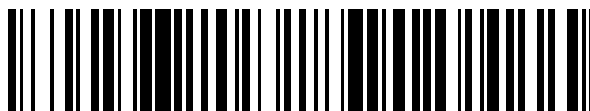


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 091**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2013** **E 13161644 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016** **EP 2647709**

54 Título: **Compuestos de amina para la preparación selectiva de muestras biológicas**

30 Prioridad:

05.04.2012 EP 12163497

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

19.04.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WILL, STEPHEN GORDON

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 567 091 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

Compuestos de amina para la preparación selectiva de muestras biológicas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la analítica. Dentro de este campo, se refiere al aislamiento de material diana biológico de una muestra biológica que comprende la unión de dicho material diana a un soporte sólido, en el que las impurezas se eliminan selectivamente del soporte sólido mediante el lavado de este con un tampón de lavado que contiene una amina catiónica.

Antecedentes de la invención

El aislamiento de materiales biológicos tales como ácidos nucleicos o proteínas a partir de mezclas biológicas complejas tales como muestras clínicas, como por ejemplo sangre total, es de considerable importancia en especial para fines de diagnóstico.

Se han desarrollado en la técnica numerosos métodos diferentes, por ejemplo, desnaturalizando, precipitando y eliminando los componentes no deseados en una muestra con la posterior precipitación y aislamiento del analito en cuestión (por ejemplo, precipitación de ácidos nucleicos basada en alcohol).

Otro enfoque es la unión del material biológico a ser aislado a un material de soporte sólido que puede proporcionarse, por ejemplo, en forma de columnas cromatográficas.

Para fines de diagnóstico, y especialmente para el aislamiento automatizado de materiales biológicos sujetos a un posterior análisis de mediano o alto rendimiento, se utilizan a menudo partículas de unión.

Es conocido en la técnica que durante el proceso de aislamiento a menudo se unen impurezas al correspondiente soporte sólido y por lo tanto se coaislan, y tales impurezas pueden interferir con el análisis de corriente abajo del material biológico en cuestión.

La técnica anterior ha intentado hacer frente a la circunstancia mencionada anteriormente mediante la aplicación de diversas medidas.

Por ejemplo, el Manual QIAprep® Miniprep (segunda edición, diciembre de 2006) describe un proceso en el que el soporte sólido se lava con sales caotrópicas y etanol, y CN101665785A describe un tampón de lavado de soporte sólido que contiene Triton X-100. Estas aproximaciones presentan diversos inconvenientes.

WO 98/23645 se refiere a la purificación por afinidad de polipéptidos en una matriz de proteína A usando disolventes de electrolitos hidrófobos como cloruro de tetraetilamonio (TEAC) o cloruro de tetrametilamonio (TEMAC).

El documento WO 95/22389 también describe la purificación de proteínas cromatográficas, utilizando tampones de amonio.

Los documentos WO 2006/034294 y WO 2004/101809 ambos se ocupan de la captura de ácidos nucleico para espectrometría de masas mediante electropulverización, en el que se utilizan tampones de lavado que contienen acetato de amonio o bicarbonato de amonio.

La patente PE 1031626 A1 da a conocer métodos para el aislamiento de ácidos nucleicos en el que los compuestos catiónicos se añaden a una muestra biológica.

Las entradas de base de datos XP002111378 y XP002111379 de STN Chemical Abstracts describen compuestos de amina catiónicos utilizados en la preparación de DNA de plásmido a partir de bacterias.

La entrada de base de datos XP002111380 STN Chemical Abstracts se refiere a la interacción de DNA y complejos de liposomas de DNA con sales de bisamonio.

La patente WO 98/19709 se refiere a citofectinas catiónicas y liposomas que comprenden los mismos para su uso en la entrega de compuestos exógenos en las células.

Breve resumen de la invención

En un primer aspecto, tal como se ha mencionado anteriormente, la invención se refiere a un método para aislar un ácido nucleico a partir de una muestra de fluido.

Este procedimiento comprende, en una primera etapa, la combinación conjunta de un soporte sólido y la muestra de fluido en un recipiente de reacción de tal manera que el ácido nucleico puede unirse al soporte sólido.

Posteriormente, el material de soporte sólido se aísla de los otros materiales presentes en la muestra de fluido en una estación de separación, seguido de la purificación del ácido nucleico mediante la separación de la muestra de fluido del material del soporte sólido. A continuación, el material del soporte sólido se lava una o más veces con un tampón de lavado que comprende una amina catiónica como se define en las reivindicaciones.

Además, la invención proporciona el uso de un tampón de lavado que comprende una amina catiónica como se define en las reivindicaciones para la eliminación selectiva de un inhibidor del análisis de un ácido nucleico a partir de un soporte sólido al que se une dicho ácido nucleico.

Otro aspecto de la presente invención es un equipo para aislar un ácido nucleico a partir de una muestra de fluido, dicho equipo comprende los siguientes componentes:

- un tampón de unión
- un soporte sólido
- un tampón de lavado que comprende una amina catiónica tal como se define en las reivindicaciones
- opcionalmente, un tampón de elución,

en el que el tampón de unión y el tampón de lavado son tampones diferentes contenidos en diferentes recipientes.

Descripción detallada de la invención

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere en un primer aspecto a un método para aislar un ácido nucleico a partir de una muestra de fluido, dicho método comprende los pasos:

- a. combinar juntos un soporte sólido y dicha muestra de fluido en un recipiente de reacción durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para permitir que dicho ácido nucleico sea inmovilizado sobre el soporte sólido,
- b. aislar el material del soporte sólido de los otros materiales presentes en la muestra de fluido en una estación de separación,
- c. purificar el material biológico mediante la separación de la muestra de fluido del soporte sólido,
- d. lavar del soporte sólido una o más veces con un tampón de lavado que comprende una amina catiónica como se define en las reivindicaciones.

Tal como se indica anteriormente, un requisito previo frecuente para una prueba de diagnóstico con éxito es el aislamiento de material biológico sustancialmente no degradado sin el coaislamiento de cantidades significativas de impurezas que puedan interferir con el procesamiento corriente abajo de dicho material diana. Esto puede ser el caso, por ejemplo, durante el aislamiento y el análisis de proteínas o ácidos nucleicos.

Los términos "ácido nucleico" o "polinucleótido" se pueden utilizar indistintamente y se refieren a un polímero que puede corresponderse a un ácido ribonucleico (RNA) o polímero de ácido desoxirribonucleico (DNA), o un análogo de los mismos. Esto incluye polímeros de nucleótidos, tales como RNA y DNA, así como las formas sintéticas, formas modificadas de los mismos (por ejemplo, modificados química o bioquímicamente), y polímeros mixtos (por ejemplo, incluyendo tanto RNA como subunidades de DNA). Ejemplos de modificaciones incluyen metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas tales como enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, y similares), porciones colgantes (por ejemplo, polipéptidos), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, y similares), quelantes, alquilantes, y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos y similares). También se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad para unirse a una secuencia designada a través de enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Típicamente, los monómeros de nucleótidos están unidos a través de enlaces fosfodiéster, aunque las formas sintéticas de ácidos nucleicos pueden comprender otros enlaces (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos como se describe en Nielsen et al (Science 254: 1497-1500, 1991) Un ácido nucleico puede ser o puede incluir, por ejemplo, un cromosoma o segmento de cromosoma, un vector (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de DNA o RNA desnudo, el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un oligonucleótido, una sonda, y un cebador. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, de cadena sencilla, de doble cadena, o de triple de cadena y no se limita a cualquier longitud particular. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia explícitamente indicada.

Algunos de los métodos de análisis más ampliamente utilizados para los ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, PCR (véase, por ejemplo PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications; eds. Innis et al, Academic Press, San Diego, EE.UU., 1990), implica la amplificación de la molécula diana.

El término "amplificación" se refiere generalmente a la producción de una pluralidad de moléculas de ácido nucleico de un ácido nucleico diana en el que los cebadores se hibridan con sitios específicos en las moléculas de ácidos nucleicos diana con el fin de proporcionar un sitio de iniciación para la extensión por una polimerasa. La

amplificación puede llevarse a cabo por cualquier método conocido generalmente en la técnica, tales como, pero sin limitarse a: PCR estándar, PCR larga, PCR de arranque en caliente, qPCR, RT-PCR y amplificación isotérmica.

Las enzimas que producen dicha amplificación son propensas a la inhibición por diversas sustancias contenidas en muestras biológicas complejas tales como, por ejemplo, sangre total. En consecuencia, si una amplificación de ácido nucleico falla debido a la inhibición y, por tanto, por ejemplo, un patógeno en una muestra clínica no se detecta, entonces esto puede provocar consecuencias graves para el paciente en cuestión. Un "número de falsos negativos" de este tipo puede causar que un paciente no reciba tratamiento para una enfermedad no detectada que podría ser potencialmente mortal en algunos casos.

Con el fin de tratar de evitar el coaislamiento de impurezas que pueden inhibir el análisis corriente abajo del ácido nucleico, la técnica anterior ha adoptado diversos enfoques tales como los mencionados anteriormente, que comprende lavar el soporte sólido al que el ácido nucleico está unido con tampones de lavado que contienen por ejemplo, agentes caotrópicos, etanol o detergentes tales como Triton X-100.

Sin embargo, estas sustancias en sí son todos los inhibidores conocidos de la PCR y también son perjudiciales para otros métodos analíticos. Por lo tanto, teniendo dichas sustancias en un tampón de lavado puede o bien inhibir la analítica corriente abajo por sí misma, o se pueden hacer más etapas de lavado obligatorias con el fin de eliminar estos componentes una vez más, con lo que el correspondiente proceso de aislamiento es más complicado y muy probablemente más caro. Además, cada paso adicional retrasa el tiempo hasta que se obtiene un resultado, que puede ser un factor crítico especialmente en el campo del diagnóstico in vitro.

Por otra parte, algunas impurezas que actúan como inhibidores a métodos analíticos no se pueden eliminar de manera eficiente por las medidas descritas en la técnica anterior como se describe anteriormente. En este contexto, especialmente la sangre total constituye un reto considerable debido a su compleja composición.

Una estrategia común para hacer frente a este problema ha sido la de reducir la cantidad de entrada de la muestra biológica. Este intento de reducir el nivel de entrada de la impureza inhibidora lo que reduciría su concentración en la salida del proceso de aislamiento. Esto tiene la consecuencia indeseable de reducir la concentración del analito diana, lo que puede afectar negativamente el límite de detección del método de análisis.

Alternativamente, el impacto de los inhibidores en el producto líquido desde el proceso de aislamiento se puede reducir por dilución del eluato a concentraciones tales que el método de análisis corriente abajo no se ve afectado por la concentración residual del inhibidor. Este beneficio potencial también puede ser adquirido a través de la reducción en el volumen del eluato que se usa en los análisis posteriores. Estos dos métodos reducen la concentración de los inhibidores en los análisis corriente abajo, pero con una reducción concomitante en la concentración del ácido nucleico en estudio. Esto puede afectar negativamente a la sensibilidad de los análisis corriente abajo.

El experto en la técnica apreciará el valor de un método para la eliminación selectiva de los inhibidores durante el proceso de aislamiento, lo que permitirá ya sea el uso de un mayor volumen de la muestra biológica de entrada o de obviar la necesidad de la dilución del eluato del aislamiento.

