

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 964 100**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.09.2018 PCT/US2018/051354**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2019 WO19055926**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2018 E 18855327 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2023 EP 3684948**

54 Título: **Método de utilización de un sistema acuoso bifásico para el aislamiento, purificación y/o concentración de fragmentos cortos de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

18.09.2017 US 201762560180 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.04.2024

73 Titular/es:

**PHASE SCIENTIFIC INTERNATIONAL, LTD.
(100.0%)**

**1/F, Building 22 E, Phase 3, Hong-Kong Science
Park
Shatin, N.T., Hong Kong, HK**

72 Inventor/es:

CHIU, YIN, TO

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 964 100 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 de utilización de un sistema acuoso bifásico para el aislamiento, purificación y/o concentración de fragmentos cortos de ácidos nucleicos

5

CAMPO DE LA INVENCION

[0001] Esta invención se refiere a un método para el aislamiento, concentración y/o purificación de fragmentos cortos de ácidos nucleicos en un sistema acuoso bifásico (ATPS). En particular, la presente invención proporciona un método y componentes ATPS para el aislamiento, concentración y/o purificación de fragmentos cortos de ácidos nucleicos a partir de materiales biológicos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Desde el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa, o simplemente PCR, en 1983, se han secuenciado genomas completos y numerosos descubrimientos en la comprensión fundamental de las ciencias de la vida y avances médicos clave han sido posibles gracias a ello. Han nacido campos enteros de innovaciones tecnológicas para hacer que la PCR sea más eficiente, más efectiva y menos costosa. Y debido a que los ácidos nucleicos son tanto las entradas como las salidas de la PCR, se han realizado y se siguen realizando esfuerzos incansables para que su preparación y análisis aguas abajo sean más exactos, precisos, rápidos y rentables.

15

20

[0003] La ganancia marginal para la eficiencia está alcanzando una meseta con un rendimiento decreciente de la escala. Este cuello de botella es especialmente evidente cuando se necesita aislar pequeños fragmentos de ácidos nucleicos de menos de 250 pares de bases (pb) de longitud. Un campo en el que la necesidad de aislar, purificar y concentrar pequeños fragmentos de ácidos nucleicos (NA) es el reciente advenimiento en el campo de la biopsia líquida. La biopsia líquida se basa en la captura y amplificación de ADN circulante (cfADN), específicamente ADN tumoral circulante (ctADN), obteniendo así un diagnóstico precoz de tumorigénesis o recurrencia de cáncer en pacientes que están en remisión. El ADN tumoral circulante (ctADN tumoral circulante) es un tipo de fragmento de ADN derivado de las células tumorales que tienen el tamaño de entre 100 y 300 pares de bases. El ADN circulante (cfADN) liberado por las células tumorales preserva las características de la cuestión de origen. El análisis y estudio del cfADN permite la caracterización genética del tumor mediante un proceso no invasivo en comparación con la biopsia convencional. El análisis de cfADN es un método alternativo no invasivo y rápido para detectar y monitorizar las alteraciones genómicas a lo largo del curso de la enfermedad. Las técnicas disponibles permiten la extracción de ADN de células/tejidos de diferentes orígenes. Se pueden utilizar diferentes protocolos, comercializados como "kits" que se pueden utilizar para extraer ácidos nucleicos de diferentes materiales (fluidos biológicos, cultivos celulares, muestras de tejido fresco o congelado). La concentración de cfADN suele ser muy baja y el cfADN está muy fragmentado con un fragmento de pico corto (por ejemplo, menor de 250 pb). En particular, los ácidos nucleicos de aproximadamente 160-165 pb generalmente aparecen en la orina, que es un tipo de muestra más deseable para la biopsia líquida. Por lo tanto, el método de extracción para el aislamiento de cfADN de muestras biológicas puede afectar significativamente el rendimiento del cfADN, lo que puede afectar aún más las características de diferentes pruebas y grados de validación clínica.

25

30

35

40

[0004] El desafío aquí es aislar, purificar y concentrar los fragmentos poco comunes y escasos de ácidos nucleicos en un fondo complejo de matriz biológica. Muchas veces el rendimiento de los fragmentos relevantes es tan bajo que los resultados posteriores de la PCR pueden no tener suficiente sensibilidad diagnóstica y especificidad. Por lo tanto, es de suma urgencia que se desarrolle un método nuevo y más efectivo de aislamiento, purificación y concentración de fragmentos de ácidos nucleicos menores de 250 pb.

45

[0005] Se han desarrollado una variedad de métodos diferentes para el aislamiento de ácidos nucleicos de muestras biológicas, por ejemplo, métodos que implican la adsorción selectiva de ácidos nucleicos en un sustrato y métodos que implican la eliminación de contaminantes de ácidos nucleicos solubles. Los métodos de purificación actualmente disponibles se basan en el uso de fenol/cloroformo, salazón, el uso de sales caotrópicas y resinas de sílice, el uso de resinas de afinidad, la cromatografía de intercambio iónico y el uso de perlas magnéticas como se describe en las patentes de EE. UU n.º 5.057.426, 4.923.978, las patentes EP 0512767 A1 y EP 0515484B y WO 95/13368, WO 97/10331 y WO 96/18731.

50

55

[0006] También se conocen procesos para purificar el ADN plasmídico mediante el sistema acuoso bifásico (ATPS) que se describe en WO2004/106516 y Purification of plasmid DNA vectors by aqueous two-phase extraction and hydrophobic interaction chromatography, Journal of Chromatography A, 1082 (2005), 176-184. Ambos procesos revelaron el uso de ATPS para la purificación del ADN plasmídico, pero ninguno de ellos fue diseñado para aislar ácidos nucleicos con una longitud de 250 pb o menos. No se espera que los procesos existentes para purificar moléculas grandes de ácidos nucleicos sean capaces de purificar ácidos nucleicos cortos de 250 pb o menos con suficiente pureza para un rendimiento satisfactorio de las aplicaciones posteriores.

60

65

[0007] La necesidad de preparar muestras biológicas específicamente para aislar, purificar y concentrar fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos es muy importante tanto en el ámbito de la investigación como en el de la industria, pero esta necesidad no se satisface en gran medida con los métodos existentes. Aunque se han descrito varios métodos de uso de diferentes formulaciones químicas para lograr la separación de especies en sistemas acuosos, no se ha intentado con éxito utilizar tales posibilidades para el aislamiento, purificación y concentración de fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos de una manera eficiente en el tiempo, rentable, sencilla y rápida que también ofrezca rendimientos superiores, que la presente invención ha demostrado haber logrado.

