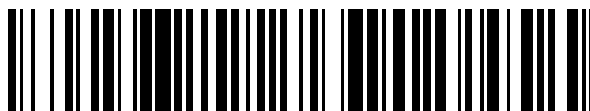


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 711**

51 Int. Cl.:

C12N 11/08 (2006.01)

C12N 11/10 (2006.01)

C12N 11/14 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2012** **PCT/US2012/063385**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013** **WO13067399**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2012** **E 12787302 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019** **EP 2773745**

54 Título: **Materiales y métodos para inmovilizar, aislar y concentrar células usando superficies carboxiladas**

30 Prioridad:

03.11.2011 US 201161555349 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

LOWE, BRIAN;
NAZARENKO, IRINA y
RUS, SZYMON

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 730 711 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

Materiales y métodos para inmovilizar, aislar y concentrar células usando superficies carboxiladas

Antecedentes**A. Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere a un método para determinar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra. Se describen métodos para usar en la concentración y/o aislamiento de células de una muestra usando superficies carboxiladas.

B. Breve descripción de la técnica relacionada

Las superficies carboxiladas han encontrado múltiples usos en la técnica de la biotecnología.

- 10 Con frecuencia, las superficies se usan para aislar biomoléculas específicas. Por ejemplo, el documento WO 2007-004687 describe la formación de aglutinados de lipoproteínas, distintas de una fracción de lipoproteínas específica, usando nanopartículas magnéticas que tienen grupos funcionales aniónicos, tales como un grupo ácido carboxílico, en sus superficies.

- 15 Las superficies carboxiladas también se han usado como soportes para ligandos específicos de biomoléculas y biomateriales, que se pueden usar para inmovilizar la biomolécula o biomaterial. En el escenario típico, el grupo carboxilo se activa, por ejemplo, usando una carbodiimida. El carboxilo activado después se hace reaccionar con un grupo reactivo (tal como una amina) en una entidad capaz de unirse a una célula o clase de células diana, tal como un anticuerpo, inmovilizando así la entidad a la superficie. La célula puede entonces unirse a la superficie por una interacción entre la entidad inmovilizada y la célula. Por ejemplo, el
- 20 documento WO 2007-095279 usa nanopartículas modificadas con carboxi recubiertas con aptámeros de ADN que tienen una alta afinidad por una célula diana para inmovilizar la célula y separarla de la muestra por citometría de flujo. En US el documento 7,713,627 se describen "partículas unidas a sonda" para usar en la separación de bacterias, virus y células. La "sonda" específica para la diana se puede unir a la partícula mediante una reacción química con una superficie funcionalizada con un grupo que lleva ácido carboxílico.
- 25 En el documento EP 1118676 se aíslan microorganismos usando la unión entre el microorganismo y un ligando, tal como un hidrato de carbono al que se sabe que se une el microorganismo, un nutriente para el microorganismo o un compuesto quelante de hierro.

- Otros han descrito el uso de superficies carboxiladas para aislar directamente virus de muestras biológicas. Por ejemplo, el documento US 2003-0087284 describe el uso de partículas recubiertas con al menos un
- 30 grupo catiónico y al menos un grupo aniónico para unir, separar y detectar virus.

- El documento WO2010/127228 A1 se dirige a un método de amplificación de no objetivo para la detección de formas de empalme de ARN en una muestra. Describe el uso de perlas de carboxilo magnéticas para unir células tales como células de cuello uterino. El documento WO 2009/015159 A1 describe, entre otros, métodos para recuperar ácido nucleico espermático, en particular de una muestra forense. Entre otras
- 35 opciones, se pueden usar perlas de ácido carboxílico o partículas magnéticas para atrapar células. Schwalbe et al. (*Journal of Magnetism and Magnetic Materials* (2005), 293: 433-437) describe el uso de partículas magnéticas recubiertas con carboximetildextrano para el marcaje y aislamiento de células de cáncer de mama y leucemia viables.

Sumario de la invención

- 40 La invención se puede definir por las reivindicaciones adjuntas. La presente invención proporciona un método para determinar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra que comprende una célula de cuello uterino y un agente fijador que es un medio de citología en base líquida, definiéndose dicho método en la reivindicación 1.

La presente descripción se refiere a la inmovilización de una célula usando una superficie carboxilada.

- 45 Se describe un método para inmovilizar una célula, que comprende poner en contacto una superficie carboxilada con una muestra, comprendiendo la muestra la célula y un fijador, durante un tiempo suficiente para permitir que la célula se una a la superficie carboxilada.

- Se describe un método para aislar una célula de una muestra que comprende: (a) poner en contacto una superficie carboxilada con una muestra que comprende la célula y un agente fijador en condiciones
- 50 suficientes para inducir la unión entre la célula y la superficie; y (b) separar la superficie de la muestra, aislando así la célula.

También se describe un método para aislar una biomolécula de una célula, comprendiendo el método: (a) poner en contacto una superficie carboxilada con una muestra que comprende la célula en condiciones

suficientes para inducir la unión entre la célula y la superficie; (b) separar la superficie de la muestra, aislando así la célula; y (c) lisar la célula, liberando así la biomolécula.

5 También se describe un método para determinar la presencia de una biomolécula en una muestra, comprendiendo el método: (a) poner en contacto una superficie carboxilada con una muestra que comprende la célula en condiciones suficientes para inducir la unión entre la célula y la superficie; (b) separar la superficie de la muestra, aislando así la célula; (c) lisar la célula, liberando así la biomolécula en un lisado; y (d) detectar la biomolécula en el lisado.

10 También se describe un método para determinar la presencia de un ácido nucleico en una muestra, comprendiendo el método: (a) poner en contacto una superficie carboxilada con una muestra que comprende la célula en condiciones suficientes para inducir la unión entre la célula y la superficie; (b) separar la superficie de la muestra, aislando así la célula; (c) lisar la célula, liberando así el ácido nucleico; y (d) detectar el ácido nucleico mediante un método que comprende generar un híbrido de ADN:ARN entre el ácido nucleico y una sonda de ácido nucleico específica para el ácido nucleico.

15 También se describe un método para concentrar una célula en una muestra, comprendiendo dicho método: (a) poner en contacto una superficie carboxilada con la muestra en condiciones suficientes para inducir la unión entre la célula y la superficie; y (b) eliminar al menos una parte de la muestra que no está unida a la superficie, concentrando así la célula.

También se describe un complejo entre una célula y una superficie carboxilada en presencia de un agente fijador.

20 También se describe una superficie carboxilada para usar en los métodos descritos en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica de barras que compara la recuperación de ácido nucleico del HPV16 usando perlas de carboxilato para concentrar la célula ("COOmag") en comparación con la centrifugación ("MC"). Se usaron células SiHa (ya sea 300.000 o 30.000) como una fuente de HPV16, añadidas a muestras clínicas negativas para HPV o medio líquido de citología PRESERVCYT® limpio. El eje y representa una señal (en unidades de luz relativas ("RCU")) que se correlaciona directamente con la concentración del ácido nucleico del HPV16.

La figura 2 es una gráfica de barras que compara la recuperación de ácido nucleico del HPV16 usando perlas de carboxilato para concentrar la célula ("COOmag") en comparación con la centrifugación ("MC"). Se usaron células SiHa (ya sea 300.000 o 30 00) como fuente de HPV16, añadidas a muestras clínicas negativas para HPV o en medio líquido de citología PRESERVCYT® limpio. El eje y representa una señal (en RCU) que se correlaciona directamente con la concentración del ácido nucleico del HPV16.

La figura 3 es una gráfica de barras que compara la recuperación de ácido nucleico de HPV16 usando diferentes cantidades de perlas de carboxilato (10 µl y 5 µl) y diferentes tiempos de incubación (1, 10, 15 y 30 minutos) para concentrar la célula.

La figura 4 es una gráfica de barras que compara la recuperación de ácido nucleico del HPV16 cuando se reservaron varios volúmenes (50, 100 y 200 µl) del líquido sobrenadante separado después de la inmovilización de las células y se añadieron de nuevo al lisado antes de ensayarlo. "PC Sup" indica que se añadió un volumen indicado de un líquido sobrenadante antes del ensayo HC2™. "STM +/DNR" indica controles positivos que usan un volumen indicado de una mezcla 2:1 de STM/DNR en lugar del líquido sobrenadante añadir.

La figura 5A y figura 5B son gráficas de barras que comparan la recuperación de ácido nucleico del HPV16 usando perlas de carboxilato para concentrar 20000, 10000 y 0 células de SiHa añadidas a muestras de cuello uterino negativas para HPV en SUREPATH®. "MC" indica que las muestras se procesaron de acuerdo con el Protocolo 4, mientras que "COO-" indica que las muestras se procesaron de acuerdo con el protocolo 3.

La figura 6 es una gráfica de barras que compara la recuperación de ácido nucleico del HPV16 en muestras de SUREPATH® a pH 4 o pH 7.

La figura 7 es una gráfica de barras que compara la recuperación de ácido nucleico del HPV16 en muestras de SUREPATH® a pH 4.5 o pH 7, con o sin metanol (al 24% y 42%). "SP" indica una muestra en SUREPATH®, mientras que "PC" indica una muestra en PRESERVCYT™, que se usó como control positivo.

La figura 8 es una gráfica de barras que compara la recuperación de ácido nucleico de cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* inactivados por calor añadidos a PRESERVCYT™ limpio ("ebs en PC limpio") o mezcla de muestras de cuello uterino negativas para HPV en PRESERVCYT™ ("ebs en PC mezcla"), usando una perla carboxilada para concentrar los cuerpos elementales antes del aislamiento y análisis de los ácidos

nucleicos. Los ejemplos comparativos sin la concentración de perlas se indican por "ebs en PC limpio sup MC" y "ebs en PC mezcla sup MC".

La figura 9 es una gráfica de barras que compara la recuperación de ácido nucleico del *Chlamydia trachomatis* inactivada por calor, los cuerpos elementales se añadieron en la mezcla de muestras de cuello uterino negativas para HPV en PRESERVCYT™ ("ebs en grupo PC") o en orina fresca, y las perlas carboxiladas debían concentrar los cuerpos elementales antes del aislamiento y análisis de ácidos nucleicos. Los ejemplos comparativos sin la concentración de perlas se indican mediante "PC mezcla sup MC". Los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* añadidos directamente a una mezcla 2:1 de STM y DNR se usaron como control positivo ("STM/DNR").

10 Descripción detallada de la invención

La invención se puede definir por las reivindicaciones adjuntas. La presente invención proporciona un método para determinar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra que comprende una célula de cuello uterino y un agente fijador que es un medio de citología en base líquida, definiéndose dicho método en la reivindicación 1.

15 La presente descripción incluye métodos, composiciones, reactivos, sistemas y kits relacionados con la inmovilización de células usando superficies carboxiladas. Los métodos, composiciones, reactivos, sistemas y kits son útiles para, por ejemplo, investigación de laboratorio y fines de diagnóstico clínico, que incluyen, pero no se limitan a el aislamiento de biomoléculas de células para usar en la detección e identificación de organismos patógenos y la detección de una predisposición genética a una enfermedad particular.

20 Inmovilización de la célula

En un aspecto, se describe un método para inmovilizar una célula, comprendiendo dicho método poner en contacto una muestra que comprende la célula con una superficie carboxilada en condiciones suficientes para inducir la unión entre la célula y la superficie. En un aspecto, la célula es una célula de mamífero.

25 En principio, se puede usar cualquier célula. En otro aspecto, la célula de mamífero es una célula epitelial de cuello uterino humana. En otro aspecto, la célula es un organismo unicelular, tal como una bacteria del género *Mycobacterium*, *Chlamydia*, *Staphylococcus* o *Neisseria*; o un protozoo del género *Trichomonas*; o una levadura del género *Saccharomyces* o *Candida*. En otro aspecto, la bacteria es del género *chlamydia*, por ejemplo, en forma de un cuerpo elemental.

30 Como se usa en la presente memoria, la expresión "compuesto de carboxilato" se referirá a cualquier compuesto o parte del mismo que comprenda al menos un ácido carboxílico libre (COOH) o un anión carboxilato (COO⁻).

Como se usa en la presente memoria, la expresión "superficie carboxilada" se referirá a una superficie de un sólido o casi sólido, comprendiendo la superficie un grupo ácido carboxílico libre, un anión carboxilato o una sal de carboxilato.

35 En un aspecto, la "superficie" como se usa en este documento en particular se refiere a la parte de una fase sólida que entra en contacto con una disolución cuando la fase sólida se pone en contacto con ella. La fase sólida proporciona la superficie que proporciona, p. ej. lleva el grupo carboxilato, anión carboxilato, o sal carboxilato. Las fases sólidas adecuadas pueden estar hechas de o pueden comprender, en particular, en su superficie un material seleccionado del siguiente grupo:

40 - un material que comprende o consiste en silicio tal como sílice y materiales de ácido polisilícico, cuarzo, borosilicatos, silicatos, tierra de diatomeas o vidrios,

45 - un material que comprende o consiste en un polímero tal como poli(met)acrilato, poliuretano, poliestireno, poliestirol, poliacrilamida, un polímero de divinilbenceno, un polímero de estireno y divinilbenceno, polietileno, polipropileno, poli(fluoruro de vinilideno), poli(acrilonitrilo), poli(cloruro de vinilo), poli(acrilato), poliacrilamida, polimetacrilato o un polímero de metacrilato de metilo;

- un material que comprende o consiste en un polisacárido tal como agarosa, celulosa, dextranos o sefarsa;

- un material que comprende o consiste en un mineral;

- un material que comprende o consiste en un óxido metálico tal como óxido de aluminio, óxido de magnesio, óxido de titanio u óxido de circonio;

50 - un material que comprende o consiste en un metal tal como oro o platino; y

- un material que comprende o consiste en un derivado de lo anterior.

Además, la fase sólida también puede comprender más de uno de los materiales descritos anteriormente. En un aspecto, al menos la superficie que comprende los restos carboxilato está compuesta por uno de los materiales descritos o una mezcla de los mismos. También se puede usar cualquier fase sólida adecuada para la cromatografía de intercambio iónico como fase sólida para proporcionar la superficie que comprende, p. ej. está funcionalizada con grupos carboxilato.

Los formatos ejemplares de la fase sólida incluyen, pero no se limitan a, partículas tales como perlas, membranas, filtros, placas, columnas y tiras reactivas. De acuerdo con un aspecto, la superficie que comprende restos carboxilato es proporcionada por un recipiente, por ejemplo, la superficie interna de un recipiente que está destinado a recibir la muestra. La superficie interior o partes de la misma, se pueden funcionalizar, por ejemplo, revestir, con restos carboxilato. Los ejemplos de recipientes respectivos incluyen, pero no se limitan a microtubos y pocillos de una microplaca. En este aspecto, las células se unen debido a los restos carboxilato proporcionados a la superficie interna del recipiente o pocillo y, por lo tanto, se recogen.