Los métodos alternativos para el remedio de la inhibición incluyen la floculación de materiales proteínicos a partir del material biológico. Otros métodos incluyen el uso de glicosilasas para degradar polisacáridos que pueden actuar como inhibidores de análisis corriente abajo. Ambos de estos métodos están destinados a abordar grandes moléculas que pueden actuar como inhibidores. El experto en la técnica apreciará el valor de un método para la eliminación de inhibidores de una amplia gama de tamaños moleculares.

El método de acuerdo con la presente invención reduce eficazmente el coaislamiento de impurezas. Al lavar el soporte sólido con un tampón de lavado que comprende una amina catiónica, las impurezas que pueden interferir con el procesamiento corriente abajo, tales como el análisis del material diana aislado se eliminan al tiempo que conservan el ácido nucleico unido a la fase sólida.

Entre las ventajas del método descrito anteriormente está su capacidad para eliminar de manera eficiente ciertos inhibidores que son particularmente perjudiciales para los métodos de análisis tales como la amplificación de ácidos nucleicos como la PCR. La hemina, un producto de degradación de la hemoglobina que comprende la porción de unión a oxígeno de esta última, es abundante en muchas muestras de sangre total, ya que a menudo se libera de los eritrocitos que se lisaron por ejemplo, durante el almacenamiento. La hemina tiene considerable afinidad a soportes sólidos a los que, por ejemplo, los ácidos nucleicos se unen. Por lo tanto, el coaislamiento de hemina con ácidos nucleicos es un problema en el análisis de ácidos nucleicos de una muestra de sangre total, especialmente ya que es un fuerte inhibidor de técnicas analíticas como la PCR.

Tal como se muestra en la Tabla 1, la aplicación de un tampón de lavado con una amina catiónica de acuerdo con el método descrito anteriormente permite a la persona experta en la técnica eliminar hemina del soporte sólido de tal manera que se mejoran las condiciones de reacción para el análisis corriente abajo.

Además, el método descrito anteriormente es adecuado para eliminar otras impurezas inhibitoras tales como por ejemplo bilirrubina, ácidos húmicos, melanina o sales biliares.

Además, el método descrito más arriba por sí mismo no interfiere con el análisis corriente abajo. En la Figura 1, se muestra que una PCR llevada a cabo en un ácido nucleico aislado de la sangre o del plasma por el método descrito anteriormente mejora significativamente en comparación con un método que utiliza un tampón de lavado sin una amina catiónica tal como se define en las reivindicaciones.

[En el contexto de la presente invención, los términos "aislamiento", "purificación" o "extracción" de un material biológico diana se refieren a lo siguiente: Antes de que materiales biológicos diana como por ejemplo, ácidos nucleicos pueden ser analizados en un ensayo de diagnóstico, por ejemplo, mediante amplificación, por lo general tienen que ser purificados, aislados o extraídos de muestras biológicas que contienen mezclas complejas de diferentes componentes. Los métodos adecuados son conocidos para el experto en la técnica.

Típicamente, uno de los primeros pasos comprende la liberación de los contenidos de células o partículas virales, por ejemplo, mediante el uso de enzimas y/o reactivos químicos. Este proceso se conoce comúnmente como la lisis. Para el enriquecimiento de la sustancia analizada en cuestión en el lisado, un procedimiento útil para la unión de ácidos nucleicos implica la unión selectiva de ácidos nucleicos a superficies de vidrio de unión a partículas tales como por ejemplo partículas magnéticas en soluciones de sales caotrópicas y separando los ácidos nucleicos de los contaminantes tales como agarosa, proteínas o residuos celulares. En algunas formas de realización, se forma el cristal de las partículas usando el proceso sol-gel descrito en el documento WO 96/41811.

"Material biológico diana" o "material biológico", en el sentido de la invención, comprende todo tipo de moléculas biológicas, por ejemplo proteínas o ácidos nucleicos, y también otras moléculas que se producen en la naturaleza o son derivados o análogos sintéticos o variantes de estos. Además, el término "material biológico" comprende virus y células eucariotas y procariotas.

Una "muestra de fluido" es cualquier material fluido que puede ser sometido a un ensayo de diagnóstico y se encuentra en algunas formas de realización derivan de una fuente biológica. Una muestra de fluido puede pipetarse, de manera que el término "muestra de fluido" comprende líquidos homogéneos o homogeneizados, pero también emulsiones, suspensiones y similares. En algunas formas de realización, dicha muestra de fluido deriva de un ser humano y es un líquido corporal. En una forma de realización de la invención, la muestra de fluido es sangre humana o plasma de la sangre, orina, esputo, sudor, frotis genital o bucal o nasal, heces pipeteables, o fluido espinal. En otras realizaciones, la muestra de fluido es sangre humana o plasma sanguíneo.

El término "soporte sólido" comprende cualquier material adecuado para la unión al ácido nucleico, por ejemplo, partículas magnéticas con o sin recubrimiento de vidrio, gel de sílice, fibras de vidrio, filtros de fibra de vidrio, papel de filtro, etc., mientras que el soporte sólido no se limita a estos materiales. El soporte sólido puede ser proporcionado en la forma, por ejemplo, de columnas cromatográficas, membranas de unión en recipientes, tales como partículas de unión, por ejemplo, perlas, o similares.

En algunas realizaciones del método descrito anteriormente, el soporte sólido comprende partículas de unión a ácidos nucleicos, en otras realizaciones uno o más de los materiales seleccionados a partir de sílice, metal, óxidos de metal, plástico, polímeros y oligonucleótidos de captura. En aún otras formas de realización el soporte sólido son partículas de vidrio magnéticas.

Los términos "vasos" o "recipiente de reacción" comprenden, pero no se limitan a, tubos, o los pocillos de placas de micropocillos, placas de pozos profundos u otros tipos de placas de múltiples pocillos, en la que la inmovilización del ácido nucleico en el soporte sólido se lleva a cabo. Los límites exteriores o paredes de estos recipientes son químicamente inerte, de forma que no interfieren con la inmovilización que tiene lugar en su interior.

"Inmovilizar", en el contexto de la invención, significa capturar objetos tal como el ácido nucleico. En particular, "inmovilizado sobre el soporte sólido", significa que el objeto o los objetos están asociados con el soporte sólido con el propósito de su separación de cualquier medio que les rodee, y se pueden recuperar, por ejemplo, por separación del material de soporte sólido en un momento posterior. En este contexto, la "inmovilización" puede, por ejemplo, comprender la adsorción de ácidos nucleicos a un vidrio u otras superficies adecuadas de materiales sólidos como se ha descrito anteriormente. Por otra parte, los ácidos nucleicos pueden "inmovilizarse" específicamente mediante la unión a oligonucleótidos de captura, en el que los ácidos nucleicos se unen por emparejamiento de bases a los ácidos nucleicos esencialmente complementarios unidos a un soporte sólido. En el último caso, la inmovilización específica conduce a la unión predominante de los ácidos nucleicos diana.

Una "estación de separación" es un dispositivo o un componente de un sistema analítico que permite el aislamiento del soporte sólido de los otros materiales presentes en la muestra de fluido. Tal estación de separación puede por ejemplo comprender, aunque no se limita a estos componentes, una centrífuga, un estante con tubos de filtro, un imán, u otros componentes adecuados. En algunas formas de realización, la estación de separación comprende uno o más imanes. En ciertas realizaciones, uno o más imanes se utilizan para la separación de partículas magnéticas, tales como, por ejemplo, partículas de vidrio magnéticas, como un soporte sólido. Si, por ejemplo, la muestra de

fluido y el material de soporte sólido se combinan juntos en los pocillos de una placa de múltiples pocillos, a continuación, uno o más imanes comprendidos por la estación de separación pueden, por ejemplo, ponerse en contacto con la propia muestra de fluido mediante la introducción de los imanes en los pocillos, o dichos uno o más imanes pueden ser llevados cerca de las paredes exteriores de los pozos con el fin de atraer las partículas magnéticas y posteriormente separarlos del líquido circundante.

Un "tampón de lavado" es un fluido que está diseñado para eliminar los componentes no deseados, especialmente en un procedimiento de purificación. Tales tampones son bien conocidos en la técnica. En el contexto de la purificación del ácido nucleico, el tampón de lavado es adecuado para lavar el material de soporte sólido con el fin de separar el ácido nucleico inmovilizado de cualquier componente no deseado. Como se describió anteriormente, el tampón de lavado utilizado en el contexto de la presente invención comprende una amina catiónica. El tampón de lavado puede, por ejemplo, contener etanol y/o agentes caotrópicos en una solución tamponada. El tampón de lavado también puede ser una solución tamponada sin etanol y/o agentes caotrópicos como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, el tampón de lavado tiene un valor de pH ácido. También en algunas realizaciones, el tampón de lavado consiste en una solución acuosa tamponada y una amina catiónica tal como se define en las reivindicaciones. A menudo la solución de lavado u otras soluciones se proporcionan como soluciones madre que tienen que diluirse antes de su uso. Un tampón de lavado, que en algunas realizaciones es un tampón acuoso, comprende una sustancia tampón. Las sustancias tampón son generalmente importantes para mantener un cierto valor de pH o intervalo de pH en una solución. Este es el requisito previo para la mayoría de los sistemas biológicos, y en su mayoría también deseable en las reacciones in vitro. Las sustancias tampón útiles en el contexto de la invención son tampones de citrato tales como citrato de sodio, pero también tampones Tris (tris-(hidroximetil)-aminometano) tales como Tris HCl, tampones fosfato, N-(2-hidroxietil) piperazina-N' (ácido 2-etanosulfónico) (HEPES), tampones de acetato, pero también otras sustancias tampón se pueden utilizar en el contexto de la invención.

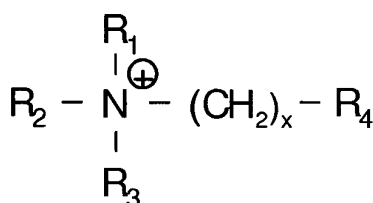
El lavado en el procedimiento según la invención requiere un contacto más o menos intensivo del soporte sólido y el ácido nucleico inmovilizado sobre el mismo con el tampón de lavado. Existen diferentes métodos posibles para lograr esto, por ejemplo, incubación de una columna cromatográfica con el tampón de lavado, o en el caso de partículas de unión tales como por ejemplo perlas, sacudiendo el tampón de lavado con el soporte sólido en o junto con el correspondiente recipiente o recipientes. Otro método ventajoso es aspirar y dispensar la suspensión que comprende tampón de lavado y soporte sólido una o más veces. Este método es en algunas realizaciones se lleva a cabo usando una pipeta, en el que dicha pipeta en algunas formas de realización comprende una punta de pipeta desechable en el que dicha suspensión se aspira y de la que se dispensa de nuevo.

El término "amina catiónica", como se usa aquí, significa un compuesto que comprende al menos un átomo de nitrógeno cargado positivamente. Dicha carga positiva puede ser, por ejemplo debida a la protonación de amoníaco o de una amina primaria, secundaria o terciaria, o debido a la alquilación de la amina para formar un ion de amonio cuaternario. En algunas realizaciones de la invención, se añade dicha amina catiónica al tampón de lavado como una sal, en ciertas realizaciones como una sal de ácido acético, ácido clorhídrico o ácido cítrico. En algunas realizaciones, la carga positiva se basa en un valor de pH apropiado de los medios circundantes. La persona experta en la técnica está familiarizada con las medidas para ajustar el valor de pH de una manera apropiada para mantener la carga positiva de la amina catiónica.