10 RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] La presente invención se refiere al aislamiento, concentración y/o purificación de fragmentos cortos de ácidos nucleicos en un sistema acuoso bifásico (ATPS). En una realización, la presente invención proporciona un método de uso de un ATPS para el aislamiento, concentración y/o purificación de fragmentos cortos de ácidos nucleicos que tienen aproximadamente 250 pares de bases (pb) o menos. En una realización, la presente invención proporciona una composición para la purificación de fragmentos cortos de ácidos nucleicos que tienen aproximadamente 250 pares de bases o menos a partir de materiales biológicos que contienen ácidos nucleicos. En otra realización, la presente invención proporciona un uso de ciertas sales y/o polímeros en un ATPS para la purificación de fragmentos cortos de ácidos nucleicos que tienen aproximadamente 250 pares de bases o menos a partir de ácidos nucleicos que contienen materiales biológicos.

BREVE DESCRIPCION DEL DIBUJO

[0009] Las figuras 1A y 1B muestran la separación de fases inducida por la adición de polímero y sal. El tubo de la figura 1A consta de dos fases separadas con una relación de volumen de fase superior/inferior de 1:1. El tubo de la figura 1B muestra dos fases separadas con una relación de volumen de fase superior/inferior de 9:1. Al ajustar los componentes ATPS, la relación de volumen de la fase superior con respecto a la fase inferior se puede cambiar de 1: 1 a 9: 1, y se puede alterar aún más para concentrar una molécula diana en la fase con un volumen más pequeño. La figura 1B muestra un escenario típico en el que la molécula diana se concentró en la fase inferior (se muestra en color más oscuro).

La figura 2 muestra una imagen de electroforesis en gel de ADN purificado según una realización de la presente invención.

La figura 3 muestra una imagen de electroforesis en gel de ácidos nucleicos de diferentes tamaños divididos en dos fases diferentes de acuerdo con una realización de la presente invención.

La figura 4 muestra el % de recuperación de ADN de diferentes tamaños extraído de acuerdo con una realización de la presente invención.

La figura 5 compara el % de recuperación de ADN de diferentes tamaños extraído según una realización de la presente invención y por el mini kit QIAamp Blood DNA.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

[0010] En la siguiente descripción, se describen varias realizaciones de la invención. A efectos de explicación, se establecen configuraciones y detalles específicos para proporcionar una comprensión profunda de las realizaciones. Además, para las formas plurales o singulares de una palabra y en la medida en que las orientaciones de las realizaciones se describen como "arriba", "abajo", "delante", "detrás", "izquierda", "derecha" y similares, estos términos son para ayudar al lector a comprender las realizaciones y no pretenden ser limitantes físicamente. Es evidente para una persona experta en la técnica que la presente invención puede practicarse sin detalles específicos. La invención se entenderá mejor por referencia a los ejemplos que siguen, pero los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los ejemplos específicos son solo para fines ilustrativos y no deben limitar el alcance de la invención que se define por las reivindicaciones que siguen a continuación. Cabe señalar que el término transitorio "que comprende" o "que incluye", que es sinónimo de "que contiene" o "se caracteriza por", es inclusivo o abierto y no excluye elementos o pasos de método adicionales no recitados.

[0011] En la presente invención, se ha adaptado un sistema acuoso bifásico (ATPS) para el aislamiento, concentración y/o purificación de fragmentos cortos de ácidos nucleicos que tienen aproximadamente 250 pares de bases (pb) o menos a partir de diversos materiales biológicos.

[0012] En una realización, la presente invención proporciona un método de uso de un sistema acuoso bifásico (ATPS) para el aislamiento, concentración y/o purificación de fragmentos cortos de ácidos nucleicos que tienen aproximadamente 250 pares de bases (pb) o menos. En una realización, el método comprende los pasos de

a) proporcionar una composición ATPS; y

b) poner en contacto o mezclar dicha composición ATPS con una solución de muestra que comprende los fragmentos cortos de ácidos nucleicos;

5 c) permitir que una mezcla de dicha ATPS y la solución de muestra se separe en una primera fase y una segunda fase;

donde los fragmentos cortos de ácidos nucleicos se dividen en la solución de primera fase o la solución de segunda fase, aislando y concentrando así los fragmentos cortos de ácidos nucleicos.

10 [0013] En una realización, la presente invención proporciona una composición para aislar y concentrar fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos de una muestra, la composición comprende un componente de primera fase y un componente de segunda fase capaz de formar un sistema acuoso bifásico (ATPS) cuando los componentes se disuelven en una solución acuosa; el componente de la primera fase es un polímero que se disuelve en una primera fase y el componente de la segunda fase es una sal que se disuelve en una segunda fase, que se caracteriza porque el polímero es polietilenglicol 6000 a una concentración del 8-11 % en peso, y la sal es fosfato de potasio dibásico a una concentración del 20-22 % en peso. . En una realización, los fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos se concentran en una fase.

20 [0014] En una realización, la presente invención proporciona un método para aislar y concentrar fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos de una muestra; el método mezcla una composición descrita en la presente invención con una solución de muestra que comprende los fragmentos cortos de ácidos nucleicos, aislando y concentrando así los fragmentos cortos de ácidos nucleicos.

25 [0015] En una realización, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos son ADN codificante, ADN no codificante, ARN mensajero, ARN ribosómico, microARN o ARN de transferencia. En una realización, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos son ADN circulante o ADN tumoral circulante. ATPS (sistema acuoso bifásico)

30 [0016] Similar a un sistema de aceite-agua, un ATPS consta de dos fases líquidas distintas, cuyas proporciones se pueden controlar fácilmente. Las biomoléculas suspendidas en el sistema ATPS se dividen en una de las dos fases acuosas en función de sus propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, hidrofiliidad y tensión interfacial de las dos fases), concentrando así las biomoléculas de interés.

35 [0017] En una realización, la presente invención proporciona un sistema acuoso bifásico (ATPS) de dos componentes para aislar/concentrar/purificar/recuperar uno o varios fragmentos cortos de ácidos nucleicos o moléculas diana (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico) de una muestra. Diferentes moléculas en una mezcla se distribuirían diferencialmente entre las dos fases debido a sus diferentes propiedades, y es posible separar y concentrar moléculas diana utilizando ATPS con preparación e intervención humana mínimas. En una
40 realización, no se necesita energía o equipo para lograr la separación de fases, ya que el flujo de fluido depende puramente de la acción capilar que se basa en principios dinámicos isotérmicos.

[0018] La ventaja de esta invención es que la alta pureza y concentración de la molécula diana se pueden obtener de una manera sencilla y compatible con aplicaciones posteriores, incluyendo, entre otras a la
45 amplificación (por ejemplo, por PCR), secuenciación, etiquetado o detección (por ejemplo, por hibridación o inmunoensayo de flujo lateral (LFA)) sin paso adicional de purificación o concentración.

[0019] Los métodos y dispositivos proporcionados en este documento son robustos, económicos, simples, fáciles de manipular, seguros, cómodos de usar y rápidos. El presente método es capaz de purificar y concentrar uno o
50 varios fragmentos cortos de ácidos nucleicos o moléculas diana y, por lo tanto, garantiza que el rendimiento de las aplicaciones posteriores utilizando la molécula purificada y concentrada no se verá afectado por impurezas en la muestra original.

