

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 967 082**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/32** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2016 PCT/EP2016/067667**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.02.2018 WO18019360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2016 E 16754409 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023 EP 3487869**

54 Título: **Procedimiento para el enriquecimiento de biomoléculas y para la eliminación de las biomoléculas de una muestra biológica**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.04.2024**

73 Titular/es:  
**IST INNUSCREEN GMBH (100.0%)  
Robert-Rössle-Str. 10  
13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es:  
**HILLEBRABD, TIMO**

74 Agente/Representante:  
**ÁLVAREZ LÓPEZ, Sonia**

ES 2 967 082 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 enriquecimiento de biomoléculas y para la eliminación de las biomoléculas de una muestra biológica

5

El objeto de la invención es un procedimiento sencillo para el enriquecimiento de biomoléculas y para la eliminación (aislamiento) de las biomoléculas de una muestra para un análisis subsiguiente de estas biomoléculas o para un procesamiento posterior. Las biomoléculas que deben enriquecerse incluyen ácidos nucleicos libres de células, virus o micropartículas subcelulares (por ejemplo, exosomas). El procedimiento es un procedimiento mejorado y más sencillo que el procedimiento descrito en la patente DE 10 2008 023 297 B4. El documento WO 2013/124863 A1 da a conocer un procedimiento para el enriquecimiento/ separación de biomoléculas con la ayuda de partículas magnéticas recubiertas de alginato.

Se conoce que en los fluidos corporales libres de células se encuentran los denominados ácidos nucleicos de libre circulación, exosomas, así como en el caso de una infección viral también partículas de virus. Todas estas diferentes biomoléculas son de gran importancia para el diagnóstico de enfermedades. A este respecto, en particular, los ácidos nucleicos libres de células y los exosomas desempeñan un papel cada vez más importante. Todas estas biomoléculas también tienen en común que solo están presentes en concentraciones muy bajas en los fluidos corporales. Esto dificulta su uso diagnóstico. La única salida consiste en procesar volúmenes de muestra más grandes para tener disponibles finalmente una cantidad suficiente de biomoléculas. Como muestras iniciales importantes entran en consideración, por ejemplo, fluidos corporales como el plasma sanguíneo o el suero o incluso la orina.

En la actualidad, existen pocos procedimientos que permitan enriquecer o aislar estas biomoléculas de una muestra de gran volumen o utilizar a continuación las biomoléculas enriquecidas para la extracción de ácidos nucleicos.

25

Así, por ejemplo, para el enriquecimiento de exosomas a partir de una muestra biológica, existe la aplicación de técnicas de ultracentrifugación. A este respecto, se produce una acumulación de exosomas en el fondo del recipiente de reacción. Este método está unido a una ultracentrifugadora y, además, requiere mucho tiempo y no es adecuado para el diagnóstico de rutina. Además, también se utiliza la técnica de la ultrafiltración. Este método también consume mucho tiempo y es muy caro. Los procedimientos alternativos consisten en una inmunoprecipitación de los exosomas por medio de una immunoplate o por medio de Immunobeads. Este tipo de enriquecimiento de los exosomas también requiere mucho tiempo y es propenso a fallos y caro debido a los reactivos a utilizar. Además, con esta tecnología solo se pueden utilizar de 200 a 500 µl de muestra. Para el enriquecimiento de virus se pueden utilizar igualmente técnicas de ultracentrifugación. Los procedimientos alternativos consisten en la precipitación de partículas de virus por medio de polietilenglicol/ cloruro de sodio y una centrifugación subsiguiente (Yamamoto et al., Virology 40(1970) 734; Morandi et al., J.Clin.Microbiol. 36 (1998) 1543-1538). Se utilizan diferentes mezclas de PEG y cloruro de sodio y se mezclan estos reactivos con la muestra biológica. A continuación, la preparación se incuba durante un tiempo prolongado en frío y, a continuación, se obtienen los precipitados de (proteínas de) virus - NaCl/ PEG por centrifugación. Estos procedimientos también son complejos y requieren mucho tiempo. Además, es problemático el procesamiento posterior de los precipitados para el aislamiento de los ácidos nucleicos virales. A menudo, los precipitados son muy difíciles de volver a disolver. Esto influye significativamente en la eficiencia y la calidad del aislamiento de ácidos nucleicos. La patente DE 19856415 C2 describe un procedimiento que se vale de la conocida precipitación de NaCl/ PEG, donde a continuación se realiza el aislamiento de los ácidos nucleicos de una manera conocida en sí misma a través de la unión a una fase sólida de silicato. No queda claro en qué medida este procedimiento se diferencia del método suficientemente conocido de la precipitación de NaCl/ PEG con los problemas conocidos. Además, este procedimiento también requiere una incubación en frío y una centrifugación de veinte minutos. El procedimiento debe permitir aislar ácidos nucleicos virales de una muestra de hasta 10 ml. Otra variante disponible comercialmente, que debería permitir el procesamiento de hasta 1 ml de muestra, se basa en el enriquecimiento de ácidos nucleicos virales utilizando un detergente especial. A este respecto, una incubación inicial de la muestra con un reactivo de lisis conduce a la lisis de los virus. A continuación, se produce la configuración de un "complejo de ácido nucleico y detergente". La preparación se centrifuga y el pellet obtenido se trata a continuación proteolíticamente y el ácido nucleico a su vez se aísla de una manera conocida en sí misma a través de la unión a una fase sólida de silicato (QIAamp UltraSens Virus Handbook). También en este caso se señalan problemas con la resuspensión del pellet. Además, el procedimiento solo permite el procesamiento de muestras con un volumen máximo de 1 ml.