La carga positiva dependiente del pH antes mencionada es el resultado de la protonación en solución acuosa. Más específicamente, la amina catiónica tal como se utiliza en el contexto de la presente invención puede adquirir su carga positiva a través de la protonación de al menos uno de sus átomos de nitrógeno. La persona experta en la técnica es consciente de la circunstancia de que tal protonación es una función de equilibrio en función del valor de pH como se ha descrito anteriormente. En el contexto de la presente invención, por tanto no se requiere que todas las moléculas de la amina en el tampón de lavado estén protonadas con el fin de conseguir el efecto técnico deseado.

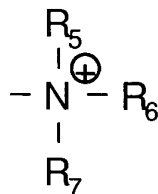
En otras realizaciones, como en el caso de las aminas cuaternarias, dicha carga positiva es prácticamente independiente del valor de pH de los medios circundantes.

Un aspecto de la invención es el método descrito anteriormente, en el que dicha amina catiónica es una amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de la fórmula general I,



Fórmula I

en donde R_1 y R_2 pueden ser, independientemente el uno del otro, un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo,
 R_3 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, x es un número entero entre 1 y 12,
 R_4 es un residuo de acuerdo con la fórmula general II



Fórmula II

en el que R_5 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo,

R_6 pueden ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, o $-(CH_2)_3-NH_2$, o $-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$, y

R_7 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo. El término "alquilo" denota un grupo hidrocarburo monovalente saturado lineal o ramificado de 1 a 12 átomos de carbono. En realizaciones particulares, el alquilo tiene de 1 a 7 átomos de carbono, y en realizaciones más particulares de 1 a 4 átomos de carbono. Los ejemplos de alquilo incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, n-butilo, iso-butilo, sec-butilo, o terc-butilo.

El término "arilo" denota un sistema de anillo hidrocarburo monocíclico o bicíclico aromático monovalente que comprende de 6 a 10 átomos de carbono en el anillo. Los ejemplos de porciones arilo incluyen fenilo y naftilo.

El término "cicloalquilo" denota un grupo hidrocarburo monocíclico o bicíclico saturado monovalente de 3 a 10 átomos de carbono en el anillo. En realizaciones particulares el cicloalquilo denota un grupo hidrocarburo monocíclico saturado monovalente de 3 a 8 átomos de carbono en el anillo. Bicíclico significa que comprende dos carbociclos saturados que tienen uno o más átomos de carbono en común. Los grupos cicloalquilo particulares son monocíclicos. Ejemplos de cicloalquilo monocíclico son ciclopropilo, ciclobutanilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo. Ejemplos de cicloalquilo bicíclico son biciclo[2.2.1]heptanilo, o biciclo[2.2.2]octanilo.

El término "heteroarilo" denota un sistema de anillo aromático heterocíclico mono- o bicíclico monovalente de 5 a 12 átomos en el anillo, que comprende 1, 2, 3 o 4 heteroátomos seleccionados de N, O y S, siendo de carbono los restantes átomos del anillo. Ejemplos de porciones heteroarilo incluyen pirrolilo, furanilo, tienilo, imidazolilo, oxazolilo, tiazolilo, triazolilo, oxadiazolilo, tiadiazolilo, tetrazolilo, piridinilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, triazinilo, azepinilo, diazepinilo, isoxazolilo, benzofuranilo, isotiazolilo, benzotienilo, indolilo, isoindolilo, isobenzofuranilo, bencimidazolilo, benzoxazolilo, benzoisoxazolilo, benzotiazolilo, benzoisotiazolilo, benzoisotiazolilo, benzoisotiazolilo, benzotiadiazolilo, benzotriazolilo, purinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, quinazolinilo, o quinoxalinilo.

En algunas realizaciones, dicha amina catiónica se selecciona del grupo de putrescina, etilendiamina, cadaverina, espermidina, espermina, diamina de trimetileno, y amonio.

En algunas realizaciones del método descrito, dicha amina catiónica es una diamina de alquilenos.

Una "diamina de alquilenos" es un compuesto "alquilo" tal como se ha especificado anteriormente sustituido con dos grupos amino. En algunas realizaciones, dichos grupos amino se encuentran en los correspondientes extremos de las cadenas de hidrocarburos lineales. En el contexto de la invención, una diamina de alquilenos puede llevar sustituyentes, por ejemplo, tal como se describe en las Fórmulas I y II, o puede no estar sustituido.

Las diaminas de alquilenos no sustituidas confieren la ventaja de que los dos grupos amino terminales, en su forma protonada, estén estéricamente bien posicionados para interactuar con las porciones con carga negativa de impurezas no deseadas, como por ejemplo, hemina.

En algunas realizaciones, la diamina de alquilenos se selecciona del grupo de etilendiamina, putrescina y cadaverina.

Entre las diaminas de alquilenos, estos compuestos muestran resultados particularmente buenos cuando se utilizan en el método descrito anteriormente. Son eficaces en la eliminación de impurezas inhibitorias y no interfieren con el análisis corriente abajo.

Como se mencionó anteriormente, el ácido nucleico se aísla a menudo con el fin de someterlo a métodos analíticos. Por lo tanto, un aspecto de la invención es el método descrito anteriormente, que comprende además el paso

e. Análisis del ácido nucleico aislado.

Este tipo de análisis puede comprender, por ejemplo, análisis de ácidos nucleicos como la PCR, incluyendo PCR en tiempo real o métodos de secuenciación, o análisis de proteínas tales como por ejemplo, ensayos basados en anticuerpos como ELISA u otros métodos. El análisis también puede incluir métodos para la detección del material biológico aislado, como por ejemplo, técnicas basadas en quimioluminiscencia o electroluminiscencia, radiografía u otros métodos de detección. En algunas realizaciones, el ácido nucleico aislado se analiza mediante la amplificación, en algunas realizaciones por PCR, en otras formas de realización mediante PCR en tiempo real.

El método descrito anteriormente es particularmente útil en el contexto de aislamiento de ácidos nucleicos con un posible análisis posterior, por ejemplo, mediante PCR.

Por lo tanto, en el método descrito anteriormente, el material diana biológico es un ácido nucleico.

Otro aspecto de la invención es el uso de un tampón de lavado que comprende una amina catiónica como se define en las reivindicaciones para la eliminación selectiva de un inhibidor del análisis de un ácido nucleico a partir de un soporte sólido al que dicho ácido nucleico está unido.

"Eliminación selectiva", en el contexto de la invención, significa la eliminación de la mayor parte de un compuesto no deseado de un objeto mientras que otros compuestos en gran medida permanecen unidos a este último. Más específicamente, significa la eliminación de la mayor parte de un inhibidor de análisis corriente abajo de un ácido nucleico a partir de un soporte sólido al que dicho ácido nucleico está unido. Es evidente para una persona experta en la técnica que dicha selectividad por lo general no es cuantitativa, es decir, una parte menor del material diana puede retirarse del soporte sólido, junto con la mayor parte de las impurezas no deseadas.

El uso de una amina catiónica tal como se define en las reivindicaciones en un tampón de lavado para eliminar impurezas de un soporte sólido es especialmente ventajoso cuando se aíslan ácidos nucleicos a partir de una muestra de fluido.

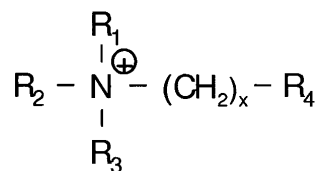
Por lo tanto, en el uso descrito anteriormente, el material diana biológico es un ácido nucleico y el análisis corriente abajo comprende o consiste en la amplificación del ácido nucleico.

Como se ha indicado anteriormente, los métodos analíticos que implican la amplificación de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, PCR a menudo son muy sensibles a la inhibición por impurezas derivadas de muestras de fluidos que contienen material biológico, de manera que el método y el uso descrito anteriormente son especialmente útiles en este contexto.

Entre las posibles muestras de fluidos, la sangre total es una matriz especialmente compleja. Dado que, por ejemplo, la hemina es abundante en la sangre total, el método y el uso descrito anteriormente son particularmente útiles en este contexto.

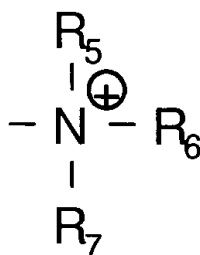
Por lo tanto, un aspecto de la invención es el método o el uso descrito anteriormente, en el que la muestra de fluido es sangre total.

En analogía con el método descrito más arriba, un aspecto de la invención es el uso descrito anteriormente, en el que dicha amina catiónica es una amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de la fórmula general I,



Fórmula I

en donde R_1 y R_2 pueden ser, independientemente el uno del otro, un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, R_3 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, x es un número entero entre 1 y 12, R_4 es un residuo de acuerdo con la fórmula general II



Fórmula II

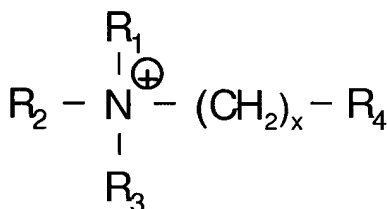
- 5 en el que R_5 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, R_6 pueden ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, o $-(CH_2)_3-NH_2$, o $-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$, y R_7 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo.

- 10 Un aspecto adicional de la invención es un equipo para aislar un ácido nucleico a partir de una muestra de fluido, dicho equipo comprende los componentes:

- un tampón de unión
- un soporte sólido
- 15 • un tampón de lavado que comprende una amina catiónica como se define en las reivindicaciones
- opcionalmente, un tampón de elución,

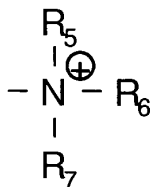
en el que el tampón de unión y el tampón de lavado son diferentes tampones contenidos en diferentes recipientes.

- 20 En analogía con el método y el uso descrito más arriba, un aspecto de la invención es el equipo descrito anteriormente, en el que dicha amina catiónica es una amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de la fórmula general I,



Fórmula I

- 25 en donde R_1 y R_2 pueden ser, independientemente el uno del otro, un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, R_3 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, x es un número entero entre 1 y 12, R_4 es un residuo de acuerdo con la fórmula general II



Fórmula II

- 35 en el que R_5 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, R_6 pueden ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, o $-(CH_2)_3-NH_2$, o $-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$, y R_7 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo.

- 40 Otro aspecto de la invención es el equipo descrito anteriormente, en el que

- dicho tampón de unión comprende un agente caotrópico y/o
- dicho soporte sólido comprende sílice y/o un material magnético y/o
- 45 • dicho tampón de lavado que comprende una amina catiónica tiene un valor de pH por debajo de 7 y/o

- dicho tampón de elución es acuoso y/o comprende un agente conservante.

El soporte sólido y el tampón de lavado que comprende una amina catiónica como se define en las reivindicaciones se han definido y descrito anteriormente.

Un "tampón de unión" es un medio líquido que facilita la unión del ácido nucleico al soporte sólido. En algunas realizaciones, el tampón de unión también sirve como un tampón de lisis para alterar células o partículas virales, liberando de este modo el ácido nucleico.

