

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 865 124**

(51) Int. Cl.:

**B01D 57/02** (2006.01)  
**C07H 1/06** (2006.01)  
**C12N 15/10** (2006.01)  
**C12Q 1/6806** (2008.01)  
**G01N 27/447** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/028518**  
(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14144209**  
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14765295 (2)**  
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2021 EP 2969140**

---

(54) Título: **Procedimiento en una etapa para la purificación de ácidos nucleicos**

(30) Prioridad:

**15.03.2013 US 201361789622 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.10.2021**

(73) Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)  
1300 East Touhy Avenue  
Des Plaines, IL 60018, US**

(72) Inventor/es:

**GUNDLING, GERARD, J.**

(74) Agente/Representante:

**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

ES 2 865 124 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 en una etapa para la purificación de ácidos nucleicos

5    **Antecedentes**

[0001] La purificación de ácidos nucleicos consiste típicamente en una etapa de lisis para liberar ácidos nucleicos de una muestra, la unión de los ácidos nucleicos a una matriz sólida, el lavado de la matriz para eliminar las sustancias contaminantes y la elución de los ácidos nucleicos de la matriz en un tampón. El proceso es complejo, sobre todo en el lavado de la matriz durante la eliminación de contaminantes. Se deben añadir soluciones a la matriz que eliminarán los contaminantes, pero no los ácidos nucleicos y, a continuación, estas soluciones se deben eliminar antes de la elución de los ácidos nucleicos de la matriz. Si se usan partículas magnéticas como la matriz sólida, se deben capturar típicamente después de la etapa de unión, separándolas de la solución de unión a lisis, ya sea capturando y eliminando las partículas de la solución o inmovilizando las partículas y eliminando la solución de unión a lisis y, a continuación, liberándolas en una solución de lavado. Después del lavado, las partículas deben capturarse otra vez y separarse de la solución del lavado. Ver, por ejemplo, Alderton R. P., et al., Anal. Biochem. (1992) 201:166-169 y WO 91/00212. Algunos protocolos requieren varias etapas de lavado utilizando diferentes soluciones de lavado. Después del lavado de partículas, las partículas deben resuspenderse en un tampón de elución para liberar los ácidos nucleicos de las partículas. Además, a menudo estos procedimientos no son selectivos para los ácidos nucleicos. Más bien, una variedad de sustancias sólidas y disolventes se aglutinan también.

[0002] Otros protocolos requieren la precipitación del ácido nucleico con, por ejemplo, etanol. El ácido nucleico precipitado debe entonces lavarse y solubilizarse. También existen procedimientos de cromatografía para el aislamiento del ácido nucleico (ver, por ejemplo, el documento EP 0 658 164), pero estos procedimientos requieren también múltiples etapas y lavados.

[0003] El sistema SCODA (Coeficiente Síncrono de Alteración de Arrastre) de la técnica anterior de Boreal Genomics, Inc. (Los Altos, CA) usa un campo electrónico pulsado para concentrar ácidos nucleicos en un punto, pero típicamente es un material prepurificado que puede ser muy diluido. El sistema de canal oleoso desarrollado por Kelso en la Universidad del Noroeste (Sur, et al., Immiscible Phase Nucleic Acid Purification Eliminates PCR Inhibitors with a Single Pass of Paramagnetic Particle through a Hydrophobic Liquid, 25 J Mol. Diag. 2012 12(5) 620-628) arrastra las partículas a través del aceite para intentar eliminar el lavado, pero el procedimiento dio lugar a un sobrante significativo de sal debido a que el aceite dejó una gotita grande de solución de lisis alrededor de las partículas que dio como resultado una gran cantidad de sobrante de sal. Por lo tanto, se necesitaba un procesamiento adicional a la hora de usar este sistema. El documento WO2012/086243 da a conocer un procedimiento para eliminar contaminantes de una muestra lisada de ácidos nucleicos que comprende unir los ácidos nucleicos liberados a las partículas magnéticas y pasárlas por un gel de base acuosa a un líquido de lavado.

[0004] Se puede observar que los procedimientos para el aislamiento/purificación de ácidos nucleicos que se consideran estado de la técnica tienen ciertas desventajas. Tales desventajas tienen relación con, por ejemplo, la pureza, selectividad, tasa de recuperación, seguridad de laboratorio y conveniencia, así como también la velocidad del proceso de aislamiento/purificación. En otras palabras, los procedimientos conocidos del estado de la técnica requieren múltiples etapas y a menudo dan como resultado una pérdida de ácidos nucleicos objetivo debido a las numerosas etapas y/o alteración del ácido nucleico objetivo (por ejemplo, la pérdida de grupos modificadores debido a condiciones repetidas de un tratamiento severo).

[0005] Por lo tanto, el problema a resolver es proporcionar un procedimiento más simple para aislar ácidos nucleicos de una muestra que ahorrará tiempo y reactivos y ayudará a prevenir la pérdida de objetivo y/o modificación del objetivo durante el proceso.

50    **Características de la Invención**

[0006] Basándose en la divulgación que se contiene en el presente documento, la presente invención proporciona un procedimiento para eliminar componentes de tampón de lisis de una muestra de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento a) proporcionar una muestra que comprende o se sospecha que comprende ácidos nucleicos, b) poner en contacto la muestra con un tampón de lisis, c) poner en contacto la muestra con un sustrato sólido durante un periodo de tiempo y bajo condiciones adecuadas para que los ácidos nucleicos en la muestra se unan al sustrato sólido, en el que dicho sustrato sólido es una micropartícula magnética, y d) atraer el sustrato sólido unido con los ácidos nucleicos, si el ácido nucleico está presente en la muestra, a través de un gel de separación de base acuosa a un tampón de elución o un tampón de no elución con un campo magnético, en el que el procedimiento se lleva a cabo en un recipiente de ensayo, y en el que el gel de separación de base acuosa se pone en capas sobre el tampón de lisis y el tampón de elución o el tampón de no elución se pone en capas sobre el gel de separación de base acuosa.

[0007] La presente invención y las realizaciones de la misma se establecen en las reivindicaciones adjuntas.

65    [0008] La presente invención se refiere al uso de un gel para separar la solución de unión a lisis de un tampón de

elución. Las partículas se usan para capturar ácidos nucleicos en la solución de unión a lisis. Las partículas son magnéticas y se concentran utilizando un campo magnético. Específicamente, las partículas se atraen por un campo magnético a través de un gel que elimina contaminantes, y las partículas concentradas se suspenden otra vez en un tampón de elución. El procedimiento es extremadamente sencillo. El gel separa la solución de unión a lisis del tampón de elución y limita o elimina la mezcla entre los dos. El movimiento de las partículas a través del gel elimina contaminantes y sales. Los contaminantes se eliminan al pasar por el gel (*es decir*, "se separan por arrastre"). Las sales se diluyen al pasar por el gel. A continuación, las partículas pasan directamente al tampón de elución donde los ácidos nucleicos se liberan. A continuación, las partículas magnéticas se pueden atraer de nuevo al gel o separar del tampón de elución mediante centrifugación o sedimentación (gravedad). Este procedimiento se ha mostrado que purifica con éxito el ARN viral de VHC de una muestra de plasma utilizando un ensayo de PCR en tiempo real para detectar el ARN del virus de la hepatitis C (VHC viral).

