

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 950 788**

51 Int. Cl.:

C07H 1/08 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2009** **E 19210595 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2023** **EP 3650454**

54 Título: **Procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

30.05.2008 EP 08009941

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.10.2023

73 Titular/es:

QIAGEN GMBH (100.0%)
Qiagen Straße 1
40724 Hilden, DE

72 Inventor/es:

RITT, CHRISTOPH;
HORLITZ, MARTIN DR. y
SPRENGER-HAUSSELS, MARKUS DR.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 950 788 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

Procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos

La presente invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos, que comprenden ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud de ≤ 500 pb, en donde los ácidos nucleicos son ADN extracelular.

El aislamiento de ácidos nucleicos, tales como ADN y ARN, a partir de materiales vegetales, animales o humanos, así como a partir de cultivos celulares o cultivos de virus tiene lugar, por norma general, de acuerdo con un modelo base unitario: los materiales de partida con contenido en ácidos nucleicos se disgregan primeramente - en parte utilizando enzimas degradantes de proteínas. En las siguientes etapas, los distintos componentes se pueden separar utilizando los más diversos métodos. Además de ello, los ácidos nucleicos pueden aislarse a partir de materiales de muestras en los que se presentan libres, es decir, no en células. Así, ácidos nucleicos libres pueden presentarse en mezclas de muestras artificiales, pero también, sin embargo, en muestras naturales, tales como, p. ej., la sangre. Ácidos nucleicos libremente circulantes de este tipo se denominan también ácidos nucleicos extracelulares.

La mayoría de los procedimientos para la purificación de los ácidos nucleicos, conocidos del estado de la técnica, se basan en uno de los dos principios de separación siguientes:

Los procedimientos clásicos se basan en un proceso de una etapa, en el que, después de la adición de un tampón, que en la mayoría de los casos contiene un caótropro, y después de la adición de un agente de extracción orgánico - la mayoría de las veces fenol y/o cloroformo - se lleva a cabo una extracción. Las sustancias acompañantes indeseadas se desechan con la fase orgánica. Los ácidos nucleicos que permanecen en la fase acuosa pueden separarse a continuación mediante una separación de fases y, con ello, aislarse. El inconveniente esencial de este modo de proceder consiste en que junto al uso de sustancias venenosas y perjudiciales para la salud, tales como fenol y/o cloroformo, permanecen en la solución acuosa de ácidos nucleicos sustancias hidrosolubles como impurificación las cuales tienen que ser separadas en otras etapas de purificación que requieren mucho tiempo.

A la vista de estos inconvenientes, en el estado de la técnica se ha impuesto, por lo tanto, un proceso alternativo que se basa en la adsorción selectiva de ácidos nucleicos a materiales de soporte sólidos, tales como, por ejemplo, dióxido de silicio. El material de partida con contenido en ácidos nucleicos es lisado en caso necesario y es puesto en contacto con el material de soporte bajo condiciones definidas, de modo que los ácidos nucleicos pueden unirse al material de soporte; eventualmente, se llevan a cabo etapas de lavado. Opcionalmente, a continuación, el ácido nucleico unido al soporte es eluido del material de soporte mediante un tampón adecuado.

Un procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos, adecuado para una pluralidad de diferentes aplicaciones, se da a conocer, por ejemplo, en el documento US 5.234.809 (Boom). Allí se describe un procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de materiales de partida con contenido en ácidos nucleicos mediante la incubación del material de partida con un tampón caotrópico y una fase sólida que une ADN. Los tampones caotrópicos realizan, en la medida en que sea necesario, tanto la lisis del material de partida como la unión de los ácidos nucleicos a la fase sólida. El procedimiento es bien adecuado para aislar ácidos nucleicos a partir de cantidades de muestra pequeñas. Un procedimiento basado en un principio similar se describe también en el documento WO 93/11221.

El documento EP 1 960 938 da a conocer un procedimiento en el que ácidos nucleicos se unen a una superficie de sílice en presencia de un compuesto caotrópico y/o de un alcohol ramificado o no ramificado. La inmovilización de los ácidos nucleicos tiene lugar a temperaturas elevadas. Se conocen otros métodos de purificación de ácidos nucleicos en Li et al, Clinical Chemistry 50:60 1002-1011 (2004), DE 20 2004 006 675 U1 y Niesters et al, 2000, Journal of Clinical Microbiology, Feb. 2000, p. 712-715. En la técnica anterior también se conocían kits comerciales para el aislamiento de ácidos nucleicos.

En el estado de la técnica se conocen muchos procedimientos para la purificación de ácidos nucleicos que se componen de la combinación de una fase sólida con un tampón caotrópico. Dado que en el caso de todos los procedimientos conocidos los ácidos nucleicos de cadena larga se unen al menos igual de bien, en la mayoría de los casos, sin embargo, esencialmente mejor a la fase sólida que los ácidos nucleicos de cadena corta (por ejemplo, con una longitud menor que 1000 pb, 500 pb o incluso 300 pb), los procedimientos del estado de la técnica no son adecuados para purificar de manera eficaz ácidos nucleicos de cadena corta o bien incluso concentrarlos con respecto a los ácidos nucleicos de cadena larga.

La mala idoneidad de purificar ácidos nucleicos de cadena corta se ha de atribuir presumiblemente a que los ácidos nucleicos de cadena corta se unen peor al material de soporte que los ácidos nucleicos de cadena larga (p. ej., ADN genómico). Por lo tanto, ácidos nucleicos de cadena corta se pierden en una gran parte en el caso de la mayoría de los procesos de purificación habituales y no se encuentran o están sub-representados entre los ácidos nucleicos purificados. Sin embargo, precisamente para determinadas aplicaciones se desea aislar ácidos nucleicos de cadena corta o bien concentrarlos con respecto a ácidos nucleicos de cadena larga.

Con el fin de concentrar preferiblemente ácidos nucleicos de cadena corta o bien separar ácidos nucleicos de cadena corta de ácidos nucleicos de cadena larga se emplearon ya diferentes principios en el estado de la técnica. El documento DE 10 2006 045 391 describe, por ejemplo, un procedimiento para la separación de ácidos nucleicos largos de ácidos nucleicos cortos, en el que la muestra es añadida varias veces a través de fases sólidas especialmente configuradas. Otro procedimiento se basa en el empleo de tampones de unión especiales que no contienen sales caotrópicas, sino sales del ácido cítrico, con el fin de unir así, en particular, ácidos nucleicos de cadena corta (documento WO 2007/065934).

La purificación/concentración de ácidos nucleicos de cadena corta (ARN y ADN) es de una importancia fundamental para diferentes sectores de aplicación. Un sector en el que ácidos nucleicos de cadena corta juegan un papel fundamental es el diagnóstico prenatal. Junto al ADN libremente circulante propio, en la sangre de mujeres embarazadas se encuentra adicionalmente también ADN libremente circulante del feto. Se admite que el ADN fetal que circula libremente en la sangre de mujeres embarazadas se diferencia en su tamaño del ADN libremente circulante de la madre. Mientras que el ADN libremente circulante materno posee a menudo una longitud media superior a 500 pb, una parte predominante del ADN libremente circulante fetal es claramente menor y posee, por término medio, una longitud inferior a 500 pb. Esta diferencia de tamaño entre los ácidos nucleicos fetales y los maternos podría aprovecharse con el fin de concentrar y, con ello, poder examinar mejor el ADN fetal, en la medida en que estuvieran a disposición métodos de purificación adecuados. El aprovechamiento del ADN libremente circulante de origen fetal para el diagnóstico prenatal tendría la ventaja de que frente a métodos clásicos, tales como la amniocentesis o la biopsia corial, no sería peligrosa para el feto y, por lo tanto, albergaría menos riesgos. Sin embargo, las cantidades de ADN libremente circulante de origen fetal en la sangre son muy pequeñas. En función del estadio del embarazo, en 1 ml de sangre se encuentran entre 20 y 260 copias de ADN fetal. Con ello, la concentración de ADN fetal libremente circulante es ciertamente baja, pero sigue siendo todavía mayor que la concentración de células fetales libremente circulantes. Además, existe el problema de que la concentración del ADN fetal libremente circulante es extremadamente baja en comparación con el ADN materno libremente circulante, de modo que en el caso del aislamiento global de ADN libremente circulante a partir de sangre materna solo una fracción de la sustancia hereditaria procede del feto; la parte predominante de la sustancia hereditaria aislada procede de la madre. Debido al elevado fondo de ADN materno, en muchos casos se dificulta la detección de segmentos de gen del feto, en algunos casos la sensibilidad incluso de métodos de detección tan sensibles tales como la PCR en tiempo real no es suficiente como para poder detectar el ADN fetal.

Los métodos empleados hasta ahora para el aislamiento de ADN libremente circulante a partir de la sangre materna purifican a menudo en igual medida el ADN fetal que el ADN materno, de modo que se mantiene la relación desfavorable de ADN fetal a materno - el ADN fetal supone solo una fracción del ADN global. Hasta ahora no tiene lugar una concentración de ADN fetal frente al ADN materno. Además, los ácidos nucleicos fetales se purifican incluso regularmente peor, dado que los ácidos nucleicos de cadena corta son detectados a menudo peor durante la purificación. Dado que son detectados peor durante la purificación, en la muestra a purificar se presentan entonces comparativamente en menor concentración que en la muestra de partida. Una purificación eficiente o incluso una concentración específica de los ácidos nucleicos extracelulares de cadena corta, tales como, p. ej., el ADN fetal, sería sin embargo ventajoso, ya que con ello se aumentaría esencialmente la sensibilidad y, con ello, la fiabilidad de un diagnóstico prenatal que se basa en un ADN fetal libremente circulante.

Por lo tanto, la presente invención tiene por misión proporcionar un procedimiento para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos con el que se puedan aislar/purificar ácidos nucleicos extracelulares y, en particular, también ácidos nucleicos de cadena corta. Además, es misión de la invención proporcionar un procedimiento para el aislamiento de ADN fetal a partir de sangre materna que permita un aislamiento y/o una concentración efectiva del ADN fetal.

El problema se resuelve en este caso mediante un procedimiento para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos extracelulares de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 17. Además, la presente invención se refiere al uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 18.

La presente invención se define mediante las reivindicaciones. La reivindicación 1 se refiere a un procedimiento para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos que comprenden ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud de ≤ 500 pb, a partir de un material de partida con contenido en ácidos nucleicos, caracterizado por las siguientes etapas de procedimiento:

(a) unión de los ácidos nucleicos a un material de soporte que une ácidos nucleicos, en el que el material de partida se pone en contacto, en presencia de al menos un compuesto caotrópico e alcoholes de isopropanol, con el material de soporte que une ácidos nucleicos, en donde el alcohol se presenta en una concentración ≥ 15 % (v/v) y preferiblemente ≤ 32 % (v/v);

(b) opcional elución de los ácidos nucleicos unidos del material de soporte que une ácidos nucleicos,

en el que

- el material de partida con contenido en ácidos nucleicos es un líquido corporal seleccionado entre plasma, suero, orina y fluido cerebral;
- los ácidos nucleicos son ADN extracelular.

De acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención conforme a la reivindicación 1, la inmovilización de los ácidos nucleicos para asilar el material de soporte se efectúa bajo condiciones de reacción específicas. Decisivos para la unión efectiva de los ácidos nucleicos de cadena corta al material de soporte son dos componentes, a saber, al menos un compuesto caotrópico, así como un alcohol ramificado y/o no ramificado, en donde en el caso del alcohol se trata de isopropanol. Particularmente importante es, de acuerdo con la invención, la elección correcta de la concentración de alcohol que en la mezcla de muestras durante la unión al material de soporte es ≥ 15 , en particular $\geq 19\%$ (v/v). Se ha demostrado que, en el caso de la elección de la concentración correcta de alcohol, los ácidos nucleicos de cadena corta se unen muy bien al material de soporte. Una concentración de alcohol más baja puede ser compensada en cierta medida mediante un aumento de la concentración de sustancias caotrópicas. Por lo tanto, existe una interacción entre la concentración de alcohol y la concentración de compuestos caotrópicos, a la que se abordará todavía en lo que sigue. El ajuste de acuerdo con la invención de la concentración del alcohol determina que, en particular ácidos nucleicos de cadena corta sean unidos de manera eficiente y, con ello, detectados durante la purificación.

De acuerdo con una forma de realización, la concentración de alcohol se encuentra en un intervalo de aprox. 19 a 32% (v/v), dado que en este intervalo pueden unirse particularmente bien y, con ello, aislarse ácidos nucleicos de cadena corta y, en particular, ADN. Se da a conocer, además, que en función del ajuste preciso de las condiciones de unión puede tener lugar de esta forma también una concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta frente a los ácidos nucleicos de cadena larga. Este efecto de concentración se alcanza, en particular, en el caso de una concentración de alcohol entre 25 a 32% (v/v) y 28 a 32% (v/v). En el caso de estas condiciones, los ácidos nucleicos de cadena corta se unen mejor y, con ello, preferiblemente al material de soporte que los ácidos nucleicos de cadena larga, como también lo demuestran los ejemplos. También la concentración de compuestos caotrópicos influye sobre la unión de los ácidos nucleicos. En el caso de la elección de una concentración elevada de compuestos caotrópicos pueden emplearse también menores concentraciones de alcohol.

