

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 353**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2005 E 05103320 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2015 EP 1589116**

54 Título: **Uso de un control de extracción en un procedimiento de extracción de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

23.04.2004 US 564926 P

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

03.03.2016

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417, US**

72 Inventor/es:

**HELLYER, TOBIN J.;
FORT, THOMAS L. y
MCMILLIAN, RAY A.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 562 353 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

Uso de un control de extracción en un procedimiento de extracción de ácidos nucleicos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar la eficacia de una etapa de extracción en un proceso para examinar una muestra biológica que contiene un ácido nucleico. La presente invención se refiere también a una matriz empaquetada para extraer un ácido nucleico de una muestra biológica.

Descripción de la técnica relacionada

10 La extracción de un ácido nucleico de una muestra es una operación importante en procesos de diagnóstico clínico, clonación, purificación y aislamiento y otros procesos en biotecnología. Por ejemplo, la tecnología de genética recombinante necesita el aislamiento tanto de un vector ADN y como del ADN clonado y/o expresado. Con el fin de diagnosticar una enfermedad genética o detectar un gen de cáncer, es necesario extraer el ácido nucleico del tejido, las células, y otros materiales biológicos varios de una muestra.

15 Un ácido nucleico no se encuentra libre en la naturaleza. Se encuentra en bacterias, células, o partículas víricas, rodeado por una membrana celular y/o una pared celular compuesta de proteínas, lípidos y azúcares. Un ácido nucleico forma en general complejos con histona y/u otras proteínas en su ambiente natural. Para extraer un ácido nucleico las membranas celulares y paredes celulares que lo rodean se tienen que destruir. En el caso de aislar un ácido nucleico, el complejo ácido nucleico-proteína tiene que desnaturalizarse o degradarse para liberar el ácido nucleico que se desea del complejo de forma que se pueda solubilizar y extraer. Los procedimientos para extraer ácidos nucleicos se describen, por ejemplo, en la Pat de EE. UU. 6.043.032.

20 Se han aplicado referencias internas en el análisis de ácidos nucleicos. Estas incluyen los ARNm que se expresan constitutivamente, para controlar la eficacia del examen. Además, se han aplicado controles externos en la etapa de extracción del análisis basado en la amplificación del ácido nucleico. Sin embargo, la detección y/o cuantificación del control necesita amplificación, por lo que no es posible distinguir si un problema ha aparecido en la etapa de amplificación o en la etapa de extracción. Por ejemplo, en la Pat de EE. UU. 6.387.652 B1, la adición de secuencias de *G. candidum* como referencia para ensayar secuencias fúngicas diana se empleó como control. Sin embargo, era necesario asumir una eficacia de amplificación de uno (col. 19, líneas 45-61). Petersen D G y col., FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY, Vol. 53, N° 3, pp. 339-348 (Agosto 2005) también describe el uso de una referencia interna que se añade a las muestras antes de la extracción de ADN. La referencia interna en Petersen, N., y col., Clinical Chemistry, Vol 41(11), pp. 1605-1613 (1995) es adecuada para detectarse con una sonda. Boom, C.J., y col., J. Clin. Micro., Vol. 28(3), pp. 495-503 (Marzo 1990) describe el uso de ADN marcado para ensayar la recuperación de cantidades en picogramos de ADN. Mummy, K., y col., J. Micro. Bio. Methods Vol. 57, pp. 259-268 (2004) utiliza una referencia externa de recuperación de ADN que está amplificada.

Hasta el momento no hay un procedimiento para verificar el proceso de extracción solo para un ácido nucleico, independiente de la aplicación corriente abajo, tal como una etapa de amplificación.

Sumario de la invención

35 La presente invención se refiere a

(1) un procedimiento para detectar, verificar, y/o calibrar la extracción de un ácido nucleico de una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:

40 (a) combinar uno o más ácidos nucleicos de referencia con la muestra biológica, en que dicho ácido nucleico de referencia está marcado pero en el que dicho marcador es un resto detectable que se selecciona de entre un cromóforo, un fluoróforo, y una enzima;

(b) extraer un ácido nucleico diana de la muestra biológica simultáneamente con y/o después de la etapa (a) para dar lugar a un extracto;

45 (c) detectar la presencia de y/o cuantificar la cantidad del ácido nucleico de referencia en el extracto; y

(d) amplificar el ácido nucleico diana en que el ácido nucleico de referencia no participa en o interfiere con la amplificación;

en que el ácido nucleico de referencia se detecta y/o cuantifica sin una etapa de amplificación, y además en que el ácido nucleico de referencia es capaz de ser detectado sin interferencia a partir del material de la muestra biológica;

50 (2) un procedimiento para analizar una muestra biológica que comprende:

(a) combinar uno o más ácidos nucleicos de referencia con la muestra biológica, en que dicho ácido nucleico de referencia está marcado pero en que dicho marcador es un resto detectable que se selecciona de entre un cromóforo, fluoróforo, y una enzima, y en que el ácido nucleico de referencia se detecta y/o cuantifica sin una etapa de amplificación y además en que el ácido nucleico de referencia es capaz de ser detectado sin

interferencia en el material de la muestra biológica.

(b) extraer el ácido nucleico de la muestra biológica simultáneamente con y/o después de la etapa (a) para dar lugar a un extracto; y

(c) detectar la presencia de y/o cuantificar la cantidad del ácido nucleico de referencia en el extracto; y

5 (d) ensayar el extracto en cuanto a un ácido nucleico de referencia en que la etapa de ensayo comprende una etapa de amplificación y en que el ácido nucleico de referencia no participa con o interfiere con la amplificación; y

(3) una matriz empaquetada para la práctica de los procedimientos (1) y (2) anteriores para extraer el ácido nucleico de múltiples muestras biológicas, en que la matriz empaquetada comprende:

10 (a) un grupo de primeros recipientes que contienen el ácido nucleico de referencia, en que el ácido nucleico de referencia se diseña para que sea detectado y/o cuantificado sin una etapa de amplificación y es capaz de ser detectado y/o cuantificado sin interferencia del ácido nucleico diana, y además en que la detección y/o cuantificación es a través de un resto marcado unido al ácido nucleico de referencia, en que dicho resto marcado se selecciona de entre un cromóforo, fluoróforo, y una enzima;

15 (b) un soporte sólido para extraer el ácido nucleico;

(c) un cebador para amplificar el ácido nucleico diana en que el ácido nucleico de referencia no participa con o interfiere con la amplificación; y

20 (d) opcionalmente un grupo de segundos recipientes para el emplazamiento independiente de múltiples muestras biológicas que permiten la transferencia de material entre los primeros recipientes y los segundos recipientes. En una realización más, el procedimiento y la matriz empaquetada de la presente invención se pueden incorporar en un montaje robótico para el análisis automático de la presencia de un organismo enfermo en una muestra biológica.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 es un diagrama de flujo de una realización de un protocolo de extracción utilizando un sistema automático para la extracción de ADN de especímenes urinarios y vaginales en el Procesador de Muestras BD Viper™.