De acuerdo con un aspecto ilustrativo, la superficie se proporciona mediante una fase sólida que se puede proporcionar como suspensión y se puede separar de una fase líquida. Cuando se pone en contacto con una fase líquida tal como, por ejemplo, un medio de citología en base líquida que contiene células, la superficie que comprende los restos carboxilato está en contacto con la fase líquida con el fin de permitir la unión celular. En un aspecto, la superficie que comprende restos carboxilato la proporcionan partículas que comprenden restos carboxilato en su superficie. Las partículas pueden tener un tamaño medio que se selecciona de un intervalo de 100 nm a 50 µm, 200 nm a 40 µm, 300 nm a 35 µm, 400 nm a 30 µm, 450 nm a 25 µm, 500 nm a 20 µm, 550 nm a 15 µm, 600 nm a 12,5 µm, 650 nm a 10 µm, 700 nm a 7,5 µm, 750 nm a 5 µm, 800 nm a 3,5 µm, 800 nm a 3 µm, 800 a 2,5 µm, 800 nm a 2 µm y 800 nm a 1,5 µm. Las partículas de los tamaños respectivos y, en particular, de un tamaño más pequeño tal como 5 µm o menos, 2,5 µm o menos o 1,5 µm o menos, son fáciles de manipular y se pueden resuspender bien en la muestra de células. Además, las partículas pequeñas respectivas proporcionan una gran superficie específica a la que pueden unirse y, por lo tanto, recoger eficazmente las células de la muestra restante, tal como p. ej. un medio de recolección de citología en base líquida. Los materiales adecuados para proporcionar o hacer las partículas se han descrito antes. Las partículas también pueden comprender más de uno de los materiales descritos anteriormente, p. ej. que comprenden dos o más capas que comprenden o consisten en diferentes materiales para proporcionar el cuerpo de partículas.

En un aspecto, las partículas magnéticas se usan para proporcionar una superficie carboxilada que se une a las células. El uso de partículas magnéticas tiene la ventaja de que se pueden procesar y mover con la ayuda de un campo magnético. Las partículas magnéticas pueden tener, por ejemplo, características superparamagnéticas, paramagnéticas, ferrimagnéticas o ferromagnéticas. Las partículas magnéticas pueden comprender un material magnético que se incorpora en las partículas y/o está asociado con las partículas. Para evitar la lixiviación del material magnético, el material magnético puede estar completamente encapsulado, p. ej., por el material que proporciona la superficie tal como, p. ej., sílice, poli(ácido silícico), vidrio o un material polimérico como el poliacrilato.

Numerosos sólidos y cuasi-sólidos adecuados son bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitado a superficies útiles en cromatografía de intercambio catiónico. El sólido o el cuasi-sólido debe tener un carácter tal que se pueda poner en suspensión en, y separar de, una fase líquida. Además, el sólido o el cuasi-sólido debe ser de un carácter tal que, cuando se pone en contacto con una fase líquida, la superficie que comprende el compuesto que contiene carboxilato esté en contacto con la fase líquida. Las superficies sólidas o cuasi-sólidas de ejemplo incluyen, pero no se limitan a policarbonato y/o perlas magnéticas, incluyendo perlas paramagnéticas, diamagnéticas, ferromagnéticas, ferrimagnéticas y diamagnéticas; columnas; platos; papel de filtro; polidimetilsiloxano (PDMS); y tiras reactivas. En un aspecto ilustrativo, la superficie carboxilada comprende una perla magnética. Las perlas magnéticas ilustrativas incluyen las que se describen en la solicitud de patente alemana DE 10 2005 058 979.9. Dichas perlas magnéticas están disponibles en el mercado.

En un aspecto ilustrativo, la superficie está recubierta con un polímero carboxilado. Los ejemplos de polímeros carboxilados que son adecuados como material de recubrimiento se describen en detalle en la solicitud de patente alemana DE 10 2005 040 259.3. Ejemplos de compuestos que se pueden unir a la superficie son glicina, ácido aspártico, ácido 6-aminocaproico, NTA (ácido nitrilotriacético), poli(ácido acrílico) (PAA), diglima (éter dimetilico del dietilenglicol), o combinaciones de estos, sin limitarse a ellos.

En un aspecto, se usa la superficie carboxilada que tiene una carga global débilmente negativa. En un aspecto adicional, la superficie carboxilada comprende un contenido de carboxilo según se determina por valoración conductométrica con hidróxido de sodio de: al menos 0,1 mEq/g; al menos 0,2 mEq/g; al menos 0,3 mEq/g; al menos 0,4 mEq/g; de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,7 mEq/g; de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,6 mEq/g; de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 mEq/g; de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,7 mEq/g; de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,6 mEq/g; de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,5 mEq/g; de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,7 mEq/g; de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,6

mEq/g; de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,5 mEq/g; de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,7 mEq/g; de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,6 mEq/g; o de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 0,5 mEq/g.

En un aspecto adicional, la superficie carboxilada tiene una carga global negativa.

- 5 En un aspecto adicional, la superficie carboxilada puede comprender grupos funcionales aniónicos adicionales, tales como grupos fosfonato y/o sulfato.

- 10 En otro aspecto, se usa una superficie carboxilada adecuada para uso en cromatografía de intercambio catiónico. Dichas superficies son bien conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, las perlas SERADYN® DS-MGCM. En un aspecto adicional, la superficie es adecuada para usar en cromatografía de intercambio catiónico, pero no en cromatografía de intercambio aniónico.

- 15 En un aspecto, la unión de la célula a la superficie carboxilada no es mediada por una interacción ligando-receptor o una interacción anticuerpo-antígeno. Como tal, se puede usar una superficie carboxilada que comprende al menos un compuesto que no está modificado con un ligando de receptor o un anticuerpo capaz de unirse a la célula. En un aspecto adicional, la célula está inmovilizada por una asociación directa entre la célula y el compuesto que comprende el grupo carboxilato.

- 20 Se puede usar cualquier muestra en la que puedan estar presentes células, incluyendo, sin limitación: un espécimen o cultivo (p. ej., cultivos celulares y tisulares) que incluyen muestras clínicas y biológicas de laboratorio; muestras de alimentos y agrícolas; y muestras forenses, incluyendo muestras de orina, semen, cabello, sangre, piel y saliva. Las muestras pueden ser de cualquier mamífero, incluyendo un ser humano, e incluyen explícitamente fluidos, sólidos (p. ej., heces) o tejidos, así como también alimentos líquidos y sólidos y productos para piensos e ingredientes tales como productos lácteos, carne y subproductos cárnicos, y residuos. Se incluyen explícitamente muestras tomadas directamente de un mamífero, así como las muestras que se han almacenado en un conservante, incluyendo, pero no limitadas a muestras de tejido incluidas en parafina y muestras celulares y tisulares almacenadas en un medio de citología con base líquida.

- 25 De acuerdo con un aspecto, la superficie carboxilada se añade a una muestra líquida que comprende la célula. En un aspecto, la partícula que comprende la superficie carboxilada se añade a la muestra líquida en un volumen para lograr una concentración de partículas después de la resuspensión que se encuentra en un intervalo seleccionado de: al menos 10 µg/ml, al menos 20 µg/ml; al menos 30 µg/ml; al menos 40 µg/ml; al menos 50 µg/ml; de 10 µg/ml a 1000 µg/ml; de 10 µg/ml a 500 µg/ml; de 10 µg/ml a 300 µg/ml; de 10 µg/ml a 200 µg/ml; de 20 µg/ml a 1000 µg/ml; de 20 µg/ml a 500 µg/ml; de 20 µg/ml a 300 µg/ml; de 20 µg/ml a 200 µg/ml; de 30 µg/ml a 1000 µg/ml; de 30 µg/ml a 500 µg/ml; de 30 µg/ml a 300 µg/ml; de 30 µg/ml a 200 µg/ml; de 40 µg/ml a 1000 µg/ml; de 40 µg/ml a 500 µg/ml; de 40 µg/ml a 300 µg/ml; de 40 µg/ml a 200 µg/ml; de 40 µg/ml a 1000 µg/ml; de 40 µg/ml a 500 µg/ml; de 50 µg/ml a 300 µg/ml; y de 50 µg/ml a 200 µg/ml.

- 35 En un aspecto, la muestra comprende al menos un agente fijador. En un aspecto, la muestra comprende un agente fijador de reticulación y/o no reticuladores. Los fijadores de reticulación funcionan haciendo enlaces químicos entre proteínas en la muestra de tejido, conduciendo a su precipitación e inmovilización dentro del tejido. Los fijadores de reticulación ilustrativos incluyen, pero no se limitan a formaldehído y paraformaldehído. Los fijadores no reticuladores no alteran químicamente las proteínas en la muestra; más bien, simplemente las precipitan donde se encuentran en la muestra de tejido. Los fijadores no reticuladores incluyen etanol, acetona, metanol y mezclas de los mismos.

- 45 En otro aspecto, la muestra es una muestra líquida que comprende al menos un agente fijador. En un aspecto, la muestra comprende un agente fijador de reticulación y/o no reticulador. Los fijadores de reticulación funcionan haciendo químicos entre proteínas en la muestra de tejido, conduciendo a su precipitación e inmovilización dentro del tejido. Los fijadores de reticulación ilustrativos incluyen, pero no se limitan a formaldehído y paraformaldehído. Los fijadores no reticuladores no alteran químicamente las proteínas en la muestra; más bien, simplemente las precipitan donde se encuentran en la muestra de tejido. Los fijadores no reticuladores incluyen etanol, acetona, metanol y mezclas de los mismos.

- 50 En un aspecto, la muestra está en un medio líquido de citología. Los medios líquidos de citología ilustrativos incluyen, pero no se limitan a PRESERVCYT® (Hologic, Inc., Bedford, MA) (un medio líquido de citología en base de metanol); medio de transporte de especímenes DIGENE® (Qiagen Gaithersburg, Inc., Gaithersburg, MD) (un medio de transporte de especímenes basado en guanidinio); y SUREPATH™ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) (un medio líquido de citología que contiene alcohol y aldehído).

PRESERVCYT® es un medio líquido de citología basado en metanol que comprende ~42% de metanol; EDTA ~5 mM, a un pH 4.5).

- 55 El medio de transporte de especímenes DIGENE® (Qiagen Gaithersburg, Inc., Gaithersburg, MD) es un medio de transporte de especímenes basado en guanidinio.

SUREPATH™ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) es un medio líquido de citología que comprende ~22% de etanol y un fijador/reticulador de células en trazas (similar al formaldehído), pH 7.

En un aspecto, el pH del medio líquido de citología está en un intervalo seleccionado del grupo que consiste en: no más de 9; no más de 8; no más de 7; de 2 a 9; de 2 a 8; de 2 a 7; de 3 a 9; de 3 a 8; de 3 a 7; de 4 a 9; de 4 a 8; de 4 a 7. En un aspecto, el pH del medio líquido de citología se ajusta para mejorar la inmovilización de la célula a la superficie carboxilada.

En un aspecto, el pH del medio líquido de citología está en un intervalo seleccionado del grupo que consiste en: no más de 9; no más de 8; no más de 7; de 2 a 9; de 2 a 8; de 2 a 7; de 3 a 9; de 3 a 8; de 3 a 7; de 4 a 9; de 4 a 8; de 4 a 7. En un aspecto, el pH del medio líquido de citología se ajusta para mejorar la inmovilización de la célula a la superficie carboxilada.

En un aspecto, la muestra líquida es orina.

En un aspecto, las células se ponen en contacto con la superficie carboxilada en presencia del medio líquido de citología u orina durante un período de tiempo suficientemente largo, es decir, un período de tiempo que es suficiente para permitir que las células se unan/liguen ellas mismas a la superficie carboxilada. Dicho período de tiempo debe ser de al menos 30 s, preferiblemente al menos 1 min, más preferiblemente al menos 3 min, más preferiblemente al menos 10 minutos.

Concentración de una célula de la muestra y/o aislamiento de la célula de la muestra

En un aspecto, la superficie carboxilada se puede usar para concentrar o aislar la célula. En un aspecto, se proporciona un método que comprende: (a) inmovilizar la célula como se ha expuesto antes; y (b) separar la superficie de la muestra, aislando así la célula.

En un aspecto, se proporciona un método para concentrar una célula en una muestra que comprende: (a) inmovilizar la célula tal como se ha expuesto antes; y (b) separar la superficie de al menos una parte de la muestra, aislando así la célula.

Son posibles diferentes modos de operaciones con el fin de separar la superficie con las células unidas de la muestra.

En un aspecto, se usa un recipiente, en donde la pared interna del recipiente está funcionalizada al menos parcialmente con restos carboxilados como se describe en la presente memoria, la muestra restante se puede descartar por decantación o se puede separar por aspiración o métodos similares. Las células unidas permanecen asociadas a la superficie interna del recipiente debido a los restos carboxilados. Las respectivas etapas de separación se pueden llevar a cabo usando un sistema robótico.

Como otro ejemplo, se usan partículas que comprenden restos carboxilados para proporcionar la superficie carboxilada. Si las partículas no son magnéticas, se pueden recoger, por ejemplo, por filtración o sedimentación, que, según un aspecto, puede ser asistido por centrifugación. Sin embargo, se prefiere usar partículas magnéticas, porque las partículas magnéticas que incluyen las células unidas se pueden procesar fácilmente mediante la ayuda de un campo magnético, p. ej., usando un imán permanente. Este aspecto es preferido ya que es compatible con sistemas robóticos establecidos capaces de procesar partículas magnéticas. Aquí, en la técnica anterior existen diferentes sistemas robóticos que se pueden usar junto con la presente invención para procesar las partículas magnéticas a las que se han unido las células. Según un aspecto, las partículas magnéticas se recogen en el fondo o en el lado del recipiente de reacción y la muestra líquida restante se retira del recipiente de reacción, dejando atrás las partículas magnéticas recogidas a las que están unidas las células. La separación de la muestra restante puede ocurrir por decantación o aspiración. Dichos sistemas son bien conocidos en la técnica anterior y, por lo tanto, no necesitan una descripción detallada aquí.

En un sistema alternativo que es conocido para procesar partículas magnéticas, el imán que habitualmente está cubierto por una cubierta o envoltura se sumerge en el recipiente de reacción para recoger las partículas magnéticas. Las partículas magnéticas que transportan las células unidas después se pueden transferir, por ejemplo, a un nuevo recipiente de reacción, p. ej., que comprende una disolución de resuspensión, preferiblemente una composición desnaturalizante como se describirá a continuación. Como los sistemas respectivos son bien conocidos en la técnica anterior y también están disponibles en el mercado (p. ej., QIAAsymphony; QIAGEN), no necesitan ninguna descripción detallada aquí.

En un sistema alternativo adicional que se conoce para procesar partículas magnéticas, la muestra que comprende las partículas magnéticas se puede aspirar en una punta de pipeta y se pueden recoger las partículas magnéticas en la punta de la pipeta aplicando un imán, p. ej., en el lado de la punta de la pipeta. La muestra restante se puede liberar de la punta de la pipeta mientras que las partículas del imán recogidas que llevan las células unidas permanecen debido al imán en la punta de la pipeta. Las partículas magnéticas recogidas después se pueden procesar. Dichos sistemas también son bien conocidos en la técnica anterior y

también están disponibles en el mercado (p. ej., BioRobot EZ1, QIAGEN) y, por lo tanto, no necesitan ninguna descripción detallada aquí.

