade DTT en condiciones suficientes (10 mM) antes de añadir la diana ARN y se mantiene una incubación de 30 minutos.

Modo de realización:

Descontaminación por la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato de una solución acuosa enriquecida en ARN totales.

A una solución de ARN totales de ARN de *B. Cereus* (5 μl a 2000 equivalentes célula/μl en agua) se añaden 10 μl de ClipPhen-Cu (250 μM en agua/DMF 50/50), 20 μl de agua y 10 μl de ascorbato a 2,5 mM en agua.

Se incuba esta solución a descontaminar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Detención de la actividad de fragmentación de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato

Se añaden 5 μl de DTT a 173,7 mM (concentración final DTT: 17,3 mM) a la solución anterior para detener la reacción de hidrólisis y desactivar la ClipPhen. Se obtiene la solución A.

Control para demostrar que la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato/DTT no tiene actividad de fragmentación y no inhibe la NASBA si la actividad de fragmentación es inmediatamente detenida por adición de DTT.

Paralelamente, se realiza un experimento control en el que una solución de ARN total de ARN de *B. Cereus* (5 μl a 2000 equivalentes célula/μl en agua) se incuba en presencia de 5 μl de DTT a 173,7 mM, 10 μl de ClipPhen-Cu (250 μM en agua/DMF 50/50, 20 μl de agua y 10 μl de ascorbato a 2,5 mM en agua). Se incuba esta solución en la que la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato está inmediatamente inactivada durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Este experimento permite medir la eventual inhibición de la reacción de amplificación por la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato/DTT. Se trata de la solución B.

Amplificación de los ácidos nucleicos que quedan en la solución A después de la descontaminación y aún presente en la solución B.

Se extraen entonces 5 μl de las soluciones A o B a las que se añaden 10 μl de la mezcla "Reactif Mix: REAG" (de NucliSens EasyQ Basic Kit bioMérieux (referencia comercial 285006, Boxtel (NL))). Esta mezcla contiene los reactivos necesarios para la amplificación, los dos cebadores y la sonda necesaria para la detección de la amplificación. Esta solución contiene además suficiente DTT (6 mM) para impedir una reactivación de la ClipPhen. La concentración final de la mezcla es por lo tanto de 10 mM en DTT. Las soluciones se incuban durante 2 minutos a 65°C y después durante 2 minutos a 41°C.

Se añaden entonces a las soluciones anteriores 5 μl de la mezcla "Enzyme Mix: ENZ" de Basic Kit NucliSens bioMérieux a fin de comenzar la amplificación. El medio de reacción se mantiene durante 1h30 a 41°C en el fluorímetro "NucliSens EasyQ" de bioMérieux (NucliSens EasyQ Analyser, Nasba Diagnostic, bioMérieux, Boxtel (NL)). Las mediciones de fluorescencia se registran y se trazan las curvas (figura 4).

Resultados y conclusiones:

Se observa un ligero desplazamiento de la curva B que corresponde al control que ha sufrido la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato inmediatamente inhibida por adición de la solución de DTT. Este desplazamiento de la amplificación no cambia nada la sensibilidad del ensayo, ya que las pendientes al inicio de la amplificación son de la misma amplitud. Esto se debe a un aumento de la concentración en DTT con respecto al control positivo (curva A). Se muestra en este caso que la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato/DTT no tiene efecto sobre la NASBA y que las enzimas de esta reacción de amplificación no están afectadas por esta mezcla de compuestos. Además, se muestra también que el DTT permite la inhibición de la actividad de fragmentación de la ClipPhen-Cu puesto que no se señala ninguna actividad cuando se añade suficiente DTT.

La curva C muestra que si la actividad de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato es mantenida durante 30 minutos y después detenida por adición de DTT (17 mM), la fragmentación es tal que la curva de amplificación ya no se retrasa. Se demuestra aquí que se puede utilizar una mezcla compleja (ClipPhen-Cu/ascorbato) para degradar unos ácidos nucleicos, detener esta actividad por adición de un exceso de DTT y utilizar esta solución (sin purificación) para una amplificación enzimática ulterior. Esta técnica permite por lo tanto con una gran facilidad superar

problemas de contaminación por unos ácidos nucleicos.

Ejemplo 4: Fragmentación por la clipPhen-Cu de ácidos nucleicos distintos del ARN; aplicación con ADN monocatenario, ADN bicatenario a ARN bicatenario y un heterodúplex ARN/ADN

Objetivo:

Este ejemplo demuestra que la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato puede también degradar tanto el ARN como el ADN monocatenario como los dúplex o heteodúplex correspondientes.

Modo de realización:

Se preparan las soluciones indicadas en la tabla siguiente a partir de oligonucleótidos fluorígenos (sondas) y de dianas complementarias ordenadas en Aurogentec (Tabla 1).

Tabla 1: Secuencias utilizadas en el ejemplo 4.