De acuerdo con una realización preferida, que es particularmente adecuada para el aislamiento/la purificación efectiva de ácidos nucleicos extracelulares a partir de la muestra biológica reivindicada, la concentración de alcohol en la etapa (a) se encuentra en un intervalo de $\geq 15\%$ y $\leq 25\%$ (v/v). En la etapa (a) el alcohol puede estar presente en la mezcla, p. ej., en una concentración de aprox. 18 a 20% (v/v). De acuerdo con la reivindicación 1, el alcohol es isopropanol. Ensayos han demostrado que también en el caso de estas bajas concentraciones de alcohol pueden ser purificados de manera eficiente ácidos nucleicos de diferente longitud y también ácidos nucleicos de cadena corta y, con ello, se abarca de manera efectiva un amplio espectro de tamaños. Con el fin de garantizar una buena detección de los ácidos nucleicos de cadena corta, el compuesto caotrópico en la etapa (a) debería estar presente en una concentración suficientemente elevada. La concentración del compuesto caotrópico en la etapa (a) se encuentra, por lo tanto, en ≥ 2 mol/l. La concentración de compuesto caotrópico que debe emplearse de manera concreta, con el fin de unir de manera efectiva también a los ácidos nucleicos de cadena corta, depende del poder del compuesto caotrópico empleado. Así, en el caso del empleo de un compuesto caotrópico débil, tal como, p. ej., hidrocloreuro de guanidinio, se requiere una concentración mayor que en el caso del empleo de un compuesto caotrópico más fuerte, tal como, p. ej., tiocianato de guanidinio. Compuestos fuertemente caotrópicos adecuados que fomentan la unión de los ácidos nucleicos de cadena corta, también en el caso de bajas concentraciones de alcohol, pueden elegirse a base de la denominada serie de Hofmeister. De acuerdo con ella, aniones fuertemente caotrópicos son NO_3^- , ClO_4^- , SCN^- y Cl_3CCOO^- . Cationes fuertemente caotrópicos son, p. ej., Ba^{2+} y guanidinio. Preferiblemente, como compuestos caotrópicos se emplean tiocianatos, isotiocianatos y/o percloratos, en particular tiocianato de guanidinio o isotiocianato de guanidinio. Estos compuestos fuertemente caotrópicos se emplean preferiblemente en combinación con bajas concentraciones de alcohol de $\leq 25\%$ (v/v). Concentraciones adecuadas se encuentran en $\geq 2,0$ mol/l y $\leq 3,1$ mol/l.

Opcionalmente, pueden llevarse a cabo etapas de lavado. Los ácidos nucleicos unidos al material de soporte son separados entonces del material de soporte, p. ej., son eluidos de manera en sí conocida, en la medida en que se desee una obtención de los ácidos nucleicos de cadena corta. Los ácidos nucleicos aislados/concentrados de acuerdo con la invención pueden continuar elaborándose entonces de manera conocida, es decir, p. ej., pueden analizarse. En función del tratamiento ulterior subsiguiente planeado o del análisis es sin embargo asimismo posible emplear los ácidos nucleicos unidos al material de soporte y, con ello, sin elución. Además, el procedimiento puede emplearse para separar los ácidos nucleicos de una muestra.

El procedimiento de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo como procedimiento de 1 etapa. La ventaja de un procedimiento de 1 etapa estriba en que, por norma general, se alcanza un rendimiento mayor de ácidos nucleicos (en conjunto); los ácidos nucleicos se pierden durante la purificación solamente en una pequeña medida. Dado que con el procedimiento de acuerdo con la invención en la variante de 1 etapa los ácidos nucleicos de cadena corta se unen de manera eficaz al material de soporte y, con ello, se pueden aislar/concentrar, el aislamiento/la concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta, realizado de esta manera, es ya suficiente para muchas aplicaciones. Un procedimiento de 1 etapa es también particularmente agradable para el usuario, ya

que puede ser llevado a cabo de manera rápida y sencilla. Como lo confirman los ensayos comparativos mostrados en los Ejemplos, el procedimiento de 1 etapa de acuerdo con la invención para el aislamiento de ácidos nucleicos de cadena corta es claramente superior a los procedimientos conocidos del estado de la técnica, dado que con el procedimiento de acuerdo con la invención se puede alcanzar un aislamiento efectivo de ácidos nucleicos de cadena corta con un buen rendimiento y en parte incluso también una concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta con respecto a los ácidos nucleicos de cadena larga. El procedimiento de 1 etapa se adecua particularmente para la purificación efectiva de ácidos nucleicos extracelulares a partir de un líquido corporal reivindicado, tal como, en particular, plasma o suero, en el que de acuerdo con la reivindicación 1 el ácido nucleico que comprende ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud ≤ 500 pb es ADN extracelular..

Para determinadas aplicaciones es ventajoso alcanzar una concentración lo más eficiente posible de los ácidos nucleicos de cadena corta con respecto a los ácidos nucleicos de cadena larga; los ácidos nucleicos de cadena corta deben obtenerse sin o bien con un fondo lo menor posible de ácidos nucleicos de cadena larga. En este caso, es deseable purificar conjuntamente los menos ácidos nucleicos de cadena larga posibles. Con el fin de conseguir esto de manera particularmente efectiva, conforme a un procedimiento divulgado, a las propias etapas de aislamiento a) y, opcionalmente, b) para la separación/elución de los ácidos nucleicos de cadena corta, se antepone una etapa (x), mediante la cual se alcanza un empobrecimiento eficaz de los ácidos nucleicos de cadena larga. Mediante el empobrecimiento previo de los ácidos nucleicos de cadena larga pueden obtenerse de una forma particularmente pura ácidos nucleicos de cadena corta. Por lo tanto, se da a conocer, además, un procedimiento para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos de cadena corta a partir de un material de partida con contenido en ácidos nucleicos que presenta las siguientes etapas de procedimiento de acuerdo con la invención:

(x) unión de ácidos nucleicos a un material de soporte que une ácidos nucleicos, al poner en contacto el material de partida, en presencia de al menos un compuesto caotrópico y al menos un alcohol ramificado y/o no ramificado con el material de soporte que une ácidos nucleicos, presentándose el alcohol en una concentración de $\leq 25\%$ (v/v);

(a) unión del material roto/material sobrenadante de la etapa (x) a un material de soporte que une ácidos nucleicos, al poner en contacto el material roto/material sobrenadante de la etapa (x), en presencia de al menos un compuesto caotrópico y al menos un alcohol ramificado y/o no ramificado con el material de soporte que une ácidos nucleicos, en donde el alcohol está presente en una concentración de $\geq 5\%$ (v/v) y preferiblemente $\leq 40\%$ (v/v), preferiblemente $\leq 35\%$ (v/v) y más preferiblemente $\leq 32\%$ (v/v);

(b) opcional elución de los ácidos nucleicos unidos del material de soporte que une ácidos nucleicos.

De acuerdo con este procedimiento de 2 etapas divulgado, a las etapas de aislamiento a) y b) propiamente dichas para el aislamiento/la purificación de los ácidos nucleicos de cadena corta está antepuesta la etapa (x), mediante la cual se consigue un empobrecimiento eficiente de los ácidos nucleicos de cadena larga. En la etapa de unión (x) tiene lugar la unión de los ácidos nucleicos al material de soporte en presencia de compuestos caotrópicos y un alcohol ramificado y/o no ramificado. Decisivo para el empobrecimiento eficiente de los ácidos nucleicos de cadena larga son de nuevo las condiciones de unión y, en particular, la concentración del alcohol presente durante la unión en la muestra global. La concentración de alcohol es en la etapa (x) $\leq 30\%$ (v/v) y es preferiblemente incluso $\leq 25\%$ (v/v). Se ha demostrado, sorprendentemente, que una concentración de alcohol en torno al 25% (v/v) puede conllevar una inversión de la selectividad del tamaño. Por debajo de 25% (v/v), preferiblemente por debajo de 20% (v/v) se unen preferiblemente ácidos nucleicos de cadena larga o bien de cadena más larga al material de soporte, en la medida en que se elija de manera correspondiente la concentración de compuestos caotrópicos (véase más adelante). Los ácidos nucleicos de cadena corta no se unen en el caso de estas condiciones o bien lo hacen peor al material de soporte y, por lo tanto, se encuentran en el material roto/material sobrenadante (en función del material de soporte empleado). A partir del material roto/material sobrenadante de la etapa (x) que contiene en particular los ácidos nucleicos de cadena corta se aíslan y, con ello, se concentran entonces en las etapas a) y, opcionalmente, b) subsiguientes los ácidos nucleicos de cadena corta.

De acuerdo con una forma de realización, las etapas a) y b) del procedimiento de 1 etapa (véase arriba) son muy similares o bien son casi idénticas a las etapas a) y b) del procedimiento de 2 etapas. En el caso del procedimiento de 2 etapas se emplea en última instancia, en lugar del material de partida con contenido en ácidos nucleicos, el material roto/material sobrenadante de la etapa (x). Por lo tanto, para las etapas a) y b) del procedimiento de 2 etapas son válidas las mismas condiciones preferidas a las descritas en relación con el procedimiento de 1 etapa. Mediante la etapa (x) antepuesta tiene lugar, en última instancia, adicionalmente un empobrecimiento de los ácidos nucleicos de cadena larga, de modo que estos se encuentran al menos en pequeña cantidad en el material roto/material sobrenadante. En la medida en que se desee, en el caso del procedimiento de 2 etapas, los ácidos nucleicos de cadena larga pueden eluirse asimismo del material de soporte unido en la etapa (x) y pueden continuar utilizándose para otros fines.

Como ya se ha indicado, el tipo y la concentración del compuesto caotrópico tiene influencia sobre la unión de los ácidos nucleicos y, en particular, sobre la eficiencia de la unión de los ácidos nucleicos de cadena corta. En la medida en que la concentración de alcohol sea, por lo tanto, igual o casi igual en la etapa (x) antepuesta y en la etapa (a) subsiguiente, en la etapa (x) se emplea una concentración menor de compuestos caotrópicos y/o un

compuesto caotrópico más débil que en la etapa (a). Con ello se puede alcanzar de nuevo un empobrecimiento de los ácidos nucleicos de cadena larga y, con ello, una concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta. Un ejemplo adecuado para un compuesto caotrópico más débil que se puede emplear en la etapa (x) es, p. ej., hidrocloreuro de guanidinio.

De acuerdo con la presente divulgación, pueden pasar a emplearse diferentes materiales y, en particular, materiales biológicos como materiales de partida con contenido en ácidos nucleicos. A ellos pertenecen, p. ej., virus, fagos y células, tales como, p. ej., bacterias, pero también células humanas, animales o vegetales. Junto a ello, el procedimiento se adecúa, sin embargo, también en particular para el aislamiento/la purificación de ácidos nucleicos libres a partir de muestras sin contenido en células, o muestras correspondientemente elaboradas. En particular, el procedimiento divulgado se adecua, p. ej., para el aislamiento de ácidos nucleicos tales como ADN y/o ARN a partir de materiales de muestra de origen humano o animal, en particular muestras clínicas, tales como sangre, plasma, suero, colutorio, orina, líquido cerebral, esputo, heces, materiales corporales obtenidos mediante punción, frotis epiteliales, biopsias y otros tejidos o muestras de la médula ósea. De acuerdo con la reivindicación 1, el procedimiento de acuerdo con la invención es un procedimiento para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos que comprenden ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud ≤ 500 pb procedentes de un fluido corporal como material de partida que contiene ácidos nucleicos, en el que los ácidos nucleicos extracelulares son ADN extracelular y el fluido corporal se selecciona entre plasma, suero, orina y fluido cerebral. En particular, el procedimiento de acuerdo con la invención es adecuado para el aislamiento de ADN fetal a partir de muestras de plasma sanguíneo materno. Asimismo, el procedimiento de acuerdo con la invención es adecuado particularmente para el aislamiento de ácidos nucleicos libremente circulantes, tales como, por ejemplo, ADN tumoral a partir de, en particular, plasma y/o suero.

En determinados casos, la muestra puede ser empleada en el procedimiento de acuerdo con la invención sin un tratamiento previo. En muchos casos, la muestra debe ser, sin embargo, disgregada primeramente mediante un método adecuado y el material biológico contenido en la muestra debe ser liberado. Procedimientos para la disgregación de muestras y células son conocidos por el experto en la materia y pueden ser de naturaleza química, enzimática o física. También es posible una combinación de estos procedimientos.

En este caso, pueden manifestarse ventajosos diferentes factores para distintos materiales biológicos; en principio son bien adecuados los siguientes métodos: lisis con ayuda de detergentes iónicos y no iónicos, tales como, p. ej., SDS, LiDS o Sarkosyl en tampones adecuados, el empleo de sales caotrópicas, tales como, por ejemplo, hidrocloreuro de guanidinio (GHCL), tiocianato de guanidinio (GTC), isotiocianato de guanidinio (GITC), yoduro de sodio, perclorato de sodio, y otras; desgarre mecánico, tal como, p. ej., mediante una prensa French, ultrasonidos, molienda con esferas de vidrio, esferas de níquel, aluminio o en nitrógeno líquido; lisis enzimática, por ejemplo con lisozima, proteinasas, proteinasa K o celulasas, o mediante otras enzimas adquiribles en el comercio para la lisis; lisis de las células mediante bacteriófagos o infecciones por virus; liofilización; choque osmótico; tratamiento con microondas; tratamiento térmico; por ejemplo calentamiento o ebullición o congelación, p. ej., en hielo seco o nitrógeno líquido y descongelación; lisis alcalina.

Como se ha indicado, los procedimientos precedentes representan el estado de la técnica para la lisis que ya son ampliamente conocidos y, por lo tanto, no tienen que explicarse en detalle.

En el caso de la purificación de ácidos nucleicos libremente circulantes, tales como, p. ej., a partir de una muestra de sangre, tal como, p. ej., para la purificación de ADN fetal a partir de una muestra materna, las células y otros componentes sólidos se separan primeramente de la sangre (p. ej., mediante centrifugación) y el plasma así obtenido se continúa elaborando. El plasma está habitualmente exento de células y contiene el ácido nucleico libremente circulante o bien ADN materno y fetal. En el caso de la purificación de ácidos nucleicos libres a partir del plasma no se requiere una lisis celular propiamente dicha con el fin de liberar los ácidos nucleicos, dado que estos ya están presentes en forma libremente circulante. Esto es válido también para otras muestras en las que los ácidos nucleicos se presentan libres y, de manera correspondiente, no se encuentran en células. Sin embargo, los ácidos nucleicos libremente circulantes pueden presentarse formando complejos con proteínas y/u otras sustancias. Por este motivo, el material de partida con contenido en ácidos nucleicos, por ejemplo, el plasma sanguíneo, se trata primeramente con un tampón de liberación que garantiza que los ácidos nucleicos sean liberados a partir de la forma complejada. El tampón de liberación es similar en su función y composición a un tampón de lisis que se emplea para la disgregación de las células; mediante el tampón de liberación se generan en la muestra condiciones adecuadas para la liberación de los ácidos nucleicos, de modo que estos no se presentan de forma complejada. Mediante la adición del tampón de liberación, el ácido nucleico es mejor accesible para la purificación. El procedimiento de acuerdo con la invención puede emplearse de manera correspondiente también en el caso de materiales de partida exentos de células. El correspondiente tampón de liberación puede actuar, en función de la composición, también como tampón de lisis con el fin de purificar o bien concentrar de manera efectiva ácidos nucleicos. Por norma general, los tampones de lisis habituales pueden emplearse también como tampón de liberación.