**[0009]** La presente divulgación contempla un procedimiento de eliminación de componentes de tampón de lisis de una muestra de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento, proporcionar una muestra que comprende o se sospecha que comprende ácidos nucleicos, poner en contacto la muestra con uno o más reactivos de lisis, poner en contacto la muestra con un sustrato sólido durante un periodo de tiempo y bajo condiciones adecuadas para que los ácidos nucleicos en la muestra se unan al sustrato sólido y provoquen que el sustrato sólido se una con ácidos nucleicos, si el ácido nucleico está presente en la muestra, para pasar a través de un gel de separación de base acuosa. El presente procedimiento es útil cuando el tampón de lisis contiene sales en una concentración mayor de aproximadamente 1 molar. El sustrato sólido puede ser una micropartícula y la micropartícula puede ser de aproximadamente 0,1 nm a aproximadamente 5 nm en diámetro o de aproximadamente 0,8 nm a aproximadamente 5 nm en diámetro. Además, la micropartícula puede ser magnética.

**[0010]** La presente invención contempla además que los ácidos nucleicos unidos al sustrato sólido entran en contacto con un tampón de elución después de pasar por el gel acuoso que eluye ácidos nucleicos del sustrato sólido. Más aun, los ácidos nucleicos no precipitan en un disolvente orgánico o los ácidos nucleicos se pueden precipitar en un disolvente orgánico y el disolvente orgánico puede ser etanol o cualquier otro disolvente orgánico adecuado.

**[0011]** La presente invención contempla además que los ácidos nucleicos unidos al sustrato sólido entran en contacto con una enzima después de pasar por el gel acuoso, antes o después de la elución del sustrato sólido. La enzima puede ser una ADN polimerasa o una transcriptasa inversa. Aun más, el ácido nucleico puede secuenciarse sobre el sustrato sólido sin diluir.

**[0012]** La presente invención contempla además que los ácidos nucleicos unidos al sustrato sólido pueden entrar en contacto con un bisulfito después de pasar por el gel acuoso de tal modo que las citosinas no metiladas se desaminan. La presente invención contempla además que al menos una base nucleica en el ácido nucleico puede tener una modificación epigenética.

**[0013]** La presente invención contempla además que el ácido nucleico puede estar unido al sustrato sólido a través de una entidad seleccionada del grupo que consiste en hibridación de ácido nucleico, un aptámero, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, biotina, avidina y estreptavidina.

**[0014]** La presente divulgación contempla un procedimiento para enriquecer ácidos nucleicos a partir de una muestra, comprendiendo el procedimiento: proporcionar una muestra que se sospecha que comprende ácidos nucleicos, micropartículas adecuadas para unirse a ácidos nucleicos y un gel de separación de base acuosa, poner en contacto la muestra con las micropartículas durante un periodo de tiempo y bajo condiciones adecuadas para que cualquier ácido nucleico en la muestra se una a las micropartículas magnéticas para crear micropartículas magnéticas cargadas; atraer las micropartículas cargadas a través del gel de separación de base acuosa con un campo magnético. El gel puede ser un gel de agarosa. El gel de agarosa puede estar a una concentración de aproximadamente 0,10 % a aproximadamente 1,0 %. El gel de separación puede comprender uno o más de etanol y glicerol. Las partículas también pueden comprender un grupo funcional adecuado para unir el ácido nucleico.

**[0015]** Además se contempla que las micropartículas pueden ser magnéticas y las micropartículas magnéticas están, opcionalmente, al menos en parte, cubiertas con uno o más de sílice y vidrio. Las micropartículas magnéticas pueden ser esferoides aunque se contempla cualquier forma como adecuada en la presente invención.

**[0016]** Además se contempla que la muestra puede comprender un tampón de lisis.

#### Descripción de las Figuras

**[0017]**

La Figura 1 (A-F) muestra un ejemplo del procedimiento de la presente invención tal como se describe en los Ejemplos. La Figura 2 muestra (A) curvas de amplificación de ADN de secuencias nucleotídicas objetivo purificadas utilizando los procedimientos de la presente invención, tal como se detalla en el Ejemplo 2 y (B) controles internos.

La Figura 3 muestra (A) curvas de amplificación de ADN de secuencias nucleotídicas objetivo purificadas utilizando

los procedimientos de la presente invención, tal como se detalla en el Ejemplo 2 y (B) controles internos.

### Descripción Detallada de la invención

5 [0018] Los presentes procedimientos se dirigen a un procedimiento de aislamiento y purificación de una etapa de ácidos nucleicos. El procedimiento es simple y se lleva a cabo fácilmente por un experto en la materia. El procedimiento implica añadir a una solución de lisis (las soluciones de lisis son conocidas por los expertos en la materia) y un sustrato sólido que une a ácido nucleico (por ejemplo, partículas de óxido de hierro, partículas magnéticas, partículas magnéticas que están cubiertas al menos en parte con vidrio, sílice o similares, etc.). Los ácidos nucleicos presentes 10 se unirán a las partículas. A continuación, las partículas se atraen a través de un gel acuoso (por ejemplo, un gel de agarosa aunque cualquier gel compatible con ácidos nucleicos, por ejemplo, un gel de acrilamida de SDS, sería adecuado) con, en el caso de las partículas magnéticas, una fuente magnética (es decir, un imán) colocado fuera del recipiente de ensayo. La acción de atraer las partículas a través del gel elimina (es decir, "arrastra") los contaminantes 15 no solubles y diluye los contaminantes solubles (por ejemplo, sales). Las partículas entran en un tampón de elución después de salir del gel. El ácido nucleico se libera en el tampón de elución. A continuación, las partículas magnéticas se retroatraen en el gel o se deja que sedimenten (o se centrifugan después de eliminar el tampón de elución de la superficie de gel). El procedimiento se lleva a cabo típicamente en un tubo, donde el gel se pone en capas sobre el 20 tampón de lisis y el tampón de elución se pone en capas sobre el gel. Opcionalmente, se puede poner en capas un tampón de no elución sobre el gel y los ácidos nucleicos se eluyen de las partículas posteriormente, si se desea. El tampón de elución puede comprender o no un disolvente orgánico (tal como etanol).

25 [0019] Los tampones de lisis típicos comprenden sales. Típicamente las sales que se encuentran en tampones de lisis incluyen, pero no se limitan a, tiocianato de guanidinio (GITC) (intervalo típico de 0,5 M hasta 4,0 M), NaCl (intervalo típico de hasta 0,1 M y 105 M), Los tampones de lisis también contienen típicamente un tampón (por ejemplo, Tris-HCl; concentración típica de aproximadamente 25 mM, desde aproximadamente pH 7 hasta aproximadamente 8 u otro tampón adecuado conocido por un experto en la materia) y detergentes (por ejemplo, NP-40, Tween™, Triton™-X, polisorbatos, desoxicolato, desoxicolato de sodio y dodecilsulfato sódico (SDS); las concentraciones que se usan típicamente oscilan entre aproximadamente 0,1 % y aproximadamente 2,0 %).