55

Para el aislamiento del ADN libre de células circulante a partir de muestras de gran volumen, se procede escalando todos los componentes también necesarios para la extracción. El experto en la materia sabe que esto conlleva un enorme gasto de reactivos y tiempo.

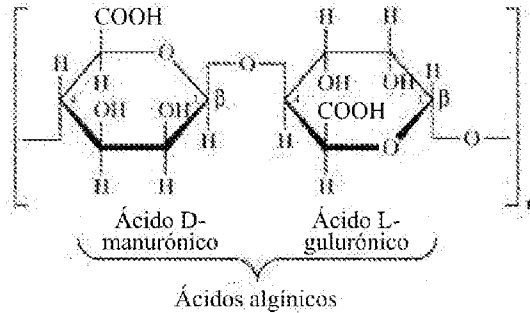
60

El experto en la materia también puede ver que para diferentes biomoléculas (por ejemplo, virus o ADN o partículas

subcelulares) siempre se necesitan diferentes procedimientos si se quiere concentrar o purificar las biomoléculas de una muestra.

Un enfoque completamente nuevo para la concentración de biomoléculas a partir de una muestra biológica y para la  
5 subsiguiente extracción de ácidos nucleicos se da a conocer en la patente DE 10 2008 023 297 B4.

El procedimiento se basa en el uso de derivados de polisacáridos para una complejación de las biomoléculas contenidas en una muestra. Los derivados de polisacáridos son las sales de ácidos poliurónicos. A este respecto, son especialmente adecuados los llamados alginatos de los ácidos alginicos. Los alginatos son elementos estructurantes  
10 en las algas marrones. El alginato es un polisacárido que se compone de ácido 1,4- $\alpha$ -L-gulurónico (G) y ácido  $\beta$ -D-manurónico (M).



15 Forma zonas homopoliméricas en las que el ácido manurónico o el ácido gulurónico está presente como bloque.

Los alginatos se utilizan en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, por ejemplo, como agentes gelificantes en la industria alimentaria, como agentes de apresto para textiles, para la producción de papel fotográfico o en la práctica dental para la producción de impresiones dentales y maxilares.

20 La patente describe el uso de la capacidad de los alginatos para gelificarse en soluciones con bajo contenido de calcio y formar los llamados hidrogeles. La causa de la gelificación se debe al almacenamiento de iones de calcio en la estructura en zigzag de los bloques GG. En esta zona se deposita entonces la estructura en zigzag de otra molécula de alginato. Esto conduce de este modo a la formación de estructuras tridimensionales. La configuración de geles  
25 también se realiza en combinación con ácidos fuertes. Además, las estructuras de gel resultantes también se pueden destruir de nuevo de forma específica.

Aprovechando la configuración de geles de alginato, el enriquecimiento de biomoléculas se puede realizar de forma fácil y rápida y, a continuación, se puede llevar a cabo el aislamiento de ácidos nucleicos.

30 El desarrollo del procedimiento se describe de la siguiente manera:

1. Mezcla de una solución acuosa de alginato con una muestra biológica líquida
2. Adición de una solución acuosa que induce la configuración de gel/pellet (por ejemplo, uso de una solución de  
35 cloruro de calcio 1 M o una solución de ácido clorhídrico al 1%)
3. Mezcla de la muestra e incubación breve a temperatura ambiente
4. Centrifugación de la muestra y eliminación del sobrenadante
5. Disolución del pellet o partícula de gel y, por lo tanto, liberación de las biomoléculas y, si es necesario, aislamiento directo del ADN o el ARN de un modo o manera conocidos en sí mismos.

40 El procedimiento revelado en la patente es extremadamente eficiente y permite utilizar muestras de gran volumen de forma rápida y sencilla para el enriquecimiento de biomoléculas.

Sin embargo, el procedimiento descrito muestra una gran desventaja. La automatización del proceso es difícil de llevar  
45 a cabo. Esto se debe al hecho de que el paso de enriquecimiento siempre debe realizarse por medio de centrifugación. De manera conocida, la integración de un paso de centrifugación en un proceso automatizado no es fácil de implementar y, además, aumenta significativamente el coste de una máquina automática.