Los agentes caotrópicos, que generalmente perturban la estructura ordenada de moléculas de agua en la solución y las fuerzas de unión no covalentes en y entre las moléculas, pueden hacer varias contribuciones al procedimiento de preparación de la muestra. En particular, pero no solamente, se pueden aplicar como inhibidores de RNasa para perturbar la estructura terciaria de la nucleasa. Por lo general, no es necesario aplicar más inhibidor de RNasa al tampón de lisis. Además, los agentes caotrópicos contribuyen a la ruptura de las membranas biológicas, tales como membranas de plasma o las membranas de los orgánulos celulares si están presentes. Además, pueden desempeñar un papel significativo en la unión de ácidos nucleicos a superficies como vidrio. Los agentes caotrópicos útiles en el contexto de la invención son, por ejemplo sales de guanidinio como tiocianato de guanidinio o hidrocloreto de guanidinio o el cloruro de guanidinio o isotiocianato de guanidinio, urea, percloratos tales como por ejemplo perclorato de potasio, otros tiocianatos o yoduro de potasio.

El uso de alcohol en un tampón de unión también puede ser por ejemplo ventajoso para la preparación de ácidos nucleicos, tal como la persona experta en la técnica lo conoce. En el contexto de la invención es útil, por ejemplo, polidocanol, mientras que otros alcoholes también se pueden utilizar. El uso de polidocanol para la preparación de ácidos nucleicos, por ejemplo, se ha descrito en el documento PE 1 932 913.

Los agentes reductores también pueden contribuir a la desnaturalización de componentes no deseados tales como por ejemplo enzimas degradantes. En particular, los agentes reductores, tal como se conocen ampliamente en la técnica, escinden los enlaces disulfuro inter- e intramoleculares, que son especialmente importantes para la estructura terciaria de muchas proteínas. En el contexto de la invención son útiles los agentes reductores tales como por ejemplo ditiotreitól (DTT), pero se puede emplear también otros agentes reductores conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, 2-mercaptoetanol.

Un "tampón de elución" en el contexto de la invención es un líquido adecuado para separar el ácido nucleico del soporte sólido. Dicho líquido puede ser, por ejemplo, agua o soluciones salinas acuosas destiladas, tales como por ejemplo tampones Tris como Tris HCl, o HEPES, u otros tampones adecuados conocidos por el experto en la materia. El valor de pH de un tampón de elución de este tipo es preferiblemente alcalino o neutro. Dicho tampón de elución puede contener otros componentes tales como agentes conservantes, como por ejemplo, quelantes como EDTA, que estabiliza el material diana biológico aislado, tal como por ejemplo ácidos nucleicos, por inactivación de las enzimas de degradación.

Tal como se ha mencionado en el contexto del método y el uso descrito anteriormente, el material diana biológico es un ácido nucleico. En algunas formas de realización del equipo descrito anteriormente, la muestra de fluido es sangre total.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: curvas de crecimiento de PCR de un control de proceso completo (FPC) y un control de inhibición (IC). El FPC se recuperó de la sangre total usando un tampón de lavado que contiene putrescina o un tampón de lavado de referencia sin una amina catiónica, respectivamente, el IC se añadió directamente a la mezcla maestra de PCR.

Fig.2: tolerancia a la inhibición por heces como función del volumen de procesamiento con diferentes dispositivos de muestreo.

Descripción detallada de las figuras

La figura 1 muestra diferentes curvas de crecimiento de PCR de un control de proceso completo (FPC) y un control de inhibición (IC). El FPC se recuperó de la sangre total usando un tampón de lavado que contiene dihidrocloruro de putrescina en una concentración de 22 mM o un tampón de lavado de referencia, respectivamente, este último sin una amina catiónica pero por lo demás idénticamente formulada. El IC se añadió directamente a la mezcla maestra de PCR.

Figura 1A: curvas de crecimiento de PCR de un control de procesos completo de DNA (FPC) recuperado usando un tampón de lavado con putrescina (línea continua) y un tampón de lavado de referencia sin amina catiónica (línea de puntos). Las curvas muestran claramente un mejor resultado con tampón de lavado que contiene amina, lo que sugiere una mejora en la recuperación de DNA de manera significativa durante la preparación de la muestra.

Figura 1B: curvas de crecimiento de PCR de un control de inhibición de DNA (IC) se añadió a la mezcla maestra de PCR después de utilizar en la preparación de la muestra un tampón de lavado con putrescina (línea continua) y un tampón de lavado de referencia sin amina catiónica (línea de puntos). El resultado muestra que el rendimiento de la PCR es comparable en ambos casos.

Figura 1C: curvas de crecimiento de PCR de un control de procesos completo de RNA (FPC) recuperado usando un tampón de lavado con putrescina (línea continua) y un tampón de lavado de referencia sin amina catiónica (línea de puntos). Las curvas muestran claramente un mejor resultado con tampón de lavado que contiene amina, lo que sugiere una mejora en la recuperación de RNA de manera significativa durante la preparación de la muestra.

Figura 1D: curvas de crecimiento de PCR de un control de inhibición de RNA (IC) se añadió a la mezcla maestra de PCR después de utilizar en la preparación de la muestra un tampón de lavado con putrescina (línea continua) y un tampón de lavado de referencia sin amina catiónica (línea de puntos). El resultado muestra que el rendimiento de la PCR es comparable en ambos casos.

Fig.2: tolerancia a la inhibición por heces como función del volumen de procesamiento con diferentes dispositivos de muestreo. Con putrescina en el tampón de lavado, la tolerancia de las heces inhibidor aumentó con una señal fluorescente aceptable (RFI) y los valores de Ct.

Ejemplos

Ejemplo 1

Ensayo de compuestos de amina para la preparación selectiva de muestras biológicas

Diseño experimental

Con el fin de obtener una medida exacta de la eficiencia de los procesos de preparación de muestras experimentales, se ideó un método para amplificar y detectar simultáneamente 2 dianas sintéticas. Estas dianas se introducen en la muestra de trabajo preparación/amplificación/detección en diferentes puntos del proceso, mediante el cual se introduce un control de proceso completo (FPC) en una matriz de muestras y un control de inhibición (IC) se introduce en la mezcla maestra de PCR. La detección del FPC está influenciado por la eficiencia con la que esta diana se recupera a través del proceso de preparación de muestras compuesto con el efecto de inhibidores de la PCR en la amplificación y detección de esta diana. El IC no pasa por el proceso de preparación de muestras, por lo que la amplificación y detección de este material está influida solamente por la presencia de inhibición de la PCR. De esta manera, el efecto de cambiar elementos del proceso de preparación de muestras, (por ejemplo, tipo de ácido nucleico, matriz de muestras, procesos y combinaciones de reactivos) en la recuperación de ácidos nucleicos puede ser evaluada y diferenciada del efecto de inhibición de la PCR. Las 2 dianas deberían ser amplificadas y detectadas con eficiencias similares, y deberían estar influenciadas por los inhibidores en sustancialmente la misma medida, a fin de que este diseño experimental sea válido.

Desde una perspectiva de diagnóstico ambas formas de DNA y RNA de ácidos nucleicos son adecuados para el estudio. Por lo tanto, es ventajoso construir las dianas sintéticas para este marco experimental en ambas formas. Con el fin de normalizar la variación de las eficiencias de amplificación de las diferentes dianas, la secuencia de ácido nucleico de los amplicones debe ser la misma para ambas formas de cada una de las dianas. Sin embargo, ya que se introducen en los procesos bajo diferentes condiciones, estos no necesitan ser configurados en diferentes formas. El FPC de DNA puede introducirse en la matriz de muestras en 2 formas, como DNA plasmídico o como construcción de DNA del fago λ encapsulado. Este último imita más estrechamente una partícula de virus de DNA recubierto de proteína, por ejemplo, de lo que lo haría el plásmido. La partícula de fago λ requiere la lisis con el fin de liberar el DNA encapsulado adecuado para la captura en una superficie de sílice. El IC correspondiente para esta diana de DNA también debe ser en forma de DNA, pero ya que este se introduce después de la lisis, este debería estar en la forma de un plásmido. Análogamente, para el RNA, el FPC es preferiblemente una construcción de RNA blindada, y el IC es un transcrito de RNA.

Con el fin de obtener un análisis más completo del eluato derivado de cualquier proceso de preparación de muestras, es conveniente analizar químicamente los eluatos, para medir cualquier cambio en la composición química del material eluido provocada por el cambio de proceso en estudio. Se desarrollaron métodos específicos para identificar y cuantificar los inhibidores específicos del proceso de PCR. El aislamiento de ácidos nucleicos a partir de especímenes de muestras complejas puede conducir a eluidos en el que el rendimiento de PCR es muy pobre debido a la copurificación de posibles inhibidores de la PCR junto con los ácidos nucleicos deseados. Se observó que mediante el procesamiento de la sangre total con reactivos de preparación de muestras estándar, se puede obtener un eluato rojizo lo que sugiere la presencia de moléculas que contienen hierro tales como la hemoglobina o hemina. Era importante establecer métodos analíticos para detectar y cuantificar dichos inhibidores. Otros ejemplos de inhibidores de la PCR conocidos, tales como bilirrubina, ácido húmico o melanina (como el que se obtiene a partir de muestras de tejido de melanoma) fueron candidatos para análisis de fluidos y se desarrollaron métodos analíticos adecuados para estos.

Dos métodos experimentales se llevaron a cabo para la evaluación de la eliminación de inhibidor de flujos de trabajo de preparación de muestras. Con el fin de detectar posibles tampones de lavado por su capacidad para eliminar los inhibidores, se diseñaron sistemas modelo, en los que se añadieron inhibidores conocidos de plasma humano y se utilizó este plasma en las evaluaciones de los flujos de trabajo de preparación de muestras. De esta manera podrían examinarse muchas combinaciones de tampones de lavado, junto con varios inhibidores conocidos diferentes. El segundo tipo de experimento utilizó sangre total como muestra de entrada. Este experimento se utilizó para verificar el rendimiento de los tampones de lavado candidatos descubiertos por medio de el proceso de selección anterior.

Configuración experimental

Las muestras se sometieron a una preparación de muestras totalmente automatizada en un instrumento STAR de Hamilton modificado y la posterior amplificación/detección en un LightCycler 480 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/DE). El volumen de proceso de muestras de 850 µl fue constante para todas las matrices de muestras analizadas. Se implementó un volumen de entrada de plasma en EDTA y suero de muestras de 850 µl. Un volumen de entrada de muestra de sangre total fresca (resp. muestra de cadaverina) de 150 µl (resp. 100 µl) se diluyó con 700 µl (resp. 750 µl) de diluyente de la muestra para alcanzar el volumen total del proceso de 850 µl.

Preparación de muestras

Las muestras se sometieron a una preparación de muestras totalmente automatizada en un instrumento STAR de Hamilton modificado (comparar WO 2012/013733). El principio de la preparación de muestras se puede describir en cuatro etapas principales:

- Montaje de la muestra
- Lisis y unión
- Lavado
- Elución

Los siguientes párrafos describen los pasos individuales en más detalle.

Secuencia de montaje de muestras

Etapas de preparación de muestras

La muestra biológica a analizar (volumen en función de la matriz de la muestra) está, si es necesario, diluida con diluyente de muestra para alcanzar un volumen final del proceso de 850 µl. Se añade un volumen total de 50 µl de reactivo de FPC, seguido de 50 µl de los reactivos de la proteasa. A esta mezcla se añaden 100 µl de reactivo de partículas de vidrio magnéticas (MGP) (compárese el documento WO 96/41811; pigmentos magnéticos).

Etapas de lisis/unión

Para la muestra montada se añade 1250 µl de tampón de lisis y la reacción de unión de lisis se lleva a cabo a 40 ° C durante 10 min. en agitación constante que permite la lisis celular y la unión de ácidos nucleicos a las partículas de vidrio magnéticas. Un campo magnético se aplica para permitir la separación magnética de los ácidos nucleicos unidos a MGP de los líquidos circundantes. La solución de lisis circundante al MGP se retira y el campo magnético se para.