La Figura 2 es un gráfico de los resultados que se presentan en el Ejemplo 1.

30 Las Figuras 3a y 3b muestran los resultados de la recuperación del control de extracción (EC) de los especímenes urinario y vaginal cuando se utilizan en conjunción con la BD ProbeTec™ ET Amplified CT (*Chlamydia trachomatis*) Ensayo en ausencia de ADN diana.

Las Figuras 4a y 4b muestran los resultados de la recuperación del control de extracción (EC) de los especímenes urinario y vaginal cuando se utiliza en conjunción con la BD ProbeTec™ ET Amplified GC (*Neisseria gonorrhoeae*) Ensayo en ausencia de ADN diana.

35 La Figura 5 muestra los resultados de la recuperación del control de extracción (EC) de dos matrices biológicas diferentes cuando se utilizan en los ensayos CT o GC.

40 Las Figuras 6a y 6b son gráficos de los efectos de diferentes niveles del control de extracción (EC) sobre la amplificación y detección de una amplificación de control interna (IAC) que se utiliza en ensayos de amplificación del desplazamiento de cadena (SDA) por *Chlamydia trachomatis* (CT) y *Neisseria gonorrhoeae* (GC). Los resultados muestran que el control de extracción no interfiere con los análisis posteriores del ácido nucleico extraído por la amplificación y detección basada en fluorescencia.

La Figura 7 muestra el efecto de un control de extracción (EC) sobre la detección de extracción corriente abajo de controles de amplificación interna (IAC) que se emplean en ensayos basados en SDA para *Chlamydia trachomatis* (CT) y *Neisseria gonorrhoeae* (GC). La eficacia de la amplificación del IAC se controla utilizando el algoritmo de pases tras el umbral (PAT).

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un procedimiento para asegurar o verificar la extracción de un ácido nucleico diana de una muestra biológica.

50 La diana es un ácido nucleico tal como un ADN o ARN de cadena sencilla o doble. Ejemplos de ácido nucleico que se pueden extraer por el procedimiento incluyen no solo el ADN o ARN genómico de animales, plantas, bacterias, virus, hongos y organismos parasitarios, sino también el ADN o ARN de mitocondrias o cloroplastos. Ejemplos de otras clases de ácido nucleico que se pueden extraer por el procedimiento incluye no solo el ARNm, sino también tARN, rARN y tmARN (ARN transferente-mensajero) así como plásmidos ADN. El ADN y ARN extraído por el procedimiento de la invención también puede ser monocatenario total o parcialmente o poseer otra estructura terciaria o cuaternaria. Una muestra que contiene ácidos nucleicos se ejemplifica por muestras viables tales como

55 células leucocitarias, el cultivo de células huésped que contienen vectores que se preparan típicamente por tecnología genética recombinante, células infectadas con virus o fagos, virus en la sangre y el cultivo de un microorganismo de la muestra. El cultivo puede contener microorganismos pero su sobrenadante solo es suficiente. No solo es aplicable un cultivo artificial sino también un cultivo de origen natural. En el caso de una muestra contiene masas de microorganismos, se puede llevar a cabo la homogeneización o sonicación como sea necesario para

60 conseguir una buena eficacia de extracción.

Tipos de muestras alternativas incluyen especímenes biológicos para el diagnóstico de enfermedades infecciosas o no infecciosas, especímenes ambientales, o muestras de alimento o agua. El ácido nucleico diana puede ser una secuencia particular o puede ser una clase de ácido nucleico. Una clase de ácido nucleico es, para un procedimiento particular de ensayo, las moléculas de ácido nucleico cuyas propiedades químicas, físicas o biológicas son tales que se puede esperar que se extraigan eficazmente en procedimientos que se utilizan para la extracción de ácidos grasos. Típicamente, pero no necesariamente, los ácidos nucleicos de una clase son ADN completo o análogos de ADN o ARN completo o análogos de ARN.

Los organismos a los que se dirige pueden incluir *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, virus de la inmunodeficiencia humana 1/2, Virus de la hepatitis B, Virus del síndrome respiratorio agudo severo, gripe A/B, Virus del herpes simple 1-6, Enterovirus, Virus del Nilo occidental, virus de Parainfluenza, Adenovirus, Virus respiratorio sincitial A/B, *Mycobacterium paratuberculosis*, complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, complejo *Mycobacterium tuberculosis*, Citomegalovirus, *Streptococcus* grupo B, *Bordetella pertussis*, y *Bordetella parapertussis*.

En un aspecto de la invención, el ácido nucleico diana es un ARN o ADNc particular de una o más de las siguientes fuentes: bacterias patógenas, bacterias no patógenas, virus patógenos, virus no patógenos, hongos patógenos, hongos no patógenos, levaduras patógenas, levaduras no patógenas, parásitos patógenos, parásitos no patógenos, plantas, productos animales, alimentos, ARN o ADNc total en la matriz de muestra, ARN o ADNc procariótico total, ARN o ADNc eucariótico total, o ARN o ADNc vírico total.

En otro aspecto de la invención, el ácido nucleico diana que se busca es el ADN de una o más de las siguientes fuentes: bacterias patógenas, bacterias no patógenas, virus patógenos, virus no patógenos, hongos patógenos, hongos no patógenos, levaduras patógenas, levaduras no patógenas, parásitos patógenos, parásitos no patógenos, plantas, productos animales, alimentos, ARN o ADNc total en la matriz de muestra, ARN o ADNc procariótico total, ARN o ADNc eucariótico total, o ARN o ADNc vírico total.

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, se añade un control de extracción a la muestra biológica antes de la etapa de extracción. El control de extracción es una secuencia de ácido nucleico con un marcador distinguible. Por marcador distinguible se quiere significar una marca o marcador que se puede identificar y cuantificar por un procedimiento espectrométrico, fluorogénico o colorimétrico en presencia de ácido nucleico sin marcar y otros componentes de la matriz de la muestra. El uso de un control de extracción para el proceso de extracción se entiende como el uso de una referencia o estándar para permitir la verificación de que la extracción se produjo como se deseaba. También es posible la calibración y cuantificación del control de extracción. El control de extracción se diseña para que se detecte sin amplificación de su secuencia de nucleótidos, y además se diseña de forma que no interfiera con la amplificación del ácido nucleico diana.