De acuerdo con la invención, el empleo de tampones de liberación o bien de lisis con contenido en caótropos es particularmente efectivo. Esto particularmente debido a que también la composición del tampón de liberación o bien de lisis influye sobre las condiciones bajo las cuales se unen los ácidos nucleicos al material de soporte. Las condiciones de unión en la muestra, que son decisivas de acuerdo con la invención para la efectividad del

procedimiento de acuerdo con la invención, pueden ajustarse por lo tanto también mediante la elección adecuada del tampón de liberación o bien de lisis, p. ej., en combinación con un tampón de unión. Tampones de liberación o bien de lisis de acuerdo con la presente invención contienen un compuesto caotrópico, tal como, p. ej., GTC o GHCL y, eventualmente, un detergente, tal como, p. ej., SDS o Tween. Estos agentes pueden presentarse en solución acuosa o en una solución tampón, es decir, como los denominados tampones de liberación o de lisis. Como tampón puede emplearse cualquier tampón adecuado, tal como, por ejemplo, tampón Tris, bicina, tricina o fosfato. Alternativamente, el agente de lisis o bien de liberación puede añadirse también por separado. Concentraciones y cantidades adecuadas de los agentes de lisis o bien de liberación varían en función de los sistemas correspondientes, el tipo de células, etc., y pueden determinarse por el experto en la materia. Para aplicaciones específicas, se han acreditado, por ejemplo, concentraciones en el intervalo de 2 a 7 M de compuestos caotrópicos, tales como, p. ej., GTC, GHCL o NaI o perclorato de sodio, agentes alcalinos 0,1 M a 1 M, tales como, p. ej., NaOH, así como detergentes al 0,1 a 50 % en peso (p/v), tales como, en particular, detergentes no iónico, tales como, por ejemplo Tween.

Compuestos caotrópicos están también presentes en la mezcla de muestras durante la unión de los ácidos nucleicos al material de soporte. Los compuestos caotrópicos pueden proceder, p. ej., del tampón de lisis o bien de liberación y/o ser añadidos, sin embargo, por separado, p. ej., en forma de un tampón de unión. Decisivas son, en última instancia, las condiciones de unión en la muestra durante la unión de los ácidos nucleicos al material de soporte. Aquí, el compuesto caotrópico puede presentarse en última instancia hasta el límite de solubilidad. El empleo de compuestos caotrópicos es ventajoso para la unión eficiente del ácido nucleico. La concentración de los compuestos caotrópicos en la muestra se encuentra durante la unión preferiblemente en un intervalo de 1 a 10 mol/l, de manera particularmente preferida en 2 a 6 mol/l. Compuestos adecuados son, por ejemplo, yoduro de sodio, perclorato de sodio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio e hidrocloreto de guanidinio. La interacción de la concentración y el tipo del compuesto caotrópico empleado y de la concentración de alcohol en el caso del ajuste de las condiciones de unión ya se discutieron arriba en detalle. Se remite a la divulgación anterior.

Además, la muestra puede presentar durante la unión detergentes, tales como, p. ej., detergentes no iónicos y, en particular, Tween. Los detergentes pueden añadirse con el tampón de liberación/lisis, o pueden ser componente del tampón de unión. Los detergentes determinan una solubilización eficiente de diferentes componentes en la muestra, así, p. ej., de componentes del suero y del plasma. Con ello, se puede impedir una obstrucción del material de soporte que une ácidos nucleicos. Esto es particularmente ventajoso en el caso del empleo de una membrana de sílice.

Como se ha expuesto, es decisiva la concentración del alcohol en la muestra durante la unión de los ácidos nucleicos al material de soporte en el caso del procedimiento de acuerdo con la invención. De acuerdo con las reivindicaciones, para la unión se emplea isopropanol como alcohol. Se dan a conocer, además, alcoholes de cadena corta, ramificados o no ramificados, con uno a cinco átomos de carbono, tales como, p. ej., metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanoles o pentanoles. Se da a conocer, además, el empleo de mezclas de los correspondientes alcoholes. Como particularmente preferido se da a conocer isopropanol o un alcohol o bien mezcla de alcoholes con propiedades similares al isopropanol. En función de la etapa de unión (etapa de unión (x) para el empobrecimiento de los ácidos nucleicos de cadena larga o etapa de unión a) para la unión de los ácidos nucleicos de cadena corta) varía la concentración del alcohol.

En la medida en que en una etapa previa (x) se empobrezcan los ácidos nucleicos de cadena larga, pasan a emplearse concentraciones de alcohol que fomentan la unión de los ácidos nucleicos de cadena larga al material de soporte, con el fin de poder separar con ello a estos de la muestra. La interacción de la concentración en el compuesto caotrópico y la concentración del alcohol se discutió ya arriba en detalle. Se remite a la divulgación anterior. El material roto o bien el material sobrenadante contiene los ácidos nucleicos de cadena corta deseados en virtud del empobrecimiento en una mayor proporción.

En la etapa a) del procedimiento de 2 etapas divulgado se emplea una concentración de alcohol elevada para la unión preferida de los ácidos nucleicos de cadena corta. Para una mejor unión de los ácidos nucleicos de cadena corta, la concentración de alcohol en la muestra durante la unión es preferiblemente $\geq 15\%$ (v/v), $\geq 19\%$ (v/v) y, en particular, está en un intervalo de aprox. 19 a 36%. En el caso de concentraciones por encima de aprox. 25% (v/v) se comprobó incluso que ácidos nucleicos de cadena corta podían ser concentrados frente a ácidos nucleicos de cadena larga, en particular en el caso de un empobrecimiento previo de los ácidos nucleicos. Esto es válido particularmente en el caso del ajuste de la concentración a compuestos caotrópicos; concentraciones adecuadas se describen arriba. Se da a conocer, además, que en el caso del empleo de concentraciones elevadas de alcohol de $\geq 25\%$ (v/v) en la etapa (a) se emplean compuestos caotrópicos más débiles, tales como, p. ej., hidrocloreto de guanidinio, o concentraciones menores de un compuesto caotrópico más fuerte. En el caso del empleo de una concentración menor de alcohol de $\leq 25\%$ (v/v) en la etapa (a) se emplea de manera correspondiente una concentración elevada de compuestos caotrópicos, o bien un compuesto caotrópico más fuerte, tal como isotiocianato de guanidinio o tiocianato de guanidinio. Este resultado es particularmente ventajoso para la purificación de ácidos nucleicos extracelulares, tales como, p. ej., ADN fetal, tales como, p. ej., plasma sanguíneo materno, es beneficioso, dado que las muestras suelen ser contienen normalmente de manera predominante ácidos nucleicos de cadena larga. Con el procedimiento de acuerdo con la invención se puede alcanzar, por lo tanto, incluso una purificación más efectiva e incluso una concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta.

De acuerdo con una realización, la mezcla de muestras contiene, durante la unión de los ácidos nucleicos al material de soporte para la unión preferida de los ácidos nucleicos de cadena corta, aprox. 30% (v/v) de alcohol. Con ello se dispone de un procedimiento efectivo para la concentración de ácidos nucleicos de cadena corta, que alcanza una concentración > 2 veces, > 5 veces o incluso más de 10 veces de los ácidos nucleicos de cadena corta. En general, el potencial de concentración del procedimiento puede determinarse mediante comparación de los rendimientos de un fragmento de ácido nucleico de 200 pb de longitud y de un fragmento de ácido nucleico de 1000 pb de longitud. Así pues, el método de acuerdo con la invención también es claramente superior a los métodos del arte previo.

De acuerdo con una forma de realización, en la etapa (a) el alcohol está presente en la mezcla de muestras en una concentración que se elige del grupo

- $\geq 19\%$ (v/v);
- $\geq 25\%$ (v/v);
- ≥ 15 a $\leq 25\%$ (v/v).
- ≥ 25 a $\leq 32\%$ (v/v);
- ≥ 28 a $\leq 32\%$ (v/v).

De acuerdo con la reivindicación 1, el alcohol es isopropanol.

En el caso del procedimiento de 2 etapas divulgado, en el que en la etapa (x) tiene lugar un empobrecimiento de los ácidos nucleicos de cadena larga, la concentración de los compuestos caotrópicos en la etapa (a) es $\geq$ a la concentración de compuestos caotrópicos en la etapa (x). Se alcanzan resultados claramente mejores cuando la concentración de los compuestos caotrópicos durante la transición de la etapa (x) del procedimiento a la etapa (a) del procedimiento no se reduce, sino que se aumenta la concentración de alcohol. Preferiblemente, en la etapa (a) de aislamiento propiamente dicha se emplea incluso una concentración mayor de compuestos caotrópicos, así como una concentración mayor de alcohol que en la etapa (x) con el fin de fomentar la unión de los ácidos nucleicos de cadena corta al material de soporte.

De acuerdo con una forma de realización, el procedimiento divulgado presenta al menos una de las siguientes características:

- que la concentración de los compuestos caotrópicos en la mezcla en la etapa (x) y/o la etapa (a) es ≥ 1 mol/l hasta el límite de solubilidad; y/o
- que la concentración de los compuestos caotrópicos en la mezcla en la etapa (x) y/o la etapa (a) es ≥ 2 mol/l, $\geq 2,4$ mol/l o $\geq 2,6$ mol/l; y/o
- que la concentración de los compuestos caotrópicos en la etapa (a) es $\geq$ a la concentración de los compuestos caotrópicos en la etapa (x); y/o
- que el material de partida con contenido en ácido nucleico es tratado previamente con un tampón de lisis; y/o
- que el material de partida con contenido en ácido nucleico no contiene células y no se lleva a cabo una lisis celular; y/o
- que el material de partida con contenido en ácido nucleico es tratado previamente con un tampón de liberación y/o
- que no se lleva a cabo una extracción con fenol; y/o
- que los ácidos nucleicos aislados son tratados con DNasa; y/o
- que al menos el 30% de ácidos nucleicos de cadena corta se pueden aislar mediante el procedimiento; y/o
- que al menos el 50% de ácidos nucleicos de cadena corta se pueden aislar mediante el procedimiento; y/o
- que al menos el 60 % de ácidos nucleicos de cadena corta se puede aislar mediante el procedimiento; y/o
- que se alcanza una concentración de al menos 2 veces de los ácidos nucleicos de cadena corta; y/o
- que se alcanza una concentración de al menos 5 veces de los ácidos nucleicos de cadena corta; y/o
- que se alcanza una concentración de al menos 10 veces de los ácidos nucleicos de cadena corta; y/o
- que se aíslan y/o concentran ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud que se elige del grupo de los ácidos nucleicos con una longitud de ≤ 500 pb, ≤ 400 pb y/o ≤ 300 pb y/o ≥ 50 pb y/o ≥ 100 pb; y/o

- se aíslan ácidos nucleicos extracelulares.

El material de soporte que une ácidos nucleicos es preferiblemente una fase sólida que une ácidos nucleicos del grupo de los materiales con contenido en sílice, gel de sílice, dióxido de silicio, vidrio, zeolita, óxido de aluminio, dióxido de titanio, dióxido de zirconio, caolín, gel de sílice, material cerámico o materiales de soporte poliméricos, así como bolitas de poliestireno. En última instancia, es decisivo que el material de soporte esté en condiciones de unir ácidos nucleicos. De manera particularmente preferida se emplean materiales de sílice. Aquí se ha acreditado tanto el empleo de membranas de sílice como de partículas magnéticas que presentan una superficie de sílice o de vidrio. Éstas pueden ser esencialmente en forma de perla o esfera y presentan preferiblemente un tamaño de partícula en el intervalo de 0,02-30 μm , preferiblemente de 0,05-15 μm , de manera particularmente preferida de 0,1-10 μm . Partículas de sílice magnéticas que pueden emplearse de manera ventajosa en el procedimiento de acuerdo con la invención se describen, p. ej., en la solicitud de patente internacional WO 01/71732, a la que con ello se hace referencia en todo su contenido.

Después de la incubación de la matriz de soporte con el material con contenido en ácido nucleico tal como se reivindica, tiene lugar la separación de ácidos nucleicos del líquido de la muestra restante. Esto se alcanza, en general, mediante la separación de los ácidos nucleicos unidos de acuerdo con la invención a las partículas - en el caso de utilizar partículas de sílice magnéticas con ayuda de un campo magnético - . Por ejemplo, las partículas magnéticas pueden ser atraídas a la pared del recipiente en el que ha tenido lugar la incubación. Después de ello, el líquido puede separarse con las sustancias constitutivas de la muestra que no se han unido a las partículas magnéticas. En la etapa (x) se continuaría elaborando el material sobrenadante (los ácidos nucleicos de cadena larga están unidos a las partículas magnéticas); en la etapa a), los ácidos nucleicos de cadena corta se unen a las partículas magnéticas y en la etapa b) se eluyen, eventualmente después de etapas de lavado, opcionalmente de las partículas. La elaboración depende del tipo de recipiente en el que ha tenido lugar la incubación. Etapas del procedimiento adecuadas para la separación del líquido son, p. ej., separación por decantación, separación por pipeteado, separación por filtración o filtración con succión del líquido.

Como se ha expuesto, pueden emplearse, p. ej., también membranas de sílice. Los líquidos pueden separarse aquí mediante centrifugación o mediante la aplicación de vacío o mediante presión. En muchas aplicaciones del procedimiento de acuerdo con la invención, en particular en el caso de la purificación de ADN fetal, los ácidos nucleicos a purificar se presentan en pequeñas concentraciones en grandes volúmenes. En el caso de emplear una membrana de sílice, en el estado de la técnica existe a menudo el problema de que volúmenes de muestras grandes pueden obstruir la membrana. Sin embargo, de acuerdo con el procedimiento de acuerdo con la invención, este procedimiento no se manifiesta dado que se emplean sustancias/concentraciones tampón, especiales. En este caso, es particularmente ventajoso que se empleen detergentes.

