

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 062**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2009 PCT/US2009/062061**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2010 WO10062556**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2009 E 09752940 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2347011**

54 Título: **Ensayo y sistema de captura de híbrido de resultados rápidos**

30 Prioridad:

27.10.2008 US 108687 P
01.05.2009 US 174848 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2017

73 Titular/es:

QIAGEN GAITHERSBURG, INC. (100.0%)
1201 Clopper Road
Gaithersburg, MD 20878, US

72 Inventor/es:

EDER, PAUL;
PAYNE, ERIC;
NAZARENKO, IRINA;
RAMANCHANDRAN, SUGI;
VIRMANI, ARVIND y
BELL, LAURA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 622 062 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

Ensayo y sistema de captura de híbrido de resultados rápidos

Esta solicitud reivindica prioridad tanto a la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Nº 61.108.687, presentada el 27 de octubre de 2008, como a la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. Nº 61/174.848, presentada el 1 de mayo de 2009.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos, reactivos, sistemas y kits para determinar la presencia de un ácido nucleico en una muestra.

Antecedentes de la invención

10 La detección y caracterización de secuencias específicas de ácidos nucleicos y cambios de secuencia se han utilizado para detectar la presencia de secuencias de ácido nucleico virales o bacterianas indicativas de una infección, la presencia de variantes o alelos de genes de mamíferos asociados con enfermedades y cánceres y la identificación de la fuente de los ácidos nucleicos encontrados en las muestras forenses, así como en las determinaciones de paternidad.

15 Por ejemplo, se han aislado y secuenciado el ARN o el ADN para muchos microorganismos y virus. Las sondas de ácido nucleico han sido examinadas para un gran número de infecciones. Se han utilizado previamente secuencias de ácidos nucleicos detectables que se hibridan con secuencias complementarias de ARN o ADN en una muestra de ensayo. La detección de la sonda indica la presencia de una secuencia de ácido nucleico particular en la muestra de ensayo para la cual la sonda es específica. Además de ayudar a la investigación científica, pueden utilizarse sondas de ADN o ARN para detectar la presencia de virus y microorganismos tales como bacterias, levaduras y protozoos, así como mutaciones genéticas relacionadas con trastornos específicos en muestras de pacientes.

20 Las sondas de hibridación de ácido nucleico tienen las ventajas de una alta sensibilidad y especificidad frente a otros métodos de detección y no requieren un organismo viable. Las sondas de hibridación pueden marcarse, por ejemplo con una sustancia radiactiva que se puede detectar fácilmente, o con marcadores bioquímicos tales como, por ejemplo, biotina, que permite su captura y detección. Las moléculas de ácido nucleico también pueden ser capturadas por un primer anticuerpo que sea específico para híbridos de ADN, en el que los híbridos pueden comprender híbridos de ADN-ARN, híbridos de ADN-ADN o híbridos de ARN-ARN. Los híbridos pueden detectarse posteriormente mediante un segundo anticuerpo marcado que puede estar, por ejemplo, marcado con un marcador bioquímico tal como fosfatasa alcalina o cualquier otro marcador capaz de ser detectado.

25 Bhan P. et al, Nucleic Acids Research 25(16):3310-3317, 1997, describe oligonucleótidos antisentido que se unen selectivamente al ARN complementario pero no al ADN. Se refiere a la síntesis de los respectivos oligonucleótidos y analiza la inhibición antisentido que se logra con los oligonucleótidos. El documento WO 98/10263 describe un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra que se basa en la captura híbrida. La muestra puede estar comprendida en un medio de recogida/transporte que preserva los ácidos nucleicos e inhibe a las nucleasas, tal como una solución de sal caotrópica, una solución detergente que comprende SDS, o una solución de agente quelante tal como EDTA. Los ensayos basados en captura híbrida también se describen en Gentech Diagnostics: "Digene HBV Test Hybrid Capture II", 6 de junio de 2008, Hantz S. y col., Pathologie Biologie 56: 29-35, 2008 y Sandri MT, y col., Journal of Clinical Microbiology 44 (6): 2141-2146, 2006. El documento de EE.UU. 2008/200344 enseña un método de cribado de un sujeto humano de infección por el virus del papiloma que se basa en un ensayo de chips de proteínas. Los tampones de extracción de proteínas tales como el tampón de lisis RIPA y sus variantes y su uso en el contexto de la extracción de proteínas y/o inmunoprecipitación se describen en Boston BioProducts Inc.: "Protein Extraction buffers", 2 de Septiembre 2007, Bart: "General Principles of Immunoprecipitation", 31 de Julio 2008, Invitrogen: "Anti-V5 Antibody, Anti-V5-HRP Antibody", 1 de Enero 2001, documento AU 701781, documento WO 2006/050166 y documento WO 2005/088311. El documento 30 WO 98/59044 describe ensayos para la actividad de la primasa y para la identificación de moduladores de la actividad de la primasa. El documento WO 2005/080602 describe métodos y kits de hibridación para la detección y medición de moléculas biológicas.

35 A medida que se acumula la secuencia de ácidos nucleicos para los genes de seres humanos y de organismos patógenos, aumenta la demanda de pruebas rápidas, rentables y fáciles de usar. Existe la necesidad de proporcionar métodos, composiciones y kits nuevos y eficaces para determinar ácidos nucleicos diana de una manera rápida, rentable y fiable en áreas geográficas donde el acceso a la atención médica no esté fácilmente disponible. También es necesario proporcionar estos ensayos en un formato de detección rápida que se pueda utilizar en países en desarrollo. Los métodos y ensayos de la presente invención satisfacen estas necesidades y pueden utilizarse en sistemas manuales, parcialmente automatizados, automatizados y no automatizados.

55 El análisis clínico en países en desarrollo y áreas geográficas donde el acceso a la atención médica no está disponible presenta desafíos únicos. La invención descrita en este documento logra una resolución aceptable que equilibra la importancia de estos desafíos en tales países y áreas. Por ejemplo, la velocidad en la obtención de

resultados es particularmente importante en lugares donde las mujeres viajan grandes distancias para proporcionar especímenes para el análisis. En tales lugares, es ventajoso que los resultados se obtengan a las varias horas o el mismo día mientras el paciente está todavía presente para evitar la pérdida de seguimiento asociada con el viaje desde el hogar hasta el sitio de la prueba.

- 5 Otros factores que enfrentan los países en desarrollo son el costo de ejecutar el ensayo y la instrumentación necesaria para ejecutar el ensayo. Las pipetas de repetición y las pipetas simples son sólo dos tipos de dispositivos que se utilizan rutinariamente en países desarrollados pero que son potencialmente prohibitivos en los países en desarrollo. En consecuencia, existe la necesidad de dispositivos y productos médicos que empleen alternativas más baratas y más fácilmente accesibles en los países en desarrollo.

10 **Sumario**

Un aspecto se refiere a un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra que contiene material biológico. El material biológico puede incluir una célula epitelial cervical o un ácido nucleico de una célula cervical. Usando los métodos descritos, la determinación de si una molécula de ácido nucleico diana está presente en una muestra se puede obtener relativamente rápidamente, por ejemplo dentro de un período de menos de aproximadamente dos o tres horas. La invención puede definirse por las reivindicaciones.

- 15

De acuerdo con la reivindicación 1, se proporciona un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra que incluye:

- a) suspender una muestra en un medio de recogida que incluya un detergente aniónico y un detergente no iónico;
- b) desnaturalizar una molécula de ácido nucleico diana;

- 20 c) poner en contacto una o más sondas polinucleotídicas con la molécula de ácido nucleico diana en condiciones que permitan que las sondas y la molécula de ácido nucleico diana se hibriden o se unan, y

d) capturar el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un soporte sólido revestido con un primer anticuerpo específico para el híbrido de ácido nucleico híbrido de doble hebra.

De acuerdo con la reivindicación 5, se proporciona una composición que comprende:

- 25 (a) una muestra biológica suspendida en un medio de recogida, en el que dicho medio de recogida comprende un detergente aniónico y un detergente no iónico;

(b) un reactivo de desnaturalización;

(c) al menos una sonda polinucleotídica capaz de unirse a una molécula de ácido nucleico diana;

(d) un soporte recubierto con un primer anticuerpo antihíbrido; y

- 30 (e) un segundo anticuerpo que es específico para el híbrido de ácido nucleico bicatenario o específico para el primer anticuerpo para formar un complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario/anticuerpo de soporte sólido; En el que el segundo anticuerpo está marcado con un marcador detectable.

De acuerdo con la reivindicación 9, se proporciona una composición que comprende:

- 35 (a) una muestra biológica suspendida en un medio de recogida que comprende de aproximadamente 0,5 por ciento a aproximadamente 2,0 por ciento de NP-40, de aproximadamente 0,10 por ciento a aproximadamente 0,40 por ciento de desoxicolato de sodio y de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA y

(b) una sonda polinucleotídica; y

(c) un soporte recubierto con un primer anticuerpo antihíbrido.

- 40 De acuerdo con la reivindicación 15, se proporciona un kit para la detección de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra, que comprende:

a) un medio de recogida que comprende un detergente aniónico y un detergente no iónico;

b) un reactivo de desnaturalización;

c) un soporte recubierto con un primer anticuerpo antihíbrido;

- 45 d) un reactivo de detección que comprende un segundo anticuerpo que es específico para el híbrido de ácido nucleico bicatenario o específico para el primer anticuerpo para formar un complejo híbrido de ácido nucleico de doble cadena/anticuerpo de soporte sólido, en el que el segundo anticuerpo está marcado de forma detectable;

e) un tampón de lavado a base de detergente; y

f) un segundo reactivo de detección que comprende un sustrato para el marcador en el segundo anticuerpo.

Las realizaciones y los aspectos que no caen bajo el alcance de las reivindicaciones tienen sólo fines ilustrativos.

5 En un aspecto, un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra comprende:

a) suspender la muestra en un medio de recogida;

b) liberar moléculas de ácido nucleico diana de la muestra en el medio de recogida;

c) convertir las moléculas de ácido nucleico diana de doble hebra en moléculas de ácido nucleico diana monocatenarias;

10 d) poner en contacto una o más sondas con las moléculas de ácido nucleico diana monocatenarias en condiciones que permitan que las sondas y las moléculas de ácido nucleico diana monocatenario objetivo hibriden formando híbridos de ácido nucleico de doble hebra;

e) capturar los híbridos de ácido nucleico bicatenarios;

15 f) separar los híbridos de ácido nucleico bicatenarios de moléculas de ácido nucleico diana monocatenario no unidas; y

g) detectar los híbridos de ácido nucleico bicatenarios, indicando con ello la presencia del ácido nucleico diana.

20 En un aspecto, el método puede ser predominantemente manual, requiriendo la intervención humana. Otro aspecto se refiere a la detección rápida de moléculas de ácido nucleico diana en una muestra. El método de detección puede ser automatizado, ya sea totalmente automatizado, o parcialmente automatizado - en otras palabras, requiere de alguna intervención humana.

Otro aspecto se refiere a la detección de moléculas de ácido nucleico diana en múltiples muestras al mismo tiempo o dentro de un periodo de tiempo muy corto, por ejemplo en una máquina o una serie de máquinas.

25 Todavía otro aspecto se refiere a un instrumento para ejecutar un método para la detección de una molécula de ácido nucleico diana en una huella simple. El instrumento combina muchos, o todos, de otros instrumentos individuales que realizan los pasos del método.

Otro aspecto se refiere a un sistema portátil para evaluar la detección de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra.

Otro aspecto se refiere a un kit para la detección de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra.

30 Un aspecto adicional se refiere a reactivos dentro de un medio de recogida en el que se recoge una muestra que contiene una molécula de ácido nucleico diana. La molécula de ácido nucleico diana se pueden mantener en el medio de recogida con una degradación mínima de la molécula de ácido nucleico diana durante un período de tiempo de semanas o meses. En un aspecto, el material de la muestra diana basado en ADN se puede mantener en el medio de recogida con una degradación mínima de la molécula de ácido nucleico diana durante un período de tiempo de semanas o meses. En un aspecto, el medio de recogida basado en detergente permite el análisis y el
35 procesado rápidos de una muestra.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra que el medio de co-separación basado en detergente retiene las perlas magnéticas en pocillos de placa de microtitulación mejor que el medio de transporte de muestra o de recogida conocido (STM) (medio sin detergente).

40 La Figura 2 muestra que las muestras que tienen sólo 0,2 pg de ácido nucleico diana (ADN) por ml de muestra proporcionan una señal legible usando los métodos de la presente invención.

La Figura 3 muestra la estabilidad de la muestra clínica a temperatura ambiente durante 21 días.

La Figura 4 muestra la estabilidad de la muestra clínica a 33°C durante 21 días.

45 La Figura 5 muestra que los resultados de las pruebas demuestran un S/N > 2,0 para un plásmido de VPH 16 de 0,2 pg/ml que es equivalente a 1000 copias de ADN de VPH 16.

La Figura 6 muestra un sistema para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra que incluye un calentador configurado para calentar múltiples muestras; un luminómetro; y un monitor.

La Figura 7 muestra diferentes reactivos asociados con el ensayo de detección. Los viales de reactivo están codificados por color para facilitar su uso y pueden incluirse en un kit.

La Figura 8 muestra un monitor utilizado junto con el sistema para detectar la presencia de moléculas de ácido nucleico.

- 5 La Figura 9 muestra datos de estabilidad de 11 días para pastillas blandas suspendidas en un medio de recogida a base de detergente y almacenadas a temperatura ambiente.

Descripción detallada

10 La presente descripción cubre métodos, composiciones, reactivos, sistemas y kits para determinar rápidamente la presencia de una molécula de ácido nucleico en una muestra. Los métodos, composiciones, reactivos, sistemas y kits se pueden utilizar con fines de diagnóstico clínico, incluyendo, pero sin limitarse a, la detección e identificación de organismos patógenos y la detección de una predisposición genética a una enfermedad particular.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra. El método comprende:

- a) suspender la muestra en un medio de recogida que comprende un detergente;
- 15 b) desnaturalizar la molécula de ácido nucleico diana;
- c) poner en contacto una o más sondas polinucleotídicas con la molécula de ácido nucleico diana en condiciones que permitan que las sondas y la molécula de ácido nucleico diana se hibriden, formando de este modo un híbrido de ácido nucleico bicatenario;
- 20 d) capturar el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un soporte sólido revestido con un primer anticuerpo específico para el híbrido de ácido nucleico híbrido bicatenario, formando de este modo un complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario/soporte sólido;
- e) separar el complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario/soporte sólido de un ácido nucleico no unido;
- f) conjugar el complejo con un segundo anticuerpo que es específico para el híbrido de ácido nucleico bicatenario o específico para el primer anticuerpo para formar un complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario/anticuerpo de soporte sólido; En el que el segundo anticuerpo está marcado con un marcador detectable;
- 25 g) lavar el complejo de híbrido de ácido nucleico de doble cadena/anticuerpo de soporte sólido con un tampón de lavado que comprende un detergente; y
- h) detectar el marcador en el segundo anticuerpo en el que la detección indica la presencia de la molécula de ácido nucleico diana.

30 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra que incluye suspender una muestra en un medio de recogida que incluye un detergente; desnaturalizar una molécula de ácido nucleico diana; poner en contacto una o más sondas polinucleotídicas con la molécula de ácido nucleico diana en condiciones que permitan a las sondas y la molécula de ácido nucleico diana hibridarse o unirse y capturar el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un soporte sólido revestido con un primer anticuerpo específico para el híbrido de ácido nucleico híbrido de doble cadena.

35

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra que incluye suspender una muestra en un medio de recogida que incluye un detergente; desnaturalizar una molécula de ácido nucleico diana; poner en contacto una o más sondas polinucleotídicas con la molécula de ácido nucleico diana en condiciones que permitan a las sondas y la molécula de ácido nucleico diana hibridarse o unirse, capturar el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un soporte sólido revestido con un primer anticuerpo específico para el híbrido de ácido nucleico híbrido bicatenario y separar el complejo de híbrido de ácido nucleico de doble cadena/soporte sólido del ácido nucleico no unido.