**Objeto de la invención**

50 La invención tenía el objetivo de eliminar las desventajas de las soluciones técnicas conocidas. La presente invención

se define mediante las reivindicaciones.

### Solución del objeto

5 El objetivo se ha logrado según las características de las reivindicaciones. El procedimiento según la invención permite enriquecer biomoléculas (también a partir de muestras de gran volumen) y liberar a continuación las biomoléculas o, dado el caso, aislar de ellas ácidos nucleicos (ADN y ARN) o liberar los ácidos nucleicos.

10 El procedimiento permite implementar todos los pasos de proceso necesarios de forma sencilla y rápida en un proceso automatizado. Sorprendentemente, esto se puede llevar a cabo de una manera muy simple, sin un paso de centrifugación.

El procedimiento se basa en el procedimiento conocido de mezclar una muestra líquida biológica con una solución de alginato y con sales de cationes divalentes o polivalentes (por ejemplo, sales de calcio, zinc o aluminio) o con un ácido.

15 Pero, el enriquecimiento de las biomoléculas no se realiza a continuación mediante un paso de centrifugación. Se añaden partículas magnéticas o paramagnéticas a la muestra. A este respecto, no desempeña ningún papel de qué tipo de partículas se trate. Tanto el tamaño de las partículas como su funcionalización son de importancia secundaria. Por lo tanto, se pueden utilizar nanopartículas, micropartículas o partículas más grandes. Para una fácil separación de las partículas, las partículas magnéticas son las más adecuadas. En este caso, las partículas se separan por medio

20 de un imán y se elimina el sobrenadante de la muestra. Después de eliminar el sobrenadante de la muestra, las biomoléculas a enriquecer (partículas subcelulares, virus o ácidos nucleicos) se encuentran completamente en un complejo de gel de alginato y partículas magnéticas o paramagnéticas. Sorprendentemente, este enriquecimiento se realizó sin la centrifugación mencionada en la patente DE 10 2008 023 297 B4. La liberación de las biomoléculas complejas se puede realizar ahora mediante la adición de reactivos que destruyen de nuevo la estructura del gel de alginato y, por lo tanto, liberan las biomoléculas complejas. Esto se puede realizar, por ejemplo, por medio de una

25 solución tampón que contiene un agente quelante (EDTA) o también por medio de la adición de una solución de citrato de trisodio dihidrato. Tras la adición de estos reactivos se realiza una breve resuspensión de las partículas y una incubación. La incubación sirve para disolver la estructura del gel de alginato y la liberación de las biomoléculas. A continuación, las partículas magnéticas o paramagnéticas se separan mediante la aplicación de un campo magnético.

30 El sobrenadante resultante contiene las biomoléculas, que se pueden preparar o analizar posteriormente.

Por lo tanto, el procedimiento no requiere un paso de centrifugación y se puede llevar a cabo de forma extremadamente sencilla y completamente automatizada. Esto permite, por primera vez, procesar grandes volúmenes de muestras de

35 forma eficiente y rápida.

El procedimiento según la invención muestra además otra ventaja. En una forma de realización especial, se pueden seleccionar las partículas utilizadas para la separación de tal manera que estas sean capaces de unir ácidos nucleicos. Esto significa que las partículas sirven, por un lado, para la separación del complejo de biomolécula y alginato y, a continuación, también para la extracción de ácidos nucleicos de alta pureza. Este procedimiento es importante en

40 particular cuando los llamados ácidos nucleicos circulantes libres de células deben enriquecerse a partir de una muestra libre de células y aislarse a continuación. Para ello, se añade a la muestra (suero, plasma, orina, etc.) una solución de alginato y una solución acuosa que contiene sales de cationes divalentes o polivalentes (por ejemplo, cloruro de calcio o cloruro de aluminio) o un ácido débil, así como partículas paramagnéticas o magnéticas. Estas partículas se seleccionan de modo que, en condiciones específicas, sean capaces de unirse a los ácidos nucleicos.

45 Tales partículas son conocidas por el experto en la materia y se utilizan en la rutina para el aislamiento de ácidos nucleicos. Después de añadir estos componentes, el preparado se mezcla brevemente y se incuba durante algunos minutos a temperatura ambiente. A continuación, las partículas se separan por medio de un imán y se elimina el sobrenadante de la muestra. Después de eliminar el sobrenadante, las partículas (el complejo de partículas y gel de alginato) se mezclan con un tampón que permite una destrucción del complejo de gel y alginato. Para ello, las

50 partículas se resuspenden y la preparación se incuba durante algunos minutos. En este caso, también se pueden añadir otros aditivos al tampón, como enzimas proteolíticas, etc. La incubación se puede realizar a temperatura ambiente o también a temperaturas más altas, preferentemente de 50 °C a 70 °C. Después de la liberación del ácido nucleico complejo libre de células, este se une a las partículas magnéticas o paramagnéticas. Esto se puede realizar mediante el tampón utilizado. Preferentemente, la unión del ADN se efectúa mediante la adición de un tampón de

55 unión. Como tampón se pueden emplear combinaciones de reactivos, que son conocidas por el experto en la materia de la patente DE 10 2008 023 297 B4. Es importante destacar que el primer tampón permite la destrucción de la estructura del gel de alginato y una unión subsiguiente del ADN liberado, solo o en combinación con un tampón de unión adicional.