Comentarios	Ref. ODN	Secuencia	Modificación 5'	Modificación 3'
ADN sonda fluorígena	16025	TGT AAT GAT GAG GGT GTC ACT GCG GTT	6-FAM	TAMRA
ARN sonda fluorígena	16027	UGU AAU GAU GAG GGU GUC ACU GCG GUU	6-FAM	TAMRA
ADN diana complementaria	16026	AAC CGC AGT GAC ACC CTC ATC ATT ACA	-	-
ARN diana complementaria	16028	AAC CGC AGU GAC ACC CUC AUC AUU ACA	-	-

Las soluciones madres de oligonucleótidos fluorígenos son de 200 nM en agua que se diluyen con 10 nM (1 µl) de 18 µl de tampón fosfato 80 mM, pH 7,2, MgCl₂ 20 mM, NaCl 100 mM. Según los casos, la diana complementaria es añadida a la misma concentración. Las soluciones son entonces desnaturalizadas y dejadas a 37°C durante una hora a fin de permitir la hibridación de las dos hebras. Se añade entonces una solución de ClipPhen-Cu (1 µl a 20 µM en agua/DMF, [ClipPhen-Cu final] = 1 µM), después una solución de ascorbato (1 µl a 2 mM en agua, [ascorbato final]= 100 µM), salvo en los controles, antes de empezar la medición de la fluorescencia con la ayuda del EasyQ (bioMérieux, véase el ejemplo 1) durante 120 minutos a 37°C. Estas mediciones se repiten cuatro veces, así como los experimentos control correspondientes que no contienen ascorbato. Sólo el valor medio se representa en las figuras 5, 6 y 7.

Tabla 2: Mezclas de oligonucleótidos utilizados en el ejemplo 4.

	Mezcla ODN	Molaridad (mM) en el tampón	Cliphen.Cu (µM)	Molaridad Ascorbato (mM)	
ADN sonda fluorígena	16025	10	1	0	100
ARN sonda fluorígena	16027	10	1	0	100
ADN/ADN	16025/16026	10/10	1	0	100
ARN/ARN	16027/16028	10/10	1	0	100
ARN/ADN	16027/16026	10/10	1	0	100

Resultados y conclusiones:

Se observa en la figura 5 el resultado de la medición de fluorescencia a lo largo del tiempo de un ADN fluorígeno monocatenario (16025, curva a) o ARN fluorígeno (16027, curva b) sometido a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato. Se observa en los dos casos un aumento de la fluorescencia muy claro en comparación de los controles (curvas c y d). Esta aparición de fluorescencia demuestra que el ADN está fragmentado tanto como el ARN y a una velocidad comparable durante los primeros instantes de la reacción.

La figura 6 muestra la fragmentación de un dúplex ADN/ADN. Durante la formación del dúplex ADN/ADN (curvas a y b) se observa que el nivel de fluorescencia está aumentado de un factor 6 con respecto al control monocatenario (curvas c o d). Este aumento no se debe a la Clip-Phen-Cu sino a la hibridación entre las 2 hebras. A partir del momento de la adición de ascorbato, se observa una disminución de fluorescencia de la curva b que se une al nivel de fluorescencia de la curva d correspondiente a la fluorescencia emitida por el monocatenario totalmente escindido. La modificación de la fluorescencia con respecto a los controles demuestra claramente que el ADN monocatenario y el ADN/ADN bicatenario son escindidos de manera absolutamente comparable.

Finalmente, se ha evaluado la diferencia de velocidad de fragmentación según que los ácidos nucleicos a fragmentar sean ADN o ARN bicatenario o un heterodúplex ARN/ADN (figura 7). Se observa en este caso, para los 3 controles y como en la figura 6, un aumento de fluorescencia a partir de la formación de los dúplex y después, durante la

fragmentación inducida por la adición de ascorbato, una disminución de la fluorescencia que se une al nivel de la fluorescencia de un monocatenario totalmente escindido.

5 En todos los casos y sea cual sea la naturaleza del híbrido, la fragmentación tiene lugar, demostrando que la mezcla ClipPhen-cu/ascorbato está perfectamente adaptada a la degradación de cualquier tipo de ácido nucleico.

Ejemplo 5: Efecto descontaminante de una molécula de fragmentación inmovilizada sobre soporte sólido

10 Objetivo: Inmovilizar la ClipPhen sobre un soporte sólido y demostrar el mantenimiento de su actividad después de la inmovilización sobre bolas de poliestireno Tentagel (referencia comercial MB 250 002, Rapp Polymers, Germany)

Modo de realización:

15 Colocar 61,5 mg de bolas Tentagel Macrobeads NH₂ (referencia comercial MB 250 002 Rapp Polymers, Germany) en una columna Snap Fit (ABI, USA) o una columna Handee Centrifuge (referencia 69705 Pierce, USA) es decir n = 16,6 μmol. Lavar las bolas con dimetilsulfóxido (DMSO) anhidro a fin de eliminar cualquier traza eventual de agua. Trasegar el DMSO. Pasar bajo un flujo de argón. Filtrar 14 μL de trietilamina (6 eq, 99 μmoles, ≈150 mM) en 600 μl de DMSO anhidro (1 min). Esta etapa permite garantizar que los grupos aminas están claramente en forma NH₂ y no NH₃⁺. Trasegar la solución de trietilamina. Filtrar 36,4mg de disuccinimidilsuberato (DSS) (6 eq, 99 μmoles, ≈250 mM, Pierce) en 400 μl de DMSO anhidro (10 min). Trasegar la solución que contiene el DSS en exceso.

