

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 877 602**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C07H 1/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2008** **E 17168296 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021** **EP 3222733**

54 Título: **Materiales de captura de polinucleótidos y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

13.07.2007 US 959437 P

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

17.11.2021

73 Titular/es:

HANDYLAB, INC. (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07147, US

72 Inventor/es:

BRAHMASANDRA, SUNDARESH, N. y
BOUTT, ELIZABETH

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 877 602 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

Materiales de captura de polinucleótidos y procedimientos de uso de los mismos

5 CAMPO TÉCNICO

La tecnología descrita en el presente documento se refiere de forma general a procedimientos para procesar muestras biológicas y, más en particular, se refiere a materiales para capturar moléculas de polinucleótidos, como ARN y ADN, desde dichas muestras y permitir su determinación cuantitativa.

10

ANTECEDENTES

El análisis de una muestra biológica, como por ejemplo una muestra clínica o una muestra de alimento para ensayo, para determinar la presencia de un patógeno, como pueda ser un virus, o para determinar la presencia de un gen en particular incluirá normalmente la detección de uno o más polinucleótidos presentes en la muestra. Un tipo de detección es la detección cualitativa, que se refiere a la determinación de la presencia o ausencia de un polinucleótido diana y/o la determinación de información relacionada, por ejemplo, con el tipo, el tamaño, la presencia o la ausencia de mutaciones y/o la secuencia del polinucleótido diana. Otro tipo de detección es la detección cuantitativa, que se refiere a la determinación de la cantidad de un polinucleótido en particular presente en la muestra, expresado por ejemplo como una concentración o una cantidad absoluta en peso o un volumen. La detección puede incluir también tanto aspectos cualitativos como cuantitativos. La detección cuantitativa, sin embargo, constituye normalmente una búsqueda más desafiante que la simple determinación cualitativa de la presencia o ausencia de un polinucleótido.

La detección de polinucleótidos suele implicar el uso de una enzima. Por ejemplo, algunos procedimientos de detección incluyen la amplificación del polinucleótido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o a través de una técnica de amplificación relacionada. Se emplean enzimas asimismo en otros procedimientos de detección que no amplifican el polinucleótido que se va a detectar. Sin embargo, el funcionamiento de las enzimas utilizadas en dichas técnicas se puede inhibir por la presencia de materiales (conocidos como inhibidores) que acompañan al polinucleótido en muchas muestras biológicas - en particular clínicas. Los inhibidores pueden interferir por ejemplo con la eficiencia y/o especificidad de las enzimas.

La detección de polinucleótidos hoy en día avanza hacia técnicas cada vez más rápidas y cada vez más sensibles. Por ejemplo, el diagnóstico rápido y preciso de infecciones virales es muy valioso para tratar a un paciente con precisión al dirigir la administración de la terapia antiviral apropiada, eliminar la utilización innecesaria de antibióticos y llevar un seguimiento de la respuesta individual del régimen prescrito. Dada sus significativas ventajas de sensibilidad, especificidad y tiempo para el resultado, la detección de polinucleótidos (o ensayo de ácido nucleico) ha pasado a ser el patrón internacional presuntivo para diagnóstico viral.

Sin embargo, la aplicación de las pruebas de ácido nucleico al diagnóstico de rutina de dianas virales se ha limitado a los grandes laboratorios de referencia clínica y los laboratorios de los principales hospitales debido al alto coste, su complejidad y los requerimientos de un alto nivel de pericia para implementar dichas pruebas. Si bien se han realizado importantes mejoras en los últimos años, la detección con éxito de virus de ARN, en particular, requiere unos procedimientos de extracción extremadamente laboriosos que se basan frecuentemente en el uso de sustancias químicas tóxicas. Por otra parte, las moléculas de ARN pueden ser muy inestables y, por lo tanto, es posible que requieran un procesamiento/tratamiento delicado durante su determinación. Hasta la fecha, se han resuelto todas estas cuestiones con el uso de un equipo robótico grande, caro y que requiere mucho tiempo.

A la vista de las demandas que exige la práctica de la medicina actualmente, los laboratorios que realizan pruebas de diagnóstico de las muestras de pacientes observan sustanciales beneficios al tener una producción enormemente alta, que se ve favorecida cuando se acorta lo más posible el tiempo necesario para llegar a un resultado de diagnóstico para una muestra dada. Las pruebas se pueden realizar con mayor rapidez si la muestra real en la que se pone en marcha la prueba se reduce en la mayor medida de lo posible. Más recientemente, se observa la creciente necesidad de una plataforma pequeña, fácil de utilizar, de bajo coste y automática para la extracción de ARN de alta calidad a partir de dianas virales en muestras clínicas.

En consecuencia, pues, cada vez es más importante la necesidad de poder aislar cantidades diminutas de polinucleótidos a partir de muestras biológicas complejas de manera que se evite de forma eficaz la presencia de inhibidores, o se reduzca su impacto perjudicial. Asimismo, teniendo en cuenta que se dispone de diversos aparatos de amplificación automáticos independientes, es deseable poder extraer desde una muestra clínica en bruto de forma segura y rutinaria una cantidad de polinucleótidos que esté lista - en lo que se refiere a la pureza y la cantidad - para amplificación.

Yoza B et al, Fully automated DNA extraction from blood using magnetic particles modified with hyperbranched polyamidoamine dendrimer. Journal of Bioscience and Bioengineering, Elsevier, Amsterdam, NL, páginas 21 - 26, se

refiere a una extracción de ADN completamente automatizada a partir de sangre usando partículas magnéticas modificadas con un dendrímero de poliamidoamina hiperramificado.

Yoza Brandon et al, DNA extraction using bacterial magnetic particles modified with hyperbranched polyamidoamine dendrimer, Journal of Biotechnology, Elsevier, Amsterdam, NL, páginas 219 -. 228, se refiere a la extracción de ADN usando partículas magnéticas bacterianas modificadas con dendrímero de poliamidoamina hiperramificado.

La exposición en los antecedentes del presente documento se incluye para explicar el contexto de la tecnología. No debe considerarse como una aceptación de que cualquier material al que se haya hecho referencia esté publicado, sea conocido o forme parte del dominio público en general hasta la fecha de prioridad de cualquiera de las reivindicaciones que se adjuntan al presente documento.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de la presente memoria descriptiva se pretende que la palabra "comprende", y las variaciones de la misma, como "comprendiendo" y "comprenden", no excluyan otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para el aislamiento de polinucleótidos a partir de una muestra que contiene células, comprendiendo el procedimiento:
poner en contacto la muestra con una solución de lisis que tiene un primer pH entre 4 y 8 y una pluralidad de partículas de unión recubiertas de PAMAM, de modo que los polinucleótidos se liberan de las células y se unen a PAMAM, creando así partículas de unión unidas con polinucleótidos y una solución que contiene materia celular residual;
compactar las partículas de unión;
eliminar la solución que contiene materia celular residual;
lavar las partículas de unión; y
liberar los polinucleótidos de las partículas de unión poniendo en contacto las partículas de unión con una solución de liberación, liberando en base a un cambio del primer pH a un segundo pH más básico; en el que la PAMAM tiene un peso molecular entre 500 y 600 Daltons.

El proceso y los materiales del presente documento se pueden aplicar a una serie de dianas de prueba, en particular, aquellas que se basan en ARN, tales como gripe (A & B), RSV, HSV, CMV, Adenovirus, y Enterovirus.