60 También es posible utilizar, además del tampón de lisis, un tampón de unión que permita lograr una selectividad con respecto a los ácidos nucleicos que se van a purificar (fraccionamiento por tamaño o separación de ADN y ARN). El

experto en la materia conoce el proceso de extracción adicional. Los ácidos nucleicos unidos a las partículas se lavan y los ácidos nucleicos se separan finalmente de las partículas mediante la adición de agua o mediante la adición de un tampón de sal baja.

- 5 Por medio del procedimiento según la invención, todo el proceso también se puede llevar a cabo de forma automatizada, comenzando con el enriquecimiento de biomoléculas hasta la extracción final de ácidos nucleicos de alta pureza. Ya no es necesario un paso de centrifugación. Esto significa una ventaja decisiva sobre el procedimiento dado a conocer en la patente DE 10 2008 023 297 B4. Además, por medio del procedimiento según la invención se puede procesar de facto cualquier volumen de muestra y, por lo tanto, no está limitado a volúmenes pequeños y, además, es fácil de automatizar. Los volúmenes de las muestras de partida líquidas se pueden seleccionar a voluntad, lo que permite una gama muy amplia de aplicaciones. Por ejemplo, se puede trabajar con muestras de 500 µl o también de 10 ml. Por lo tanto, hay una enorme variedad de aplicaciones.

- 15 El procedimiento según la invención también es adecuado para aislar en general ácidos nucleicos de una muestra. Si los ácidos nucleicos a aislar no están presentes como ácidos nucleicos libres, entonces la muestra se puede lisar en una forma conocida en sí misma. Los ácidos nucleicos así liberados de la muestra se aíslan a continuación de nuevo conforme al procedimiento según la invención. Una vez más, después de disolver la estructura del gel de alginato (que contiene el ácido nucleico enriquecido), se puede llevar a cabo una purificación "clásica" de los ácidos nucleicos o, después de disolver la estructura del gel de alginato por medio de un tampón básico de sal baja, utilizar la solución obtenida directamente para una reacción de PCR.

La invención se explica con más detalle a continuación mediante ejemplos de realización.

- Ejemplo de realización 1: Enriquecimiento de ADN libre de células a partir de una muestra de plasma de 1 ml. Comprobación de la combinación necesaria de solución de alginato, reactivo para la configuración de un gel de alginato, así como partículas separables por medio de un campo magnético**

- La muestra de partida para el enriquecimiento fue plasma humano. La muestra de plasma se centrifugó nuevamente durante 10 minutos antes de la aplicación para eliminar las células eventualmente aún presentes. Se siguió trabajando con el sobrenadante. Se probaron tres procedimientos diferentes.

- Muestra 1: Se añadieron 30 µl de una solución de alginato al 0,5% a la muestra y se mezcló brevemente la preparación. A continuación, se añadieron 150 µl de una solución 1 molar de cloruro de calcio, así como 50 µl de una suspensión de partículas magnéticas (suspensión MAG; Analytik Jena AG).

- Muestra 2: Se añadieron 30 µl de una solución de alginato al 0,5% a la muestra y se mezcló brevemente la preparación. A continuación, se añadieron 50 µl a una suspensión de partículas magnéticas (suspensión MAG; Analytik Jena AG).

- Muestra 3: Se añadieron 150 de una solución de cloruro de calcio 1 molar a la muestra y se mezcló brevemente la preparación. A continuación, se añadieron 50 µl a una suspensión de partículas magnéticas (suspensión MAG; Analytik Jena AG).

A continuación, las muestras se procesaron de la siguiente manera.

- 45 La preparación se mezcló brevemente y se incubó durante 10 minutos. A continuación, se llevó a cabo la separación de las partículas magnéticas por medio de un imán. Se eliminó el sobrenadante y las partículas magnéticas se lavaron con 1 ml de agua. Después de la nueva separación de las partículas magnéticas, se eliminó completamente el sobrenadante.

- 50 Se añadieron 400 µl de tampón (4 M de tiocianato de guanidina, EDTA) y 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) al complejo de ADN, gel de alginato y partículas magnéticas y se resuspendió la preparación con una pipeta. A continuación, se realizó una incubación durante 15 min a 70 °C.