Un ensayo con ninhidrina sobre algunas bolas extraídas en esta fase de la reacción permite garantizar que el conjunto de las funciones aminas ha reaccionado con el enlazador. Si este no es el caso, las bolas se tiñen de azul.

25 Filtrar durante 1h como mínimo (1h15-1h30) a temperatura ambiente una mezcla de reacción que contiene: la 3-ClipPhen (2,8 eq., 45 μmoles, 56 mM), 4-Dimetilaminopiridina (2,8 eq, 45 μmoles, 56 mM), 6,3 μl de trietilamina (2,8 eq, 45 μmoles, 56 mM) en 800 μl de DMSO.

30 Es posible extraer algunos μl de la mezcla de reacción antes y después de la reacción a fin de determinar el grado de funcionalización de las bolas por ensayo diferencial en UV a 328 nm. La mezcla de reacción tiene una coloración marrón que se debe a la 3-ClipPhen. Lavar con DMSO anhidro hasta la desaparición de esta coloración marrón de la solución de lavado.

35 Las bolas inicialmente amarillentas presentan un color amarillo ligeramente más oscuro después de la reacción. Añadir 5,9 μl de etanolamina (10 eq, 99 μmoles ≈ 130mM) en 800 μl de DMSO anhidro, a fin de inactivar todos los grupos NHS que no hayan reaccionado. Dejar actuar durante 10 minutos. Lavar las bolas 5 veces con 1 ml de DMSO, trasegar el DMSO. Volver a realizar la misma operación con acetonitrilo (a fin de poder secar las bolas). Pasar debajo de un flujo de argón y después evaporar con un evaporador rotativo.

40 Complejación con cobre

45 Filtrar durante 10 minutos 1 ml de solución de CuCl₂ 1M en DMSO/agua 50/50 (sobre 55 mg de bolas, es decir 145 equivalentes con respecto al grado de funcionalización). Lavar con DMSO y con agua hasta que la solución de lavado sea incolora (si la solución CuCl₂ inicial estuviese teñida) y después con acetonitrilo. Pasar bajo un flujo de argón. Secar con un evaporador rotativo.

Ensayo de escisión

50 El ensayo de escisión se realiza de la siguiente manera: la cantidad deseada de resina, entre 1 mg y una sola bola, es decir una cantidad de ClipPhen introducida de 125 nmoles/12,5 mM para la TentaGel, (es decir una cantidad de ClipPhen introducida de 1,25 à 2,5 nmoles/125 μM a 250 μM) se introduce en un tubo Eppendorf (capacidad máxima de 200 μl). El ARN diana (transcritos de ARN 16s de 1600 bases, concentración entre 6 y 70 ng/μl según los experimentos) se añade a la resina, así como el ascorbato, a la concentración deseada (5mM). Las muestras tienen un volumen total de 10 μl, el tampón utilizado es un tampón tris a pH=7,4, de concentración final de 20 mM.

55 Una sola bola de resina TentaGel basta para la observación de la escisión. Se realizan unas muestras control de "diana sola" (electroforegrama A figura 8), "diana en presencia de ascorbato" (electroforegrama B), "diana en presencia de resina" acoplada al complejo ClipPhen-cu. El control "diana en presencia de ascorbato" permite controlar que la cantidad de ascorbato utilizada no tenga efecto sobre la fluorescencia. Las muestras así preparadas se agitan durante 30 minutos a temperatura ambiente (1000 rpm) antes de ser depositado sobre chip Agilent RNA 6000 Nano ((Kit comercial referenciado como 5067-1512, Agilent, USA) según la diana utilizada. 1 μl de sobrenadante basta para el análisis sobre un Bioanalizador (Agilent, USA).

60 Resultados y conclusiones:

65 Los resultados obtenidos y representados en la figura 8 (electroforegrama C) muestran que existe efectivamente la

escisión de la diana considerada en media hora, únicamente en presencia de ascorbato, para una cantidad de resina mínima (1 sola bola para la TentaGel, es decir considerando que 1 mg de resina contiene entre 50 y 100 bolas, una cantidad de ClipPhen soportada comprendida entre 1,25 y 2,5 nmoles, es decir una concentración comprendida entre 125 y 250 µM). Esta escisión se observa muy fácilmente en el modelo de ARN, ya que los fragmentos generados son visibles en el electroforegrama (electroforegrama C).

Así, se demuestra que la ClipPhen inmovilizada está todavía activa y ha conservado sus propiedades de degradación de los ácidos nucleicos.

Ejemplo 6: Demostración de la descontaminación de una solución que contiene unos ácidos nucleicos contaminantes y unos ácidos nucleicos de interés

Objetivo: Eliminar los contaminantes “ADN celular genómico” que se encuentran en el sobrenadante de un cultivo viral sin degradar unos ácidos nucleicos virales presentes en cantidad más pequeña y protegidos por una cápside viral. Esto con el objetivo de disminuir las amplificaciones no específicas que se realizan a partir del ADN celular sin inhibir la amplificación específica de la diana de interés.

Para ello, se ensaya antes y después de la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato la concentración de ADN 18S genómico en el sobrenadante (kit comercial de ensayo Search LC + ADN genómico, Promega, ref. G3041, USA) para la realización de una gama de diluciones. Se ensaya en paralelo la concentración de ARN viral antes y después de la acción de mezclado ClipPhen-Cu/ascorbato, mediante PCR con unos cebadores específicos y un ensayo con Light Cycler .SybrGreen (Roche, USA).