Los ácidos nucleicos marcadores se conocen en la técnica. Incluyen parejas colorantes de donante interruptor tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC)/isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), FITC/rojo Texas TM (Molecular Probes), FITC/1-pirenbutirato de N-hidroxisuccinimidilo (PYB), FITC/isotiocianato de eosina (EITC), 1-pirensulfonato de N-hidroxisuccinimidilo (PYS)/FITC, FITC/Rodamina X y FITC/tetrametilrodamina (TAMRA). La selección de un par donante/interruptor no es crítica. Para la transferencia de energía de los mecanismos de interrupción solo es necesario que las longitudes de onda del fluoróforo donante se solapen con las ondas de excitación del interruptor, es decir, tiene que haber un solapamiento del espectro suficiente entre los dos colorantes para permitir la transferencia energética eficaz, transferencia de carga o interrupción de la fluorescencia. El ácido p-(dimetil aminofenilazo) benzoico (DABCYL) es un colorante interruptor no fluorescente que interrumpe eficazmente la fluorescencia de un fluoróforo adyacente, por ejemplo, la fluoresceína o el 5-(2'-aminoetil) aminonaftaleno (EDANS). Cualquier pareja de colorantes que produzca interrupción de fluorescencia se puede utilizar en los procedimientos de la invención, independientemente del mecanismo por el que se produzca la interrupción.

Los marcadores preferidos para el control de extracción incluyen fluoróforos tales como la fluoresceína y la rodamina, enzimas tales como la peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, peroxidasa de soja o luciferasa. Los procedimientos para unirse a restos detectables en el ácido nucleico de forma que sea estable en la mayoría de los procedimientos de manejo de ácidos nucleicos se conocen en la técnica. Por ejemplo, se proporcionan procedimientos para producir enlaces covalentes se proporcionan comercialmente por compañías tales como Integrated DNA Technologies (véanse los boletines técnicos de IDT, disponibles en internet en el sitio de Integrated DNA Technologies). Otros procedimientos de marcado incluyen los que tienen un resto detectable unido a un miembro de una pareja de unión altamente estable, y el otro miembro de la pareja de unión unida al ácido nucleico. Tal pareja de unión puede ser, por ejemplo, avidina (o estreptavidina) y biotina. Las técnicas de marcaje con avidina-biotina se describen por ejemplo en *Advances in Biomagnetic Separation* (M. Uhlen, E. Hornse, and O. Olsvik (Eds.), Eaton Publishing 1994).

La secuencia de nucleótidos del control de extracción debe ser lo suficientemente larga para tener las propiedades físicas y químicas generales de un ácido nucleico. En una realización, el control de extracción consiste esencialmente en una secuencia de nucleótidos de entre 21 y 61 bases de longitud y un marcador. En otra realización, la secuencia de nucleótidos, marcada por ejemplo, con rodamina, debe ser lo suficientemente larga para unirse reversiblemente con una partícula de óxido de hierro bajo condiciones de extracción como se las que se describen en la Pat. de EE.

UU. 6.433.160, en que la rodamina libre no se une a una partícula de óxido de hierro.

El control de extracción se puede añadir a una muestra biológica antes o después de la lisis/destrucción de la membrana celular o la pared celular. En ciertas circunstancias, tales como con el control de extracción basado en ARN que es susceptible a la degradación por RNasas, el control de extracción se debería añadir hasta el punto inmediatamente antes de la extracción. Para los procedimientos que implican la unión del ácido nucleico a un soporte sólido, el control de extracción en general se puede añadir en cualquier punto antes de la unión, y de esta manera controlar todas las fases posteriores del proceso.

Después de la adición de un control de extracción, se lleva a cabo la extracción del ácido nucleico. La frase "extracción de ácido nucleico" se refiere a la purificación del ácido nucleico suficiente de las proteínas u otros materiales de la matriz de la muestra de forma que tenga una pureza razonablemente suficiente para los ensayos de identificación o cuantificación de segmentos de ácido nucleico. El término "proteína" se utiliza para incluir cadenas de aminoácidos o derivados de aminoácidos que comprenden péptidos, polipéptidos o proteínas de longitud completa. Los procedimientos para extraer ácidos nucleicos se conocen en la técnica. Por ejemplo, la Pat de EE. UU. 6.043.032 describe varios procedimientos de extracción de ácido nucleico, incluyendo procedimientos de extracción en fase líquida.

El procedimiento de extracción puede incluir una etapa en la que el ácido nucleico está unido a un soporte sólido. El soporte sólido se lava típicamente para retirar el material no deseado. En muchos casos, el ácido nucleico se libera de un soporte sólido y se procesa adicionalmente. En otros casos, el ácido nucleico unido al soporte sólido se procesa adicionalmente. Los expertos reconocerán cuando es apropiado evaluar la extracción en vez de evaluar un procedimiento posterior. A menudo, la evaluación se hace tras la liberación del soporte sólido. O, si no se necesita tal liberación, la evaluación se puede hacer del ácido nucleico unido al soporte. Soportes apropiados para la captura no específica de ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, polvos de cristal machacado (por ejemplo, disponible en Bio101 como GeneClean™) y filtros de fibra de vidrio (por ejemplo, disponible en Roche como el sistema High Pure™, Cellite (por ejemplo disponible en BioRad Laboratories como Prep-A-Gene™), y partículas paramagnéticas que contienen hierro (por ejemplo, como se describe en la Pat. de EE. UU. 6.433.160, que desvela la unión de ácidos nucleicos bajo condiciones ácidas). Para la captura específica de la diana, se pueden utilizar partículas paramagnéticas con superficies modificadas (por ejemplo como se describe en el documento EP-B-0 446 260 y Pat. de EE. UU. N° 5.512.439, portando cada partícula una pluralidad de moléculas de un oligonucleótido). Los oligonucleótidos capturados se pueden conjugar directamente a la superficie de la partícula o acoplarse por medio de un engarce intermediario tal como estreptavidina-biotina u otra interacción ligando-receptor, como se conoce en la técnica.

Después de la extracción para obtener un extracto que contenga el control de extracción y el ácido nucleico diana, la presencia del control de extracción en el extracto se verifica por la detección del marcador, también conocido como marcador detectable. El marcador del control de extracción se puede analizar también por el procedimiento de detección para permitir la cuantificación de la cantidad del control de extracción en el extracto. Los procedimientos adecuados para la detección del marcador incluyen procedimientos espectrométricos, fluorogénicos o colorimétricos.

