

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 460**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2016 PCT/EP2016/063150**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16198519**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2016 E 16732490 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023 EP 3307907**

54 Título: **Método automatizable para el aislamiento de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**09.06.2015 EP 15171261**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.04.2024**

73 Titular/es:

**BIOCARTIS NV (100.0%)  
Generaal De Wittelaan 11B  
2800 Mechelen, BE**

72 Inventor/es:

**MEERSSEMAN, GEERT y  
DECANNIERE, KLAAS**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 965 460 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

Método automatizable para el aislamiento de ácidos nucleicos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método altamente automatizable para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, que es particularmente adecuado para ácidos nucleicos de menos de 250 pb y se puede realizar sin una etapa de digestión proteolítica previa en un sistema automatizado, preferentemente un sistema basado en cartuchos. En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona métodos automatizados de detección de ácidos nucleicos basados en dicho método de aislamiento y/o purificación. También se proporcionan, pero fuera del objeto de las reivindicaciones, tampones y kits para utilizarlos en la realización de dichos métodos.

15 **Antecedentes de la invención**

Actualmente, el aislamiento de ácidos nucleicos se realiza con mayor frecuencia basándose en uno de dos principios diferentes. El primero y anterior emplea un procedimiento de extracción de una sola etapa mediante el que se añade a una muestra biológica un tampón que contiene un agente caotrópico y un extractante orgánico (normalmente fenol y/o cloroformo). Como resultado, la mezcla así obtenida se separa en dos fases: reteniendo la fase acuosa los ácidos nucleicos y reteniendo la fase orgánica los restos no deseados que pueden desecharse. Las desventajas importantes de este procedimiento de extracción de una sola etapa son, en primer lugar, el uso de sustancias tóxicas y nocivas como fenol y/o cloroformo, y, en segundo lugar, la posible contaminación de la fase acuosa que retiene el ácido nucleico con otras sustancias hidrosolubles. Estas sustancias pueden eliminarse realizando etapas de purificación adicionales que, sin embargo, requieren mucho tiempo.

El segundo principio se basa en la adsorción seleccionada de ácidos nucleicos sobre materiales de soporte sólidos como dióxido de silicio, por ejemplo, como se divulga en el documento EP0389063, lo que proporciona un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico prácticamente libre de las desventajas enumeradas anteriormente. En resumen, el procedimiento implica la lisis, en caso necesario, del ácido nucleico que contiene el material de partida, seguida de la puesta en contacto de dicho material con el material de soporte en condiciones definidas para permitir la unión de los ácidos nucleicos al material de soporte. Opcionalmente, las etapas de lavado y elución se pueden realizar utilizando soluciones o tampones adecuados.

En el documento EP0819696 (Boom *et al.*, J. Clin. Microbiol. 1990, 28(3)), se divulga una variación bien conocida del procedimiento anterior denominada "protocolo Boom". El protocolo Boom implica aislar ácidos nucleicos de un material de partida que contiene ácidos nucleicos incubando dicho material de partida con un tampón caotrópico y una fase sólida de unión al ADN. El tampón caotrópico afecta, en caso necesario, tanto la lisis del material de partida como la unión de los ácidos nucleicos a la fase sólida.

El protocolo Boom y muchas variaciones del mismo conocidas en la técnica anterior son en su mayoría adecuados para la extracción y purificación de ácidos nucleicos de más de 1 kilobase (kb), como plásmidos bacterianos que normalmente tienen una longitud de entre 3 y 10 kb. Presumiblemente, esto puede atribuirse al hecho de que la adsorción de ácidos nucleicos de cadena corta (es decir, de menos de 250 nucleótidos (nt) de longitud) al material de soporte sólido es inferior a la de ácidos nucleicos más largos. No obstante, para determinadas aplicaciones, es deseable aislar ácidos nucleicos de cadena corta o concentrarlos en ácidos nucleicos de cadena larga, por ejemplo, para el aislamiento y la detección de ácidos nucleicos fragmentados de cadena corta que circulan en fluidos corporales, tales como el ADN libre circulante (ADNlc) que se encuentra en la sangre de pacientes con cáncer o durante el embarazo.

Para preferentemente purificar, concentrar o separar ácidos nucleicos de cadena corta de ácidos nucleicos de cadena larga, se han descrito varios protocolos. Uno de ellos se describe en el documento WO2009146776 (EP2285816) que enseña el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos con una longitud de <1000 nt uniéndolos a un material de soporte silíceo en presencia de al menos un compuesto caotrópico en una concentración de  $\geq 2$  M y  $\leq 3,5$  M e isopropanol en una concentración de  $\geq 15$  % (v/v) y  $\leq 32$  % (v/v). Sin embargo, el procedimiento adolece del inconveniente de que las condiciones mencionadas anteriormente provocan una rápida precipitación de proteínas presentes en muestras biológicas, que sin un tratamiento previo adecuado puede perjudicar sustancialmente la adsorción de ácidos nucleicos al material de soporte y también provocar la obstrucción de materiales de soporte tales como membranas o columnas de purificación. Por lo tanto, el protocolo de aislamiento divulgado en el documento EP2285816 debe ir precedido de un tratamiento proteolítico que implique al menos una incubación de 15 a 30 minutos con una proteasa (proteínasa K) a una temperatura superior a 50-60 °C, lo que es esencial para el éxito del procedimiento. El hecho de que el material de partida que contiene ácidos nucleicos debe predigerirse primero antes de ponerse en contacto con el material de soporte en presencia del caotropo e isopropanol, no solo hace que el protocolo requiera más tiempo y trabajo, lo que interfiere con su implementación eficaz en sistemas automáticos, sino que, y lo que es lo más importante, también aumenta las posibilidades de degradación de los ácidos nucleicos, en particular, de los ácidos nucleicos de cadena corta, pero también y especialmente de diferentes tipos de ARN.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es abordar los inconvenientes mencionados anteriormente proporcionando un método simple y rápido para aislar y/o purificar ácidos nucleicos, que no requiera el pretratamiento proteolítico y que sea apto para la automatización. Es importante destacar, el método de la presente invención es particularmente ventajoso para aislar ácidos nucleicos de cadena corta que tienen una longitud de <250 pb a partir de biopsias líquidas, pero también puede servir para aislar diversas especies de ácidos nucleicos intracelulares y extracelulares tales como ácidos nucleicos víricos o microARN.

**Sumario de la invención**

La presente invención se define en las reivindicaciones independientes adjuntas. Se definen realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes. En particular, la presente invención proporciona la materia objeto establecida en una cualquiera y todas las reivindicaciones adjuntas 1 a 10. En particular, la presente invención se refiere a un método para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos a partir de un material de partida que contiene ácidos nucleicos, en donde el material de partida que contiene ácidos nucleicos es una muestra biológica líquida seleccionada del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina, comprendiendo el método las etapas de:

- (a) unir los ácidos nucleicos a un material de soporte de unión a ácidos nucleicos mediante la puesta en contacto del material de partida que contiene ácidos nucleicos con el soporte de unión a ácidos nucleicos en presencia de al menos un compuesto caotrópico y al menos un alcohol; y
- (b) opcionalmente eluir los ácidos nucleicos unidos del material de soporte de unión a ácidos nucleicos con una solución de elución, tal como agua pura o un tampón de elución, por ejemplo, tampón TE;

estando el método **caracterizado por que**

- (i) el alcohol es un alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono y está presente en la etapa a) a una concentración de entre el 17 % (v/v) y el 50 % (v/v), **y por que**
- (ii) el al menos un compuesto caotrópico está presente en la etapa a) a una concentración de entre 1,5 M y 4,5 M.

Los métodos de última generación para el aislamiento de ácidos nucleicos derivados del protocolo Boom se basan en la adsorción de ácidos nucleicos a una fase sólida en presencia de etanol o isopropanol. Estos métodos conocidos requieren una predigestión proteolítica de muestras biológicas para evitar la precipitación sustancial de proteínas que ocurre en dichas condiciones, incluso habiendo un agente caotrópico presente a una alta concentración. Al emplear un alcohol de 4 o 5 átomos de carbono, la presente invención evita sustancialmente el problema de la precipitación persistente y, por tanto, también hace redundante el uso de la etapa de predigestión proteolítica convencional. Por tanto, en una realización particularmente ventajosa, la presente invención proporciona un método de aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos, en donde no se añade proteasa a la etapa a), o en donde no se incubaba con una proteasa, o ninguna etapa equivalente, se realiza antes de someter el material de partida que contiene ácidos nucleicos a la etapa a). Gracias a estas características, el método de la presente invención es particularmente adecuado para realizarse de manera automatizada.

En un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un método de diagnóstico automatizado para detectar ácidos nucleicos en un sistema automatizado, comprendiendo el método las etapas de:

- a) proporcionar un material de partida que contiene ácidos nucleicos en un sistema automatizado;
- b) aislar y/o purificar ácidos nucleicos en dicho sistema automatizado, de acuerdo con el método de aislamiento y/o purificación de acuerdo con las realizaciones anteriores;
- (c) realizar una PCR en dicho sistema automatizado en ácidos nucleicos diana aislados y/o purificados en la etapa (b); y
- (d) detectar los ácidos nucleicos diana generados en la PCR en la etapa (c), preferentemente también en dicho sistema automatizado.