40

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra que incluye suspender una muestra en un medio de recogida que incluye un detergente; desnaturalizar una molécula de ácido nucleico diana; poner en contacto una o más sondas polinucleotídicas con la molécula de ácido nucleico diana en condiciones que permitan a las sondas y la molécula de ácido nucleico diana hibridarse o unirse, capturar el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un soporte sólido revestido con un primer anticuerpo específico para el híbrido de ácido nucleico híbrido bicatenario, formando de este modo un complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario/soporte sólido; separar el complejo híbrido de ácido nucleico de doble cadena/soporte sólido del ácido nucleico no unido; y conjugar el complejo con un segundo anticuerpo que es específico para el híbrido de ácido nucleico bicatenario o específico para el primer anticuerpo para formar un complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario/anticuerpo de soporte sólido.

45

50

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra que incluye suspender una muestra en un medio de recogida que incluye un detergente; desnaturalizar una molécula de ácido nucleico diana; poner en contacto una o más sondas polinucleotídicas con la molécula de ácido nucleico diana en condiciones que permitan a las sondas y la molécula de ácido nucleico diana hibridarse o unirse, capturar el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un soporte sólido revestido con un primer anticuerpo específico para el híbrido de ácido nucleico híbrido bicatenario, formando de este modo un complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario/soporte sólido; y separar el complejo de híbrido de ácido nucleico de doble cadena/soporte sólido del ácido nucleico no unido; conjugar el complejo con un segundo anticuerpo que es específico para el híbrido de ácido nucleico bicatenario o específico para el primer anticuerpo para formar un complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario/anticuerpo de soporte sólido; en el que el segundo anticuerpo está marcado con un marcador detectable; y lavar el complejo de híbrido de ácido nucleico bicatenario/anticuerpo de soporte sólido con un tampón de lavado que comprende un detergente.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo el método:

- 15 a) suspender la muestra en un medio de recogida que comprende un detergente;
- b) desnaturalizar la molécula de ácido nucleico diana en la muestra;
- c) formar un híbrido de ácido nucleico bicatenario poniendo en contacto al menos una sonda polinucleotídica con la molécula de ácido nucleico diana;
- 20 d) formar un complejo de soporte híbrido de ácido nucleico bicatenario capturando el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un soporte, donde el soporte comprende un primer anticuerpo;
- e) formar un complejo de híbrido de ácido nucleico bicatenario-soporte-segundo anticuerpo poniendo en contacto el complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario-soporte con un segundo anticuerpo, en el que el segundo anticuerpo está marcado con un marcador detectable;
- f) lavar el complejo de híbrido de ácido nucleico bicatenario-soporte-segundo anticuerpo con un tampón de lavado; y
- 25 g) detectar el marcador en el segundo anticuerpo en el que la detección indica la presencia de la molécula de ácido nucleico diana.

En un aspecto, el soporte sólido comprende una perla paramagnética modificada que está recubierta o se ha unido a ella un primer anticuerpo inmunoespecífico para ácidos nucleicos híbridos bicatenarios. Se utiliza un campo magnético para separar el complejo de ácido nucleico bicatenario-perlas magnéticas-anticuerpo del ácido nucleico no unido.

En un aspecto, el método no incluye una etapa de pretratamiento de muestra. Por ejemplo, el medio de recogida basado en detergente permite reducir el tiempo de preparación de la muestra lo que, a su vez, puede conducir a una detección acelerada de moléculas de ácido nucleico diana. La muestra se puede analizar mediante métodos, ensayos o el aparato de la descripción de una manera directa al ensayo. En un ejemplo, las etapas de purificación no se realizan en la muestra antes de la evaluación usando ensayos de la descripción. En un aspecto, el lisado bruto se analiza directamente mediante los métodos, ensayos o el aparato de la descripción. En otro aspecto, la muestra no experimenta una etapa de amplificación de la diana.

Un aspecto se refiere a un método de diagnóstico de cáncer mediante la utilización de métodos, kits, ensayos y el aparato proporcionado en la presente memoria. En un aspecto, el cáncer cervical se detecta identificando moléculas de ácido nucleico asociadas con variantes de VPH y VPH. En otro aspecto, la neoplasia intraepitelial cervical (CIN) se puede cribar usando métodos, kits, ensayos, y el aparato proporcionado en la presente memoria. El cáncer detectado puede tratarse posteriormente después de ser diagnosticado por los métodos, kits, ensayos y el aparato proporcionado en la presente memoria. En un aspecto, el cáncer diagnosticado es el cáncer cervical y sus variantes.

En un aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende una muestra biológica suspendida en un medio de recogida que comprende de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica.

En un aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende:

(a) una muestra biológica suspendida en aproximadamente de 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato sódico, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, de

aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica; y

(b) al menos una o más sondas polinucleotídicas.

En un aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende:

5 (a) una muestra biológica suspendida en un medio de recogida que comprende de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato sódico, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica;

10 (b) al menos una o más sondas polinucleotídicas; y

(c) un primer anticuerpo.

En un aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende:

15 (a) una muestra biológica suspendida en un medio de recogida que comprende de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl, y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica;

(b) un primer anticuerpo; y

(c) un segundo anticuerpo.

20 En un aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende:

(a) una muestra biológica suspendida en un medio de recogida que comprende de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato sódico, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica;

25

(b) al menos una o más sondas polinucleotídicas;

(c) un primer anticuerpo; y

(d) un segundo anticuerpo.

En un aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende:

30 (a) una muestra biológica suspendida en un medio de recogida, en el que el medio de recogida comprende al menos un detergente;

(b) un reactivo de desnaturalización;

(c) al menos una sonda polinucleotídica capaz de unirse a una molécula de ácido nucleico diana;

(d) un soporte recubierto con un primer anticuerpo; y

35 (e) un segundo anticuerpo marcado con un marcador detectable.

En un aspecto, cualquiera de las composiciones anteriores puede utilizarse con cualquiera de los medios de recogida descritos en la presente memoria.

40 En un aspecto, la muestra biológica en las composiciones anteriores es una muestra de células cervicales o una muestra de células cervicales humanas. En otro aspecto, las moléculas de ácido nucleico en la muestra biológica están desnaturalizadas. La muestra biológica en las composiciones anteriores puede exhibir estabilidad cuando se almacena en el medio de recogida durante al menos 21 días a 33°C. En un aspecto, el segundo anticuerpo se marca con un marcador detectable.

Muestra biológica

45 Los métodos de la presente invención se pueden usar para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana a partir de muestras, incluyendo, sin limitación, un espécimen o cultivo (por ejemplo, cultivos celulares, microbiológicos y virales) incluyendo muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas pueden ser de un

animal, incluyendo un ser humano, fluidas, sólidas (por ejemplo, heces) o de tejido, así como productos e ingredientes líquidos y sólidos de alimentos y piensos, tales como productos lácteos, verduras, carne y subproductos de carne y deshechos. Las muestras ambientales incluyen materiales ambientales tales como muestras de superficies, suelo, agua y muestras industriales, así como muestras obtenidas de alimentos e instrumentos de proceso de productos lácteos, aparatos, kits, utensilios, artículos desechables y no desechables.

Son particularmente preferidas las muestras biológicas que incluyen, aunque sin limitación, células epiteliales cervicales (por ejemplo, una muestra obtenida de un hisopo cervical), células adenoides, células epiteliales anales, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo y semen. La muestra puede comprender una molécula de ácido nucleico bicatenario o puede comprender una molécula de ácido nucleico monocatenario. Si está presente una molécula de ácido nucleico bicatenario, puede prepararse para el análisis de hibridación por una variedad de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando un álcali, usando proteinasa K/SDS, sales caotrópicas. El proceso de preparación de una molécula de ácido nucleico bicatenario para el análisis de hibridación implica generalmente convertirlo en una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla. Este proceso se conoce generalmente como desnaturalización. Sin embargo, también se contempla que una molécula de ácido nucleico bicatenario pueda ser detectada sin desnaturalización, por ejemplo, a través de una construcción de cadena triple.

La molécula de ácido nucleico diana en una muestra puede ser ADN o ARN o ambos ADN y ARN. La molécula de ácido nucleico diana puede estar contenida dentro de una molécula de ácido nucleico más grande. La detección de la molécula de ácido nucleico diana o de la molécula de ácido nucleico más grande que contiene la molécula de ácido nucleico diana se contempla en esta descripción.

La muestra biológica puede comprender células cervicales, especialmente células cervicales humanas. La muestra puede recogerse con cualquier método o dispositivo conocido en la técnica, incluyendo un dispositivo de recolección químicamente inerte tal como un hisopo con punta DACRON. Se pueden usar otros dispositivos de recolección aceptables incluyendo, pero no limitados a, un hisopo de algodón, un cepillo cervical, un hisopo flocado (un hisopo en forma de un hisopo de DACRON pero hecho con fibras de nylon permitiendo la recolección de más células y la liberación más fácil de células), escobilla cervical, mini escobilla, lavado, o cualquier dispositivo de recolección utilizado con frecuencia en pruebas de Papanicolaou.

En un aspecto, los métodos incluyen la recogida de una muestra de una mujer de más de 30 años de edad. El método también puede incluir la recolección de una muestra de una mujer de más de 30 años a través de un frotis de Papanicolaou o una prueba comparable. La muestra recogida por el frotis de Papanicolaou o una prueba comparable puede ser una muestra de células cervicales.

Una vez que se recoge la muestra, se puede colocar en un tubo de muestra. El tubo se puede sellar para evitar la contaminación. El dispositivo de recogida (hisopo, cepillo, etc.) puede contener además un mecanismo mediante el cual se puede mover una vez que está dentro del tubo de muestra. En un aspecto, el dispositivo de recogida contiene un inserto que puede ser movido usando un imán. En un aspecto, este inserto comprende un metal. En otro aspecto, este inserto comprende un material magnético. El material magnético incluye materiales paramagnéticos, ferromagnéticos y diamagnéticos. Una ventaja de mover el dispositivo de recogida una vez que está dentro del tubo de muestra es evitar que el dispositivo de recogida haga contacto con cualquier extractor de muestras o dispositivos de detección de muestras. Ejemplos de un dispositivo de extracción de muestras incluyen pipetas, puntas de pipeta, botellas cuentagotas u otros dispositivos de extracción de tecnología inferior. Ejemplos de dispositivos de detección de muestras incluyen sondas y puntas de sonda.

La velocidad de este ensayo también es beneficiosa en el cribado de muestras de pacientes en áreas de vida remotas. A menudo, los pacientes viajarán bastante lejos para visitar al médico o la clínica y probablemente no regresarán por algún tiempo después. Por lo tanto, es deseable ser capaz de analizar al paciente y proporcionar los resultados mientras el paciente espera en la clínica. En algunas circunstancias, puede ser difícil seguir el rastro del paciente para proporcionar los resultados de la prueba y/o tratar al paciente después de haber salido del consultorio del médico. Por lo tanto, los ensayos descritos proporcionan resultados durante un tiempo corto, por ejemplo, entre aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas, entre aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, entre aproximadamente 3 horas a aproximadamente 5 horas, entre aproximadamente 4 horas a aproximadamente 8 horas, o entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 12 horas. En otro aspecto, los ensayos descritos proporcionan resultados en menos de aproximadamente 2 horas, menos de aproximadamente 2,5 horas, menos de aproximadamente 3 horas, menos de aproximadamente 3,5 horas, menos de aproximadamente 4 horas, menos de aproximadamente 4,5 horas, menos de aproximadamente 5 horas, menos de aproximadamente 8 horas, menos de aproximadamente 12 horas y menos de aproximadamente 24 horas. Un tiempo de respuesta tan corto permite al médico proporcionar al paciente los resultados y/o el tratamiento el mismo día que el paciente está en la clínica.

Tubo de muestra

Se puede utilizar cualquier tipo de tubo de muestra. Ventajosamente, el tubo de muestra puede estar cerrado o sellado para minimizar la contaminación. El cierre puede ser permanente o extraíble. Ejemplos de cierres extraíbles incluyen tapones de presión, tapones roscados, septos de goma, papel aluminio y películas. El cierre puede

contener una o más aberturas o perforaciones, que cuando se perforan pueden ser re-sellables. Una ventaja de un cierre que contiene tales aberturas o perforaciones es que el cierre no se vuelve ineficaz cuando es perforado, por ejemplo, por un dispositivo de extracción de muestras o un dispositivo de detección de muestras. Una vez que se ha retirado el dispositivo de extracción de muestras o el dispositivo de detección de muestras, el cierre vuelve a sellar, minimizando así la contaminación.

Almacenamiento de la muestra biológica

Una vez que la muestra está en el tubo de muestra, la muestra puede almacenarse secándola con un sustrato, o en un medio conservante, o ambos. La desecación se realiza mediante secado a presión o secado con productos químicos. Esto elimina la mayor parte del agua y es adecuado para la estabilidad a largo plazo. Alternativamente, la muestra puede ser liofilizada (secada por congelación) con un sustrato como trehalosa para asegurar la estabilidad de la muestra.

Otra posibilidad es que la muestra se pueda almacenar suspendiéndola en un medio conservante, conocido y evidente para un experto en la técnica. El propósito del medio conservante es proteger los componentes biológicos que pueden degradarse. Por ejemplo, las células de muestra, la mezcla de sondas, el complejo anticuerpo:perlas utilizado en la etapa de captura y el anticuerpo secundario utilizado en la etapa de detección son todos susceptibles de degradación. Un medio conservante en la etapa inicial de la recolección idealmente proporciona estabilidad e integridad de la muestra y puede afectar a las etapas posteriores en el proceso de captura y detección de ácidos nucleicos. En un aspecto, la muestra puede almacenarse a temperatura ambiente, refrigerarse o congelarse antes o después de la adición del medio conservante.

Medios de recolección

En un aspecto, la muestra puede ser recogida y almacenada en un medio de recogida. El medio de recogida tiene varias funciones, incluyendo como medio conservante para conservar los ácidos nucleicos e inhibir las nucleasas para prevenir la degradación de los ácidos nucleicos antes del análisis. En un aspecto, el medio de recogida contiene al menos un detergente. En otro aspecto, el medio de recogida contiene al menos dos detergentes, al menos tres detergentes, o al menos cuatro detergentes. En un aspecto, cada uno de los detergentes es diferente. En otro aspecto, el medio de recogida basado en detergente comprende dos detergentes diferentes, uno que es capaz de controlar la señal de fondo y otro detergente que mejora el comportamiento de las perlas magnéticas, por ejemplo, la migración a través de una muestra viscosa. Debido a que el detergente mejora el comportamiento de las perlas, las perlas se pueden lavar con una variedad de dispositivos menos precisos, tales como una botella de chorros y una botella cuentagotas, sin causar demasiada rotura de las perlas. Tal metodología puede ser ventajosa para su uso en países en desarrollo en los que los fondos o el acceso a equipos tecnológicamente avanzados, tales como los dispositivos de pipeteado, pueden no estar disponibles.

Además, la presente invención proporciona un ensayo robusto que puede soportar el uso de dispositivos de suministro de reactivos menos precisos. Los reactivos en este ensayo fueron diseñados para ser robustos y soportar variabilidad en el suministro del volumen de reactivo. Por ejemplo, la etapa de neutralización del ensayo utiliza una solución de pH neutro altamente tamponada para llevar el pH muy básico de la reacción al intervalo de pH apropiado para la hibridación con tolerancias de volumen muy grandes.

El uso de un medio de recogida a base de detergente para su uso en el ensayo puede incluir uno o más detergentes. En un aspecto, se emplea calor durante las etapas de hibridación, captura y detección del ensayo. Incluso con detergente y la aplicación de calor, los anticuerpos utilizados en el ensayo siguen siendo funcionales.

La figura 1 demuestra que un medio de recogida basado en detergente mejora en gran medida la capacidad para evitar la pérdida y la migración de perlas magnéticas durante la manipulación en comparación con los medios de recogida estándar. El medio de recogida a base de detergente puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir simplemente en uno, dos, tres o cuatro o más detergentes. Los detergentes son conocidos en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a, detergentes catiónicos tales como, pero sin limitarse a, bromuro de cetilpiridinio, bromuro de cetiltrimetilamonio (colectivamente conocidos como compuestos de cetrimonio) y cloruros de alquilbencilidimetilamonio (conocidos colectivamente como compuestos de benzalconio), y sales de alquil-trimetilamonio; detergentes aniónicos tales como, pero no limitados a, dodecil sulfato de sodio (SDS) y Sarkosyl; y detergentes no desnaturalizantes tales como NP-40; y otros detergentes. NP-40 también se conoce como NP-40 de tipo Tergitol, que es nonil fenoxilpolietoxietanol. El NP-40 no es lo suficientemente potente como para romper la membrana nuclear, pero puede romper la membrana plasmática. Como tal, puede utilizarse para obtener el contenido citoplásmico de un cultivo celular.