Modo de realización:

Se ponen en cultivo unas células infectadas por un virus. En un experimento control, se ensaya en el sobrenadante el ADN genómico residual (18S) con el kit Search LC (Entrada B de la tabla siguiente). Se mide también con Light Cycler (Roche) la cantidad de ácidos nucleicos que corresponde al virus (técnica de amplificación con unos cebadores específicos) (Entrada B de la tabla siguiente).

En otro experimento (Entrada A de la tabla siguiente) se somete el sobrenadante a la acción de la mezcla ClipPhen-Cu/ascorbato (ClipPhen-Cu 100µM, Ascorbato 50 mM, 30 min, inactivación con DTT con 2,5 M final) durante 30 minutos, después se mide la cantidad de ADN genómico residual (18S) y la cantidad de ácidos nucleicos correspondiente al virus.

	Cuantificación 18S ADN genómico (ensayo LC Search)		Cuantificación ARN viral (Light Cycler)	Entrada	
		nº de ciclo	pg/µl		cp/cap
ClipPhen-Cu/Ascorbato	Sobrenadante + ClipPhen	19	2600	2500	A
	Sobrenadante - ClipPhen	14,8	> 26000	3000	B

Resultados y conclusiones:

Se constata que en el caso en el que se ha tratado el sobrenadante con el agente de escisión, la concentración en ADN genómico es 10 veces más baja (Entrada A) sin que la concentración en ácido nucleico viral esté afectada de manera consecuente.

Esta técnica permite por lo tanto aumentar la sensibilidad del ensayo de los ácidos nucleicos virales reduciendo al ruido de fondo de manera notable.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> bioMérieux

<120> Método de descontaminación de una solución de los ácidos nucleicos indeseables

<130> ClipPhen

<150> FR0754165

< 151> 30-03-2007

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

5 < 211> 27

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

< 223> sonda

10 <400> 1

tgtaatgatg aggtgtcac tgcggt 27

<210> 2

< 211> 27

< 212> ARN

15 < 213> Artificial

<220>

< 223> sonda

<400> 2

uguaaugaug agggugucac ugcgguu 27

20 <210> 3

< 211> 27

< 212> ADN

< 213> Artificial

<220>

25 < 223> diana

<400> 3

aaccgcagtg acaccctcat cattaca 27

<210> 4

< 211> 27

30 < 212> ARN

< 213> Artificial

<220>

< 223> diana

<400> 4

aaccgcagug acaccucau cauuaca

27

REIVINDICACIONES

1. Método de descontaminación de una solución de cualquier ácido nucleico presente en esta solución, que comprende las etapas siguientes:
- 5 - someter, durante un tiempo suficiente, la solución a la acción de al menos una molécula de fragmentación, formada por un complejo constituido por dos moléculas de 1,10-fenantrolina asociado a un átomo metálico que forma el complejo bis(1,10-enantrolina)/metal, en presencia de reductor orgánico, hasta la degradación total de dichos ácidos nucleicos, y
- 10 - detener de la actividad de la molécula de fragmentación mediante la adición:
- * de un exceso de reductor orgánico, o
- 15 * de un agente complejante, tal como EDTA.
2. Método de descontaminación de una solución, que contiene unos ácidos nucleicos contaminantes y unos ácidos nucleicos de interés que comprenden las etapas siguientes:
- 20 - someter, durante un tiempo suficiente, la solución a la acción de al menos una molécula de fragmentación formada por un complejo constituido de dos moléculas de 1,10-fenantrolina asociado a un átomo metálico que forma el complejo bis(1,10-fenantrolina)/metal, en presencia de reductor orgánico, y esto hasta la degradación de dichos ácidos nucleicos contaminantes conservando al mismo tiempo los ácidos nucleicos de interés que están naturalmente protegidos de la acción de la molécula de fragmentación por un revestimiento exterior, y
- 25 - detener la actividad de la molécula de fragmentación mediante una adición:
- * de un exceso de reductor orgánico, o
- 30 * de un agente complejante, tal como EDTA.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que el método comprende, después de la detención de la actividad de la molécula de fragmentación, una etapa suplementaria que consiste en una reacción de amplificación.
- 35 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el metal es un metal de transición tal como el cobre, el rutenio, el níquel, el hierro, el zinc, el rodio, el cobalto o el manganeso.
- 40 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que los dos núcleos fenantrolina de la molécula de fragmentación están unidos el uno al otro mediante un miembro para formar una molécula ClipPhen.
6. Método según la reivindicación 5, caracterizado por que el miembro de unión entre los dos núcleos fenantrolina está constituido por una cadena de tres átomos de carbono sucesivos, cuyo átomo de carbono en la posición central es sustituido y cuyo átomo de carbono terminal está unido a un núcleo fenantrolina por un átomo de oxígeno.
- 45 7. Método según la reivindicación 6, caracterizado por que el átomo de carbono en la posición central está sustituido por $-NH_2$ o $-NH-CO-CH_3$, y por que cada átomo de carbono terminal está unido a un núcleo fenantrolina por un átomo de oxígeno en la posición 2 o 3 de dicho núcleo.
- 50 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado por que la molécula CliPhen es una 3-ClipPhen ((1,3-bis(1,10-fenantrolin-3-iloxi)propan-2-amina).
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la molécula de fragmentación es un complejo cuproso de tipo I asociado a peróxido de hidrógeno H_2O_2 y, eventualmente, a otro reductor, preferiblemente orgánico.
- 55 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la molécula de fragmentación es un complejo cúprico de tipo II asociado, preferiblemente, a otro reductor orgánico.
- 60 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que el reductor tal como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, u otro reductor tal como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, es un reductor orgánico constituido por:
- * un tiol, tal como el di-tiotreitól (DTT), un tio-ácido, tal como el ácido mercapto-propiónico, o
- 65 * un ácido carboxílico, o