A continuación, un aspecto adicional no de acuerdo con la invención reivindicada proporciona un tampón de extracción acuoso para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos, comprendiendo dicho tampón:

- (i) un alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono, a una concentración de entre el 20 % (v/v) y el 65 % (v/v), preferentemente de entre el 35 % (v/v) y el 60 % (v/v), lo más preferentemente de entre el 40 % (v/v) y el 50 % (v/v)

y

- (ii) al menos un compuesto caotrópico a una concentración de entre 3,3 M y 6,7 M, preferentemente de entre 3,5 M y 5,5 M, lo más preferentemente de entre 3,7 M y 4,5 M.

En otra realización preferida no de acuerdo con la invención reivindicada, la presente memoria descriptiva también proporciona un kit para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos, comprendiendo dicho kit al menos el

tampón de extracción acuoso como se ha descrito anteriormente. En una realización preferida no de acuerdo con la invención reivindicada, dicho kit puede tener la forma de un cartucho en donde el tampón de extracción acuoso de acuerdo con la invención se proporciona dentro de dicho cartucho.

5 Por último, también se proporcionan los usos del método de aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos mencionado anteriormente y del método de diagnóstico automatizado de acuerdo con la invención en cualquiera de los siguientes:

- 10 - aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos extracelulares;
- aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos de cadena corta que tienen una longitud <250 nt;
- aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos víricos,
- diagnóstico de infecciones, así como afecciones patológicas o estados fisiológicos.

### Definiciones

15 La expresión "*ácido nucleico*" como se usa en el presente documento se refiere a un polímero de ribonucleósidos o desoxirribonucleósidos que comprende enlaces fosfodiéster entre subunidades de nucleótidos. Los ácidos nucleicos incluyen, aunque no de forma limitativa, ADN genómico, ADNc, ARNnh, ARNm, ARNr, ARNt, microARN, ácido nucleico fragmentado, ácido nucleico obtenido de exosomas o de orgánulos subcelulares tales como mitocondrias, y ácido nucleico obtenido de microorganismos o virus que pueden estar presentes sobre o dentro de una muestra. El ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario, lineal o circular.

20 La expresión "*ácidos nucleicos de cadena corta*", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polímero de ribonucleósidos o desoxirribonucleósidos que comprende menos de <250 nt, preferentemente <200 nt o incluso <150 nt. En uno de sus aspectos especialmente favorables, la presente invención tiene por objeto proporcionar una base sólida para la detección de mutaciones relacionadas con el cáncer en biopsias líquidas como sangre y plasma de pacientes con cáncer. Algunos hallazgos recientes informan que la mayoría de los fragmentos de ADN libre que circulan en la sangre de los pacientes con cáncer miden entre 180 y 200 pb. Cabe señalar que este tamaño se correlaciona con el tamaño normal del ADN envuelto alrededor de los nucleosomas y liberado de las células tras la apoptosis, lo que también indica que el ADNc entra en la sangre a través de la liberación pasiva de las células cancerosas que mueren masivamente (véase, por ejemplo, Jahr *et al.*, Cancer Research 2001; Diaz y Bardelli, J. of Clin. Onco., 2014; y Devonshire *et al.* Anal. Bioanal. 2014). En vista del hecho de que el aislamiento de fragmentos tan pequeños es un desafío técnico y deseable por razones de diagnóstico, para los fines de la presente invención, las expresiones "*ácido nucleico de cadena corta*" y "*ácidos nucleicos de cadena corta*" deben interpretarse como aquellos relacionados con ácidos nucleicos de tamaño inferior a los 250 nt especificados anteriormente.

35 Como se usa en el presente documento, por las expresiones "*ácidos nucleicos extracelulares*" o "*ácido nucleico extracelular*" se entienden ácidos nucleicos que no están contenidos en las células y se refieren tanto al ARN extracelular como al ADN extracelular y sus mezclas. Los respectivos ácidos nucleicos extracelulares también se suelen denominar ácidos nucleicos libres circulantes, como el ADN libre circulante (ADNlc) o ARN libre circulante (ARNlc). Por consiguiente, los ácidos nucleicos extracelulares suelen estar presentes fuera de una célula o fuera de una pluralidad de células interconectadas. Se pueden encontrar ejemplos de ácidos nucleicos extracelulares típicos, por ejemplo, en una fracción (o porción) libre circulante de una muestra biológica tal como un líquido corporal o una muestra derivada de un líquido corporal tal como, por ejemplo, plasma sanguíneo. Los ácidos nucleicos extracelulares incluyen, pero sin limitación, ácidos nucleicos extracelulares de mamíferos tales como, por ejemplo, ADN y/o ARN extracelular asociado a tumores o derivado de tumores, otro ADN y/o ARN extracelular relacionado con enfermedades, ADN modificado epigenéticamente, ADN y/o ARN fetal, pequeños ARN de interferencia tales como, por ejemplo, miARN y ARNip. Estos ácidos nucleicos extracelulares de mamíferos pueden existir como mononucleosomas y oligonucleosomas, o pueden unirse a las superficies de las células sanguíneas mediante proteínas que albergan propiedades de unión a ácidos nucleicos. Además, los ácidos nucleicos extracelulares también incluyen de manera importante ácidos nucleicos extracelulares de no mamíferos tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos víricos, ácidos nucleicos patógenos liberados en la población de ácidos nucleicos extracelulares, por ejemplo, de procariotas (por ejemplo, bacterias), virus u hongos.

55 En muchas afecciones y procesos infecciosos, la detección de la presencia o el cambio en los niveles de ácidos nucleicos extracelulares y/o de cadena corta es de interés para el cribado, el diagnóstico, el pronóstico y la vigilancia de la progresión de la enfermedad, la identificación de posibles dianas terapéuticas y el control de la respuesta al tratamiento. De manera adicional, el ADN/ARN fetal elevado en la sangre materna se está utilizando para determinar, por ejemplo, la identidad de género, evaluar anomalías cromosómicas y controlar complicaciones asociadas al embarazo. Además de los ácidos nucleicos extracelulares de mamíferos que proceden, por ejemplo, de células tumorales o del feto, las muestras que comprenden ácidos nucleicos extracelulares de cadena corta también pueden comprender otros ácidos nucleicos de interés que no están comprendidos en las células, por ejemplo, ácidos nucleicos patógenos como ácidos nucleicos víricos o bacterianos. El aislamiento eficaz de ácidos nucleicos víricos o bacterianos a partir de muestras, tales como, en particular, muestras de sangre o muestras derivadas de sangre, también es importante para muchas aplicaciones de diagnóstico.

Además, como se utilizan en el presente documento los términos "*muestra*" o "*muestra biológica*" pretenden incluir una variedad de fuentes biológicas que contienen ácido nucleico y/o material celular. El ácido nucleico y/o el material celular de las células que se analizan sirven para determinar si están presentes uno o varios marcadores concretos. Las muestras incluidas son muestras de cultivos de células, microorganismos eucariotas o muestras de diagnóstico tales como un líquido corporal, precipitado de líquido corporal, muestra de lavado, material aspirado con aguja fina, muestra de biopsia, muestra de tejido, células cancerosas, células de un paciente, células de un tejido o células cultivadas *in vitro* de un individuo que está siendo analizado y/o tratado por una enfermedad o infección, o muestras forenses. Algunos ejemplos no limitados de muestras de líquidos corporales incluyen sangre completa, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido linfático, suero, plasma, orina, quilo, heces, semen, esputo, aspirado del pezón, saliva, muestra de hisopos, líquido de lavado y/o muestras de cepillo. En una realización preferida de la presente invención, el material de partida que contiene ácidos nucleicos se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre completa, una muestra de suero o una muestra de plasma.

### Breve descripción de los dibujos

Con referencia específica ahora a las figuras, se subraya que los detalles mostrados son solo a modo de ejemplo y con fines de análisis ilustrativo de las diferentes realizaciones de la presente invención. Se presentan con el fin de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este sentido, no se intenta mostrar los detalles de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención. La descripción sirve para ilustrar a los expertos en la materia cómo pueden llevarse a la práctica diversas realizaciones de la invención y las figuras, como se resume a continuación sirven para respaldar la descripción, en donde:

**Fig. 1:** muestra las diferencias en los niveles de precipitación de proteínas en función del tipo de alcohol mezclado con una muestra biológica y un agente caotrópico presente a alta molaridad.

**Fig. 2:** muestra las diferencias de las propiedades de unión del ADN a un material de unión silíceo en función de la concentración de sal caotrópica y según el tipo de alcohol.

**Fig. 3:** muestra las velocidades de extracción de fragmentos cortos de ADN de 50 pb (barras claras) y 150 pb (barras oscuras) en presencia de n-butanol al 44 % en función de la concentración de GuSCN.

**Fig. 4:** muestra los resultados de un análisis de mutación de BRAF realizados en ácidos nucleicos extracelulares aislados de muestras clínicas de plasma o LCR utilizando un protocolo de extracción de ácidos nucleicos totalmente automatizado sin tratamiento con proteasas.

**Fig. 5:** muestra el rendimiento de diferentes alcoholes durante la extracción y el análisis de un ARN vírico a partir de muestras de sangre completa.