Ácidos nucleicos que pueden ser aislados con el procedimiento divulgado son, p. ej., ADN, ARN, ARNm, ácidos nucleicos mitocondriales, epigenéticamente modificados, de cadena sencilla, de cadena doble, circulares, de plásmidos, cósmidos, artificiales o sintéticos, así como ADNc y fragmentos de los mismos. El procedimiento divulgado se adecua, en particular, para la concentración de ácidos nucleicos de cadena corta (p. ej., ADN y ARN en cualquier forma, incluido ARN no codificante, tal como, p. ej., ARNm o ácidos nucleicos sintéticos) con una longitud ≤ 1000 pb, ≤ 800 pb, ≤ 500 pb o ≤ 300 pb. De acuerdo con una forma de realización se aíslan y/o concentran ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud que se elige del grupo de ácidos nucleicos con una longitud de ≤ 500 pb, ≤ 400 pb, ≤ 300 pb y/o ≥ 50 pb, ≥ 100 pb. Preferiblemente, se purifica ADN y/o ARN. De manera particularmente eficaz se puede purificar ADN o ARN de una longitud de ≥ 50 nucleótidos. Para la obtención de ARN de cadena corta, el ácido nucleico a purificar se trata preferiblemente con DNasa. De acuerdo con la reivindicación 1 los ácidos nucleicos que comprenden ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud de ≤ 500 pb son ADN extracelular, que se aíslan y/o purifican a partir de un fluido corporal como material de partida que contiene ácido nucleico, en el que el fluido corporal se selecciona entre plasma, suero, orina y fluido cerebral..

El tamaño de los ácidos nucleicos aislados puede variarse/controlarse también mediante la elección de la concentración de alcohol, en particular en combinación con la concentración de agentes caotrópicos. El procedimiento divulgado posibilita en ambas variantes (procedimiento de 1 etapa y procedimiento de 2 etapas) un aislamiento efectivo también de ácidos nucleicos de cadena corta. Mediante el ajuste adecuado de las condiciones de unión tal como se describen aquí puede alcanzarse también una concentración específica de los ácidos nucleicos de cadena corta. El procedimiento de acuerdo con la invención se adecua, en particular, para la concentración de ácidos nucleicos fetales, tal como lo confirman también los siguientes Ejemplos.

El procedimiento de acuerdo con la invención puede emplearse, por lo tanto, de manera ventajosa con el fin de aislar ácidos nucleicos extracelulares, tales como, p. ej., ADN fetal,. Con la presente invención se proporciona, por lo tanto, también un procedimiento para la concentración de ácidos nucleicos fetales procedentes de, en particular de plasma o suero sanguíneo, que se caracteriza porque se lleva a cabo el procedimiento de acuerdo con la invención para el aislamiento/la purificación de ADN extracelular de cadena corta. Particularidades del procedimiento se exponen arriba.

Otros sectores de aplicación divulgados se encuentran, sin embargo, por ejemplo, en el campo forense y en otros sectores en donde es decisiva la purificación de ácidos nucleicos pequeños. Además de ello, el procedimiento de

acuerdo con la invención puede emplearse también en el marco del diagnóstico, p. ej., con el fin de purificar ácidos nucleicos de tumores libremente circulantes a partir de una muestra sometida a estrés.

El procedimiento de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para el uso en el diagnóstico. También es automatizable y, por lo tanto, se puede emplear para su uso en robots de purificación correspondientes.

- 5 La presente invención se refiere, además, al uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 18.

Además, se divulga un kit para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos, en particular de ácidos nucleicos de cadena corta, a partir de un material de partida con contenido en ácidos nucleicos, que presenta tampón y/o reactivos y, opcionalmente, al menos un material de soporte que une ácidos nucleicos para la realización del procedimiento divulgado. Particularidades del procedimiento se exponen arriba.

- 10 Los kits divulgados se pueden emplear, en particular, en el sector del diagnóstico y para aplicaciones médicas. Se pueden emplear de forma automatizada.

Ejemplos

La presente invención se explica ahora con ayuda de Ejemplos. Los ensayos llevados a cabo tuvieron lugar con ayuda de las prescripciones de ensayo descritas en lo que sigue.

- 15 Ejemplos que no son abarcados por las reivindicaciones son ejemplos comparativos. Los ejemplos comparativos son, en particular, aquellos ejemplos en los que se utiliza una concentración de isopropanol que está fuera del intervalo de concentración reivindicado de $\geq 15\%$ (v/v) y $\leq 32\%$ (v/v).

- 20 Punto de partida para la aplicación del procedimiento de acuerdo con la invención para el aislamiento de ADN fetal libremente circulante a partir de sangre materna con la concentración simultánea del ADN fetal con relación al ADN materno es el hallazgo descrito en la bibliografía de que se diferencia la longitud media de ambas especies de ácidos nucleicos. Mientras que momentáneamente se parte del hecho de que la longitud media de ADN fetal es menor que 500 pb, la longitud media de ADN materno es mayor que 500 pb.

Ejemplo 1: Ensayo para la determinación de la longitud media de ADN fetal y materno

- 25 Tres agrupaciones de plasma diferentes que estaban formadas a partir de sangre de fetos masculinos de mujeres embarazadas se utilizaron para el examen de la distribución por tamaños del ADN libremente circulante que se encontraba en las mismas. Las agrupaciones de plasma eran la agrupación A, B y C. La agrupación A contenía plasma procedente de muestras de sangre de mujeres embarazadas en el primer a tercer trimestre del embarazo. Las agrupaciones B y C contenían en cada caso plasma procedente de sangre que fue tomada de las mujeres embarazadas en el primer y segundo trimestre del embarazo; un momento en el que todavía contiene pequeñas cantidades de ADN fetal libremente circulante, pero que es de gran relevancia para el momento de diagnóstico clínico.

- 30 Como material de partida se utilizaron 10 ml de plasma y en el caso de la agrupación A, 5 ml de plasma. Se procedió de acuerdo con el protocolo QIAamp Blood DNA Midi (QIAGEN) que fue adaptado a un volumen de 10 ml. Se eluyó en cada caso con 300 μ l de tampón AE (QIAGEN, comercialmente disponible). Después de la elución, se llevó a cabo una precipitación con etanol/acetato de sodio, y el sedimento secado se recogió en 15 μ l de tampón EB (QIAGEN, comercialmente disponible). Tras una electroforesis en gel de agarosa, las fracciones por tamaño individuales se recortaron del gel y se llevó a cabo una extracción con gel de acuerdo con el protocolo de vacío QIAquick para la extracción de gel. Por cada fracción de gel se eluyó en 100 μ l; en la PCR subsiguiente se emplearon en cada caso 20 μ l de los materiales eluidos en una determinación doble. Se amplificó con cebadores correspondientes para uno de los locus SRY para la detección del ADN fetal libremente circulante. SRY solo puede ser detectado en el caso de individuos masculinos. Dado que se utilizó exclusivamente sangre de embarazadas que deciden tener seguro un feto masculino, todas las señales SRY debieron ser atribuidas a ADN de origen fetal. Se amplificó, además, con cebadores correspondientes del locus c-myc para la detección del ADN libremente circulante global en la sangre materna. La amplificación se llevó a cabo en un instrumento ABI 7500 (Applied Biosystems). En este caso, se obtuvo el resultado mostrado en la Fig. 1 y la Fig. 2. La Fig. 1 muestra la distribución por tamaños del ADN fetal en función de las agrupaciones utilizadas. La Fig. 2 muestra la distribución por tamaños del ADN global en función de las agrupaciones utilizadas.

- 50 Este experimento demuestra que, tal como se describe en la bibliografía, el ADN fetal solo está presente en cortos fragmentos. En este caso, la parte principal se encuentra claramente en la fracción menor que 300 pb, una parte significativa muestra longitudes de fragmento de 300 a 500 pb. Solo muy poco del ADN fetal libremente circulante en la sangre materna es mayor que 500 pb. Por otro lado, no todo el ADN materno es mayor que 500 pb. Aproximadamente la mitad del ADN materno que circula libremente en la sangre es asimismo solo de 500 pb de longitud y menos, pero la otra mitad es claramente mayor que 500 pb. Mediante un fraccionamiento por tamaño de los ácidos nucleicos aislados/concentrados se puede alcanzar de acuerdo con ello una concentración significativa, relativa de ADN fetal con respecto a ADN materno.

Ejemplo 2

Con el fin de simular la diferente distribución por tamaños de ADN fetal (la porción predominante es más corta que 300 pb, véase el Ejemplo 1) y ADN materno (principalmente más largo que 500 pb), al plasma sanguíneo se añadieron como fondo dos amplificadores por PCR diferentes. Un fragmento de 219 pb debe simular en este caso el ADN fetal, un fragmento de 1018 pb de longitud, el ADN materno. En un primer experimento se utilizaron para ello cantidades relativamente elevadas de estos amplificadores por PCR, a saber, en cada caso 2×10^6 copias en 600 µl de plasma. En este caso, se procedió de acuerdo con el siguiente protocolo:

A 600 µl de plasma en un recipiente de 5 ml se añadieron 90 µl de proteasa (QIAGEN) y 600 µl de tampón AL (QIAGEN, comercialmente disponible), que contiene guanidina. Después de la mezclado mediante vórtices, la tanda se incubó para la lisis durante 15 min a 56 °C. Después de la lisis se añadieron al lisado los amplificadores por PCR de 219 a 1018 pb de longitud. Las condiciones de unión se ajustaron con 100 µl de isopropanol de modo que con ello resultó en la muestra global una concentración de 6,9 % (p/v) de isopropanol.

Después de la mezclado mediante vórtices, se incubó durante 10 min a la temperatura ambiente. Para la unión se añadieron 50 µl de partículas magnéticas MagAttract con superficie de sílice (QIAGEN) y la tanda se dejó unir durante 5 min en un agitador. Después de la unión, las partículas se separaron del material sobrenadante mediante un imán y el material sobrenadante se retiró. El material sobrenadante se conservó a 4 °C para el tratamiento ulterior.

Tratamiento de las partículas MagAttract

Después de la retirada del material sobrenadante, las partículas magnéticas se mezclaron con 750 µl de tampón AW1 (QIAGEN, comercialmente disponible) durante 5 min en un agitador de placas y, a continuación, la suspensión de partículas se transfirió a un recipiente de reacción de 1,5 ml. Después de la separación magnética en este recipiente se retiró el material sobrenadante y se desechó. A continuación, las partículas se lavaron todavía (en cada caso después de 5 min de incubación en un agitador) sucesivamente con 750 µl de tampón AW2 (QIAGEN, comercialmente disponible) y 750 µl de etanol. Después de la etapa de lavado con alcohol, las partículas se secaron en un bloque calefactor durante 10 min a 56 °C. Para la elución de los ácidos nucleicos unidos a las partículas se utilizaron 200 µl de agua exenta de RNasa (QIAGEN), agitándose para la elución de nuevo durante 5 min. El material eluido se transfirió a un nuevo recipiente después de la separación magnética.

Tratamiento del material sobrenadante de la unión

El material sobrenadante/material roto de la unión (el material no unido a las partículas magnéticas) se trató de la siguiente forma. El material sobrenadante se mezcló después de la unión con 2 ml de tampón B6 (GuHCl 2,5 M, isopropanol al 50%), de modo que resultó una concentración de isopropanol de 32,4% (v/v), se mezcló mediante vórtices y se incubó durante 10 min a la temperatura ambiente.

Después de la incubación, se añadieron 50 µl de partículas MagAttract y se procedió de la misma manera que la descrita para la primera tanda de unión (lavado con AW1 (QIAGEN, comercialmente disponible), AW2 (QIAGEN, comercialmente disponible), etanol, elución en agua exenta de RNasa). Alternativamente, al material sobrenadante se añadieron, después de la unión, 2 ml de isopropanol al 100 % (tampón B11), de modo que resultó una concentración de isopropanol de 61,9% (v/v). De los materiales eluidos se tomaron partes alícuotas iguales y, con ayuda de una PCR en tiempo real, se amplificó un amplicón de 119 pb que proporciona un fragmento idéntico tanto a partir del fragmento de 219 pb como a partir del fragmento de 1018 pb. La detección del amplicón tuvo lugar durante la PCR con ayuda de SYBR Green.

En este caso, resultó la imagen mostrada en la Fig. 3.

Este experimento demuestra que tanto el fragmento de 219 pb como el fragmento de 1018 pb, bajo las condiciones de unión elegidas, une solo poco ácido nucleico a las primeras partículas MagAttract, en cada caso aproximadamente solo 10%. En el caso de un nuevo ajuste de las condiciones de unión con tampón B6 o bien B11 resulta, sin embargo, de manera sorprendente una diferencia en el rendimiento en función del tamaño de los fragmentos. Mientras que con ayuda de tampón B6 se pudo encontrar de nuevo más del 80% del ADN corto (que representa el ADN fetal) para el ADN más largo (que representa el ADN materno) resulta solo un rendimiento de aproximadamente 50%. Por el contrario, en el caso del empleo de tampón B11 no resultan diferencias esenciales en el rendimiento entre las dos longitudes de fragmento de ADN.

Este ensayo demuestra que con ayuda de un sistema de unión de dos etapas con ayuda de dos fases sólidas bajo condiciones adecuadas, el ADN fetal puede ser concentrado con respecto al ADN materno, debiéndose registrar solo muy pequeñas pérdidas de rendimiento de ADN fetal.

Ejemplo 3

Se procedió como se describe en el Ejemplo 2, solo que en esta ocasión solamente se emplearon 200.000 copias de los fragmentos definidos con el fin de simular una imagen más realista de los números de copias que circulan

libremente reales en la sangre. Bajo la primera condición se unieron a la matriz en esta ocasión 100 µl de tampón B11 (véase arriba) + 1,2 ml de tampón B6, de modo que resultó una concentración de isopropanol de 20,3% (v/v) (véase arriba). Para la condición alternativa para la unión a la matriz se añadieron 100 µl de tampón B11 y 2,0 ml de tampón B6 al lisado de plasma. Adicionalmente, los fragmentos de ADN se unieron bajo las dos condiciones de tampón arriba mencionadas en la tanda de unión en cada caso a una matriz MagAttract o bien a columnas QIAamp Mini.

Para ello se procedió como sigue. Los tampones B11 y B6 se añadieron al material sobrenadante, se mezclaron y se incubaron durante 10 min a la temperatura ambiente. El lisado de dos muestras se reunió y se añadió con ayuda de un Tubo de Extensión (QIAGEN) en vacío a una columna QIAamp Mini (QIAGEN). Se lavó sucesivamente con 1000 µl (en el caso de la unión a partículas MagAttract) o bien 750 µl (en el caso de la unión a columnas QIAamp Mini) de AW1 (QIAGEN, comercialmente disponible), AW2 (QIAGEN, comercialmente disponible) y etanol. Para el secado, las columnas se centrifugaron durante 3 min a 14.000 rpm y las columnas se dispusieron durante 5 min en un bloque calefactor a 56 °C. Las partículas MagAttract se trataron tal como se describe en el Ejemplo 2. También aquí se eluyó con 200 µl de agua exenta de RNasa (centrifugación durante 1 min a 14.000 rpm). La PCR en tiempo real subsiguiente proporcionó en este caso la imagen mostrada en la Fig. 4.