Etapas de lavado

En una etapa inicial de lavado, un volumen total de 900 µl de tampón de lavado se añade seguido de mezclado. Se añade un volumen adicional de 1500 µl de tampón de lavado seguido de mezclado. Se aplica un campo magnético para permitir la separación magnética de los ácidos nucleicos unidos a MGP de los líquidos circundantes. La solución de lavado se elimina y el campo magnético se para. En una segunda etapa de lavado, un volumen total de 2000 µl se añadió seguido de mezclado. Se aplica un campo magnético para permitir la separación magnética de los ácidos nucleicos unidos a MGP de los líquidos circundantes. La solución de lavado se elimina y el campo magnético se para.

Etapas de elución

Se añade un volumen total de 50 µl de tampón de elución y los ácidos nucleicos se eluyen del MGP con lavados repetidos de 6 minutos a 80 °C. Se utiliza un volumen final de 25 µl de eluido para la PCR de ensamblaje.

Reactivos de preparación de muestras

Diluyente de Muestra	Concentración
Tris, pH 7,4	5 mM

Metilparabeno	0,1% (p/v)
Azida de sodio	0,095% (p/v)

Reactivo FPC	Concentración
Tris, pH 8,0	10 mM
EDTA	0,1 mM
Azida de sodio	0,05% (p/v)
poli (rA) ARN	20 mg / L
DNA FPC (resp. RNA)	2 copias/ μ l (6 copias/ μ L)

Reactivo de la proteasa	Concentración
Tris, pH 5,5	10 mM
EDTA	1 mM
cloruro de calcio	5 mM
Acetato de calcio	5 mM
Glicerol 50% (p/v)	proteasa 80 mg/mL

Reactivo MGP	Concentración
Tris, pH 8,5	30 mM
Metilparabeno	0,1% (p/v)
azida de sodio	0,095% (p/v)
MGP en polvo	60 mg/mL

Tampón de lisis	Concentración
DTT	2% (p/v)
polidocanol	5% (p/v)
tiocianato de guanidina	4 M
citrato de sodio, pH 5,8	50 mM

5

Tampón de lavado (modo mejor)	Concentración
putrescina dihidrocloruro > 98,0% (Sigma Aldrich)	22 mM
citrato de sodio	7,5 mM
metilparabeno	0,1% (p/v)
NaOH, 1 M, (Sigma Aldrich)	para llevar el pH a 4,1

Tampón de elución	concentración
Tris, pH 8,5	5 mM
metilparabeno	0,2% (p/v)

Ejemplos adicionales de tampones de lavado

- 10 Además del tampón de lavado que contiene putrescina (mejor modo) descrito anteriormente, varios tampones de lavado que contienen aminas se han aplicado con éxito (datos no mostrados) en el procedimiento de preparación de muestras descrito en este documento. La putrescina se puede sustituir por las siguientes aminas:

Candidatos de amina para la eliminación de inhibidor en tampón de lavado	Concentración
dihidrocloruro de etilen diamina	26 mM
diacetato de etilen diamina	26 mM
dihidrocloruro de espermidina	22 mM
dihidrocloruro de cadaverina	26 mM
dihidrocloruro de espermina	52 mM
acetato de amonio	22 mM
dihidrocloruro de trimetilendiamina	26 mM

- 15 Ensayo de PCR

Montaje de PCR

Un volumen total de 25 µl de eluato se transfiere a una placa de 96 micropocillos. El volumen de reacción de PCR de 50 µl se monta como sigue:

Componente de reacción de PCR	Volumen
Eluato	25 µl
MMx R1	5 µl
MMx R2	15 µl
reactivo IC2	5 µl

Reactivo IC	Concentración
Tris, pH 8,0	10 mM
EDTA	0,1 mM
Azida de sodio	0,05% (p/v)
Poli (rA) RNA	20 mg/L
IC DNA (resp. de RNA)	50 copias/µL (80 copias/µl)

5

MMx R1 (en H ₂ O)	Concentración
Mn (Ac) ₂ * 4H ₂ O (pH 6,1 ajustado con ácido acético)	50 mM
NaN ₃ , tamponado con Tris 10 mM a pH 7	0,36 µM

MMx R2 (en H ₂ O)	Concentración
DMSO (%)	13,33 µM
NaN ₃ , tamponado con Tris 10 mM a pH 7	366,667 µM
KOAc (pH 7,0)	0,09 µM
Glicerol (%)	13,33 µM
Tricina pH 8,0	166,667 µM
NTQ21-46A - aptámero	0,741 µM
UNG (U/µL)	0,67 µM
Igepal (solución madre precalentada a 37 °C) (%)	0,08 µM
dGTP	1,667 µM
dATP	1,667 µM
dCTP	1,667 µM
dUTP	3,333 µM
ZO5-D de la polimerasa (U/µl)	2 µM
Id. de Sec. N°: 1	0,5 µM
Id. de Sec. N°: 2	0,5 µM
Id. de Sec. N°: 3	0,5 µM
Id. de Sec. N°: 4	0,5 µM
Id. de Sec. N°: 5	0,333 µM
Id. de Sec. N°: 6	0,333 µM

Amplificación y detección

- 10 Para la amplificación y detección, la placa de micropocillos se selló manualmente y se transfirió a un LightCycler 480. El siguiente perfil de PCR fue utilizado manualmente:

	Ciclos	Objetivo (°C)	Mantenimiento (hh:mm:ss)	Rampa
Pre-PCR	1	50	00:02:00	4,4
		94	00:00:05	4,4
		55	00:02:00	2,2
		60	00:06:00	4,4
		65	00:04:00	4,4
1.Medic.	5	95	00:00:05	4,4
		55	00:00:30	2,2
2.Medic.	45	91	00:00:05	4,4
		58	00:00:25	2,2
Post	1	40	00:02:00	2,2

Dianas sintéticas

Las dianas sintéticas (FPC e IC) están constituidos por partículas de DNA plasmídico linealizado o transcripciones de RNA. Las partículas de ácido nucleico se utilizan en números de copias predefinidos por reacción.

- 5 El concepto general de diseño para estas dianas consiste en una secuencia de ácido nucleico común que puede ser bien RNA o DNA, y será blindado como tal en partículas denominadas RNA blindado (partículas de proteína de recubrimiento de fago MS2) o de DNA blindado (partículas de fago lambda). Cada diana tendrá un correspondiente juego de cebadores específicos y sondas TaqMan diferencialmente marcadas con fluorescencia para utilizarse en todos los ensayos, eliminando así la influencia en función del tipo de diana sobre la estimación de la eficiencia de preparación de muestras. Para este fin, cada diana, junto con sus correspondientes cebadores y sondas, se diseñó utilizando el programa BLAST del NCBI y shuffleseq EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite) para generar una secuencia única. La sonda FPC se marcó con Cy5 y la sonda IC se marcó con tinción HEX. Las construcciones se diseñaron y se clonaron para su posterior evaluación. Para producir RNA blindado la secuencia se clonó en el vector pCP-1. Para producir transcripción la secuencia se clonó en pSP64a. Para producir el DNA blindado la secuencia se clonó en lambda GT11.

Control interno	Número de copias (cp) por reacción (rxn)
DNA IC (resp. RNA)	100 cp/rxn (300 cp/rxn)
DNA FPC (resp. RNA)	250 cp/rxn (400 copias/ μ L)

DNA: plásmido linealizado

- 20 Un plásmido recombinante construido usando el vector de clonación poli(A) pSP64a (Promega) se linealizó con la enzima de restricción EcoRI.

Región de interés del plásmido recombinante pEF054 (FPC)

- 25 La secuencia de interés del plásmido pEF054 recombinante se linealizó con la enzima de restricción EcoRI IC en el vector de clonación poli (A) pSP64a (después de 270 pb) que corresponde a Id. de Sec. N°: 7:

Plásmido recombinante pEF066 (IC)

- 30 La secuencia de interés del plásmido pEF066 recombinante se linealizó con la enzima de restricción EcoRI IC en el vector de clonación poli (A) pSP64a (después de 503 pb) que corresponde a Id. de Sec. N°: 8.

Análisis químico del eluato (ISS)

- 35 Durante los experimentos en los que se analizaron diferentes tampones de lavado, se desarrolló una forma de controlar la eficacia de la eliminación de inhibidores. Los inhibidores de la PCR candidatos se analizaron en los eluatos obtenidos con el proceso de preparación de la muestra descrito anteriormente. La eliminación de estos inhibidores específicos se utiliza para monitorizar la eficiencia de los tampones de lavado. Sus propiedades inhibitoras de la PCR se evaluaron al añadirlos directamente en la PCR y observando la respuesta de la PCR con diferentes concentraciones de los correspondientes compuestos. Para los experimentos en los que se procesa la sangre total, el inhibidor de elección era hemina. Para analizar si la amina añadida en el tampón de lavado se puede utilizar con otros especímenes de muestras difíciles, estas últimos se simulaban mediante la adición de melanina, sales biliares y ácido húmico al plasma humano en el proceso de preparación de muestras. Los métodos de análisis se desarrollaron para permitir la cuantificación relativa de los compuestos específicos en los eluatos.

- 45 Detección de hemina (ISS)

- La detección basada en HPLC de hemina se llevó a cabo a 20 °C en un aparato de cromatografía líquida Agilent 1100 acoplado con un detector agilent PDA. La medición se llevó a cabo utilizando la colección de espectros de absorbancia 3D entre 200 y 800 nm y la salida se proporcionó mediante la detección de onda única, tanto en $\lambda = 254$ como a 400 nm. Las muestras de eluato se centrifugaron durante 3 min a 4000 rpm y 25 °C y el sobrenadante se utilizó para el análisis. Se inyectó una muestra de 30 μ L del eluato y se separó en una columna de HPLC polimérico 5 μ m 100 Å 4,1 x 100 mm Hamilton PRP-1. Todas las fases móviles se prepararon con compuestos de calidad HPLC proporcionados por Sigma Aldrich. La fase móvil (A) se preparó añadiendo CF₃COOH (0,1% v/v) para el agua filtrada Milli-Q. Este último se añadió con el fin de suprimir la ionización del péptido. La fase móvil (B) fue acetonitrilo de calidad cromatográfica. El análisis de HPLC se operó en un modo de flujo constante y el caudal se mantuvo a 1 mL/min. Los resultados del análisis cromatográfico fueron procesados por el programa Agilent ChemStation modular 3D y fue como sigue cuando se utiliza un tampón de lavado que contiene putrescina como una amina catiónica:

- 60 Tabla 1: El área del pico de la hemina a 17,7 min en eluato producido con y sin putrescina

Muestra	Área del pico de hemina usando tampón de lavado (véase más)	Área de el pico hemina usando tampón de lavado (véase más)
---------	---	--

	arriba) sin amina catiónica (3 repeticiones)	arriba) dihidrocloruro que contiene putrescina (3 repeticiones)
100 µl de sangre total envejecida 24h	media: 30,88 DESVEST: 1,78	promedio: 3,56 DESVEST: 0,55
100 µl de sangre total envejecida 48h	media: 43,74 DESVEST: 4,16	promedio: 2,92 DESVEST: 0,19

El gradiente utilizado durante la separación fue:

Tiempo/min	(A)	(B)
0-5	100	0
5-10	90	10
10-15	50	50
15-20	0	100

- 5 La identificación del compuesto de hemina a partir del eluato de la sangre total se confirmó mediante análisis HPLC de una muestra auténtica de hemina (BioXtra, porcina, ≥98.0% (HPLC) Sigma Aldrich, Mat N° 51280) que proporcionó tiempos de retención de HPLC y espectros de absorbancia UV idénticos.