* un derivado de un ácido carboxílico tal como el ascorbato, o

* una fosfina como la tri-carboxi-etil-fosfina (TCEP), o

* una combinación de al menos dos de estos reductores orgánicos.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la molécula de fragmentación está inmovilizada sobre un soporte sólido.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que el reductor tal como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o el otro reductor tal como el definido en cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, está inmovilizado sobre un soporte sólido.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, caracterizado por que el soporte sólido es una partícula, una membrana, una banda, una película o un filtro.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, caracterizado por que la relación entre la molécula de fragmentación y el otro reductor orgánico, constituido por un ácido carboxílico o un derivado de tal ácido, está comprendida entre 1 por 1 y 1 por 100.

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la relación entre dicha molécula de fragmentación y el reductor, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, constituido por un tiol, es superior a 1 por 100, y preferiblemente superior a 1 por 1000.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado por que los ácidos nucleicos tratados son el ARN o el ADN, que se presenta en forma mono o bicatenaria, así como los heterodúplex ARN/ADN.

18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado por que la duración del tratamiento sufrido por los ácidos nucleicos tratados está comprendido entre 5 y 60 minutos, preferiblemente entre 10 y 30 minutos para unas concentraciones en ClipPhen/metal comprendidas entre 1 μM y 100 μM .

19. Utilización de una solución tratada por un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 18, para la amplificación de ácidos nucleicos diana, caracterizada por que la solución está mezclada con una muestra biológica que contiene dichos ácidos nucleicos diana, que se desean amplificar, pero también los cebadores de amplificación y las sondas de detección específicas de los ácidos nucleicos diana.

20. Utilización según la reivindicación 19, caracterizada por que el reductor orgánico, tal como el descrito en el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, es idéntico a otro reductor orgánico, según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10.

21. Utilización según la reivindicación 19, caracterizada por que el reductor orgánico, tal como el descrito en el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, es diferente del otro reductor orgánico, tal como el descrito en el método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10.