[0020] Debido a las características únicas descritas en este documento, la presente invención puede purificar y concentrar la molécula diana conveniente y rápidamente sin el uso de instrumentación compleja, y es aplicable a
55 muestras que contienen uno o varios fragmentos cortos de ácidos nucleicos o moléculas diana en una cantidad muy baja, o de un volumen pequeño. Además, el método actual es fácilmente adaptable a la automatización, incluyendo los sistemas de detección de alto rendimiento.

60 Uso de ATPS (sistema acuoso bifásico) para aislar y/o concentrar pequeños fragmentos de ácidos nucleicos

[0021] En una realización, la presente invención se utiliza para aislar, purificar, recuperar y concentrar uno o
65 varios fragmentos cortos de ácidos nucleicos o moléculas diana de una muestra. En una realización, la presente invención es capaz de separar los fragmentos cortos de ácidos nucleicos o moléculas diana de moléculas no diana, y concentrar las moléculas de ácidos nucleicos diana simultáneamente.

[0022] En una realización de la presente invención, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos o moléculas diana se retienen en el material poroso integrado en el ATPS, mientras que los materiales no diana se dejan en el sistema líquido (es decir, la muestra original más cualquier componente no ATPS). En una realización, los materiales no diana se retienen en el material poroso integrado en ATPS, mientras que los fragmentos cortos de ácidos nucleicos o las moléculas diana se dejan en el sistema líquido (es decir, la muestra original más cualquier componente no ATPS).

[0023] En la presente invención, el sistema acuoso bifásico (ATPS) ha sido adaptado para el aislamiento, concentración y/o purificación de fragmentos cortos de ácidos nucleicos que tienen aproximadamente 250 pares de bases o menos a partir de diversos materiales biológicos.

[0024] En una realización, la presente invención proporciona un método de uso de un sistema acuoso bifásico (ATPS) para el aislamiento, concentración y/o purificación de fragmentos cortos de ácidos nucleicos que tienen aproximadamente 250 pares de bases o menos. En una realización, el método comprende los pasos de

a) proporcionar una composición ATPS que comprende una solución de primera fase y una solución de segunda fase; y

b) poner en contacto dicha composición ATPS con una solución de muestra que comprende fragmentos cortos de ácidos nucleicos y

permitir que los fragmentos cortos de ácidos nucleicos se concentren en la solución de la primera fase o en la solución de la segunda fase, aislando, concentrando y/o purificando así los fragmentos cortos de ácidos nucleicos.

[0025] En una realización, la composición de ATPS es una solución de fase mixta de componentes ATPS que comprende polímeros y sales. En una realización, la composición se separa en la solución de la primera fase y la solución de la segunda fase después de que se pone en contacto con la solución de muestra, iniciando así una separación de fase.

[0026] En una realización, los ácidos nucleicos son ADN circulante (cfADN). Tal como se usa en el presente documento, el "ADN circulante" (cfADN) es el ADN que está presente fuera de una célula, por ejemplo, el ADN presente en la sangre, el plasma, el suero o la orina de un sujeto. Sin estar limitado por ninguna teoría o mecanismo en particular, se cree que el cfADN se libera o se origina a partir de células, por ejemplo, a través de la apoptosis de las células. Tal como se usa en la presente invención, "cfADN nativo" o "cfADN del sujeto" se refiere al ADN circulante liberado u originado a partir de células (por ejemplo, células no cancerosas) del sujeto. Tal como se usa en la presente invención, "cfADN no nativo" o "cfADN no nativo del sujeto" se refiere al ADN circulante de una fuente no nativa que difiere del cfADN del sujeto en términos de secuencia, por ejemplo, una diferencia en la identidad de secuencia en uno o varios loci que incluyen, entre otros, los descritos en este documento. Los ejemplos de ADN no nativo incluyen, entre otros, ADN de donante de trasplante y ADN de cáncer/tumor. Los ejemplos de cfADN no nativo incluyen, entre otros, cfADN de donante de trasplante (también denominado cfADN específico del donante) y cfADN tumoral (también conocido en el presente documento como cfADN específico del cáncer). La fuente de cfADN no nativo depende del sujeto. Como otro ejemplo, el cfADN no nativo incluye ADN bacteriano, fúngico y vírico. Por ejemplo, si un sujeto es un receptor de trasplante, el cfADN no nativo puede eliminarse del órgano trasplantado donado (cfADN específico del donante) y el cfADN nativo puede ser eliminado por células del huésped/sujeto (cfADN del huésped). Si el sujeto tiene cáncer, el cfADN no nativo puede ser eliminado, por ejemplo, por un tumor y/o metástasis (cfADN específico del cáncer), y el cfADN nativo puede ser eliminado, por ejemplo, por células no cancerosas del sujeto.

[0027] En una realización, los ácidos nucleicos son ADN tumoral circulante (ctADN) que está presente en el plasma o el suero de los pacientes de cáncer.

[0028] En una realización, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos sujetos a la presente invención son iguales o menores de 250 pb de tamaño. En otra realización, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos tienen un tamaño de 160-165 pb. En otra realización, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos tienen un tamaño de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240 o 250 pb.

[0029] En una realización, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos se distribuyen en la solución de primera fase. En otra realización, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos se distribuyen en la segunda fase. En otra realización, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos se distribuyen en la interfaz de la solución de la primera fase y la solución de la segunda fase.

[0030] En una realización, la solución de muestra es una muestra que contiene ácidos nucleicos o material biológico que contiene ácidos nucleicos. La importancia de la presente invención radica en el tratamiento y preparación de muestras que contienen ácidos nucleicos y materiales biológicos que contienen ácidos nucleicos,

ES 2 964 100 T3

que incluyen, entre otros, tejidos, sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, saliva, materias fecales y secreciones tales como lágrimas, esputo, moco nasofaríngeo, flujo vaginal, secreción peneana.

5 [0031] En una realización, la solución de la primera fase comprende un polímero. En una realización, el primer polímero comprende polietilenglicol

En una realización, la concentración de polímero de la solución de la primera fase está en el intervalo de aproximadamente el 8 a aproximadamente el 11 % en peso del peso total de la solución acuosa (p/p). En varias realizaciones, la solución de polímero se selecciona de una solución de polímero que es aproximadamente del 8 % p/p, aproximadamente del 9 % p/p, aproximadamente del 10 % p/p y aproximadamente del 11 % p/p

10 [0032] En una realización, la solución de segunda fase comprende una sal y, por lo tanto, forma una solución salina. En una realización, la sal es K_2HPO_4 .

15 [0033] En una realización, la concentración total de sal está en el rango de aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 22 %. Una persona experta en la técnica comprenderá que la cantidad de sal necesaria para formar un sistema acuoso de dos fases estará influenciada por el peso molecular, la concentración y el estado físico del polímero.