**Fig. 6:** muestra los resultados de la RT-qPCR para una detección totalmente automatizada del ARN vírico del Ébola.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un método para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos a partir de un material de partida que contiene ácidos nucleicos, en donde el material de partida que contiene ácidos nucleicos es una muestra biológica líquida seleccionada del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina, comprendiendo el método las etapas de:

(a) unir los ácidos nucleicos a un material de soporte de unión a ácidos nucleicos mediante la puesta en contacto del material de partida que contiene ácidos nucleicos con el soporte de unión a ácidos nucleicos en presencia de al menos un compuesto caotrópico y al menos un alcohol; y

(b) opcionalmente eluir los ácidos nucleicos unidos del material de soporte de unión a ácidos nucleicos con una solución de elución, tal como agua pura o un tampón de elución, por ejemplo, tampón TE;

estando el método **caracterizado por que**

(i) el alcohol es un alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono y está presente en la etapa a) a una concentración de entre el 17 % (v/v) y el 50 % (v/v), **y por que**

(ii) el al menos un compuesto caotrópico está presente en la etapa a) a una concentración de entre 1,5 M y 4,5 M.

Los alcoholes con 4 o 5 átomos de carbono, en particular, los monohidroxílicos como butanoles y pentanoles, tienen una solubilidad limitada con el agua presente de forma natural en las muestras biológicas, y se separan de ella formando un sistema bifásico. Por este motivo, estos alcoholes no se utilizan con tanta frecuencia en los procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos como otros mucho más populares y que se mezclan bien con medios acuosos como el etanol y el isopropanol. En vista de lo anterior, la presente invención se basa en dos

observaciones inesperadas: en primer lugar, que el sistema bifásico que se forma de manera natural entre el 50 % de agua y el 50 % de mezcla de butanol o pentanol se fusiona en una solución monofásica estable y uniforme (bajo STP, condiciones normales de temperatura y presión) cuando se añade un compuesto caotrópico a dicha mezcla hasta una molaridad de aproximadamente 1,5 M o superior. En segundo lugar, se observó que en las condiciones descritas anteriormente, los butanoles o pentanoles no solo permiten la unión de ácidos nucleicos a la sílice, pero también proporcionan condiciones suficientemente hidrófobas para evitar (o al menos ralentizar sustancialmente) la agregación y precipitación inmediata de las proteínas presentes en muestras biológicas.

La presente invención proporciona condiciones de extracción de ácidos nucleicos prácticamente exentas de precipitación de proteínas que al mismo tiempo permiten que el ácido nucleico se una a los materiales de unión de ácidos nucleicos convencionales. En primer lugar, esto elimina la necesidad de realizar una predigestión proteolítica de muestras que requiere mucho tiempo, que, de lo contrario, sufrirían una precipitación extensa que bloquearía las superficies de unión de los ácidos nucleicos. En segundo lugar, gracias a la aceleración y simplificación del procedimiento conseguidas, el presente método también puede automatizarse fácilmente. Como consecuencia, en una realización particularmente preferida, el método de la invención se puede realizar sin añadir ninguna proteasa a la etapa a), o sin realizar ninguna incubación con una proteasa directamente antes de someter el material de partida que contiene ácidos nucleicos a la etapa a).

Habitualmente, la unión del ácido nucleico en el presente método de la invención se realiza mediante adsorción de sílice. Por lo tanto, en realizaciones comunes, el material de soporte de unión a ácido nucleico comprenderá sílice, seleccionada preferentemente entre cualquiera de los siguientes materiales síliceos: gel de sílice, dióxido de silicio, vidrio, zeolita, caolín, gel de sílice, cerámicas, membranas o resinas de sílice (como en una columna) y partículas magnéticas que tienen una superficie de sílice o vidrio. El material de soporte de unión puede ser de cualquier forma conocida en la técnica, incluyendo partículas, micropartículas, gel, fibras, perlas, membranas, columnas y otros soportes tales como tubos de ensayo y micropocillos, pero preferentemente será una membrana o una columna.

En una realización típica, el método de acuerdo con la presente invención normalmente comprenderá además al menos una, posiblemente más, etapas de lavado entre las etapas a) y b). Como apreciará cualquier experto en la materia, tales etapas de lavado de ácidos nucleicos inmovilizados son bien conocidas en la técnica y convencionalmente emplean soluciones de etanol de diferentes concentraciones, normalmente del 50 %, 70 % o 75 %, aunque también se pueden utilizar otras soluciones de lavado o tampones.

A continuación, los ácidos nucleicos unidos al soporte de unión a ácidos nucleicos de acuerdo con la invención se pueden procesar o analizar adicionalmente de cualquier manera conocida en la técnica. Por ejemplo, dependiendo de las etapas planificadas posteriores, es posible utilizar los ácidos nucleicos unidos al material de soporte sin elución. Por esta razón, la etapa b) del presente método se describe como opcional.

En realizaciones preferidas del método proporcionado en el presente documento, el alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono es un alcohol monohidroxílico, es decir, butanol o pentanol, incluida cualquier isoforma del mismo. Por lo tanto, el alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono se selecciona preferentemente del grupo formado por n-butanol, sec-butanol, isobutanol, *terc*-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil-2-butanol, o una mezcla de los mismos. Se observó que algunas de estas isoformas de butanol y propanol funcionaban particularmente bien; por consiguiente, más preferentemente, el alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono se selecciona del grupo que consiste en n-butanol, 1-pentanol, sec-butanol, isobutanol, *terc*-butanol, o una mezcla de los mismos. Lo más preferentemente, el alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono probablemente será n-butanol.

En realizaciones preferidas, la concentración del alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono en la etapa a) está comprendida entre el 20 % (v/v) y el 50 % (v/v), preferentemente entre el 25 % (v/v) y el 50 % (v/v), más preferentemente entre el 30 % (v/v) y el 45 % (v/v), lo más preferentemente entre el 35 % (v/v) y el 40 % (v/v).

En realizaciones preferidas adicionales, el al menos un compuesto caotrópico es un compuesto caotrópico potente, es decir, que comprende cualquiera de los grupos aniónicos intensamente caotrópicos tales como SCN<sup>-</sup>, NCS<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> o Cl<sub>3</sub>CCOO<sup>-</sup>; y/o que comprende cualquiera de los grupos catiónicos intensamente caotrópicos tales como guanidinio. Preferentemente, el compuesto caotrópico se selecciona entre tiocianatos, isocianatos, percloratos o mezclas de los mismos. Lo más preferentemente, será tiocianato de guanidinio o isotiocianato de guanidinio. Sin embargo, como alternativa, también puede ser un caotropo más débil, por ejemplo, yoduro de sodio, perclorato de sodio, clorhidrato de guanidinio, acetato de litio, etc.; proporcionado a una concentración más alta.

En realizaciones preferidas, la concentración del compuesto caotrópico en la etapa a) del método de la invención está comprendida entre 2 M y 4,5 M, en algunas realizaciones, preferentemente entre 2,5 M y 4 M, o más preferentemente entre 3 M y 3,5 M.

Debido a su capacidad para proporcionar condiciones para el aislamiento eficaz de ácidos nucleicos de menos de <250 pb, el método de la invención también proporciona una forma eficaz de aislar/purificar ácidos nucleicos libres circulantes, tales como ADN o ARN bicatenarios o monocatenarios derivados de células apoptóticas o necróticas, o

excretados intencionalmente por diversos tipos de células durante la señalización intracelular. Tales ADN o ARN de cadena corta pueden, por ejemplo, detectarse en biopsias líquidas e indicar un estado fisiológico o patológico, como el embarazo, uno en curso, por ejemplo, infección viral, inflamación o cáncer. Por tanto, en una realización preferida, el presente método se emplea para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos de cadena corta, definidos en el presente documento como que aquellos que tienen una longitud inferior a 250 nt (<250 nt), preferentemente de aproximadamente el tamaño de o inferior a 200 nt.

A este respecto, el material de partida que contiene ácidos nucleicos sometido al método de la invención es una muestra biológica líquida seleccionada del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina. Todo lo anterior se puede usar fácilmente para detectar la presencia/tipo de ácidos nucleicos extracelulares presentes en la matriz libre circulante de dichas muestras, o en la matriz intracelular presente entre las células suspendidas en dicha matriz o en las superficies de dichas células.

Sin embargo, cabe señalar que, en posibles realizaciones, el presente método también permite aislar ácidos nucleicos intracelulares, tales como ADN genómico, diferentes tipos de ARN celular, ARN pequeños como los microARN en particular, así como ácidos nucleicos de patógenos intracelulares como virus o protozoos, por ejemplo *Plasmodio*. En dichas realizaciones, el material de partida que contiene ácidos nucleicos sometido al método de la invención puede ser un sedimento celular, y preferentemente es una suspensión de células en cualquier líquido, tal como PBS u otro tampón.

En realizaciones preferidas adicionales, el presente método también se puede emplear para la detección de ácidos nucleicos víricos patógenos, en particular, los presentes en los líquidos corporales de los mamíferos, ya sea en su fracción libre circulante o todavía dentro de sus células hospedadoras. Algunos ejemplos de virus patógenos que pueden detectarse después del aislamiento/purificación del ácido nucleico realizado de acuerdo con el presente método son virus con envoltura de ARN de cadena negativa tales como el virus del Ébola. Por lo tanto, en una posible realización, el material de partida que contiene ácidos nucleicos es sangre completa y el presente método se realiza para aislar y/o purificar ARN del virus del Ébola.

En una realización particular de la invención, la etapa a), más preferentemente, ambas etapas a) y b) del presente método se realizan a una temperatura de  $\geq 4$  °C y  $\leq 40$  °C, preferentemente de  $\geq 15$  °C y  $\leq 25$  °C. En esencia, la reacción no es particularmente sensible a la temperatura, proporcionando así una ventaja adicional sobre los procedimientos de aislamiento conocidos en la técnica. Esto permite que el método se lleve a cabo a temperatura ambiente normal, sin la presencia de ningún sistema especializado de regulación de temperatura, incluso en zonas tropicales.