30 [0020] La presente invención no se limita a ninguna muestra o tipo de muestra específicos. Por ejemplo, los materiales de muestra pueden incluir fluidos corporales que incluyen plasma, suero sanguíneo, fluido espinal, semen, fluidos vaginales, esputo y saliva, fluido cerebroespinal, fluido linfático y fluidos digestivos. Otros materiales de muestra pueden incluir poblaciones y tejidos de células aisladas o enriquecidas. Las muestras pueden ser recientes o fijadas (conservadas). Las muestras fijadas pueden estar incrustadas (por ejemplo, incrustadas en parafina). Además, las 35 muestras se pueden obtener de excavaciones arqueológicas, es decir, tejidos prehistóricos, tales como huesos, pueden producir ácidos nucleicos que se pueden enriquecer o aislar utilizando los procedimientos de la presente invención. Ciertos tipos de muestras pueden necesitar un pretratamiento para, por ejemplo, concentrar la muestra (mediante, por ejemplo, centrifugación de células suspendidas) o separar grandes fuentes de muestra (por ejemplo, moliendo huesos o descomposición digestiva de tejidos). Tales pretratamientos son primarios para obtener materiales 40 iniciales que son manipulables con mayor facilidad utilizando los procedimientos de la presente invención.

[0021] Los geles utilizados en la presente invención pueden ser de una concentración de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 1,0 %, de aproximadamente el 0,15 % a aproximadamente el 0,75 %, de aproximadamente el 0,2 % a aproximadamente el 0,50%.

45 [0022] Se entiende en la presente memoria que el término "un ácido nucleico" significa al menos un ácido nucleico. Además, el término "un ácido nucleico" también puede indicar una mezcla de ácidos nucleicos. El término "ácido nucleico" abarca ARN, ADN o ambos. Además, tal como se usa en el presente documento, "ácido nucleico" o "AN" se refiere a ambos, un ácido desoxirribonucleico y un ácido ribonucleico. Tal como se usa en el presente documento, "secuencia de ácido nucleico" se refiere al orden o la secuencia de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos a lo largo de una cadena. Pueden ser secuencias naturales o artificiales y, en particular, ADN genómico (ADNg), ADN complementario (ADNc), ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr), secuencias híbridas o secuencias sintéticas o semisintéticas u oligonucleótidos que se modifican o contienen bases modificadas. Estos ácidos nucleicos pueden ser de origen humano, animal, vegetal, bacteriano o viral y similares. Se pueden 50 obtener mediante cualquier técnica conocida por expertos en la materia, y, en particular, mediante lisis celular, el cribado de bibliotecas, mediante síntesis química o mediante procedimientos que incluyen la modificación química o enzimática de secuencias obtenidas mediante el cribado de bibliotecas. Pueden estar químicamente modificados, por ejemplo, pueden ser ácidos pseudonucleicos (APN), oligonucleótidos modificados por varias uniones químicas (por ejemplo, fosforotioato o fosfonato de metilo) o alternativamente oligonucleótidos que están funcionalizados, por ejemplo, que están acoplados con una o más moléculas que tienen propiedades características diferentes.

55 [0023] Los procedimientos de la presente invención se pueden alterar para aislar o enriquecer de manera específica tanto ADN como ARN. Por ejemplo, el uso de óxido de hierro no recubierto como una partícula de captura sería selectiva para ARN. Las partículas de sílice o las partículas recubiertas de sílice, por ejemplo, serían específicas para ADN. Sin embargo, si se elabora el tampón de lisis con etanol al 33%, las partículas de sílice, por ejemplo, se unirán 60 a ADN y ARN para aislamiento o enriquecimiento de ácidos nucleicos totales.

[0024] El término "sustrato" significa una sustancia que es sustancialmente insoluble en una solución acuosa y donde un ácido nucleico en una solución acuosa (de fuerza iónica alta) puede absorber cuando se añade la sustancia. El término "sustrato" abarca partículas atraíbles magnéticamente y partículas atraíbles magnéticamente, tales como óxido de hierro no recubierto o recubierto con, por ejemplo, sílice, vidrio, cuarzo o zeolitas. Sin embargo, el sustrato no tiene que ser magnético. Además, las partículas pueden comprender grupos funcionales adecuados para unir ácidos nucleicos. Los ejemplos de tales grupos funcionales incluyen, pero no se limitan a, proteínas (o partes funcionales de las mismas), anticuerpos (o partes funcionales de los mismos), enlazadores químicos (por ejemplo, avidina, estreptavidina, vía hibridación de ácidos nucleicos, un aptámero de biotina, etc.). Por lo tanto, el ácido nucleico no necesita unirse directamente con el sustrato, pero puede unirse vía una o más entidades, tal como se describe en el presente documento o tal como se conoce por un experto en la materia. Además, se puede hacer que las partículas no magnéticas pasen por el gel de base acuosa utilizando, por ejemplo, centrifugación (por ejemplo, centrifugación a velocidad baja). En este caso, se contempla que el tampón de elución (o salino, etc.) estaría en el fondo del tubo con el gel en capas sobre el tampón de elución y el tampón de lisis en la parte más alta del gel. La fuerza de la centrifugación empujaría las partículas abajo a través del gel al tampón de elución. En otro caso, el tubo se coloca como cuando se usa fuerza magnética (tampón de lisis en el fondo, tampón de elución en la parte más alta) y el tubo se tapa y se invierte antes de centrifugar. Además, se contemplan otros medios para mover las micropartículas a través del gel. Por ejemplo, las partículas cargadas se pueden atraer a través del gel utilizando procedimientos de tipo electroforético. Aún más, si se permite que las partículas sedimenten (o centrifuguen hasta el nivel del gel) y se elimina el tampón de lisis, se pueden empujar las micropartículas a través del gel con un dispositivo similar a una prensa francesa.

[0025] El sustrato puede ser de cualquier forma que incluye, pero no se limita a, esférica, elíptica, rectangular, de vara alargada, de espiral y amorfa. El sustrato de la presente invención no se limita en tamaño, pero preferiblemente es de aproximadamente 0,2 mm o menos, 0,02 mm o menos, 2,0 μm o menos, 200 nm o menos, 20 nm o menos y 2 nm o menos en el diámetro más largo. El sustrato de la presente invención puede ser de aproximadamente 0,1 nm a aproximadamente 5 nm y puede ser de aproximadamente 0,8 nm a aproximadamente 5 nm de diámetro. Además, se entiende que un sustrato, cuando se dispersa en una fase líquida, tal como una solución acuosa, puede producir una suspensión o puede sedimentarse fuera de la solución.

[0026] Los términos "fuerza iónica alta" y "concentración alta" significan la fuerza iónica o la concentración en una solución acuosa que es el resultado de sales diluidas en concentraciones iguales o mayores de aproximadamente 1 M. Típicamente las sales están presentes en la solución acuosa en concentraciones de 1 a 10 M. Más típicas son las sales caotrópicas en concentraciones de 1 a 8 M. En una realización preferida, el tampón de lisis de la presente invención tiene una concentración de sal de más de aproximadamente 1 M.