Se prefiere poner en contacto las células unidas después de la etapa b) con una composición líquida. Este aspecto tiene la ventaja de que puede, entre otros, apoyar la recolección de las células si se usan partículas magnéticas, en particular si se usa un sistema robótico para recoger las partículas magnéticas en donde el imán se sumerge en el recipiente de reacción. Al poner en contacto las células recogidas que todavía están unidas a las partículas magnéticas con una composición líquida, se garantiza en este aspecto que las partículas se retiran de manera eficaz del imán y se vuelven a dispersar en la composición líquida. Sin embargo, poner en contacto las células recogidas con una composición líquida tiene ventajas generales adicionales también cuando se usan otros sistemas de separación magnética u otras superficies carboxiladas como se describe en la presente memoria. La composición líquida es compatible con el procesamiento posterior aguas abajo, por ejemplo, cuando se forman híbridos de ADN:ARN de doble cadena como se describe a continuación. La composición líquida se puede añadir a las células recogidas que están unidas a la superficie carboxilada, p. ej., se puede añadir a las partículas magnéticas que llevan las células unidas o viceversa. De acuerdo con un aspecto, poner en contacto la superficie carboxilada que lleva las células unidas con la composición líquida da como resultado que las células recogidas se liberan al menos parcialmente y, por lo tanto, son eluidas de la superficie carboxilada. Si se desea, después la superficie carboxilada se puede separar de las células liberadas. Aquí, cualquier modo de separación es factible y los modos adecuados incluyen, pero no se limitan a recoger la composición líquida que comprende las células liberadas, p. ej., por aspiración o, lo que es factible si se usan partículas magnéticas, recoger y separar las partículas magnéticas de la composición líquida restante que comprende las células liberadas usando un campo magnético. Sin embargo, como se muestra en los ejemplos, no es obligatorio separar la superficie carboxilada antes de las etapas c) y d) y esto es una ventaja particular ya que esto nuevamente ahorra etapas de manipulación. Las células pueden incluso permanecer unidas a la superficie carboxilada siempre que los ácidos nucleicos se liberen de la misma.

Liberación de una entidad de la célula inmovilizada

También se proporciona un método para aislar una biomolécula de una célula que comprende: (a) aislar la célula como se ha expuesto antes; y (b) lisar la célula, liberando así la biomolécula en un lisado.

En un aspecto, se puede liberar una entidad de una célula que se ha inmovilizado como se describe antes, opcionalmente después de que la célula se haya concentrado y/o aislado del resto de la muestra. A modo de ejemplo y no de limitación, la entidad puede incluir, pero no se limita a: una biomolécula, tal como ácidos nucleicos (incluyendo, pero no limitado a ADN y ARN), péptidos (incluyendo, pero no limitado a oligopéptidos y polipéptidos), lípidos, azúcares, etc.; un virus o partícula vírica; un orgánulo u otra estructura subcelular; y un microorganismo, tal como bacterias, micobacterias, protozoos y hongos. Los métodos para liberar las entidades anteriores son bien conocidos en la técnica.

En un aspecto, la entidad es una biomolécula seleccionada del grupo que consiste en péptidos y ácidos nucleicos. En un aspecto, la biomolécula es un péptido de la superficie celular y se libera sin lisar la célula, tal como por extracción de la membrana plasmática, elución de un ligando de un receptor de la superficie celular, o liberación enzimática de una proteína anclada a la membrana plasmática.

En otro aspecto, la biomolécula es intracelular y se libera mediante lisis de la célula. Se puede usar cualquier forma de lisar la célula en el método descrito, incluyendo sin limitación: lisis mecánica, tal como por ultrasonidos o citólisis; y lisis química, incluyendo el uso de detergentes como el 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (vendido comercialmente como CHAPS®); octilfenoxipoliétoxietanol (también conocido como NONIDET P-40® o IGEPAL CA-630®); desoxicolato; C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n (vendido comercialmente como TRITON® X-100); dodecil-sulfato de sodio (vendido comercialmente como SDS); y/o tensioactivos de polisorbato (vendidos comercialmente como TWEEN®). En un aspecto adicional, la lisis se lleva a cabo en presencia de calor.

En un aspecto adicional, la biomolécula es un ácido nucleico o una proteína.

En un aspecto adicional, se libera un ácido nucleico por un método que comprende: (b) aislar o concentrar la célula como se ha expuesto antes; (c) poner en contacto la célula con una composición líquida que lisa la célula, liberando así el ácido nucleico en un lisado, y (d) opcionalmente, desnaturizar el ácido nucleico liberado. Según un aspecto, las células recogidas se lisan poniéndolas en contacto con una composición líquida.

En un aspecto, la composición líquida para lisar las células comprende un agente caotrópico. Se puede usar cualquier agente caotrópico para este propósito que produzca desorden en una proteína o ácido nucleico, por ejemplo, pero no limitado a alterar la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de una proteína o un ácido nucleico. Preferiblemente, se usa una sal caotrópica. La sal caotrópica comprende preferiblemente guanidinio, tiocianato, isotiocianato, perclorato, tricloroacetato y/o trifluoroacetato como ion caotrópico.

Preferiblemente, el agente caotrópico se selecciona del grupo que consiste en hidrocloreuro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio, tiocianato de sodio, yoduro de sodio, perclorato de sodio, tricloroacetato de sodio, trifluoroacetato de sodio y urea. También se puede usar una mezcla de agentes caotrópicos. Preferiblemente, se usa el hidrocloreuro de guanidinio, tiocianato de guanidinio o isotiocianato de guanidinio como agente caotrópico en la composición que ayuda a la liberación de los ácidos nucleicos en la etapa c). La composición líquida puede comprender el agente caotrópico, que preferiblemente es una sal caotrópica como se ha mencionado antes, en una concentración que se encuentra en un intervalo seleccionado de aproximadamente 0,1M hasta el límite de saturación, de aproximadamente 0,2 M a 8 M, de aproximadamente 0,3 M a 4 M, de aproximadamente 0,4 M a 3 M, de aproximadamente 0,5 M a 2,5 M, de aproximadamente 0,6 M a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 0,6 M a aproximadamente 1,5 M y de 0,6 M a aproximadamente 1 M. Preferiblemente, la composición líquida es una disolución tal como un tampón de lisis.

De acuerdo con un aspecto, la composición líquida para lisar las células comprende un agente quelante, preferiblemente EDTA. Un agente quelante es un compuesto orgánico que es capaz de formar enlaces de coordinación con metales por dos o más átomos del compuesto orgánico. Los agentes quelantes adecuados incluyen, pero no se limitan a ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA), ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) y N,N-bis(carboximetil)glicina (NTA). De acuerdo con un aspecto preferido, se usa EDTA. Como se usa en la presente memoria, el término "EDTA" indica entre otras cosas la parte de EDTA de un compuesto de EDTA tal como, por ejemplo, K₂EDTA, K₃EDTA o Na₂EDTA.

Según un aspecto, la composición líquida para lisar la célula puede comprender un detergente. El detergente puede ser no iónico, iónico, aniónico, catiónico o de ion híbrido.

En un aspecto, la composición líquida para lisar las células puede comprender un conservante tal como azida sódica. Además, la composición líquida para lisar las células puede comprender un agente de tamponamiento. Preferiblemente, está comprendido en la composición un tampón biológico tal como HEPES, MES, MOPS, TRIS, BIS-TRIS-propano y otros. Preferiblemente, se usa un tampón de Tris.

En un aspecto, también se desnaturaliza el ácido nucleico liberado. Esto se puede lograr, p. ej., añadiendo un agente de desnaturalización tal como una base y/o por calentamiento, como se describirá a continuación. Para los casos en los que el ácido nucleico liberado es bicatenario y se va a hibridar con una sonda de ácido nucleico, se prefiere que el ácido nucleico diana bicatenario se convierta en una cadena monocatenaria al menos parcialmente para que los ácidos nucleicos sean accesibles para la hibridación.

En un aspecto, la composición líquida para lisar las células tiene un valor de pH alcalino para lograr o soportar la desnaturalización de los ácidos nucleicos liberados. Según un aspecto, la composición líquida tiene un valor de pH que se selecciona de un valor de pH de 10 o más, un valor de pH de 11 o más, un valor de pH de 11,5 o más, un valor de pH de 12 o más, un pH valor de 12,5 o más, un valor de pH de 12,75 o más, un valor de pH de 13 o más y un valor de pH de 13,25 o más. Un valor de pH alto alcalino apoya la liberación de los ácidos nucleicos y, además, desnaturaliza los ácidos nucleicos liberados, preparando así los ácidos nucleicos para la detección (d1). Este aspecto es particularmente preferido si el ácido nucleico diana es ADN porque dicho pH básico cortará y degradará la mayoría del ARN interno en el espécimen. En un aspecto, la desnaturalización es mantenida por calentamiento como se describirá más adelante. Además, el tratamiento alcalino puede alterar interacciones entre péptidos y ácidos nucleicos para mejorar la accesibilidad del ácido nucleico diana y degradar la proteína. Además, el tratamiento alcalino de proteínas homogeniza eficazmente el espécimen 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 al destruir cualquier ácido nucleico de ARN monocatenario endógeno, híbridos ADN-ARN o híbridos ARN-ARN en la muestra. También ayuda a inactivar enzimas como las RNasas y las DNasas que pueden estar presentes en la muestra. Un experto en esa técnica apreciaría que si el ARN es el ácido nucleico diana (a diferencia del ADN), pueden ser preferibles diferentes reactivos. Para establecer un pH alcalino como se ha descrito antes, se puede añadir una base, preferiblemente una base química tal como, p. ej., hidróxido de sodio o potasio, respectivamente pueden estar comprendidos en la composición líquida.

El uso de una composición líquida alcalina fuerte como se ha descrito antes es particularmente adecuado si el ácido nucleico diana es ADN. Si el ácido nucleico diana es ARN, se prefieren condiciones más moderadas para preservar la integridad del ARN. P. ej., la composición líquida puede tener un valor de pH de 7,5 a 10, de 8 a 9,5 o de 8,5 a 9.

La composición líquida para lisar las células se puede proporcionar mediante una composición, p. ej., una disolución o se puede preparar poniendo en contacto las células con dos o más composiciones separadas. De acuerdo con un aspecto, las células recogidas se ponen en contacto con dos o más composiciones separadas con el fin de proporcionar las condiciones de liberación y desnaturalización descritas antes. De acuerdo con un aspecto, se mezclan dos o más composiciones para proporcionar una composición líquida como se ha descrito anteriormente, antes de contraer dicha composición con la superficie carboxilada a la

que están unidas las células (preferiblemente partículas magnéticas). De acuerdo con un aspecto, una primera composición comprende el agente caotrópico y opcionalmente los otros componentes descritos antes (p. ej., la composición de STM se puede usar como primera composición, véanse los ejemplos) y una segunda composición separada comprende el agente de desnaturalización (p. ej., DNR como segunda composición, véanse ejemplos). En un aspecto, dicha segunda composición es una disolución alcalina. Es adecuado cualquier álcali que pueda llevar la composición líquida que resulta de la mezcla de la primera y la segunda composición, a un intervalo de pH descrito anteriormente. Las concentraciones adecuadas de álcali incluyen de aproximadamente 1,0 N a aproximadamente 2,0 N o de aproximadamente 1,25 N a aproximadamente 1,75 N. Sin estar limitados, los álcalis adecuados incluyen NaOH y KOH. La mezcla entre sí de las dos (o más) composiciones proporciona la composición líquida que ayuda a la liberación y desnaturalización de los ácidos nucleicos y, por lo tanto, proporciona las condiciones descritas antes y, en particular, establece el valor de pH alcalino descrito antes. Se prefiere la preparación de la composición líquida mezclando dos o más composiciones separadas para establecer las condiciones descritas antes y se prefiere en particular añadir el agente de desnaturalización como se ha descrito antes, por separado.

De acuerdo con un aspecto, la superficie la proporcionan partículas magnéticas, y las células recogidas que están unidas a las partículas magnéticas se ponen en contacto con una cantidad de la composición líquida descrita antes que se selecciona de 25 µl a 500 µl, de 30 µl a 400 µl, de 35 µl a 300 µl, de 40 µl a 250 µl, de 50 µl a 200 µl, de 60 µl a 175 µl, de 70 µl a 150 µl, de 80 µl a 125 µl y de 85 µl a 100 µl. De acuerdo con un aspecto, la composición líquida se añade en un volumen para conseguir una concentración de partículas después de resuspensión que está en el intervalo seleccionado de 2000 µg/ml a 15000 µg/ml, de 2500 µg/ml a 12500 µg/ml, de 3000 µg/ml a 10000 µg/ml; de 3500 µg/ml a 9500 µg/ml, de 4000 µg/ml a 9000 µg/ml, de 4500 µg/ml a 8750 µg/ml y de 5000 µg/ml a 8500 µg/ml.

En lugar de o además del agente de desnaturalización descrito antes, se pueden usar otros métodos de desnaturalización, tal como usar una etapa de calentamiento, por ejemplo, calentando la muestra a al menos 80°C o al menos 95°C para separar las cadenas de ácido nucleico. Se prefiere la adición de un agente de desnaturalización alcalino, que puede estar comprendido en la composición líquida como se ha descrito antes, y llevar a cabo una etapa de calentamiento para desnaturalizar eficazmente los ácidos nucleicos liberados.

De acuerdo con un aspecto, después de que las células se pusieran en contacto con la composición líquida para lisar las células, la mezcla resultante se calienta para ayudar a la desnaturalización de los ácidos nucleicos. Preferiblemente, dicha mezcla se calienta a al menos 55°C, preferiblemente al menos a 60°C. Los intervalos de temperatura adecuados incluyen de 55°C a 90°C, preferiblemente de 60°C a 85°C y más preferiblemente de 65°C a 80°C. Preferiblemente, el calentamiento se produce durante al menos 30 minutos, preferiblemente al menos 35 minutos, más preferiblemente al menos 40 minutos. Los períodos de tiempo adecuados se pueden seleccionar de 30 minutos a 150 minutos, de 35 minutos a 130 minutos, de 40 minutos a 120 minutos y de 45 minutos a 100 minutos. Las condiciones de tiempo y temperatura descritas proporcionarán una desnaturalización eficaz de los ácidos nucleicos en un período de tiempo aceptable, a la vez que dejan el ácido nucleico diana en unas condiciones adecuadas para llevar a cabo (d1). El período de tiempo adecuado también depende de la muestra procesada. Por ejemplo, cuando se procesan muestras que contienen células que comprenden fijadores específicos, como muestras SUREPATH, se prefieren tiempos de incubación más largos de 90 minutos (o más largo si se desea) a una temperatura de al menos 60°C, preferiblemente a aproximadamente 65°C. Cuando se procesan muestras que contienen células que no comprenden fijadores de reticulación tales como muestras PRESERV CYT, son suficientes tiempos de incubación más cortos de p. ej. 45 minutos (o más largo si se desea) a una temperatura de al menos 60°C, preferiblemente a aproximadamente 65°C. Los períodos de tiempo adecuados también los puede determinar el experto. Un experto en la técnica entenderá fácilmente que períodos de incubación más largos a temperaturas más bajas, o períodos de incubación más cortos a temperaturas más altas, se puede equilibrar para proporcionar un efecto similar a las condiciones descritas en la presente memoria. La liberación de los ácidos nucleicos también puede ser asistida por agitación. P. ej., la muestra tratada con la composición líquida descrita antes se puede mezclar mezclando manualmente o agitando mecánicamente a aproximadamente 800 rpm, aproximadamente 900 rpm, aproximadamente 1000 rpm, entre aproximadamente 600 y aproximadamente 1000 rpm, o entre aproximadamente 600 y 1200 rpm.