Por lo tanto, el presente método no solo tiene las ventajas de ser robusto y funcional a temperaturas ambiente (aproximadamente 20 °C), sino que también es fácilmente adaptable para una automatización total. Por tanto, en una realización ventajosa que requiere una manipulación mínima y sin conocimientos avanzados de laboratorio, el método de la invención se realiza en un sistema automatizado. Los sistemas automatizados adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la plataforma Idylla de Biocartis NV. Por tanto, en una realización ventajosa adicional, se proporciona un método en donde las etapas a) y b) se realizan preferentemente en un cartucho que se puede acoplar y retirar de dicho sistema automatizado. Un ejemplo de tal cartucho se puede hallar en el documento EP1904234.

A este respecto, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de diagnóstico automatizado para detectar ácidos nucleicos en un sistema automatizado, comprendiendo el método las etapas de:

- a) proporcionar un material de partida que contiene ácidos nucleicos en un sistema automatizado;
- b) aislar y/o purificar ácidos nucleicos en dicho sistema automatizado, de acuerdo con el método de aislamiento y/o purificación de acuerdo con las realizaciones anteriores;
- c) realizar la amplificación en dicho sistema automatizado de ácidos nucleicos diana aislados y/o purificados en la etapa (b); y
- (d) detectar los ácidos nucleicos diana amplificados en la etapa (c), preferentemente también en dicho sistema automatizado.

En realizaciones preferidas, la amplificación en la etapa (c) se realizará mediante PCR. Sin embargo, también se puede realizar utilizando un método alternativo de amplificación de ácidos nucleicos, tal como los enfoques isotérmicos más recientes que incluyen la amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación mediada por bucle, amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico, amplificación por desplazamiento de cadena o amplificación por desplazamiento múltiple. Como alternativa, la etapa (c) en lugar de implicar la amplificación de ácidos nucleicos diana, puede implicar la generación de señales a partir de dichos ácidos nucleicos diana aislados y/o purificados en la etapa (b) y la amplificación de dichas señales de acuerdo con cualquier técnica conocida en la técnica. En tales casos, la siguiente etapa (d) implicaría detectar las señales amplificadas en la etapa (c), preferentemente también en dicho sistema automatizado. Un ejemplo de dicha técnica de amplificación de señales compatible con la realización mencionada anteriormente del método de acuerdo con la invención es el ensayo de ADN ramificado (ADNr) que se puede utilizar, por ejemplo, en un ensayo de ADN ramificado (ADNr) para evaluar la carga vírica en una muestra.

En realizaciones particularmente preferidas de dicho método de diagnóstico automatizado, no se realiza ninguna incubación con una proteasa entre las etapas a) y b) o durante la etapa b).

5 En una realización preferida, la PCR realizada en la etapa c) del presente método de diagnóstico automatizado es una PCR cuantitativa (qPCR).

En otra realización preferida, compatible con las realizaciones anteriores, se proporciona un método de diagnóstico automatizado en donde al menos las etapas (b) y (c) se realizan en un cartucho que se puede acoplar y retirar del sistema automatizado.

10 En una realización, el presente método de diagnóstico automatizado permite detectar ácidos nucleicos extracelulares tales como ácidos nucleicos víricos o ADN circulante fetal o derivado de tumores.

15 En línea con este último ejemplo, en una segunda realización preferida, el método de diagnóstico automatizado también permite la detección de ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud <250 nt, preferentemente igual o menor que aproximadamente 200 nt, tales como microARN o fragmentos cortos de ADN bicatenario (bc) tales como el ADN circulante fetal o derivado de tumores mencionado anteriormente.

20 En una realización alternativa, el método de diagnóstico automatizado de la invención permite detectar ácidos nucleicos víricos que pueden estar presentes tanto en la fracción celular como en la extracelular del material de partida que contiene ácidos nucleicos. En una realización particularmente preferida de dicho método de diagnóstico automatizado, el ácido nucleico detectado es un ácido nucleico del virus del Ébola. En una realización ventajosa, el ácido nucleico del virus del Ébola es el ARN del Ébola. En tal realización, la PCR realizada en la etapa c) es preferentemente una PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), más preferentemente una PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (qRT-PCR). En tales casos, el material de partida que contiene ácidos nucleicos será lo más preferentemente sangre completa; sin embargo, también puede ser orina.

30 Las sales caotrópicas como GuSCN no se disuelven en butanoles ni pentanoles. Por lo tanto, para lograr las condiciones de aislamiento/purificación de ácidos nucleicos de la presente invención, el compuesto caotrópico se puede disolver directamente en una muestra líquida como plasma, suero o LCR, tras lo que se puede añadir el alcohol apropiado de 4 o 5 átomos de carbono. Más convenientemente, sin embargo, las condiciones de aislamiento/purificación se crean mezclando una muestra biológica o suspendiéndola en un tampón de extracción acuoso que comprenda el caotropo y el alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono en una concentración más alta.

35 Por tanto, en un aspecto adicional no de acuerdo con la invención reivindicada, la presente memoria descriptiva también proporciona un tampón de extracción acuoso para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos, comprendiendo dicho tampón

40 (i) un alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono, a una concentración de entre el 20 % (v/v) y el 65 % (v/v), preferentemente entre el 35 % (v/v) y el 60 % (v/v), lo más preferentemente de entre el 40 % (v/v) y el 50 % (v/v)

y

45 (ii) al menos un compuesto caotrópico a una concentración de entre 3,3 M y 6,7 M, preferentemente de entre 3,5 M y 5,5 M, lo más preferentemente de entre 3,7 M y 4,5 M.

50 Como este tampón de extracción acuoso se va a utilizar en los métodos de la invención, aquí también se aplican los mismos alcoholes y caotropos preferidos de 4 o 5 átomos de carbono mencionados. Por tanto, el alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono se selecciona preferentemente del grupo que consiste en n-butanol, 1-pentanol, sec-butanol, isobutanol, *terc*-butanol, o una mezcla de los mismos, y lo más preferentemente es n-butanol. De manera análoga, el al menos un compuesto caotrópico comprendido en el presente tampón de extracción se selecciona preferentemente entre tiocianatos, isocianatos, percloratos, clorhidratos o mezclas de los mismos; y lo más preferentemente es tiocianato de guanidinio o isotiocianato de guanidinio.

55 En un siguiente aspecto no de acuerdo con la invención reivindicada, la presente divulgación también proporciona un kit para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos, preferentemente ácidos nucleicos de cadena corta y/o extracelulares o víricos, a partir de un material de partida que contiene ácidos nucleicos, el kit comprende al menos el tampón de extracción. Dicho kit también puede comprender elementos adicionales típicos como instrucciones de uso del kit, pero ventajosamente comprenderá además cualquiera o todos los siguientes:

60 (a) un material de soporte de unión a ácidos nucleicos adecuado para unirse a ácidos nucleicos, tal como un material silíceo;  
 (b) una solución de lavado tal como un tampón de lavado;  
 (c) una solución de elución tal como un tampón de elución.

65 En una realización preferida no de acuerdo con la invención reivindicada, el kit comprende un cartucho que se puede acoplar con un sistema automático de elección, en donde al menos el tampón de extracción se proporciona dentro del

cartucho.

En otras realizaciones preferidas no de acuerdo con la invención reivindicada, el cartucho comprende además un compartimento de aislamiento y/o purificación de ácido nucleico que comprende el material de soporte de unión a ácido nucleico, en donde dicho compartimento de aislamiento y/o purificación de ácido nucleico alberga o contiene dicho tampón de extracción o está en comunicación fluida con otro compartimento de cartucho que alberga dicho tampón de extracción. Preferentemente, dicho cartucho comprende además compartimentos adicionales en comunicación fluida con el compartimento de aislamiento y/o purificación de ácido nucleico, comprendiendo dichos compartimentos adicionales, por ejemplo, las soluciones de lavado o soluciones de elución, etc.

Finalmente, en otro aspecto, la presente invención proporciona un uso del método de aislamiento/purificación de la invención en cualquiera de los siguientes:

- aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos extracelulares, tal como, entre otros, ácidos nucleicos de patógenos como virus, de exosomas, así como ácidos nucleicos fetales o derivados de tumores;
- aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud <250 nt, lo más preferentemente igual o inferior a aproximadamente 200 nt;
- aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos víricos, tal como ARN del Ébola;
- diagnóstico de infecciones (por ejemplo, víricas, bacteriológicas, fúngica o protozoicas), afecciones patológicas (por ejemplo, cáncer) o estados fisiológicos (por ejemplo, embarazo).

Otros campos de aplicación, sin embargo, se pueden encontrar fuera del área de diagnóstico, por ejemplo, en medicina forense u otros campos en los que la purificación de ácidos nucleicos de cadena corta es crucial.

Los usos enumerados anteriormente se aplican a un material de partida que contiene ácidos nucleicos que se selecciona entre una muestra de biopsia líquida, tal como una muestra de sangre completa, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de LCR; o una muestra de orina.

En línea con lo anterior, está dentro de un aspecto particular de la presente invención, que el presente método de aislamiento/purificación de ácidos nucleicos se utilice en un sistema automático, por ejemplo, un sistema de cartuchos.