[0027] Los términos "fuerza iónica baja" y "concentración baja" significan la fuerza iónica o la concentración en una solución acuosa que es el resultado de sales disueltas en concentraciones menores de aproximadamente 1 M.

[0028] Los términos "magnético" y "partícula o partículas magnéticas" harán referencia a objetos fabricados de un material que está magnetizado y/o crea su propio campo magnético constante. Aunque se contempla cualquier material adecuado, tal como se conoce por un experto en la materia, para su uso en la presente invención, se contemplan de manera más frecuente materiales a base de hierro (por ejemplo, óxido de hierro) o material que comprende óxido de hierro. En la presente invención las partículas magnéticas (partículas magnéticas multifuncionales; MMP) forman un sustrato y, aunque no se limitan en tamaño, son preferiblemente de aproximadamente 0,2 mm o menos, 0,02 mm o menos, 2,0 μm o menos, 200 nm o menos, 20 nm o menos y 2 nm o menos en el diámetro más grande. En una realización preferida de la presente invención, las partículas magnéticas están recubiertas al menos en parte con vidrio, sílice o con una o más sustancias conocidas por un experto en la materia para unirse con ácidos nucleicos. Las partículas magnéticas de tamaño micro y nano están disponibles comercialmente para un experto en la materia (por ejemplo, Promega Corp. Madison, WI, Life Technologies. Grand Isle. NY; Bangs Laboratories, Fishers, IN). Además, las partículas se pueden sintetizar en el laboratorio por un experto en la materia, ver, por ejemplo, Starmans LW, et al., Iron Oxide Nanoparticle-Micelles (ION-Micelles) for Sensitive (Molecular) Magnetic Particle Imaging and Magnetic Resonance Imaging PLoS One. Epub 20 de Febrero de 2013; 8(2)e57335, Heitsch, Andrew T.. et al., Multifunctional Particles. Magnetic Nanocrystals and Gold Nanorods Coated with Fluorescent Dye-Doped Silica Shells, Solid State Chem, Julio de 2008; 181(7): 1590-1599.

[0029] Los procedimientos y los reactivos para lisar células y tejidos para la extracción de ácidos nucleicos son bien conocidos por expertos en la materia y cualquier procedimiento que no destruya los ácidos nucleicos de la muestra es adecuado para su uso por la presente invención. Además, los ácidos nucleicos adecuados para aislamiento y purificación mediante el presente procedimiento se pueden obtener de muestras fijadas (por ejemplo, muestras fijadas con formalina o glutaraldehído), muestras incrustadas (por ejemplo, muestras incrustadas en parafina) y de recipientes de reacción que contienen soluciones o suspensiones de ácidos nucleicos sintetizados.

[0030] Los ácidos nucleicos enriquecidos, aislados o purificados mediante los procedimientos de la presente invención se pueden usar en cualquier procedimiento convencional conocido por expertos en la materia, ya que los procedimientos de la presente invención no alteran los ácidos nucleicos de ninguna manera que pueda ser perjudicial

para su uso posterior. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden secuenciar amplificándose mediante PCR, utilizándose en vectores de expresión, etc. A este respecto, los ácidos nucleicos pueden entrar en contacto con enzimas, tales como, por ejemplo, una ADN polimerasa o una transcriptasa inversa después de pasar por el gel acuoso. Además, la presente invención contempla que el ácido nucleico se secuencia en el sustrato sólido sin diluir.

5 Además, la presente invención contempla que los ácidos nucleicos unidos al sustrato sólido entran en contacto con bisulfito después de pasar por el gel acuoso de tal modo que se desaminan las citosinas no metiladas. Además, la presente invención contempla que al menos una base nucleica en el ácido nucleico tiene una modificación epigenética.

## Kits

10 [0031] La presente divulgación también contempla kits en los que los kits contienen soluciones de gel y/o ingredientes de gel (tales como se ejemplifican a continuación o equivalentes, tal como se determinan por un experto en la materia sin mucha experimentación), partículas magnéticas adecuadas para unir ácidos nucleicos e instrucciones. De manera opcional, se pueden proporcionar viales, soluciones de reacción y otros elementos en un kit de la presente divulgación para usos específicos (por ejemplo, el aislamiento de ARNs) y/o para ayudar al usuario en relación con la realización del procedimiento.

15 [0032] Todas patentes, publicaciones de solicitudes de patente, artículos de revistas, manuales y otras publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de capacidad de los expertos en la materia a la que pertenece la divulgación.

20 [0033] La presente invención descrita de manera ilustrativa en el presente documento puede realizarse de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento u elementos o limitación o limitaciones, que no se dé a conocer de manera específica en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, cada caso del presente documento de cualquiera de los términos "que compone", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se puede sustituir por cualquiera de los dos términos. Del mismo modo, las formas singulares de "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias a "el procedimiento" incluyen uno o más procedimientos y/o etapas del tipo, que se describen en el presente documento y/o que serán evidentes para los expertos en la materia al leer la divulgación.

25 [0034] Los términos y las expresiones que se han utilizado se usan como términos de descripción y no de limitación. A este respecto, cuando se definen ciertos términos en el presente documento y se definen, se describen o se analizan de otro modo en otra parte de la "Descripción Detallada" o en otra parte de esta memoria descriptiva, todas de dichas definiciones, descripciones y discusiones a tratar pretenden atribuirse a tales términos. Tampoco existe intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas.

30 [0035] Se entiende que son posibles diferentes modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, se debe entender que aunque la presente invención se ha descrito de manera específica en el contexto de realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la materia pueden recurrir a modificaciones y variaciones de los conceptos que se dan a conocer en el presente documento. Tales modificaciones y variaciones se consideran que están dentro del alcance de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

## Ejemplificación

### Ejemplo 1

45 [0036] El concepto de la presente invención es que los ácidos nucleicos se pueden purificar fácilmente a partir de, por ejemplo, lisados celulares u otras muestras celulares, mediante la unión del ácido nucleico a partículas magnéticas y, a continuación, la atracción de las partículas a través de un gel viscoso, acuoso o una solución de gel. La primera prueba fue para ver si el gen puede reducir el nivel de sal en una muestra libre de ácido nucleico.

50 [0037] Se fabricó un gel al 1 % de la siguiente manera: se mezclaron 50 ml de agua (agua libre de ADNasa y ARNasa) con 0,5 g de Agarosa-LE (Ambion #9040, aunque cualquier agarosa disponible comercialmente sería factible). La agarosa se fundió en agua en un horno microondas (aunque cualquier fuente de calor adecuada será factible) para producir una solución de agarosa al 1 % y se colocó sobre un bloque de temperatura (es decir, un bloque de calor) fijado a 55 °C para mantener el gel fundido.