El control de extracción puede tener un marcador detectable cuyas características de detección (por ejemplo longitudes de onda de emisión o absorción) se solapan con las características de detección que se utilizarán en un procedimiento post-extracción, tal como un ensayo para una molécula específica. Por ejemplo, los cromóforos o fluoróforos que se utilizan para el control de extracción y el segundo procedimiento post-extracción puede ser el mismo. En tal caso, la detección del control de extracción y la detección en el procedimiento siguiente se diseñan de manera que una extracción positiva produce una cantidad de marcador detectable, en el procedimiento siguiente, que contribuirá al resultado solo como la que se puede compensar fiablemente en una señal controlada por la señal de fondo.

Los datos de la detección del control de extracción marcado opcionalmente se normalizan. La etapa de normalización de datos puede comprender la interpolación a partir de los datos de control de cuánto se deberían normalizar un punto de datos experimental o puede comprender descartar los puntos de datos que los datos de control indican que son irrealizables o que se puedan considerar como una señal de fondo. La detección y normalización de los datos se pueden combinar en una única etapa con fines de automatización.

En una realización, la secuencia del ácido nucleico de control de extracción se basa sustancialmente en la estructura del ácido nucleico diana. Por lo tanto, por ejemplo, el procedimiento puede buscar la extracción de una estructura genética determinada, fase de lectura abierta (ORF), intrón, exón, ARNm, ADNc, y se puede diseñar el ácido nucleico del control de extracción para que contenga un 1% o más, un 10% o más, o un 50% o más de la estructura primaria del mismo. Por lo tanto, en una realización, si se busca ARN para extraerse, el control de extracción será ARN (o un análogo de ARN), y si se busca ADN para extraerse, el control de extracción será ADN (o un análogo de ADN). En otras realizaciones, se se va a extraer un ARN, el control puede ser ADN (o un análogo de ADN) y si se va a extraer ADN, el control de extracción puede ser ARN (o un análogo de ARN).

Se define un gen estructural por el segmento de ácido nucleico (y si es relevante su complemento) que codifica un ARN transcrito (si tal ARN se edita tardíamente para retirar intrones) o que codifica el mínimo segmento contiguo que

codifica una proteína que se expresa. Dada la existencia de variantes empalmadas, y la típica existencia de ARN en los extremos 3' y 5' del ARNm que no se traducen en proteínas, un gen determinado puede definir uno, dos o varios genes estructurales. En todos los casos, la presencia de una modificación con un marcador de un resto o nucleótido, que comprendería de otra manera una secuencia compartida, no disminuye el porcentaje que se comparte. Para la declaración de porcentajes de estructura idéntica, si el porcentaje necesario existe al menos en uno de los genes estructurales, entonces la declaración está satisfecha.

En otra realización, si se van a extraer dos o más ácidos nucleicos diana con diferentes características, se pueden añadir dos o más controles de extracción antes de la etapa de extracción.

Si el ácido nucleico que se va a extraer tiene características que se asocian con dificultades en la extracción, estas características se pueden modelar en las sustancias seleccionadas como controles de extracción. Por ejemplo, si se busca un particular segmento de ácido nucleico, y el segmento incluye un segmento con alto contenido G/C, o un alto grado de estructura secundaria o terciaria que contribuye a la dificultad de la extracción, entonces tal sub-segmento o un análogo del mismo se puede incluir en la secuencia del control de extracción. El diseño del control de extracción también incluye la limitación de que el control de extracción no debería interferir con la amplificación post-extracción de la secuencia diana.

En muchos contextos para la extracción de ácido nucleico, se utilizará una reacción de hibridación en un procedimiento post-extracción. En muchos de estos procedimientos post-extracción, el uso de ácidos nucleicos para el control de extracción con una secuencia basada en una secuencia de intrón minimizará hibridaciones de competencia no deseadas. Cuando se utilizan procedimientos basados en polimerasa en los procedimientos post-extracción, el extremo 3' del control de extracción se puede modificar para evitar la extensión del control de extracción. Por ejemplo, se puede unir el marcador detectable al extremo 3' para bloquear la extensión o el extremo 3' del control de extracción se puede tapar utilizando un didesoxinucleótido, base invertida u otro resto terminal no extensible como se conoce en la técnica. Otros procedimientos de inhibición de la amplificación no deseada se conocen en la técnica, por ejemplo, en la Pat. de EE. UU. 5.972.610 y Pat. de EE. UU. 5.849.497. Se puede conseguir determinar si un control de extracción interferirá o no con la amplificación de la secuencia diana ejecutando en paralelo una amplificación de la secuencia diana con y sin el control de extracción.

Se hace una distinción entre la amplificación de ácido nucleico y la amplificación de señal. Amplificación de ácido nucleico significa una técnica tal como SDA, PCR, TMA y NASBA, por la que se hacen copias adicionales del ácido nucleico. Por el contrario, una señal de amplificación tal como la que se produce cuando se utiliza un marcador quimioluminiscente o colorimétrico en la detección de un marcador, y no da como resultado copias adicionales del marcador. El uso del término general "amplificación" en lo que se refiere a la amplificación post-extracción tiene significado en referencia la amplificación de ácido nucleico. Una secuencia de un control de extracción se define como no capaz de amplificarse durante la amplificación post-extracción si, al final de la amplificación de la secuencia diana, la cantidad de control de extracción presente en la mezcla de reacción es menor de 1000 veces más que la presente antes de lo que estaba presente antes de la amplificación. El control de extracción que se utiliza en la presente invención está diseñado para no participar o interferir en una etapa de amplificación posterior del ácido nucleico diana, que incluye la amplificación de secuencias añadidas para medir o controlar independientemente la eficacia de la etapa de amplificación. No participación o no interferencia por el control de extracción se define por amplificaciones que se ejecutan en paralelo de la secuencia diana con y sin el control de extracción. Si la amplificación de la secuencia diana en presencia del control de extracción es aproximadamente equivalente a la amplificación de la secuencia diana sin el control de extracción, entonces el control de extracción se define como que no participa o no interfiere con, la amplificación post-extracción de la secuencia diana.

En una realización de la invención, se incluyen múltiples controles de extracción en el procedimiento de extracción, cada uno diseñados específicamente para verificar la extracción de una o más clases de ácido nucleico. En otra realización de la invención, el control de extracción se puede secar para su almacenamiento a largo plazo sin impactar en su forma o función.

La **Figura 1** contiene un diagrama de flujo de un protocolo de extracción que utiliza un sistema automático para la extracción de ADN de especímenes urinarios y vaginales en el Procesador de Muestras BD Viper™, que es un ejemplo de una matriz empaquetada. Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención.