Detección de bilirrubina (ISS)

10

La detección de la bilirrubina se llevó a cabo en un sistema de HPLC como se ha descrito anteriormente.

El gradiente utilizado durante la separación fue:

Tiempo/min	(A)	(B)
0-5	100	0
5-15	0	100
15-30	0	100
30-31	50	50
31-32	100	0
32-40	100	0

15

La identificación del compuesto de bilirrubina se llevó a cabo utilizando bilirrubina comercialmente disponible (≥98.0% Sigma Aldrich, Mat N° B4126). Los resultados fueron comparables a los obtenidos para la detección de la hemina.

20 Detección de melanina (ISS)

La melanina se detectó mediante mediciones de absorbancia a $\lambda = 562$ nm usando un lector de placa de múltiples pocillos (Tecan Infinity 500).

- 25 Para la cuantificación de la melanina, se estableció la linealidad de la respuesta ($R^2 = 0,9998$). La absorbancia de las soluciones de melanina entre 7,8 y 500 ppm, se midió con el uso de melanina sintética disponible comercialmente (Sigma Aldrich, Mat N° M8631) disuelto en tampón de elución (tampón Tris 5 mM, 0,2% (p/v) metilparabeno, pH 8,5) y utilizando un eluato producido con melanina 0 ppm como una muestra en blanco (100 µl). Los resultados fueron comparables a los obtenidos para la detección de la hemina. Los siguientes parámetros se utilizaron para los análisis:

30

Varias lecturas por pocillo (círculo (lleno))	4x4	15
Varias lecturas por pocillo (borde)	1350	mm
Longitud de onda	562	nm
Ancho de banda de	5	nm
Cantidad de Disparos	10	ms
Tiempo establecido	1	20

Ejemplo 2

- 35 Prueba de un tampón de lavado que contiene putrescina para la preparación de muestras de heces

En la serie de experimentos con un ensayo dirigido a *Clostridium difficile* descrito en el presente documento, se demostró que la inhibición de la PCR por los inhibidores intrínsecos contenidos en el material de la muestra (heces) se podría reducir mediante la introducción de putrescina en el tampón de lavado utilizado en el primer paso para

lavar las partículas de vidrio magnéticas (MGP). Un volumen de entrada de heces más alta fue tolerada durante el uso de un tampón de lavado que contiene putrescina, lo que mejora la sensibilidad del ensayo.

Configuración experimental

A menos que se indique lo contrario, los instrumentos y el flujo de trabajo fueron como se describe para el Ejemplo 1. Las MGP se lavaron dos veces como anteriormente, mientras que el tampón de lavado que contiene putrescina fue empleado en la primera etapa de lavado.

1) Tolerancia a la inhibición por heces con volumen de entrada variable de las muestras

Método

Se utilizaron en el estudio muestras de heces de inhibición juntadas de *C.difficile* positiva (determinada por el ensayo disponible comercialmente Cepheid Xpert® *C.difficile*/Epi). Se utilizaron dos dispositivos de toma de muestras de heces (asa de siembra, e torunda) para transferir heces en medio de PCR cobas® (Roche Diagnostics, art 06466281190). Cuando se utiliza un asa de siembra de inoculación de 10 µl como dispositivo de transferencia de las heces, se utilizó el volumen de entrada máxima permitida de suspensión de heces (400 µl) para compensar una cantidad muy baja de la muestra primaria. Cuando se utiliza un hisopo flocado que transfiere cantidades mucho más grandes de la muestra primaria, se evaluaron varios volúmenes de suspensión de heces para encontrar el límite superior de tolerancia. La Tabla 2 muestra las condiciones que se probaron en este estudio. Un control interno (IC) se incluyó en cada muestra analizada.

Tabla 2: Diseño Experimental para la tolerancia a la inhibición por heces, N = 8

Dispositivos de toma de muestras	volumen de entrada de la suspensión de heces (µl)	putrescina en el tampón de lavado	heces en cada extracción de la muestra (µl)
Asa de siembra	400	No	0.9
Asa de siembra	400	Sí	0,9
Hisopo flocado	75	No	2,6
Hisopo flocado	100	No	3.5
Hisopo flocado	150	No	5.2
Hisopo flocado	200	No	7.0
Hisopo flocado	75	Sí	2,6
Hisopo flocado	150	Sí	5.2
Hisopo flocado	200	Sí	7.0

Resultado

Los resultados de este estudio se resumen en la figura 2. Al utilizar muestras de heces en torundas, la mayoría de las réplicas no mostraron ninguna señal de fluorescencia a 150 µl de entrada sin putrescina en el tampón de lavado, lo que indica inhibición. Con la putrescina, la tolerancia a la inhibición por heces aumentó con una señal fluorescente aceptable y valores de Ct observados hasta 200 µl de entrada de suspensión de heces. Cuando se utiliza un asa de siembra para la transferencia de las heces (400 µl volumen de entrada de suspensión heces), la señal se inhibió completamente sin putrescina en el tampón de lavado. La inhibición se eliminó por adición de putrescina al tampón de lavado.

Conclusiones

La putrescina en el tampón de lavado de MGP permite una mayor entrada de heces, por lo tanto, potencialmente el aumento de la sensibilidad del ensayo.

El mejor equilibrio entre la señal diana y el grado de inhibición parece alcanzarse con 150 µl de entrada de suspensión de heces con tampón de lavado que contiene putrescina al utilizar torundas como dispositivo de transferencia de materia fecal (véase la figura 2)

2) Comparación de la sensibilidad analítica con volumen de entrada de muestra variable

Método

La sensibilidad analítica del ensayo antes mencionado se evaluó con cuatro combinaciones de dispositivos de muestreo de heces y los volúmenes de procesamiento de heces en suspensión como se describe en la Tabla 3. La muestra de *C.difficile* positiva (determinada por el ensayo Cepheid Xpert® *C.difficile*/Epi disponible comercialmente) se diluyó en serie 7 veces en un conjunto de muestras negativas no inhibitorias. Cada nivel de dilución se analiza en 24 repeticiones para cada condición. Se utilizó el análisis Probit para determinar el límite de detección (LoD).

Tabla 3: Condiciones analizadas para analizar la sensibilidad analítica

Dispositivos de toma de muestras	Volumen de procesado (µl)	Putrescina en el tampón de lavado
Asa de siembra	400	No
Asa de siembra	400	Sí
Hisopo flocado	75	No
Hisopo flocado	100	Sí

Resultado

Los resultados de este estudio se resumen en la Tabla 4. La mejor condición para tolerar la inhibición del estudio 1 (toma de muestras de heces con hisopo flocado de 150 µl de entrada y putrescina en tampón de lavado, véase más arriba) también mostró mejor sensibilidad.

Tabla 4: Comparación de la sensibilidad analítica bajo diferentes condiciones

Dispositivos de toma de muestras	Volumen de procesado (µl)	Putrescina en tampón de lavado	LoD Probit concentración relativa*	LoD 95% CI fiducial	
				Inferior	Superior
Asa de siembra	400	No	7,5	5,0	12,2
Asa de siembra	400	Sí	5,6	3,7	9,0
Hisopo flocado	75	No	3,5	2,3	5,6
Hisopo flocado	150	Sí	1,0	0,6	1,6

* el nivel más bajo detectable se establece en 1,0 para esta comparación

Conclusión

Los resultados de este estudio confirman que la eliminación de inhibidor de las muestras de heces mediante putrescina permite una mayor entrada de heces, por lo tanto, aumenta la sensibilidad del ensayo.

3) comparación con el ensayo Cepheid Xpert® C.difficile/Epi, y cultivo de referencia de C. difficile toxigénica

Método

Las muestras clínicas se recogieron en centros de salud en los EE.UU. Las muestras se analizaron usando el ensayo mencionado anteriormente y los resultados se compararon con el ensayo Cepheid Xpert® C.difficile/Epi y los resultados de los cultivos de referencia. Para el ensayo de C. difficile, se probaron cuatro condiciones para cada muestra de heces (ver Tabla 5). Un hisopo flocado de poliéster se utiliza como dispositivo de transferencia de materia fecal.

Tabla 5: Condiciones analizadas utilizando muestras clínicas individuales de heces

Dispositivos de toma de muestras	Volumen de procesado (µl)	Putrescina en el tampón de lavado
Asa de siembra	75	No
Asa de siembra	150	Sí
Hisopo flocado	75	No
Hisopo flocado	150	Sí

Resultados

Los resultados se resumen en la Tabla 6 y en la Tabla 7. La Tabla 6 muestra la comparación de rendimiento del ensayo Cepheid Xpert® C. difficile/Epi y en la Tabla 7 se muestra la comparación de rendimiento de un cultivo de referencia (combinación de aislamiento de colonias directa y enriquecida de C. difficile toxigénica). Los resultados mostrados como "Cdiff no válido" indican inhibición. El acuerdo de porcentaje positivo para el ensayo Cepheid Xpert® C.difficile/Epi y para la sensibilidad cuando se utiliza el cultivo de referencia C.difficile como estándar, mejoró ligeramente con el aumento de volumen de la suspensión de heces y el uso de tampón de lavado que contiene putrescina.

Tabla 6: Análisis de rendimiento en comparación con el ensayo Cepheid Xpert® C. difficile/Epi

			Hisopo flocado		Hisopo de poliéster	
			75 µl	150 µl	75 µl	150 µl
Resultado del	Resultado del		Sin putrescina	Con putrescina	Sin putrescina	Con putrescina

ensayo Cepheid Cdiff	ensayo Cdiff				
Negativo	Cdiff no válida	6	5	10	6
	Cdiff NEG	327	290	258	263
	Cdiff POS	1	4	4	3
Positivo	Cdiff no válida	0	0	0	2
	Cdiff NEG	6	5	7	5
	Cdiff POS	59	54	46	46
total de la muestra probada		399	358	325	325
Sensibilidad		90,8%	91,5%	86,8%	90,2%
Especificidad		99,7%	98,6%	98,5%	98,9%
tasa de inhibición		1,5%	1,4%	3,1 %	2,5%

Tabla 7: Análisis de rendimiento en comparación con el cultivo de referencia de C. difficile

		Hisopo flocado		Hisopo de poliéster	
		75 µl	150 µl	75 µl	150 µl
Resultado del ensayo Cepheid Cdiff	Resultado del ensayo Cdiff	Sin putrescina	Con putrescina	Sin putrescina	Con putrescina
Negativo	Cdiff no válida	0	0	4	2
	Cdiff NEG	161	138	125	127
	Cdiff POS	2	2	2	3
Positivo	Cdiff no válida	0	0	0	0
	Cdiff NEG	6	4	3	4
	Cdiff POS	28	28	23	22
total de la muestra probada		197	172	157	158
Sensibilidad		82,4%	87,5%	88,5%	84,6%
Especificidad		98,8%	98,6%	98,4%	97,7%
tasa de inhibición		0%	0%	2,5%	1,3%

5 Resumen

Los datos de estos estudios demostró que un tampón de lavado que contiene putrescina reduce la inhibición de la PCR y aumenta la sensibilidad analítica.