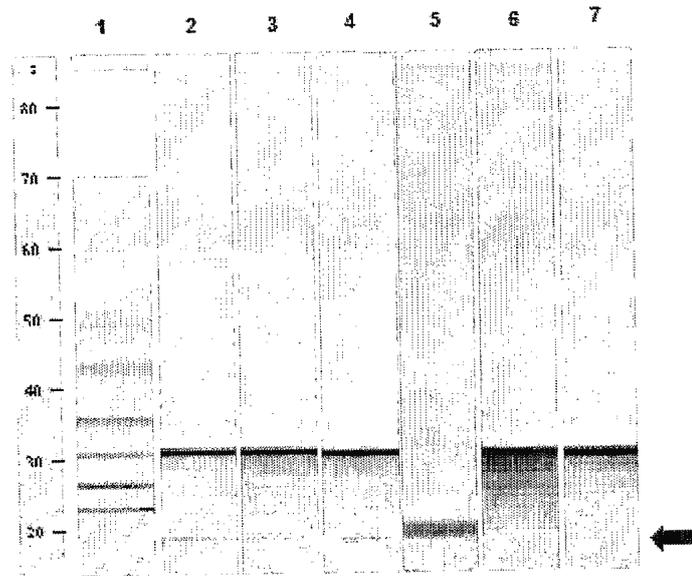


Figura 1

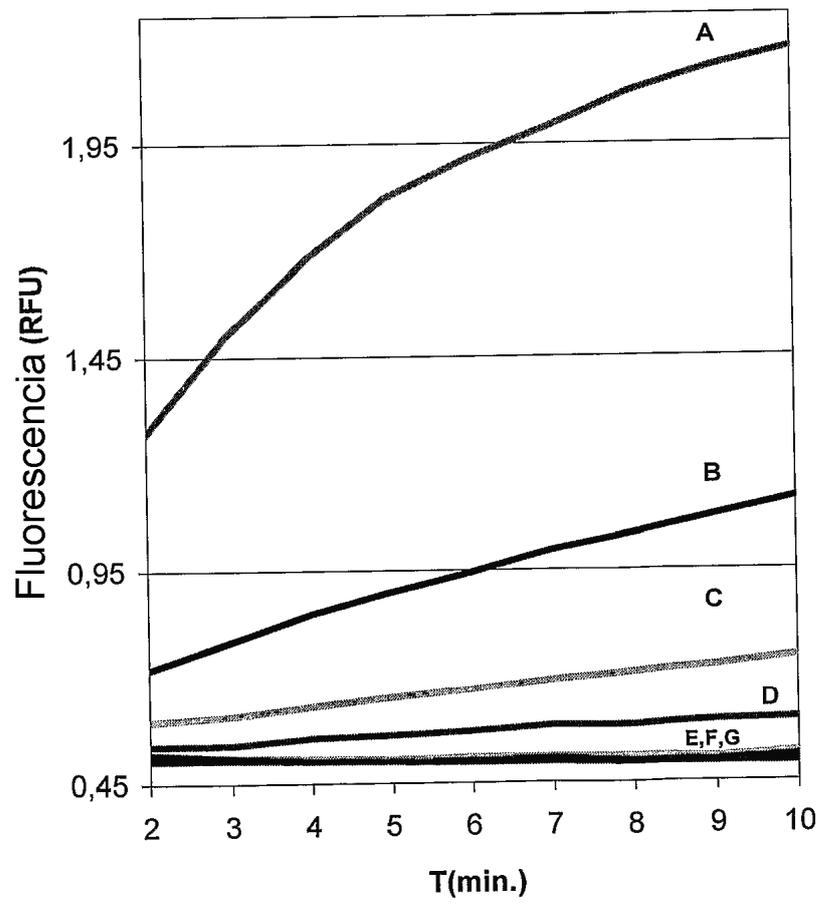


Figura 2

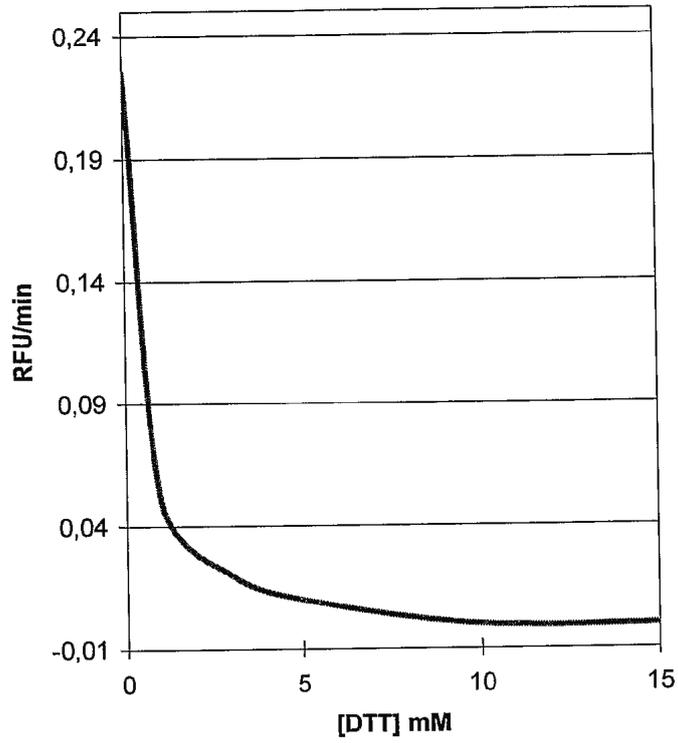


Figura 3