20 [0034] En varias realizaciones, la solución salina es de aproximadamente el 20 % al 22 % p/p. En varias realizaciones, la solución salina es aproximadamente del 20% p/p, aproximadamente del 21 % p/p y aproximadamente del 22 % p/p.

25 [0035] En una realización, la solución de primera fase y/o la solución de segunda fase comprende un disolvente que es inmisible con agua. En algunas realizaciones, el disolvente comprende un disolvente orgánico no polar. En algunas realizaciones, el disolvente comprende un aceite. En algunas realizaciones, el disolvente puede ser pentano, ciclopentano, benceno, 1,4-dioxano, dietiléter, diclorometano, cloroformo, tolueno o hexano.

30 [0036] En una realización, las proporciones entre la solución de la primera fase y la solución de la segunda fase están en el intervalo de 1:1 a 1: 1000. En algunas realizaciones, la proporción entre la solución de la primera fase y la solución de la segunda fase puede ser una proporción de aproximadamente 1: 1, aproximadamente 1: 2, aproximadamente 1: 3, aproximadamente 1: 4, aproximadamente 1: 5, aproximadamente 1: 6, aproximadamente 1: 7, aproximadamente 1: 8, aproximadamente 1: 9 y aproximadamente 1: 10. En algunas realizaciones, la proporción entre la solución de la primera fase y la solución de la segunda fase puede ser una proporción de aproximadamente 1:20, aproximadamente 1:30, aproximadamente 1:40, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:60, aproximadamente 1:70, aproximadamente 1:80, aproximadamente 1:90 y aproximadamente 1: 100. En algunas realizaciones, la proporción entre la solución de la primera fase y la solución de la segunda fase puede ser de aproximadamente 1:200, aproximadamente 1:300, aproximadamente 1:400, aproximadamente 1:500, aproximadamente 1:600, aproximadamente 1:700, aproximadamente 1:800, aproximadamente 1:900 y aproximadamente 1: 1000.

40 [0037] En una realización, la proporción entre la solución de la segunda fase y la solución de la primera fase es de aproximadamente 1: 1, aproximadamente 1: 2, aproximadamente 1: 3, aproximadamente 1: 4, aproximadamente 1: 5, aproximadamente 1: 6, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1: 8, aproximadamente 1: 9 o aproximadamente 1: 10. En algunas realizaciones, la proporción entre la solución de la segunda fase y la solución de la primera fase es de aproximadamente 1:20, aproximadamente 1:30, aproximadamente 1:40, aproximadamente 1:50, aproximadamente 1:60, aproximadamente 1:70, aproximadamente 1:80, aproximadamente 1:90, o aproximadamente 1: 100. En algunas realizaciones, la proporción entre la solución de la segunda fase y la solución de la primera fase puede ser de aproximadamente 1:200, aproximadamente 1:300, aproximadamente 1:400, aproximadamente 1:500, aproximadamente 1:600, aproximadamente 1:700, aproximadamente 1:800, aproximadamente 1:900 o aproximadamente 1: 1000.

55 [0038] En una realización, la presente invención proporciona una composición para aislar y/o concentrar fragmentos cortos de ácidos nucleicos, la composición comprende componentes que son capaces de formar un sistema acuoso bifásico (ATPS).

[0039] En una realización, la composición actual comprende una solución de fase mixta que comprende una solución de primera fase y una solución de segunda fase, que incluyen las descritas en la descripción anterior.

60 [0040] En una realización, la composición actual para aislar y/o concentrar fragmentos cortos de ácidos nucleicos comprende polietilenglicol (PEG) 6000 y fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4). En una realización, la composición actual para aislar y/o concentrar fragmentos cortos de ácidos nucleicos comprende un 11 % de polietilenglicol (PEG) 6000 y un 20 % de K_2HPO_4 . En otra realización, la composición actual para aislar y/o concentrar fragmentos cortos de ácidos nucleicos comprende un 8 % de polietilenglicol (PEG) 6000 y un 22 % de K_2HPO_4 .

65 Ajuste de los factores de concentración

[0041] A modo de ilustración, en algunas realizaciones, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos diana se concentran 10 veces en la solución de la primera fase, por ejemplo, mediante el uso de una proporción de volumen de 1:9 de la solución de la primera fase con respecto a la solución de la segunda fase.

5

[0042] En una realización, se pueden cambiar las cantidades relativas de componentes ATPS. La relación de volumen de los dos componentes de ATPS se controla para aislar/purificar/concentrar/recuperar los fragmentos cortos de ácidos nucleicos o moléculas diana preferentemente en una fase.

10

[0043] Para cuantificar mejor los fenómenos asociados con la presente invención, se desarrolló un ensayo para evaluar la correlación entre las cantidades relativas de componentes ATPS y el resultado alcanzado (p. ej., eficiencia de concentración/aislamiento/recuperación). Con esto, el factor de concentración, la eficiencia de aislamiento y la tasa de recuperación se pueden seleccionar y configurar ajustando la cantidad relativa de los componentes ATPS.

15

[0044] En una realización, la relación entre las dos fases en un ATPS puede controlarse fácilmente mediante concentraciones variables de componentes ATPS. Las figuras 1A-B muestran la concentración de separación de fases inducida por la adición de diferentes componentes ATPS (por ejemplo, polímero y sal) a la solución. Los componentes ATPS y la muestra se mezclaron 1: 1. Al ajustar los componentes ATPS, la fase de mezcla se separa y las moléculas diana se dividen en una de las dos fases. La figura 1B muestra que la molécula diana se concentró en la fase inferior con una relación de volumen de 9: 1. La relación de volumen entre la fase superior y la fase inferior se puede alterar aún más para concentrar la molécula diana en una fase con un volumen más pequeño.

20

25

[0045] En otra realización, ajustando los componentes ATPS (por ejemplo, añadiendo componentes ATPS adicionales del mismo tipo o de tipos diferentes a la mezcla, o alterando el volumen relativo o la concentración de componentes ATPS que deben añadirse a la mezcla al preparar la solución final, o ajustando el volumen de la solución de muestra que debe añadirse al sistema al preparar la solución final), el volumen relativo o la concentración de los componentes ATPS en la mezcla final pueden alterarse. En una realización, la relación de volumen de la fase superior con respecto a la fase inferior se puede cambiar de 1: 1 a 9: 1, o relaciones más altas. Este fenómeno se puede aprovechar para concentrar una molécula diana sin necesidad de energía, equipo o formación. En un medio simple, como el agua o una solución salina, esto es trivial de reproducir; sin embargo, dado un medio complejo (por ejemplo, saliva, sangre, orina, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), materias fecales y secreciones como lágrimas, esputo, moco nasofaríngeo, flujo vaginal y secreción peneana) que tiene una alta variabilidad y potencialmente otras sustancias interferentes, es más difícil lograr una relación de volumen útil. La eliminación de sustancias interferentes del medio complejo puede ayudar. Por ejemplo, el ácido cítrico se puede utilizar para eliminar la urea de la orina, o el ácido tricloroacético se puede utilizar para eliminar la proteína de la saliva en algunas realizaciones de esta invención.