Ejemplo 1

Se llevó a cabo un experimento para evaluar la capacidad de un control de extracción marcado con Rodamina (ROX) para detectar los fallos en la extracción automática de ácidos nucleicos. El control se denominó BBTEC-26 (SECUENCIA ID N° 1). El protocolo era el siguiente:

- Añadir en orina masculina y femenina agrupadas, 7500 copias de plásmido de *Chlamydia trachomatis* (CT) por ml (cada plásmido portaba una copia única de la secuencia de amplificación diana).
- Calentar las muestras de orina con adición o sin adición (control) a 114 °C durante 30 minutos.

- Transferir la orina a tubos de extracción que contienen 40 mg de óxido ferrosférico (Fe₃O₄).
 - Transferir 111 picomoles del Control de Extracción BBTEC-26 (EC) a los tubos deseados.
 - Extraer en el BD Viper™ (instrumento de extracción equipado con una placa de pruebas) utilizando el siguiente protocolo automático:
- 5
- Añadir 50 µl de ácido de unión a los tubos de extracción y mezclar. (La solución de ácido de unión facilita que el ácido nucleico se una a los óxidos ferrosféricos como se describe en el documento US 5.973.138). Omitir el ácido de unión en los tubos de control. El ácido de unión era ácido fosfórico (H₃PO₄).
 - Posicionar imanes cerca de los tubos de extracción para bloquear el Fe₃O₄ y cualquier ácido nucleico que esté unido en los lados de los tubos.
- 10
- Aspirar la muestra no unida de los tubos de extracción y transferirlo a los desechos.
 - Transferir 1030 µl de tampón de lavado a cada tubo de extracción y mezclar. El tampón de lavado era glicina-HCl 1 mM.
 - Posicionar imanes cerca de los tubos de extracción para bloquear el Fe₂O₄ y el ácido nucleico unido a los lados de los tubos.
- 15
- Aspirar la solución no unida de los tubos de extracción y transferirla a los desechos.
 - Transferir 370 µl de tampón de elución a cada tubo de extracción y mezclar. El tampón de elución tiene un pH básico. El tampón de elución era 177,8 mM de Bicina, 88,3 mM de KOH, un 11% de DMSO, y un 12,1% de glicerol.
 - Posicionar imanes cerca de los tubos de extracción para bloquear el Fe₃O₄ en los laterales de los tubos.
- 20
- Aspirar el eluido de los tubos de extracción y transferirlo al Ensayo BD ProbeTec™ ET CT Amplified DNA.
 - Recolectar, normalizar y promediar las señales ROX a partir de los pases 20-60 de incubación en el instrumento BD ProbeTec™ ET para evaluar lo adecuado de la extracción EC.
 - Recolectar los resultados del ensayo BD ProbeTec CT (puntuaciones MOTa, que corresponden con el área bajo la curva de amplificación) para evaluar lo adecuado de la recuperación de CT diana y la amplificación.
- 25
- Los datos posteriores se presentan en valores MOTa para las determinaciones CT y en valores ROX normalizados en la máquina para las determinaciones de EC. El colorante libre de ROX no se unirá al óxido férrico bajo las condiciones que se utilizan para la extracción. Los valores MOTa representan la suma de las mediciones individuales de fluorescencia a lo largo del tiempo utilizando un fluorómetro con un nivel límite establecido para una reacción positiva de 2.000 para los ensayos BD ProbeTec™ ET CT y ADN amplificado GC. Los kits de ensayo de la marca BD Probe Tec™ están disponibles en Becton, Dickinson and Company, y están diseñados para su uso con el sistema BD Probe Tec™ ET para la Amplificación de Desplazamiento de Cadena (SDA). El Procesador de Muestras BD Viper™ automatiza el manejo de la muestra que se asocia con el alto volumen de ensayos que utiliza el Sistema BD Probe Tec™ ET.
- 30

Resultados

Tubo	+ CT + EC + Ácido de unión				+CT No EC + Ácido de unión			
	MOTA diana		Puntuación EC (Ensayo ROX pocillo/ROX Normalizador)		MOTA diana		Puntuación EC (Ensayo ROX pocillo/ROX Normalizador)	
	1	2	1	3	1	2	1	2
1	82765	81900	2,57	2,72	64083	107523	0,95	1,38
2	89858	72722	2,68	2,25	57317	62082	1,19	1,11
3	61719	92915	2,24	2,62	80405	82031	1,18	1,18
4	83622	96592	2,63	3,00	73549	75247	1,31	1,19
5	55736	89618	2,49	2,31	82858	84116	1,15	1,07
6	47094	48845	2,32	2,55	45150	95490	1,07	1,31

(continuación)

Tubo	No CT +EC + Ácido de unión				+CT +EC No Ácido de unión			
	MOTA diana		Puntuación EC (Ensayo ROX pocillo/ROX Normalizador)		MOTA diana		Puntuación EC (Ensayo ROX pocillo/ROX Normalizador)	
	1	2	1	3	1	2	1	2
1	0	3	2,12	2,31	2367	7876	0,99	0,83
2	0	0	2,11	2,20	63027	4	1,19	1,09
3	0	0	1,89	2,10	35	15	0,97	0,98
4	0	1	2,52	2,54	78262	10846	1,37	1,16
5	0	53	1,90	2,11	69528	20765	1,09	1,01
6	17	0	2,47	1,98	179	65026	1,05	1,21

- En todos los casos en los que tanto el EC y el ácido de unión estaban presentes, los valores ROX normalizados eran = 1,89.
- 5 • En todos los casos en los que el ácido de unión estaba presente, pero el control de extracción no se había añadido, los valores ROX normalizados eran = 1,38.
- En todos los casos en los que estaba presente el control de extracción, pero el ácido de unión no se había añadido, los valores ROX normalizados eran = 1,38.
- 10 • En todos los casos en los que el control de extracción se había añadido y la diana CT se había extraído satisfactoriamente, los valores de ROX normalizados eran de 1,89.
- En todos los casos en los que la diana CT se había añadido, pero no se había extraído satisfactoriamente, los valores normalizados ROX eran = 1,38.

15 Los resultados se presentan gráficamente en la **Figura 2**. Los resultados demuestran que el control de extracción se extraía satisfactoriamente de una muestra y que identificaba con precisión casos en los que fallaba la extracción del ácido nucleico diana específico. De manera alternativa, el ejemplo anterior se puede llevar a cabo con EC-26,3 (SECUENCIA ID N° 2). También se pueden utilizar otros controles de extracción conforme al procedimiento de la presente invención.

Ejemplo 2

20 Para determinar si el EC se podía extraer de diferentes matrices, se añadieron 168 pmol de EC en grupos de orina y matriz clínicas de las torundas vaginales presionadas. Se analizaron ocho réplicas del ensayo para cada muestra, incluyendo un control negativo que carecía del EC. Los resultados se presentan en las **Figuras 3, 4 y 5** para su comparación.