### Ejemplos

La presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que los alcoholes que son más hidrófobos que el etanol y el isopropanol, y que normalmente no se mezclan con agua, son particularmente adecuados para realizar la extracción de ácidos nucleicos basada en adsorción de sílice en presencia de un agente caotrópico con una molaridad superior a al menos 1,5 M.

Ya se sabe por el protocolo Boom, que la unión de los ácidos nucleicos a la sílice se ve favorecida en presencia de alcoholes como el etanol o el isopropanol. Sin embargo, ambos alcoholes, cuando están presentes en la concentración requerida, provocan la agregación inmediata de proteínas, lo que conduce a la obstrucción irreversible de las membranas de sílice y al atrapamiento inespecífico de los ácidos nucleicos. Como consecuencia, en un protocolo de Boom típico, se requiere una digestión extensa con proteasas para reducir suficientemente la longitud del péptido y así prevenir este impedimento.

La presente invención evita la necesidad de una etapa de tratamiento con proteasas proporcionando un método para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos a partir de un material de partida que contiene proteínas y ácidos nucleicos, en donde dicho material de partida que contiene proteínas y ácidos nucleicos se pone en contacto con un material de soporte de unión a ácidos nucleicos en presencia de al menos un compuesto caotrópico en una concentración de entre 1,5 M y 4,5 M y al menos un alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono en una concentración de entre el 17 % (v/v) y el 50 % (v/v).

El papel del agente caotrópico dentro de este intervalo de molaridad es, en primer lugar, proporcionar la mezcla del alcohol de 4 o 5 átomos de carbono con agua (ya sea añadida o presente en el material de partida que contiene ácidos nucleicos, por ejemplo, una muestra biológica) y, en segundo lugar, proporcionar una acción caotrópica suficiente para desnaturizar las proteínas presentes en el material de partida que contiene ácidos nucleicos y así, hasta cierto punto, volverlas inactivas. Esto último es particularmente importante si el ácido nucleico aislado es ARN, que sería inmediatamente atacado y digerido por una gran cantidad de ribonucleasas en la mayoría de las muestras biológicas.

Por otra parte, el papel del alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono, siendo preferentemente butanol o pentanol, es, en primer lugar, proporcionar condiciones que permitan la unión del ácido nucleico al material de soporte (normalmente sílice); y, en segundo lugar, mientras tanto, mantener las proteínas desnaturizantes suficientemente solubles para no interferir con la unión eficaz de los ácidos nucleicos al soporte. Por lo tanto, el uso selectivo de butanoles y/o pentanoles en las condiciones de aislamiento de ácidos nucleicos dadas reduce sustancialmente la precipitación de proteínas, haciendo así redundante un pretratamiento con proteasa.

La capacidad descrita anteriormente está bien demostrada en la Figura 1, que representa una muestra de plasma mezclada con una gran cantidad de tiocianato de guanidinio (GuSCN) y dividida en tres réplicas de 1 ml, cada una de las cuales se diluyó, a continuación, dos veces con el alcohol respectivo seleccionado entre (1) etanol (indicado como "etOH"), (2) isopropanol (indicado como "propOH") y (3) butanol (indicado como "butOH"). Tras la adición de los respectivos alcoholes hasta la concentración final del 50 %, la concentración final de GuSCN en estas réplicas fue de aproximadamente 2 M. Como se puede apreciar en la Figura 1, las soluciones de plasma-GuSCN mezcladas con etanol o isopropanol se volvieron visiblemente turbias debido a la precipitación de proteínas intensa y casi inmediata a temperatura ambiente. Por el contrario, como lo demuestra una escala fácilmente visible en el tubo que contiene la muestra, no se formaron precipitados en la mezcla de plasma-GuSCN con butanol. Esto último generalmente se aplica a otros compuestos probados dentro del intervalo de concentración especificado anteriormente, GuSCN y mezclas de butanol o pentanol con agua y plasma o sangre completa, incluidos, por ejemplo, GuSCN 2,9 M y n-butanol al 50 %, *tert*-butanol 2,9 M y al 51 %, GuSCN 3,7 M y 1-pentanol al 32 %, GuSCN 3,2 M y 1-pentanol al 38 %, GuSCN 2,9 M y 3-pentanol al 46 %. El tipo de precipitados, cuando eran visibles, que se formaron en estas soluciones dependía naturalmente de cuán densa en proteínas era la muestra biológica analizada (por ejemplo, la sangre completa es un material que da más problemas que el plasma). Sin embargo, en general, eran transparentes y a veces solo podían verse después de la centrifugación.

La siguiente etapa era comparar la capacidad de los ácidos nucleicos presentes en muestras de plasma tratadas con diferentes concentraciones de un agente caotrópico para unirse a un material de soporte sílice en presencia de etanol, isopropanol o butanol. Para ello, primero se combinaron varias muestras de plasma, se dividieron en repeticiones que contenían el 58 % de uno de los tres alcoholes y GuSCN en diferentes concentraciones seleccionadas entre 1,1 M, 2,2 M, 3,3 M, 4,4 M y 5,5 M. Se mantuvo una muestra de plasma y alcohol de elección al 58 % para cada alcohol como control de unión sin agregar GuSCN (muestra "0,0"). Después, se añadió cada una de dichas mezclas preparadas de plasma/GuSCN/alcohol y se agitó con pequeños oligonucleótidos de 50 y 150 pb marcados con diferentes colorantes fluorescentes (Rojo Texas y Atto647N). Se midieron los valores de fluorescencia de cada mezcla, tras lo que todas las mezclas se sometieron a aislamiento de ácidos nucleicos en columnas de sílice. A continuación, se eluyeron los ácidos nucleicos adsorbidos en sílice en tampón TE, seguido de una segunda medición de fluorescencia en flujo continuo. La Figura 2 muestra los valores de fluorescencia relativos de la segunda medición con respecto a la primera medición (eje y) en las muestras analizadas (eje x), normalizados con respecto a TE. Los resultados muestran que, de hecho, no se necesita ningún agente caotrópico para que el ADN pase a través de una membrana de sílice mientras esté presente al menos un 50 % de etanol o propanol. Para estos alcoholes, se observó una fuerte precipitación en todas las concentraciones de GuSCN y el rendimiento de ADN fue mayor sin GuSCN o con GuSCN 1,1 M, donde la precipitación fue la más baja. Por otro lado, para el butanol, se observaron dos fases líquidas separadas sin GuSCN e incluso con GuSCN 1,1 M, lo que podría explicar las peores eficiencias de extracción en la columna. Sin embargo, a concentraciones de GuSCN de 2,2 M y superiores, la mezcla de plasma-butanol era una solución uniforme y transparente y dio como resultado tasas de extracción de ADN mucho mejores en comparación con las correspondientes mezclas de etanol o isopropanol. Esto último probablemente pueda explicarse debido a una precipitación de proteínas más fuerte en concentraciones más altas de GuSCN en muestras de etanol e isopropanol, lo que probablemente provoca el atrapamiento de ácidos nucleicos en complejos proteicos y el bloqueo de la membrana de sílice. A diferencia de ello, no se observó precipitación de proteínas en el plasma tratado con butanol al menos hasta una concentración de GuSCN de 4,4 M.

Para determinar la eficacia de la unión del ADN de cadena corta a la membrana de sílice en función de la concentración del agente caotrópico, se prepararon ocho muestras de plasma y n-butanol al 44 % que contenían diferentes concentraciones de GuSCN (de 0,6 M a 2,5 M) como se ha descrito anteriormente y se les añadieron pequeñas cantidades de los dos oligonucleótidos marcados de manera diferente de 50 pb (marcado con Rojo Texas) y 150 pb (marcado con Atto647N) de tamaño. Las muestras se cargaron directamente (es decir, sin tratamiento con proteasa) en columnas de sílice, tras lo que los ácidos nucleicos unidos se eluyeron con 500 ul de TE. Para diferenciar los fragmentos de oligonucleótido de 50 pb y 150 pb recuperados en el flujo continuo, las muestras se resolvieron por tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa. Se midió la fluorescencia para cada fragmento en su longitud de onda de emisión apropiada y se expresó como resultados de fluorescencia relativa normalizando con respecto a la fluorescencia de entrada en TE para ambos fragmentos, como se muestra en la Figura 3, en donde las barras más claras muestran la recuperación del fragmento más corto de 50 pb y las barras más oscuras del fragmento ligeramente más largo de 150 pb. A veces se observan valores superiores al 100 % y son simplemente una consecuencia de las normalizaciones y la variabilidad experimental en ambas mediciones de fluorescencia. Sin embargo, se pueden ver claramente las tendencias: los resultados muestran que con concentraciones crecientes del agente caotrópico, aumenta la cantidad unida del fragmento más corto de 50 pb y del fragmento de 150 pb. Se observó un hallazgo similar al aumentar las concentraciones de alcohol, lo que también fue favorable para el aislamiento preferencial de fragmentos más cortos (datos no mostrados).

El aislamiento descrito anteriormente de los fragmentos de oligonucleótidos cortos (50 pb y 150 pb) añadidos al plasma muestra que el método de la invención no solo permite la recuperación eficaz incluso de ácidos nucleicos de cadena muy corta de una muestra biológica compleja, sino que también permite eliminar el tratamiento con proteasas, lo que se requiere en los protocolos del estado de la técnica para evitar la obstrucción o el bloqueo del soporte de unión de ácido nucleico. Esto último confiere así una ventaja importante frente a las conocidas extracciones de ácidos nucleicos basadas en etanol o isopropanol, en donde la digestión con proteasas que requiere mucho tiempo (a menudo

aproximadamente 1 hora) a temperaturas elevadas es absolutamente necesaria. Como resultado, el método de aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, así como los tampones y kits de extracción proporcionados en el presente documento, también se puede utilizar para extracciones de ADN o ARN totalmente automatizadas en sistemas automatizados, por ejemplo, sistemas basados en cartuchos.