Pueden usarse otros detergentes y una combinación de detergentes, y ventajosamente su combinación proporciona la capacidad de controlar el ruido de fondo y mejorar el comportamiento de las perlas magnéticas (cuando el soporte sólido empleado comprenda perlas magnéticas). En ciertos aspectos, un detergente es un detergente aniónico y el segundo detergente es un detergente no aniónico. Por ejemplo, en un aspecto, la combinación de detergentes no iónicos y aniónicos ayuda a mantener un bajo ruido de fondo. En un aspecto, un medio de recogida a base de

detergente comprende un detergente aniónico tal como desoxicolato de sodio, que controla el ruido de fondo y NP-40, lo que mejora el comportamiento de las perlas magnéticas.

5 La combinación de estos dos tipos de detergentes proporciona beneficios sinérgicos más allá de una simple combinación de adición de dos detergentes juntos: control del ruido de fondo, mejor comportamiento de las perlas y mayor velocidad de ensayo. La presencia de estos detergentes (en el medio de recogida a base de detergente) proporciona la capacidad para conseguir resultados de ensayo más rápidos, pero no afecta negativamente al ácido nucleico o al anticuerpo de captura durante las etapas analíticas posteriores.

10 Además, el medio de recogida a base de detergente mejora la retirada de la muestra del dispositivo de recogida a medida que la muestra se disuelve más fácilmente. Además, el medio de recogida a base de detergente mejora la homogeneidad de la muestra en comparación con otros medios de recogida tales como, pero sin limitarse a, PRESERVCYT (utiliza una solución al 40% de metanol), STM (utiliza un agente caotrópico) y alcohol. El medio de recogida a base de detergente también redujo la viscosidad de la muestra después de la mezcla (manual o automatizada).

15 La concentración de NP-40 en el medio de recogida puede oscilar entre aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0%, de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1,0%, así como cualquier número dentro de los rangos citados. En ciertos aspectos, el NP-40 está presente en una concentración de aproximadamente 0,8% a aproximadamente 1,5%; desde aproximadamente 0,9% hasta aproximadamente 1,2% y en ciertos aspectos es aproximadamente 1,0%. En otro aspecto, el NP-40 está presente en una concentración de aproximadamente 0,1%, aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,4%, aproximadamente 0,5%,
20 aproximadamente 0,6%, aproximadamente 0,7%, aproximadamente 0,8%, aproximadamente 0,9%, aproximadamente 1,0%, aproximadamente 1,1%, aproximadamente 1,2%, aproximadamente 1,3%, aproximadamente 1,4%, aproximadamente 1,5%, aproximadamente 1,6%, aproximadamente 1,7%, aproximadamente 1,8%, aproximadamente 1,9%, o aproximadamente 2,0%. La concentración de desoxicolato de sodio en el medio de recogida puede variar desde aproximadamente 0,10% hasta aproximadamente 0,40%, desde aproximadamente 0,20% hasta aproximadamente 0,30%, así como cualquier número dentro de los intervalos citados. En un aspecto, la concentración de desoxicolato de sodio es de aproximadamente 0,10%, aproximadamente 0,15%, aproximadamente 0,20%, aproximadamente 0,25%, aproximadamente 0,30%, aproximadamente 0,35%, o aproximadamente 0,40%.

30 El medio de recogida a base de detergente puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir simplemente en un tampón, dos detergentes, un quelante y un conservante. El tampón puede ser Tris-HCl en una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM; de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM; desde aproximadamente 40 mM hasta aproximadamente 50 mM, y de aproximadamente 45 mM a aproximadamente 55 mM, así como cualquier número dentro de los intervalos citados. El tampón puede ser también Tris-HCl en una concentración de aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 55 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 65 mM, aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 75 mM.

40 Puede usarse cualquier conservante y la elección puede depender de factores tales como la funcionalidad deseada, minimización de los efectos secundarios, el coste, etc. Los conservantes adecuados incluyen gentamicina, ProClin, dimersol y azida sódica. La concentración de los conservantes en el medio de recogida depende de factores tales como el tipo de conservante, su eficacia, sus efectos secundarios, etc. Por ejemplo, para la azida sódica, la concentración de azida sódica puede variar desde aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,1%, desde aproximadamente 0,025% hasta aproximadamente 0,075%, y desde aproximadamente 0,04% hasta aproximadamente 0,06%, así como cualquier número dentro de los rangos citados. El conservante, por ejemplo, la azida sódica, también puede estar presente en aproximadamente 0,01%, aproximadamente 0,02%,
45 aproximadamente 0,03%, aproximadamente 0,04%, 0,05%, aproximadamente 0,06%, aproximadamente 0,07%, aproximadamente 0,08%, aproximadamente 0,09%, o aproximadamente 0,10%.

50 En un aspecto, el medio de recogida a base de detergente comprende, consiste esencialmente en, o consta de 1,0% de NP-40, 0,25% de desoxicolato de sodio, 50 mM de Tris-HCl, 25 mM de EDTA, 150 mM de NaCl y 0,05% de azida sódica. En otro aspecto, el medio de recogida a base de detergente comprende, consiste esencialmente en, o consta de aproximadamente de 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica. En otros aspectos, el medio de recogida a base de detergente comprende, consiste esencialmente en, o consta de aproximadamente de 0,8% a aproximadamente 1,5% de NP-40, de aproximadamente 0,20% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM de EDTA, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl, y de aproximadamente 0,025% a aproximadamente 0,075% de azida sódica. En aún otro aspecto,
55 el medio de recogida a base de detergente comprende, consiste esencialmente en, o consta de aproximadamente de 0,9% a aproximadamente 1,2% de NP-40, de aproximadamente 0,20% a aproximadamente 0,30% de desoxicolato de sodio, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM de Tris-HCl, de aproximadamente

20 mM a aproximadamente 30 mM EDTA, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 150 mM de NaCl, y de aproximadamente 0,04% a aproximadamente 0,06% de azida sódica.

5 En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consta de NP-40 y EDTA. En otro aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consta de NP-40, EDTA y azida sódica. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consta de desoxicolato sódico, EDTA y azida sódica. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consta de NP-40, desoxicolato sódico, Tris-HCl, EDTA y azida sódica.

10 En otro aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consta de 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40 y de 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA. En otro aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consta de 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida de sodio. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consta de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato sódico, EDTA de 10 mM a aproximadamente 50 mM y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consta de aproximadamente de 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, de 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste esencialmente en, o consta de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato sódico, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica.

25 En un aspecto, el medio de recogida es un medio no caotrópico. Es decir, por ejemplo, el medio de recogida no incluye un medio caotrópico o sales caotrópicas. Sin limitación, en un aspecto, el medio de recogida no incluye clorhidrato de guanidina ni urea. Una ventaja potencial de usar un medio de recolección no caotrópico es una mejor resuspensión de una muestra, pruebas más reproducibles y alícuotas de ensayo más uniformes con relación a un medio que incluye un medio caotrópico o sales caotrópicas.

30 Una ventaja de usar un medio de recogida a base de detergente es que preserva la estabilidad de la muestra. Una muestra almacenada en un medio de recogida a base de detergente tal como se describe es estable durante al menos 31 días, y cuando se mantiene a temperaturas de 15°C a 33°C es estable durante al menos 21 días. En un aspecto, una muestra es estable cuando se congela en un medio de recogida a base de detergente a -20°C durante al menos seis meses. En otro aspecto, una muestra de células cervicales es estable durante al menos 31 días, durante al menos 21 días cuando se mantiene a temperaturas de 15 ° C a 33 ° C y durante al menos 6 meses en un medio de recolección a base de detergente a -20°C.

35 En un aspecto, el medio de recogida basado en detergente presenta una sensibilidad para detectar neoplasia intraepitelial cervical o cáncer de al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% para una relación de corte de 0,5 unidades luminosas relativas. En otro aspecto, el medio de recogida a base de detergente presenta una especificidad para detectar neoplasia intraepitelial cervical o cáncer de al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% para una relación de corte de 0,5 unidades luminosas relativas. En otro aspecto más, el medio de recogida a base de detergente presenta una sensibilidad para detectar neoplasia intraepitelial cervical severa o moderada o cáncer (CIN2+) de aproximadamente 90% y una especificidad de aproximadamente 84% para una relación de corte de 0,5 unidades luminosas relativas. En un aspecto, el medio a base de detergente incluye de 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato de sodio, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica.

Un medio de recogida a base de detergente también conduce a un rendimiento de ensayo mejorado bajo rigurosas condiciones de hibridación y captura (por ejemplo, a temperaturas entre 65°-75°) con respecto al medio de recogida que contiene un desnaturalizante.

50 La presencia de uno, dos, tres, cuatro o más detergentes puede reducir la viscosidad de la muestra, lo cual ayuda en la eliminación de la fase líquida de las perlas magnéticas, así como ayuda en la mezcla de la muestras.

55 En un aspecto, una muestra tal como sangre o una muestra de células cervicales exfoliadas puede ser recogida y suspendida en un medio de recogida a base de detergente. La muestra se puede recoger con un dispositivo de recolección químicamente inerte tal como un hisopo con punta DACRON. Se puede usar cualquier otro hisopo adecuado, tal como hisopos de fibra de nylon. La muestra puede almacenarse en un medio de recogida a base de detergente para evitar la degradación de los ácidos nucleicos antes del análisis y para mantener la estabilidad de la muestra.

Las muestras pueden recogerse en otros medios de recogida conocidos y después pueden utilizarse en los métodos descritos en la presente memoria. Ejemplos de otros medios de recogida incluyen PRESERVCYT, SUREPATH, DCM (Medio de Colección DIGENE) y STM (Muestra/Medio de Transporte de Muestras). Ciertos medios de recogida son específicos de ácido nucleico. Por ejemplo, no se usa DCM cuando el ácido nucleico diana es ARN. Las muestras recogidas en algunos de estos medios pueden requerir tratamiento antes de que los ácidos nucleicos en las muestras puedan ser detectados y analizados. Se conocen en la técnica varios métodos de procesamiento de muestras (también conocidos como preparación de las muestras). Por ejemplo, las muestras de células cervicales recogidas para análisis citológico en un medio tal como PRESERVCYT pueden combinarse con un tampón de lisis basado en detergente seguido por la adición de perlas magnéticas que comprenden superficies de unión a ácidos nucleicos. Además, se pueden combinar otras muestras de células recogidas en otros medios de recogida comúnmente conocidos con un tampón de lisis basado en detergente seguido por la adición de perlas magnéticas que comprenden superficies de unión a ácidos nucleicos.

Moléculas de ácido nucleico diana

Las moléculas de ácido nucleico diana incluyen, sin limitación, moléculas de ácido nucleico encontradas en especímenes o cultivos (por ejemplo, cultivos celulares, microbiológicos y virales) incluyendo muestras biológicas y ambientales. Las moléculas de ácido nucleico diana se pueden encontrar en muestras biológicas de un animal, incluyendo un ser humano, fluidas, sólidas (por ejemplo, heces) o tejidos, así como productos e ingredientes líquidos y sólidos de alimentos y piensos, tales como productos lácteos, verduras, carne y subproductos de la carne, y residuos. Las moléculas de ácido nucleico diana pueden encontrarse en muestras ambientales e incluir material ambiental tal como muestras de superficie, suelo, agua y muestras industriales, así como muestras obtenidas de alimentos e instrumentos de procesos de lácteos, aparatos, equipos, utensilios, artículos desechables y no desechables.

Las moléculas de ácido nucleico diana que se encuentran en las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, muestras cervicales (por ejemplo, una muestra obtenida de un hisopo cervical) o muestras de células cervicales, células adenoides, células epiteliales anal, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, fluido pleural, leche, linfa, esputo, orina y semen. Las moléculas de ácido nucleico diana pueden ser de otros virus, bacterias, micobacterias o plasmidios, por ejemplo citomegalovirus (CMV), herpes, VIH, H1N1, clamidia, gonorrea, *Trichomonas vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, tuberculosis, coronavirus o influenza asociado con SARS. En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico diana son al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 98%, al menos 99% , o al menos 100% idénticas a las moléculas de ácido nucleico asociadas con una cualquiera de las muestras cervicales (por ejemplo, una muestra obtenida de un hisopo cervical) o muestras de células cervicales, células adenoides, células epiteliales anales, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, orina y semen, otros virus, bacterias, micobacterias o plasmidios, por ejemplo citomegalovirus (CMV), herpes, VIH, H1N1, chlamydia, gonorrea, *Neisseria gonorrhoeae* (GC), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Trichomonas vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, tuberculosis, coronavirus asociado al SRAS o influenza.

En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico diana son virus del papiloma humano (VPH) e incluyen variantes genéticas del VPH. Una variante incluye polimorfismos, mutantes, derivados, modificados, alterados, o formas similares del ácido nucleico diana. En un aspecto, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico de VPH. En otro aspecto, el ácido nucleico de VPH es ADN de VPH de un tipo de VPH de alto riesgo. En otro aspecto, el ácido nucleico de VPH es ARN de VPH de un tipo de VPH de alto riesgo. En otro aspecto, los ácidos nucleicos diana son cualquiera de los tipos de VPH de alto riesgo 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o cualquiera de los tipos del VPH de bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico diana es al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idéntica a moléculas de ácido nucleico asociadas con cualquiera de VPH, variantes genéticas de VPH, ADN de VPH de un tipo de VPH de alto riesgo, o ARN de VPH de un tipo de VPH de alto riesgo. En otro aspecto, los ácidos nucleicos diana son al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% idénticos a moléculas de ácido nucleico asociadas con cualquiera de los tipos de VPH de alto riesgo 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o cualquiera de los tipos de VPH de bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83 del VPH de bajo riesgo.

Utilizando métodos de la presente invención, la molécula de ácido nucleico diana puede estar presente en concentraciones menores que aproximadamente 1 pg por ml, menos de aproximadamente 0,75 pg por ml, menos de 0,5 pg por ml, menos de 0,25 pg por ml e incluso tan bajo como 0,2 pg por ml. Como se ve en la FIG. 2 se obtiene una relación señal/ruido excelente cuando se utilizó ADN de VPH-16 como molécula de ácido nucleico diana presente a una concentración de 0,2 pg por ml.

Como se ha indicado anteriormente, la molécula de ácido nucleico diana puede ser ADN o ARN. Cuando la molécula de ácido nucleico diana es ADN, la sonda es preferiblemente ARN y cuando el ácido nucleico diana es ARN, la sonda es preferiblemente ADN. Sin embargo, se puede usar una sonda de ADN con molécula de ácido nucleico

diana de ADN y se puede usar una sonda de ARN con molécula de ácido nucleico diana de ARN. También como se ha indicado anteriormente, la molécula de ácido nucleico diana puede determinar el medio de recogida utilizado.

Desnaturalización

5 Después de que la muestra se recoge en un medio de recogida a base de detergente como se ha descrito anteriormente, la muestra puede tratarse con un reactivo de desnaturalización para hacer que la molécula de ácido nucleico diana sea accesible a la hibridación. En un aspecto, la muestra se desnaturaliza con una solución alcalina. Se puede usar cualquier álcali que pueda llevar un pH de solución a aproximadamente pH 12, aproximadamente pH 13 o aproximadamente pH 14. Además, se puede usar cualquier álcali que pueda llevar un pH de solución a un intervalo de aproximadamente pH 12 a aproximadamente pH 13, de aproximadamente pH 12 a aproximadamente pH 10 de aproximadamente pH 13 a aproximadamente pH 14. Las concentraciones adecuadas de álcali incluyen de aproximadamente 1,0 N a aproximadamente 2,0 N, de aproximadamente 1,25 N a aproximadamente 1,75 N, y de aproximadamente 1,25 N a aproximadamente 1,5 N, y aproximadamente 1,5 N, así como cualquier número dentro de los intervalos citados. Sin limitarse, los álcalis adecuados incluyen NaOH y KOH.