Este ensayo demuestra, sorprendentemente, que en el caso de una composición igual del tampón, apenas existe una diferencia el que se empleen como fase sólida partículas magnéticas o una membrana de sílice. En el caso de la adición de 1,2 ml de tampón B6 se concentraron fragmentos de ADN largos (aprox. 1000 pb) en la muestra de ADN obtenida, mientras que en el caso de la adición de 2,0 ml de tampón B6 se concentraron, sorprendentemente, a la inversa cortos fragmentos de ADN (aprox. 200 pb). En el caso del empleo de una membrana de sílice (QIAamp Mini), el rendimiento de ADN es en conjunto mayor que en el caso de las partículas MagAttract, no obstante, también la unión de ADN dependiente del tamaño es algo menos acusada. Una combinación de partículas magnéticas (primera matriz) y membrana de sílice (segunda matriz) en una extracción de ADN de dos etapas (en la que el material sobrenadante con contenido en ADN de la 1ª unión se continúa utilizando y se une a una membrana de sílice) se adecua, por consiguiente, extraordinariamente con el fin de concentrar de manera eficiente fragmentos de ADN cortos en dos etapas y, con ello, también concentrar de manera efectiva ADN fetal con relación a ADN materno en la segunda matriz.

Ejemplo 4

Se procedió de manera similar a la indicada en el Ejemplo 3, solo que en esta ocasión se trabajó con una muestra de sangre real y se empleó un procedimiento de unión de dos etapas. En este caso, para la 1ª etapa de unión de la muestra se añadieron 1,2 ml de tampón B6, el material roto o bien el material sobrenadante de la 1ª etapa de unión se ajustó entonces con tampón B6 adicional a un total de 2,0 ml de tampón B6. El material de partida era una agrupación a base de muestras de plasma de mujeres embarazadas del 1º y 2º trimestre, de las que era seguro que iban a tener un niño. Para la detección del ADN fetal, en la siguiente PCR en tiempo real se amplificó el locus SRY, para la detección del ADN global, el locus 18S (véase también el Ejemplo 1). Para fines comparativos, se llevó a cabo un protocolo de 1 columna de acuerdo con el protocolo al vacío para virus QIAamp MinElute, que corresponde al estado de la técnica. Los resultados se muestran en la Fig. 5.

El resultado de este experimento coincide con el resultado del Ejemplo 3, lo que demuestra que el sistema artificial con fragmentos de 219 pb y 1018 pb es una buena simulación para la situación real (Ejemplo 4). Mientras que mediante la primera matriz no se pierde prácticamente nada de ADN fetal, cantidades significativas del ADN materno se unen ya a la primera matriz (aquí: partículas magnéticas MagAttract). Por lo tanto, el ADN materno se empobrece de manera efectiva en esta etapa (x) y, por lo tanto, ya está agotado durante la purificación a través de la segunda columna. En comparación con el estado de la técnica (MinElute 1 etapa), el método de dos matrices proporciona no solo un número absoluto incrementado de ADN fetal, sino que determina mediante el agotamiento al menos parcial del ADN materno a través de la 1ª matriz también una mejor relación de ADN fetal a materno en el material eluido, lo cual fomenta claramente la capacidad de detección del material hereditario del feto procedente de la sangre materna. La Fig. 6 ilustra otra vez la relación mejorada de ADN fetal a materno. Mientras que en el caso de la purificación de 1 etapa de acuerdo con el estado de la técnica resulta una porción de aproximadamente 15% de ADN fetal en el material eluido (cuantificado a través de la PCR en tiempo real SRY/18S dúplex), la proporción en el caso de una purificación en 2 etapas se duplica más del doble con una proporción de 30 a 40%.

Ejemplo 5

Se procedió como se describe en el Ejemplo 4, solo que en esta ocasión se utilizó un volumen mayor de plasma sanguíneo (3 ml por tanda). Además de ello, se compararon entre sí diferentes combinaciones de superficies de unión (partículas MagAttract y columnas QIAamp Mini), así como diferentes cantidades de MagAttract. Adicionalmente, en el caso del protocolo de 2 etapas en membrana se lisó durante 30 min, no solo durante 15 min. Los resultados se muestran en la Fig. 7. Este experimento confirma los resultados de los experimentos precedentes. En comparación con el protocolo de 1 etapa del estado de la técnica, con el protocolo de 2 etapas de acuerdo con la invención resultan siempre relaciones mejoradas de ADN fetal a ADN materno y, a saber, independientemente de sí en la segunda etapa de unión se emplean partículas magnéticas con superficie de sílice o membranas de sílice. Una lisis prolongada de 30 min parece mejorar en este caso todavía adicionalmente la relación de ADN fetal a ADN

materno a favor del ADN fetal, de modo que con ello se puede agotar claramente el ADN materno. Esta mejora de la relación se muestra también en la Fig. 8. Mientras que en el caso del protocolo de 1 matriz de acuerdo con el estado de la técnica solo resulta una relación de ADN fetal a materno de aproximadamente 15%, esta relación puede aumentarse mediante el protocolo de 2 matrices hasta en un 50% de ADN fetal. La proporción del ADN fetal en el ADN circulante purificado procedente de plasma materno puede por lo tanto aumentarse claramente en comparación con el estado de la técnica.

La Tabla mostrada en la Fig. 9 muestra, además, diferentes condiciones de reacción en la muestra bajo las cuales tiene lugar la unión de los ácidos nucleicos al material de soporte (conforme al procedimiento de 1 etapa de acuerdo con la invención). Se emplearon partículas MagAttract como material de soporte. Los resultados se muestran en la Fig. 10.

Ejemplo 6

Con el fin de comparar la eficiencia del procedimiento de acuerdo con la invención para la extracción de ADN libremente circulante a partir de plasma humano, se compararon entre sí los siguientes protocolos:

1. El procedimiento de 1 etapa de ADN libremente circulante, empleado en el estado de la técnica, a saber, el protocolo QIAamp MiniElute Virus modificado, indicado más adelante
2. El protocolo de 1 etapa de acuerdo con la presente invención para la extracción/el aislamiento de ADN libremente circulante ("one step").

Para este ensayo se empleó y sometió a ensayo plasma agrupado de donantes masculinos en cuatro repeticiones de extracción por protocolo. La extracción de ADN tuvo lugar de acuerdo con el respectivo protocolo. Se emplearon 5 ml de plasma; el ADN se eluyó en 50 µl.

1. Protocolo al vacío para virus QIAamp MinElute, modificado - estado de la técnica

Los ácidos nucleicos libremente circulantes se aislaron a partir de 5 ml de plasma EDTA. El protocolo tuvo lugar como sigue:

Condiciones de liberación

750 µl de proteasa QIAGEN (disuelta en disolvente proteasa) se pipetearon en un recipiente de 50 ml. Después se añadieron 5 ml de plasma y 5 ml del tampón AL con contenido en guanidina (con 5,6 µg de ARN portador). El recipiente se cerró y se sometió bien a vórtices, con el fin de obtener una solución homogénea. La solución homogénea se incubó luego durante 30 minutos a 56 °C en un baño de agua.

Adición de los fragmentos de marcador

Después se añadieron a la mezcla homogénea 20 µl de una mezcla de fragmentos de marcador, con el fin de simular la situación del ácido nucleico fetal mezclado con ácidos nucleicos maternos. Para ello se añadieron en cada caso 200.000 copias de fragmentos de 219 pb (correspondientes al ADN fetal) y 1018 pb (correspondientes al ADN materno).

Unión

Al lisado se añadieron 6 ml de etanol. La mezcla se sometió a vórtices y se incubó durante 5 minutos en hielo. El lisado se cargó en una minicolumna QIAamp, fijándose un tubo de extensión en un dispositivo de vacío QIAvac 24. El lisado se hizo pasar a través de la columna mediante la aplicación de vacío. Los tubos de extensión se retiraron con cuidado.

Etapas de lavado

600 µl del tampón AW1 (QIAGEN, comercialmente disponible) se añadieron a la columna y se aplicó un vacío. Esta etapa de lavado se repitió con 750 µl del tampón AW2 (QIAGEN, comercialmente disponible) y con 750 µl de etanol.

Las columnas se colocaron en tubos de recogida de 2 ml y se centrifugaron durante 3 minutos a 14.000 rpm. Después, las columnas se transfirieron a tubos de recogida recientes y se secaron en un bloque calefactor a 56 °C durante 10 minutos.

Elución

Las columnas secadas se colocaron en recipientes de 1,5 ml y a cada una de las columnas se añadieron 50 µl del tampón AVE (QIAGEN, comercialmente disponible); incubación durante 3 minutos y centrifugación durante un minuto a 14.000 rpm.

Los ácidos nucleicos así obtenidos se encuentran en el material eluido.

2. Aislamiento de ácido nucleico libremente circulante conforme al procedimiento de 1 etapa de acuerdo con la invención

Liberación

- 5 750 µl de proteasa QIAGEN (disuelta en disolvente proteasa) se pipetearon en un recipiente de 50 ml. Después se añadieron 5 ml de plasma y 5 ml del tampón AL de lisis/liberación con contenido en guanidina (QIAGEN, comercialmente disponible, sin ARN portador).

El recipiente se cerró y se sometió bien a vórtices, con el fin de obtener una solución homogénea. La solución homogénea se incubó durante 30 minutos a 56 °C en un baño de agua.

Adición de los fragmentos de marcador

- 10 También aquí se añadieron de nuevo 20 µl de una mezcla de fragmentos de marcador (en cada caso 200.000 copias de fragmentos de 200 pb y 1.000 pb, con el fin de simular la relación de ADN fetal a materno).

Unión

- 15 Después, mediante la adición de tampón de unión, se ajustaron las siguientes condiciones de unión: isopropanol a aprox. 25 a 35% y compuestos caotrópicos más de 2 M. Decisivas son las condiciones de reacción en la muestra global y no en el tampón, dado que las condiciones de reacción en la mezcla son decisivas para la eficiencia de unión de los ácidos nucleicos de cadena corta al material de soporte.

La muestra se sometió a vórtices y se incubó durante 5 minutos en hielo.

- 20 El lisado mezclado con el tampón de unión se cargó luego en una minicolumna QIAamp con tubo de extensión, la cual estaba fijada sobre un dispositivo de vacío QIAvac 24. El lisado se hizo pasar a través de la columna mediante la aplicación de vacío. Después, los tubos de extensión se retiraron con cuidado.

Etapas de lavado

600 µl de un tampón de lavado, tal como, por ejemplo, AW1 (QIAGEN, comercialmente disponible) se añadieron a la columna y se extrajeron mediante vacío. Pueden seguir etapas de lavado adicionales con 750 µl del tampón AW2 (QIAGEN, comercialmente disponible) y con 750 µl de etanol.

- 25 Las columnas lavadas se colocaron en tubos de recogida de 2 ml y se centrifugaron durante 3 minutos a 14.000 rpm. Las columnas se colocaron entonces en tubos de recogida recientes y se secaron en un bloque calefactor a 56 °C durante 10 minutos.

Elución

- 30 Las columnas se colocaron en recipientes de 1,5 ml y a cada una de las columnas se añadieron 50 µl del tampón de elución AVE (QIAGEN, comercialmente disponible), la incubación tuvo lugar durante 3 minutos y luego tuvo lugar una etapa de centrifugación durante un minuto a 14.000 rpm. Los ácidos nucleicos predominantemente de cadena corta se encuentran en el material eluido.

3. Resultados

- 35 El rendimiento de ADN conforme a los distintos protocolos se midió mediante una PCR en tiempo real cuantitativa, dúplex, empleándose muestras Taqman (4 repeticiones de PCR por cada extracción de ADN). El ADN se determinó, por una parte, mediante una diana Y-cromosómica (DYS14) y una diana 18S específica para ADNr. Mediante ambos métodos se determinó en última instancia la concentración del ADN en la muestra. Dado que el ADNr 18S está presente en los dos cromosomas, se encuentra en una cantidad doble que la diana Y cromosómica. El rendimiento de ADN se indicó como copias de genoma haploides por ml de plasma.

- 40 La concentración de pequeños fragmentos de ADN se determinó independientemente, en los fragmentos de ADN de 200 pb y 1.000 pb concentrados en una PCR en tiempo real, dúplex.

Los resultados se representan en las Figuras 11 y siguientes.

- 45 La Figura 11 muestra el rendimiento de ADN por muestra (se sometieron a ensayo 4 muestras por cada método de extracción). Por lo tanto, se muestra el contenido total de ADN que se obtuvo mediante los distintos métodos. Como muestra la recopilación, con el procedimiento de 1 etapa de acuerdo con la invención se alcanza un rendimiento claramente superior que con el procedimiento de 1 etapa conocido del estado de la técnica (MinElute). El rendimiento de ADN se encuentra un múltiplo más alto, lo cual es particularmente ventajoso precisamente para la determinación de ácidos nucleicos poco expresados/presentes.

La Figura 12 muestra el rendimiento de los fragmentos de ADN de 200 pb (simula los ácidos nucleicos fetales) y de 1.000 pb (simula los fragmentos maternos de cadena larga) alimentados. Tal como se expuso arriba, los fragmentos de 200 pb y los de 1.000 pb se alimentaron en una relación de 1:1, a saber, en cada caso 200.000 copias. El gráfico mostrado en la Figura 12 muestra si en el caso de los ácidos nucleicos purificados la relación de ácidos nucleicos de cadena corta a ácidos nucleicos de cadena larga sigue siendo de 1:1, o si se alcanzó una concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta. Tal como muestra la Figura 12, el procedimiento de 1 etapa del estado de la técnica (MinElute) tiene una relación de ácidos nucleicos de cadena larga a ácidos nucleicos de cadena corta de aprox. 1:1. Por lo tanto, no se alcanza concentración alguna de los ácidos nucleicos de cadena corta. Debajo de la Fig. 12 se muestra también a modo de tabla la cantidad de los distintos fragmentos (200 pb y 1.000 pb) que se obtuvieron de la muestra. Así, por ejemplo, el dato de que se purificaron 62,5 % de fragmentos de 200 pb y 36 % de fragmentos de 1.000 pb indica que se purificó 62,5% de fragmentos de 200 pb y 36% de fragmentos de 1.000 pb, que se purificó 62,5% de las 200.000 copias inicialmente alimentadas de los fragmentos de 200 pb y, con ello, se aislaron, y 36% de las 200.000 copias de los fragmentos de 1.000 pb. Tal como se muestra, con el procedimiento de 1 etapa de acuerdo con la invención se alcanza una concentración clara de los ácidos nucleicos de cadena corta con respecto a los ácidos nucleicos de cadena larga. La relación no es mayor que 1:1 (tal como es alimentada), sino que se purificaron claramente más ácidos nucleicos de cadena corta y, con ello, se concentraron en el material eluido. Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la invención es claramente superior al estado de la técnica.