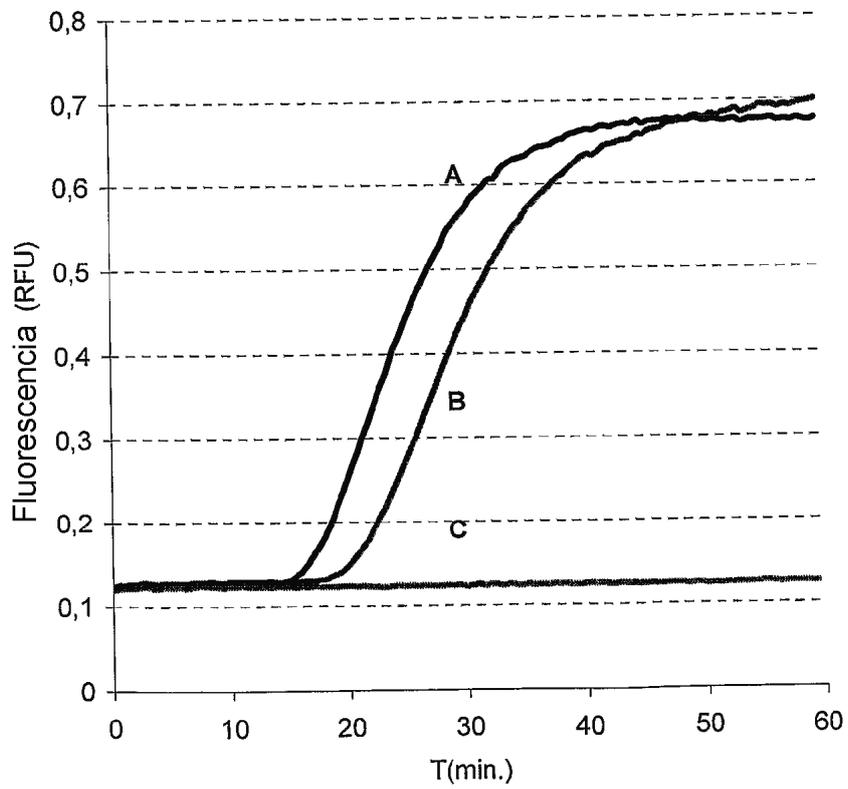


Figura 4

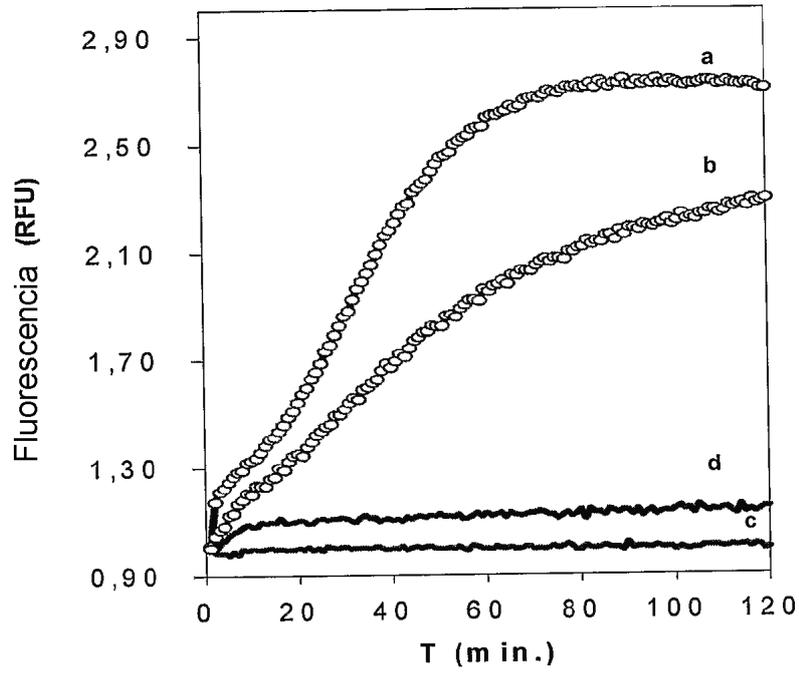


Figura 5

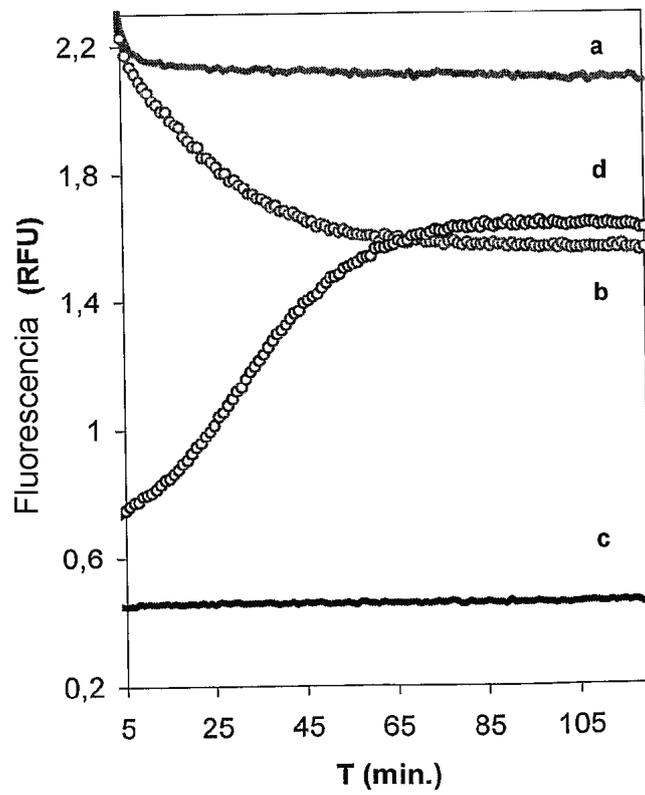


Figura 6