La tecnología del presente documento proporciona una captura de ARN excelente - así como de ADN - y la recuperación a través del uso de micropartículas que tienen una alta capacidad de unión a ARN y ADN, como por ejemplo perlas de 100 µg/mg y >90 % de eficiencia de liberación. En los ejemplos de realizaciones, se pueden extraer 8 - 10 µg de ARN desde un cultivo de toda la noche. Los procesos, tal como se describen en el presente documento permiten la extracción de ARN muy rápida (15-20 minutos incluyendo la lisis) a partir de material celular o viral, a través de un proceso en un solo tubo. Los procesos, tal como se describen en el presente documento comprenden un procedimiento simplificado que tiene menos etapas (por ejemplo, seis) para proceder desde una muestra bruta a un ARN purificado. Dichos procesos proporcionan por lo tanto una limpieza enormemente eficaz de ARN desde muestras biológicas en bruto, de manera que permite la realización de PCR sobre ellas. Los procedimientos y procesos son aplicables en una amplia gama de matrices de muestra, además de como tampones clínicos utilizados para recoger muestras en bruto, por ejemplo, M4, UTM, y caldo de cultivo de Todd Hewitt Broth.

Las dianas adecuadas que se han utilizado en los ensayos de pruebas clínicas y que pueden ser objeto de procesos de preparación de muestras, tal como se describen en el presente documento, incluyen, pero sin limitarse a ellas: Chlamydia Trachomatis (CT); Neisseria Gonorrhea (GC); estreptococo del grupo B; HSV; Tipificación HSV; CMV; Influenza A & B; MRSA; RSV; TB; Trichomonas; Adenovirus; Bordetella; BK; JC; HHV6; EBV; Enterovirus; y M. pneumoniae.

Un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para procesar uno o más compuestos de ARN y/o ADN (por ejemplo, para concentrar el compuesto o compuestos de ARN y/o ADN y/o para separar el compuesto o compuestos de ARN y/o ADN de compuestos inhibidores (por ejemplo, hemoglobina, péptidos, compuestos fecales, ácidos húmicos, compuestos mucosos, proteínas de unión al ADN o un sacárido) que podrían inhibir la detección y/o amplificación de los compuestos de ARN y/o ADN).

En algunas realizaciones, el procedimiento incluye poner en contacto la muestra que contiene los compuestos de ARN y/o PAMAM (Generación 0) que se asocia preferentemente con (por ejemplo, conserva) los compuestos de ARN y/o ADN en comparación con inhibidores. La PAMAM (Generación 0) está típicamente unida a una superficie (por ejemplo, una superficie de una o más partículas). La PAMAM (Generación 0) retiene los compuestos de ARN y/o ADN de modo que los compuestos de ARN y/o ADN y los inhibidores pueden separarse, por ejemplo lavando la superficie con el compuesto y los compuestos de ARN y/o ADN asociados. Tras la separación, la asociación entre el compuesto de ARN y/o ADN y la PAMAM (Generación 0) puede romperse para liberar (por ejemplo, separar) los compuestos de ARN y/o ADN del compuesto y la superficie.

La presente divulgación incluye además un proceso para la concentración de ARN desde una muestra que contiene inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa, comprendiendo dicho procedimiento el contacto de entre 500 pl y 1 ml de la muestra con una pluralidad de partículas de unión de ARN, estando configuradas las partículas de unión para retener preferentemente el ARN en la muestra en comparación con los inhibidores de reacción en cadena de la polimerasa; la concentración de la pluralidad de partículas que tienen uno o más polinucleótidos unidos en un volumen eficaz de entre 50 nanolitros y 5 microlitros; y la liberación de uno o más polinucleótidos en < 30 µl de solución.

La presente divulgación incluye además una composición que comprende: micropartículas modificadas con carboxilo; y PAMAM (Generación 0) unido a través de uno o más grupos amina por molécula con uno o más grupos ácido carboxílico en las micropartículas.

La presente divulgación incluye además un kit, que comprende una serie de tubos cerrados herméticamente, que contienen cada uno un tampón de lisis; un tubo que contiene micropartículas liofilizadas que tienen PAMAM (Generación 0) unida a ellas; un tubo que contiene reactivos de lavado líquidos, suficientes para analizar el número de muestras; y un tubo que contiene reactivos de liberación líquidos, suficientes para analizar el número de muestras, donde cada componente del kit se almacena en un envase hermético al aire.

La presente divulgación incluye además también un kit que comprende: una primera bolsa hermética al aire que encierra una serie de tubos, conteniendo cada tubo micropartículas liofilizadas que tienen PAMAM (Generación 0) unida a ellas; una segunda bolsa hermética al aire que encierra una serie de soportes de reactivo, comprendiendo cada soporte: un tubo que contiene reactivos de lisis líquidos; un tubo que contiene reactivos de lavado líquidos; y un tubo que contiene reactivos de liberación líquidos.

La presente divulgación incluye adicionalmente un procedimiento para obtener un elemento de retención de polinucleótido, comprendiendo dicho procedimiento: lavado de una cantidad de microesferas con carbonato y tampón MES; preparación de sulfo-NHS y EDAC; incubación de las microesferas con sulfo-NHS y EDAC durante 30 minutos; lavado de las microesferas con MES y tampón borato; contacto de las microesferas con PAMAM(0) durante 8 - 10 horas; y aclarado de PAMAM(0) sin unir de las microesferas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 presenta de forma esquemática un proceso típico según la descripción del presente documento.

FIG. 2 presenta de forma esquemática la acción de las perlas de afinidad de ADN tal como se describe más

adelante en el presente documento.

FIG. 3 presenta curvas de PCR para extracción de ARN EV13 de hisopos nasales.

FIG. 4 presenta curvas de PCR para extracción de ARN EV13 en medios M4.

FIG. 5 presenta una comparación de las curvas PCR de ARN extraído de un tampón con el obtenido de plasma.

FIG. 6 presenta la extracción de ARN utilizando perlas.

FIG. 7 presenta la extracción de ARN de plasma.

FIG. 8 ilustra la sensibilidad de extracción.

FIG. 9 presenta un diagrama de flujo de un proceso para la preparación de micropartículas revestidas con PAMAM (Generación 0).

En los distintos dibujos se indican con los mismos símbolos de referencia los mismos elementos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El análisis de muestras biológicas suele incluir la determinación de si está presente o no uno o más polinucleótidos (por ejemplo, a ADN, ARN, ARNm o ARNr) en una muestra. La tecnología descrita en el presente documento es susceptible de aplicación para determinar tanto ARN como ADN que está presente en la muestra. Por ejemplo, se puede analizar una muestra para determinar si está presente o no el ARN de un patógeno en particular, y también si está presente o no el ADN de otro o del mismo patógeno. Si están presentes, el ARN o el ADN pueden ser indicativos en combinación o por separado de la enfermedad o la afección correspondiente.

Por consiguiente, la tecnología descrita en el presente documento se refiere a materiales que se unen a polinucleótidos y al uso de dichos materiales en el aislamiento de polinucleótidos, tales como ADN y ARN, desde muestras biológicas. Los materiales, en combinación con los procedimientos de uso de los materiales, proporcionan una extracción rápida y segura de ARN y ADN desde muchos tipos diferentes de muestras biológicas, incluyendo la determinación cuantitativa tanto de ARN como de ADN. Dichos procedimientos se denominan normalmente procedimientos de "preparación de muestra". Lo que se entiende por dicho término es la liberación, extracción, concentración y/o aislamiento de ARN y/o ADN de un organismo diana desde una muestra en bruto - como la obtenida directamente de un paciente o un producto agrícola o de alimento - donde la muestra en bruto contiene el ARN diana y/o el ADN diana unido en forma celular. El ARN diana y/o el ADN diana liberado se coloca en la culminación del proceso, en una forma adecuada para amplificación y/o detección.