De acuerdo con un aspecto, la mezcla de muestra que comprende la composición líquida para lisar las células, las células y opcionalmente la superficie carboxilada, p. ej., las partículas magnéticas, o una parte alícuota de dicha mezcla, se transfiere a un nuevo recipiente, preferiblemente un dispositivo de múltiples pozos tal como una placa de 96 pocillos, antes de calentar. Este aspecto es ventajoso ya que se puede integrar fácilmente en flujos de trabajo de ensayo establecidos para generar y aislar híbridos de ADN:ARN y también sistemas de procesamiento automatizado, ya que en estos se procesan los respectivos dispositivos de múltiples pozos y, por consiguiente, se puede usar el equipo existente.

Después de realizar lo anterior, se obtiene una muestra que comprende el ácido nucleico liberado. Dicha muestra también comprende opcionalmente la superficie carboxilada, p. ej., partículas magnéticas si las partículas magnéticas no se separaron antes o durante el aislamiento.

La muestra obtenida después se puede almacenar, p. ej., a 4°C o menos antes de llevar a cabo las etapas de procesamiento posteriores, si las hay.

Detección de un ácido nucleico liberado

- En un aspecto ilustrativo, se detecta un ácido nucleico en una muestra aislando el ácido nucleico como se ha expuesto antes; y detectando el ácido nucleico en el lisado. Se puede usar cualquier método para detectar el ácido nucleico, incluyendo la electroforesis en gel, técnicas relacionadas con la PCR, incluyendo la PCR con transcriptasa inversa y la PCR en tiempo real, secuenciación, procedimientos de subclonación, transferencia Southern, transferencia Northern, hibridación fluorescente in situ, y varios análisis mutacionales que incluyen HYBRID CAPTURE™ y análisis múltiplex. En un aspecto ilustrativo, un ácido nucleico que comprende una secuencia específica se puede detectar hibridándolo con una sonda de ácido nucleico complementaria a la secuencia específica. En un aspecto, la sonda de ácido nucleico se une a una fase sólida o se adapta para unirse a una fase sólida. En otro aspecto, la hibridación de la sonda de ácido nucleico con la molécula de ácido nucleico da como resultado un híbrido de ADN:ARN entre la sonda y la molécula de ácido nucleico. El híbrido resultante después se puede unir mediante un anticuerpo que se sabe que se une específicamente a los híbridos de ADN:ARN ("anticuerpo de unión al ADN:ARN"), que a su vez se puede unir a una fase sólida o adaptar para unirse a una fase sólida. En cualquier caso, la hibridación de la sonda con el ácido nucleico da como resultado que el ácido nucleico se asocie con una fase sólida, que después se puede separar del lisado usando medios mecánicos. A modo de ejemplo y no de limitación, dichos métodos se describen en la patente de EE.UU. n° 6 228 578 y solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 12/695 071. Los anticuerpos de unión a ADN:ARN ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en las patentes de EE.UU. n° 4 732 847 y 4 865 980. En otros métodos de ejemplo, el ácido nucleico se detecta, entre otras cosas, por amplificación del ácido nucleico. Los métodos de amplificación de ejemplo incluyen, pero no se limitan a la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), PCR con transcriptasa inversa ("RT-PCR"), PCR en tiempo real, RT-PCR en tiempo real.
- En un aspecto, se describe un método para detectar un ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo dicho método: (c) liberar el ácido nucleico de la célula como se ha descrito antes; (d) opcionalmente desnaturizar el ácido nucleico liberado; y (e) detectar el ácido nucleico liberado.

- En un aspecto adicional, se proporciona un método automatizado para cribar muestras clínicas en busca de un estado de enfermedad, comprendiendo dicho método: (a) inmovilizar una célula comprendida en las muestras a la superficie carboxilada como se ha expuesto antes; (b) aislar o concentrar la célula como se ha expuesto antes; (c) lisar las células para crear un lisado como se ha expuesto antes; (d) opcionalmente desnaturizar el ácido nucleico liberado; y (e) detectar la presencia de un ácido nucleico diana en el lisado, en donde la presencia o ausencia del ácido nucleico diana en el lisado es indicativa del estado de la enfermedad. Se puede usar cualquier método de detección compatible con la automatización. A modo de ejemplo y no de limitación, el método de detección puede comprender hibridar una sonda de ácido nucleico con el ácido nucleico del lisado. A modo de ejemplo y no de limitación, la hibridación da como resultado un híbrido de ADN:ARN. En un aspecto adicional, el híbrido de ADN:ARN se detecta uniendo un anticuerpo específico para los híbridos de ADN:ARN al híbrido de ADN:ARN entre la sonda de ácido nucleico y el ácido nucleico del lisado.

40 Detección de un ácido nucleico liberado usando híbridos de ácido nucleico bicatenarios

En un aspecto, la detección comprende la generación de un híbrido de ácido nucleico bicatenario entre el ácido nucleico diana y una sonda de ácido nucleico específica para el mismo. En un aspecto, el híbrido de ácido nucleico es un híbrido de ADN:ARN.

De acuerdo con un aspecto, la detección comprende:

- 45 (e1) poner en contacto el ácido nucleico diana liberado y opcionalmente desnaturizado con una o más sondas específicas para el ácido nucleico diana en condiciones que permiten que las sondas y el ácido nucleico diana hibriden formando híbridos de ácido nucleico bicatenarios; y

(e2) detectar la presencia o ausencia de híbridos de ácido nucleico bicatenarios.

En un aspecto, los híbridos de ácido nucleico bicatenarios se detectan por un método que comprende:

- 50 (e2α) capturar los híbridos de ácido nucleico bicatenarios en un soporte sólido;

(e2β) separar opcionalmente los híbridos de ácido nucleico bicatenarios unidos al soporte sólido de los ácidos nucleicos no unidos; y

(e2γ) detectar la presencia o ausencia de híbridos de ácido nucleico bicatenarios.

En otro aspecto:

(e2α) los híbridos de ácido nucleico bicatenarios se capturan en el soporte sólido poniendo en contacto los híbridos bicatenarios con un primer agente de unión que está unido a o adaptado para unirse a la fase sólida para formar un complejo de ácido nucleico bicatenario/primer agente de unión; y

(e2y) la presencia o ausencia de híbridos de ácido nucleico bicatenarios se detecta por (a) la unión de dicho complejo de ácido nucleico bicatenario/primer agente de unión con un agente de unión adicional que está marcado con un marcador detectable para formar un complejo de híbrido de ácido nucleico bicatenario/primer agente de unión/agente de unión marcado; (b) opcionalmente lavar el complejo híbrido de ácido nucleico bicatenario/primer agente de unión/agente de unión marcado; y (c) detectar la presencia o ausencia del marcador del agente de unión adicional, lo que indica la presencia o ausencia del ácido nucleico diana.

- 10 En los aspectos anteriores, la superficie carboxilada está dispuesta preferiblemente sobre una partícula magnética, cuya partícula magnética puede estar presente opcionalmente a lo largo de la detección.

En un aspecto, la detección comprende el uso de un analizador que comprende: (1) un elemento de calentamiento; y (2) un dispositivo para detectar una señal detectable, como un fluorímetro o un luminómetro.

- 15 En los métodos anteriores, después de la liberación y desnaturalización opcional de los ácidos nucleicos como se ha descrito antes, los ácidos nucleicos diana se ponen en contacto con una o más sondas en condiciones adecuadas para que la una o más sondas hibriden con el ácido nucleico diana para formar un híbrido de ácido nucleico bicatenario. La sonda es preferiblemente una sonda polinucleotídica. La sonda puede ser ADN de longitud completa, truncado o sintético o ARN de longitud completa, truncado o sintético. Además, se pueden usar sondas que comprenden nucleótidos de ARN y ADN o que comprenden nucleótidos modificados y/o análogos de nucleótidos, con la condición de que se forme un híbrido. Si el ácido nucleico diana es ADN, entonces preferiblemente la sonda es ARN y si el ácido nucleico diana es ARN, entonces preferiblemente la sonda es ADN. Por consiguiente, se forma preferiblemente un híbrido de ARN/ADN. Las sondas se diseñan para hibridar o unirse con las moléculas de ácido nucleico diana.
- 20

- 25 En un aspecto, las sondas son capaces de hibridar o unirse a HPV o variantes de alto riesgo de HPV. En un aspecto adicional, las sondas son específicas para el HPV y variantes de alto riesgo del HPV. Las sondas de alto riesgo (HR) pueden incluir sondas para los tipos de HPV de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82. Las sondas pueden variar en cantidad de aproximadamente 7,5 ng a aproximadamente 60 ng por tipo de HPV por ensayo, o de aproximadamente 20 ng a aproximadamente 45 ng por tipo de HPV por ensayo, o se usan aproximadamente 30 ng de sonda por cada tipo de HPV por ensayo.
- 30 Por lo tanto, en un aspecto, las sondas de HR consisten o consisten esencialmente en una o más sondas para los tipos de alto riesgo de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 82 o tipos de HPV de bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83. Las sondas de ARN pueden ser sondas de ARN sintético corto que se unen específicamente solo a la molécula de ácido nucleico diana.

- 35 En un aspecto no limitante, la una o más sondas usadas pueden hibridar o unirse a moléculas de ácido nucleico diana que son al menos 70 por ciento, al menos 80 por ciento, al menos 85 por ciento, al menos 90 por ciento, al menos 95 por ciento, al menos 96 por ciento, al menos 97 por ciento, al menos 98 por ciento, al menos 99 por ciento, al menos 99 por ciento, o 100 por cien idénticas a las moléculas de ácido nucleico asociadas con el HPV, variantes genéticas del HPV, ADN del HPV de un tipo de HPV de alto riesgo, o ARN del HPV de un tipo de HPV de alto riesgo, o cualquiera de los tipos de HPV 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 HPV de bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83. En otro aspecto, la una o más sondas usadas son complementarias al HPV, variantes genéticas del HPV, ADN del HPV de un tipo de HPV de alto riesgo, ARN del HPV de un tipo de HPV de alto riesgo, o uno cualquiera de los tipos de HPV 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 HPV de bajo riesgo 6, 11, 40, 43, 53, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 81 y 83. También se pueden usar fragmentos de ADN o ARN de los ácidos nucleicos diana.
- 40
- 45

- De acuerdo con un aspecto, la muestra desnaturalizada se neutraliza antes o durante la adición de las sondas si la desnaturalización se produce en condiciones alcalinas. De acuerdo con un aspecto, la una o más sondas se diluyen en un diluyente de sonda que también puede actuar como un tampón de hibridación neutralizante. Este aspecto es ventajoso con el fin de neutralizar el valor de pH alcalino que se usó en la etapa c) para liberar y desnaturalizar los ácidos nucleicos. El diluyente de sonda usado 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 de ARN, se prefiere neutralizar la muestra primero y después añadir la una o más sondas o, alternativamente, añadir la sonda de ARN y un agente neutralizante (diluyente de sonda) a la muestra al mismo tiempo, ya que valores de pH alcalinos fuertes pueden destruir el ARN. El diluyente de sonda se puede usar para disolver y diluir la sonda y también ayuda a restablecer la muestra a un pH aproximadamente neutro o débilmente alcalino, p. ej., de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 9, preferiblemente de 6,5 a 8, más preferiblemente de 6,5 a aproximadamente 7,5 para proporcionar un entorno más favorable para la hibridación. Se puede usar un volumen suficiente de diluyente de sonda, p. ej., la mitad del volumen de la muestra, para neutralizar una muestra tratada con base.
- 50
- 55

En un aspecto, el diluyente de sonda comprende un tampón, poli(ácido acrílico), NaOH y azida sódica. El diluyente de sonda puede comprender ácido acético. En un aspecto, el diluyente de sonda comprende BES 2,2 M (ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico), poli(ácido acrílico) (PAA) al 2,6 por ciento, NaOH 0,7 N y azida de sodio al 0.05 por ciento. El diluyente de sonda puede contener BES de aproximadamente 1,2 M a aproximadamente 2,6 M, BES de aproximadamente 1,5 M a aproximadamente 2,5 M; BES de aproximadamente 1,75 M a aproximadamente 2,25 M; BES de aproximadamente 2 M a 2,4 M, o BES de aproximadamente 2,2 M, así como cualquier número dentro de los intervalos indicados. En un aspecto, el diluyente de sonda puede contener PAA de aproximadamente 2 por ciento a aproximadamente 3,0 por ciento o, así como cualquier número dentro de los intervalos citados. En otro aspecto, la concentración de PAA es de aproximadamente 2,2 por ciento a aproximadamente 2,7 por ciento. En otro aspecto más, la concentración de PAA es aproximadamente 2,6 por ciento. En un aspecto adicional, el diluyente de sonda puede contener NaOH de aproximadamente 0,6 N a aproximadamente 0,8 N, por ejemplo, NaOH aproximadamente 0,7 N. La concentración de NaOH generalmente aumenta a medida que aumenta la cantidad de BES.

Para sondas grandes, se puede añadir una disolución alcalina calentada a la muestra, después se puede añadir diluyente de sonda a la muestra a temperatura ambiente, y después la muestra se puede recalentar. Dicho proceso puede inhibir la formación de estructuras secundarias. Los agentes de unión tales como los anticuerpos tienden a unirse a estructuras con estructura secundaria. Cuando se usan sondas que no son de longitud completa, tal como sondas truncadas o sintéticas, puede no ser necesario calentar las disoluciones o muestra porque no se encuentran problemas de estructuras secundarias. En un aspecto, la muestra no se calienta cuando se usa con sondas truncadas o sintéticas. Después del tratamiento con el reactivo de desnaturalización, se puede añadir una parte alícuota de tampón de neutralización, en un aspecto del diluyente de sonda descrito, en el que se disuelven la una o más sondas a la muestra en condiciones adecuadas para permitir que se produzca la hibridación o unión de la sonda y el ácido nucleico diana. El tampón de neutralización puede contener una sola sal de tamponamiento. En un aspecto, el tampón de neutralización no contiene más de una sal de tamponamiento. Las condiciones de hibridación son suficientes para permitir que la una o más sondas polinucleótidas se reasocien con una secuencia de ácido nucleico complementaria correspondiente, si está presente, en la muestra para formar un híbrido de ácido nucleico bicatenario.

Se usan condiciones de hibridación adecuadas para las sondas y diluyentes particulares usados. Por ejemplo, las sondas y los ácidos nucleicos de la muestra se pueden incubar durante un tiempo de hibridación, preferiblemente al menos de aproximadamente 5 a aproximadamente 120 minutos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 minutos, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 minutos, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos, así como cualquier número dentro de los intervalos indicados, suficiente para permitir que la una o más sondas polinucleótidas se reasocien con una secuencia de ácido nucleico diana complementaria correspondiente. Las condiciones de hibridación pueden incluir una temperatura de hibridación de al menos aproximadamente 55°C, al menos aproximadamente 60°C, preferiblemente de aproximadamente 60°C a aproximadamente 75°C, preferiblemente de 65°C a aproximadamente 70°C, así como cualquier número dentro de los intervalos indicados. Para un ácido nucleico diana dado y una sonda dada, un experto en la técnica puede determinar fácilmente las condiciones de hibridación y los tiempos de hibridación deseados mediante experimentación rutinaria. Un experto en la técnica apreciará además que el tiempo y la temperatura de hibridación se deben optimizar, uno con respecto al otro. Sin estar limitados, las condiciones de hibridación rigurosas se pueden controlar aumentando la temperatura, aumentando las condiciones iónicas por encima de 0,5 M (por ejemplo, NaCl) o reduciendo la concentración de PAA. Como un ejemplo no limitante, las condiciones de hibridación rigurosas pueden incluir llevar a cabo una reacción de hibridación a temperaturas elevadas, tales como por ejemplo de al menos aproximadamente 65°C.