10 Listado de secuencias

<110> F. Hoffmann-La Roche

<120> Compuestos de amina para la preparación selectiva de muestras biológicas

<130> 30730 EP1

15 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador/sonda

<400> 1

ttgatagcaa tcggctatcg acta 24

25 <210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> cebador/sonda

<400> 2

gcttcgatac tcagtcattc cggtata 27

<210> 3

<211> 26

35 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador/sonda

<400> 3
 gggcgaatga tgcaggcttc agaatt 26
 <210> 4
 <211> 26
 5 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 4
 10 gttttctagc gttcgccac ttcatt 26
 <210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cebador/sonda
 <400> 5
 tctctcgcca tctctaccg cattggc 27
 <210> 6
 20 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador/sonda
 25 <400> 6
 cggtaggacga cagacaattt tacgatttg g 31
 <210> 7
 <211> 3221
 <212> DNA
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ácido nucleico control
 <400> 7
 aattcgtaat catgtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac 60
 acaacatacag agccggaagc ataaagtgtg aagcctgggg tgcctaataga gtgagctaac 120
 tcacattaat tgcgttgctc tctactgccc ctttccagtc gggaaacctg tctgtgccagc 180
 tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg cgctcttccg 240
 cttcctcgtc cactgactcg ctgcgctcgg tctgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc 300
 actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt 360
 gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc 420
 ataggctccg ccccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa 480
 acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 540
 ctgttccgac cctgcgcgtt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg 600
 cgctttctca tagctcacgc tgtaggatc tcagttcggt gtaggtcggt cgctccaagc 660
 tgggctgtgt gcacgaacct cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 720
 gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggttaaca 780
 ggattagcag agcgaggat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 840
 acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg 900
 gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt 960

ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct	1020
tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttgggtcatga	1080
gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa	1140
tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac	1200
ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga	1260
taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc	1320
cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca	1380
gaagtgggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta	1440
gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg	1500
tggtgtcacg ctcgctgttt ggtatggctt cattcacgctc cggttcccaa cgatcaaggc	1560
gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctccctcggt cctccgatcg	1620
ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt	1680
ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt	1740
cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgta atacgggata	1800
ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc	1860
gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacc actcgtgcac	1920
ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa	1980
ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggc cgacacggaa atgttgaata ctcatactct	2040
tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat	2100
ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc	2160
cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaaat aggcgtatca	2220
cgaggccctt tcgtctcgcg cgtttcggtg atgacggtga aaacctctga cacatgcagc	2280
tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg	2340
gcgcgtcagc ggggtgttggc ggggtgtcggg gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga	2400
ttgtactgag agtgcaccat tcgacgctct cccttatgcg actcctgcat taggaagcag	2460
cccagtagta gggtgaggcc gttgagcacc gccgccgcaa ggaatggtgc atgcaaggag	2520
atggcgccca acagtcccc gccacgggg cctgccacca taccacgcc gaaacaagcg	2580
ctcatgagcc cgaagtggcg agccgatct tccccatcgg tgatgtcggc gatataggcg	2640
ccagcaaccg cacctgtggc gccggtgatg ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc	2700
tggctagcga tgaccctgct gattggttcg ctgaccattt ccgggtgcgg gacggcgтта	2760
ccagaaactc agaaggttcg tccaaccaa ccgactctga cggcagttta cgagagagat	2820
gatagggtct gcttcagtaa gccagatgct acacaattag gcttgtacat attgtcgтта	2880

gaacgoggct acaattaata cataacctta tgtatcatac acatacgatt taggtgacac 2940
tatagaatac aagctttgcc tgcttgatag caatcggcta tcgactaatg actgtcctgg 3000
cggctctctcg ccatctccta ccgcattggc tcataggtaa gctcgctgtc acccagtacg 3060
gaggtgccag tagattatta gagacagtcg ccaatcgatc gttataccga gatgactgag 3120
tatogaagct acattgtagc cgcacatagg accacccatc ttcatgttgg atccccgggc 3180
gagctcccaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaacc g 3221

<210> 8

<211> 3480

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ácido nucleico control

<400> 8

aattcgtaat catgtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac 60
acaacatacg agccggaagc ataaagtgt aagcctgggg tgcctaata ga gtgagctaac 120
tcacattaat tgcggttgccg tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc 180
tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg 240
cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc 300
actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt 360
gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc 420
ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa 480
acccgacagg actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc 540
ctgttccgac cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg 600
cgctttctca tagctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcggt cgctccaagc 660
tgggctgtgt gcacgaaccc cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc 720
gtcttgagtc caaccggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca 780
ggattagcag agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact 840
acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg 900
gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt 960
ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct 1020
tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga 1080
gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa 1140
tctaaagtat atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac 1200

ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga	1260
taactacgat acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc	1320
cacgctcacc ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca	1380
gaagtgggtcc tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta	1440
gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg	1500
tgggtgtcagc ctcgctgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc	1560
gagttacatg atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctccctcggt cctccgatcg	1620
ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt	1680
ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt	1740
cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgta atacgggata	1800
ataccgcgcc acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc	1860
gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaacct actcgtgcac	1920
ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa	1980
ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct	2040
tcctttttca atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat	2100
ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc	2160
cacctgacgt ctaagaaacc attattatca tgacattaac ctataaaaat aggcgtatca	2220
cgaggccctt tcgtctcgcg cgtttcggtg atgacggtga aaacctctga cacatgcagc	2280
tcccggagac ggtcacagct tgtctgtaag cggatgccgg gagcagacaa gcccgtcagg	2340
gcgcgtcagc ggggtgttggc ggggtgtcggg gctggcttaa ctatgcggca tcagagcaga	2400
ttgtactgag agtgcaccat tcgacgctct cccttatgcg actcctgcat taggaagcag	2460
cccagtagta ggttgaggcc gttgagcacc gccgccgcaa ggaatggtgc atgcaaggag	2520
atggcgccca acagtcccc gccacgggg cctgccacca taccacgcc gaaacaagcg	2580
ctcatgagcc cgaagtggcg agcccgatct tccccatcgg tgatgtcggc gatataggcg	2640
ccagcaaccg cacctgtggc gccggtgatg ccggccacga tgcgtccggc gtagaggatc	2700
tggctagcga tgaccctgct gattggttcg ctgaccatth ccgggtgcgg gacggcgtha	2760
ccagaaactc agaaggttcg tccaacaaa ccgactctga cggcagttta cgagagagat	2820
gatagggtct gcttcagtaa gccagatgct acacaattag gcttgtacat attgtcgtta	2880
gaacgcggct acaattaata cataacctta tgtatcatac acatacgatt taggtgacac	2940
tatagaatac aagcttgggc tgcaggtcga ctctagaaac tgggtagtaa ctgcgggggc	3000
gaatgatgca ggcttcagaa attaaactca atagtatccg gtgtctcaat ctttttcggg	3060
ccaggcggcg gtggacgaca gacaatttta cgattttggt tccggtcaca accgcgccat	3120

ES 2 567 091 T3

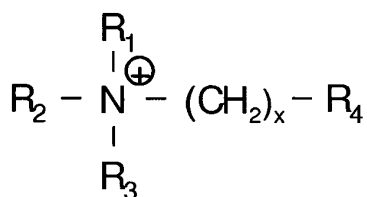
acatgtcaag aatgaagtgg gcgaacgcta gaaaactgac gccagcaatt aagtgagtcg	3180
gggcgtggtg actcccacgt aaaaagcccc taccgcgcac cgttacgaag tatcaaaacg	3240
ggacgcgcac gaaccgacga ttggtactgt ataagcggcc cgacgaactc aaaatcccaa	3300
gtgaatctat gaaatctaca tcgcgtttat aatctacggg gtgtaaacgg atgagaattg	3360
gccaaacgga ggcacacacg cgtgcaatgc gccgaccctg agaaaagtat catgtgcgtc	3420
ggccacagga tccccgggag agctcccaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaacgg	3480

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar un ácido nucleico a partir de una muestra de fluido, dicho método comprende los pasos:

- a. combinar juntos un soporte sólido y dicha muestra de fluido en un recipiente de reacción durante un período de tiempo y en condiciones suficientes para permitir que dicho ácido nucleico sea inmovilizado sobre el soporte sólido,
- b. aislar el material del soporte sólido de los otros materiales presentes en la muestra de fluido en una estación de separación,
- c. purificar el ácido nucleico mediante la separación de la muestra de fluido del material de soporte sólido,
- d. lavar el material del soporte sólido una o más veces con un tampón de lavado que comprende una amina catiónica.

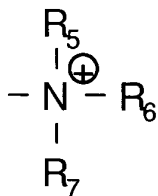
en el que dicha amina catiónica es una amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de la fórmula general I,



Fórmula I

en donde R_1 y R_2 pueden ser, independientemente el uno del otro, un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo,

R_3 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, x es un número entero entre 1 y 12, R_4 es un residuo de acuerdo con la fórmula general II



Fórmula II

en el que R_5 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo,

R_6 pueden ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, o $-(CH_2)_3-NH_2$, o $-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$, y

R_7 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, o un par de electrones libres, en cuyo caso el nitrógeno vecino no tiene carga.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha amina catiónica es una diamina de alquileno.

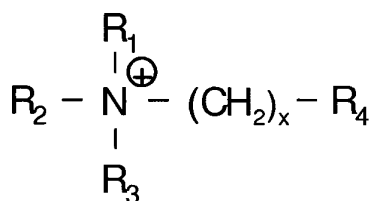
3. El método de la reivindicación 2, en el que dicha diamina de alquileno no está sustituida.

4. El método de la reivindicación 3, en el que dicha amina catiónica se selecciona del grupo de etilendiamina, putrescina y cadaverina.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además el paso

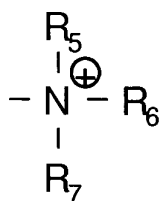
e. Analizar el material diana biológico aislada.

6. El uso de un tampón de lavado que comprende una amina catiónica para eliminar selectivamente un inhibidor del análisis de un ácido nucleico a partir de un soporte sólido al que se une dicho ácido nucleico, en el que el análisis corriente abajo comprende o consiste en la amplificación de ácido nucleico, y en el que dicha amina catiónica es una amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de la fórmula general I,



Fórmula I

- 5 en donde R_1 y R_2 pueden ser, independientemente el uno del otro, un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo,
 R_3 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, x es un número entero entre 1 y 12,
 R_4 es un residuo de acuerdo con la fórmula general II



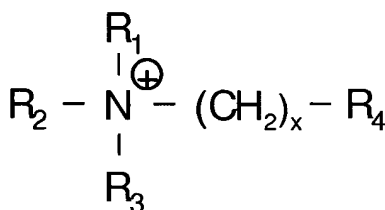
Fórmula II

- 10 en el que R_5 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo,
 R_6 pueden ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, o $-(CH_2)_3-NH_2$, o $-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$, y
 15 R_7 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo

7. Un equipo para aislar un ácido nucleico a partir de una muestra de fluido, dicho equipo comprende los componentes:

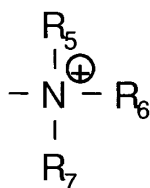
- 20 • un tampón de unión
 • un soporte sólido
 • un tampón de lavado que comprende una amina catiónica
 • opcionalmente un tampón de elución,

- 25 en el que el tampón de unión y el tampón de lavado son diferentes tampones contenidas en diferentes recipientes, y en el que dicha amina catiónica es una amina primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de la fórmula general I,



Fórmula I

- 30 en donde R_1 y R_2 pueden ser, independientemente el uno del otro, un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo,
 R_3 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, x es un número entero entre 1 y 12,
 R_4 es un residuo de acuerdo con la fórmula general II



Fórmula II

- 40 en el que R_5 puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo,
 R_6 pueden ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo, o $-(CH_2)_3-NH_2$, o $-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$, y

R₇ puede ser un residuo de hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, arilo o heteroarilo

8. El equipo de la reivindicación 7, en el que

- 5
- dicho tampón de unión comprende un agente caotrópico y/o
 - dicho soporte sólido comprende sílice y/o un material magnético y/o
 - dicho tampón de lavado que comprende una amina catiónica como se define en la reivindicación 7 tiene un valor de pH por debajo de 7 y/o
 - dicho tampón de elución es acuoso y/o comprende un agente conservante.