Los términos ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico) y juntos como polinucleótidos, tal como se utilizan en el presente documento significan una molécula individual o población de moléculas, que se pueden identificar por tener una secuencia de nucleótidos específica común a todos, o puede significar colectivamente moléculas de ADN o ARN que tienen diferentes secuencias entre sí. Por ejemplo, una muestra biológica de un paciente humano puede contener ADN de las células del paciente, que tienen una secuencia y ADN o ARN de las células de un patógeno, que tiene una secuencia diferente de la del ADN del paciente. Por tanto, se hace referencia a la muestra como una muestra que contiene ADN y ARN (o, en combinación, polinucleótidos) incluso aunque haya moléculas de ADN (o ARN) en la muestra que sean diferentes (distintas químicamente) entre sí. Los procedimientos del presente documento se pueden utilizar para liberar, colectivamente, moléculas de ADN y ARN tanto desde las células del paciente como desde las células de patógenos en dicha muestra. Normalmente, sin embargo, en tales casos, normalmente sería el ADN o el ARN del patógeno lo que sería de interés y que se amplificaría selectivamente entre todos los ADN y ARN que se aislaran en última instancia de la muestra. El ADN y el ARN más apropiado para la extracción según los procedimientos del presente documento tienen un tamaño de menos de 7,5 Mbp, aunque ha de entenderse que pueden ser susceptibles de extracción y detección según los procedimientos del presente documento moléculas de ADN y de ARN más grandes.

Normalmente, las muestras biológicas son mezclas complejas. Por ejemplo, se puede proporcionar una muestra como, por ejemplo, una muestra de sangre, una muestra de tejido (por ejemplo, un hisopo, por ejemplo, de tejido nasal, bucal, anal o vaginal), un aspirado de biopsia, un lisado, hongos o bacterias. El ARN y/o ADN que se va a determinar está contenido normalmente dentro de partículas (por ejemplo, células como glóbulos blancos o glóbulos rojos), fragmentos de tejidos, bacterias (por ejemplo, bacterias gram-positivas o bacterias gram-negativas), hongos o esporas. Normalmente, forma parte de la muestra y/o se añade a la muestra durante una etapa del procesamiento uno o más líquidos (por ejemplo, agua, un tampón, sangre, plasma sanguíneo, saliva, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) o disolvente orgánico). Los materiales y los procedimientos descritos en el presente documento son compatibles con diversas matrices clínicas que incluyen al menos sangre, orina, LCR, hisopo y plasma.

Los procedimientos para analizar las muestras biológicas incluyen la liberación de ARN y/o ADN desde las partículas (por ejemplo, bacterias) en la muestra, la amplificación de uno o más de los ARN y/o ADN liberados (por ejemplo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)) y determinación de la presencia (o ausencia) de polinucleótido(s) amplificados (por ejemplo, por detección de fluorescencia).

Las muestras clínicas presentan varios retos, sobre todo en la detección de ARN y ADN diana por PCR y tecnologías similares. Un ácido nucleico diana podría estar presente en una concentración de tan solo 10 copias por mililitro, según se mide frente a un fondo de millones o miles de millones de copias de ácidos nucleicos que compiten (por ejemplo, desde las células normales del paciente). Por otra parte, existen diversas entidades bioquímicas presentes en la muestra química inhiben la PCR. Los inhibidores pueden frustrar asimismo el aislamiento de ARN o ADN desde la muestra, por ejemplo siendo capturados por el material diseñado para retener el ARN o ADN. Si no se reduce la concentración de los inhibidores en relación con el ARN o ADN que se va a determinar, el análisis puede producir resultados negativos falsos. Entre los ejemplos de dichos inhibidores, dependiendo de la muestra biológica en cuestión, se incluyen residuos celulares, como fragmentos de membrana, ácidos húmicos, compuestos de la mucosa, hemoglobina, otras proteínas como proteínas de unión a ADN, sales, ADNasas, materia fecal, meconio, urea, líquido amniótico, sangre, lípidos, sacáridos y polisacáridos. Por ejemplo, dichos inhibidores pueden reducir la eficiencia de la amplificación del ADN y ARN por PCR y otras técnicas enzimáticas para determinar la presencia de ADN y ARN.

Por lo tanto, un procedimiento de preparación de muestra eficaz debería llevar a una concentración del ARN o ADN diana y minimizar la presencia de sustancias inhibitoras. Los procedimientos descritos en el presente documento pueden aumentar la concentración del ADN y/o ARN que se van a determinar y/o reducir la concentración de inhibidores en relación con la concentración de ADN y/o ARN que se va a determinar.

Además, las células de algunos organismos diana, como bacterias gram-positivas (por ejemplo, *Estrep.* del Grupo B) son muy difíciles de lisar, lo que significa que las condiciones de lisado pueden ser muy rigurosas. Es posible que dichos organismos requieran sustancias químicas adicionales para la lisis, como mutanolisina, y pueden requerir además temperaturas más altas para una lisis óptima. Dichas condiciones pueden acomodarse a los materiales y procedimientos que se describen en el presente documento.

Proceso de preparación de muestra

Se puede llevar a cabo un proceso de preparación de muestra típico en una cámara de procesamiento que incluye una pluralidad de partículas (por ejemplo, perlas, microesferas), configuradas para retener ARN y/o ADN de la muestra en un primer conjunto de condiciones (por ejemplo una primera temperatura y/o un primer pH) y para liberar el ARN en un segundo conjunto de condiciones (por ejemplo, una segunda temperatura más alta y/o un segundo pH más básico) y para liberar ADN en un tercer conjunto de condiciones (por ejemplo, una tercera temperatura diferente y/o un tercer pH más básico que el pH utilizado en las condiciones primera y segunda). Normalmente, el ADN y el ARN se retienen con preferencia a los inhibidores que puedan estar presentes en la muestra.

En la FIG. 1 se ilustra un ejemplo de proceso de preparación de muestra. Los diversos reactivos a los que se hace referencia en conexión con la FIG. 1 se describen con mayor detalle a lo largo del presente documento. En 100, un tubo de proceso 101, como por ejemplo un tubo de microcentrífuga de 1,7 ml de laboratorio normal, contiene una muestra biológica que comprende un líquido 109, como por ejemplo una solución acuosa y materiales celulares 111, donde al menos algunos de los materiales celulares pueden contener ARN y/o ADN de una diana de interés. La muestra biológica puede ser cualquiera de las descritas a lo largo del presente documento, y el tubo de proceso 101 puede ser cualquier tubo o vaso adecuado, tal como se describe más adelante en presente documento. Debe entenderse que, aunque el proceso se ilustra con respecto a la FIG. 1, el proceso no está limitado a su realización en un tubo. Por ejemplo, la muestra y los diversos reactivos pueden estar, suministrarse y mezclarse y hacerse reaccionar dentro de cámaras de un dispositivo microfluídico como, por ejemplo, un cartucho microfluídico tal como se describe con mayor detalle en la solicitud de patente de Estados Unidos Serie No. 11/281,247, registrada el 16 de noviembre de 2005.

- 15 Una primera punta de pipeta 103 contiene una solución 107 de micropartículas 105, que son suministradas al tubo de proceso y se ponen en contacto con la muestra biológica contenida en él. Se modifica la superficie de las partículas 105 para fijar en ellas PAMAM (0) tal como se describirá más adelante en el presente documento, para que retengan ARN y/o ADN con preferencia a los inhibidores en la solución. La solución 107 puede ser una solución de lisis, tal como se describe más adelante en el presente documento. La solución de lisis puede contener undetergente, además de las diversas enzimas, tal como se describe a lo largo del presente documento. El mezclado a fondo de las micropartículas, la solución y la muestra biológica puede producirse simplemente por combinación turbulenta de las dos soluciones tras la liberación de la solución que contiene micropartículas desde la punta de la pipeta, o puede tener lugar por agitación mecánica o manual del tubo de proceso 101.
- 25 Se coloca la primera punta de pipeta 103 por encima de la cámara de proceso 101, por ejemplo, por operación manual por parte del usuario o mediante un cabezal de pipeteado automático, tal como se describe por ejemplo en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Serie No. 60/959,437, 13 de julio de 2007.