Después de que la una o más sondas se dejen hibridar con la molécula de ácido nucleico diana y formar un híbrido de ácido nucleico bicatenario, el híbrido es capturado por una molécula que se une al híbrido de ácido nucleico bicatenario formado. Dicha molécula se denomina en la presente memoria agente de unión. De este modo, se forma un complejo de híbrido de ácido nucleico bicatenario/agente de unión. Los agentes de unión específicos para los híbridos de ácido nucleico bicatenarios incluyen, pero no se limitan a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, proteínas tales como pero no limitadas a RNasa H, ácidos nucleicos que incluyen, pero no se limitan a aptámeros o ácidos nucleicos específicos de secuencia. En un aspecto, un anticuerpo que se une al híbrido de ácido nucleico bicatenario formado se usa como agente de unión, los anticuerpos respectivos también se conocen como anticuerpos antihíbridos. Por consiguiente, los híbridos de ácido nucleico bicatenarios formados se pueden capturar y detectar usando anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que son específicos para los híbridos de ácido nucleico bicatenarios. Posteriormente, se describirán aspectos adecuados y preferidos haciendo referencia a los anticuerpos. Sin embargo, dicha descripción se aplica igualmente a fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab capaces de unirse a los híbridos u otros agentes de unión adecuados.

El anticuerpo es específico para híbridos bicatenarios, tales como pero no limitados a híbridos de ARN/ADN; híbridos de ADN/ADN; híbridos de ARN/ARN; miméticos de los mismos, donde los miméticos se refieren a moléculas que se comportan de manera similar a los híbridos de ARN/ADN, ADN/ADN o ARN/ARN. El

anticuerpo antihíbrido de ácido nucleico bicatenario, es decir, el anticuerpo antihíbrido que se usa dependerá del tipo de híbrido de ácido nucleico bicatenario formado. En un aspecto, el anticuerpo antihíbrido es inmunoespecífico para híbridos de ARN/ADN. Los expertos en la técnica entenderán que se pueden usar anticuerpos policlonales o monoclonales antihíbridos y/o acoplados y/o inmovilizados sobre un soporte en el presente método como se describe a continuación. En un aspecto, los anticuerpos monoclonales soportan temperaturas de incubación de alta rigurosidad durante la etapa de captura. Los agentes de unión primeros y adicionales, que preferiblemente son anticuerpos pueden ser los mismos para la captura y detección o pueden ser diferentes entre sí. En un aspecto, el agente de unión primero y adicional (que se puede marcar, véase más abajo), que preferiblemente son ambos anticuerpos monoclonales, usados para la captura y/o detección son los mismos y son específicos para los híbridos de ARN-ADN. Como se ha descrito antes, también son adecuados como agentes de unión los inmunofragmentos o derivados de anticuerpos que son específicos para híbridos bicatenarios donde dichos fragmentos o derivados contienen las regiones de unión del anticuerpo.

En un aspecto, se usa un anticuerpo híbrido anti-ARN/ADN monoclonal derivado de una línea celular de hibridoma. Dichas líneas celulares de hibridoma se describen en patente de EE.UU. nº 4,865,980, patente de EE.UU. nº 4,732,847 y patente de EE.UU. nº 4,743,535. Los anticuerpos monoclonales específicos de híbridos también se pueden preparar usando técnicas que son convencionales en la técnica. El anticuerpo monoclonal específico del híbrido se puede usar tanto para capturar como para detectar el ácido nucleico diana. También se pueden usar otros agentes de unión adecuados para unirse específicamente al híbrido formado.

En un aspecto, un primer agente de unión antihíbrido, tal como un anticuerpo antihíbrido, se inmoviliza sobre un soporte usando técnicas que son convencionales en la técnica. Los ejemplos de tecnologías de inmovilización adecuadas 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 recipientes de reacción, incluyendo placas de microvaloración en donde uno o más pocillos están funcionalizados con la molécula que se une al híbrido, preferiblemente un anticuerpo antihíbrido, partículas, partículas magnéticas, columnas, placas, papel de filtro y tiras reactivas. Se puede usar cualquier soporte siempre que permita la separación, p. ej., la extracción de una fase líquida. Las partículas magnéticas son útiles porque se pueden dejar en la disolución y la fase líquida se puede extraer o decantar, si se aplica un campo magnético para inmovilizar las partículas, o las partículas magnéticas con el híbrido unido se pueden separar usando un sistema como se ha descrito antes. Las partículas que son pequeñas y tienen una superficie específica alta son preferibles, tal como partículas de aproximadamente 0,5 µm a 10 µm, de 0,75 µm a 7,5 µm, de 0,75 µm a 5 µm, de 0,75 µm a 2,5 µm y lo más preferido de 1 µm de diámetro. Sin embargo, cuando se usan partículas magnéticas como soporte sólido para el primer agente de unión que une el híbrido, se prefiere llevar a cabo una etapa de separación magnética final antes de llevar a cabo (d2) con el fin de asegurar que las partículas magnéticas no interfieren con la detección.

Preferiblemente, el soporte que se usa para inmovilizar el primer agente de unión que se une al híbrido generado es un recipiente de reacción. Preferiblemente, el soporte está provisto de un dispositivo de múltiples pocillos, tal como una placa de microvaloración, en donde los pocillos están al menos parcialmente funcionalizados con el primer agente de unión. Este aspecto es ventajoso, ya que permite separar fácilmente las partículas que se usaron para unir las células durante el ensayo, si dichas partículas no se separaron antes de (d1). El híbrido generado es capturado por el agente de unión y, por lo tanto, se inmoviliza en el recipiente de reacción, de modo que la muestra restante que incluye las partículas que se usaron para la unión de células se puede eliminar fácilmente, p. ej., por aspiración y/o lavado.

Los híbridos se incuban con el agente de unión antihíbrido unido al soporte durante un tiempo suficiente para permitir la captura de los híbridos de ácido nucleico bicatenarios por el agente de unión antihíbrido inmovilizado. De este modo, se forma un complejo de híbrido de ácido nucleico bicatenario/soporte sólido, que también comprende el primer agente de unión que se usa para capturar el híbrido. Como se ha descrito antes, en un aspecto preferido, el soporte es un recipiente de reacción, preferiblemente una placa de microvaloración funcionalizada con uno o más agentes de unión antihíbridos tales como anticuerpos antihíbridos. El anticuerpo antihíbrido puede ser monoclonal o policlonal. En un aspecto el anticuerpo es monoclonal. En un aspecto, el anticuerpo se acopla al soporte por un conector 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 perla acoplado al agente de unión, que preferiblemente es un anticuerpo, se diluye en un tampón de dilución de perla. El tampón de dilución de perlas es útil para minimizar la desnaturalización de proteínas en la perla. Un ejemplo de un tampón de dilución de perlas comprende caseína al 6 por ciento, Tris-HCl 100 mM, NaCl 300 mM y azida sódica al 0,05 por ciento.

En un aspecto, el soporte recubierto con el anticuerpo antihíbrido se incuba con la muestra. La incubación se puede realizar a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas. El tiempo de incubación puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 120 minutos, de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 minutos, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 80 minutos, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos, así como cualquier número dentro de los intervalos indicados suficiente para permitir la captura. Los mismos tiempos de incubación son adecuados si el primer agente de unión que se usa para unir el híbrido formado no está unido a un soporte sólido. La muestra se puede agitar durante dicha incubación. Los expertos en la técnica entenderán que el tiempo de incubación, la temperatura y/o las condiciones de agitación se pueden variar para lograr cinéticas de captura alternativas según se desee.

Tras la unión y, por lo tanto, la captura del híbrido de ácido nucleico diana/sonda, el híbrido capturado se puede separar del resto de la muestra. La separación es particularmente fácil si el primer agente de unión está inmovilizado en un soporte sólido. En este caso, la muestra no unida se puede p. ej. simplemente aspirar como se describe también en los ejemplos. De acuerdo con un aspecto, se llevan a cabo una o más etapas de lavado para lavar los ácidos nucleicos no capturados y los restos de muestra. Como se ha descrito antes, si las partículas que se usaron para unir las células todavía están presentes durante la generación y captura del híbrido, se separarán al menos parcialmente durante dicha etapa de separación. Ventajosamente, no es necesario separar específicamente las partículas, p. ej., con la ayuda de un imán en el caso de partículas magnéticas, ya que se separarán automáticamente cuando se separen los residuos de la muestra. Esto ahorra etapas de manipulación.

De acuerdo con un aspecto, se usa un agente de unión adicional. El agente de unión adicional puede comprender un marcador detectable. El agente de unión adicional se usa para permitir detectar la presencia de híbridos de ácido nucleico bicatenarios. El agente de unión adicional se puede unir directa o indirectamente al complejo que se forma cuando el primer agente de unión se une y así captura el híbrido formado, proporcionando así un complejo de híbrido de ácido nucleico bicatenario/primer agente de unión/agente de agente de unión marcado o un complejo de híbrido de ácido nucleico bicatenario/soporte sólido/agente de unión marcado si el primer agente de unión se ha inmovilizado en un soporte sólido. En un aspecto, el agente de unión adicional comprende un marcador que debe reaccionar con un sustrato para proporcionar una señal que se puede detectar. El agente de unión adicional se puede disolver en un tampón adecuado. En un aspecto, el tampón comprende TrisHCl 100 mM, a pH 7,4, NaCl 0,5 M, ZnCl₂ 0,1 mM, MgCl₂ 1,0 mM, Tween 20 al 0,25 por ciento, RNasa A 0,2 mg/ml de hidroxipropil-b-ciclodextrina (ciclodextrina) al 4 por ciento, tampón de dilución de perlas al 30 por ciento, como se ha descrito previamente, IgG de cabra al 0,05 por ciento, azida sódica al 0,05 por ciento. Preferiblemente, el agente de unión adicional es un anticuerpo o fragmento del mismo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

De acuerdo con un aspecto, el agente de unión adicional comprende un marcador detectable y se une al híbrido de ácido nucleico bicatenario. Alternativamente, el agente de unión adicional que comprende un marcador detectable se une al primer agente de unión. Alternativamente, los híbridos de ácido nucleico bicatenarios formados se pueden detectar con un segundo agente de unión que no está directamente marcado. En este aspecto, se usa un segundo agente de unión que se puede unir al híbrido de ácido nucleico bicatenario o al primer agente de unión y dicho segundo agente de unión puede ser unido por un agente de unión adicional que comprende un marcador detectable. Por ejemplo, el segundo agente de unión puede ser una inmunoglobulina de ratón que es detectada mediante un tercer anticuerpo marcado, p. ej., un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón.

En un aspecto, la reacción de unión del agente de unión marcado al complejo que comprende el híbrido capturado tiene lugar a temperatura ambiente. En un aspecto, la reacción de unión tiene lugar a temperatura ambiente durante entre aproximadamente 15 minutos y 120 minutos, 20 minutos y 100 minutos, 25 minutos y 80 minutos, 30 minutos y 60 minutos o 30 minutos y 45 minutos. La reacción de unión puede tener lugar a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas.

Los expertos en la técnica entenderán que se puede usar 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 la fosfatasa alcalina. Se conocen métodos para conjugar un marcador con un anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo se puede reducir con ditiotreitól (DTT) para dar fragmentos de anticuerpos monovalentes. El anticuerpo reducido después se puede conjugar directamente 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 se puede purificar por HPLC. El conjugado también se puede purificar usando cualquier tipo de cromatografía de exclusión por tamaños. Un beneficio de la purificación es que los conjugados de una proteína con un anticuerpo se pueden separar de esos conjugados con otras proporciones de proteína a anticuerpo.

Después de la unión con el agente de unión adicional que comprende un marcador detectable, la muestra se puede lavar con un tampón de lavado. El tampón de lavado puede contener uno o más detergentes o puede carecer de un detergente. Si el tampón de lavado contiene un detergente, el detergente es preferiblemente 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 en una concentración de aproximadamente 0.05 por ciento a aproximadamente 1,5 por ciento, o de aproximadamente 0.075 por ciento a aproximadamente 1,0 por ciento, o de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 0,75 por ciento, o aproximadamente 0,5 por ciento o cualquier número dentro de los intervalos indicados. Un ejemplo de un tampón de lavado adecuado

5

La muestra se puede lavar 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 indicados. La muestra también se puede lavar 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

10

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.

El llevar a cabo dicha una o más etapas de lavado tiene la ventaja de que cualquier rastro restante de partículas magnéticas que se usaron para unir las células se pueden lavar eficazmente y, por lo tanto, se separan antes de realizar la detección. Las partículas se pueden lavar particularmente fácilmente si tienen un

15

tamaño de 5 µm o menos, preferiblemente de 2,5 µm o menos.

El marcador presente en el agente de unión adicional se detecta para indicar así la presencia o ausencia de la molécula de ácido nucleico diana. Los métodos para detectar diferentes marcadores son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los métodos de colorimetría, radioactivos, resonancia de plasmón de superficie o quimioluminiscencia se describen, p. ej., en Coutlee et al., *J. Clin. Microbiol.* 27: 1002-1007 (1989).

20

Por ejemplo, un conjugado de fosfatasa alcalina unido se puede detectar 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 FVLUMINA (Source Scientific Systems, Inc., Garden Grove, CA), un luminómetro OPTOCOMP I (MGM Instruments, Hamden, CT), o similares, tal como un luminómetro de Veritas Microplate de Turner Biosystems. También se pueden usar múltiples técnicas de detección en

25

secuencia o en paralelo. Por ejemplo, el conjugado se puede detectar por quimioluminiscencia y fluorescencia. En otro aspecto, el conjugado se puede detectar por quimioluminiscencia.

Como se describe en la presente memoria, la detección del marcador es indicativa de la presencia de una o más de las moléculas de ácido nucleico diana en la muestra que son complementarias de una o más sondas. Después del lavado (véase antes), la muestra se suspende en un tampón de detección que, por ejemplo,

30

contiene el sustrato para el marcador en el agente de unión marcado.

Una razón por la cual la presencia del HPV u otras moléculas de ácido nucleico diana se puede determinar en cortos períodos de tiempo es porque el método no requiere una amplificación de 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 HPV u otras moléculas de ácido nucleico diana. En un

35

aspecto, los métodos pueden incluir una etapa de amplificación de señal. En un aspecto, los métodos no incluyen una etapa de amplificación de diana y, en particular, no incluyen una etapa de amplificación de PCR en (d1). En otro aspecto, los métodos de la descripción pueden incluir una etapa de amplificación de señal y no etapa de amplificación del ácido nucleico diana.

La presente descripción también proporciona métodos y ensayos para detectar cáncer, por ejemplo, cáncer de cuello uterino, detectando la presencia de una molécula de ácido nucleico diana, tal como el HPV, en una muestra que usa el método descrito antes.

40

Los expertos en la técnica entenderán que la detección se puede llevar a cabo en una serie de plataformas que incluyen, pero no se limitan a tubos, tiras reactivas, micromatrices, microplacas, placas de 384 pocillos, otras placas de microlitro y sistemas microfluídicos.