15 En un ejemplo, aproximadamente un volumen de la muestra suspendida en un medio de recogida a base de detergente puede tratarse con aproximadamente medio volumen de solución de NaOH 1,75 N. Por ejemplo, en ciertos aspectos aproximadamente una alícuota de 50 µl se elimina de una muestra suspendida en un medio de recogida a base de detergente y aproximadamente 25 µl de solución de NaOH 1,75 N se añaden a la muestra de alícuota de 50 µl. A temperatura ambiente, la muestra tratada con el reactivo de desnaturalización se puede mezclar mezclando a mano o agitando mecánicamente a aproximadamente 800 rpm, aproximadamente 900 rpm, 20 aproximadamente 1000 rpm, entre aproximadamente 600 y aproximadamente 1000 rpm, o entre aproximadamente 600 y 1200 rpm. El pH de la muestra después de la adición del reactivo de desnaturalización puede ser de aproximadamente 14. En otro aspecto, el pH puede ser de aproximadamente pH 12 o pH 13. Dicho pH básico cortará y desnaturalizará la mayoría del ácido nucleico en la muestra. Además, el tratamiento alcalino puede interrumpir las interacciones entre péptidos y ácidos nucleicos para mejorar la accesibilidad del ácido nucleico diana y degradar la proteína.

30 El tratamiento alcalino de la proteína homogeneiza eficazmente la muestra para asegurar la reproducibilidad de los resultados del análisis para una muestra dada. También puede reducir la viscosidad de la muestra para aumentar la cinética, homogeneizar la muestra y reducir el fondo mediante la destrucción de cualquier ácido nucleico endógeno de ARN de cadena sencilla, híbridos de ADN-ARN o híbridos de ARN-ARN en la muestra. También ayuda a inactivar enzimas tales como RNasas y DNasa que pueden estar presentes en la muestra. Un experto en la materia apreciaría que si ARN es el ácido nucleico diana (en oposición al ADN), pueden ser preferibles diferentes reactivos, incluyendo, pero sin limitarse a, extracción con fenol y precipitación con TCA/acetona, y extracción con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo.

35 Pueden emplearse otros métodos de desnaturalización tales como la utilización de una etapa de calentamiento, por ejemplo, calentamiento de la muestra a aproximadamente 95°C para separar las cadenas de ácido nucleico. También se pueden usar enzimas como la helicasa.

40 En un aspecto, se añade NaOH de 1,5 N a 2,0 N a la muestra y se calienta. En otro aspecto, se añade NaOH 1,75 N a la muestra y se calienta. La muestra con reactivo de desnaturalización se puede calentar a aproximadamente de 60°C a 80°C durante aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 65°C a aproximadamente 75°C durante aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 67°C a aproximadamente 70°C durante aproximadamente 30 minutos, o a aproximadamente 70°C durante aproximadamente 30 minutos, o cualquier número dentro de los intervalos citados. En otro aspecto, la muestra con reactivo de desnaturalización se calienta a aproximadamente 60°C a aproximadamente 80°C durante aproximadamente 20 a aproximadamente 40 minutos, o aproximadamente 65°C a aproximadamente 75°C durante aproximadamente 20 a aproximadamente 40 minutos, a aproximadamente 45 67°C a aproximadamente 70°C durante aproximadamente 20 a aproximadamente 40 minutos, o aproximadamente 70°C durante aproximadamente 20 a aproximadamente 40 minutos, o cualquier número dentro de los intervalos citados. El objetivo de las condiciones de tiempo y temperatura descritas es proporcionar una desnaturalización máxima de la muestra en una cantidad mínima de tiempo, dejando el ácido nucleico diana en una condición adecuada para llevar a cabo las etapas restantes de hibridación, captura, lavado y detección. Por lo tanto, la muestra puede calentarse en el reactivo de desnaturalización durante aproximadamente 5 a aproximadamente 120 minutos, aproximadamente 10 a aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 50 40 minutos, aproximadamente 30 minutos, o cualquier número dentro de los intervalos citados. Los expertos en la materia entenderán fácilmente que pueden equilibrarse períodos más largos de incubación a temperaturas más bajas o períodos más cortos de incubación a temperaturas más altas para proporcionar un efecto similar a las condiciones descritas en la presente memoria.

Hibridación e unión de sondas

Después de desnaturalizar la muestra que contiene el ácido nucleico, se pone en contacto con una o más sondas polinucleotídicas bajo una condición suficiente para que una o más sondas polinucleotídicas se hibriden con el ácido nucleico diana en la muestra para formar un híbrido de ácido nucleico bicatenario. La sonda puede ser ADN de

longitud completa, truncado o sintético o ARN de longitud completa, truncado o sintético. Si el ácido nucleico diana es ADN, entonces la sonda puede ser ARN y si el ácido nucleico diana es ARN, entonces la sonda puede ser ADN. Preferiblemente, la o las sondas polinucleotídicas se diluyen en un diluyente de sonda que también puede actuar como un tampón de hibridación neutralizante (para neutralizar el reactivo de desnaturalización básico).

- 5 El diluyente de la sonda utilizado para las sondas de ADN o ARN diferirá debido a los diferentes requisitos necesarios para la estabilidad del ADN frente al ARN. Por ejemplo, si las sondas son ARN, es preferible neutralizar primero la muestra y añadir la sonda o bien añadir la sonda de ARN y el agente neutralizante (diluyente de la sonda) a la muestra al mismo tiempo ya que el NaOH puede destruir el ARN. El diluyente de la sonda se puede usar para disolver y diluir la sonda y también ayudar a restaurar la muestra a aproximadamente un pH neutro, por ejemplo, de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 9, para proporcionar un entorno más favorable para la hibridación. Se puede utilizar un volumen suficiente de diluyente de la sonda, preferiblemente la mitad del volumen de la muestra, para neutralizar la muestra tratada con base.

- 15 En un aspecto, el diluyente de la sonda comprende un tampón, ácido poliacrílico, NaOH y azida de sodio. El diluyente de la sonda puede comprender ácido acético. En un aspecto, el diluyente de la sonda comprende 2,2 M de BES (ácido N,N-Bis (2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), ácido poliacrílico (PAA) 2,6%, NaOH 0,7 N y azida sódica al 0,05%. El diluyente de la sonda puede contener de aproximadamente 1,2 M a aproximadamente 2,6 M de BES, de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 2,5 M de BES; desde aproximadamente 1,75 M hasta aproximadamente 2,25 M BES; desde aproximadamente 2 M hasta 2,4 M de BES, o aproximadamente 2,2 M de BES, así como cualquier número dentro de los intervalos citados. En un aspecto, el diluyente de la sonda puede contener de aproximadamente 2% a aproximadamente 3,0% de PAA o, así como cualquier número dentro de los intervalos citados. En otro aspecto, la concentración de PAA es de aproximadamente 2,2% a aproximadamente 2,7%. En aún otro aspecto, la concentración de PAA es de aproximadamente 2,6%. En un aspecto adicional, el diluyente de la sonda puede contener de aproximadamente 0,6 N a aproximadamente 0,8 N de NaOH, por ejemplo, aproximadamente 0,7 N de NaOH. La concentración de NaOH aumenta generalmente a medida que aumenta la cantidad de BES.

- 25 Para las sondas de longitud completa, se puede añadir una solución alcalina calentada a la muestra, a continuación se puede añadir el diluyente de la sonda a la muestra a temperatura ambiente y, a continuación, se puede recalentar la muestra. Tal proceso puede inhibir la formación de la estructura secundaria. Los anticuerpos tienden a unirse irreversiblemente a estructuras con estructura secundaria. Cuando se utilizan sondas no de longitud completa tales como sondas truncadas o sintéticas, el calentamiento de las soluciones o muestra puede no ser necesario debido a que los problemas de las estructuras secundarias no están presentes. En un aspecto, la muestra no se calienta cuando se usa con sondas truncadas o sintéticas.

- 30 Después del tratamiento con el reactivo de desnaturalización, se puede añadir a la muestra, en condiciones apropiadas, una alícuota de tampón de neutralización, en un aspecto del diluyente de la sonda descrito, en el que se disuelven una o más sondas, para permitir la hibridación o unión de la sonda y el ácido nucleico diana. El tampón de neutralización puede contener una sola sal de tampón. En un aspecto, el tampón de neutralización no contiene más de una sal tamponante única. La condición de hibridación es suficiente para permitir que una o más sondas polinucleotídicas se hibriden con una correspondiente secuencia de ácido nucleico complementaria, si está presente, en la muestra para formar un híbrido de ácido nucleico bicatenario.

- 35 Se emplean condiciones de hibridación adecuadas para las sondas y diluyentes particulares descritos en la presente memoria. Por ejemplo, las sondas y los ácidos nucleicos de la muestra pueden incubarse durante un tiempo de hibridación, preferiblemente de al menos aproximadamente 5 a aproximadamente 30 minutos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 minutos, o de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 minutos, o aproximadamente 10 minutos, asimismo como cualquier número dentro de los intervalos citados suficientes para permitir que una o más sondas polinucleotídicas se hibriden con una secuencia de ácido nucleico complementaria correspondiente. La condición de hibridación puede incluir una temperatura de hibridación de al menos aproximadamente 65°C, de aproximadamente 68,5°C y de aproximadamente 67°C a aproximadamente 70°C, así como cualquier número dentro de los intervalos citados. Para un ácido nucleico diana dado y una sonda dada, un experto en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones de hibridación deseadas mediante experimentación rutinaria. Un experto en la técnica apreciará además que el tiempo y la temperatura de hibridación deben optimizarse, uno con respecto al otro. Así, temperaturas de hibridación más altas pueden llevarse a cabo durante períodos de tiempo más cortos y viceversa. Sin ser limitadas, las condiciones de hibridación rigurosas pueden controlarse aumentando la temperatura, aumentando las condiciones iónicas por encima de 0,5 M (por ejemplo, NaCl) o reduciendo la concentración de PAA. Como ejemplo no limitativo, las condiciones de hibridación rigurosas pueden incluir la realización de una reacción de hibridación a temperaturas elevadas, tal como de al menos aproximadamente 65°C, al menos aproximadamente 68,5°C, entre aproximadamente 67°C y aproximadamente 70°C, y entre aproximadamente 69°C y aproximadamente 70°C. Las condiciones de hibridación rigurosas también pueden incluir temperaturas elevadas, tales como de al menos aproximadamente 65°C, al menos aproximadamente 68,5°C y entre aproximadamente 67°C y aproximadamente 70°C.

- 60 En un aspecto no limitativo, la sonda es capaz de hibridar o unirse a moléculas de ácido nucleico al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos

98%, al menos 99%, o 100% idénticas a moléculas de ácido nucleico asociadas con VPH, variantes genéticas de VPH, ADN de VPH de un tipo de VPH de alto riesgo, o ARN de VPH de un tipo de VPH de alto riesgo o cualquiera de los tipos de VPH de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o cualquiera de los tipos de VPH de bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83. En otro aspecto, la sonda es complementaria a VPH, variantes genéticas de VPH, ADN de VPH de un tipo de VPH de alto riesgo, ARN de VPH de un tipo de VPH de alto riesgo, o cualquiera de los tipos de VPH de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o cualquiera de los tipos de VPH de bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83.

En un aspecto, la muestra se suspende en un medio de recogida a base de detergente, el ácido nucleico diana se desnatura con un reactivo de desnaturación y se hibrida con sondas de ácido nucleico suspendidas en un tampón neutralizante. En otro aspecto, el tampón de neutralización es el diluyente de la sonda de la presente invención. El diluyente de la sonda puede comprender 2,2 M de BES (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), ácido poliacrílico al 2,6%, NaOH 0,7 N y azida de sodio al 0,05%.

Captura

Después de permitir que las sondas se hibriden con la molécula de ácido nucleico diana y formen un híbrido de ácido nucleico bicatenario, el híbrido es capturado por una molécula que es específica para el híbrido de ácido nucleico bicatenario. Las moléculas específicas para los híbridos de ácido nucleico bicatenarios incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, proteínas tales como, pero sin limitarse a, RNAsa H, ácidos nucleicos incluyendo, pero sin limitación, aptámeros o ácidos nucleicos específicos de secuencia. Los aptámeros son tramos cortos de secuencias aleatorias que se seleccionan sucesivamente a partir de una biblioteca de secuencias por hibridación con un objetivo, amplificación de los aptámeros hibridados y repetición del proceso de selección. En un aspecto, la molécula específica para el híbrido de ácido nucleico bicatenario es capturada por un anticuerpo, conocido como anticuerpo antihíbrido.

En un aspecto, un primer anticuerpo antihíbrido se inmoviliza sobre un soporte usando técnicas que son estándar en la técnica. Ejemplos de soportes adecuados incluyen enlaces covalentes o adsorción, por ejemplo, interacciones proteína-proteína, perlas de proteína G, interacción biotina-estreptavidina, EDAC para enlazar con un grupo carboxilo o tosilo, etc., o hibridación directamente sobre el soporte sólido usando, Por ejemplo, ácidos nucleicos específicos de secuencia en una columna de afinidad.

Los soportes incluyen, pero no se limitan a perlas, perlas magnéticas, que como se ha indicado anteriormente incluyen perlas paramagnéticas, diamagnéticas, ferromagnéticas, ferromagnéticas y diamagnéticas, columnas, placas, papel de filtro, polidimetilsiloxano (PDMS) y varillas de medición. Puede utilizarse cualquier soporte siempre y cuando permita la extracción de la fase líquida y proporcione la capacidad de separar los anticuerpos unidos y no unidos. Las perlas magnéticas son particularmente útiles porque pueden dejarse en la solución y la fase líquida puede extraerse o decantarse, si se aplica un campo magnético para inmovilizar las perlas. Se prefieren perlas que sean pequeñas y tengan un área superficial alta, tales como perlas de aproximadamente 1 μm de diámetro. También se pueden usar otras perlas que emplean conmutación de carga o captura de sílice (en oposición a campos magnéticos).

Los híbridos se incuban con el anticuerpo antihíbrido unido al soporte durante una cantidad de tiempo suficiente para permitir la captura de los híbridos de ácido nucleico bicatenarios por los anticuerpos antihíbridos inmovilizados. En un aspecto, el soporte es una perla.

El anticuerpo antihíbrido puede ser monoclonal o policlonal. En un aspecto, el anticuerpo es monoclonal. En un aspecto, el anticuerpo se acopla al soporte mediante un enlace de hidrocloreuro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDAC). En un aspecto, el soporte es una perla de poliestireno. En un aspecto, el soporte o la perla acoplada al anticuerpo se diluye en un tampón de dilución de perlas. El tampón de dilución de perlas es útil para minimizar la desnaturación de las proteínas en la perla. Un ejemplo de un tampón de dilución de perlas comprende 6% de caseína, 100 mM de Tris-HCl, 300 mM de NaCl y 0,05% de azida de sodio.

En un aspecto, las perlas recubiertas con el anticuerpo antihíbrido se incuban con la muestra a aproximadamente 67°C a aproximadamente 70°C durante aproximadamente 30 minutos. En otro aspecto, las perlas y la muestra se incuban a aproximadamente 68°C a aproximadamente 69°C durante aproximadamente 30 minutos. En otro aspecto más, las perlas y la muestra se incuban a aproximadamente 68,5°C durante 30 minutos. El tiempo de incubación puede oscilar desde aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 60 minutos, desde aproximadamente 15 minutos hasta aproximadamente 45 minutos, desde aproximadamente 20 minutos hasta aproximadamente 40 minutos, o cualquier número dentro de los intervalos citados, y es generalmente inversamente proporcional a la temperatura. Los expertos en la técnica entenderán que el tiempo de incubación, la temperatura y/o las condiciones de agitación pueden variar para conseguir cinéticas de captura alternativas, según se desee.

Después de la captura del híbrido ácido nucleico/sonda diana tal como se ha descrito anteriormente, el híbrido capturado se puede separar del resto de la muestra por lavado de los ácidos nucleicos no capturados.

Conjugación

Otra etapa en el método puede implicar proporcionar un segundo anticuerpo que también es específico para híbridos de ácidos nucleicos de doble cadena o, alternativamente, es específico para el primer anticuerpo. El segundo anticuerpo puede marcarse de forma detectable, directa o indirectamente, y puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. En un aspecto, el segundo anticuerpo es monoclonal. En otro aspecto, el segundo anticuerpo está marcado directamente con un marcador detectable y es monoclonal. El segundo anticuerpo se utiliza para detectar la presencia de híbridos de ácido nucleico bicatenarios. En un aspecto, el segundo anticuerpo tiene un marcador que debe reaccionar con un sustrato para proporcionar una señal que puede ser detectada. El segundo anticuerpo puede disolverse en un tampón adecuado. En un aspecto, el tampón comprende TrisHCl 100 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1,0 mM, Tween 20 al 0,25%, RNasa A 0,2 mg/ml, hidroxipropil-b-ciclodextrina al 4% (ciclodextrina), tampón de dilución de perlas al 30% tal como se discutió anteriormente, 0,05% de IgG de cabra, 0,05% de azida de sodio.