En 110, utilizando el mismo tubo de proceso 101, se incuban las micropartículas, la muestra biológica y los reactivos de lisis, por ejemplo aplicando calor desde una fuente externa tal como se muestra, de manera que se lisan las células en la muestra biológica y liberan ARN y/o ADN. En estas condiciones, se unen las moléculas de ADN a las superficies de las micropartículas adecuadamente configuradas, tal como se describe más detalladamente más adelante. Normalmente, las partículas retienen ARN y/o ADN desde los líquidos que tienen un pH de aproximadamente 9,5 o menos (por ejemplo, aproximadamente 9,0 o menos, aproximadamente 8,75 o menos, aproximadamente 8,5 o menos). Debe advertirse que la unión de ADN a las micropartículas de afinidad se produce simultáneamente al proceso de lisis y la presencia de detergentes y, en algunos casos, enzimas líticas en la solución de lisis, no afecta negativamente a la unión. La selección de la temperatura está dictada por lo necesario para lisar las células en cuestión y no se requiere calor para efectuar la unión del ARN o ADN a las partículas. Normalmente, las células que tienen paredes más resistentes (por ejemplo, listeria, o ántrax) requerirán temperaturas más altas. Por ejemplo, la determinación de Chlamydia utiliza una temperatura de 37 °C durante un período de 5-10 minutos para la lisis y la unión, mientras que la determinación de estreptococo del Grupo B utiliza una temperatura de 60 °C durante un período de 5-10 minutos. Generalmente, se calienta el líquido a una temperatura que no llegue al punto de ebullición del líquido en presencia de las partículas.

- 45 En 120, se concentran o se compactan las micropartículas y se retira la solución restante que contiene materia celular residual 125, por ejemplo, con una segunda punta de pipeta 123. Se entiende por compactar que, en lugar de estar distribuidas uniformemente las micropartículas a través de la solución, están reunidas en un único emplazamiento del tubo de proceso en contacto entre sí. Cuando las micropartículas son magnéticas, se puede conseguir la compactación de las micropartículas por ejemplo acercando un imán 121 muy próximo a la parte exterior de la cámara de proceso 101 y desplazando el imán de arriba abajo por fuera de la cámara. Las partículas magnéticas son atraídas por el imán y traccionan hacia el interior de la pared de la cámara de proceso adyacente al imán.

La punta de pipeta 123 elimina tanta solución restante (a veces denominada sobrenadante o solución que tiene la materia celular residual) como sea práctico sin extraer cantidades significativas de micropartículas. Normalmente, puede deslizarse una punta de pipeta en la cámara de proceso 105 sin entrar en contacto con las micropartículas. De esta forma, se concentran las micropartículas al estar presentes en un menor volumen de solución que hasta ahora. La punta de pipeta 123 puede ser diferente de la punta de la punta de pipeta 103, o puede ser la misma punta. En algunas realizaciones, tras la retirada de la solución que contiene la materia celular residual, se dejan menos de 10 microlitros de solución junto con las partículas. Normalmente, esto se consigue por compactación de las micropartículas en un pequeño aglomerado, pero también alejando el aglomerado del emplazamiento donde se introduzca la pipeta para retirar el sobrenadante. La colocación de la pipeta en relación con la parte inferior del tubo también es importante para retirar prácticamente todo el sobrenadante. La punta de la pipeta deberá estar por lo menos cerca de la parte inferior del tubo (a unos 1-2 mm) pero sin cerrar completamente la punta de la pipeta contra el fondo del tubo. Se puede utilizar un diseño estrellado en la parte inferior del tubo de lisis (tal como se describe en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos No. 60/959,437, registrada el 13 de julio de 2007), pero la

colocación del diseño en relación con el emplazamiento del imán pasa a ser importante para que el deslizamiento de las micropartículas compactadas no se vea impedido y las arrugas entre los vértices del diseño estrellado no atrapen las micropartículas.

- 5 En 130, una tercera punta de pipeta 133 suministra una solución de lavado 131 a la cámara de proceso 101, que contiene partículas compactadas. La solución de lavado puede comprender, por ejemplo, un tampón como Tris-EDTA con un tensioactivo como 1 % Triton X 100, y que tiene un pH total de 8,0. Normalmente, el volumen del tampón de lavado es 100 microlitros o menos, donde la muestra es de 2 ml o menos de volumen. Se usa la solución de lavado para eliminar por lavado las moléculas que no son ADN y que no son ARN, como puedan ser inhibidores que se hayan podido unir a las micropartículas. La solución de lavado se selecciona para lavar preferentemente moléculas que no son ARN y que no son ADN al tiempo que deja en su sitio las moléculas de ARN y/o ADN unidas a las micropartículas. La punta de pipeta 133 puede ser diferente de la punta de las puntas de pipeta 103 o 123, o ambas, o puede una de las puntas reutilizada.
- 10
- 15 Para liberar el ARN y, por separado, el ADN de las partículas, se reemplaza la solución de lavado 131 con una solución de liberación alcalina (pH ~9,0) por ejemplo, una solución de tampón que tiene un pH diferente del de la solución de lavado. Esto se puede realizar pipeteando tanta solución de lavado como sea posible, por ejemplo, que tenga un volumen residual < 5 microlitros, y dispensando después el tampón de liberación con una nueva punta de pipeta. En el caso de utilizar la misma pipeta, deberá eliminarse por drenado el líquido completamente para no diluir la solución de liberación. Por ejemplo, en 140, se administra una solución de liberación 141 a la cámara de proceso 101 para que el ARN unido a las micropartículas se pueda liberar desde las micropartículas. En general, PAMAM (Generación 0) sobre las partículas (tal como se describe más adelante en el presente documento) liberan muy eficazmente ARN cuando el pH es aproximadamente 9. En consecuencia, se puede liberar ARN de las partículas en el líquido circundante. En algunos casos, se puede aplicar calor al tubo de proceso, para calentar la solución a 85 °C para facilitar la liberación de ARN. Generalmente, se calienta el líquido a una temperatura no llegue al punto de ebullición del líquido en presencia de las partículas. En algunas realizaciones, la temperatura es 100 °C o menos (por ejemplo menos de 100 °C, aproximadamente 97 °C o menos). En algunas realizaciones, la temperatura es aproximadamente 65 °C o más (por ejemplo, aproximadamente 75 °C o más, aproximadamente 80 °C o más, aproximadamente 90 °C o más). En algunas realizaciones, la temperatura se mantiene durante aproximadamente 1 minuto o más (por ejemplo, aproximadamente 2 minutos o más, aproximadamente 5 minutos o más, aproximadamente 10 minutos o más). En algunas realizaciones, la temperatura se mantiene durante aproximadamente 30 minutos (por ejemplo, aproximadamente 15 minutos o menos, aproximadamente 10 minutos o menos, aproximadamente 5 minutos o menos). En algunas realizaciones, se calienta el tubo de proceso a entre aproximadamente 65 y 90 °C (por ejemplo, a aproximadamente 70 °C) durante entre aproximadamente 1 y 7 minutos (por ejemplo, durante aproximadamente 2 minutos). En otras realizaciones, el calentamiento es a 85 °C durante 3 minutos. En otras realizaciones más, el calentamiento es a 65 °C durante 6 minutos. En general, se necesita un período de calentamiento más prolongado para una temperatura más baja. Alternativamente, o en combinación, se calientan las partículas con ARN retenido para liberar ARN sin asistencia de una solución de liberación. Cuando se utiliza solamente calor para liberar el ARN, la solución de liberación puede ser idéntica a la solución de lavado.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40 Normalmente, el ARN de una muestra de 2 ml y de acuerdo con la descripción de la lisis, unión y lavado descrita a lo largo del presente documento, se libera en aproximadamente 20 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 10 microlitros o menos, aproximadamente 5 microlitros o menos o aproximadamente 2,5 microlitros o menos) de líquido.
- 45 Aunque se ha descrito la liberación de ARN incluyendo calentamiento, se puede liberar ARN sin calentamiento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la solución de liberación tiene una concentración iónica, un pH, una concentración de tensioactivo, una composición o una combinación de los mismos que libera el ARN del elemento de retención sin requerir calor.
- 50 Cabe indicar que una cizalla excesiva, como la causada por un movimiento rápido del líquido durante las operaciones de mezclado de succión y dispensa durante el lavado y liberación (normalmente durante la liberación de ADN) en el proceso de preparación de muestra pueden liberar PAMAM (Generación 0) desde la superficie de las partículas, lo que causa de por sí la inhibición en dirección 3' de la PCR. Las etapas de mezclado deberán limitarse a menos de 10 operaciones de succión y dispensa, donde la cantidad que se mueve de atrás hacia delante oscila entre 1 y 20 microlitros desplazados en la pipeta, realizado durante 1 a 10 segundos por cada operación de succión y dispensa.
- 55
- 60 En 150, las micropartículas, que no tienen unido ARN esencialmente ahora, se pueden compactar o concentrar de manera similar a la descrita en 120, pero en este caso, para facilitar la retirada de la solución de liberación que contiene el ARN disuelto en ella. Por ejemplo, se pueden recoger perlas magnéticas reunidas en el interior de la pared de la cámara de proceso al acercar el imán 121 muy próximo por fuera de la cámara de proceso. En la FIG: 1, se utiliza el imán 121 para compactar las micropartículas en las dos etapas 120 y 150, si bien ha de entenderse que es posible utilizar diferentes imanes en ambos casos.