- 10
9. El método, uso o el equipo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra de fluido es sangre total o plasma sanguíneo.

Fig. 1A

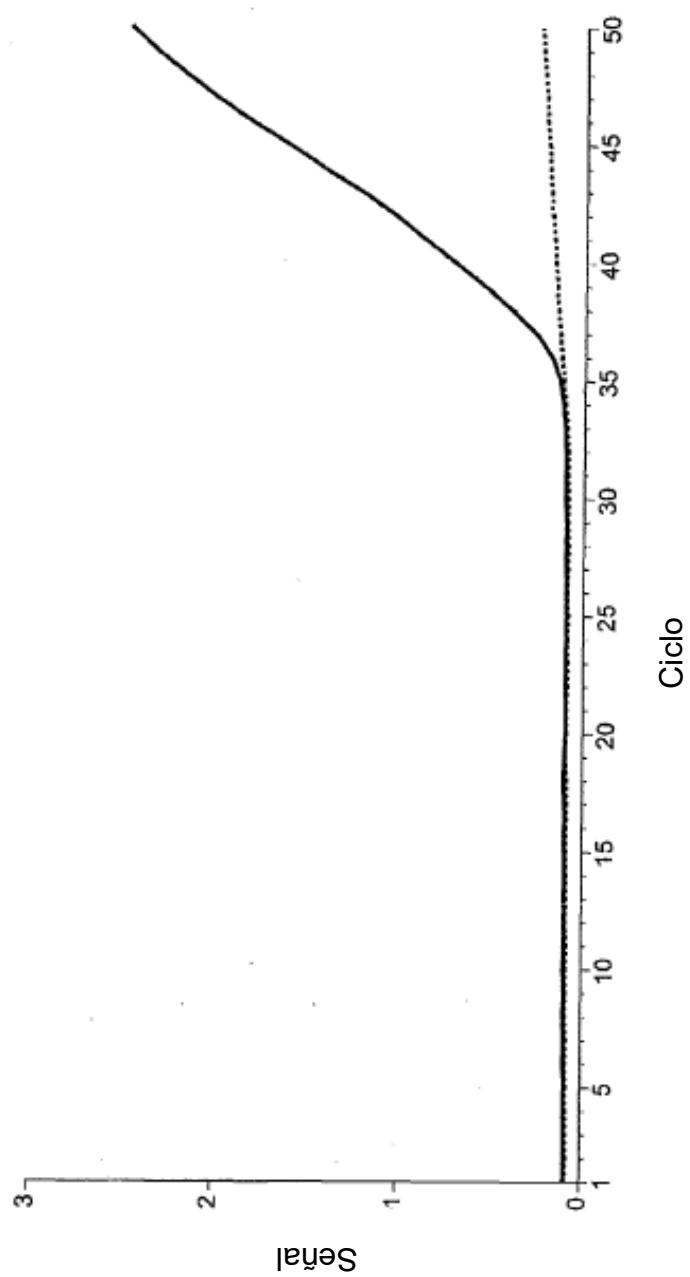
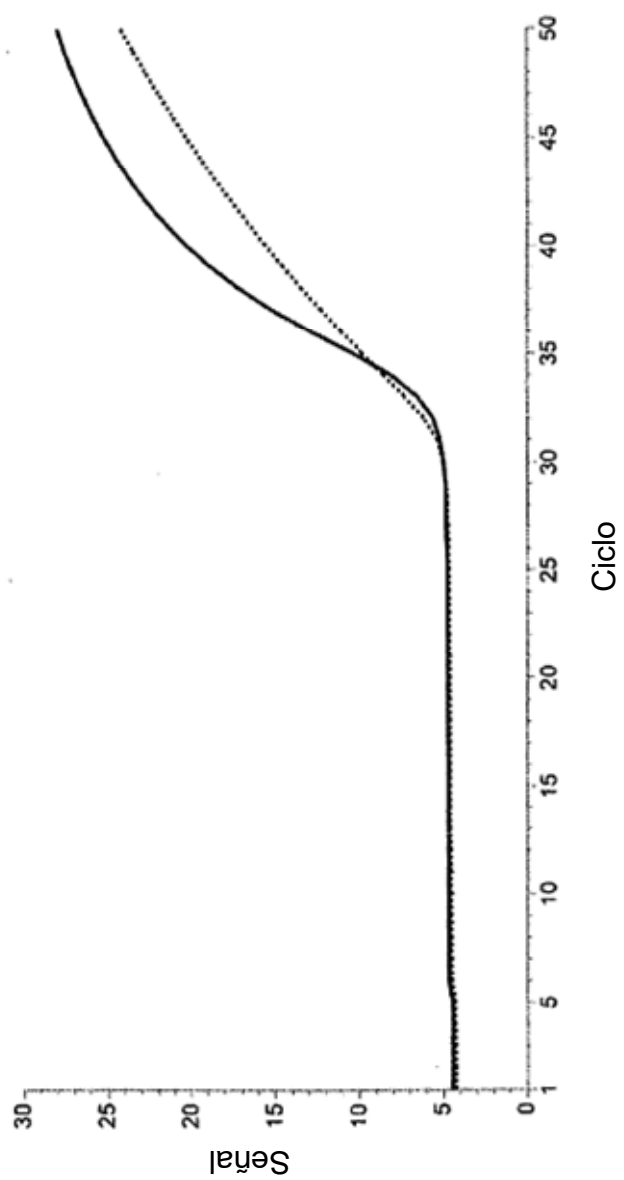


Fig. 1B



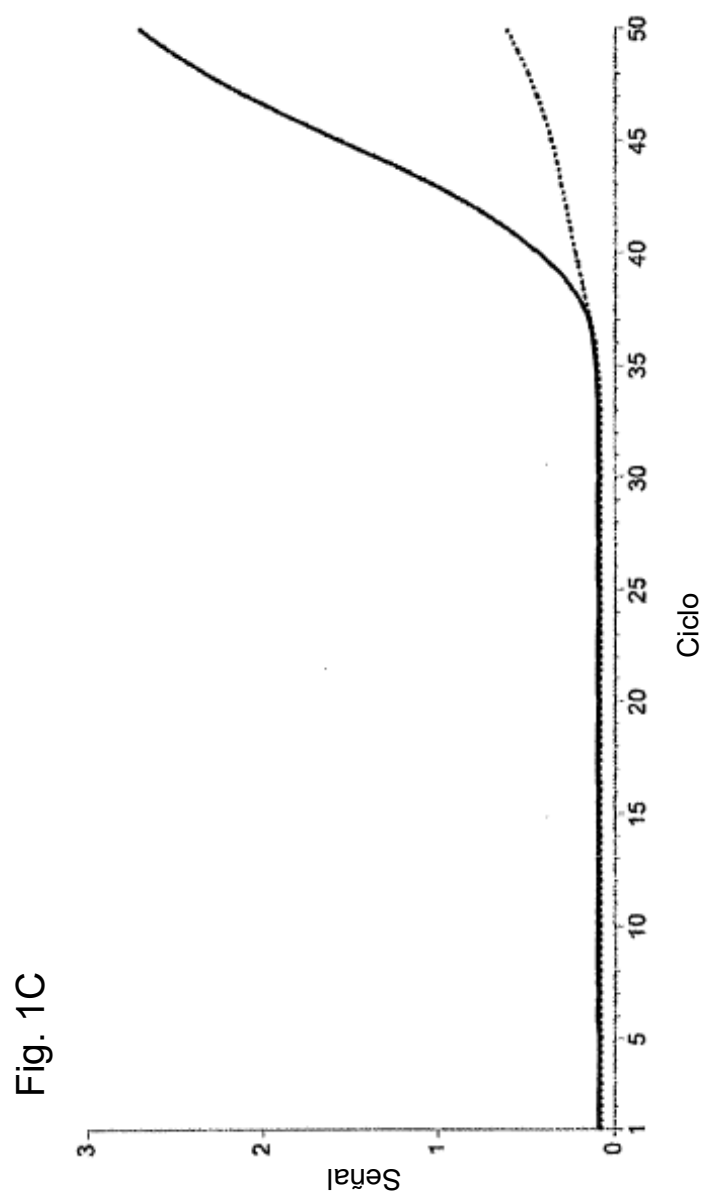


Fig. 1D

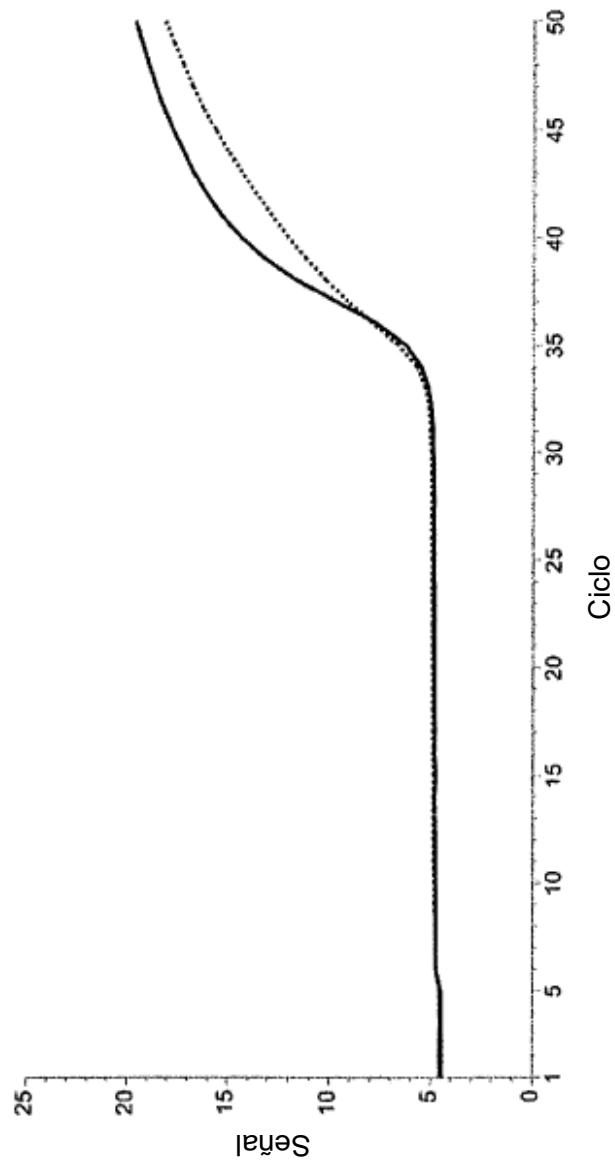


Fig. 2