- Este paso sirvió para destruir el complejo de ADN, gel de alginato y partículas y, por lo tanto, para liberar el ADN complejo. A continuación, se realizó la adición de 400 µl de un tampón de unión (isopropanol/ tritón X-100) y una nueva mezcla de las partículas, así como una incubación durante 2 min. Este paso sirvió para unir el ADN a las partículas. A continuación, se separaron las partículas magnéticas y se descartó el sobrenadante. Las partículas se lavaron a continuación con tampones de lavado alcohólicos conocidos por el experto en la materia y se secaron finalmente. En el último paso, el ADN unido se separó de las partículas mediante la adición de 50 µl de H<sub>2</sub>O y se transfirió a un nuevo recipiente de reacción.

La detección del enriquecimiento y extracción subsiguiente de ADN libre de células se realizó mediante PCR en tiempo real. Para ello, se amplificó una secuencia objetivo específica del ser humano del receptor de estrógeno 1.

**Protocolo PCR en tiempo real para la amplificación de la secuencia objetivo específica del ser humano**

5

**(Receptor de estrógeno 1).**

Cebador de sentido (5'- CGC CGC CAA CGC GCA GGT CTA-3')

Cebador antisentido (5'- AGC CGA ACG CCG CAG CCT CA-3')

10 1 sonda (5'-FAM CCT CCC CTA CGG CCC CGG G-BHQ1-3')

Carga de reacción

Por muestra:

15

cebador de sentido (50 pmol/μl)	0,1 μl
cebador antisentido (50 pmol/ μl)	0,1 μl
sonda (25 pmol/μl)	0,1 μl
mezcla dNTP (12,5 mM)	0,3 μl
10X tampón de PCR (MgCl <sub>2</sub> incluido)	1,5 μl
Taq ADN polimerasa	0,75 U
Grado PCR H <sub>2</sub> O	añadir 15 μl

Condiciones de amplificación/hibridación

Paso 1:			
	Desnaturalización	95°C	120 <sup>s</sup>
Paso 2:			
	Amplificación	45 ciclos	
		95°C	4"
	(Medición)	65°C	45"

20 **Resultado PCR**

Los resultados en la figura 1 muestran que solo la combinación de solución de alginato, reactivo para la configuración de un gel de alginato, así como partículas separables por medio de un campo magnético permite un enriquecimiento y extracción subsiguiente de ADN (curvas negras). Esto demuestra que el primer paso es la complejación del ADN libre con el gel de alginato que se configura y que las partículas añadidas se combinan con este complejo. Por lo tanto, se puede separar el complejo de ADN, gel de alginato y partículas mediante la aplicación de un campo magnético. Por lo tanto, no es necesaria una centrifugación, como se describe en la patente DE 102008023297B4.

30 **Ejemplo de realización 2: Enriquecimiento de ADN libre de células a partir de una muestra de plasma de 1 ml y 5 ml y extracción subsiguiente de ADN**

La muestra de partida para el enriquecimiento fue plasma humano. La muestra de plasma se centrifugó nuevamente durante 10 minutos antes de la aplicación para eliminar las células eventualmente aún presentes. Se siguió trabajando con el sobrenadante.

35

La muestra de 1 ml se trató de la siguiente manera. Se añadieron 30 μl de una solución de alginato al 0,5% a la muestra y se mezcló brevemente la preparación. A continuación, se añadieron 150 μl de una solución 1 molar de cloruro de calcio, así como 50 μl de una suspensión de partículas magnéticas (suspensión MAG; Analytik Jena AG). La preparación se mezcló brevemente y se incubó durante 10 minutos. A continuación, se llevó a cabo la separación de las partículas magnéticas por medio de un imán. Se eliminó el sobrenadante y las partículas magnéticas se lavaron con 1 ml de agua. Después de la nueva separación de las partículas magnéticas, se eliminó completamente el sobrenadante.

40

Se añadieron 400 μl de tampón (4 M de tiocianato de guanidina, EDTA) y 20 μl de proteinasa K (20 mg/ml) al complejo de ADN, gel de alginato y partículas magnéticas y se resuspendió la preparación con una pipeta. A continuación, se

45

realizó una incubación durante 15 min a 70 °C.

Este paso sirvió para destruir el complejo de ADN, gel de alginato y partículas y, por lo tanto, para liberar el ADN complejo. A continuación, se realizó la adición de 400 µl de un tampón de unión (isopropanol/ tritón X- 100) y una nueva mezcla de las partículas, así como una incubación durante 2 min. Este paso sirvió para unir el ADN a las partículas. A continuación, se separaron las partículas magnéticas y se descartó el sobrenadante. Las partículas se lavaron a continuación con tampones de lavado alcohólicos conocidos por el experto en la materia y se secaron finalmente. En el último paso, el ADN unido se separó de las partículas mediante la adición de 50 µl de H<sub>2</sub>O y se transfirió a un nuevo recipiente de reacción.