En los casos en los que la muestra contiene tanto ARN como ADN, y es deseable determinar tanto un ARN en particular como un ADN en particular, se pueden repetir los procedimientos 140 y 150, tal como se describen en el presente documento, utilizando una segunda solución de liberación que se diseña para liberar ADN. Tal como se describe con mayor detalle en la solicitud de patente de Estados Unidos Serie No. 12/___, registrada en la misma fecha y titulada

5 "MATERIALES DE CAPTURA DE POLINUCLEÓTIDOS Y PROCEDIMIENTOS DE UTILIZACIÓN DE LOS MISMOS" una solución diseñada para liberar ADN tiene normalmente un pH de aproximadamente 12 o más. Dicho procedimiento se basa en el hecho de que ARN y ADN tiene diferentes kPa y por tanto se eluyen desde la superficie de la partícula a la que están unidos de forma no covalente, a pH diferentes. Se aplican consideraciones similares, como las condiciones de liberación (temperatura, concentraciones de reactivo, etc.) para liberar ADN y ARN.

10 Cabe indicar que hasta ahora, todas las etapas de procesamiento han tenido lugar en un solo tubo. Esto resulta ventajoso por una serie de razones: en primer lugar, la de que etapas de transferencia de líquido innecesarias conduzcan necesariamente a cierta pérdida del material diana. Se sumarán al tiempo global del protocolo las etapas de transferencia de líquido adicionales. Debe advertirse que realizar todo el procesamiento líquido en un solo tubo no

15 es una tarea fácil por los volúmenes residuales que quedan entre sucesivas transferencias de líquido. Es incluso más difícil cuando el volumen de elución final es muy bajo, por ejemplo menos de 30 microlitros o menos de 20 microlitros o menos de 10 microlitros o menos de 5 microlitros. No obstante, con los protocolos descritos en el presente documento, se obtienen muy buenos rendimientos.

20 El ARN y/o subsiguientemente el ADN, liberado de las micropartículas pueden extraerse en una cuarta punta de pipeta 153 en solución en la solución de liberación. La punta de pipeta 153 no tiene por qué ser diferente de las puntas de pipeta 103, 123 y 133 y por lo tanto representa una reutilización de una de dichas puntas. Aunque es deseable el uso de perlas magnéticas, también se utilizan perlas no magnéticas en el presente documento y se separan, por ejemplo, por centrifugación en lugar de mediante el uso de un imán.

25 En ciertas realizaciones, la relación entre el volumen de la muestra original introducida en el tubo de procesamiento y el volumen de líquido en el que se libera el ARN o ADN es al menos aproximadamente 10 (por ejemplo, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 1,000). En algunas realizaciones, se puede retener ARN o ADN de una muestra que

30 tiene un volumen de aproximadamente 2 ml dentro del tubo de procesamiento y liberarse tras la unión y el lavado en aproximadamente 4 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 3 microlitros o menos, aproximadamente 2 microlitros o menos, aproximadamente 1 microlitros o menos) del líquido.

En algunas realizaciones, la muestra tiene un volumen mayor que el volumen concentrado de las partículas de unión

35 que tienen unido en ellas ARN o ADN en un factor de al menos aproximadamente 10.

En otras realizaciones, la muestra tiene un volumen de 100 μ l - 1 ml y las partículas compactadas ocupan un volumen efectivo de menos de 2 microlitros.

40 El líquido en el que se libera ARN o ADN incluye normalmente al menos aproximadamente 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 95 %) del ARN o ADN, respectivamente, presente en la muestra 109. Así por ejemplo, se pueden liberar ~8 - 10 μ g de ADN desde 1 ml de un cultivo de toda la noche y se pueden extraer ~2 - 4 μ g de ADN desde un hisopo bucal. La concentración de ARN o ADN presente en el líquido de liberación puede ser más alta que la correspondiente concentración en la muestra original ya que el volumen del líquido de liberación es normalmente

45 menos que el volumen de la muestra líquida original. Por ejemplo, la concentración de ADN en el líquido de liberación puede ser al menos aproximadamente 10 veces mayor (por ejemplo, al menos aproximadamente 25 veces mayor, al menos aproximadamente 100 veces mayor) que la concentración del ADN en la muestra 109. La concentración de inhibidores presentes en el líquido en el que se libera ARN o ADN es generalmente menos que la concentración de

50 los inhibidores de la muestra fluidica original en una cantidad suficiente como para aumentar la eficiencia de amplificación del ARN o ADN con respecto a la que se podría obtener de una muestra sin purificar.

En general, aunque los procesos y materiales descritos en el presente documento tienen capacidad para actuar perfectamente - normalmente solamente con una adaptación de rutina - en una amplia gama de tamaños de muestra

55 y volúmenes de reactivos, para la mayoría de las aplicaciones prácticas (considerando el tamaño de la mayoría de las muestras biológicas sometidas a análisis de diagnóstico), el volumen de las partículas compactadas que tienen ARN y/o ADN unidos a ellas que resulta (antes de liberación) está en el intervalo de 2 - 3 μ l y es independiente del volumen de la muestra, hasta aproximadamente 2 ml de la muestra. Normalmente, la cantidad de las micropartículas requeridas se determina por la cantidad de ARN y/o ADN en la muestra. Se ha observado que, dada la eficiencia de la unión a

60 las partículas, es suficiente 0,5 mg de partículas para la mayoría de las aplicaciones manuales y para la mayoría que implican un pipeteado automático, independientemente del tamaño de la muestra. Por lo tanto, por ejemplo, para muestras que tienen volúmenes de 0,5 microlitros a 3 microlitros, el volumen de las partículas compactadas es de 2-3 μ l. Por ejemplo, para Chlamydia, el tamaño de la muestra es normalmente 1 ml, y es suficiente 0,5 mg de partículas. Para otras aplicaciones, se puede extraer también ADN de una muestra de 2 ml con 0,5 mg de partículas o, en algunos

casos, se pueden usar perlas de 1 mg. Para muestras más pequeñas, como por ejemplo las que tienen un volumen de 50 µl, suele ser todavía lo normal utilizar partículas de 0,5 mg.

Para agitar la solución en varias etapas durante el proceso manual, se puede pipetear la solución arriba y abajo varias veces, por ejemplo 10 veces, 15 veces o 20 veces. Dicho procedimiento es aceptable durante la etapa de liberación, así como las etapas de lavado. La agitación con vórtice también funciona para estas etapas. Sin embargo, para los procesos automáticos, es imposible tolerar ninguna etapa de mezclado, el número de operaciones de mezclado se mantiene en el mínimo ya que posiblemente fuera la causa de que parte del PAMAM(0) se saliera e inhibiera la PCR en dirección 3'.