55 [0038] La solución de lisis-etanol se elaboró utilizando 70 ml de tampón de lisis que contenía tiocianato de guanidinio (GTC) (teniendo el tampón de lisis más de 3 M de GTC más de 1 % de detergente no iónico con un pH superior a 7,0; o cualquier tampón de lisis adecuado para procesar el tejido o la muestra que conserve los ácidos nucleicos) y 35 ml de etanol al 95 %.

60 [0039] Se añadió 1 ml de solución de tampón de lisis-etanol a un tubo de polipropileno de 12 mm X 75 mm con 0,5 ml de agua para representar una adición de muestra. Se añadieron también 50 microlitros de micropartículas magnéticas recubiertas con sílice (Abbott laboratories, Abbott Park, IL, mMicroparticlesDNA) a la mezcla de lisis.

5 [0040] Se hicieron flotar cuidadosamente 2 ml de la agarosa fundida sobre la parte superior del tampón de lisis y se dejaron enfriar para sedimentar. Después de solidificarse, la superficie del gel se lavó para eliminar cualquier guanidinio residual que se podía haber quedado en la parte superior del gel mediante la adición de 500 microlitros de agua (anteriormente) a la superficie del gel y, a continuación, la eliminación del lavado. 200 microlitros de agua (anteriormente) se añadieron a continuación a la parte superior del gel para representar el tampón de elución.

10 15 [0041] Las partículas magnéticas (MMP) se capturaron con un imán al colocar un imán en un lateral del tubo en la región del tampón de lisis. Una estrategia alternativa es colocar una fuente magnética mayor directamente por encima del tubo. A continuación, el imán se atrajo lentamente hacia el lateral del tubo con el campo magnético arrastrando consigo las partículas magnéticas. Las partículas magnéticas se expandieron en cierto modo mientras pasaban por el gel. Las partículas recolectadas estaban en el lateral del tubo y a medida que el bolo de partículas se movía hacia arriba del tubo, el gel era desplazado por las partículas. Se formó un canal donde las partículas se movían a través del gel. Puede ser posible colocar un imán de tal modo que las partículas se atrajesen directamente hacia arriba a través del centro del gel, pero la posición del imán parece no importar basándose en los resultados obtenidos.

20 25 [0042] Las partículas magnéticas se movieron a través de la capa de gel hacia la capa de agua y se mezclaron de un lado para otro moviendo el imán de un lado al otro. Esto se realizó varias veces para mezclar las partículas en el agua. A continuación, las partículas se capturaron colocando el imán en el lateral del tubo y se retroatrajeron al gel de tal modo que se eliminaron de la capa superior de agua. Ver, la Figura 1 A-F. La capa de agua se extrajo y se colocó en un tubo de microcentrifuga. Las lecturas de absorción se tomaron a A230, 260, 280 y 400 en un espectrofotómetro Beckman DU-640 aunque cualquier espectrofotómetro comercial será factible. El instrumento se esterilizó con agua y se leyeron las muestras.

30 35 [0043] Las lecturas se tomaron a A 230. La muestra no diluida dio una lectura de 2 8194 que es demasiado alta para una lectura precisa para este espectrofotómetro particular. La muestra se diluyó con proporción de 1/40 con agua y se volvió a leer. La lectura fue de 1,7268 con la dilución de 40 X. Se utilizó un factor de 0,6 X para convertir A230 en mM de GITC.  $1,7268 \times 40 \times 0,6 = 41,4$  mM de GITC. Esta concentración de GITC en la muestra sería aceptable. Se han probado varios ensayos y han mostrado una tolerancia a GITC de hasta 50 mM en la reacción. Los ensayos de interés usan una proporción de volumen de muestra:mezcla de ensayo de 1:1 y el 41,4 mM de GITC en la muestra sería igual a aproximadamente 20 mM de GITC en un ensayo.

40 45 [0044] La prueba se repitió y esta vez las MMP se atrajeron a través del gel mientras se rotaba el gel aumentando la distancia en la que viajaban las partículas. Las mediciones de espectrofotómetro se realizaron utilizando una dilución de 1/50 de la muestra en agua. La absorción a A230 fue de 0,8792.  $0,8792 \times 50 \times 0,6 = 26,4$  mM de GITC en la muestra que es un rango aceptable. Este procedimiento se analizó, a continuación, con las muestras que contenían ácido nucleico.

## Ejemplo 2

50 55 [0045] En este experimento se usó una cantidad conocida de ácido nucleico en la muestra. Los ácidos nucleicos probados eran el Calibrador B del ensayo de VHC Abbott RealTime™ y el Control interno de VHC utilizado en las extracciones de ensayos. El Calibrador B es una muestra de ARN que contiene secuencias de VHC a una concentración de aproximadamente 10.000,000 ui/ml (unidades internacionales por milímetro) en plasma humano. El control interno es también una molécula de ARN que se usa para probar el rendimiento de extracción de los sistemas de preparación de muestras utilizadas para extraer el VHC para las pruebas. También se probó la presencia de glicerol y etanol en el gel para determinar si pudieran tener algún efecto sobre la extracción. La presencia de etanol puede ayudar a retener los ácidos nucleicos en las partículas y el glicerol puede cambiar la densidad del gel.

60 65 [0046] Los geles se elaboraron de la siguiente manera utilizando Ambion Agarose-LE #9040 lote 064P80B. Se utilizaron tres botellas de reactivo con 25 ml de agua cada una para elaborar los diferentes geles. El agua fue agua libre de ADNasa y ARNasa. Se añadió Agarosa (Ambion Agarose-LE #9040 lote 064P80B) a cada botella de la siguiente manera:  
 0,05 g de agarosa a la botella 1 para elaborar un gel al 0,2 %.  
 0,10 g de agarosa a la botella 2 para elaborar un gel al 0,4 %.  
 0,15 g de agarosa a la botella 3 para elaborar un gel al 0,6 %.

[0047] La agarosa se fundió en el microondas y, a continuación, se colocaron las botellas en la parte superior del bloque de temperatura calentado hasta 55 °C para mantenerla fundida.

65 [0048] Se trajeron primero el Calibrador B viral de hepatitis C (Abbott laboratories Abbott Park, IL; es una cantidad conocida de ácido nucleico de VHC en suero humano negativo) y el Control Interno (Abbott Laboratories. Abbott Park, IL) con la mezcla de tampón de lisis y etanol y se capturaron sobre las partículas magnéticas de la siguiente manera. La mezcla de etanol y lisis descrita en el Ejemplo 1 se utilizó como el tampón de lisis.

[0049] La mezcla de lisis contenía

10 ml de la mezcla de lisis de etanol.  
 5 ml de Calibrador B de VHC.  
 350 µg de Control Interno de VHC  
 500 µg de MMP (partículas magnéticas multifuncionales).