45

En un aspecto de ejemplo, el ácido nucleico diana procede de un patógeno tal como un microorganismo o virus. En un ejemplo adicional, el ácido nucleico procede de un virus. En un aspecto adicional, el ácido nucleico vírico es una asociación de molécula de ADN derivada de un virus con la célula en un virus intacto o una cápside vírica; mantenida en la célula de forma episomal; o integrada en una molécula de ADN celular, tal como un cromosoma de la célula. En un aspecto adicional, el ácido nucleico vírico es un ARNm codificado por un gen vírico o una molécula de ADNc derivada de dicho ARNm. En un aspecto adicional, el ácido nucleico diana procede de un virus del papiloma humano. En un aspecto adicional, el método automatizado es un método de cribado de muestras clínicas para detectar la presencia de un virus del papiloma humano de alto riesgo.

50

En un aspecto, las moléculas de ácido nucleico diana son al menos 70 por ciento, al menos 80 por ciento, al menos 85 por ciento, al menos 90 por ciento, al menos 95 por ciento, al menos 96 por ciento, al menos 97 por ciento, al menos 98 por ciento, al menos 98 por ciento, al menos 99 por ciento o 100 por cien idénticas a las moléculas de ácido nucleico asociadas con o que están comprendidas en una cualquiera de muestras de cuello uterino (p. ej., una muestra obtenida de un frotis de cuello uterino) o muestras de células de cuello

55

uterino, células adenoides, células epiteliales anales, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, orina y semen, otros virus, bacterias, micobacterias o plasmodios, por ejemplo, citomegalovirus HPV, (CMV), herpes, HIV, HINI, clamidia, gonorrea, *Neisseria gonorrhoeae* (GC), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Trichomonas vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, tuberculosis, coronavirus asociado a SARS o influenza.

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

La molécula de ácido nucleico diana puede ser ADN o ARN. En un aspecto, el ácido nucleico diana que se va a detectar es ADN (p. ej., ADN genómico de HPV o ADNc) o ARN (p. ej., ARNm, ARN ribosomal, ARN nuclear, ARN de transferencia, ARN vírico, ARN nuclear heterogéneo, ARN pequeño no codificante, ARNip, miARN), en donde la una o más sondas polinucleótidas son polirribonucleótidos o polidesoxirribonucleótidos, respectivamente, o mezclas de los mismos. Las sondas también pueden comprender nucleótidos modificados. Cuando la molécula de ácido nucleico diana es ADN, la sonda polinucleotídica es preferiblemente ARN y cuando el ácido nucleico diana es ARN, la sonda polinucleotídica es preferiblemente ADN. Sin embargo, una sonda de ADN se puede usar con una molécula de ácido nucleico diana de ADN y una sonda de ARN se puede usar con una molécula de ácido nucleico diana de ARN. 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 se pueden detectar usando un anticuerpo que es inmuno-específico para los híbridos de ARN-ADN.

En un aspecto preferido, el ácido nucleico diana procede de un patógeno tal como un microorganismo o virus. En un ejemplo adicional, el ácido nucleico diana procede de un virus. En un aspecto adicional, el ácido nucleico vírico es una molécula de ADN derivada de un virus y puede estar presente en un virus intacto o una cápside vírica, puede estar comprendido en la célula en una forma episomal o puede estar presente integrado en una molécula de ADN celular, tal como un cromosoma de la célula. En un aspecto adicional, el ácido nucleico vírico es un ARNm codificado por un gen vírico o una molécula de ADNc derivada de dicho ARNm. En un aspecto, el ácido nucleico diana procede de un virus del papiloma humano. En un aspecto, el método automatizado es un método de cribado de muestras clínicas para detectar la presencia de un virus del papiloma humano de alto riesgo.

Los métodos descritos en la presente memoria son particularmente ventajosos porque se pueden automatizar completamente. El uso de una superficie que comprende restos carboxilados, en particular en forma de perlas magnéticas que comprenden restos carboxilados, permite el aislamiento de células, lisis y análisis de ácido nucleico sin una etapa de centrifugación, lo que permite un procesamiento y análisis de muestras de alto rendimiento.

En un aspecto adicional, se proporciona un sistema automatizado para su uso en el análisis de muestras, comprendiendo dicho sistema: (1) una superficie carboxilada paramagnética, superparamagnética, ferromagnética o ferrimagnética para usar en células de unión de una muestra líquida para análisis; (2) al menos un imán adaptado para inmovilizar la superficie carboxilada; (3) al menos una unidad de aspiración adaptada para separar un líquido de la superficie carboxilada; (4) al menos una unidad de suministro de reactivo adaptada para poner en contacto la superficie carboxilada con al menos un reactivo; y (5) una unidad analítica adaptada para realizar una prueba analítica en la muestra. A modo de ejemplo y no de limitación, la unidad de suministro de reactivo se puede adaptar para proporcionar, por ejemplo, un tampón de lisis; un tampón de lavado; y/o un reactivo analítico, tal como un reactivo de amplificación de ácido nucleico, una disolución de anticuerpo, o un reactivo de luminiscencia. A modo de ejemplo y no de limitación, la unidad analítica puede ser un termociclador adecuado para llevar a cabo la PCR en tiempo real, un fluorímetro adecuado para realizar la detección y cuantificación de fluorescencia, o unidades analíticas adecuadas para el análisis colorimétrico.

Detección de una proteína liberada

En un aspecto, la biomolécula es una proteína. La proteína liberada opcionalmente se puede purificar adicionalmente antes o durante la detección. Los métodos de purificación de proteínas incluyen, sin limitación, precipitación con sulfato de amonio, solubilización diferencial, centrifugación en gradiente de sacarosa, inmunoprecipitación y cromatografía. Los métodos cromatográficos de aislamiento de proteínas incluyen, sin limitación, exclusión por tamaños, intercambio iónico, interacción hidrofoba, afinidad, inmunoafinidad y cromatografía por unión a metales. Las proteínas obtenidas con los métodos y composiciones descritos se pueden usar en métodos analíticos moleculares posteriores que incluyen, sin limitación, secuenciación, inmunoprecipitación, transferencias Western, ensayos ELISA, inmunotransferencias y ensayos de actividad enzimática, tales como ensayos para la actividad de la quinasa o actividad de la fosfatasa.

A modo de ejemplo y no de limitación, la biomolécula detectada en el lisado es un péptido o proteína. A modo de ejemplo y no de limitación, la proteína se puede medir usando métodos inmunológicos, tales como ELISA, ELISPOT, transferencia Western. A modo de ejemplo y no de limitación, la proteína se puede detectar por ensayos de actividad enzimática.

En un aspecto adicional, se proporciona un sistema automatizado para usar en el análisis de muestras, comprendiendo dicho sistema: (1) una superficie carboxilada paramagnética, superparamagnética, ferromagnética o ferrimagnética para usar en células de unión de una muestra líquida para análisis; (2) al menos un imán adaptado para inmovilizar la superficie carboxilada; (3) al menos una unidad de aspiración adaptada para separar un líquido de la superficie carboxilada; (4) al menos una unidad de suministro de reactivo adaptada para poner en contacto la superficie carboxilada con al menos un reactivo; y (5) una unidad analítica adaptada para realizar un ensayo analítico en la muestra. A modo de ejemplo y no de limitación, la unidad de suministro de reactivo puede adaptarse para proporcionar, por ejemplo, un tampón de lisis; un tampón de lavado; y/o un reactivo analítico, tal como un reactivo de amplificación de ácido nucleico, una disolución de anticuerpo, o un reactivo de luminiscencia. A modo de ejemplo y no de limitación, la unidad analítica puede ser un fluorímetro adecuado para llevar a cabo la detección y cuantificación de la fluorescencia, un espectrómetro de masas o una unidad analítica adecuada para el análisis colorimétrico, tal como los ELISA.

Detección automatizada

En un aspecto adicional, se proporciona un método automatizado para cribar muestras clínicas de un estado de enfermedad, comprendiendo dicho método: (a) inmovilizar una célula comprendida en las muestras a la superficie carboxilada como se ha expuesto antes; (b) aislar o concentrar la célula como se ha expuesto antes; (c) lisar las células para crear un lisado como se ha expuesto antes; (d) detectar la presencia de una biomolécula en el lisado, en donde la presencia o ausencia de la biomolécula en el lisado es indicativa del estado de la enfermedad. A modo de ejemplo y no de limitación, la biomolécula es un ácido nucleico.

En una realización de ejemplo, el ácido nucleico procede de un gen de la célula, incluido, pero no limitado al gen, un ARNm codificado por el gen o un ADNc derivado del ARNm. En una realización adicional, el gen, ARNm y/o ADNc comprende una mutación indicativa de un estado de enfermedad, tal como cáncer.

En otra realización de ejemplo, el ácido nucleico procede de un microorganismo patógeno o virus. En un ejemplo adicional, el ácido nucleico procede de un virus. En un aspecto adicional, el ácido nucleico vírico es una asociación de molécula de ADN derivada de un virus con la célula en un virus intacto o una cápside vírica; mantenido en la célula de forma episomal; o integrado en una molécula de ADN celular, tal como un cromosoma de la célula. En un aspecto de la realización adicional, el ácido nucleico vírico es un ARNm codificado por un gen vírico o una molécula de ADNc derivada de dicho ARNm. En un aspecto de la realización adicional, el ácido nucleico diana procede de un virus del papiloma humano. En un aspecto de la realización adicional, el método automatizado es un método de cribado de muestras clínicas para detectar la presencia de un virus del papiloma humano de alto riesgo.

Se puede usar cualquier método de detección compatible con la automatización. A modo de ejemplo y no de limitación, el método de detección puede comprender hibridar una sonda de ácido nucleico con el ácido nucleico del lisado. A modo de ejemplo y no de limitación, la hibridación da como resultado un híbrido de ADN:ARN. En una realización adicional, el híbrido de ADN:ARN se detecta uniendo un anticuerpo específico para los híbridos de ADN:ARN al híbrido de ADN:ARN entre la sonda de ácido nucleico y el ácido nucleico del lisado.

A modo de ejemplo y no de limitación, la biomolécula detectada en el lisado es un péptido o proteína. A modo de ejemplo y no de limitación, la proteína se puede medir usando métodos inmunológicos, tales como ELISA, ELISPOT, transferencia Western. A modo de ejemplo y no de limitación, la proteína se puede detectar por ensayos de actividad enzimática.

Ejemplos

Los ejemplos que no pertenecen a la invención reivindicada tienen solo fines ilustrativos.

Ejemplo 1

Se añadieron un total de 30000 o 300000 células SiHa (2 copias de HPV 16 por célula) a 3 ml de medio líquido de citología líquida PRESERVCYT™ limpio ("PC limpio") o mezcla de especímenes de cuello uterino HPV-negativos. Cada muestra después se procesó de acuerdo con el protocolo 1 o el protocolo 2, que se exponen a continuación.

Protocolo 1: Se añadieron 30 µl de perlas magnéticas SERADYN® DS-MGCM (disolución madre de 50 mg/ml; contenido de carboxilo: ~0,5 mEq/g; 1 µm de diámetro; 5% de sólidos) a cada muestra de 3 ml, y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La muestra después se puso en un soporte magnético y el líquido sobrenadante se separó de las perlas por aspiración. Después, las perlas se resuspendieron en 150 µl de una mezcla 2:1 de medio de transferencia de muestra ("STM") (una disolución tamponada que comprende guanidinio-HCL 1 M; EDTA 10 mM; Tris-HCL 10 mM, pH-8,2-8,6; azida sódica al 0.05%) y reactivo de desnaturalización ("DNR") (disolución acuosa de hidróxido de sodio que comprende NaOH 1,75 M en agua desionizada) y se incubaron durante 45 minutos a 65°C para lisar la célula y liberar los ácidos nucleicos. Después se usó un ensayo HC2™ (Qiagen Gaithersburg, Inc., Gaithersburg, MD) para detectar el ADN del HPV16. El ensayo HC2™ es un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos con amplificación de señal que usa la detección quimioluminiscente de microplaca. Los especímenes que contienen el ADN diana se hibridan con un cóctel de sonda de ARN de HPV específico. Los híbridos de ARN:ADN resultantes se capturan sobre la superficie de un pocillo de la microplaca recubierta con anticuerpos específicos para los híbridos de ARN:ADN. Los híbridos inmovilizados después se hacen reaccionar con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina específicos para los híbridos de ARN:ADN y se detectan con un sustrato quimioluminiscente. La intensidad de la luz emitida indica la presencia o ausencia de ADN diana en el espécimen. Una medición de RLU igual o mayor que el valor de corte (CO) indica la presencia de secuencias de ADN del HPV en la muestra. Una medición de RLU menor que el valor de corte indica la ausencia de las secuencias de ADN del HPV específicas ensayadas o niveles de ADN del HPV por debajo del límite de detección del ensayo.

Protocolo 2 (Comparativo): se añadieron 300 µl de tampón de conversión de muestra a cada muestra de 3 ml. El tampón de conversión de muestras forma parte de un kit comercial, 5100-1400, HC2™ Sample Conversion kit (Qiagen Gaithersburg, Inc., Gaithersburg, MD). Comprende un ligante de célula para ayudar a sedimentar las células del espécimen, poli(ácido acrílico) y el colorante eosina para ayudar a visualizar el sedimento. Las células después se sedimentaron a 2900 g y se vertió el líquido sobrenadante. Después, el sedimento celular se resuspendió en 150 µl de una mezcla 2:1 de STM y DNR y se incubó durante 45 minutos a 65°C. Después se detectó el ADN de HPV16 usando un ensayo HC2™ como se describe en el protocolo 1.

Los resultados que comparan el protocolo 1 y el protocolo 2 se muestran en la figura 1.

Ejemplo 2

El ejemplo 1 se repitió usando las siguientes muestras: (1) 10000 SiHa en una muestra de cuello uterino en PC negativa para HPV; (2) 5 000 SiHa en muestra de cuello uterino en PC negativa para HPV; (3) 2 500 SiHa en muestra de cuello uterino en PC negativa para HPV; (4) muestra de cuello uterino en PC negativa para HPV (sin SiHa); y (5) 5 000 SiHa en PC limpio.

Los resultados que comparan el protocolo 1 y el protocolo 2 se muestran en la figura 2.

Ejemplo 3

El protocolo 1 se repitió con dos cantidades diferentes de perlas añadidas (10 µl y 5 µl) y diferentes tiempos de incubación (1, 10, 15 y 30 min). Los resultados se muestran en la fig. 3.

Ejemplo 4

El protocolo 1 se repitió usando 10 µl de perlas, con la condición de que se reservaran varios volúmenes (50, 100 y 200 µl) del líquido sobrenadante separado después de la inmovilización de las células y se volvieran a añadir al lisado. Se usaron volúmenes iguales de STM:DNR 2:1 como controles. Los resultados se muestran en la fig. 4. Aunque la adición de líquido sobrenadante afectó a la señal general, no obstante, el ensayo se puede llevar a cabo sin separar completamente las células de la muestra.

Ejemplo 5

Un total de 10000 o 20000 células SiHa (2 copias de HPV 16 por célula) conservadas en medio líquido de citología SUREPATH™ ("SP") se añadieron a 3 ml de una mezcla de especímenes de cuello uterino en SP

negativos para HPV. Cada muestra se procesó después de acuerdo con el protocolo 3 o el protocolo 4, que se expone a continuación.