En un aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a temperatura ambiente. En un aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a temperatura ambiente durante entre aproximadamente 1 hora y 2 horas. En otro aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. En otro aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a aproximadamente 37°C, aproximadamente 45°C o aproximadamente 50°C. En un aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a aproximadamente 37°C, aproximadamente 45°C, o aproximadamente 50°C, entre 35°C y aproximadamente 40°C, entre 40°C y aproximadamente 50°C durante entre aproximadamente 20 minutos y 40 minutos. En un aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a aproximadamente 37°C, aproximadamente 45°C, o aproximadamente 50°C durante entre aproximadamente 20 minutos y 40 minutos. En otro aspecto, la reacción de conjugación tiene lugar a aproximadamente 45°C durante aproximadamente 30 minutos.

Los expertos en la técnica entenderán que puede usarse cualquier marcador detectable tal como, pero no limitado a, una enzima, molécula radiactiva, molécula fluorescente o partícula metálica tal como partícula de oro. En ciertos aspectos, el marcador detectable es fosfatasa alcalina. Se conocen métodos de conjugación de un marcador a un anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo puede reducirse con ditioneitol (DTT) para producir fragmentos de anticuerpo monovalentes. El anticuerpo reducido puede ser entonces directamente conjugado a la fosfatasa alcalina maleinada por los métodos de Ishikawa et al, J. Immunoassay 4: 209-237 (1983) y Means et al, Chem. 1: 2-12 (1990), y el conjugado resultante puede purificarse por HPLC. El conjugado también puede purificarse usando cualquier tipo de cromatografía de exclusión de tamaño. Una ventaja de la purificación es que los conjugados de una proteína a un anticuerpo pueden separarse de aquellos conjugados con otras proporciones de proteína a anticuerpo.

En otro aspecto, los híbridos de ácido nucleico bicatenarios pueden detectarse con un segundo anticuerpo antihíbrido que no está marcado directamente. Por ejemplo, el segundo anticuerpo puede ser una inmunoglobulina de ratón que se detecta mediante un anticuerpo anti-ratón de cabra marcado.

Lavado

Después de la conjugación con el segundo anticuerpo, la muestra se lava con un tampón de lavado basado. El tampón de lavado puede contener uno o más detergentes o puede estar libre de un detergente. Si el tampón de lavado contiene un detergente, el detergente puede ser un detergente iónico o no iónico. Un ejemplo de un detergente no iónico es Triton-X. El detergente puede estar presente en el tampón de lavado a una concentración de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 1,5%, o de aproximadamente 0,075% a aproximadamente 1,0%, o de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,75%, o aproximadamente 0,5% o cualquier número dentro de los intervalos citados. Un ejemplo de un tampón de lavado adecuado comprende Tris 40 mM, pH 8,2, NaCl 100 mM, Triton-X100 al 0,5% y azida de sodio al 0,05%.

La muestra puede lavarse con el tampón de lavado de una a diez veces, o de tres a siete veces, o de cuatro a seis veces, o cinco veces, o cualquier número dentro de los intervalos citados. La muestra también puede lavarse con un solo tampón de lavado o con múltiples tampones de lavado. Cada lavado puede usar el mismo tampón de lavado o un tampón de lavado diferente. Por ejemplo, se puede usar un tampón de lavado que contiene detergente para un lavado mientras que se puede usar un tampón de lavado sin detergente para otro lavado. En un aspecto, uno de los tampones de lavado no incluye Triton.

Un beneficio del tampón de lavado que contiene detergente es los efectos positivos sobre el comportamiento de las perlas cuando se compara con tampones de lavado libres de detergente. El tampón de lavado que contiene detergente permite una unión rápida, eficiente y resiliente de las perlas al campo magnético. La unión de las perlas al campo magnético es suficientemente fuerte para que las perlas permanezcan unidas mediante inversión física y decantación. Aunque los tampones de lavado libres de detergente generalmente no permiten la inversión física sin pérdida de perlas, pueden usarse para otros propósitos. Un ejemplo del uso de un tampón de lavado libre de detergente es retirar o diluir un detergente en la muestra, reduciendo así cualquier problema de detección probable.

Detección

El marcador presente en el segundo o tercer, o más anticuerpo se detecta para indicar así la presencia de la molécula de ácido nucleico diana. En la técnica se conocen métodos para detectar diversos marcadores. Por ejemplo, los procedimientos de colorimetría, radiactividad, resonancia de plasmón de superficie o quimioluminiscencia se describen por ejemplo, Coutlee et al., J. Clin. Microbiol. 27: 1002-1007 (1989).

Por ejemplo, un conjugado de fosfatasa alcalina unida puede detectarse por quimioluminiscencia con un reactivo tal como un reactivo LUMI-PHOS 530 (Lumigen, Detroit, MI) o DR2 (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando un detector tal como un luminómetro E/LUMINA (Source Scientific Systems, Inc., Garden Grove, CA), un luminómetro OPTOCOMP I (MGM Instruments, Hamden, CT), o similares, tal como un Veritas Microplate Luminometer de Turner Biosystems. Las técnicas de detección múltiple también pueden usarse en secuencia o en paralelo. Por ejemplo, el conjugado puede ser detectado por quimioluminiscencia y fluorescencia. En otro aspecto, el conjugado puede ser detectado por quimioluminiscencia.

Los detectores que utilizan diferentes técnicas de detección para el conjugado pueden ser reversibles o irreversiblemente unidos, por ejemplo de manera modular, a una máquina que sea capaz de realizar el método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra.

Como se describe en el presente documento, la detección del marcador en el segundo anticuerpo es indicativa de la presencia de una o más de las moléculas de ácido nucleico diana en la muestra que son complementarias a una o más sondas. Después del lavado, la muestra se suspende en un tampón de detección que contiene, por ejemplo, el sustrato para el marcador en el segundo anticuerpo.

En un aspecto, la muestra está compuesta de células cervicales. El método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra de células cervicales comprende suspender la muestra en un medio de recogida a base de detergente y mezclar mezclando a mano. En otro aspecto, la mezcla es mecánica. Se separa una alícuota de aproximadamente 50 μ l de la muestra y se mezcla con aproximadamente 25 μ l de un reactivo de desnaturalización. La muestra se mezcla mezclando a mano o agitando mecánicamente entre aproximadamente 600 a aproximadamente 1200 rpm durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60 segundos y se calienta a aproximadamente 70°C durante aproximadamente 30 minutos. Las sondas de ARN de VPH de alto riesgo se preparan en un diluyente y se diluyen a aproximadamente 375 ng/ml. Se añaden aproximadamente 40 μ l de la sonda diluida a la muestra en un bloque de calentamiento de 70°C. Las muestras se incuban adicionalmente a aproximadamente 68,5°C con agitación a aproximadamente 1150 rpm durante aproximadamente 30 minutos. El sobrenadante puede eliminarse mediante una botella cuentagotas u otro dispositivo de baja tecnología. Se añaden aproximadamente 35 μ l del reactivo de detección a la muestra. El reactivo de detección contiene un segundo anticuerpo que está marcado. El segundo anticuerpo es específico para híbridos de ácido nucleico bicatenarios. La muestra que contiene el reactivo de detección se incuba a aproximadamente 45°C durante aproximadamente 30 minutos, se coloca en un estante magnético durante aproximadamente 30 segundos a 3 minutos y el sobrenadante se decanta. En otro aspecto, la muestra que contiene el reactivo de detección se incuba a temperatura ambiente. Después, la muestra se lava con tampón de lavado aproximadamente cuatro o cinco veces.

Anticuerpos antihíbridos

Los híbridos de ácido nucleico bicatenarios formados de acuerdo con la presente invención pueden ser capturados y detectados usando anticuerpos que son específicos para híbridos de ácido nucleico de doble cadena. El anticuerpo es específico para híbridos de doble hebra, tales como, pero sin limitarse a, ARN-ADN; ADN-ADN; ARN-ARN; y sus mímicos, en los que los mímicos se refieren a moléculas que se comportan de forma similar a los híbridos de ARN-ADN, ADN-ADN o ARN-ARN. El anticuerpo híbrido de ácido nucleico de doble hebra, es decir, el anticuerpo antihíbrido que se utiliza dependerá del tipo de híbrido de ácido nucleico bicatenario formado. En un aspecto, el anticuerpo antihíbrido es inmunoespecífico a híbridos de ARN-ADN.

Los expertos en la técnica entenderán que anticuerpos antihíbridos policlonales o monoclonales pueden ser utilizados y/o acoplados a perlas y/o inmovilizados sobre un soporte en el presente ensayo como se describe a continuación. El anticuerpo monoclonal preparado usando técnicas estándar se puede usar en lugar de los anticuerpos policlonales. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse por métodos que son estándar en la técnica. En un aspecto, los anticuerpos utilizados para la captura y detección del ácido nucleico diana son anticuerpos monoclonales. En un aspecto, los anticuerpos monoclonales soportan altas temperaturas de incubación durante la etapa de captura. Sin ser limitadas, las temperaturas de incubación de alta rigurosidad durante la etapa de captura pueden estar entre aproximadamente 65°C a aproximadamente 75°C o entre aproximadamente 68°C y aproximadamente 75°C. El primer y el segundo anticuerpos pueden ser iguales para la captura y la detección (es decir, producidos por la misma línea celular de mieloma híbrido) o pueden ser diferentes y producidos por diferentes líneas celulares de mieloma híbrido. En un aspecto, el primer y el segundo anticuerpos monoclonales utilizados para la captura y/o la detección son los mismos y son específicos para híbridos de ARN-ADN. También se incluyen inmunofragmentos o derivados de anticuerpos específicos para híbridos bicatenarios, en los que dichos fragmentos o derivados contienen regiones de unión del anticuerpo.

Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo híbrido monoclonal anti-ARN-ADN derivado de células de mieloma fusionadas a células de bazo que están inmunizadas con un híbrido de ARN-ADN. El anticuerpo específico híbrido puede purificarse por purificación por afinidad contra híbridos de ARN-ADN inmovilizados sobre un soporte sólido, por ejemplo, como se describe en Kitawaga et al., *Mol. Immunology*, 19: 413 (1982); y la Patente de Estados Unidos N° 4.732.847.

Se pueden usar otros métodos adecuados para producir o aislar anticuerpos, incluyendo anticuerpos humanos o artificiales, incluyendo, por ejemplo, métodos que seleccionan anticuerpos recombinantes (por ejemplo, F_v o F_{ab} de cadena sencilla, u otros fragmentos de los mismos) de una biblioteca o que dependen, tras la inmunización, de animales transgénicos (por ejemplo, ratones) capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits et al, *Nature*, 362: 255 (1993); y Pat. de EE.UU. N° 5.545.806 y Patente de EE.UU. N° 5.545.807).

En un aspecto, el ácido nucleico diana a detectar es ADN (por ejemplo, ADN genómico de VPH o ADNc) o ARN (por ejemplo, ARNm, ARN ribosómico, ARN nuclear, ARN de transferencia, ARN viral, ARN nuclear heterogéneo) en el que la una o más sondas polinucleotídicas son polirribonucleótidos o polidesoxirribonucleótidos, respectivamente. En un aspecto preferido, los híbridos de ácido nucleico bicatenarios son híbridos de ADN-ARN formados por hibridación de ADN diana y ARN sonda, y pueden ser detectados usando un anticuerpo que sea inmunoespecífico a híbridos de ARN-ADN.

En un aspecto de la presente invención, se utiliza un anticuerpo híbrido monoclonal anti-ARN-ADN derivado de una línea celular de hibridoma. Tales líneas celulares de hibridoma se describen en la Patente de EE.UU. N° 4.865.980, Patente de EE.UU. N° 4.732.847, y la Patente de EE.UU. N° 4.743.535. Los anticuerpos monoclonales específicos de híbridos se pueden preparar usando técnicas que son estándar en la técnica. El anticuerpo monoclonal específico para híbridos se puede usar para capturar y detectar el ácido nucleico diana.

Mientras que cualquier vertebrado puede ser utilizado para la preparación de anticuerpos híbridos policlonales anti-ARN-ADN, se prefieren los de cabras o conejos. Preferiblemente, se inmuniza una cabra o conejo con un híbrido poli(A)-poli(dT) sintético inyectando el híbrido en el animal de acuerdo con los procedimientos de inyección convencionales. Los anticuerpos policlonales se pueden recoger y purificar de la sangre del animal con anticuerpos específicos para la especie del animal inmunizado de acuerdo con técnicas de aislamiento de anticuerpos bien conocidas. Para la producción de anticuerpos monoclonales, el bazo puede ser eliminado del animal después de una cantidad de tiempo suficiente, y los esplenocitos pueden fusionarse con las células de mieloma apropiadas para producir los hibridomas. Los hibridomas pueden entonces ser seleccionados para la capacidad de secretar el anticuerpo antihíbrido. Los hibridomas seleccionados se pueden utilizar entonces para la inyección en la cavidad peritoneal de un segundo animal para la producción de fluido ascítico, que puede extraerse y utilizarse como una fuente enriquecida de los anticuerpos monoclonales deseados incorporados en este documento como referencia.

Sondas de polinucleótidos

Las sondas polinucleotídicas están diseñadas para hibridarse o unirse con las moléculas de ácido nucleico diana. En otro aspecto, las sondas polinucleotídicas están diseñadas para unirse a moléculas de ácido nucleico diana. En un aspecto, las sondas son capaces de hibridarse o unirse a variantes de alto riesgo de VPH y VPH. En un aspecto adicional, las sondas polinucleotídicas son específicas para las variantes de alto riesgo de VPH y VPH. Las sondas de ácido nucleico de alto riesgo (HR) pueden incluir sondas para tipos de alto riesgo de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82. En otros aspectos, las sondas de ARN o ADN son fragmentos. En un aspecto, las sondas tienen de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 kilobases de longitud, preferiblemente aproximadamente 7,5 kilobases, y pueden producirse usando un molde de plásmido usando un vector BLUESCRIPT. Sin embargo, otros plásmidos, vectores y métodos son conocidos en la técnica y también podrían usarse para producir las sondas de ARN descritas en la presente memoria.

Las sondas pueden variar en una cantidad de aproximadamente 7,5 ng a aproximadamente 60 ng por tipo de VPH por ensayo, o de aproximadamente 20 ng a aproximadamente 45 ng por tipo de VPH por ensayo, o aproximadamente 30 ng de sonda para cada tipo de VPH por ensayo. Por lo tanto, en un aspecto, las sondas de HR consisten en o constan esencialmente de una o más sondas para tipos de alto riesgo de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, y 82 o los tipos 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81, y 83 del VPH de bajo riesgo, en los que se utilizan aproximadamente 30 ng de cada sonda por ensayo para la detección de la molécula de ácido nucleico diana.

Las sondas de ARN pueden ser sondas cortas de ARN sintético que se unen específicamente sólo a la molécula de ácido nucleico diana. Ejemplos se describen en la solicitud de Pat. de EE.UU. N° 12/426.076, presentada el 17 de abril de 2009, cuyo contenido se incorpora en este documento como referencia en su totalidad.

Reactividad cruzada

La presente invención también proporciona composiciones de ensayo, sondas y condiciones en las que la reactividad cruzada entre conjuntos de sondas HR de VPH y tipos de VPH de bajo riesgo se reduce drásticamente cuando se compara con el ensayo estándar de VPH aprobado por la FDA y el conjunto de sondas. En un aspecto, el

conjunto de sondas de HR de VPH se selecciona del grupo que consiste en tipos de alto riesgo de VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o los tipos 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83 del VPH de bajo riesgo. Usando el presente ensayo con estas sondas VPH de HR, se reduce la reactividad cruzada entre los tipos de VPH de bajo riesgo y las sondas de VPH de alto riesgo. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. N° 12/426.076.