30

35

40

Diseño de material poroso integrado en ATP

[0046] En una realización, el presente método proporciona un material poroso integrado con componentes ATPS. En una realización, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos pueden aislarse y concentrarse a medida que la muestra viaja a través del material poroso integrado con componentes ATPS. En una realización, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos aislados y concentrados se recogen del material poroso directamente para su posterior análisis o almacenamiento.

45

[0047] El material poroso puede estar hecho de cualquier material poroso adecuado que pueda absorber y transferir líquido. Los materiales porosos adecuados para esta invención incluyen, entre otros, papel de fibra de vidrio, papel a base de algodón, otros tipos de papel, espumas poliméricas, espumas de celulosa, otros tipos de espumas, tela de rayón, tela de algodón, otros tipos de tela, madera, piedras y cualquier otro material que pueda absorber y transferir líquido.

50

[0048] En una realización, el ATPS comprende una solución de fase mixta que comprende una solución de primera fase y una solución de segunda fase, en la que los componentes de la solución de primera fase y los componentes de la solución de segunda fase están integrados en dicho material poroso a una concentración o carga que es suficiente para someterse a una separación de fase a medida que la solución de fase mixta fluye a través del material poroso.

55

60

[0049] En una realización, los componentes ATPS están integrados en dicho material poroso a una concentración o carga que es suficiente para someterse a una separación de fases a medida que la solución de fase mixta fluye a través del material poroso.

65

[0050] En una realización, algunos de los componentes ATPS se integran en el material poroso y luego se deshidratan antes de agregar una muestra que contiene los fragmentos de ácidos nucleicos diana a dicho material poroso.

[0051] En una realización, algunos de los componentes ATPS se integran en el material poroso y luego se deshidratan (el "material poroso pretratado"), mientras que los componentes ATPS restantes se mezclan primero con una muestra que contiene los fragmentos de ácidos nucleicos diana y luego se someten a aislamiento y concentración posteriores mediante separación de fases dentro del material poroso pretratado.

[0052] En una realización, algunos componentes ATPS se mezclan primero con una muestra que contiene los fragmentos cortos de ácidos nucleicos, la mezcla resultante se integra en el material poroso; los componentes ATPS restantes se agregan al material poroso para su posterior aislamiento/concentración a través de la separación de fases dentro del material poroso.

[0053] En una realización, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos están en contacto con la mezcla de componentes ATPS o mezclados con componentes ATPS, y se dividen en la solución de primera fase, la solución de segunda fase o la interfaz (o interfase) entre la solución de primera fase y la solución de segunda fase a medida que viaja a través del material poroso.

[0054] En una realización, se proporciona un ATPS (sistema acuoso bifásico) de dos componentes dentro de un material poroso para separar fragmentos cortos de ácidos nucleicos y moléculas largas de ácidos nucleicos en una muestra. En una realización, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos y las moléculas largas de ácidos nucleicos se dividen en diferentes fases del ATPS a medida que el ATPS sufre una separación de fases dentro del material poroso.

[0055] En una realización, el material poroso y el ATPS se seleccionan de modo que la solución de la primera fase fluya a través de la matriz porosa a una primera velocidad y la solución de la segunda fase fluya a través de la matriz porosa a una segunda velocidad, donde la primera velocidad y la segunda velocidad son diferentes.

[0056] En una realización, el material poroso está disponible comercialmente o por fabricación propia.

[0057] En una realización, para integrar los componentes ATPS en el material poroso, los componentes ATPS se solubilizan en agua (o el tampón apropiado) y se aplican sobre el material poroso en ciertas proporciones y/o concentraciones. Los materiales porosos se colocan en un liofilizador para eliminar el agua, lo que da como resultado la integración de componentes ATPS directamente en el material poroso. Tras la introducción de la muestra en los materiales porosos, los componentes ATPS se rehidratan instantáneamente y, por lo tanto, separan los fragmentos cortos de ácidos nucleicos o las moléculas diana en la muestra. En una realización, los fragmentos cortos de ácidos nucleicos se concentran en la parte frontal del flujo de fluido. En una realización, no se utiliza energía o equipo externo para proporcionar una fuerza motriz.

Diagnóstico mejorado mediante el inmunoensayo de flujo lateral (LFA)

[0058] Los fragmentos cortos de ácidos nucleicos obtenidos por el presente método pueden ser objeto de detección o análisis mediante inmunoensayo de flujo lateral (LFA).

[0059] Los métodos y dispositivos de inmunoensayo de flujo lateral (LFA) están ampliamente descritos. Véanse, por ejemplo, Gordon y Pugh, patente EE. UU. n.º 4.956.302; H. Buck, et al., WO 90/06511; T. Wang, patente EE. UU. n.º 6.764.825; W. Brown, et al., patente EE. UU. n.º 5.008.080; Kuo y Meritt, EE. UU. 6.183.972, EP 00987551 A3. Tales ensayos implican la detección y determinación de un analito que es miembro de un par de unión específico que consiste en un ligando y un receptor. El ligando y el receptor están relacionados en que el receptor se une específicamente al ligando, siendo capaz de distinguir un ligando o ligandos específicos de otros constituyentes de muestra que tienen características similares. Los ensayos inmunológicos que implican reacciones entre anticuerpos y antígenos son un ejemplo de un ensayo de unión específico. Otros ejemplos incluyen reacciones de hibridación de ADN y ARN y reacciones de unión que involucran hormonas y otros receptores biológicos.

[0060] En una realización, la presente invención es capaz de concentrar fragmentos cortos de ácidos nucleicos indicativos de una enfermedad presente en un sujeto, el producto obtenido está sujeto a un procedimiento diagnóstico aguas abajo que requiere la detección o cuantificación de los fragmentos cortos de ácidos nucleicos. También se espera que la presente invención pueda reducir la relación señal-ruido y potenciar la señal positiva en el inmunoensayo de flujo lateral (LFA) ya que la concentración de los fragmentos cortos de ácidos nucleicos ha aumentado. La tasa de falsos positivos y la tasa de falsos negativos también podrían reducirse como resultado. La concentración puede mejorarse y, por lo tanto, es posible detectar moléculas que no pudieron detectarse debido a su baja abundancia o a la interferencia por impurezas en la muestra.

[0061] Puede producir un resultado falso negativo si los fragmentos cortos de ácidos nucleicos tienen una concentración extremadamente baja. En una realización, debido al aumento de la concentración de los fragmentos cortos de ácidos nucleicos, se mejora el límite de detección del LFA. Como resultado, aumenta la reproducibilidad de la prueba.