La relación de los fragmentos de 200 pb a 1000 pb purificados se muestra adicionalmente en la Figura 13. Mientras que en el caso del procedimiento de 1 etapa conocido del estado de la técnica se alcanzan valores de aproximadamente 1, la relación en el caso del procedimiento de 1 etapa de acuerdo con la invención está desplazada claramente en dirección a los ácidos nucleicos de cadena corta que se acumulan/aíslan preferiblemente de manera correspondiente. En el caso del procedimiento de 2 etapas, en el que los ácidos nucleicos de cadena larga son empobrecidos primeramente en una etapa previa, se alcanza incluso una acumulación de 5 a 10 veces.

Como muestran los resultados, el procedimiento de 1 etapa de acuerdo con la invención es claramente superior al procedimiento de 1 etapa conocido del estado de la técnica. El procedimiento de 1 etapa de acuerdo con la invención concentra pequeños ácidos nucleicos durante la preparación, lo cual se ha de atribuir a las condiciones de reacción únicas durante la unión que conduce a una unión preferida de ácidos nucleicos de cadena corta.

Ejemplo 7

En lo que sigue se describe el aislamiento de ácidos nucleicos, en particular ARN circulante a partir de 5 ml de plasma o suero.

1350 µl de tampón AVE (QIAGEN, comercialmente disponible, contiene guanidina) se añade a un recipiente con 1350 µg de ARN portador liofilizado, de modo que se obtiene una solución de 1 µg/ml. La solución de 1 µg/µl se mezcla entonces con el tampón AL (QIAGEN, comercialmente disponible, contiene guanidina). La relación de mezcla se adapta en cada caso al número de las muestras. Para el tratamiento de una muestra se mezclan 8,5 ml del tampón AL con 5,6 µl del tampón AVE. Para más muestras, las relaciones deben adaptarse de manera correspondiente. Para la mezcladura, el recipiente se hace oscilar 10 veces en vaivén.

6 ml de solución de proteasa (QIAGEN, comercialmente disponible) se añaden a una proteasa de QIAGEN liofilizada (7,5 U.A., comercialmente disponible) y se mezclan con cuidado.

500 µl de proteasa de QIAGEN se pipetea en un recipiente de 50 ml (tubo) y a ello se añaden los 5 ml de plasma. Después se añaden 8,5 ml del tampón AL, mezclados con ARN portador (véase arriba) y se someten a vórtice, con el fin de mezclar las sustancias.

La muestra mezclada se incuba durante 30 minutos a 56 °C.

7,5 ml de un tampón de unión se añaden al lisado (contiene aprox. 0,5 a 1,5 mol/l de guanidinio, preferiblemente en torno a 1 mol/l e isopropanol, aprox. al 60 - 90 % (v/v); preferiblemente más de 70 %). La mezcla se somete a vórtice durante 30 segundos y se incuba durante 5 minutos en hielo. Se inserta una minicolumna QIAamp en un conector Vac en un QIAvac 24 Plus y se coloca un tubo de extensión en la minicolumna QIAamp abierta.

El lisado se carga en el tubo de extensión y se aplica un vacío. Tan pronto como el lisado haya sido hecho pasar a través de las columnas, se desconecta la bomba de vacío y se compensa la presión. El tubo de extensión se desecha.

La columna se retira del portador de vacío y se transfiere a un recipiente de recogida de 2 ml. La columna se centrifuga durante 1 min a 14.000 rpm.

Para la preparación de ARN se pipetea una solución patrón de DNasa I de 10 µl a 70 µl del tampón RDD (QIAGEN, comercialmente disponible). Se mezcla mediante la basculación del tubo. El tampón RDD se proporciona con el set RNase-free DNase (QIAGEN, CAT. N° 79254).

Las columnas se colocan de nuevo en el portador de vacío QIAvac 24 Plus. La mezcla de DNasa I se pipetea directamente sobre la membrana de gel de sílice QIAamp Mini y se incuba a temperaturas moderadas (20 a 30 °C) durante 15 minutos.

- 5 Después se pipetea 600 µl del tampón AW1 (QIAGEN, comercialmente disponible) sobre la minicolumna QIAamp. Después se aplica vacío con el fin de hacer pasar la mezcla a través de la columna. A continuación, se añaden 750 µl del tampón AW2 (QIAGEN, comercialmente disponible) y se hace pasar a través de la columna mediante la aplicación de vacío.

- 10 A continuación, se añaden a la columna 750 µl de etanol (al 96-100%) y se hace pasar mediante vacío. La minicolumna QIAamp se retira a continuación del portador de vacío y se desecha el VacConnector. Las columnas se colocan en un recipiente de recogida de 2 ml limpio y se centrifugan a 20.000 x g, 14.000 rpm durante 3 minutos.

La columna se coloca en un nuevo recipiente de recogida de 2 ml, y con la tapa abierta se seca durante 10 minutos a 56 °C. La minicolumna QIAamp se coloca entonces en un recipiente de microcentrifugación de 1,5 ml limpio y el recipiente recolector se desecha. 20 a 60 µl del tampón AVE (QIAGEN, comercialmente disponible) se pipetea en el centro de la minimembrana QIAamp. Con la tapa cerrada, tiene lugar una incubación durante 3 min.

- 15 A continuación, tiene lugar una etapa de centrifugación a 20.000 x g, 14.000 rpm durante 1 min con el fin de eluir el ARN. A continuación, se añade a ello un inhibidor de RNasa.

Con el protocolo correspondiente se puede purificar ARN de cadena corta.

Ejemplo 8

- 20 En lo que sigue se describe otra variante preferida del procedimiento de 1 etapa, en la que pasan a emplearse concentraciones de alcohol menores que 25% (v/v).

Esta variante es particularmente adecuada para el aislamiento de ADN circulante y ARN(m) a partir de 5 ml de plasma, suero u otro líquido corporal exento de células. En lo que sigue, este procedimiento se utilizó con el fin de purificar ácidos nucleicos circulantes a partir de 5 ml de plasma (véase la Fig. 14).

Lisis

- 25 Durante la lisis se emplean aprox. 1,7 a 2,2 mol/l de tiocianato de guanidinio y 7,5 a 9 (p/v) de detergente.

A ello se pipetea 500 µl de proteinasa K de QIAGEN en tubitos de 50 ml y se añaden 5 ml de plasma. Se añaden 4,0 ml de tampón ACL (QIAGEN, contiene 5,6 µg de ARN portador), la tapa se cierra y se mezcla durante 30 s mediante vórtices pulsados.

- 30 La muestra se calienta a 60 °C y se incuba durante 30 min. El tubito se centrifuga brevemente con el fin de eliminar gotas de la cara interna de la tapa.

Unión

Durante la unión, se emplean entre 2,1 y 2,5 mol/l de tiocianato de guanidinio, 9 a 11 % (p/v) de detergente, así como isopropanol al 19 a 21 % (v/v). A ello se añadieron al lisado 9,0 ml del tampón ACB (QIAGEN), la tapa se cerró y se mezcló a fondo durante 15-30 s mediante vórtices pulsados. La mezcla se incuba durante 5 min en hielo.

- 35 Para la purificación puede emplearse una columna (Columna QIAamp Mini). La columna se coloca en un VacConnector y en la columna abierta se dispone un tubo de extensión de 20 ml. En este caso, el tubo de extensión debe de estar colocado fijamente en la columna, con el fin de impedir una pérdida de la muestra. El lisado de la etapa es introducido en el tubo de extensión de la columna y se conecta la bomba de vacío. Cuando se ha hecho pasar el lisado completo a través de la columna, se desconecta la bomba de vacío y la presión se reduce a 0 mbar.
- 40 El tubo de extensión se retira con cuidado.

Lavado

Para el lavado se añaden a la columna 600 µl de tampón ACW1 (QIAGEN). La tapa de la columna se deja abierta y se conecta la bomba de vacío. Después de que todo el tampón ACW1 haya pasado a través de la columna, se desconecta la bomba de vacío y la presión se reduce a 0 mbar.

- 45 A la columna se añaden 750 µl del tampón de lavado ACW2 (QIAGEN). La tapa de la columna se deja abierta y se conecta la bomba de vacío. Después de que todo el tampón ACW2 haya pasado a través de la columna, se desconecta la bomba de vacío y la presión se reduce a 0 mbar.

- 50 Después se añaden a la columna 750 µl de etanol (al 96-100 %). La tapa de la columna se deja abierta y se conecta la bomba de vacío. Después de que todo el etanol haya pasado a través de la columna, se desconecta la bomba de vacío y la presión se reduce a 0 mbar.

Se cierra la tapa de la columna y la columna se coloca en un tubito recolector limpio. Después, la columna se centrifuga con toda la velocidad (20.000 x g, 14.000 rpm) durante 3 min.

Elución

5 La columna se coloca en un nuevo tubito recolector de 2 ml, la tapa se abre y el compuesto se incuba durante 10 min a 56 °C, con el fin de secar por completo la membrana.

La columna se coloca en un tubito de elución de 1,5 ml limpio y se retira el tubito recolector. Sobre el centro de la membrana de la columna se aplican 20-150 µl de tampón de elución (tampón AVE, QIAGEN). La tapa se cierra y se incuba a temperatura ambiente durante 3 min.

10 A toda velocidad se centrifuga durante 1 min (20.000 x g; 14.000 rpm) con el fin de eluir los ácidos nucleicos. En el material eluido está contenido tanto ADN circulante como ARN.

15 Los resultados de la purificación de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 8 se muestran en la Fig. 14. ADN exento de células libremente circulante se purificó conforme al protocolo de acuerdo con el Ejemplo 8 (5 ml de plasma agrupado) y el kit al vacío para virus de QIAamp MinElute (1 ml de plasma) como referencia. El volumen de elución ascendió a 100 µl. El rendimiento de ADN se cuantificó a través de una PCR en tiempo real duplex, encontrando uso una secuencia diana de 500 pb y una secuencia diana de 66 pb de longitud en la región codificante para el ARN ribosomal 18S. Para la PCR en tiempo real se utilizó el kit de PCR QuantiTect Multiplex. Las extracciones de ácidos nucleicos se llevaron a cabo en 6 réplicas por cada condición. Se observa que el protocolo de acuerdo con el Ejemplo 8 alcanza un rendimiento mayor de ADN circulante en comparación con un método habitual, correspondiente al estado de la técnica. En este caso, el rendimiento es claramente mayor que el que sería de esperar solo en virtud del elevado volumen de la muestra.

Ejemplo 9

El Ejemplo 9 muestra un procedimiento preferido para la purificación de ARN a partir de muestras, en particular plasma, suero u otros líquidos corporales. Las concentraciones recogidas en lo que sigue están diseñadas para una muestra de 5 ml.

25 El siguiente protocolo se empleó para la purificación de ARN a partir de 5 ml de plasma (véase la Fig. 15).

En este caso, el procedimiento se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 8. Sin embargo, para la purificación selectiva de ARN se llevó a cabo, a continuación de la unión y antes de llevar a cabo las etapas de lavado, además una etapa de DNasa, en la que el ADN es digerido mediante el empleo de DNasa I:

30 La columna es transferida a un tubito recolector de 2 ml y se centrifuga durante 1 min a 14.000 rpm. A través de esta etapa se retiran restos de lisado que eventualmente pudieran impedir la digestión de DNasa. Por cada muestra se añaden 10 µl de solución patrón de DNasa a 70 µl de tampón RDD (QIAGEN) y se mezclan mediante la inversión de la muestra.

35 Las columnas se llevan de nuevo a sus posiciones originales. La mezcla de incubación de DNasa I (80 µl) se aplica sobre la membrana de gel de sílice de la columnita y se incuba a temperaturas moderadas (20 - 30 °C) durante 15 min.

A continuación, se lava y eluye tal como se describe en el Ejemplo 8.

40 Los resultados se muestran en la Fig. 15. ARN exentos de células y libremente circulantes se purificaron de acuerdo con el Ejemplo 9 (5 ml de plasma; incluido tratamiento con DNasa de la columna QIAamp de acuerdo con el protocolo) y el kit al vacío para virus QIAamp MinElute (1 ml de plasma) como referencia. El volumen de elución ascendió a 100 µl. El rendimiento de ARN se cuantificó a través de una RT PCR en tiempo real que era específica para GAPDH, c-fos y ARNm beta-globina. Para la RT PCR en tiempo real se utilizó el kit QuantiTect Multiplex RT-PCR. Las extracciones de ácidos nucleicos se llevaron a cabo en 6 réplicas por cada condición.