El proceso descrito en el presente documento representa una limpieza enormemente eficaz de una muestra en la preparación de PCR y proporciona la capacidad de detectar tan solo 25 copias de ARN o ADN desde 1 mililitro de muestra clínica. EL ARN o ADN está presente en un alto nivel de concentración ya que el volumen de elución puede ser de tan solo 3 microlitros. Asimismo hay un reducido líquido de muestra residual y/o volumen de lavado en las microesferas concentradas, minimizando la dilución de la muestra o el tampón de lavado, además de minimizar la inhibición de la muestra residual.

El intervalo de tiempo entre la introducción de la muestra que contiene el polinucleótido en tubo de procesamiento 101 y la liberación del ARN o ADN en el líquido de liberación está comprendido normalmente entre 10 y 30 minutos, y es normalmente aproximadamente 15 - 20 minutos o puede ser 15 minutos o menos (por ejemplo, aproximadamente 10 minutos o menos, aproximadamente 5 minutos o menos). Estos períodos de tiempo incluyen el período de lisis (que duplica el período de unión a muestra) y son enormemente rápidos. Para liberar ARN y ADN, por separado, de una sola muestra, tan solo es necesario añadir un procedimiento de liberación adicional como en 140 en la FIG. 1.

Opcionalmente, en 160 en la FIG. 1, el ARN o ADN liberado en la solución se puede neutralizar poniéndolos en contacto con una solución de neutralización 265 (por ejemplo, un volumen igual de 25 - 50 mM tampón Tris-HCl pH 8,0). Por ejemplo, se puede liberar ARN o ADN en solución en la punta de la pipeta 153 en una segunda cámara de proceso, o vaso, 161, como por ejemplo un tubo de PCR de laboratorio normal, en el que está presente la solución de neutralización. El tubo de PCR se puede retirar e introducir en la máquina de PCR para posterior análisis. Normalmente, las soluciones para extraer ARN están lo suficientemente próximas a la neutralidad como para no requerir una etapa de neutralización por separado.

El ARN o ADN en la solución en el vaso 161 está en un estado que se puede amplificar, por ejemplo por PCR, y detectar. Asimismo, las etapas de proceso anteriores son enormemente seguras y sólidas y permiten ensayos cuantitativos del ARN o ADN extraídos sobre diluciones 7 log (10 - 10⁷ copias de ARN o ADN diana/ml de muestra).

Se ha demostrado la eficacia del proceso de la FIG. 1 en los formatos manuales y automáticos.

El proceso presentado en la FIG. 1 puede llevarse a cabo en combinación con un soporte de reactivo, en el cual se puede situar una cámara de proceso y en la que se encuentran las cantidades apropiadas de micropartículas, solución de lisis, solución de lavado, solución de liberación y solución de neutralización, estando cada uno de los mismos accesibles para una o más puntas de pipetas y para su uso tal como se muestra en la FIG. 1. Un ejemplo de soporte de reactivo se describe en la Solicitud de patente provisional de Estados Unidos No. 60/959,437, registrada el 13 de julio de 2007.

Cuando se muestra un imán en la FIG. 1 para su uso en la compactación de micropartículas magnéticas, se puede utilizar un separador magnético, tal como se describe en la Solicitud de patente provisional de Estados Unidos No. 60/959,437, registrada el 13 de julio de 2007.

Cuando se muestra en la FIG. 1 la posibilidad de aplicar calor a la cámara de proceso 101, se puede utilizar un conjunto de calentador, tal como se describe en la Solicitud de patente provisional de Estados Unidos No. 60/959,437, registrada el 13 de julio de 2007.

El proceso presentado en FIG. 1 se utiliza óptimamente para preparar ARN o ADN altamente puros y concentrados para su uso en reacciones de PCR de bajo volumen (por ejemplo, 4 µl), como puedan ser las que se llevan a cabo en un cartucho microfluídico, por ejemplo, un cartucho microfluídico descrito en la Solicitud de patente provisional de Estados Unidos No. 60/959,437, registrada el 13 de julio de 2007.

La FIG. 2 presenta de una manera esquemática un proceso de preparación de muestra a nivel molecular. En 210, se muestra una partícula magnética típica 201, que tiene un diámetro de 1 µm. Están fijadas a la superficie de la partícula 201 moléculas 205 que tienen una afinidad de unión con los polinucleótidos de la solución que rodea a la partícula. La fijación de las moléculas 205 tiene lugar normalmente a través de uniones covalentes. Dichas moléculas se describen con mayor detalle en el presente documento y en ciertas realizaciones son moléculas de PAMAM (Generación 0). De 210 a 220, se incubaba la partícula magnética en una solución que contiene ARN y/o ADN, a un pH de 4 - 8, por debajo del pKa de las moléculas 205. En 220, se muestra una partícula 201 que tiene moléculas de polinucleótido (es decir

ADN y/o ARN) 221 fijadas a las moléculas de afinidad 205. También se muestran otros sustratos unidos no específicamente 213, representados por pequeños óvalos, formas cilíndricas y líneas curvas.

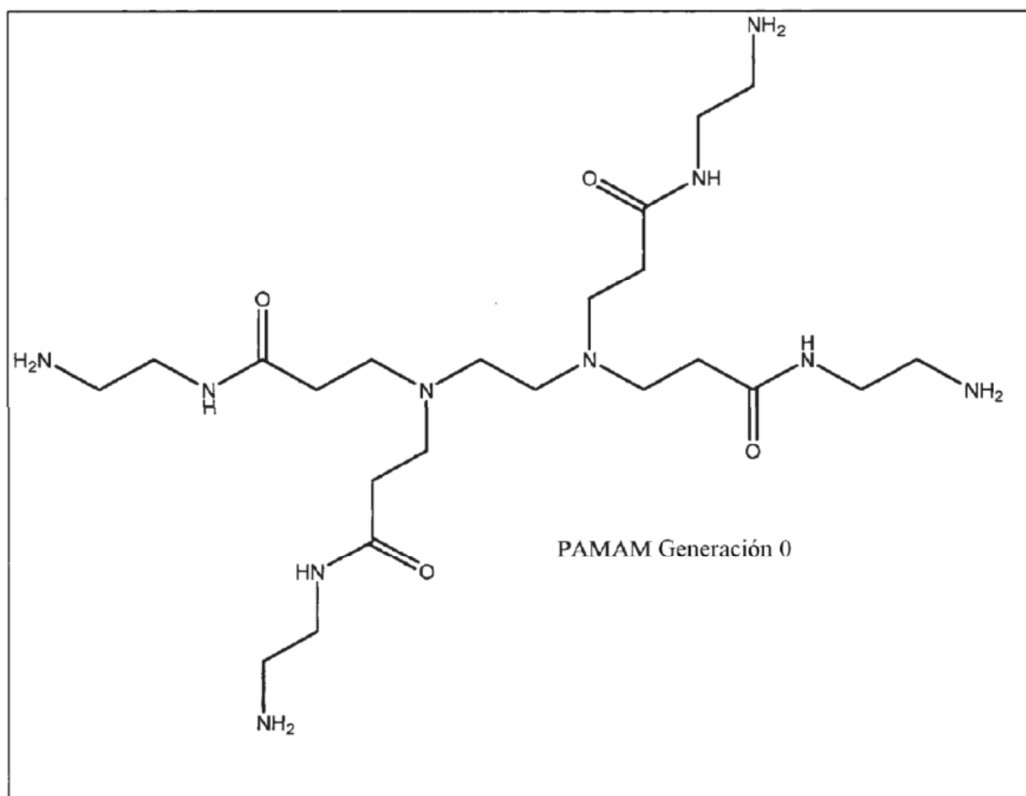
Pasando de 220 a 230 en la FIG. 2, se lavan las partículas 201, a las que se unen tanto las moléculas de ARN y/o ADN 211, como las moléculas no unidas específicamente 213, para eliminar los sustratos no específicamente unidos, dejando una partícula revestida en moléculas de afinidad 205 y ARN y/o moléculas de ADN 211 unidas. De 230 a 240, las moléculas de ARN y/o ADN 211 se liberan de la superficie de la partícula aumentando el pH de la solución que rodea la partícula a un pH de ~9 (ARN) y, posteriormente a un pH de 12 -13 (para liberar ADN). Las moléculas ARN y/o ADN liberadas pueden recogerse por separado en formato listo para PCR.