La presente invención también proporciona un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana, tal como VPH, en una muestra en aproximadamente 2 horas o menos, aproximadamente 2,5 horas o menos, aproximadamente 3 horas o menos, aproximadamente 3,5 horas o menos, aproximadamente 4 horas o menos, aproximadamente 5 horas o menos, aproximadamente 6 horas o menos, aproximadamente 7 horas o menos, aproximadamente 8 horas o menos, aproximadamente 12 horas o menos, aproximadamente 24 horas o menos, en otros aspectos, menos de aproximadamente 3,5 horas para al menos 10 muestras usando los métodos discutidos anteriormente. Una razón por la que la presencia de VPH u otras moléculas de ácido nucleico diana se puede determinar en cortos períodos de tiempo es porque el método no amplifica la molécula de ácido nucleico diana antes de la detección. En lugar de la amplificación de la diana, se puede usar la amplificación de la señal para detectar con precisión la presencia de VPH u otras moléculas de ácido nucleico diana. En un aspecto, los métodos de la descripción pueden incluir una etapa de amplificación de señal. En un aspecto, los métodos de la descripción no incluyen una etapa de amplificación de la diana. En otro aspecto, los métodos de la descripción pueden incluir una etapa de amplificación de señal y ninguna etapa de amplificación de la diana.

La presente descripción también proporciona métodos y ensayos para detectar un cáncer, por ejemplo, un cáncer cervical, detectando la presencia de una molécula de ácido nucleico diana, tal como VPH, en una muestra en aproximadamente 2 horas o menos, aproximadamente 2,5 horas o menos, aproximadamente 3 horas o menos, aproximadamente 3,5 horas o menos, aproximadamente 4 horas o menos, aproximadamente 5 horas o menos, aproximadamente 6 horas o menos, aproximadamente 7 horas o menos, aproximadamente 8 horas o menos, aproximadamente 12 horas o menos, aproximadamente 24 horas o menos, en otros aspectos, menos de aproximadamente 3,5 horas para al menos 10 muestras usando los métodos y ensayos discutidos anteriormente.

Los expertos en la técnica entenderán que la presente invención puede llevarse a cabo en un número de plataformas incluyendo, pero sin limitarse a, tubos, varillas de medición, microarrays, microplacas, placas de 384 pocillos, otras placas de microlitros y sistemas microfluidicos. Los expertos en la técnica entenderán que la presente, como pertinente para países en desarrollo, puede utilizar métodos de baja tecnología tales como botellas cuentagotas, bombillas de caucho, pipetas Pasteur o botellas de chorros para los pasos que implican el movimiento de líquidos. Estos dispositivos proporcionan volúmenes relativamente precisos dentro de los rangos aproximados que son necesarios para el ensayo. En un aspecto, los métodos de la descripción no incluyen pipetadores automáticos u otros dispositivos de pipeteo accionados por baterías o energía.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un medio de recogida en el que se recogen muestras que contienen el ácido nucleico diana. El medio de recogida proporciona estabilidad de la muestra durante varios días, varias semanas o varios meses. Por ejemplo, el medio de recogida puede proporcionar estabilidad a la muestra durante al menos 1 semana, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, desde aproximadamente 1 semana hasta alrededor de 4 semanas, desde aproximadamente 1 mes hasta aproximadamente 3 meses, desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 4 meses, o desde aproximadamente 3 meses hasta 6 meses. En otro aspecto, el medio de recogida proporciona estabilidad de la muestra durante al menos 21 días a 33°C o al menos 6 meses a 20°C. En un aspecto, la muestra anterior es una muestra de células cervicales o una muestra de células cervicales humanas. En este documento se describen medios de recogida adecuados. En un aspecto, el medio de recogida comprende, consiste en, o consiste esencialmente en NP-40, desoxicolato, Tris-HCl, EDTA, NaCl y azida sódica. En otros aspectos, el medio de recogida comprende, consiste en, o consiste esencialmente en 1,0% de NP-40, 0,25% de desoxicolato de sodio, 50 mM de Tris-HCl, 25 mM de EDTA, 150 mM de NaCl y 0,05% de azida sódica.

Otro aspecto es un tampón de lavado que contiene detergente que comprende, consiste en, o está constituido esencialmente por Tris 40 mM pH 8,2, NaCl 100 mM, Triton X-100 del 0,1% al 0,5% y azida sódica al 0,05%. Todavía otro aspecto es un tampón de lavado libre de detergente que comprende, consiste en, o está constituido esencialmente por Tris 40 mM pH 8,2, NaCl 100 mM y azida sódica al 0,05%.

Conversión de la muestra para la recuperación, detección y análisis de las moléculas de ácido nucleico

Un aspecto se refiere a la adición de un medio de recogida a una muestra que se ha preparado previamente para el análisis de diagnóstico. En un aspecto, la muestra a la que se añade el medio de recogida se ha preparado previamente utilizando un ensayo de citología basado en líquidos (LBC). Los medios LBC pueden contener fijadores tisulares, tales como alcohol y formalina, que sirven para estabilizar la muestra, inhibir el crecimiento bacteriano, preservar la morfología celular y los grupos de diagnóstico y asegurar la preparación de un portaobjetos de citología de monocapa de tejido. Sin embargo, muchas composiciones utilizadas para conservar muestras biológicas, tales como SUREPATH, contienen alcohol o formalina, lo que puede ser perjudicial para el análisis de moléculas de ácido nucleico. En un aspecto, los portaobjetos citológicos contienen muestras de células cervicales o cualquier otra

muestra biológica capaz de ser evaluada. En un aspecto, el medio de SUREPATH se utiliza para preparar la muestra de LBC.

Además de la preparación citológica, las muestras de LBC pueden utilizarse para la detección de trastornos, tales como los patógenos comunes de transmisión sexual, entre ellos el virus del papiloma humano (VPH), *Neisseria gonorrhoeae* (GC) y *Chlamydia trachomatis* (CT), entre otros. Como complemento a su aplicación como herramienta de cribado, las muestras de LBC pueden usarse para monitorear el aclaramiento viral de los pacientes después del tratamiento para una enfermedad en particular, dando información para los seguimientos posteriores y regímenes de tratamiento. En un aspecto, la prueba de VPH de muestras de LBC puede usarse para monitorear el aclaramiento viral de los pacientes después del tratamiento para una enfermedad cervical.

En un aspecto, se recoge una muestra biológica y se conserva en un medio, tal como el medio SUREPATH. El medio conservado que contiene la muestra biológica se almacena hasta que se requiera un procesamiento adicional. Los medios conservados que contienen la muestra biológica se pueden retirar y suspender en agua formando de este modo un "gránulo blando". Una parte del gránulo blando puede ser eliminada y analizada en un portaobjetos. En un aspecto, la muestra se prepara usando un ensayo LCB. En lugar de añadir más medio de conservación, tal como el SUREPATH, a la suspensión de gránulos blandos restante, el medio de recogida basado en detergente descrito en la presente memoria puede añadirse a la muestra biológica restante. Esto es ventajoso porque una muestra dispersada en el medio de recogida a base de detergente descrito en el presente documento puede analizarse directamente en un ensayo de detección de moléculas de ácido nucleico. Además, la muestra biológica suspendida en el medio de recogida a base de detergente es estable durante al menos 11 días a temperatura ambiente (Fig. 6).

Cualquiera de los medios de recogida basados en detergentes descritos son capaces de ser añadidos al gránulo blando. En otro aspecto, se puede usar un medio detergente y quelante para resolubilizar el gránulo. En un aspecto no limitativo, un medio de recogida que incluye de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0% de NP-40, de aproximadamente 0,10% a aproximadamente 0,40% de desoxicolato sódico, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 75 mM de Tris-HCl, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de EDTA, de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM de NaCl y de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,10% de azida sódica para solubilizar el gránulo blando. Después de la adición del medio de recogida a base de detergente, la muestra de gránulos blandos se puede analizar conjuntamente con cualquiera de los métodos o ensayos descritos en la presente memoria.

Kit

También se proporciona un kit para la detección de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo el kit, que consiste en, o que consiste esencialmente en:

- a) un medio de recogida;
- b) un reactivo de desnaturalización;
- c) al menos una sonda polinucleotídica;
- d) una perla recubierta con un primer anticuerpo anti-híbrido;
- e) un reactivo de detección que comprende un segundo anticuerpo anti-poli híbrido, en el que el segundo anticuerpo está marcado de forma detectable;
- f) un tampón de lavado; y
- g) un segundo reactivo de detección que comprende un sustrato para el marcador en el segundo anticuerpo.

El medio de recogida, el reactivo de desnaturalización, la perla, el primer y el segundo anticuerpo, las sondas de polinucleótidos, los reactivos de detección y los tampones de lavado se han descrito previamente.

El kit también puede incluir instrucciones para describir procedimientos asociados con los métodos y ensayos descritos. El kit también puede incluir un medio para transcribir la información del paciente. En un aspecto, el medio incluye papel, un ordenador o un dispositivo capaz de transmitir información del paciente. El kit puede incluir todos los componentes necesarios para completar los métodos en el mismo lugar donde se toma la muestra del paciente.

En un aspecto, el kit puede incluir reactivos codificados por color asociados con el ensayo de detección. Los frascos de reactivo están codificados por colores para facilitar su uso y se pueden incluir en un kit. Las botellas de reactivo también se pueden identificar mediante símbolos, letras u otros identificadores conocidos.

Como los componentes individuales del kit se juntan en una plataforma fácil de usar, una ventaja del kit descrito en este documento es que proporciona pruebas inmediatas de muestras. Esto permite una rápida determinación de los resultados de los pacientes.

En un aspecto, los métodos de la descripción pueden incluir la recogida y el procesamiento de muestras de pacientes en el campo. En un aspecto, después de que se recojan las muestras, se llevan a cabo algunos de los pasos del método en el mismo lugar donde se recogen las muestras de pacientes. En otro aspecto, todos los pasos del método pueden llevarse a cabo en el mismo lugar donde se recogen las muestras. La ubicación puede ser un pueblo, una clínica, un laboratorio, o área comunal donde las personas reciban chequeos médicos y evaluaciones. La ubicación puede ser permanente o temporal. En un aspecto, la molécula de ácido nucleico se detecta en un lugar, tal como un laboratorio o una clínica, que es diferente del lugar donde se toman las muestras. En un aspecto, el kit está diseñado para su uso en un país en desarrollo o áreas geográficas donde el acceso a la atención médica no está fácilmente disponible.

10 Sistema

En un aspecto, la muestra puede analizarse usando un sistema portátil para detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra. El sistema portátil puede incluir un calentador configurado para calentar múltiples muestras; un luminómetro configurado para detectar la quimioluminiscencia de una molécula de ácido nucleico diana sobre un soporte recubierto con un primer anticuerpo y conjugado con un segundo anticuerpo marcado con un marcador detectable; y un monitor configurado para informar datos de quimioluminiscencia (Fig.7). En un aspecto, el calentador es un calentador/agitador de combinación. En un aspecto, el sistema está configurado para analizar simultáneamente 90 muestras a la vez junto con 6 controles (96 muestras en total). En un aspecto, tanto el luminómetro como el calentador están configurados para analizar simultáneamente 90 muestras a la vez junto con 6 controles (96 muestras en total). El sistema también es capaz de informar los resultados de al menos 500 muestras a la vez. El sistema portátil y los reactivos asociados se exponen en las Figs. 6, 7 y 8.

Sin ser limitados, los componentes individuales del sistema portátil pueden ser transportados fácilmente por un individuo, tal como un médico o un técnico de laboratorio, y pesan menos de 4,5 Kg (10 libras), menos de 9,1 Kg (20 libras), menos de 13,6 Kg (30 libras), o menos de 18,1 Kg (40 libras). En otro aspecto, todo el sistema portátil para detectar moléculas de ácido nucleico diana pesa menos de 9,1 Kg (20 libras), menos de 13,6 Kg (30 libras), menos de 18,1 Kg (40 libras) o menos de 22,7 Kg (50 libras) o menos de 45,4 Kg (100 libras) y está diseñado para un transporte fácil.

El sistema portátil y de ensayo puede diseñarse para su uso en el espacio o lugar donde se recolecten las muestras y requiere una pequeña huella de espacio de trabajo en la mesa (por ejemplo, aproximadamente 25x50cm o menos). En un aspecto, el sistema portátil está configurado para funcionar sin electricidad, red o agua corriente. El sistema portátil también puede funcionar completamente con baterías. El sistema portátil se puede diseñar para su uso con el kit descrito, ensayos, con los métodos descritos en la presente memoria. En conjunto, el kit y el sistema portátil proporcionan una manera eficiente y rápida de analizar muestras y detectar muestras de ácido nucleico en países en desarrollo u otras áreas que pueden carecer de equipos de laboratorio sofisticados o instalaciones para analizar muestras de laboratorio.

Se observa que cuando se describen intervalos en la presente memoria, cualquier número dentro de ese intervalo se contempla en las invenciones descritas en la presente memoria. Los ejemplos siguientes no pretenden limitar el alcance de la invención. Los ejemplo no están dentro del alcance de las reivindicaciones y son solamente para fines ilustrativos.

Ejemplos

40 Ejemplo 1: Ensayo utilizando muestras cervicales y sondas de VPH

Se recogieron un total de 324 muestras cervicales recogidas por un médico en un medio de recogida a base de detergente y se ensayó para detectar la presencia de VPH de alto riesgo.

Una muestra de 1 ml se agitó en vórtice para homogeneizar la muestra y se retiró una alícuota de 50 μ l y se combinó con 25 μ l de reactivo de desnaturalización (NaOH 1,75 N) en la microplaca de ensayo. Esto se agitó para mezclar y se incubó a 70°C durante 30 minutos para crear ADN de cadena sencilla. A esto se añadieron 40 μ l de un tampón de neutralización (diluyente de sonda - 2,2 M de BES, 2,6% de PAA, 0,7 N de NaOH y 0,05% de azida sódica) que contenía sondas de ARN para 16 tipos de VPH para crear un pH neutro y se incubaron a 68,5°C durante 10 minutos.

Después de esto, se añadieron 10 μ l de perlas paramagnéticas conjugadas con anticuerpos (aproximadamente 1 μ m de perlas SERADYN carboxiladas de Thermo Fisher) a la reacción y se incubaron durante 30 minutos adicionales a 68,5°C. Las sondas de ARN y las moléculas diana de ADN que eran complementarias entre sí se unieron y crearon los híbridos de ARN-ADN. Los híbridos luego se capturaron por un anticuerpo específico híbrido de ARN-ADN recubierto sobre las perlas paramagnéticas SERADYN.

Después de la incubación, las perlas paramagnéticas se separan de la fase líquida/sobrenadante por exposición a un campo magnético. El residuo sobrenadante se elimina por decantación y se añaden 35 μ l de reactivo de detección 1 (enzima conjugada de anticuerpo secundario que comprende un anticuerpo híbrido monoclonal anti-ARN-ADN conjugado con fosfatasa alcalina) y se incubó a 45°C durante 30 minutos. El anticuerpo secundario se une al complejo de perlas paramagnéticas conjugado con anticuerpo híbrido ARN-ADN. El anticuerpo secundario no

unido se elimina mediante lavado usando un tampón de lavado basado en detergente (Tris 40 mM, pH 8,2, NaCl 100 mM, Triton-X100 al 0,1% y azida sódica al 0,05%).

5 Un sustrato (sustrato basado en dioxetano de ABI, llamado DCP Star, con potenciador Emerald II) se añade a las perlas lavadas y los pocillos que contienen ADN de VPH de alto riesgo crean luz que es detectable por un luminómetro y se mide en RLU (unidades de luz relativa). Se usa un patrón positivo de ensayo que contiene 1 pg/ml de ADN de VPH para establecer el punto de corte positivo. Todos los valores RLU de la muestra se dividen por el valor RLU para el estándar positivo que crea un RLU/CO (RLU a valor de corte). Los resultados se dan en RLU/CO y cualquier cosa mayor o igual a 1,0 se considera positiva.

Ejemplo 2: Ensayo de estabilidad

10 Después de las pruebas iniciales, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente y a 33°C para observar la estabilidad de las muestras. Los ensayos se llevaron a cabo hasta 21 días después de la recogida. Las Figs. 3 y 4 demuestran que el valor RLU/CO para cada muestra no cambia con el tiempo hasta 21 días. Un análisis 2x2 que comparó los resultados de la línea de base con los resultados después de 21 días de almacenamiento y el análisis del diagrama de dispersión demostró la linealidad de los valores RLU/CO con el tiempo. Basándose en estos datos, es posible concluir que las muestras recogidas y almacenadas a temperatura ambiente o 33°C durante 21 días proporcionan valores comparables de RLU/CO que los ensayados en la línea de fondo. Usando la comparación de modelos lineales mixtos de valores de RLU/CO frente a la temperatura de almacenamiento, los valores de P son 0,8803 para temperatura ambiente y 0,9517 para muestras almacenadas a 33°C indicando que los valores son iguales.