5

**[0050]** La mezcla se puso sobre una placa en agitación a temperatura ambiente durante 12 minutos.

**[0051]** Durante la incubación del lisado, se dispusieron nueve tubos de 15 ml, tal como se muestra a continuación.

Tubo	Agarosa	Agua	Etanol	Glicerol	Concentración final de agarosa
1	4 ml de 0,2 %	1 ml	0	0	0,16 %
2	4 ml de 0,4 %	1 ml	0	0	0,32 %
3	4 ml de 0,6 %	1 ml	0	0	0,48 %
4	4 ml de 0,2 %	0	1 ml	0	0,16 %
5	4 ml de 0,4 %	0	1 ml	0	0,32 %
6	4 ml de 0,6 %	0	1 ml	0	0,48 %
7	9 ml de 0,2 %	0	0	1 ml	0,18 %
8	9 ml de 0,4 %	0	0	1 ml	0,36 %
9	9 ml de 0,6 %	0	0	1 ml	0,54 %

10

**[0052]** El contenido de glicerol se fijó en 10 %. Con 20 % de glicerol, la agarosa fue más densa que el tampón de lisis y se hundió en el fondo del tubo.

15

**[0053]** Después de finalizar la incubación de lisis, las muestras se extrajeron utilizando la técnica de gel de la siguiente manera: 1,5 ml del lisado se colocó en cada uno de 9 tubos (12 mm X 75 mm de polipropileno). Se colocaron cuidadosamente 2 ml de cada mezcla de agarosa en la parte superior y se dejaron solidificar (aproximadamente a 4 °C durante -10 minutos). En la parte superior de todos los tubos había 1 ml de agua para eliminar cualquier rastro de lisis. La condición con la cantidad más baja de agarosa y etanol empezó a flotar sobre el lavado de agua y la muestra (#2) no se analizó más. El agua se eliminó de la parte superior de los geles y se añadieron 200 µl de agua a la parte superior de todos los geles para elución. Se capturaron las partículas magnéticas en el lateral del tubo con un imán y se atrajeron a través del gel al tampón de elución, tal como se describe en el ejemplo 1. A continuación, las partículas magnéticas se llevaron de un lado al otro en el tampón de elución aproximadamente 20 veces utilizando el imán para atraerlas de un lado del tubo al otro. Las partículas se retroatrajeron al gel, tal como se ha descrito anteriormente. A continuación, el tampón de elución se extrajo y se colocó en un tubo de microcentrifuga.

25

**[0054]** De cada condición se tomó una muestra de 10 µl y se diluyó con 490 µl de agua. Se leyó la absorción en un espectrofotómetro (Beckman DU-640) a 230 nm para determinar el sobrante de GITC, tal como se describe en el ejemplo 1.

30

**[0055]** El instrumento se esterilizó con agua y, a continuación, se leyeron las muestras.

Muestra	A230	GITC mM	Dilución	GITC final (mM)
1	0,3693	0,210919	50	10,54595
2	no probado			
3	0,4904	0,282627	50	14,13134
4	0,3316	0,188595	50	9,429773
5	0,4461	0,256395	50	12,81975
6	0,8110	0,472466	50	23,62328
7	0,5354	0,309273	50	15,46364
8	0,5223	0,301516	50	15,07579
9	0,5418	0,313063	50	15,65313

**[0056]** Todas las muestras tienen concentraciones de GITC por debajo de 25 mM.

35

**[0057]** A continuación se probaron las muestras para la presencia de las secuencias de VHC y Control Interno utilizando el ensayo de VHC Abbott RealTime™. Se elaboró una mezcla madre utilizando los tres componentes del ensayo de VHC Abbott RealTime™ con código 4J86-90. Se añadieron los 320 microlitros de Activador y 948 microlitros de mezcla de Oligo a la botella de enzimas precargadas y se agitaron suavemente pipeteando 25 microlitros de la mezcla madre que se mezclaron a continuación con 25 microlitros de cada muestra eluida en un pocillo de una placa de PCR. 25 microlitros de esta mezcla se transfirieron a continuación a un Tubo Cepheid y se programaron en ciclos utilizando un Cepheid (Sunnyvale, CA) SmartCycler® con el siguiente programa, a continuación.

Temperatura C	Tiempo segundos
Etapa 1 para 1 ciclo	
55	1200

Etapa 2 para 4 ciclos	
Temperatura	Tiempo
95	20
46	30
68	20

Etapa 3 para 6 ciclos	
Temperatura	Tiempo
92	20
60	30
68	20

Etapa 4 para 37 ciclos	
Temperatura	Tiempo
90	20
56	40
68	20
35	40

[0058] A continuación se leyó cada muestra.

- 5 [0059] Las curvas de amplificación se encuentran a continuación y muestran que ambos VHC y el control interno se amplificaron a partir de los eluatos. La Figura 2 muestra gráficos de las curvas de amplificación (A) y de controles internos (B).
- 10 [0060] Los segundos 25 microlitros de cada una de las mezclas de ensayo se amplificaron también utilizando un programa diferente, también en el Cepheid SmartCycler.

Temperatura C	Tiempo segundos
Etapa 1 para 1 ciclo	
55	1800

Etapa 2 para 4 ciclos	
Temperatura	Tiempo
95	40
46	30
68	20

Etapa 3 para 6 ciclos	
Temperatura	Tiempo
92	40
60	30
68	20

Etapa 4 para 37 ciclos	
Temperatura	Tiempo
90	30
56	40
68	20
35	40

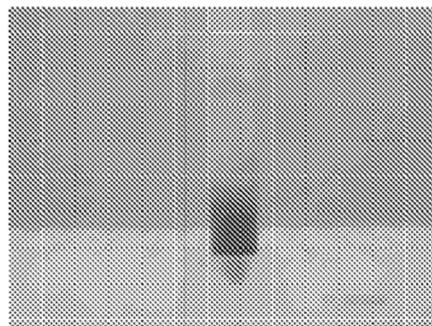
[0061] A continuación se leyó cada muestra.

La Figura 3 muestra gráficos de las curvas de amplificación (A) y de controles internos (B).

- 15 [0062] Estos experimentos demuestran que es posible capturar VHC en micropartículas magnéticas, extraer las partículas a través de un gel, que elimina niveles altos de GITC y otros contaminantes, a un tampón de elución, eluir la muestra y utilizar la muestra eluida en un ensayo de PCR sin purificación adicional del ácido nucleico. El protocolo de extracción no utilizó ninguna etapa separada de lavado.