Si bien las muestras y las distintas soluciones se han descrito en el presente documento como volúmenes a escala de microlitros, se pueden emplear otros volúmenes. Por ejemplo, los tubos de procesamiento con superficies (por ejemplo partículas) configuradas para retener preferentemente ARN y/o ADN en contraposición a los inhibidores pueden tener volúmenes más grandes (por ejemplo muchas decenas de microlitros o más, al menos aproximadamente 1 mililitro o más). En algunas realizaciones, el tubo de procesamiento tiene una escala experimental y se ajustan correspondientemente a mayor escala otras soluciones.

Material de captura de polinucleótido

Las moléculas de afinidad de polinucleótido adecuadas son aquellas que ofrecen una muy alta densidad de cargas ionizables positivamente a un pH bajo, y permiten una fuerte atracción y unión de polinucleótidos, incluyendo ARN y ADN desde un lisado clínico, en unos minutos.

Una realización de los materiales del presente documento utiliza: Poliamidoamina (PAMAM) Generación 0, distribuida por la empresa Sigma-Aldrich Chemical Company ("Sigma-Aldrich"), número de producto 412368. Se hace referencia a este material en adelante como "PAMAM (Generación 0)" o "PAMAM (0)" o "PAMAM(G0)", es un dendrímero cuyas moléculas tienen la siguiente estructura.



El núcleo de la molécula es una etilendiamina sustituida dos veces en ambos átomos de nitrógeno con un grupo acetilo. Cada grupo acetilo reacciona con los monómeros de etilendiamina para producir grupos amida sustituidos con amino.

La forma PAMAM(0) adecuada para su uso en el presente documento no está limitada al producto distribuido por Sigma-Aldrich, sin embargo, como PAMAM(0) es dendrímico por naturaleza admite una amplia gama de formas,

- controladas al menos en parte por el grado de dendrimerización permitido durante su síntesis. Por tanto, son adecuadas muchas variantes de PAMAM(0), que tienen diferentes números de unidades sustituyentes, para su uso en el presente documento. En general, existe un intervalo de tamaños de la molécula dendrimerica (o derivado de PAMAM(0)) que es adecuado para la captura de polinucleótidos: los tamaños más reducidos no capturan suficiente ARN o ADN, mientras que los tamaños más grandes retienen el ARN y ADN demasiado fuertemente, y no permiten una fácil liberación. Por otra parte, se pueden utilizar diferentes monómeros de etilendiamina para obtener una variante de PAMAM adecuada para su uso en el presente documento. Dichos monómeros pueden incluir, sin limitación, 1,2-propilendiamina, 1,3-propilendiamina, 1,2-butilendiamina, 1,3-butilendiamina y 1,4-butilendiamina.
- 10 Las moléculas de PAMAM adecuadas para su uso en el presente documento también se pueden caracterizar por el peso molecular. En particular, PAMAM (0) tiene un peso molecular de 516; otras moléculas de PAMAM adecuadas tienen pesos en el intervalo de 500 - 600 Da.
- PAMAM(0) puede funcionar por sí misma como un inhibidor de procesos enzimáticos, como amplificación de ADN y ARN, y por tanto, conviene utilizarlo de tal forma que no resida en la solución junto con el ARN y/o ADN liberados. En los ejemplos más adelante se describen con mayor detalle estos aspectos.

Materiales de soporte

- 20 Durante su uso, PAMAM (0) se une covalentemente a grupos carboxílicos en la superficie de las partículas de unión, como por ejemplo perlas carboxiladas o perlas magnéticas o no magnéticas. En muchas realizaciones, dicho soporte sólido comprende micropartículas como perlas y microesferas. Estos términos, micropartículas, perlas y microesferas, se pueden utilizar indistintamente en el presente documento. Las partículas se forman normalmente de un material con el que se puede asociar fácilmente PAMAM (0). Entre los ejemplos de materiales a partir de los cuales se pueden formar dichas partículas se incluyen materiales poliméricos que se pueden modificar para fijar un ligando.
- 25 Normalmente, dicho soporte sólido en sí puede derivarse para producir grupos funcionales superficiales que reaccionan fácilmente con moléculas de PAMAM (0) para crear un enlace químico entre la superficie y PAMAM (0). Un grupo funcional superficial deseable y que se emplea frecuentemente es el grupo ácido carboxílico (-COOH). Entre los ejemplos de materiales poliméricos que proporcionan o que se pueden modificar para proporcionar grupos carboxílicos y/o grupos amino disponibles para fijar PAMAM(0) se incluyen por ejemplo poliestireno, polímeros de látex (por ejemplo, latex revestido con policarboxilato), poliácridamida, polióxido de etileno y derivados de los mismos. En la patente estadounidense No. 6.235.313 para Mathiowitz et al se describen materiales poliméricos que se pueden utilizar para formar partículas adecuadas. Otros materiales incluyen vidrio, sílice, agarosa, materiales modificados con amino-propil-tri-etoxi-silano (APES).
- 30 Durante el proceso de reacción de la molécula de PAMAM (0) con una partícula carboxilada, como por ejemplo una partícula magnética, se consume uno de los grupos amina del total de grupos amina posibles en la molécula de PAMAM(0), como por ejemplo 6 grupos posibles en el producto antes mencionado de Sigma Aldrich, para reaccionar con el grupo COOH de la superficie de la partícula para formar un enlace carbodiimida (véase, por ejemplo, la solicitud estadounidense No. 11/281,247, página 40). El resto del número total de grupos amina, como por ejemplo 5 grupos en el producto anterior de Sigma Aldrich, está disponible para protonación.

- En algunas realizaciones, un protocolo de síntesis comprende: lavado de una cantidad de microesferas con carbonato y tampón MES; preparación de sulfo-NHS y EDAC; incubación de las microesferas con sulfo-NHS y EDAC durante 30 minutos; lavado de las microesferas con MES y tampón borato; contacto de las microesferas con PAMAM(0) durante 8 -10 horas; y aclarado del PAMAM(0) sin unir de las microesferas. Un ejemplo de protocolos de síntesis para preparar microesferas unidas a PAMAM(0) es el que se da en los Ejemplos, más adelante.

- Existen diversas fuentes de perlas o partículas que pueden utilizarse para unir PAMAM(0) y que se emplean en los procesos descritos en el presente documento, por ejemplo perlas magnéticas modificadas con carboxilo Seradyn Magnetic (Part No. 3008050250, Seradyn), perlas de carboxilo Polysciences BioMag, perlas magnéticas encapsuladas con polímero con un revestimiento de carboxilo Dynal y microesferas modificadas con carboxilato Polybeads distribuidas por Polyscience, catálogo no. 09850.

- 55 La alta densidad de las moléculas de PAMAM(0) sobre las superficies de las perlas permite que se pueda utilizar incluso una cantidad reducida de perlas (0,5 mg) para muestras clínicas de hasta un mililitro y permite incluso la unión de niveles bajos de ARN y ADN. (< 100 copias) en un fondo de miles de millones de copias de otros polinucleótidos.

- En algunas realizaciones, al menos algunas (por ejemplo, todas) partículas son magnéticas. En realizaciones alternativas, unas cuantas partículas (por ejemplo ninguna) son magnéticas. Las partículas magnéticas son ventajosas ya que generalmente no se requiere centrifugación para separarlas de una solución en la que están suspendidas.