5 Para probar lo anterior, se incluyeron tampón de extracción acuoso que comprendía n-butanol al 44 % y GuSCN 3,7 M dentro de un cartucho microfluidico de prueba de mutaciones de BRAF Biocartis Idylla en lugar del tampón de lisis convencional que se encuentra actualmente presente en los cartuchos de prueba de mutaciones de BRAF Idylla disponibles en el mercado. Se colocaron 1 ml de plasma y 1 ml de LCR obtenidos de pacientes con melanoma con mutaciones de BRAF V600E confirmadas en los compartimentos de recepción de muestras de dos de estos cartuchos de prueba de mutaciones de BRAF Idylla modificados, respectivamente, tras lo que se cerraron los cartuchos y se introdujeron en la plataforma automatizada Idylla, tras lo que se realizaron automáticamente todas las etapas posteriores. En particular, ambos cartuchos de prueba de BRAF se configuraron para mezclar 5,5 ml de n-butanol al 44 % y tampón de extracción GuSCN 3,7 M con la muestra clínica respectiva durante la lisis de la muestra y la etapa de extracción nucleica. Los ácidos nucleicos unidos a la membrana se lavaron con un tampón de lavado que comprendía etanol al 90 % y se eluyeron de la membrana con tampón de PCR x1 (KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Tris 10 mM, pH 8,6 a 25 °C) y se sometieron a una qPCR multiplexada diseñada para detectar BRAF WT, BRAF V600E y BRAF V600K/R. En paralelo, para evaluar la eficacia de la extracción automatizada de ácido nucleico del ADN circulante derivado de tumores en el cartucho Idylla, descrito anteriormente, también se extrajeron ácidos nucleicos de las mismas muestras utilizando un eficiente kit de extracción de ácidos nucleicos a base de isopropanol y GuSCN disponible en el mercado. La extracción se realizó manualmente en una columna de acuerdo con las instrucciones del fabricante, incluida la incubación con proteinasa K durante 1 hora a 60 °C, debido al hecho de que: (i) los volúmenes utilizados en dicho protocolo exceden la capacidad del cartucho, y también porque (ii) sin la digestión con Proteinasa K, la extracción no puede continuar debido a la gran precipitación que causa la obstrucción de la columna o la membrana. Después de la extracción manual, se cargaron los ácidos nucleicos purificados a partir de plasma y LCR directamente en cartuchos de prueba de mutaciones de BRAF y se analizaron mediante qPCR como se ha descrito anteriormente. Los resultados de ambas estrategias de extracción realizadas en muestras de plasma y SFC se muestran en la Figura 4. Tanto el análisis totalmente automatizado en el cartucho como el protocolo semiautomático (extracción manual de sobremesa seguida del análisis qPCR en el cartucho) arrojaron resultados comparables y lograron detectar la mutación de BRAF V600E tanto en plasma como en LCR.

Los resultados anteriores demuestran la idoneidad del método de la invención para el aislamiento de ADN muy corto y extracelular a partir de muestras humanas, utilizando el principio de adsorción a sílice sin necesidad de pretratar dichas muestras con una proteasa. La eliminación del tratamiento con proteasas, que generalmente se realiza a temperaturas elevadas, es particularmente deseable para los protocolos destinados a aislar y/o purificar ARN, que es mucho más vulnerable a la degradación en comparación con el ADN. Por lo tanto, el método de la invención también se ha probado para aislar y detectar ARN monocatenario del virus del Ébola en muestras de sangre entera humana.

Para ello, como primera etapa, se probaron diferentes tampones de extracción que comprenden diferentes alcoholes que contienen 4 o 5 átomos de carbono y diferentes concentraciones de GuSCN. Cabe señalar que la sangre como material de partida es extremadamente compleja debido a que es rica en contenido de proteínas y también en varios complejos, tales como los grupos hemo. Adicionalmente, la sangre es rica en ribonucleasas, lo que determina que el tampón de extracción debe tener preferentemente una alta concentración del caotropo para proporcionar una desnaturalización rápida de las proteínas con el fin de proteger el ARN vírico de interés. Las diferentes soluciones de alcohol-GuSCN analizadas incluyeron (1) n-butanol al 57 % y GuSCN 3,3 M; (2) 1-pentanol al 37 % y GuSCN 4,2 M; (3) 1-pentanol al 43 % y GuSCN 3,7 M; (4) 3-metil-1-butanol al 56 % (alcohol isoamílico) y GuSCN 2,8 M; (5) *terc*-butanol al 58 % y GuSCN 3,3 M; y (6) 3-pentanol al 53 % y GuSCN 3,5 M. Primero, se mezclaron 1,5 ml de cada uno de dichos tampones de extracción con 200 ul de una muestra de sangre humana, tras lo que se cargaron las mezclas de tampón de extracción/sangre en columnas de centrifugación de sílice con una configuración de vacío para cronometrar el flujo de las mezclas correspondientes a lo largo de la columna. A diferencia de las mezclas de etanol o isopropanol y GuSCN ensayadas hasta ahora, y a excepción de la mezcla que contiene alcohol isoamílico, no se produjo obstrucción de la columna. En cuanto a la mezcla que contiene alcohol isoamílico, donde se produjo un cierto grado de obstrucción, cabe señalar que era la mezcla que comprendía la concentración más baja de GuSCN. Después, se eluyeron los ácidos nucleicos unidos a las columnas con agua exenta de ribonucleasa, tras lo que fueron sometidos a PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (RT-qPCR) con cebadores y sondas específicos del Ébola. En la Figura 5, se muestran las curvas de RT-qPCR sin procesar para las condiciones de extracción de ácidos nucleicos enumeradas anteriormente y demuestran que el método de la invención es igualmente adecuado para el aislamiento de ARN.

En una etapa posterior, se probó el protocolo de detección y aislamiento del ARN del Ébola en un entorno totalmente automatizado en la plataforma Idylla. El protocolo fue diseñado para confinar todas las etapas de procesamiento realizadas en una muestra de sangre potencialmente infecciosa en un único cartucho de plástico desechable. En primer lugar, se introducen en el cartucho aproximadamente 200 ul de una muestra de sangre completa que se va a analizar, tras lo que el cartucho se cierra y se carga en el instrumento Idylla. En este sentido, dentro del cartucho, la muestra se mezcla con un exceso de un tampón de extracción acuoso que contiene GuSCN 4 M y butOH al 22 %. En estas condiciones, los componentes de la muestra, incluidas las partículas víricas que pueden estar contenidas en

ellas, se lisan y los ácidos nucleicos se adsorben en una membrana de extracción de sílice. Posteriormente, se lava el exceso de restos celulares y proteínas de la membrana de sílice, y luego se eluyen los ácidos nucleicos utilizando agua exenta de ribonucleasa. Seguidamente, el ARN así purificado se transcribe de forma inversa en ADNc mientras aún está dentro del cartucho, lo que luego se somete a una qPCR utilizando cebadores y sondas específicos del Ébola.

- 5 Los resultados obtenidos del protocolo descrito anteriormente se muestran en la Figura 6, en donde el recuadro de la izquierda muestra curvas de qPCR sin procesar obtenidas para muestras que no contienen Ébola, mientras que el recuadro de la derecha muestra las curvas de los controles que si contienen Ébola.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el aislamiento y/o la purificación de ácidos nucleicos a partir de un material de partida que contiene ácidos nucleicos, en donde el material de partida que contiene ácidos nucleicos es una muestra biológica líquida seleccionada del grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) unir los ácidos nucleicos a un material de soporte de unión a ácidos nucleicos mediante la puesta en contacto del material de partida que contiene ácidos nucleicos con el soporte de unión a ácidos nucleicos en presencia de al menos un compuesto caotrópico y al menos un alcohol; y
- (b) opcionalmente eluir los ácidos nucleicos unidos del material de soporte de unión a ácidos nucleicos con un tampón de elución;
- estando el método **caracterizado por que**
- (i) el alcohol es un alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono y está presente en la etapa a) a una concentración de entre el 17 % (v/v) y el 50 % (v/v), **y por que**
- (ii) el al menos un compuesto caotrópico está presente en la etapa a) a una concentración de entre 1,5 M y 4,5 M.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde no se añade proteasa a la etapa a) o no se realiza incubación con una proteasa (ni otro pretratamiento con proteasa equivalente) directamente antes de someter el material de partida que contiene ácidos nucleicos a la etapa a).
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, siendo el alcohol que tiene 4 o 5 átomos de carbono un alcohol monohidroxílico, seleccionándose preferentemente del grupo que consiste en n-butanol, sec-butanol, isobutanol, *terc*-butanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-pentanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2,2-dimetil-1-propanol, 2-metil-2-butanol, 3-metil 2-butanol o una mezcla de los mismos; seleccionándose más preferentemente del grupo que consiste en n-butanol, 1-pentanol, sec-butanol, isobutanol, *terc*-butanol o una mezcla de los mismos; siendo lo más preferentemente n-butanol.
4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el alcohol tiene 4 o 5 átomos de carbono y está presente en la etapa a) a una concentración de entre el 20 % (v/v) y el 50 % (v/v), preferentemente entre el 25 % (v/v) y el 50 % (v/v), más preferentemente entre el 30 % (v/v) y el 45 % (v/v), lo más preferentemente entre el 35 % (v/v) y el 40 % (v/v).
5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el al menos un compuesto caotrópico se selecciona entre tiocianatos, isocianatos, percloratos, clorhidratos o mezclas de los mismos; y preferentemente es tiocianato de guanidinio.
6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el al menos un compuesto caotrópico está presente en la etapa a) a una concentración de entre 2 M y 4,5 M, preferentemente de entre 2,5 M y 4 M, más preferentemente de entre 3 M y 3,5 M.
7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho método se realiza en un sistema automatizado en donde las etapas a) y b) se realizan en un cartucho extraíble.
8. Un método de diagnóstico automatizado para detectar ácidos nucleicos diana, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) proporcionar un material de partida que contiene ácidos nucleicos en un sistema automatizado;
- (b) aislar y/o purificar ácidos nucleicos en dicho sistema automatizado, de acuerdo con el método de aislamiento y/o purificación de las reivindicaciones 1-6;
- (c) realizar la amplificación en dicho sistema automatizado de ácidos nucleicos diana aislados y/o purificados en la etapa (b); y
- (d) detectar los ácidos nucleicos diana amplificados en la etapa (c).
9. Método de diagnóstico automatizado de acuerdo con la reivindicación 8, en donde al menos las etapas (b) y (c) se realizan en un cartucho.
10. Uso del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para cualquiera de los siguientes
- aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos extracelulares,
  - aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud <250 nt, lo más preferentemente <100 nt;
  - aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos víricos,