45 Con ayuda de los bajos valores Ct ("ciclo de umbral") se reconoce que con el protocolo del procedimiento de acuerdo con el Ejemplo 9 se alcanza un rendimiento mayor de ARNm circulante en comparación con un método habitual, correspondiente al estado de la técnica. En este caso, el rendimiento es claramente mayor que el que sería de esperar solo en virtud del elevado volumen de muestra.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos que comprenden ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud de ≤ 500 pb a partir de un material de partida con contenido en ácidos nucleicos, caracterizado por las siguientes etapas de procedimiento:
- 5 (a) unir los ácidos nucleicos a un material de soporte que une ácidos nucleicos, en el que el material de partida se pone en contacto, en presencia de al menos un compuesto caotrópico y alcoholes de isopropanol, con el material de soporte que une ácidos nucleicos, en donde el alcohol se presenta en una concentración ≥ 15 % (v/v) y ≤ 32 % (v/v);
- (b) opcional eluir los ácidos nucleicos unidos del material de soporte que une ácidos nucleicos,
- 10 en el que
- el material de partida con contenido en ácidos nucleicos es un líquido corporal seleccionado entre plasma, suero, orina y fluido cerebral, y
- los ácidos nucleicos son ADN extracelular.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que en la etapa (a) el alcohol de la mezcla está presente en una concentración $\leq 25\%$ (v/v).
3. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la concentración del compuesto caotrópico en la etapa a) se encuentra en ≥ 2 mol/l y $\leq 3,5$ mol/l, y el compuesto caotrópico se elige del grupo de los tiocianatos, isotiocianatos o percloratos.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por una o varias de las siguientes características:
- a. que la concentración de los compuestos caotrópicos en la mezcla en la etapa (a) sea ≤ 4 mol/l, $\leq 3,5$ mol/l, $\leq 3,2$ mol/l o $\leq 3,1$ mol/l, y/o
- b. que el al menos un compuesto caotrópico en la etapa (a) sea un tiocianato, isotiocianato o perclorato; y/o
- 25 c. que al menos el 30%, 50% y preferiblemente al menos el 60% de los ácidos nucleicos de cadena corta presentes en el material de partida se puedan aislar mediante el procedimiento; y/o
- d. que se aislen y/o concentren ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud que se elige del grupo de ácidos nucleicos con una longitud de ≤ 400 pb y/o ≤ 300 pb y/o ≥ 50 pb y/o ≥ 100 pb, en el que donde los ácidos nucleicos de cadena corta son ADN extracelular.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la concentración de alcohol en la etapa a) está en un intervalo de $\geq 15\%$ (v/v) y $\leq 25\%$ (v/v) y la concentración del compuesto caotrópico en la etapa a) es ≥ 2 mol/l..
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado por que el compuesto caotrópico es tiocianato de guanidinio o isotiocianato de guanidinio.
- 35 7. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el material de soporte que une ácidos nucleicos se elige del grupo de los materiales con contenido en sílice, dióxido de silicio, gel de sílice, vidrio, zeolita, óxido de aluminio, dióxido de titanio, dióxido de zirconio, caolín, gel de sílice, partículas magnéticas, en particular partículas magnéticas de sílice o vidrio, material cerámico o materiales de soporte poliméricos, o caracterizado por que el material de soporte que une ácidos nucleicos se elige del grupo consistente en membranas de sílice y partículas magnéticas que presentan una superficie de sílice o de vidrio.
- 40 8. Procedimiento para el aislamiento y/o la concentración de ácidos nucleicos extracelulares, en particular fetales a partir de una muestra de sangre, en particular a partir de plasma o suero sanguíneo, caracterizado por que se lleva a cabo un procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el fluido corporal se elige de plasma o suero.
- 45 10. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 9, para el aislamiento de ADN extracelular, elegidos de ADN fetal y ADN de tumores de plasma y/o suero.
11. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por que la muestra se lisa primero y/o se liberan ácidos nucleicos.

12. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado por que no se lleva a cabo una extracción con fenol.
13. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que el alcohol de isopropanol en la etapa a) se encuentra en una concentración del 18 al 20% (v/v).
- 5 14. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado por que la concentración de los alcoholes de isopropanol en la etapa a) es $\leq 25\%$ (v/v) y la concentración del compuesto caotrópico en la etapa a) se encuentra en ≥ 2 mol/l y $\leq 3,1$ mol/l, y en el que el compuesto caotrópico es tiocianato de guanidinio o isotiocianato de guanidinio.
- 10 15. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado por que el material de soporte que une ácidos nucleicos es una membrana de sílice.
16. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 15, caracterizado por que el material de soporte que durante la unión están presentes detergentes, preferiblemente detergentes no iónicos.
17. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 16, para aplicación en el diagnóstico.
- 15 18. Uso de un kit para la realización de un procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 17, en donde el kit es un kit para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos a partir de un material de partida con contenido en ácidos nucleicos, que presenta tampón y/o reactivos, en el que el material de partida que contiene ácidos nucleicos es un fluido corporal seleccionado entre plasma, suero, orina y fluido cerebral, y los ácidos nucleicos son ADN extracelular que comprende ADN de cadena corta ≤ 500 pb de longitud.