- 5 [0062] En una realización, esta invención proporciona una composición para aislar y concentrar fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos de una muestra, la composición comprende un componente de primera fase y un componente de segunda fase capaces de formar un sistema acuoso bifásico (ATPS) cuando los componentes se disuelven en una solución acuosa. En una realización, el componente de la primera fase es un polímero que se disuelve en una primera fase a una concentración del 8-11 % en peso, y el componente de la segunda fase es una sal que se disuelve en una segunda fase a una concentración del 20-22 % en peso, y cuando los fragmentos de ácidos nucleicos se mezclan con el ATPS, los fragmentos se concentran en una de las dos fases.
- 10 [0063] En una realización de la composición actual, el polímero es polietilenglicol.
- [0064] En una realización de la composición actual, la sal es fosfato de potasio.
- 15 [0065] En una realización de la composición actual, el polímero es polietilenglicol con un peso molecular de 6000 Da.
- [0066] En una realización de la composición actual, la sal es fosfato de potasio dibásico.
- 20 [0067] En una realización de la composición actual, cuando la muestra se mezcla con la composición, la mezcla resultante se somete a separación de fases y los fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos se concentran en una de las dos fases. En una realización, los fragmentos de ácidos nucleicos mayores de 250 pb y los fragmentos de 250 pb o menos se concentran en diferentes fases del ATPS.
- 25 [0068] En una realización de la composición actual, los fragmentos de ácidos nucleicos son ADN codificante, ADN no codificante, ARN mensajero, ARN ribosómico, microARN o ARN de transferencia. En una realización, los fragmentos de ácidos nucleicos son ADN circulante o ADN tumoral circulante.
- [0069] En una realización de la composición actual, la muestra es sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, materia fecal, lágrimas, esputo, moco nasofaríngeo, flujo vaginal o secreción peneana.
- 30 [0070] En una realización, esta invención proporciona un método para aislar y concentrar fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos de una muestra, el método comprende:
- 35 a) preparar una composición descrita en esta solicitud;
- b) mezclar la composición del paso a) con una solución acuosa que contenga la muestra, permitiendo que la mezcla resultante se divida en dos fases, y los fragmentos de ácidos nucleicos se concentren en una de las dos fases; y
- 40 c) aislar los fragmentos de ácidos nucleicos de una de las dos fases.
- [0071] En una realización, esta invención proporciona un método para aislar y concentrar fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos de una muestra, el método comprende:
- 45 a) preparar una composición que comprende un componente de la primera fase y un componente de la segunda fase capaces de formar un sistema acuoso bifásico (ATPS) cuando los componentes se disuelven en una solución acuosa, y el componente de la primera fase es un polímero que se disuelve en una primera fase a una concentración del 8-11 % en peso, y el componente de la segunda fase es una sal que se disuelve en una
- 50 segunda fase a una concentración de 20-22 % en peso;
- b) mezclar la composición del paso a) con una solución acuosa que contenga la muestra, permitiendo que la mezcla resultante se divida en dos fases, y los fragmentos de ácidos nucleicos se concentren en una de las dos fases; y
- 55 c) aislar una de las dos fases que se concentra con los fragmentos de ácidos nucleicos.
- [0072] En una realización del método actual, el método comprende además la recuperación de los fragmentos de ácidos nucleicos de la fase en el paso c).
- 60 [0073] En una realización del método actual, el polímero es polietilenglicol.
- [0074] En una realización del método actual, la sal es fosfato de potasio.
- 65 [0075] En una realización del método actual, el polímero es polietilenglicol con un peso molecular de 6000 Da.

[0076] En una realización del método actual, la sal es fosfato de potasio dibásico.

[0077] En una realización del presente método, los fragmentos de ácidos nucleicos mayores de 250 pb y los fragmentos de 250 pb o menos se concentran en diferentes fases del ATPS en el paso b).

[0078] En una realización del presente método, los fragmentos de ácidos nucleicos son ADN codificante, ADN no codificante, ARN mensajero, ARN ribosómico, microARN o ARN de transferencia. En una realización, los fragmentos de ácidos nucleicos son ADN circulante o ADN tumoral circulante.

[0079] En una realización del presente método, la muestra es sangre, plasma, suero, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, materia fecal, lágrimas, esputo, moco nasofaríngeo, flujo vaginal o secreción peneana.

[0080] En una realización del método actual, los fragmentos de ácidos nucleicos se concentran al menos 10 veces en comparación con la muestra.

[0081] Esta invención se entenderá mejor mediante referencia a los ejemplos siguientes. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los ejemplos proporcionados son meramente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención que se define por las reivindicaciones siguientes.

[0082] A lo largo de esta solicitud, cabe señalar que el término transitorio "que comprende", que es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "que se caracteriza por", es inclusivo o abierto y no excluye elementos o pasos de método adicionales no recitados.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Aislamiento selectivo y concentración de fragmentos cortos de ácidos nucleicos (<250 pb) de la solución PBS utilizando un sistema acuoso bifásico

[0083] La escalera de ADN (GeneRuler 1 kb plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) se introdujo en 1 ml de un sistema acuoso bifásico compuesto de un 11 % (p/p) de polietilenglicol (PEG) 6000 y un 20% (p/p) de K₂HPO₄ en solución PBS para conseguir una concentración final de ADN de μ g/ml. Después de agitar a fondo, las mezclas se centrifugaron durante 10 s a 10 000 rcf para la separación de fases. La relación de volumen entre la fase superior y la fase inferior fue de alrededor de 1:3. Las fases superior e inferior se extrajeron y se transfirieron a nuevos tubos respectivamente. Las fases extraídas se sometieron a precipitación de etanol y los precipitados se separaron mediante electroforesis en gel para visualizar la partición del tamaño del ADN en cada fase, como se muestra en la figura 3. La mayoría de los ácidos nucleicos mayores de 250 pb se distribuyeron en la fase inferior (carril derecho), mientras que los ácidos nucleicos menores de 250 pb se distribuyeron en la fase superior (carril izquierdo). Dado que la relación de volumen entre la fase superior y la fase inferior era de alrededor de 1:3, los fragmentos de ácidos nucleicos más cortos se aislaron de los fragmentos de ácidos nucleicos más largos y posteriormente se concentraron en un volumen más pequeño de solución.

[0084] Los fragmentos cortos de ácidos nucleicos obtenidos de los procedimientos anteriores se analizaron más a fondo mediante un LFA, con una muestra de ADN sin concentración por ATPS como control. Se utilizó ImageJ o Gelanalyzer para medir la intensidad de la línea de ensayo y los resultados se resumen en la siguiente tabla 1:

Tabla 1 - Intensidad de la línea de ensayo

	ADN concentrado por ATPS	Control
Intensidad de la línea de ensayo	60x	1x

Ejemplo 2 - Aislamiento selectivo y concentración de fragmentos cortos de ácidos nucleicos (<250 pb) de muestras de plasma utilizando un sistema acuoso bifásico

[0085] La escalera de ADN (GeneRuler Low Range DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific) se añadió a 500 ul de muestra de plasma. La muestra de plasma enriquecida se agregó a 500 ul de sistema acuoso bifásico compuesto de un 15 % (p/p) de polietilenglicol (PEG) 1000 y un 15 % (p/p) de K₂HPO₄ en agua MilliQ para obtener una concentración final de ADN de μ g/ml. Después de agitar a fondo, las mezclas se centrifugaron durante 10 s a 10 000 rcf para la separación de fases. La relación de volumen entre la fase superior y la fase inferior fue de alrededor de 1: 1.