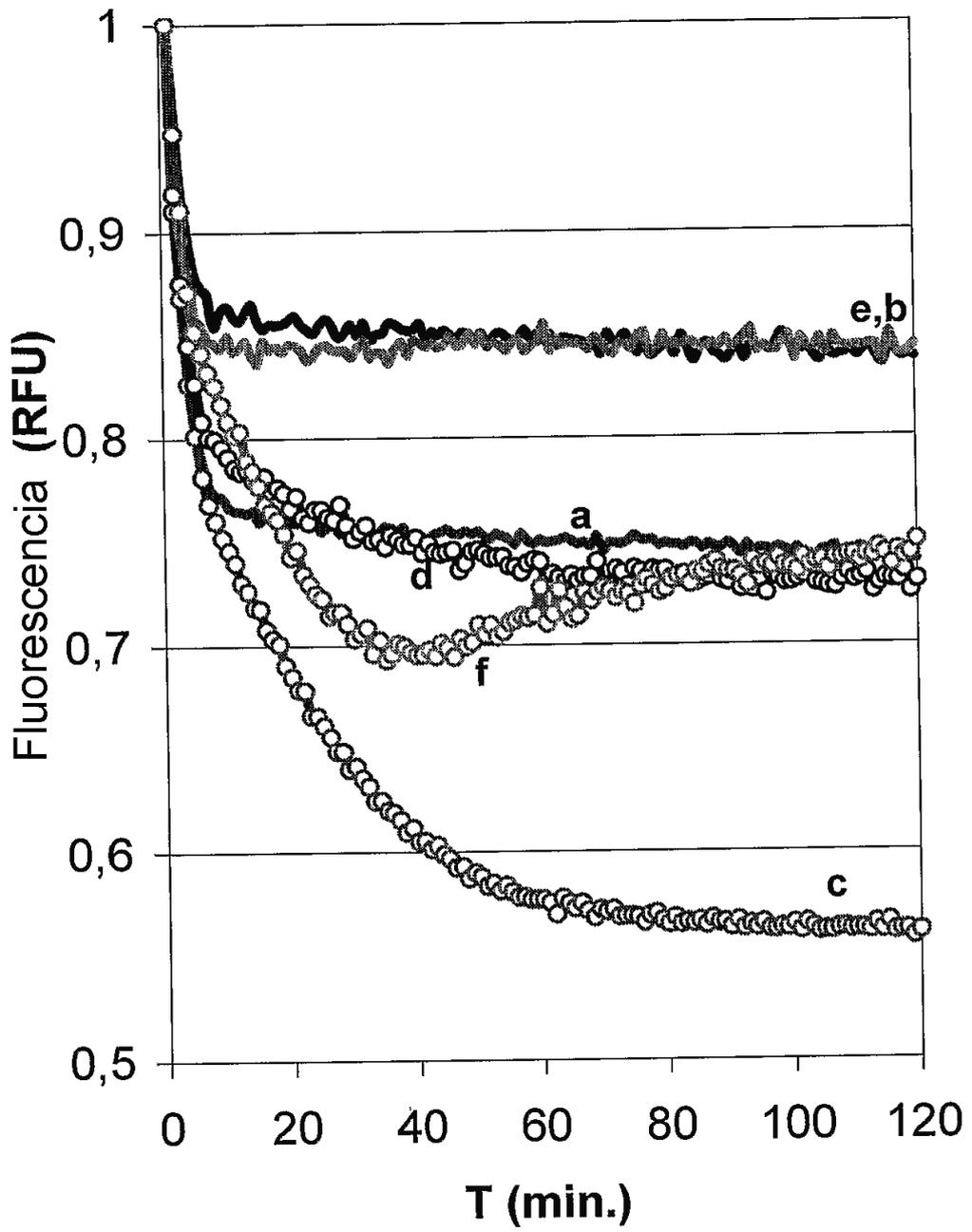


Figura 7

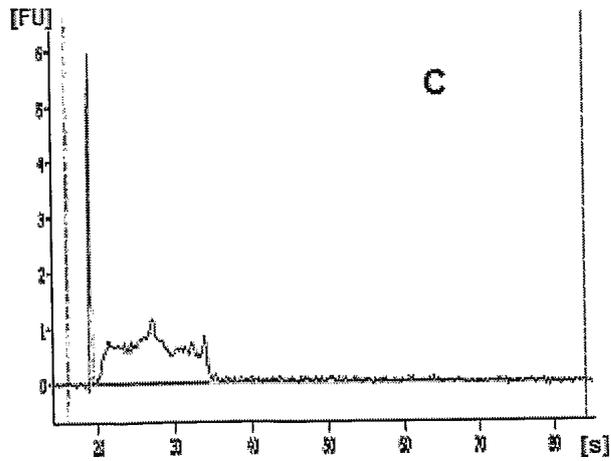
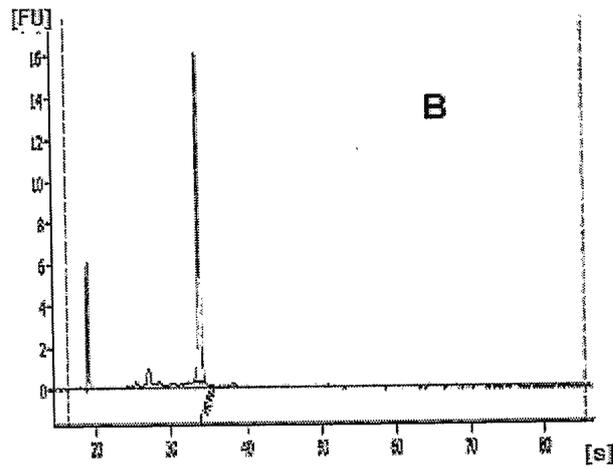
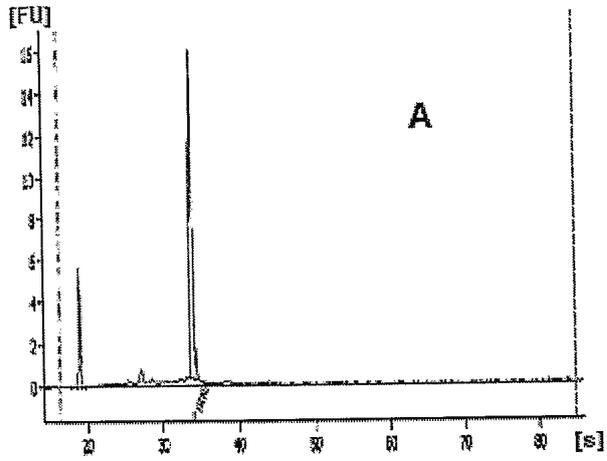


Figura 8