20 Ejemplo 3: Estudios del límite de detección

El límite de detección (LOD) de VPH 16 se midió por dilución en serie del plásmido diana VPH-16 en el medio de recogida. Los resultados de la prueba demuestran una S/N > 2,0 para un plásmido de VPH 16 de 0,2 pg/ml que es equivalente a 1000 copias de ADN de VPH 16. Véase la FIG. 5. Además, se realizaron estudios de estabilidad de tres semanas en muestras clínicas a temperaturas elevadas para imitar las condiciones en un área sometida a temperaturas relativamente elevadas, tal como Ruanda. Todos los componentes del kit biológicamente lábiles (sonda de ARN, anticuerpo de captura, conjugado de anticuerpo de detección/enzima y sustrato) se estabilizaron como parte del proceso de producción y se monitorizaron para determinar la estabilidad durante 18 meses a 37°C.

Ejemplo 4: Conversión del granulado SUREPATH y recuperación de ácidos nucleicos

30 En este ejemplo, se describe el flujo de trabajo típico para la conversión de granulados de SUREPATH y la recuperación de ácido nucleico. El flujo de trabajo para los medios de SUREPATH incluye la recolección inicial de la muestra primaria, que puede ser utilizada para la recolección de células del epitelio cervical en una zona de transición o punto de recogida de muestras. Se recoge un promedio de 2×10^8 células cervicales por cepillo, que se pueden conservar en 10 ml de medio SUREPATH en un vial de recogida. El vial se puede sellar y las células se incuban en el medio fijador a temperatura ambiente o 4°C hasta que se realice el procesamiento adicional. La suspensión de células puede someterse luego a un esquema automatizado de purificación de gradiente de densidad, y el sedimento celular resultante, con un número de células total medio de $1,6 \times 10^8$ células, puede suspenderse en un volumen final de 1 ml de agua. Este gránulo de agua puede denominarse "granulado blando" o "granulado blando no diluido".

40 200 µL del granulado blando se pueden utilizar en un protocolo de preparación de portaobjetos automatizado para citologías, dejando en promedio $1,3 \times 10^8$ células totales en un volumen de 800 µL. Después de retirar la alícuota de 200 µL para la preparación del portaobjetos, se pueden añadir 1-2 ml de medio SUREPATH fresco a los restantes 800 µl de granulado blando para estabilizar y conservar el granulado blando en caso de que el portaobjetos deba ser rehecho. En la mayoría de los casos, esta muestra de 2-3 ml restante se destruye después de que se dan los resultados citológicos.

45 El medio a base de detergente descrito en el presente documento puede añadirse a los restantes 800 µl de granulado blando. Cualquiera de los medios de recogida basados en detergente descritos en el presente documento puede añadirse a los restantes 800 µl de granulado blando. En un aspecto, el medio pueden contener NP-40 al 1,0%, desoxicolato sódico al 0,25%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 25 mM, NaCl 150 mM y azida sódica al 0,05%. Después de la adición del medio de recogida a base de detergente, la muestra de gránulos blandos se puede analizar conjuntamente con cualquiera de los métodos o ensayos descritos en la presente memoria.

50

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra que incluye:
- a) suspender una muestra en un medio de recogida que incluye un detergente aniónico y un detergente no iónico;
 - b) desnaturalizar una molécula de ácido nucleico diana;
- 5 c) poner en contacto una o más sondas polinucleotídicas con la molécula de ácido nucleico diana en condiciones que permitan que las sondas y la molécula de ácido nucleico diana se hibriden o se unan, y
- d) capturar el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un soporte sólido revestido con un primer anticuerpo específico para el híbrido de ácido nucleico híbrido bicatenario.
2. El método según la reivindicación 1, que comprende:
- 10 a) suspender la muestra en un medio de recogida que comprende un detergente aniónico y un detergente no iónico;
 - b) desnaturalizar la molécula de ácido nucleico diana;
- c) poner en contacto una o más sondas polinucleotídicas con la molécula de ácido nucleico diana en condiciones que permitan que las sondas y la molécula de ácido nucleico diana se hibriden, formando de este modo un híbrido de ácido nucleico bicatenario;
- 15 d) capturar el híbrido de ácido nucleico bicatenario sobre un soporte sólido revestido con un primer anticuerpo específico para el híbrido de ácido nucleico híbrido bicatenario, formando de este modo un complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario/soporte sólido;
- e) separar el complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario/soporte sólido de un ácido nucleico no unido;
- 20 f) conjugar el complejo con un segundo anticuerpo que sea específico para el híbrido de ácido nucleico de doble hebra o específico para el primer anticuerpo para formar un complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario/anticuerpo de soporte sólido; en el que el segundo anticuerpo está marcado con un marcador detectable;
- g) lavar el complejo de híbrido de ácido nucleico de doble cadena/anticuerpo de soporte sólido con un tampón de lavado que comprende un detergente; y
- 25 h) detectar el marcador en el segundo anticuerpo en el que la detección indica la presencia de la molécula de ácido nucleico diana.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el soporte sólido comprende perlas magnéticas y preferiblemente comprende una perla paramagnética modificada que está recubierta o tiene unido a la misma el primer anticuerpo inmunoespecífico para ácidos nucleicos híbridos de doble hebra y en el que se usa un campo magnético para separar el complejo de ácido nucleico bicatenario-perlas magnéticas-anticuerpo del ácido nucleico no unido.
- 30 4. El método de acuerdo con una o más de las reivindicaciones 1 a 3, en el que en el medio de recogida el detergente aniónico es desoxicolato sódico y el detergente no iónico es NP-40.
5. Una composición que comprende:
- 35 (a) una muestra biológica suspendida en un medio de recogida, en el que dicho medio de recogida comprende un detergente aniónico y un detergente no iónico;
 - (b) un reactivo de desnaturalización;
 - (c) al menos una sonda polinucleotídica capaz de unirse a una molécula de ácido nucleico diana;
 - (d) un soporte recubierto con un primer anticuerpo antihíbrido; y
- 40 (e) un segundo anticuerpo que es específico para el híbrido de ácido nucleico bicatenario o específico para el primer anticuerpo para formar un complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario/anticuerpo de soporte sólido; en el que el segundo anticuerpo está marcado con un marcador detectable.
6. La composición de la reivindicación 5, en la que dicho medio de recogida comprende NP-40, desoxicolato sódico y EDTA.
- 45 7. La composición de la reivindicación 5, en la que dicho medio de recogida comprende de 0,5 por ciento a 2,0 por ciento de NP-40, de 0,10 por ciento a 0,40 por ciento de desoxicolato de sodio y de 10 nM a 50 mM de EDTA.

8. La composición de la reivindicación 5, en la que dicha al menos una sonda polinucleotídica se selecciona del grupo que consiste en sondas para tipos de alto riesgo del VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82.
9. Una composición que comprende:
- 5 (a) una muestra biológica suspendida en un medio de recogida que comprende de 0,5 por ciento a 2,0 por ciento de NP-40, de 0,10 por ciento a 0,40 por ciento de desoxicolato de sodio y de 10 mM a 50 mM de EDTA y
- (b) una sonda polinucleotídica; y
- (c) un soporte recubierto con un primer anticuerpo antihíbrido.
10. La composición según la reivindicación 9, que comprende además:
- 10 (d) un segundo anticuerpo que es específico para el híbrido de ácido nucleico bicatenario o específico para el primer anticuerpo para formar un complejo híbrido de ácido nucleico de doble cadena/anticuerpo de soporte sólido, en el que dicho segundo anticuerpo está marcado con un marcador detectable.
11. La composición de la reivindicación 9, en la que dicho medio de recogida comprende además de 0,01 por ciento a 0,10 por ciento de azida sódica.
- 15 12. La composición de la reivindicación 5 ó 9, en la que dicha muestra biológica es una muestra de células cervicales.
13. La composición de la reivindicación 5 ó 9, en la que dicha muestra biológica es estable cuando se almacena en dicho medio de recogida durante al menos 21 días a 33°C.
- 20 14. La composición según la reivindicación 5 ó 9, en la que el soporte recubierto con el primer anticuerpo comprende perlas magnéticas.
15. Un kit para la detección de una molécula de ácido nucleico diana en una muestra, que comprende:
- a) un medio de recogida que comprende un detergente aniónico y un detergente no iónico;
- b) un reactivo de desnaturalización;
- c) un soporte recubierto con un primer anticuerpo anti-híbrido;
- 25 d) anticuerpo que es específico para el híbrido de ácido nucleico bicatenario o específico para el primer anticuerpo para formar un complejo de híbrido de ácido nucleico de doble cadena/anticuerpo de soporte sólido, en el que el segundo anticuerpo se marca de forma detectable,
- e) un tampón de lavado basado en detergente; y
- f) un segundo reactivo de detección que comprende un sustrato para el marcador en el segundo anticuerpo.
- 30 16. El kit de la reivindicación 15, en el que dicho kit tiene una de las siguientes características:
- a) dicho medio de recogida comprende NP-40, desoxicolato y EDTA,
- b) dicho medio de recogida comprende NP-40, desoxicolato y EDTA y comprende además azida sódica;
- c) dicho tampón de lavado a base de detergente comprende de 0,5 por ciento a 2,0 por ciento de NP-40, de 0,10 por ciento a 0,40 por ciento de desoxicolato de sodio, de 25 mM a 75 mM de Tris-HCl, de 10 mM a 50 mM de EDTA, de 35 50 mM a 200 mM de NaCl, y de 0,01 por ciento a 0,10 por ciento de azida sódica;
- d) dicho tampón de lavado a base de detergente comprende Tris 40 mM, pH 8,2, NaCl 100 mM, Triton X-100 al 0,1 por ciento - 0,5 por ciento y azida sódica al 0,05 por ciento;
- e) el diluyente comprende BES, ácido poliacrílico, NaOH y azida de sodio,
- f) el reactivo de desnaturalización es NaOH 1,75 N.
- 40 17. El kit de la reivindicación 15, que comprende además al menos una sonda polinucleotídica capaz de unirse al virus del papiloma humano (HPV) y sus variantes genéticas, en donde, preferiblemente, dicha al menos una sonda polinucleotídica se selecciona del grupo que consiste en sondas para tipos de alto riesgo de HPV 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82.