## ES 2 965 460 T3

- diagnóstico de infecciones, afecciones patológicas o estados fisiológicos.

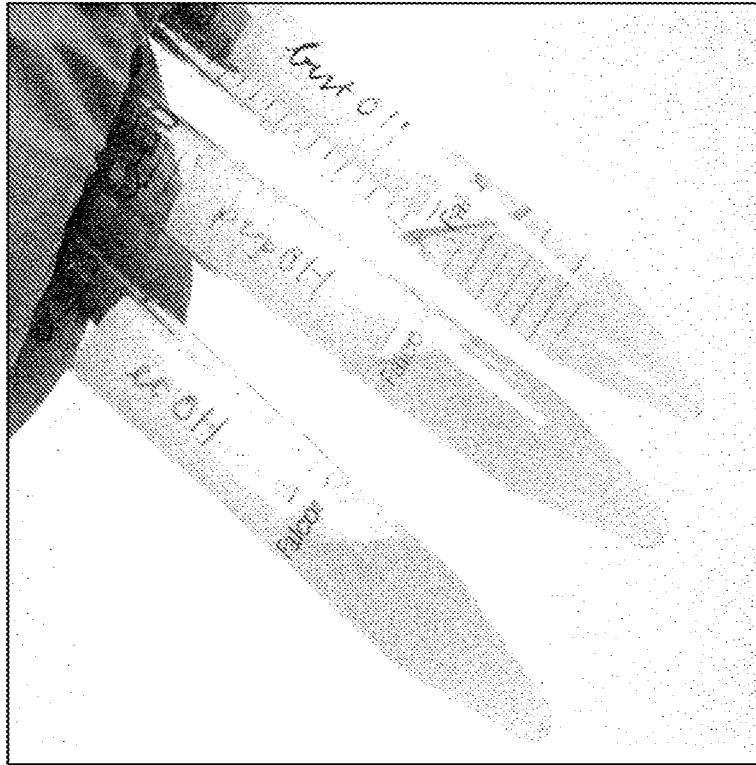


Fig. 1

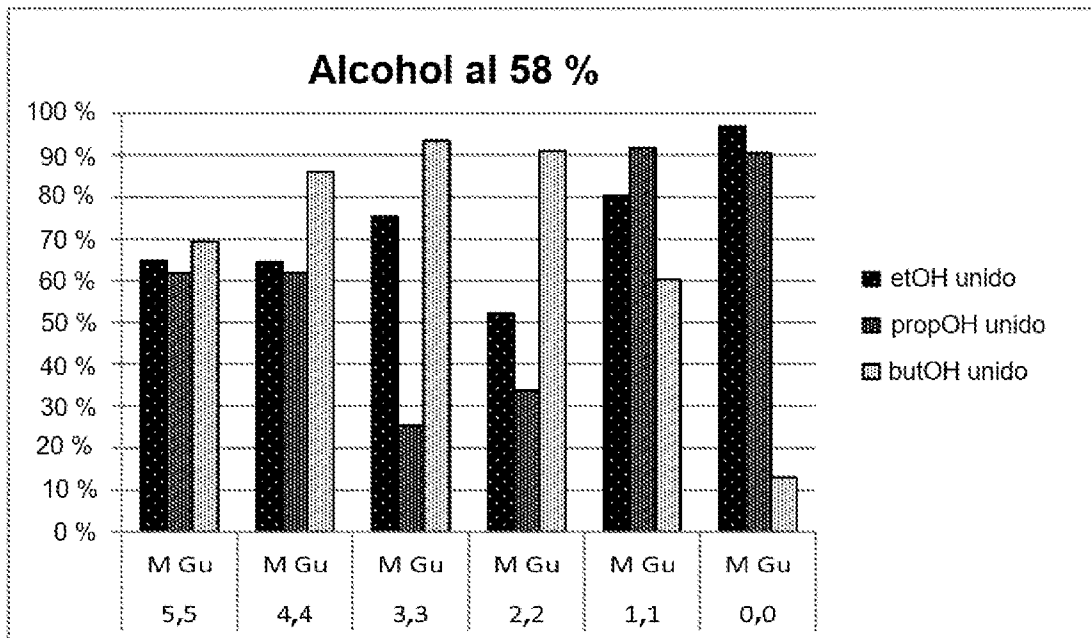


Fig. 2