10

La muestra de 5 ml se trató de la siguiente manera. La muestra se transfirió a un recipiente de reacción de 15 ml. Se añadieron 150 µl de una solución de alginato al 0,5% a la muestra y se mezcló brevemente la preparación. A continuación, se añadieron 600 µl de una solución 1 molar de cloruro de calcio, así como 100 µl de una suspensión de partículas magnéticas (suspensión MAG; Analytik Jena AG). La preparación se mezcló brevemente y se incubó durante 10 minutos. A continuación, se llevó a cabo la separación de las partículas magnéticas por medio de un imán. Se eliminó el sobrenadante y las partículas magnéticas se lavaron con 5 ml de agua. Después de la nueva separación de las partículas magnéticas, se eliminó completamente el sobrenadante.

15

Se añadieron 400 µl de tampón (4 M de tiocianato de guanidina, EDTA) y 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) al complejo de ADN, gel de alginato y partículas magnéticas y se transfirió la preparación con una pipeta a un recipiente de reacción de 1,5 ml con una pipeta. A continuación, se realizó una incubación durante 15 min a 70 °C.

20

Este paso sirvió para destruir el complejo de ADN, gel de alginato y partículas y, por lo tanto, para liberar el ADN complejo. A continuación, se realizó la adición de 400 µl de un tampón de unión (isopropanol/ tritón X- 100) y una nueva mezcla de las partículas, así como una incubación durante 2 min. Este paso sirvió para unir el ADN a las partículas. A continuación, se separaron las partículas magnéticas y se descartó el sobrenadante. Las partículas se lavaron a continuación con tampones de lavado alcohólicos conocidos por el experto en la materia y se secaron finalmente. En el último paso, el ADN unido se separó de las partículas mediante la adición de 50 µl de H<sub>2</sub>O y se transfirió a un nuevo recipiente de reacción.

25

La detección del enriquecimiento y extracción subsiguiente de ADN libre de células se realizó mediante PCR en tiempo real. Para ello, se amplificó una secuencia objetivo específica del ser humano del receptor de estrógeno 1).

30

### Resultados PCR en tiempo real

35

Protocolo PCR en tiempo real para la amplificación de la secuencia objetivo específica del ser humano (receptor de estrógeno 1). Protocolo véase el ejemplo 1.

Muestra	Valores Ct
1 ml de muestra (curva roja)	35/ 34,95
Muestra de 5 ml (curva negra)	32,25/ 32,30

Como muestran los resultados de la figura 2, de la muestra de 5 ml se enriquece y posteriormente se aísla más ADN que de la muestra de 1 ml. Por lo tanto, el procedimiento según la invención también es adecuado para el enriquecimiento y la extracción de ADN libre de células a partir de muestras de gran volumen.

40

### Ejemplo de realización 3: Enriquecimiento de ADN genómico a partir de una solución acuosa (1 ml) y liberación directa de ADN genómico sin más extracción de ADN. Comparación del procedimiento según la invención con el procedimiento de la patente DE 102008023297 B4

45

La muestra inicial para el enriquecimiento era una solución acuosa que contenía ADN genómico. El enriquecimiento se realizó por medio del procedimiento de la patente DE 102008023297 B4, así como por medio del procedimiento según la invención sin un paso de centrifugación. Para el procedimiento de la patente se utilizó el producto comercial PME free-circulating DNA Extraction Kit (Analytik Jena AG). El procedimiento según la invención se llevó a cabo de la siguiente manera.

50

Se añadieron 30 µl de una solución de alginato al 0,5% a la muestra y se mezcló brevemente la preparación. A continuación, se añadieron 150 µl de una solución 1 molar de cloruro de calcio, así como 50 µl de una suspensión de partículas magnéticas (suspensión MAG; Analytik Jena AG). La preparación se mezcló brevemente y se incubó

55

durante 5 minutos. A continuación, se llevó a cabo la separación de las partículas magnéticas por medio de un imán. Se eliminó el sobrenadante y las partículas magnéticas se lavaron con 1 ml de agua. Después de la nueva separación de las partículas magnéticas, se eliminó completamente el sobrenadante. El complejo de ADN de ADN, gel de alginato y partículas magnéticas se destruyó a continuación para liberar el ADN. Para ello, se añadieron 50 µl de una solución de citrato de sodio de 50 mM a las partículas y se resuspendió la preparación con una pipeta. Después de una corta incubación, las partículas magnéticas se separaron y el sobrenadante se transfirió a un nuevo recipiente y a continuación se mezcló con 50 µl de agua. La verificación de si el ADN genómico de la muestra también se enriqueció sin centrifugación se realizó en un gel de agarosa. Como muestra la representación electroforética en gel, ambos procedimientos permitieron concentrar el ADN genómico de la muestra de 1 ml. A este respecto, el procedimiento según la invención impresiona por su simplicidad, ya que ya no se necesitaban pasos de centrifugación.