Ejemplo 3

25 Se evaluó el efecto del control de extracción (EC) en un control de amplificación interno (IAC) separado añadiendo diferentes niveles del EC a un grupo que contenía matriz de torundas vaginales presionadas y extrayendo como se describe en el Ejemplo 1. Los eluidos resultantes se ensayaron en ensayos de amplificación de desplazamiento de cadena en cuanto a CT y GC que contenían controles de amplificación interna. Los resultados se presentan en las Figuras 6 y 7, que muestran que el control de extracción no interfiere en la amplificación posterior para los controles de amplificación internos. Al control de amplificación interno se le da una puntuación en un algoritmo de pases tras el umbral (PAT). Los umbrales para el algoritmo PAT se establecen llevando a cabo un análisis de la curva de Características de Operador Receptor sobre los resultados del análisis que se obtienen con los controles positivos y negativos. Se encontró un umbral preliminar, y se aplica a los resultados obtenidos con las muestras con adición para la verificación.

Ejemplo 4

35 Se lleva a cabo una extracción específica de secuencia con una modificación del Ejemplo 1. En lugar de partículas de hierro, se pueden utilizar perlas revestidas de estreptavidina. Las perlas se mezclan con dos oligonucleótidos biotinilados diferentes, uno de los cuales es complementario a la secuencia diana, mientras que el otro es complementario de la secuencia del control de extracción. El control de extracción se marca con rodamina. Las

condiciones de hibridación apropiadas que se conocen bien en la técnica se utilizan en la etapa de extracción. Se utilizan variaciones en la concentración de sales, temperatura, cosolventes, y detergentes para variar la rigurosidad de la especificidad de hibridación. Después de la hibridación, se lavan las perlas bajo condiciones adecuadas para retirar los residuos y el material no hibridado. El ácido nucleico diana y el control de extracción se eluyen bajo condiciones de baja salinidad, temperatura elevada u otro procedimiento que se conozca en la técnica. El marcador rodamina del control de extracción se detecta para verificar el proceso de extracción, y se cuantifica el nivel de rodamina recuperada para determinar la eficacia de la captura, lavado y elución. Los resultados se expresan cuantitativa o cualitativamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Becton, Dickinson and Company Hellyer, Tobin J. Fort, Thomas L. McMillian, Ray A.
 <120> Uso de un control de extracción en un procedimiento de extracción de ácidos nucleicos
 <130> 2728-4000
 15 <160> 2
 <170> PatentIn versión 3.2
 20 <210> 1
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> sintética
 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Rodamina (ROX) unida al extremo 5' de la secuencia (es decir, al resto 1)
 30 <400> 1
 ttcatgcgag aggagatggc attaag 26
 <210> 2
 <211> 26
 35 <212> ADN
 <213> sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 40 <222> (1)..(1)
 <223> Rodamina (ROX) unida al extremo 5' de la secuencia (es decir, al resto 1)
 <400> 2
 45 tctatgattg ttattattc ttatat 26

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección, verificación, y/o calibración de la extracción de ácido nucleico de una muestra biológica, comprendiendo el procedimiento:
 - 5 (a) combinar uno o más ácidos nucleicos de referencia con la muestra biológica, en el que dicho ácido nucleico de referencia está marcado pero en el que dicho marcador es un resto detectable seleccionado de entre un cromóforo, un fluoróforo, y una enzima;
 - (b) extraer un ácido nucleico diana de la muestra biológica simultáneamente con y/o después de la etapa (a) para producir un extracto;
 - 10 (c) detectar la presencia de y/o cuantificar la cantidad del ácido nucleico de referencia en el extracto; y
 - (d) amplificar el ácido nucleico diana en el que el ácido nucleico de referencia no participa en, ni interfiere con, la amplificación;

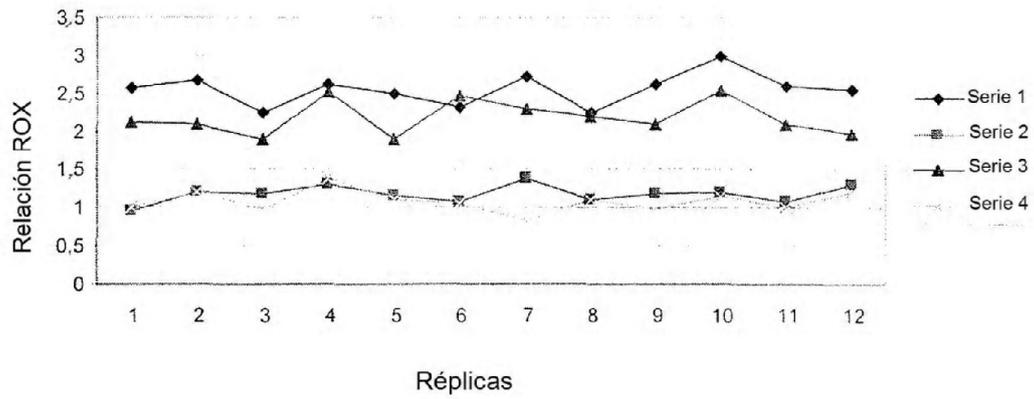
en el que el ácido nucleico de referencia se detecta y/o cuantifica sin una etapa de amplificación, y además en el que el ácido nucleico de referencia es capaz de ser detectado sin interferencia del material de la muestra biológica.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
 - (e) estimar la cantidad de un ácido nucleico no de referencia presente en la composición antes de la etapa de extracción, mediante
 - 20 (i) cuantificación de la cantidad de ácido nucleico de referencia en el extracto de la etapa (b);
 - (ii) comparación de la cantidad de ácido nucleico de referencia en el extracto de la etapa (b) con la cantidad de ácido nucleico de referencia combinado con la muestra biológica en la etapa (a) para calcular una relación de eficacia de extracción.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico de referencia comprende ARN o ADN.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende la unión reversible del ácido nucleico a un soporte sólido, el lavado del soporte sólido para retirar las moléculas que se han unido menos fuertemente que el ácido nucleico, y la liberación el ácido nucleico del soporte sólido.
- 25 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra biológica contiene un ácido nucleico obtenido de un organismo seleccionado de entre el grupo que consiste en *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en que el ácido nucleico de referencia es la SEC ID N° 1 y/o la SEC ID N° 2.
- 30 7. Un procedimiento de análisis de una muestra biológica que comprende:
 - (a) combinar uno o más ácidos nucleicos de referencia con la muestra biológica, en el que dicho ácido nucleico de referencia está marcado pero en el que dicho marcador es un resto detectable seleccionado de entre un cromóforo, un fluoróforo, y una enzima, y en el que el ácido nucleico de referencia se detecta y/o cuantifica sin la etapa de amplificación, y además en el que el ácido nucleico de referencia es capaz de ser detectado sin interferencia del material de la muestra biológica;
 - 35 (b) extraer el ácido nucleico de la muestra biológica simultáneamente con y/o tras la etapa (a) para producir un extracto; y
 - (c) detectar la presencia de y/o cuantificar la cantidad de ácido nucleico de referencia en el extracto; y
 - 40 (d) ensayar el extracto para un ácido nucleico diana en el que la etapa de ensayo comprende una etapa de amplificación y en el que el ácido nucleico de referencia no participa con, ni interfiere con, la amplificación.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en que el ácido nucleico de referencia comprende ARN o ADN.
9. Una matriz empaquetada para la práctica de los procedimientos de las reivindicaciones 1 y 7 para extraer ácido nucleico de múltiples muestras biológicas, en el que la matriz empaquetada comprende:
 - 45 (a) un grupo de primeros recipientes que contienen un ácido nucleico de referencia, en la que el ácido nucleico de referencia está diseñado para ser detectado y/o cuantificado sin una etapa de amplificación y es capaz de ser detectado y/o cuantificado sin interferencia del ácido nucleico diana, y además en la que la detección y/o cuantificación es por medio de un resto marcado unido al ácido nucleico de referencia, en la que dicho resto marcado se selecciona de entre un cromóforo, un fluoróforo, y una enzima;
 - (b) un soporte sólido para la extracción del ácido nucleico.
 - 50 (c) un cebador para amplificar el ácido nucleico diana en la que el ácido nucleico de referencia no participa con ni interfiere con la amplificación; y
 - (d) opcionalmente un grupo de segundos recipientes para el emplazamiento independiente de múltiples muestras biológicas que permite transferir material entre los primeros recipientes y los segundos recipientes.