Protocolo 3: se añadieron 10 µl de perlas magnéticas SERADYN® DS-MGCM (disolución madre 50 mg/ml; contenido de carboxilo: ~0,5 mEq/g; 1 µm de diámetro; 5% de sólidos) a cada muestra de 3 ml, y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación (900 rpm). Después la muestra se puso en un soporte magnético y el líquido sobrenadante se separó de las perlas por aspiración. Las perlas después se resuspendieron en 150 µl de una mezcla 2:1 de medio de transferencia de muestra ("STM") (una disolución tamponada que comprende hidróxido de guanidinio) y reactivo de desnaturalización ("DNR") (hidróxido de sodio acuoso) y se incubaron durante 45 minutos a 65°C, se agitaron con vórtice, y después se incubaron durante 45 minutos adicionales a 65°C para lisar la célula y liberar los ácidos nucleicos. Después se usó un ensayo HC2™ (Qiagen Gaithersburg, Inc., Gaithersburg, MD) para detectar el ADN del HPV16.

Protocolo 4 (Comparativo): se añadieron 300 µl de tampón de conversión de muestra a cada muestra de 3 ml. El tampón de conversión de muestras forma parte de un kit comercial, 5100-1400, HC2™ Sample Conversion kit (Qiagen Gaithersburg, Inc., Gaithersburg, MD). Comprende un ligante celular para ayudar a sedimentar las células del espécimen, poli(ácido acrílico) y colorante eosina para ayudar a visualizar el sedimento. Después las células se sedimentaron a 2900 g y se vertió el líquido sobrenadante. Después, el sedimento celular se resuspendió en 150 µl de una mezcla de STM y DNR 2:1 y se incubó durante 45 minutos a 65°C. Después se detectó el ADN de HPV16 usando un ensayo HC2™ como se describe en el protocolo 1.

Los resultados que comparan el Protocolo 3 y el Protocolo 4 se muestran en las figs. 5A y 5B.

Ejemplo 6

El protocolo 3 se repitió como antes, excepto que se usaron 50000 células SiHa y el pH de las mezclas clínicas de SP se redujo a pH 4 usando HCl. Los resultados se muestran en la fig. 6. Como puede verse, la reducción del pH mejoró la capacidad de la superficie carboxilada para unirse a las células.

Ejemplo 7

El protocolo 3 se repitió como antes, excepto que se usaron 50000 células SiHa, los grupos clínicos de SP se diluyeron con varios volúmenes de metanol (24%, 42%) y el pH se redujo a pH 4.5 usando HCl. Los resultados se muestran en la fig. 7.

Ejemplo 8

Un total de 50000 cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* inactivados por calor (5 copias de plásmidos crípticos por célula; 250000 copias por ensayo) se añadieron a 3 ml de medio líquido de citología PRESERVCYT™ limpio ("PC limpio") o mezcla de especímenes de cuello uterino negativos para HPV en PRESERVCYT™. Cada muestra se procesó después de acuerdo con el protocolo 5, expuesto a continuación.

Protocolo 5: se añadieron 10 µl de perlas magnéticas SERADYN® DS-MGCM (disolución madre 50 mg/ml; contenido de carboxilo: ~0,5 mEq/g; 1 µm de diámetro; 5% de sólidos) a cada muestra de 3 ml, y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación a 900 rpm. Después, la muestra se puso en un soporte magnético y el líquido sobrenadante se separó de las perlas por aspiración y se guardó para el procesamiento de acuerdo con el protocolo 6, a continuación. Las perlas después se resuspendieron en 150 µl de una mezcla 2:1 de medio de transferencia de muestra ("STM") (una disolución tamponada que comprende hidróxido de guanidinio) y reactivo de desnaturalización ("DNR") (hidróxido de sodio acuoso) y se incubaron durante 45 minutos a 65°C para lisar la célula y liberar los ácidos nucleicos. Después se analizaron 75 µl de cada muestra usando un ensayo HC2™ específico de *Chlamydia trachomatis*.

Protocolo 6 (Comparativo): se añadieron 300 µl de tampón de conversión de muestra a cada líquido sobrenadante del protocolo 5. Después las células se sedimentaron a 2900 g y se vertió el líquido sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió después en 150 µl de una mezcla de STM y DNR 2:1 y se incubó durante 45 minutos a 65°C. Después se analizaron 75 µl de cada muestra usando un ensayo HC2™ específico de *Chlamydia trachomatis*.

Los resultados que comparan el protocolo 5 y el protocolo 6 se muestran en la fig. 8.

Ejemplo 9

Los cuerpos elementales de *Chlamydia trachomatis* (5 copias de plásmidos crípticos por célula; 250 000 copias por ensayo) se añadieron a 3 ml de una mezcla de muestras de cuello uterino negativas para HPV en PRESERVCYT™ o en orina fresca (almacenada menos de 24 horas a 4°C). Cada muestra se procesó después de acuerdo con el protocolo 5 o el protocolo 6, expuesto a continuación. Se usaron cuerpos

elementales de *Chlamydia trachomatis* añadidos directamente a una mezcla de STM y DNR 2:1 como control positivo.

5 Protocolo 7: se añadieron 10 µl de perlas magnéticas SERADYN® DS-MGCM (disolución madre 50 mg/ml; contenido de carboxilo: ~0,5 mEq/g; 1 µm de diámetro; 5% de sólidos) a cada muestra de 3 ml, y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos con agitación a 900 rpm. Después, la muestra se puso en un soporte magnético y el líquido sobrenadante se separó de las perlas por aspiración y se guardó para el procesamiento de acuerdo con el protocolo 6, a continuación. Las perlas después se resuspendieron en 150 µl de una mezcla 2:1 de medio de transferencia de muestra ("STM") (una disolución tamponada que comprende hidrocloreuro de guanidinio) y reactivo de desnaturalización ("DNR") (hidróxido de sodio acuoso) y 10 se incubaron durante 45 minutos a 65°C para lisar la célula y liberar los ácidos nucleicos. Después se analizaron 75 µl de cada muestra usando un ensayo HC2™ específico de *Chlamydia trachomatis*.

15 Protocolo 8 (Comparativo): se añadieron 300 µl de tampón de conversión de muestra a cada muestra. Las células se sedimentaron a 2900 g y se vertió el líquido sobrenadante. El sedimento celular después se resuspendió en 150 µl de una mezcla de STM y DNR 2:1 y se incubó durante 45 minutos a 65°C. Después se analizaron 75 µl de cada muestra usando un ensayo HC2™ específico de *Chlamydia trachomatis*.

Los resultados que comparan el protocolo 7 y el protocolo 8 se muestran en la fig. 9.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia de un ácido nucleico diana en una muestra que comprende una célula de cuello uterino y un agente fijador que es un medio de citología en base líquida que comprende:
 - 5 (a) inmovilizar la célula de cuello uterino a una superficie carboxilada poniendo en contacto la superficie carboxilada con la muestra que comprende la célula y un agente fijador que es un medio de citología en base líquida, durante un tiempo suficiente para permitir que la célula se una a la superficie carboxilada, en donde el medio de citología en base líquida tiene un pH no mayor de 9, y en donde el pH del medio de citología en base líquida se reduce para mejorar la inmovilización de la célula a la superficie carboxilada antes o durante la inmovilización de la célula de cuello uterino a la superficie carboxilada;
 - 10 (b) separar la superficie carboxilada de al menos una parte de la muestra, aislando así la célula;
 - (c) liberar el ácido nucleico diana de la célula por un método que comprende poner en contacto la célula aislada con una composición líquida adecuada para liberar el ácido nucleico de la célula; y
 - (d) opcionalmente, desnaturalizar el ácido nucleico diana liberado; y
 - (e) detectar el ácido nucleico diana por un método que comprende:
 - 15 (e1) poner en contacto el ácido nucleico diana liberado y opcionalmente desnaturalizado con una o más sondas específicas para el ácido nucleico diana en condiciones que permiten que las sondas y el ácido nucleico diana hibriden formando híbridos de ácido nucleico bicatenarios; y
 - (e2) detectar la presencia o ausencia de híbridos de ácido nucleico bicatenarios.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde la superficie carboxilada está dispuesta sobre una partícula magnética.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la sonda de ácido nucleico hibrida con el ácido nucleico diana en presencia de la partícula magnética.
4. El método de la reivindicación 3, en donde los híbridos de ácido nucleico bicatenarios se detectan por un método que comprende:
 - 25 (e2α) capturar los híbridos de ácido nucleico bicatenarios en un soporte sólido;
 - (e2β) separar opcionalmente los híbridos de ácido nucleico bicatenarios unidos al soporte sólido de los ácidos nucleicos no unidos; y
 - (e2γ) detectar la presencia o ausencia de híbridos de ácido nucleico bicatenarios.
5. El método de la reivindicación 4, en donde:
 - 30 (e2α) los híbridos de ácido nucleico bicatenarios se capturan en el soporte sólido poniendo en contacto los híbridos bicatenarios con un primer agente de unión que está unido o adaptado para unirse a la fase sólida para formar un complejo de ácido nucleico bicatenario/primer agente de unión; y
 - 35 (e2γ) la presencia o ausencia de híbridos de ácido nucleico bicatenarios se detecta por (a) la unión de dicho complejo de ácido nucleico bicatenario/primer agente de unión con un agente de unión adicional que está marcado con un marcador detectable, para formar un complejo de híbrido de ácido nucleico bicatenario/primer agente de unión/agente de unión marcado; (b) lavado opcionalmente del complejo de híbrido de ácido nucleico bicatenario/primer agente de unión/agente de unión marcado; y (c) detección de la presencia o ausencia del marcador del agente de unión adicional, lo que indica la presencia o ausencia del ácido nucleico diana.
- 40 6. El método de la reivindicación 5, en donde el soporte sólido está recubierto con el primer agente de unión.
7. El método de la reivindicación 1, en donde al menos uno de (a), (b), (c), (d) o (e) está automatizado.
8. El método de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico diana es un ácido nucleico vírico, cuya presencia es indicativa de una enfermedad relacionada con el virus.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde los híbridos de ácido nucleico bicatenarios son híbridos de ADN:ARN.
- 45 10. El método de la reivindicación 1, que tiene al menos una de las siguientes características:
 - a) la superficie carboxilada es proporcionada por partículas sólidas que tienen un tamaño promedio de 5 μm

o menos y, opcionalmente, son magnéticas;

5 b) la superficie carboxilada tiene una carga global negativa, preferiblemente una carga global débilmente negativa, en donde opcionalmente, la superficie carboxilada comprende un contenido de carboxilo determinado por valoración conductométrica con hidróxido de sodio de al menos 0,1 mEq/g, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,7 mEq/g;

c) la superficie carboxilada es adecuada para la cromatografía de intercambio catiónico;

d) la unión de la célula a la superficie carboxilada no es mediada por una interacción ligando-receptor o una interacción anticuerpo-antígeno;

10 e) la unión es mediada por una interacción directa entre la célula y un grupo carboxilo de la superficie carboxilada.