Figura 1

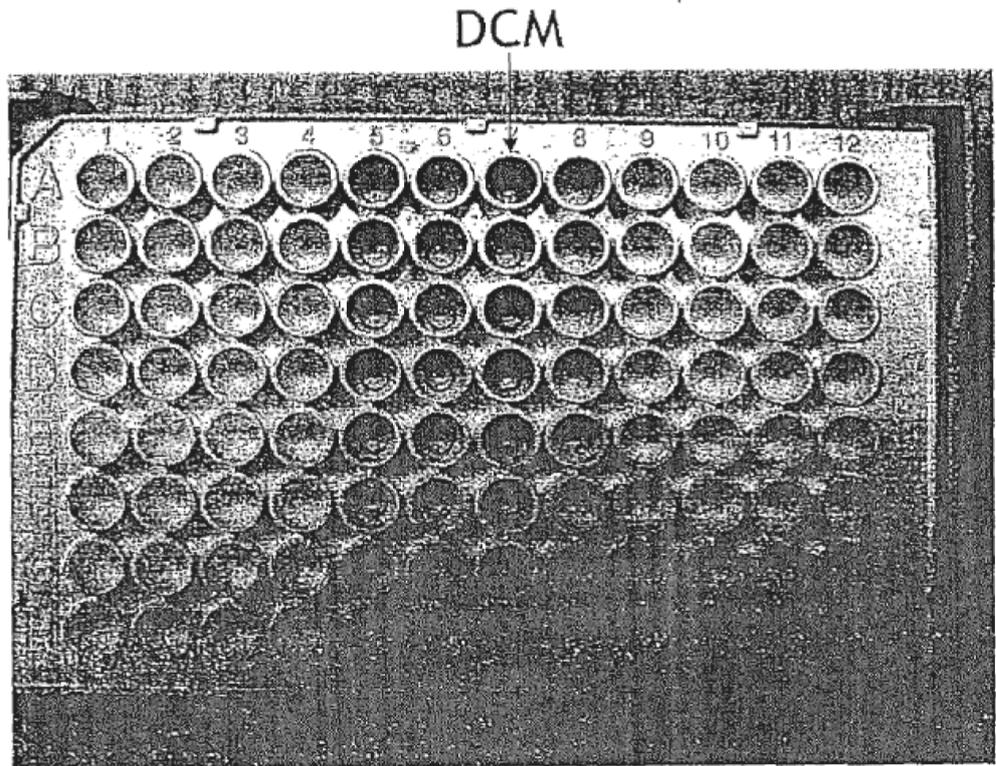


Figura 2

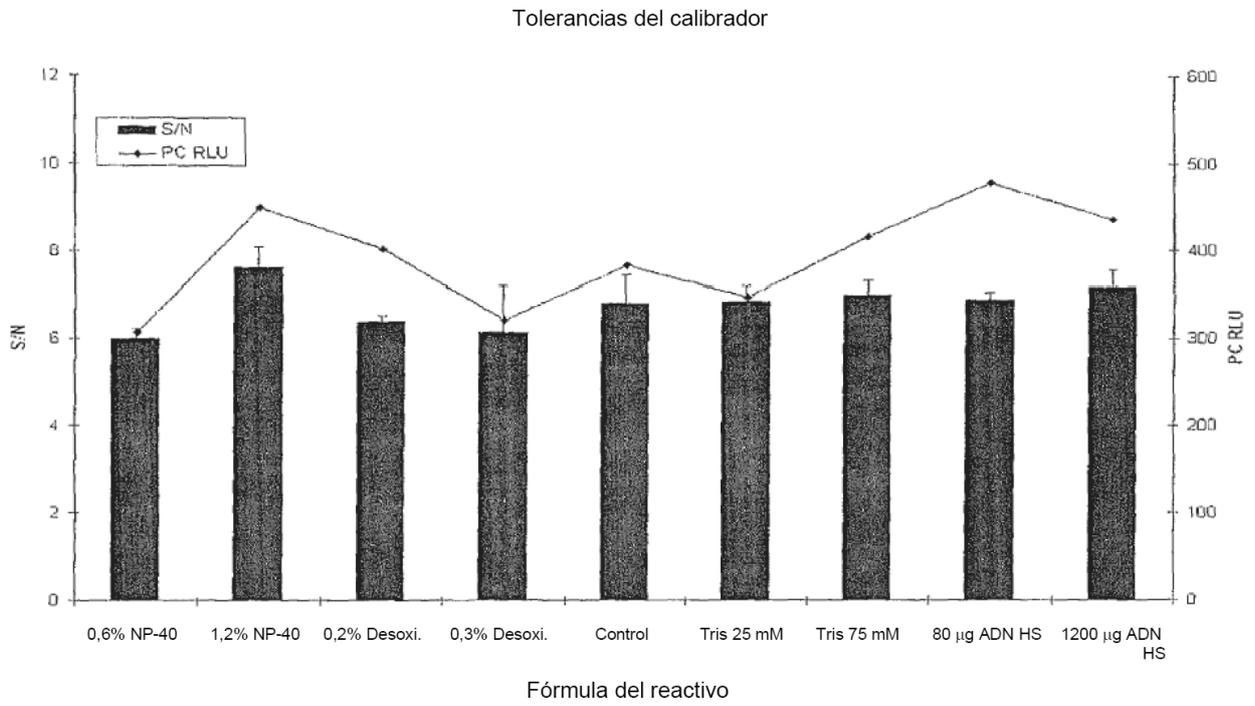


Figura 3

Estabilidad de la muestra clínica a temperatura ambiente

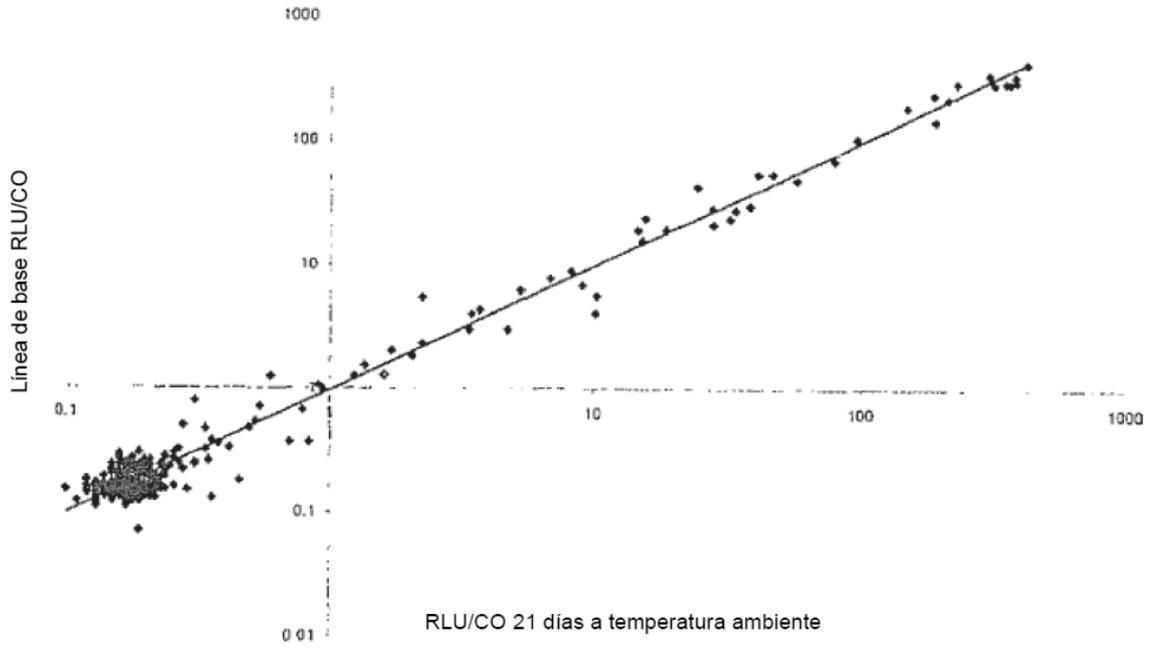
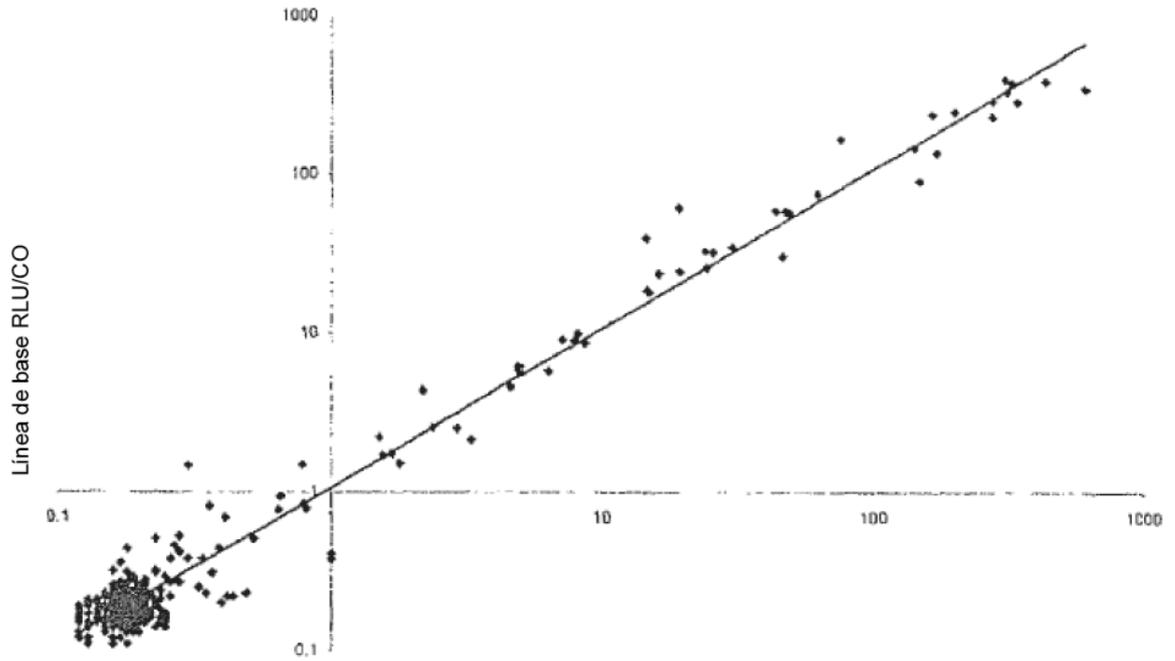


Figura 4

Estabilidad de la muestra clínica a 33°C



RLU/CO 21 días a 33°C

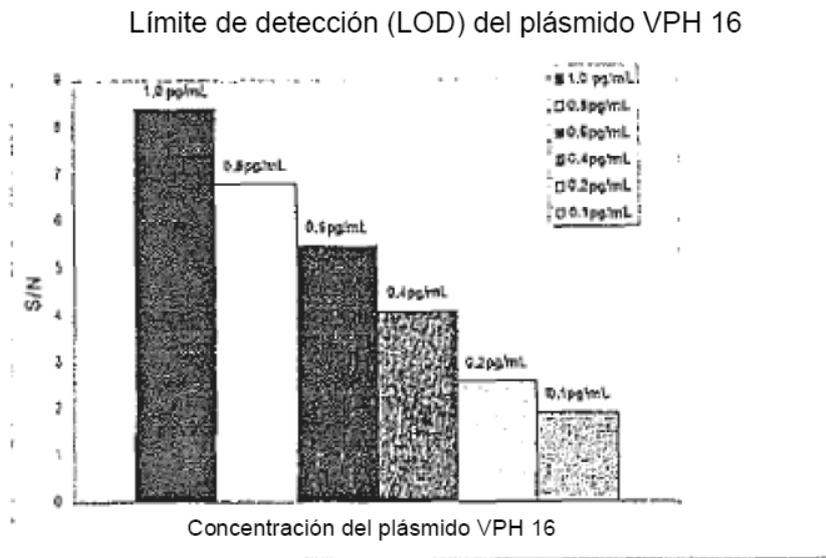


Figura 5: Los resultados de ensayo demuestran una $S/N > 2,0$ para un plásmido VPH 16 a 0,2 pg/ml, lo que es equivalente a 1000 copias de ADN de VPH 16

Figura 6

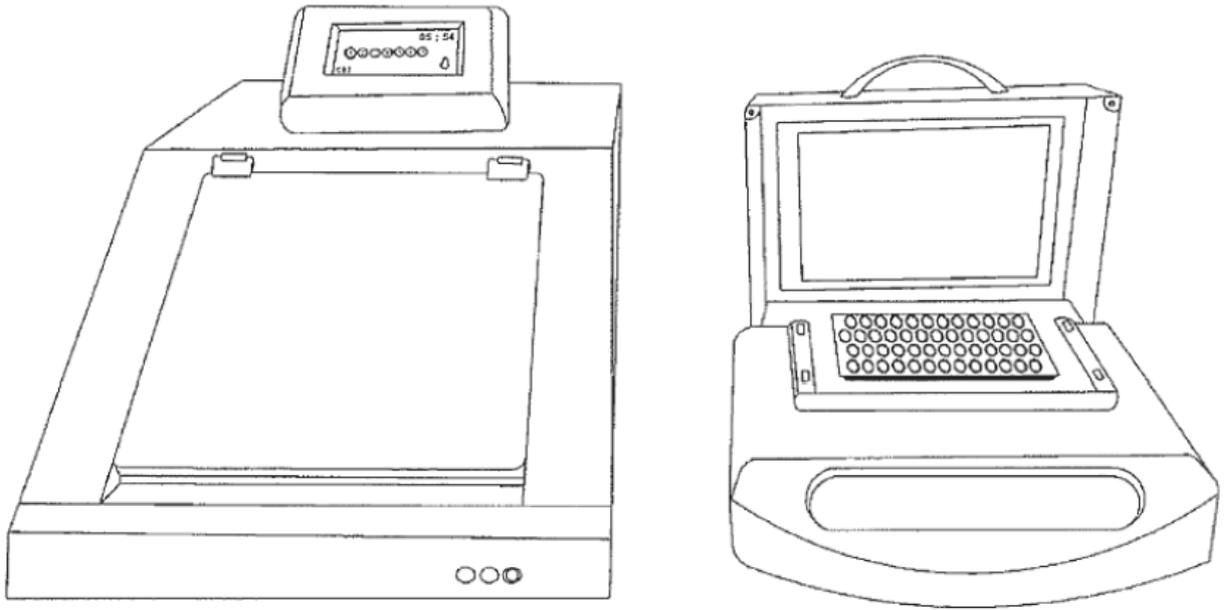


Figura 7

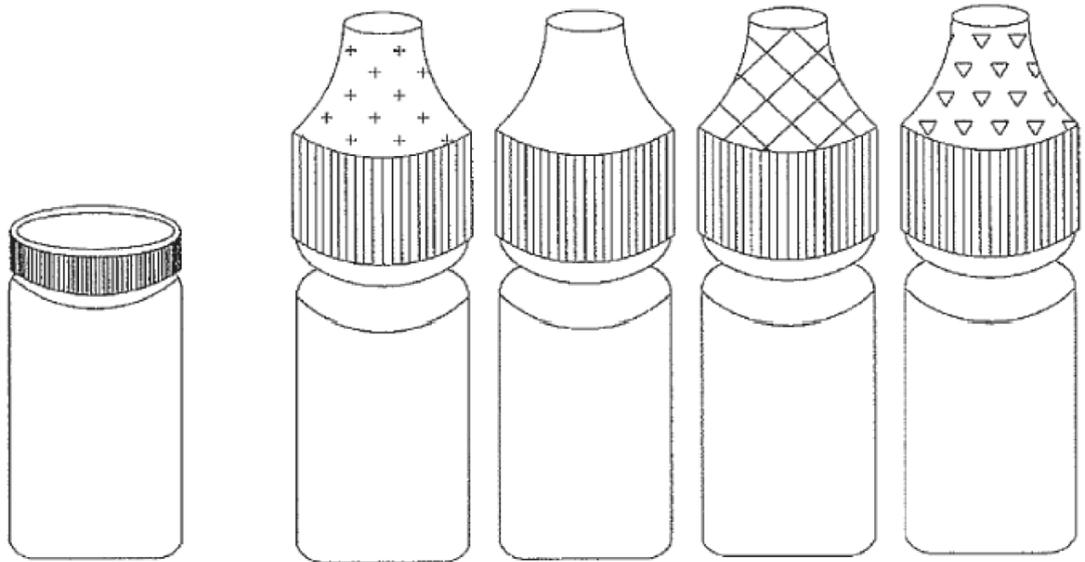
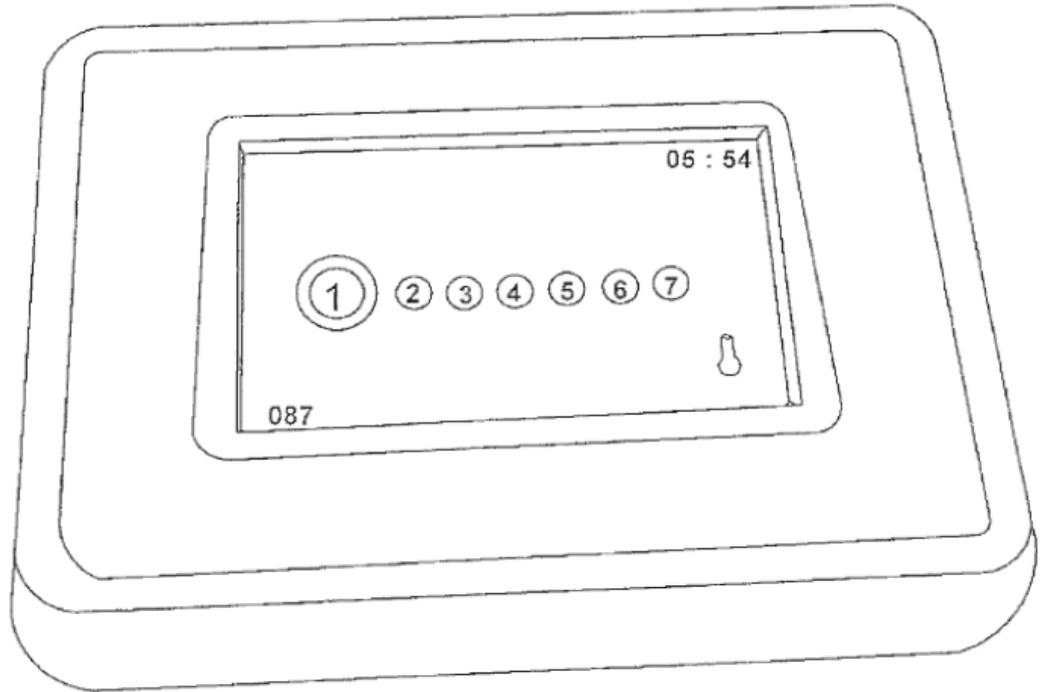


Figura 8



Estabilidad de 11 días y reproducibilidad de gránulos blandos convertidos almacenados a temperatura ambiente

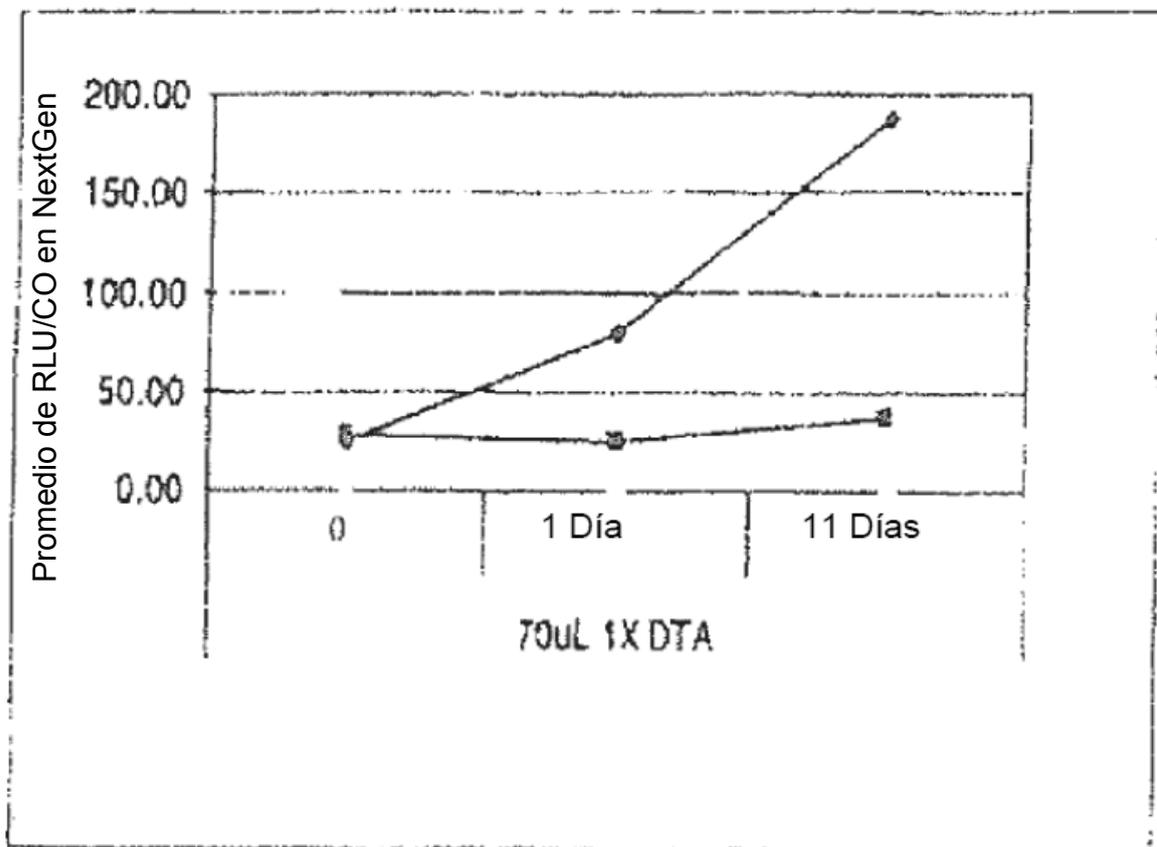


Figura 9