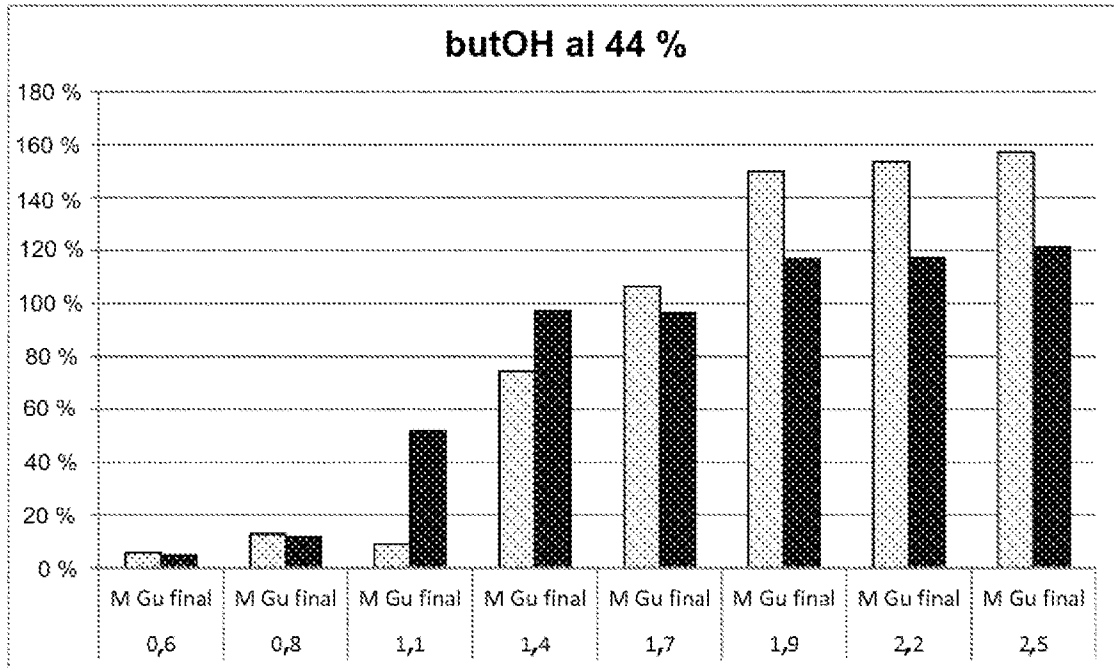


Fig. 3

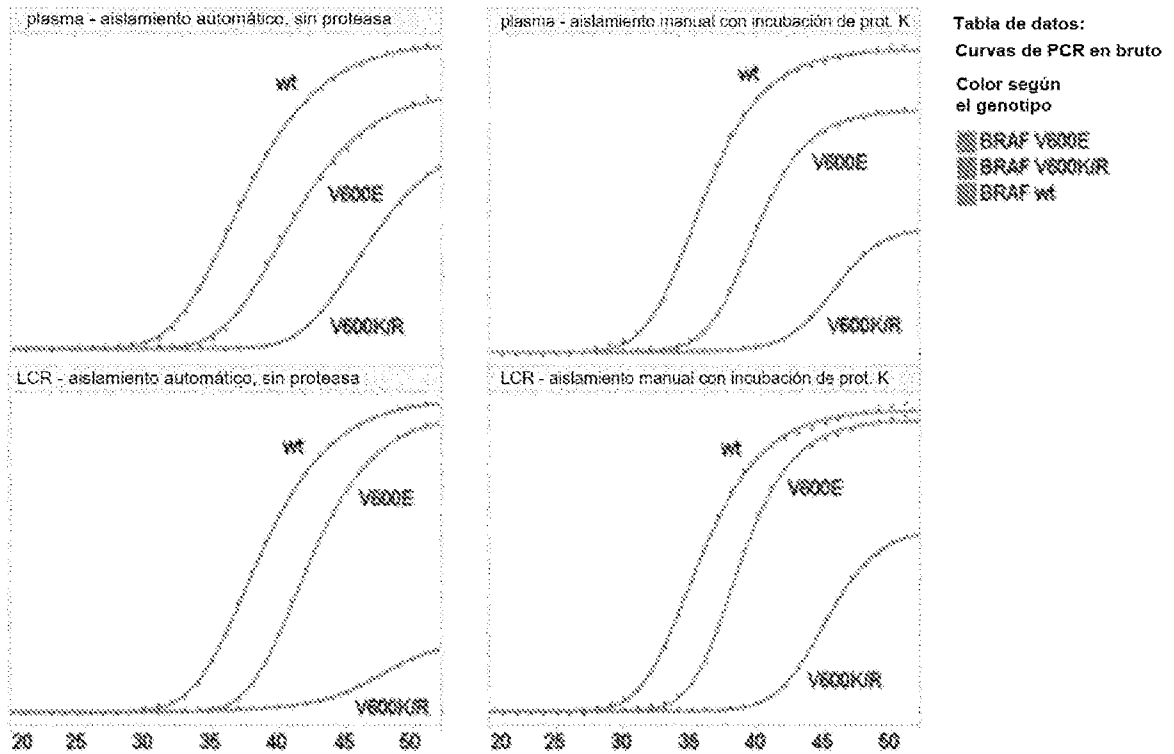


Fig. 4

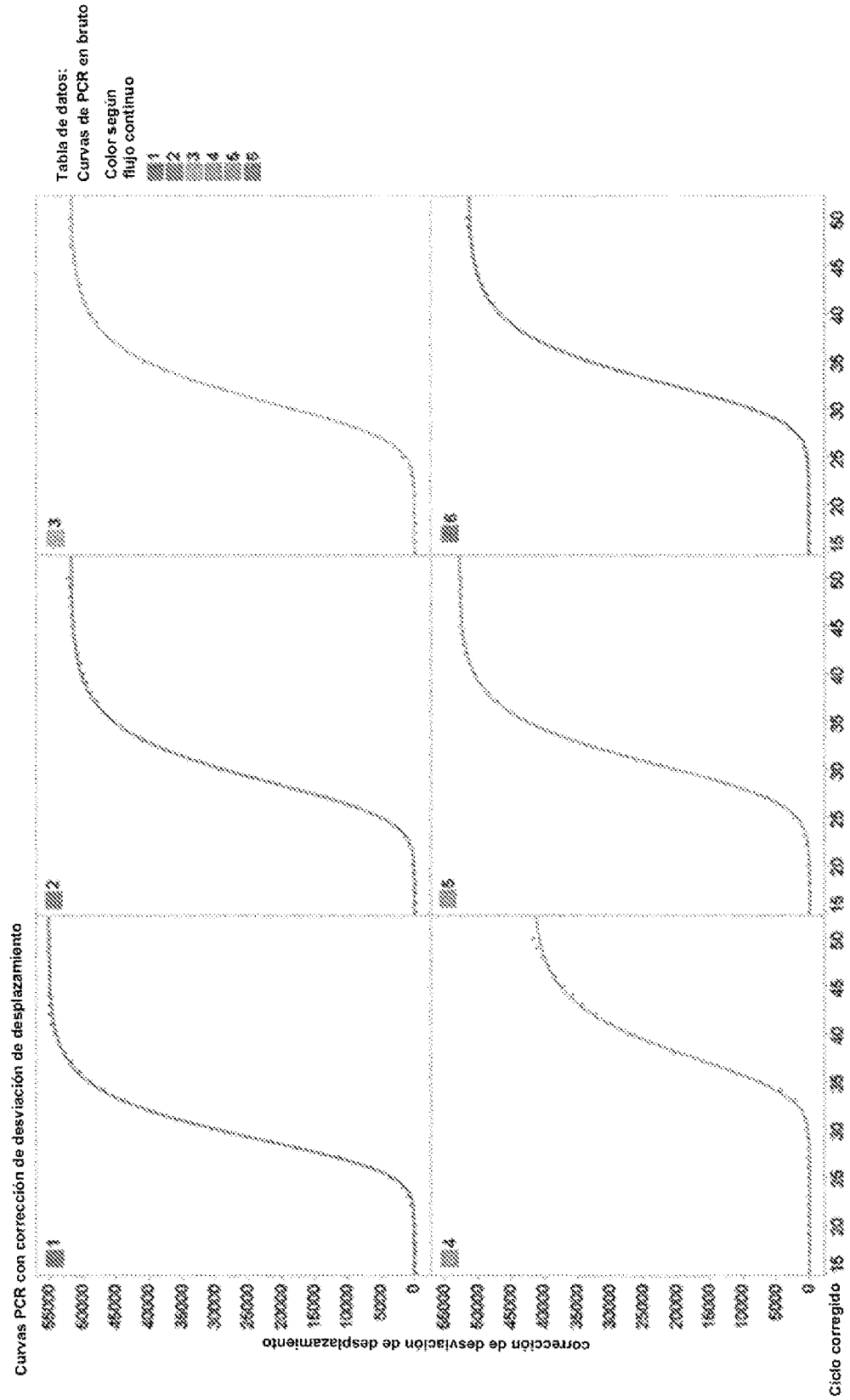


Fig. 5

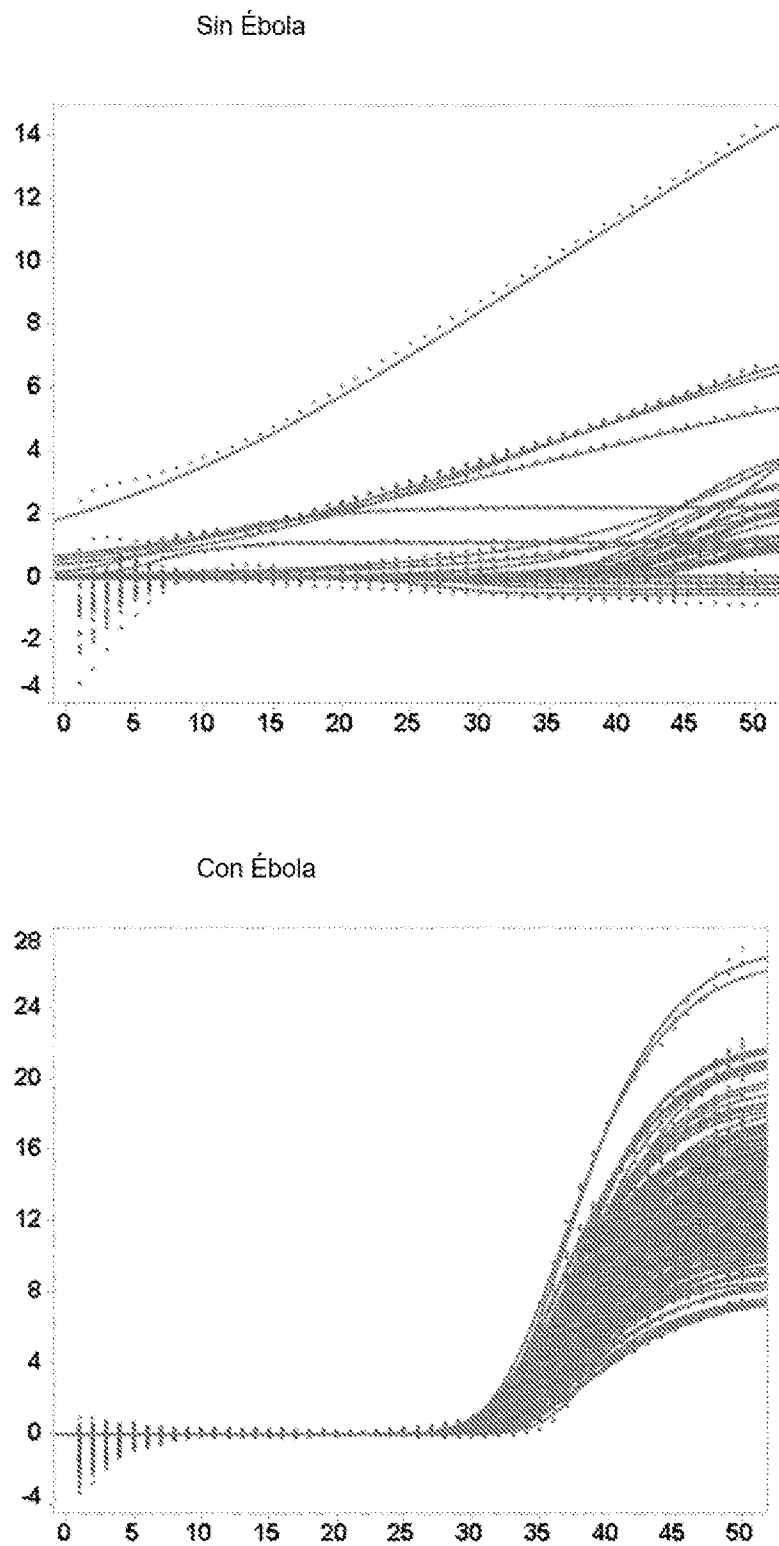


Fig. 6