[0086] La fase inferior se extrajo y se agregó a otra solución ATPS compuesta de un 11 % (p/p) de polietilenglicol (PEG) 6000 y un 20 % (p/p) de K₂HPO₄. Después de agitar a fondo, las mezclas se centrifugaron durante 10 s a 10 000 rcf para la separación de fases. La relación de volumen entre la fase superior y la fase inferior fue de alrededor de 1:3. Las fases superior e inferior se extrajeron y se transfirieron a nuevos tubos respectivamente. Las fases extraídas se sometieron a precipitación de etanol y los precipitados se separaron mediante electroforesis en gel para visualizar la partición del tamaño del ADN en cada sección (Figura 3). Los ácidos

nucleicos mayores de 250 pb se distribuyen en la fase inferior (carril derecho), mientras que los ácidos nucleicos menores de 250 pb se distribuyen en la fase superior (carril izquierdo) y, por lo tanto, los ácidos nucleicos de tamaño más pequeño se aislaron de la solución de muestra y se concentraron en un volumen más pequeño de solución.

5

[0087] Después del aislamiento y la concentración mediante el ATPS como se describe en este ejemplo, se estimó la recuperación de diferentes tamaños de la escalera de ADN (figura 4, donde el porcentaje de recuperación = rendimiento absoluto del ADN recuperado/cantidad de ADN enriquecido en la muestra). Se encontró que el ADN que era menor de 250 pb se recuperó en un alto porcentaje, mientras que el ADN que era mayor de 250 pb disminuyó significativamente. Se demostró que la invención actual es específica para capturar ADN que fuera inferior a 250 pb.

10

Ejemplo 3 - Comparación del sistema acuoso bifásico con el mini kit QIAamp Blood DNA (Qiagen)

15

[0088] Se introdujeron plásmidos de ADN digeridos de diferentes tamaños (250, 200, 150, 100, 75, 50, 25 pb) en una muestra de plasma para obtener una concentración final de ADN de 100 ng/ml. 1 ml de la muestra de plasma enriquecido resultante se agregó a 1 ml de un sistema acuoso bifásico compuesto de un 15 % (p/p) de polietilenglicol (PEG) 1000 y un 15 % (p/p) de K₂HPO₄ en agua MilliQ. Después de agitar a fondo, las mezclas se centrifugaron durante 10 s a 10 000 rcf para la separación de fases. La relación de volumen entre la fase superior y la fase inferior fue de alrededor de 1: 1.

20

[0089] La fase inferior se extrajo y se agregó a otra solución ATPS compuesta de un 8 % (p/p) de polietilenglicol (PEG) 6000 y un 22 % (p/p) de K₂HPO₄. Después de agitar a fondo, las mezclas se centrifugaron durante 10 s a 10 000 rcf para la separación de fases. La relación de volumen entre la fase superior y la fase inferior fue de alrededor de 1:5. La fase superior se extrajo y se transfirió a un nuevo tubo.

25

[0090] Se realizó otra extracción con 1 ml de la muestra de plasma enriquecida utilizando el mini kit QIAamp Blood DNA (Qiagen). El efecto de aislamiento sobre los ácidos nucleicos mediante el uso de dos métodos diferentes se comparó mediante un ensayo electroforético de los ácidos nucleicos aislados en el Bioanalizador Agilent. Los resultados se mostraron en la figura 5. Como se muestra en la figura 5, al utilizar la presente invención, se extrajo alrededor del 50-80 % de los ácidos nucleicos de longitud inferior a 250 pb (25-200 pb) mientras que se extrajo aproximadamente el 80 % de los ácidos nucleicos de 150-200 pb. En contraste, se encontró que el mini Kit QIAamp Blood DNA no puede extraer ningún ADN de 25 pb. Por lo tanto, la presente invención mostró un rendimiento mejorado en comparación con el mini Kit QIAamp Blood DNA.

30

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para aislar y concentrar selectivamente fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos de una muestra, que comprende un componente de primera fase y un componente de segunda fase que forman un sistema acuoso bifásico (ATPS) cuando los componentes se disuelven en una solución acuosa, donde el componente de la primera fase es un polímero que se disuelve en una primera fase, y el componente de la segunda fase es una sal que se disuelve en una segunda fase, caracterizada por el hecho de que:
- 10 el polímero es polietilenglicol 6000 a una concentración del 8-11 % en peso, y la sal es fosfato de potasio dibásico a una concentración del 20-22 % en peso.
- 15 2. Composición de la reivindicación 1, caracterizada por el hecho de que dicho polietilenglicol 6000 es el 11 % y fosfato de potasio dibásico es el 20 %.
3. Composición de la reivindicación 1, caracterizada por el hecho de que dicho polietilenglicol 6000 es el 8 % y fosfato de potasio dibásico es el 22 %.
- 20 4. Composición de la reivindicación 1, caracterizada por el hecho de que dicha sal comprende además uno o varios fosfatos potásicos monobásicos, cloruro sódico, sulfato de sodio y fosfato de sodio.
5. Composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizada por el hecho de que dichos fragmentos de ácidos nucleicos son ADN circulante o ADN tumoral circulante.
- 25 6. Método para aislar y concentrar selectivamente fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos de una muestra, que comprende:
- a) preparar la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5;
- 30 b) mezclar la composición del paso a) con una solución acuosa que contenga la muestra, permitiendo que la mezcla resultante se divida en dos fases, donde dichos fragmentos de ácidos nucleicos se concentran en la fase superior; y
- c) aislar dichos fragmentos de ácidos nucleicos de la fase superior.
- 35 7. Método para aislar y concentrar selectivamente fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos de una muestra, que comprende:
- a) preparar una composición que comprende un componente de la primera fase y un componente de la segunda fase que formen un sistema acuoso bifásico (ATPS) cuando los componentes se disuelven en una solución acuosa, donde el componente de la primera fase es un polímero que se disuelve en una primera fase, y el componente de la segunda fase es una sal que se disuelve en una segunda fase,
- 40 **caracterizado por el hecho de que:**
el polímero es polietilenglicol 6000 a una concentración del 8-11 % en peso, y la sal es fosfato de potasio dibásico a una concentración del 20-22 % en peso;
- 45 b) mezclar la composición del paso a) con una solución acuosa que contenga la muestra, permitiendo que la mezcla resultante se divida en dos fases, donde dichos fragmentos de ácidos nucleicos se concentran en la fase superior; y
- c) aislar la fase superior que se concentra con dichos fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos.
- 50 8. Método de la reivindicación 7, que comprende además la recuperación de los fragmentos de ácidos nucleicos de la fase en el paso c).
9. Método de la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que dicho polímero es polietilenglicol 6000 que es el 11 % y el fosfato de potasio dibásico es el 20 %.
- 55 10. Método de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, que comprende además los siguientes pasos antes del paso b):
- a) preparar una composición que comprende un componente de la primera fase y un componente de la segunda fase que formen un sistema acuoso bifásico (ATPS) cuando los componentes se disuelven en una solución acuosa, donde el componente de la primera fase comprende una disolución de polímero en una primera fase, y el componente de la segunda fase comprende una disolución de sal en una segunda fase,
- 60 **caracterizado por el hecho de que:**
el polímero es polietilenglicol (PEG) 1000 del 15 % y la sal es fosfato de potasio dibásico del 15 %;
- 65 ii) mezclar la composición del paso i) con una solución acuosa que contenga la muestra, permitiendo que la mezcla resultante se divida en dos fases, donde dichos fragmentos de ácidos nucleicos se concentran en la fase inferior; y