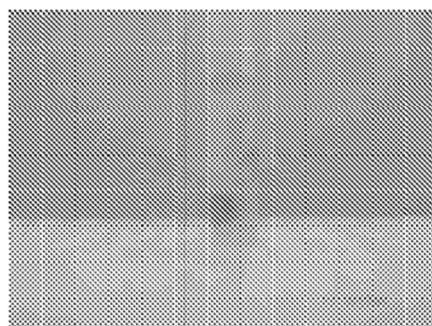
**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de eliminación de componentes de tampón de lisis de una muestra de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento
  - 5 a) proporcionar una muestra que comprende o se sospecha que comprende ácidos nucleicos,
  - b) poner en contacto la muestra con un tampón de lisis,
  - c) poner en contacto la muestra con un sustrato sólido durante un periodo de tiempo y bajo condiciones adecuadas para que los ácidos nucleicos en la muestra se unan al sustrato sólido, en el que dicho sustrato sólido es una micropartícula magnética, y
  - 10 d) atraer el sustrato sólido unido con los ácidos nucleicos, si el ácido nucleico está presente en la muestra, a través de un gel de separación de base acuosa a un tampón de elución o un tampón de no elución con un campo magnético, en el que el procedimiento se lleva a cabo en un recipiente de ensayo, y en el que el gel de separación de base acuosa se pone en capas sobre el tampón de lisis y el tampón de elución o el tampón de no elución se pone en capas sobre el gel de separación de base acuosa.
- 15 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el tampón de lisis contiene sales en una concentración mayor de aproximadamente 1 molar.
- 20 3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el sustrato sólido es una micropartícula de aproximadamente 0,1 nm a aproximadamente 5 nm de diámetro, opcionalmente en el que el sustrato sólido es una micropartícula de aproximadamente 0,8 nm a aproximadamente 5 nm de diámetro.
- 25 4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos unidos al sustrato sólido se ponen en contacto con un tampón de elución después de pasar por el gel acuoso que eluye ácidos nucleicos del sustrato sólido.
5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que:
  - (a) el procedimiento no incluye la precipitación de los ácidos nucleicos en un disolvente orgánico, o
  - (b) el procedimiento no incluye la precipitación de los ácidos nucleicos en un disolvente orgánico y el disolvente orgánico es etanol.
- 30 6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos unidos al sustrato sólido se ponen en contacto con una enzima después de pasar por el gel acuoso.
7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que la enzima es una ADN polimerasa o una transcriptasa inversa.
- 35 8. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que el ácido nucleico se secuencia sobre el sustrato sólido sin diluir.
9. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que los ácidos nucleicos unidos al sustrato sólido se ponen en contacto con bisulfito después de pasar por el gel acuoso de tal modo que se desaminan las citosinas no metiladas, opcionalmente que comprende además determinar si al menos una base nucleica en el ácido nucleico tiene una modificación epigenética.
- 40 10. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico se une al sustrato sólido a través de una entidad seleccionada del grupo que consiste en hibridación de ácido nucleico, un aptámero, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, biotina, avidina y estreptavidina.



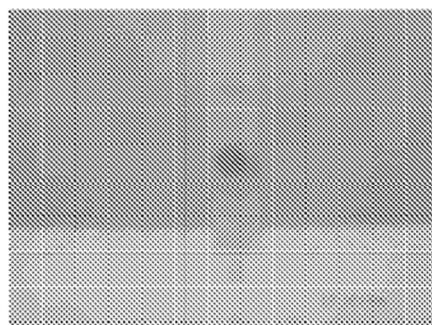
Lisis con gel y elución en la parte superior

**FIG. 1A**



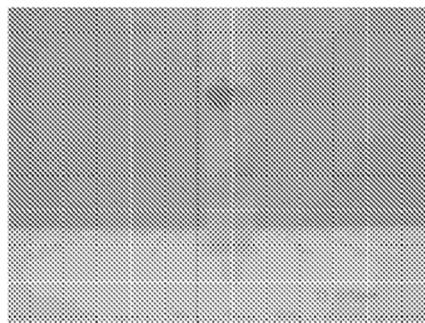
Partículas capturadas

**FIG. 1B**



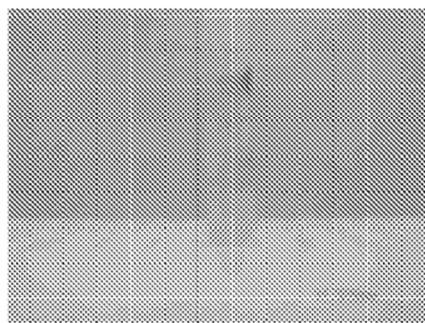
Deslizar las partículas hacia arriba en el lateral del tubo

**FIG. 1C**



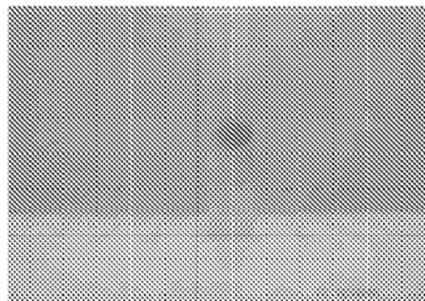
Deslizar las partículas hacia arriba del tampón de elución

**FIG. 1D**



Elución mediante movimiento de las partículas a través del tampón de elución usando imanes

**FIG. 1E**



Movimiento de las partículas hacia abajo de nuevo al gel antes de eliminar el eluato

**FIG. 1F**

Gráfico de curvas de amplificación de VCH

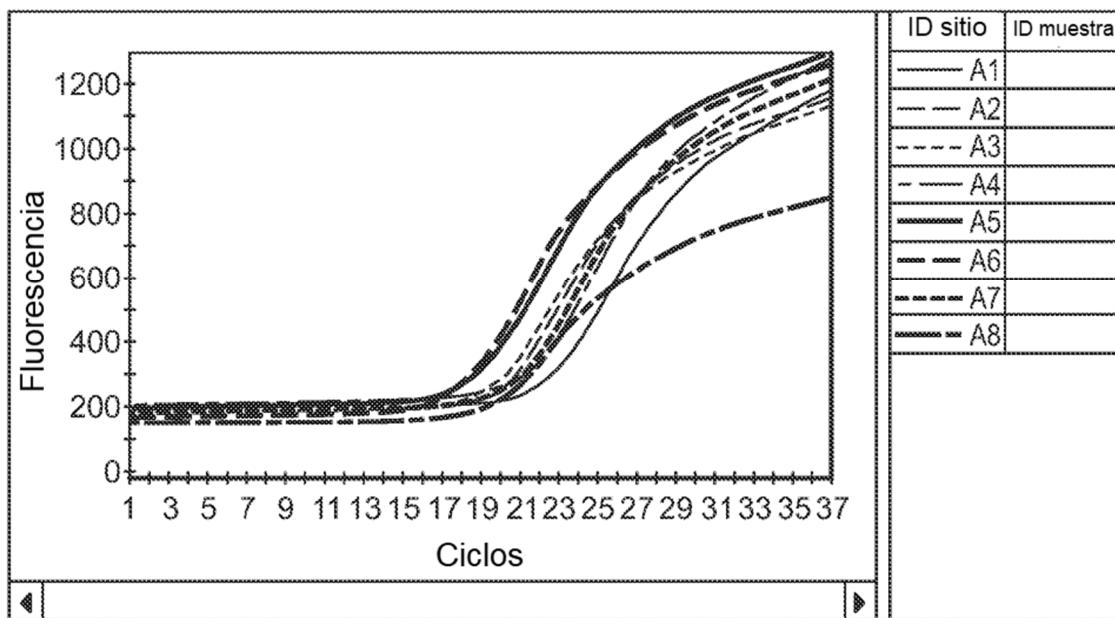


FIG. 2A

Gráfico de CI (control interno)