10. La matriz empaquetada de la reivindicación 9, en la que el ácido nucleico de referencia es la SEC ID N° 1 y/o la SEC ID N° 2.

FIGURA 1

1. Añadir el Control de Extracción (EC) a la muestra biológica sospechosa de contener el ácido nucleico diana
2. Transferir la muestra al recipiente de extracción que contiene partículas de óxido de hierro (IOP)
3. Añadir el ácido de unión
4. Mezclar y separar con un imán
5. Añadir la solución de lavado
6. Mezclar y separar con un imán
7. Añadir el tampón de elución
8. Mezclar y separar con un imán
9. Ensayar el tampón de elución para la presencia del control de extracción.

FIGURA 2



Serie 1 = + CT ADN, + EC, + Ácido de unión
 Serie 2 = + CT ADN, No EC, + Ácido de unión
 Serie 3 = No CT ADN, + EC, + Ácido de unión
 Serie 4 = + CT ADN, + EC, No Ácido de unión

Figura 3a

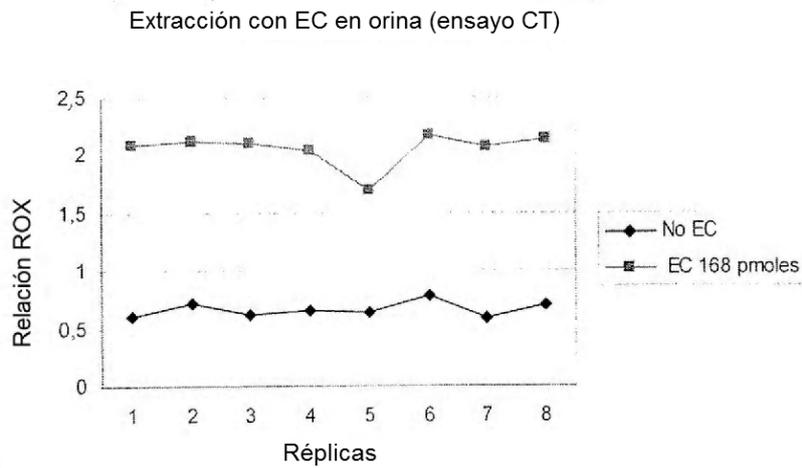


Figura 3b

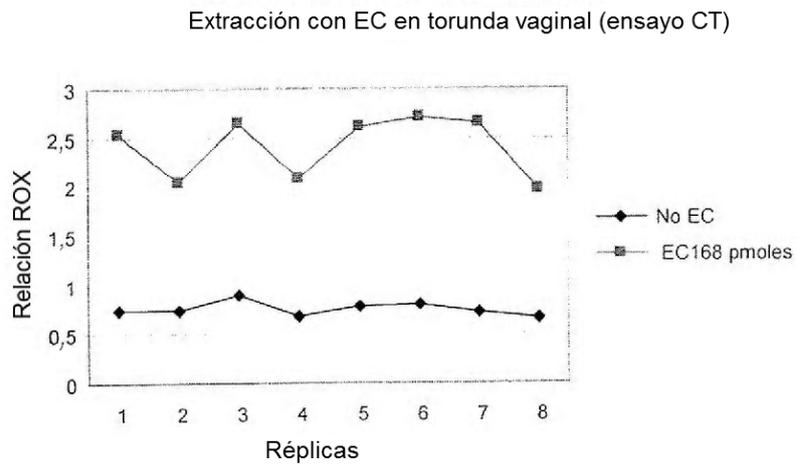


Figura 4a

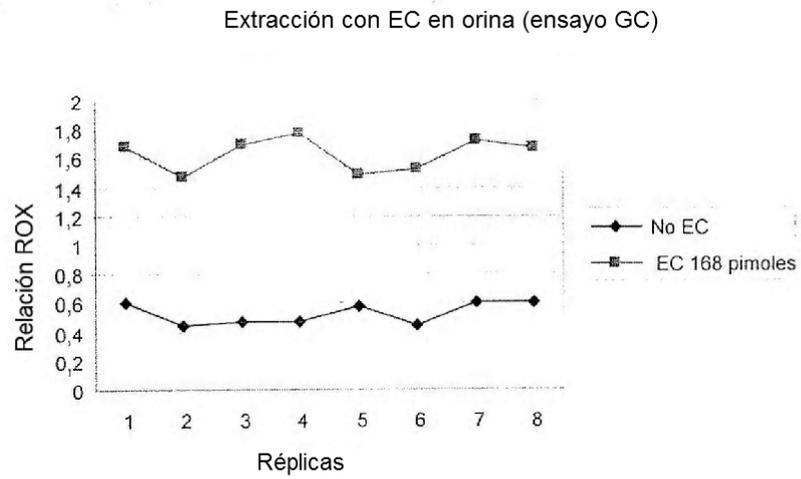


Figura 4b

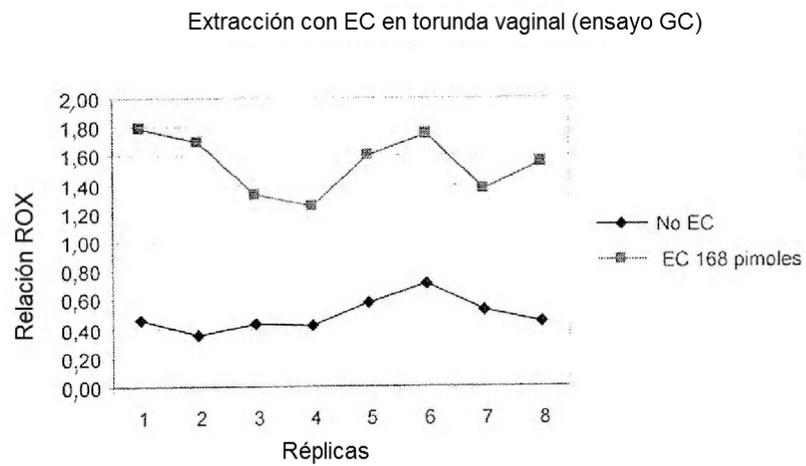


Figura 5

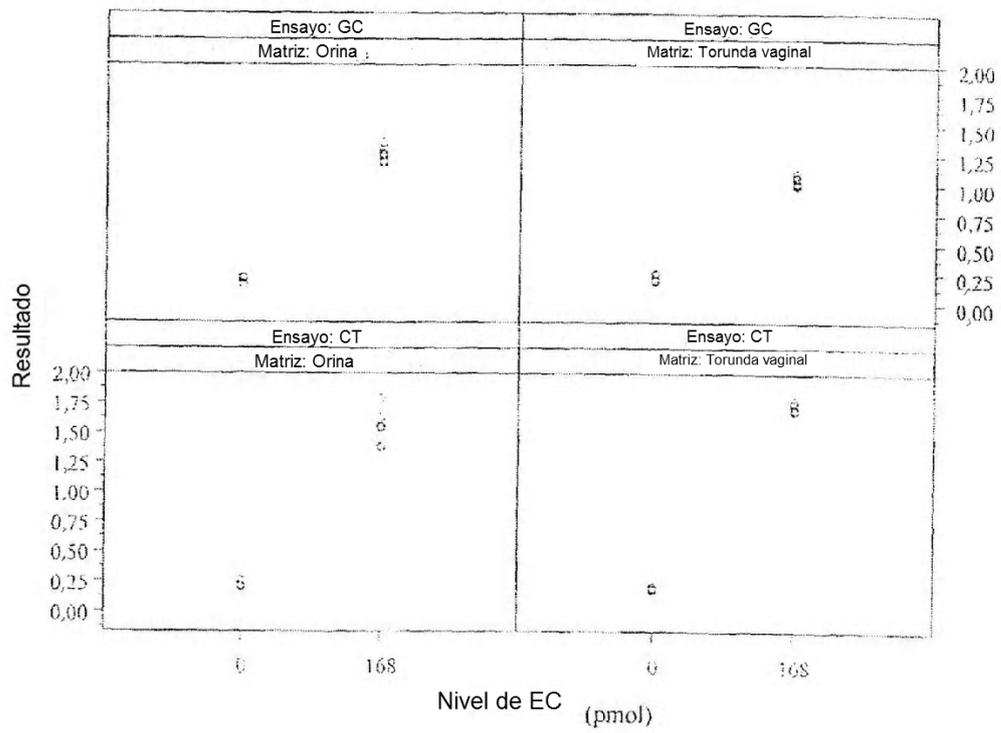


Figura 6a

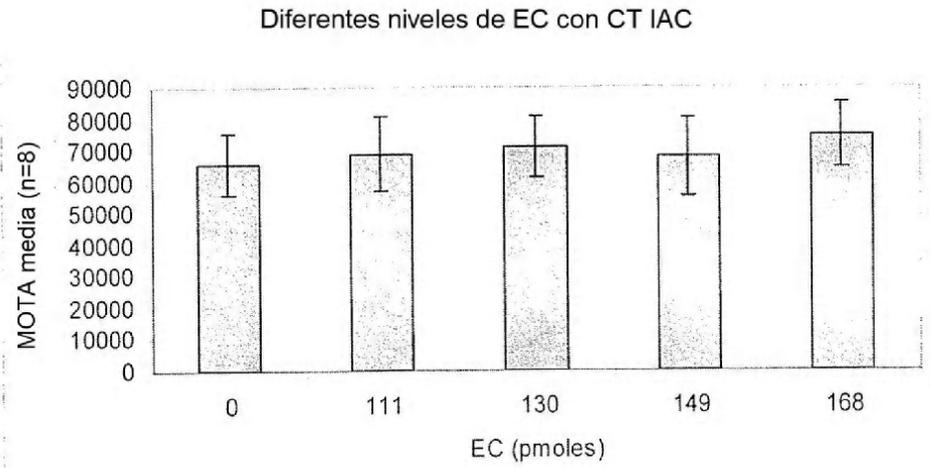


Figura 6b

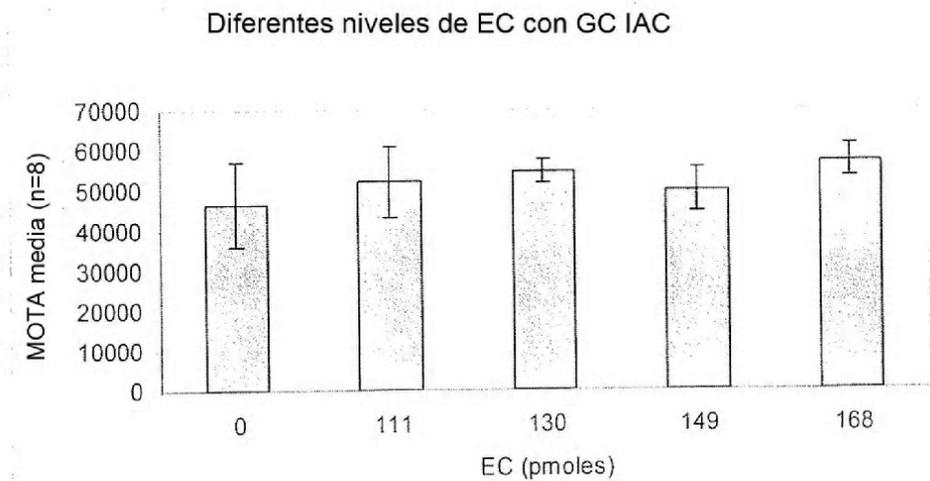


Figura 7