11. El método de la reivindicación 1, en donde la composición líquida lisa la célula, liberando así la biomolécula.

12. El método de la reivindicación 1, en donde el medio de citología en base líquida tiene un pH de 7-9.

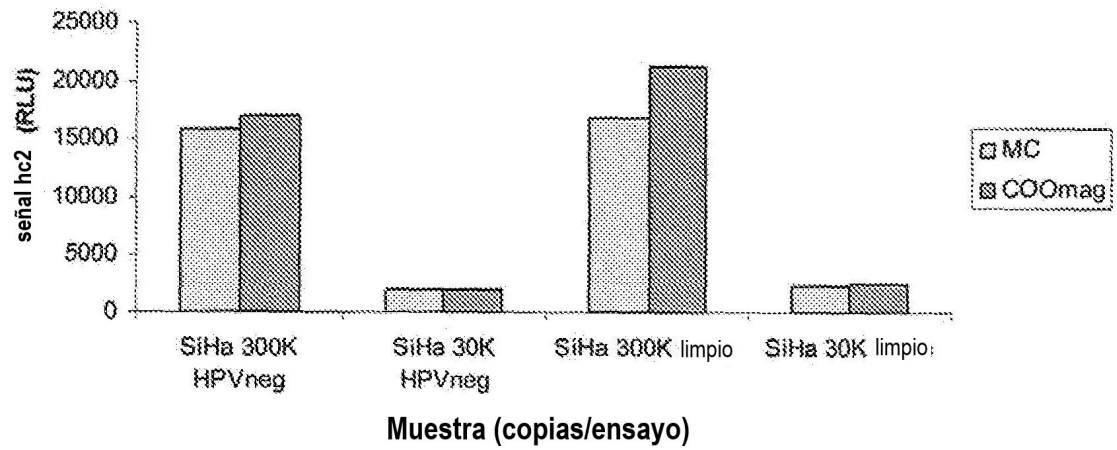


Fig. 1

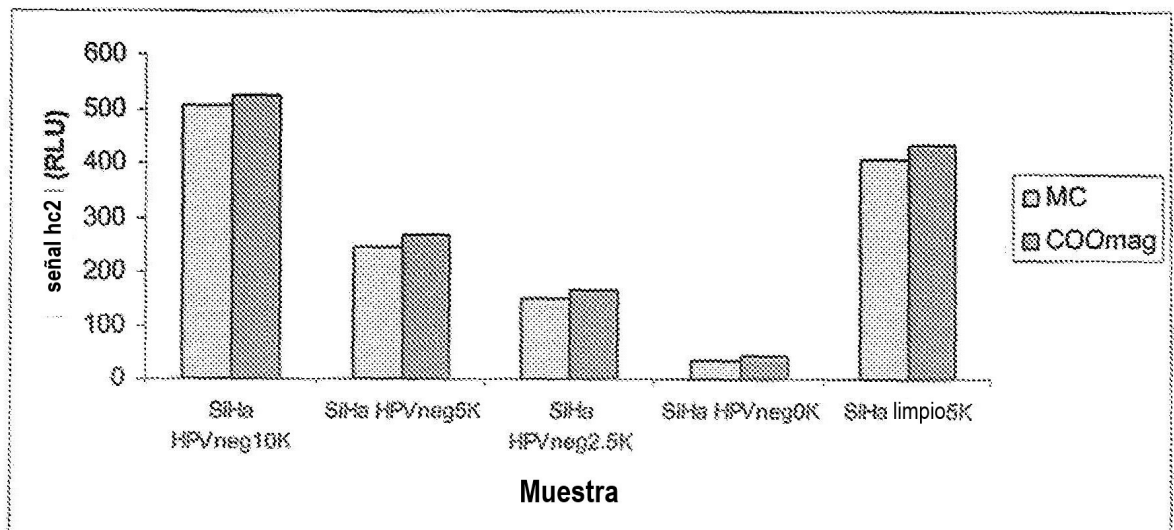


Fig. 2

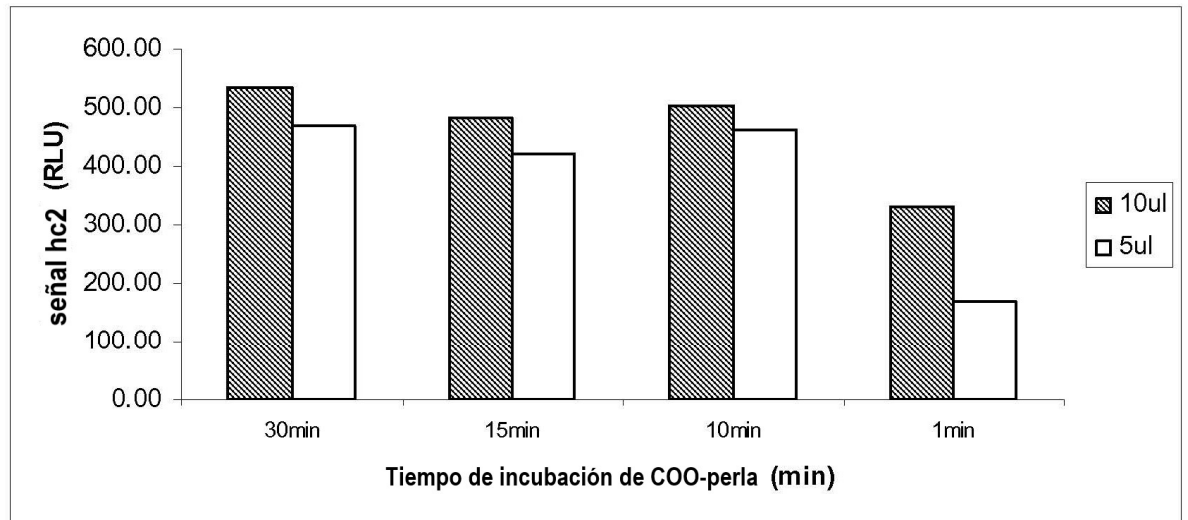


Fig. 3

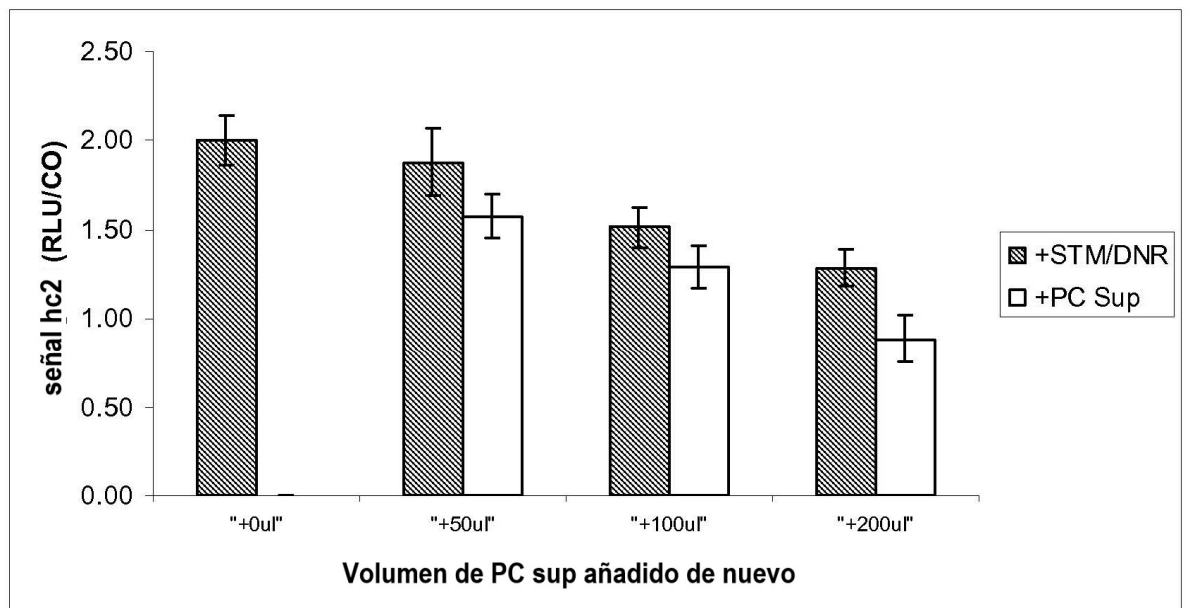


Fig. 4

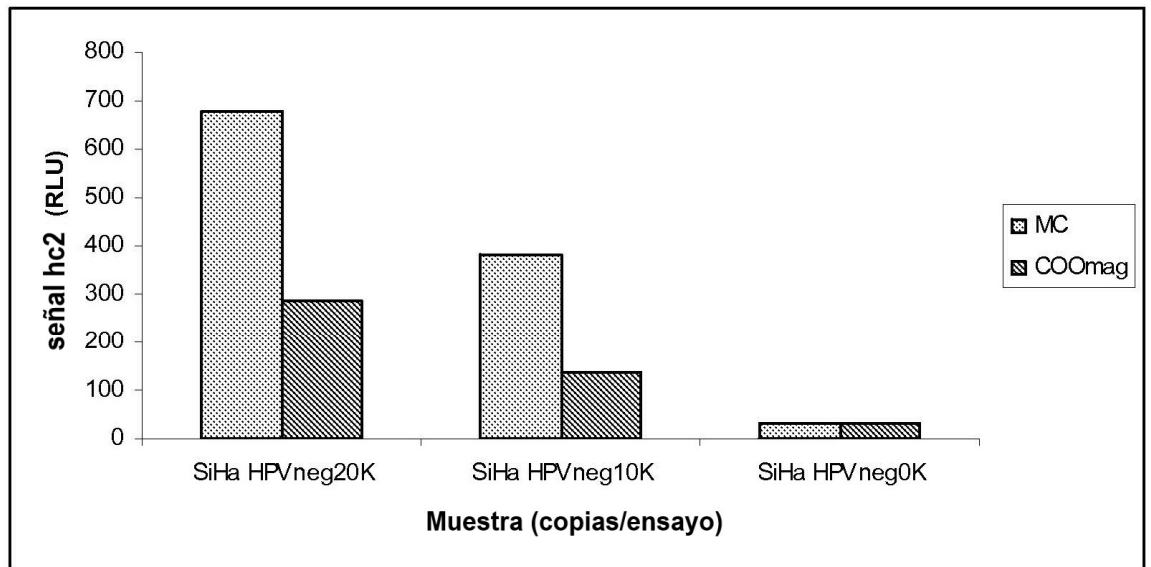


Fig. 5A

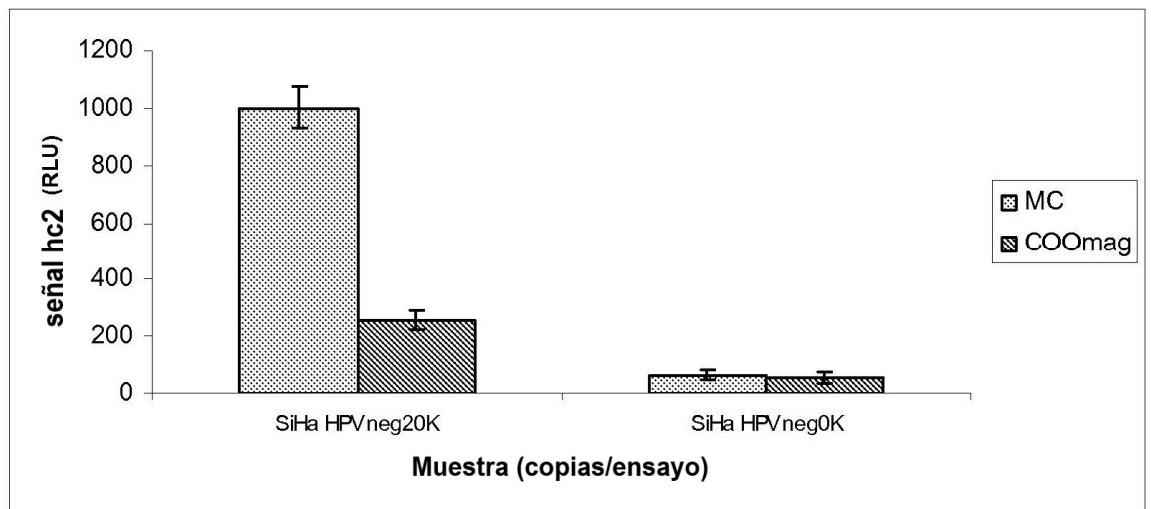


Fig. 5B

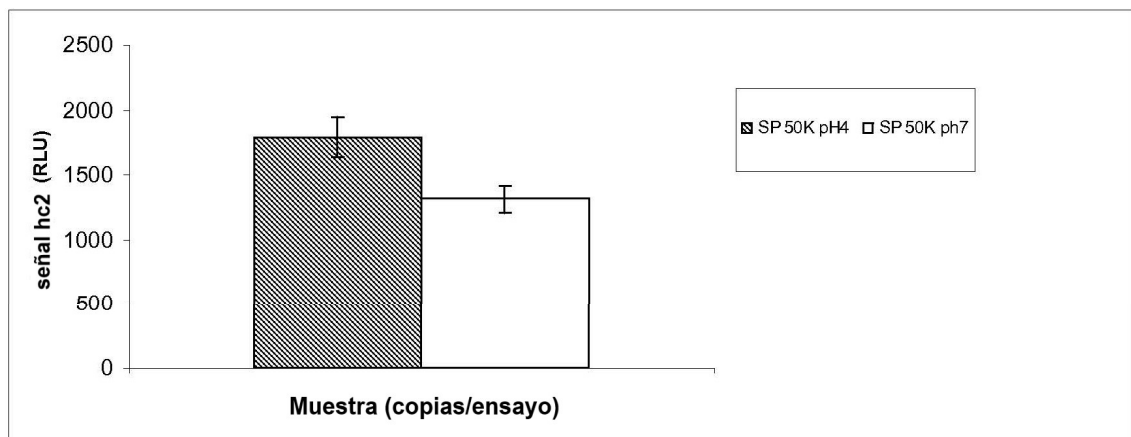


Fig. 6

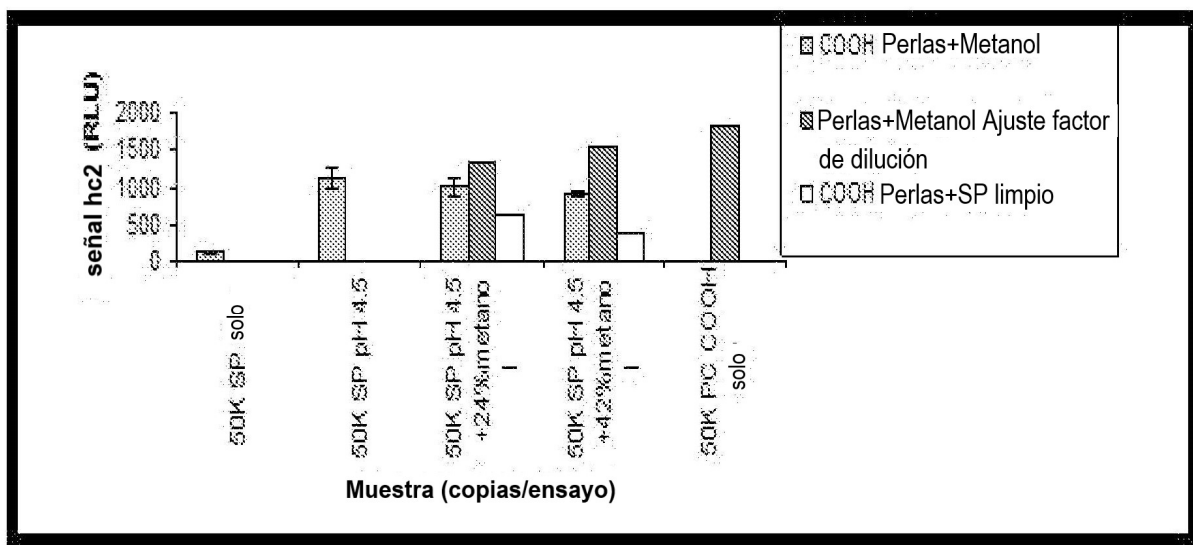


Fig. 7

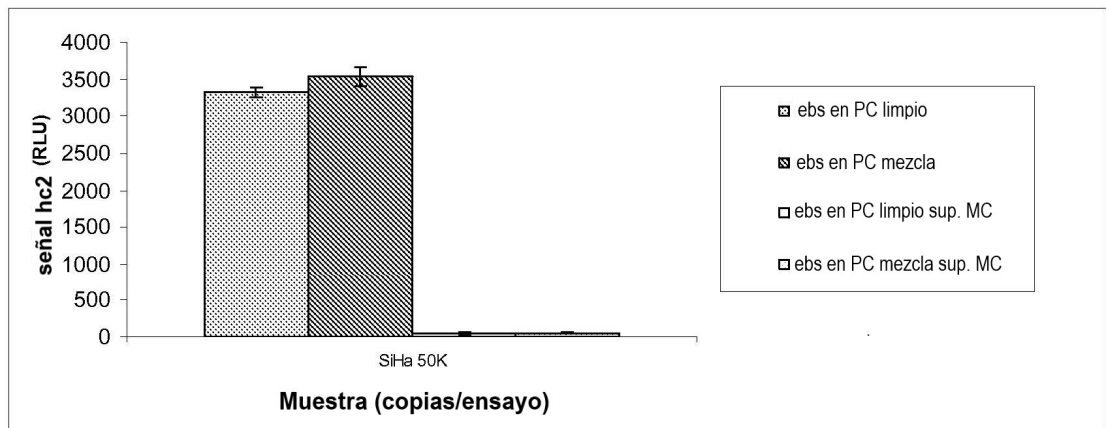


Fig. 8

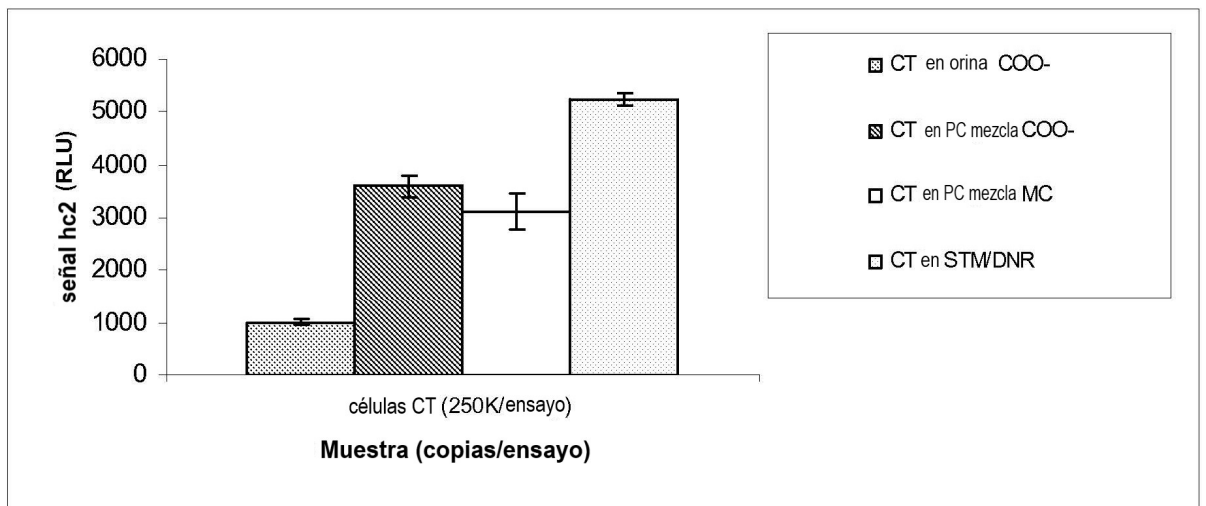


Fig. 9