**Ejemplo de realización 4: Enriquecimiento de virus y extracción subsiguiente del ácido nucleico viral**

La muestra de partida para el enriquecimiento fue plasma humano. Se añadió virus de la fiebre amarilla inactivado a la muestra de plasma. Para el enriquecimiento de los virus se utilizó 1 ml de muestra. La muestra de 1 ml se trató de la siguiente manera. Se añadieron 30 µl de una solución de alginato al 0,5% a la muestra y se mezcló brevemente la preparación. A continuación, se añadieron 150 µl de una solución 1 molar de cloruro de calcio, así como 50 µl de una suspensión de partículas magnéticas (suspensión MAG; Analytik Jena AG). La preparación se mezcló brevemente y se incubó durante 10 minutos. A continuación, se llevó a cabo la separación de las partículas magnéticas por medio de un imán. Se eliminó el sobrenadante y las partículas magnéticas se lavaron con 1 ml de agua. Después de la nueva separación de las partículas magnéticas, se eliminó completamente el sobrenadante.

Se añadieron 400 µl de tampón (4 M de tiocianato de guanidina, EDTA) y 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) al complejo de ADN, gel de alginato y partículas magnéticas y se resuspendió la preparación con una pipeta. A continuación, se realizó una incubación durante 15 min a 60 °C.

Este paso sirvió para destruir el complejo del virus, gel de alginato y partículas y, por lo tanto, la liberación de los virus complejos y la destrucción para liberar el ácido nucleico viral (ARN viral). A continuación se realizó la adición de 400 ml de un tampón de unión (tiocianato de guanidina/ isopropanol/ tritón X-100) y una nueva mezcla de las partículas, así como una incubación durante 2 min. Este paso sirvió para unir el ARN viral a las partículas. A continuación, se separaron las partículas magnéticas y se descartó el sobrenadante. Las partículas se lavaron a continuación con tampones de lavado alcohólicos conocidos por el experto en la materia y se secaron finalmente. En el último paso, el ADN unido se separó de las partículas mediante la adición de 50 µl de H<sub>2</sub>O y se transfirió a un nuevo recipiente de reacción.

La comprobación del enriquecimiento de partículas virales y la extracción subsecuente del ARN viral se realizó por medio de una PCR en tiempo real específica del virus de la fiebre amarilla.

**Resultados PCR en tiempo real**

Protocolo PCR en tiempo real para amplificar la región de no codificación 5' del virus de la fiebre amarilla

- YFallF: (5'-GCT AAT TGA GGT GYA TTG GTC TGC-3')
- YFallR (5'-CTG CTA ATC GCT CAA MGA ACG-3')
- YFallP (5'-FAM-ATC GAG TTG CTA GGC AAT AAA CAC-BHQ1-3')

**Carga de reacción**

Por muestra:

50	YFallF (50 pmol/ µl)	0,1 µl
	YFallR (50 pmol/µl)	0,1 µl
	YFallP (25 pmol/µl)	0,1 µl
	Mezcla dNTP (12,5 mM)	0,3 µl
55	10X tampón de PCR (MgCl <sub>2</sub> incluido)	1,5 µl
	Taq ADN polimerasa	0,75 U
	Grado PCR H <sub>2</sub> O	añadir hasta 15 µl

Condiciones de amplificación/hibridación

60

Paso 1:

# ES 2 967 082 T3

Desnaturalización 95°C 120 seg.  
Paso 2:  
Amplificación 45 ciclos 95°C 4 seg.  
(Medición) 65°C 45 seg.

## Resultados PCR

Muestra	Valores Ct
1 ml de muestra (azul)	28,8/ 28,9

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para el enriquecimiento de biomoléculas y para la eliminación de las biomoléculas de una muestra biológica, **caracterizado porque** - en presencia de partículas magnéticas o paramagnéticas - una muestra biológica se mezcla con una solución de alginato y con sales de cationes divalentes o polivalentes o con un ácido, donde se forma un complejo de biomoléculas de gel de alginato en las partículas, este se elimina de la muestra por separación de las partículas y a partir del cual a continuación se liberan las biomoléculas o los ingredientes de las biomoléculas.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** como sales de cationes divalentes o polivalentes se utilizan sales de calcio, zinc o aluminio.
3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizado porque** las biomoléculas son ácidos nucleicos libres de células, virus o micropartículas subcelulares.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** en el caso de partículas magnéticas, la separación de las partículas con el complejo de biomoléculas de gel de alginato se realiza a través de un imán.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** la liberación de las biomoléculas se realiza mediante la disolución del complejo de biomoléculas de gel de alginato que se encuentra en las partículas, donde las partículas y las biomoléculas se liberan.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado porque** la disolución del complejo de biomoléculas de gel de alginato se realiza mediante citrato de trisodio dihidrato o mediante agentes quelantes, preferentemente EDTA.
7. Procedimiento según la reivindicación 5 o 6, **caracterizado porque** después de la disolución del complejo de biomoléculas de gel de alginato que se encuentra en las partículas se realiza una resuspensión de las partículas y una incubación y se separan las partículas.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para el enriquecimiento de ácidos nucleicos y para la eliminación de los ácidos nucleicos de una muestra biológica, **caracterizado porque** las partículas en las que se ha formado el complejo de ácido nucleico y gel de alginato, después de su disolución, sirven simultáneamente para la unión de los ácidos nucleicos liberados del complejo.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, **caracterizado porque** después de la disolución del complejo de ácido nucleico de gel de alginato y la resuspensión de las partículas se añade un tampón de unión para la unión de los ácidos nucleicos a las partículas y el aislamiento subsiguiente de los ácidos nucleicos se realiza de una manera conocida.
10. Kit para llevar a cabo el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende
- a) una solución de alginato
  - b) al menos una sal de cationes divalentes o polivalentes o un ácido
  - c) partículas
  - d) medios para la separación de las partículas que han formado un complejo de a) y b) con biomoléculas
  - e) medios de liberación de biomoléculas que están unidas en un complejo de a), b) y c), preferentemente agentes quelantes