iii) aislar la fase inferior como muestra para el paso b).

- 5 11. Método de la reivindicación 10, caracterizado por el hecho de que dicho polietilenglicol 6000 es un 8 % y el fosfato de potasio dibásico es un 22 %.
12. Método de cualquiera de las reivindicaciones 7-11, caracterizado por el hecho de que dichos fragmentos de ácidos nucleicos son ADN circulante o ADN tumoral circulante.
- 10 13. Método de cualquiera de las reivindicaciones 7-12, caracterizado por el hecho de que la muestra es una muestra de plasma.
14. Método de la reivindicación 9, caracterizado por el hecho de que la relación de volumen entre la fase superior y la fase inferior es 1: 3.
- 15 15. Método de la reivindicación 9, que comprende además el siguiente paso después del paso c):
d) someter la fase superior a la precipitación de etanol.
- 20 16. Uso de una composición que comprende un componente de la primera fase y un componente de la segunda fase que forman un sistema acuoso bifásico (ATPS) cuando los componentes se disuelven en una solución acuosa, donde el componente de la primera fase es un polietilenglicol 6000 que se disuelve en una primera fase a una concentración del 8-11 % en peso, y el componente de la segunda fase es fosfato de potasio dibásico que se disuelve en una segunda fase a una concentración del 20-22 % en peso, para el aislamiento selectivo y la concentración de fragmentos de ácidos nucleicos de 250 pb o menos de una muestra.
- 25 17. Uso según la reivindicación 16, caracterizado por el hecho de que dicho polietilenglicol 6000 está presente en una concentración en peso del 11 %, y caracterizado por el hecho de que la concentración en peso del fosfato de potasio dibásico es del 20 %.
- 30 18. Uso según la reivindicación 16, caracterizado por el hecho de que dicho polietilenglicol 6000 está presente en una concentración en peso del 8 %, y caracterizado por el hecho de que la concentración en peso del fosfato de potasio dibásico es del 22 %.
- 35 19. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16-18, caracterizado por el hecho de que dichos fragmentos de ácidos nucleicos son ADN circulante o ADN tumoral circulante.
20. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 16-19, caracterizado por el hecho de que la muestra es una muestra de plasma.

Figura 1A

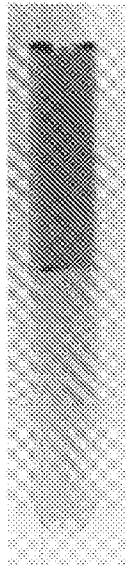


Figura 1B

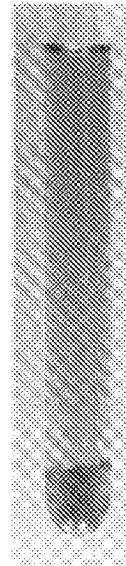


Figura 2

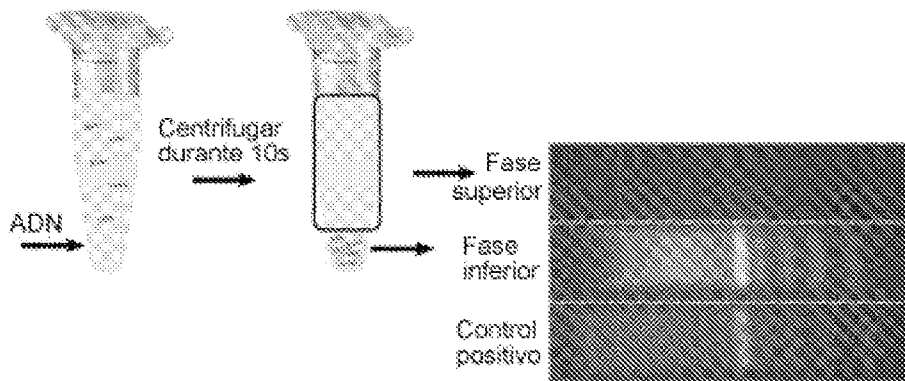


Figura 3

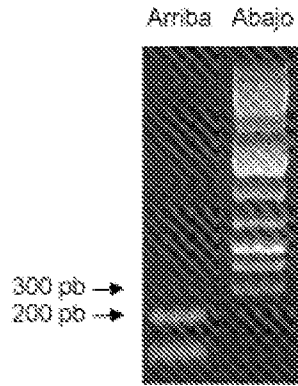


Figura 4

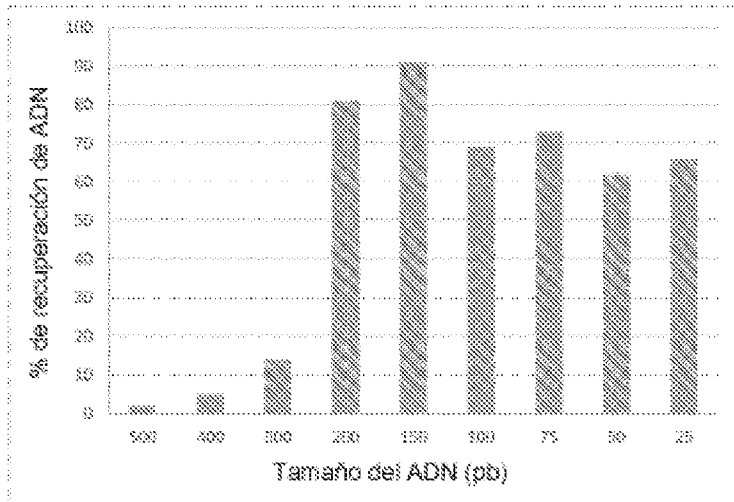


Figura 5