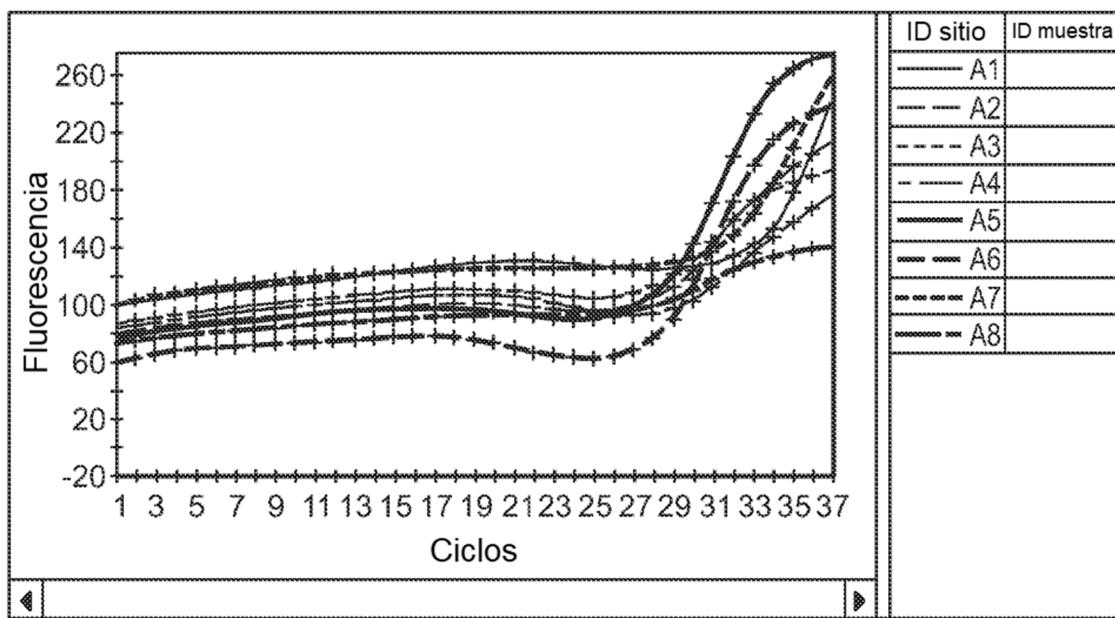


FIG. 2B

Curvas de amplificación de VCH

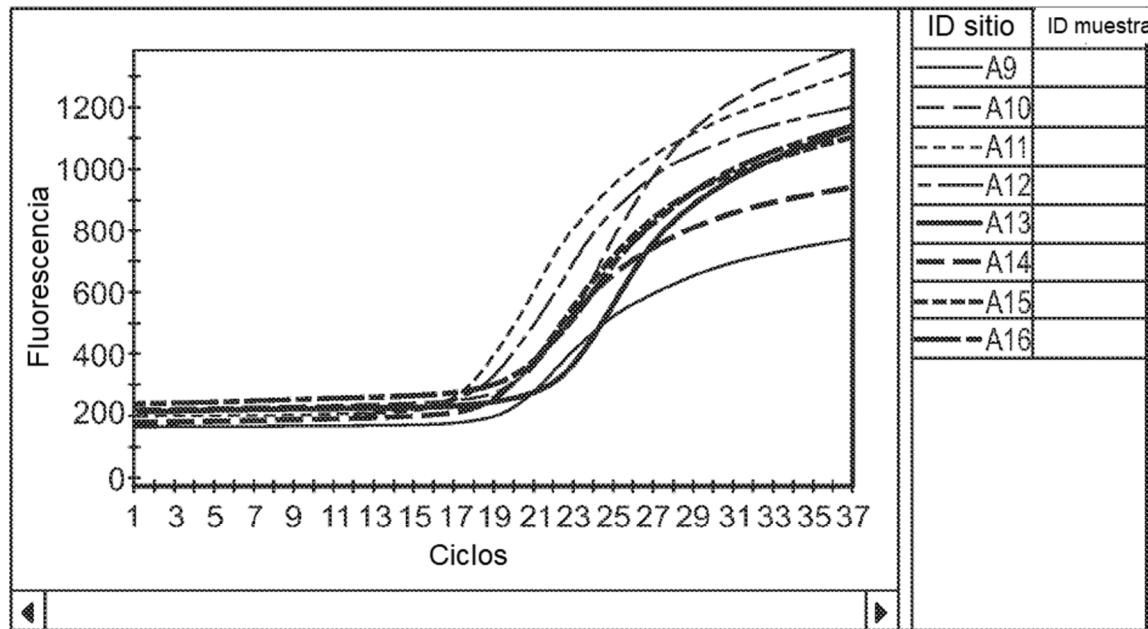


FIG. 3A

Curvas de amplificación de control interno

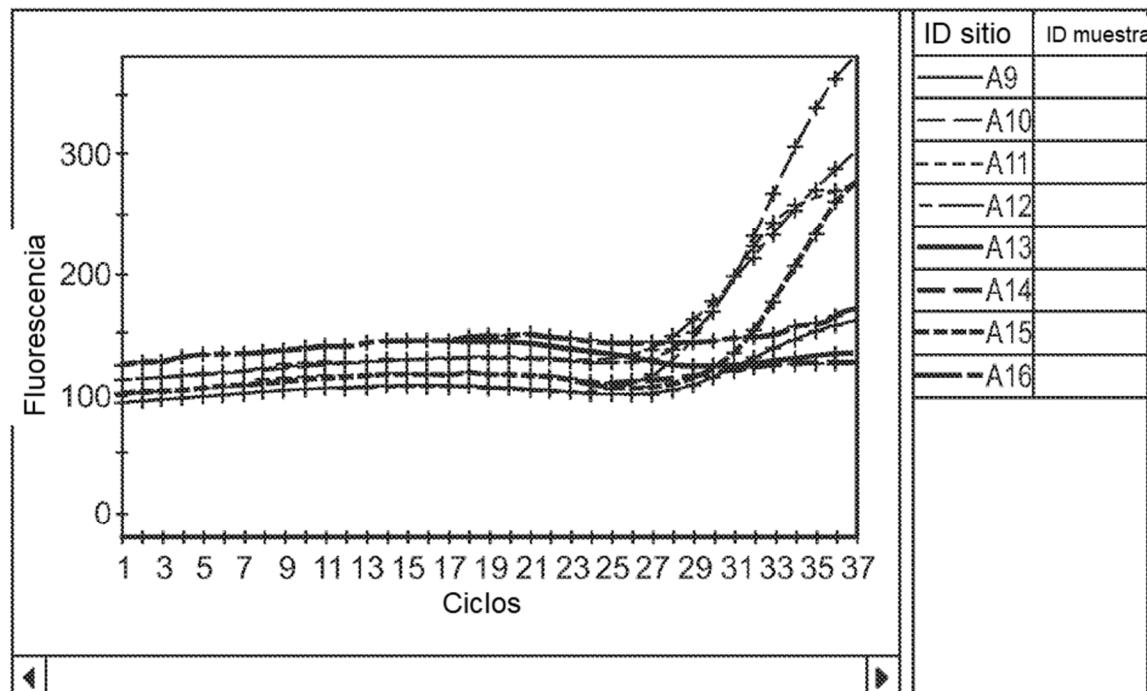


FIG. 3B