Figura 1

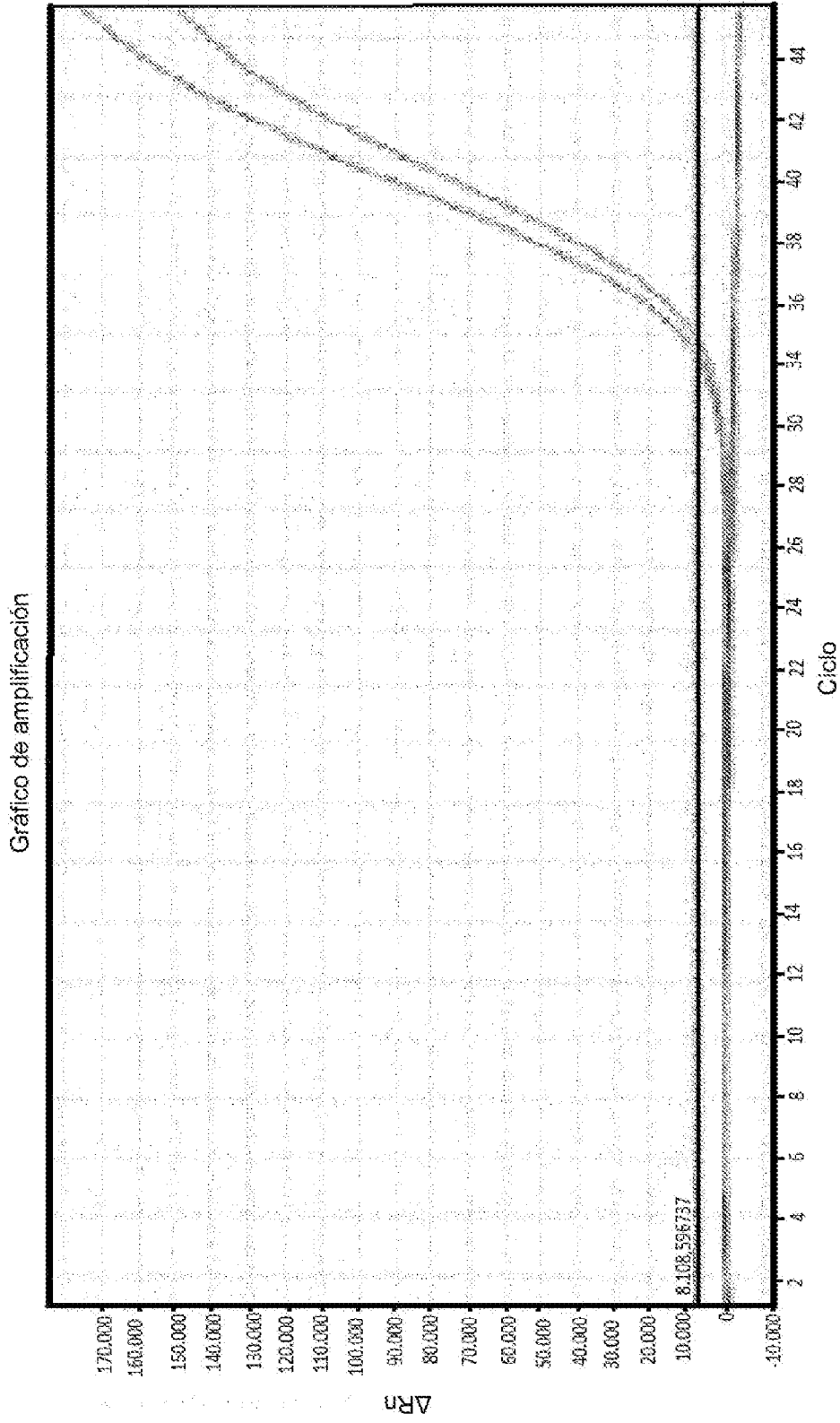


Figura 2