Fig. 1

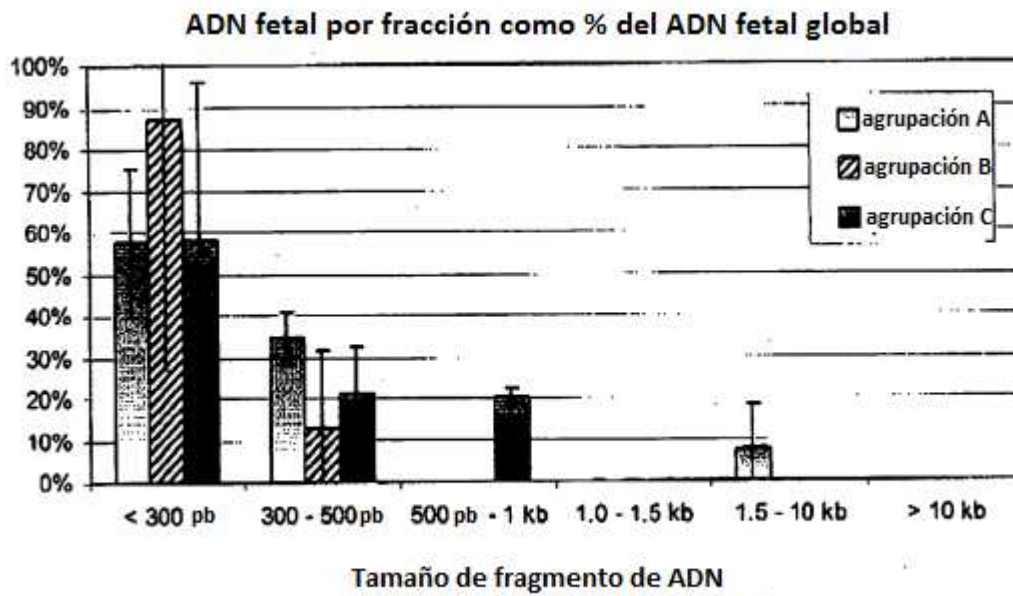


Fig. 2

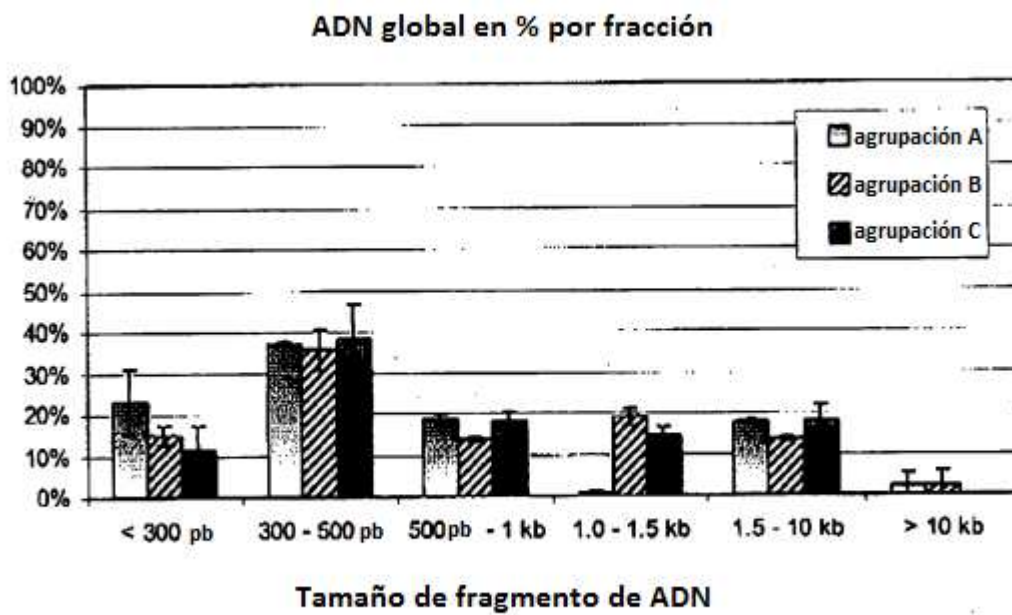


Fig. 3

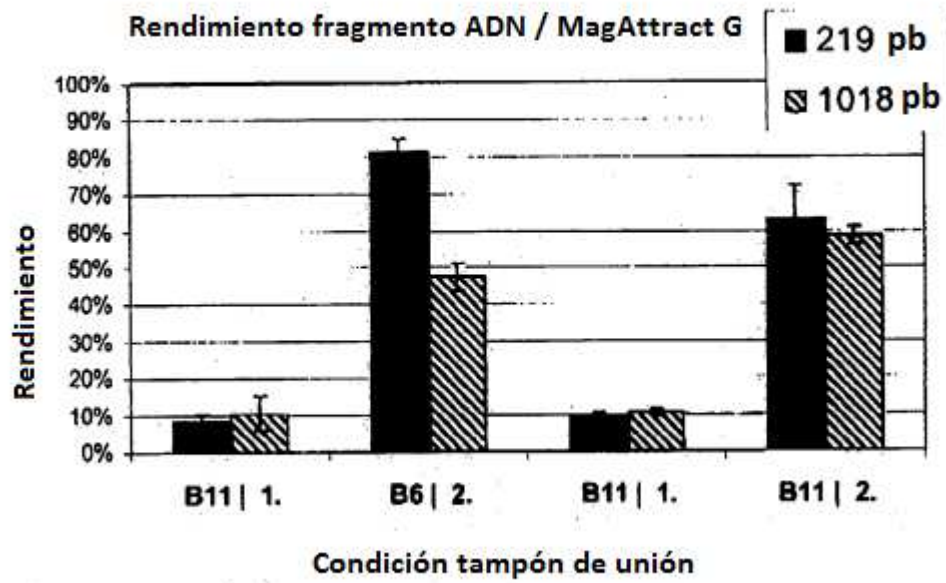


Fig. 4

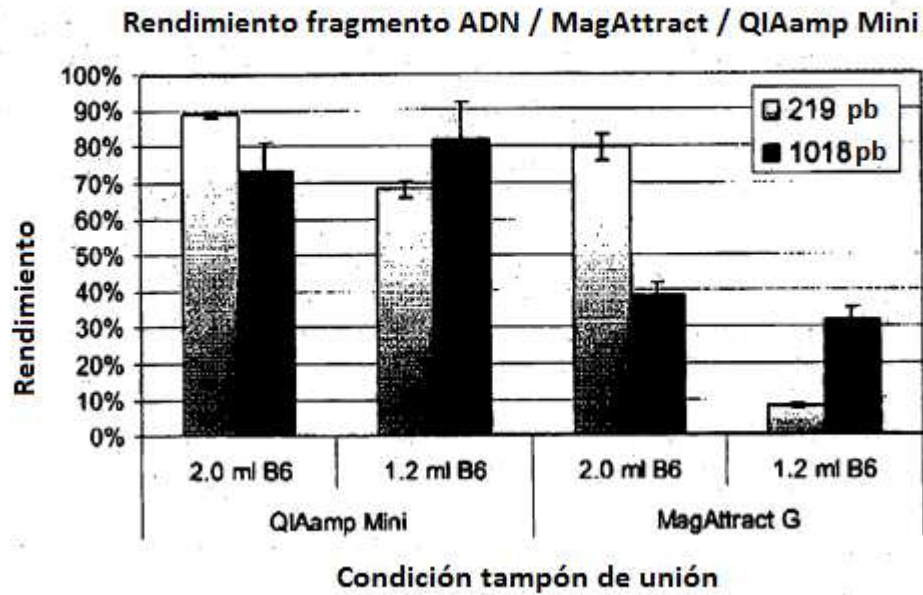


Fig. 5

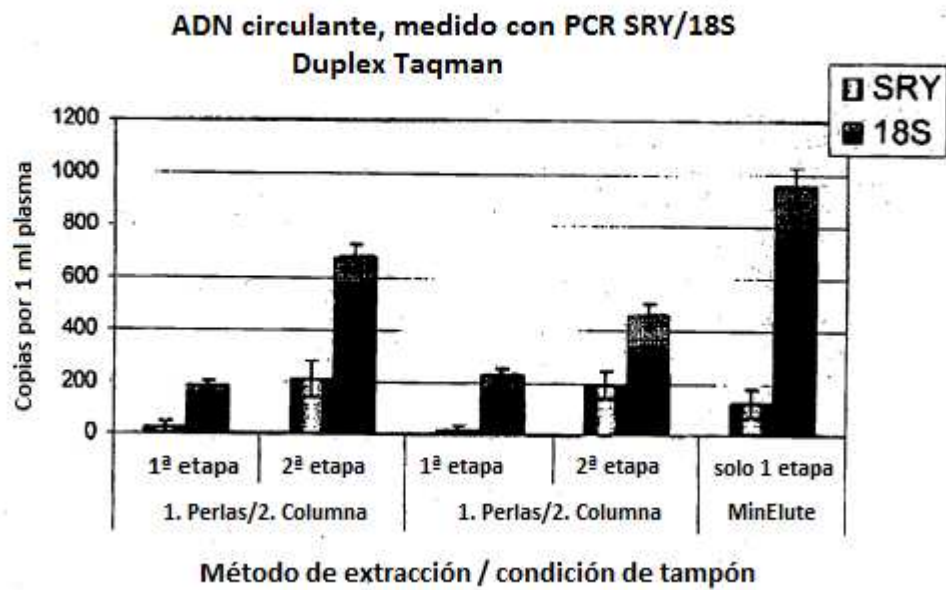


Fig. 6

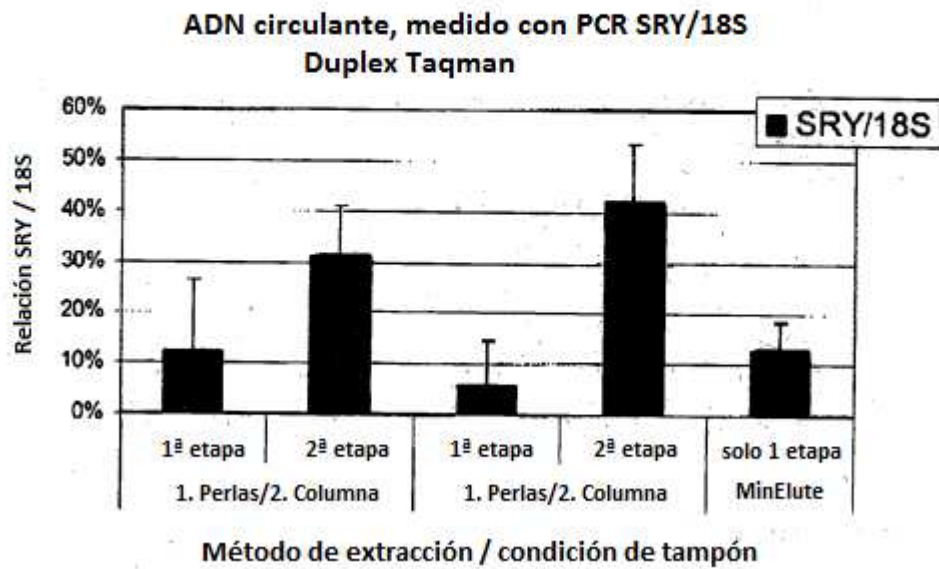


Fig. 7

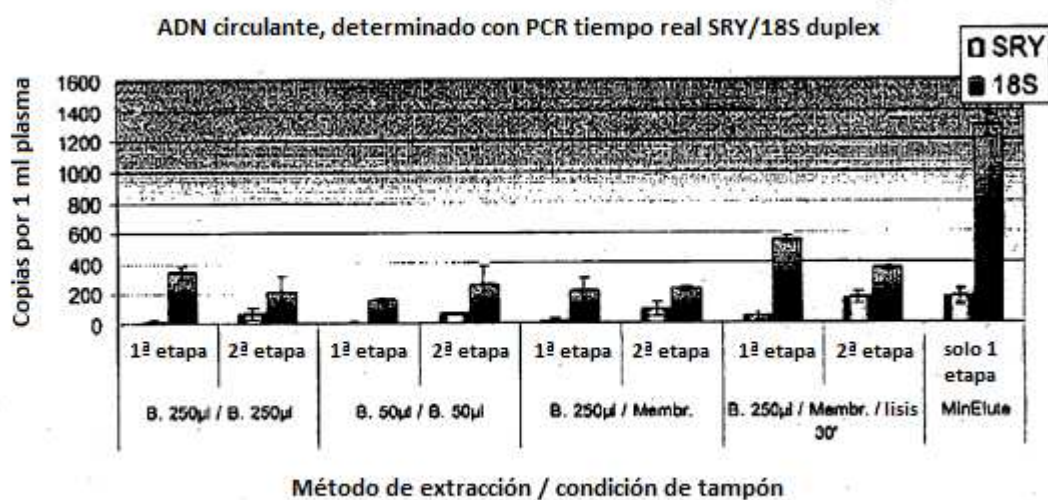


Fig. 8

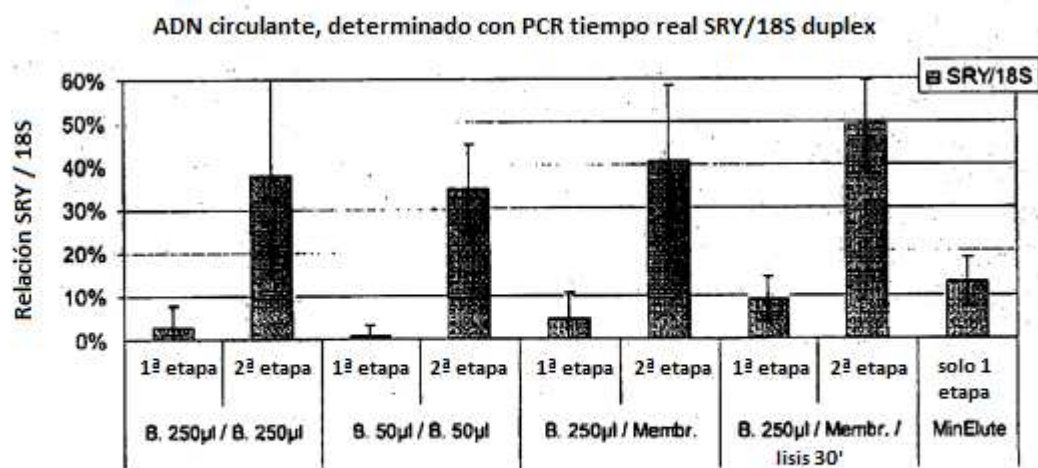


Fig. 9

Protocolo	Tampón de unión - Ejemplo	Volumen total de la muestra [ml]	Volumen tampón de unión añadido [ml]	GuHCl [mol/l]	Isopropanol [%]
1 etapa	B3	22,32	13,32	4,00	20,00
	B4	22,32	13,32	3,50	30,00
	B5	22,32	13,32	3,00	40,00
	B6	22,32	13,32	2,50	50,00
	B7	22,32	13,32	2,00	60,00
	B8	22,32	13,32	1,50	70,00
	B9	22,32	13,32	1,00	80,00
	B11	22,32	13,32	0,00	100,00

Fig. 10

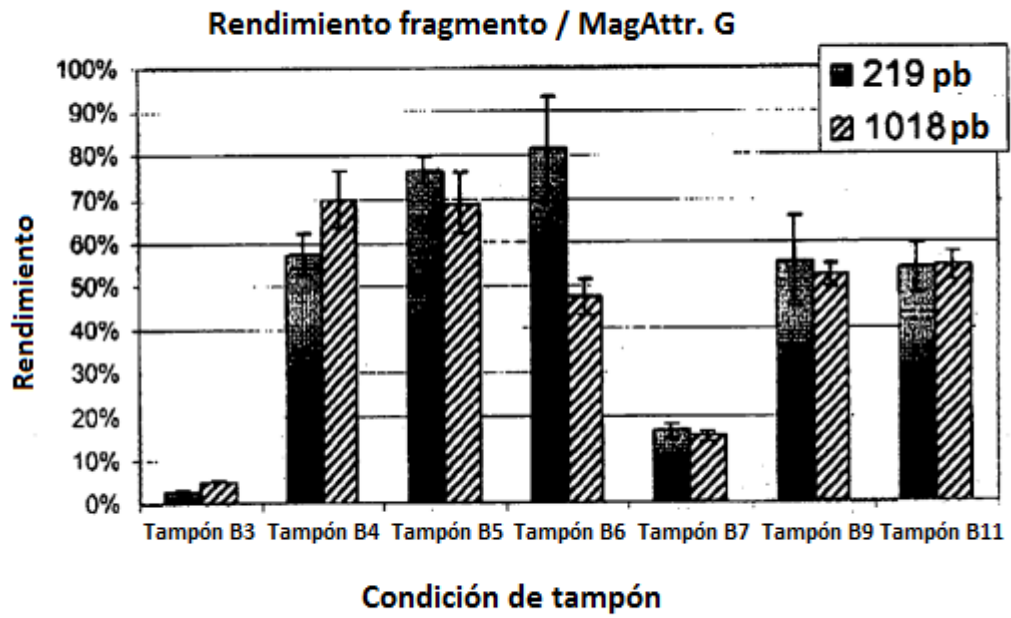


Fig. 11

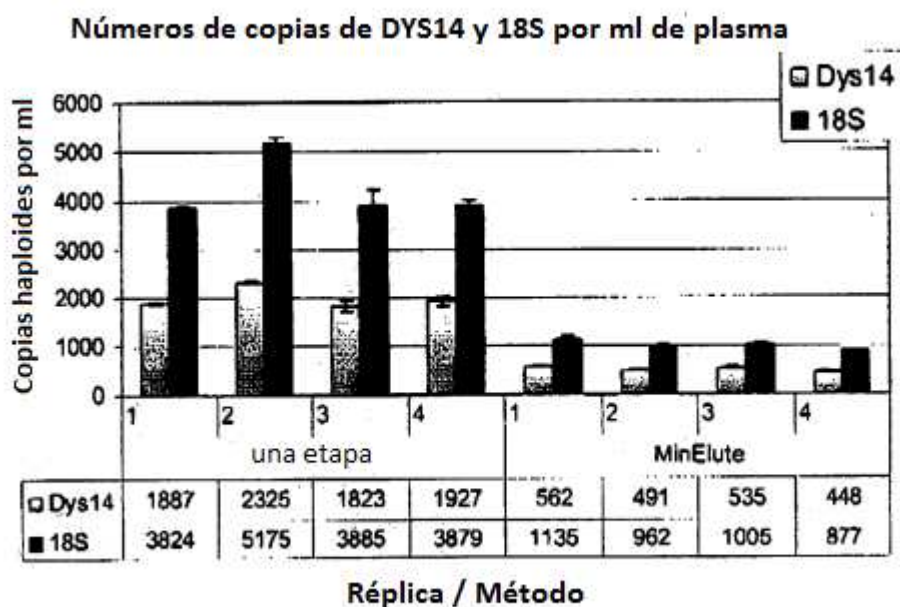


Fig. 12

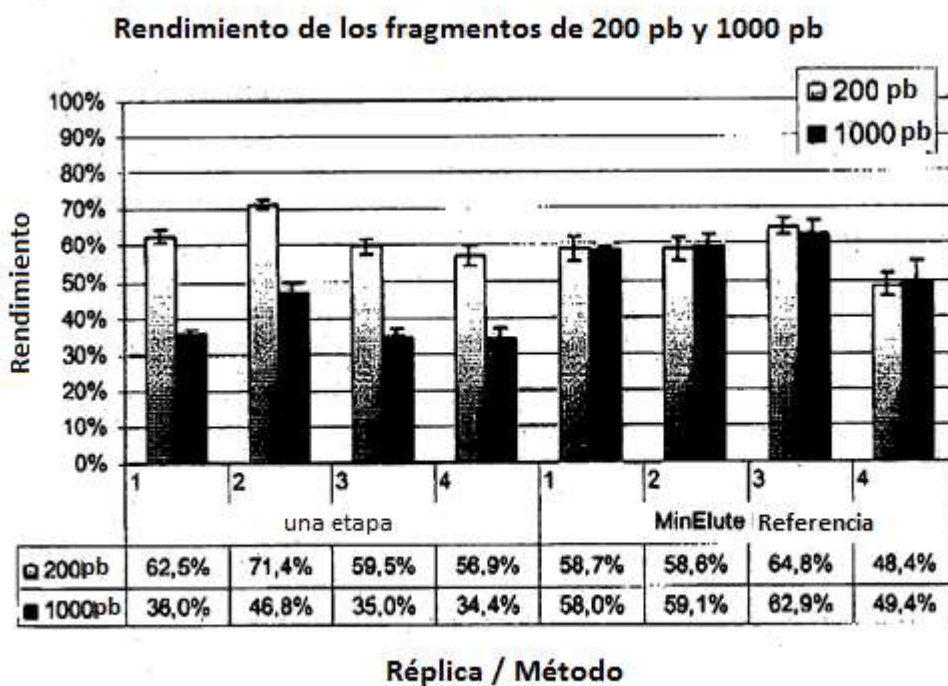


Fig. 13

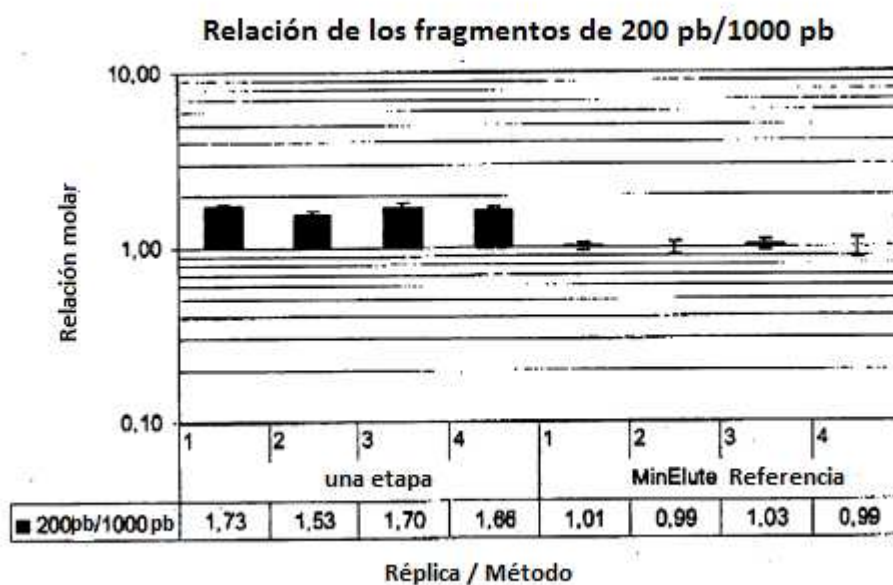


Fig. 14

Extracción de ADN circulante a partir del plasma

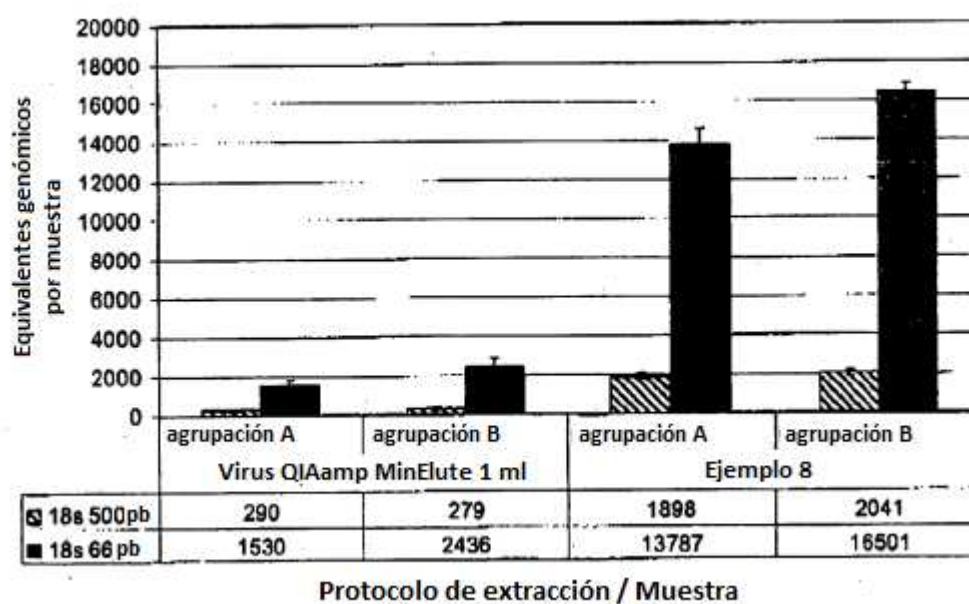


Fig. 15

Extracción de ARN circulante a partir de plasma