- Las partículas tienen normalmente un diámetro promedio de aproximadamente 20 micrómetros o menos (por ejemplo, aproximadamente 15 micrómetros o menos, aproximadamente 10 micrómetros o menos). En algunas realizaciones, las partículas tienen un diámetro promedio de al menos aproximadamente 4 micrómetros (por ejemplo, al menos

aproximadamente 6 micrómetros, al menos aproximadamente 8 micrómetros). Las partículas magnéticas, tal como se utilizan en el presente documento, normalmente tienen un diámetro promedio comprendido entre aproximadamente 0,5 micrómetros y aproximadamente 3 micrómetros. Las partículas que no son magnéticas, tal como se utilizan en el presente documento, normalmente tienen un diámetro promedio comprendido entre aproximadamente 0,5 micrómetros y aproximadamente 10 micrómetros.

La densidad de partícula es normalmente al menos aproximadamente 107 partículas por mililitro (por ejemplo, aproximadamente 108 o aproximadamente 109 partículas por mililitro). Por ejemplo, una región de procesamiento, como la presente en un dispositivo microfluídico configurado para su uso en la preparación de una muestra con un volumen total de aproximadamente 1 microlitro puede incluir aproximadamente 103 perlas.

En algunas realizaciones, al menos algunas (por ejemplo, todas) las partículas son sólidas. En algunas realizaciones, al menos algunas (por ejemplo, todas) las partículas son porosas (por ejemplo, las partículas pueden tener canales que se extienden al menos parcialmente dentro de ellas).

Las micropartículas descritas en el presente documento no solamente son adecuadas para su uso en los tubos de proceso que se manejan a través de operaciones de pipeteado manuales, sino que también se pueden utilizar en dispositivos microfluídicos, como por ejemplo un concentrador de muestra, dando cabida por tanto a que sean aplicables volúmenes de elución incluso submicrométricos para su procesamiento.

Las micropartículas que tienen PAMAM (0) unido son particularmente eficaces para capturar y liberar ARN y también ADN. En algunas realizaciones, la relación entre el peso de ARN capturado por las partículas de unión y las partículas de unión antes del contacto con el ARN, es 5- 20 %. En otras realizaciones, la relación es de 7 -12%. En otras realizaciones más, la relación es aproximadamente 10 %, que corresponde a, por ejemplo, 100 µg de ARN por cada mg de partículas.

Las micropartículas que tienen PAMAM (0) unida a ellas son particularmente efectivas para capturar ARN y/o ADN, de forma coherente a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones, permitiendo así llevar a cabo análisis cuantitativos del ARN y/o ADN. En algunas realizaciones, las partículas de unión capturan 90 % o más del ARN o ADN liberado de las células en una solución en contacto con las partículas de unión, a lo largo de un intervalo de 1 a 107 copias de ARN o ADN diana/mililitro de muestra.

En algunas realizaciones, las partículas de unión liberan 90% o más del ADN unido a las mismas cuando se despliegan ciertas condiciones de liberación.

Kits de preparación de muestras

Se pueden proporcionar al usuario las micropartículas, revestidas con PAMAM (0), en forma sólida, como por ejemplo en forma liofilizada o en solución. Sin embargo, es deseable que el usuario pueda utilizar el reactivo inmediatamente, sea cual sea la forma en que se proporcione y sea cual sea el propósito pretendido, sin ninguna etapa de preparación. Las micropartículas preparadas a partir de los procedimientos descritos en el presente documento se pueden liofilizar a través de los procedimientos conocidos en la técnica y son aplicables a micropartículas de los tamaños y características que se describen en el presente documento.

En cada uno de los kits descritos en el presente documento, no son necesarios reactivos de neutralización en el caso de que los kits se utilicen únicamente para determinar compuestos de ARN. Por tanto, es posible proporcionar reactivos de neutralización, pero son opcionales. Los reactivos de neutralización se despliegan normalmente en los casos en los que los kits se utilizan para determinar ADN o para determinar tanto ARN como ADN.

Dichas micropartículas se pueden proporcionar también en forma de kit, en combinación con otros reactivos que se utilicen, por ejemplo, en la preparación de la muestra. Un ejemplo de kit comprende una serie de tubos cerrados herméticamente, por ejemplo 24, que contienen cada uno tampón de lisis; un tubo que contiene micropartículas liofilizadas que tienen PAMAM(0) unida a ellas; un tubo que contiene reactivos de lavado líquidos, suficientes para analizar el número de muestras; un tubo que contiene reactivos de neutralización líquidos, suficientes para analizar el número de muestras; y un tubo que contiene reactivos de liberación líquidos suficientes para analizar el número de muestras, donde cada componente del kit se almacena en un envase hermético al aire. Otro número de tubos disponibles en el kit puede incluir 12, 25, 30, 36,48, 50, 60, and 100. Otros números más son también permisibles y conformes a la descripción del presente documento.

Asimismo, en otros ejemplos de dicho kit, el tubo que contiene micropartículas liofilizadas puede contener adicionalmente partículas de reactivos seleccionados del grupo que consiste en proteinasa-k; proteínasas-k y mutanolisina; y proteinasa-k, mutanolisina y un ADN de control interno. Las enzimas adicionales se utilizan a menudo en aplicaciones de lisis específicas de célula.

En otros ejemplos, un kit comprende una primera bolsa hermética al aire que encierra una serie de tubos, por ejemplo 24, conteniendo cada tubo micropartículas liofilizadas que tienen PAMAM (0) unida a ellas; una segunda bolsa hermética al aire que encierra una serie de soportes de reactivo, comprendiendo cada soporte: un tubo que contiene reactivos de lisis líquido; un tubo que contiene reactivos de lavado líquido; un tubo que contiene reactivos de neutralización líquidos y un tubo que contiene reactivos de liberación líquidos. Otros números de tubos disponibles en la forma del kit incluyen 12, 25, 30, 36, 48, 50, 60 y 100. Son permisibles y conformes a la descripción del presente documento otros números más.

Asimismo, en otros ejemplos de dicho kit, el tubo que contiene micropartículas liofilizadas puede contener además partículas de reactivos seleccionados del grupo que consiste en proteinasa-k; proteínasas-k y mutanolisina; y proteinasa-k, mutanolisina y un ADN de control interno. Las enzimas adicionales se utilizan a menudo en aplicaciones de lisis específicas de célula.

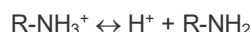
Condiciones de unión a ADN y elución

Un factor que se debe considerar al evaluar la eficacia de un material de captura de ADN es pKa del material. El pKa de un ácido, HA, es una constante de equilibrio para el equilibrio



dado por $pKa = -\log_{10} Ka$, donde $Ka = [H^+][A^-]/[HA]$. Se puede demostrar que, cuando el pH ($= -\log_{10}[H^+]$) de la solución es numéricamente igual al pKa del ácido, el ácido se disocia 50 % en equilibrio. Por lo tanto, saber el pKa de un material da una indicación del pH, por debajo del cual se disocia en gran medida (en forma aniónica) y por encima del cual se ioniza en gran medida.

El pKa de un grupo amino se define por su base conjugada, del siguiente modo: una amina protonada, $R-NH_3^+$ está en equilibrio disociativo:



y su pKa se da por $-\log_{10} Ka$, donde $Ka = [H^+][R-NH_2]/[R-NH_3^+]$.

Dado que un átomo de nitrógeno es trivalente y debido a las condiciones de dendrimerización, cada molécula de PAMAM(0) tiene una mezcla de grupos amina primaria, terciaria. Por lo tanto, las moléculas PAMAM (0) presentan múltiples valores pKa a lo largo de un intervalo de valores aproximadamente en consonancia con el intervalo de pKa cubierto por las aminas alifáticas primarias y terciarias, cuyos pKa se encuentran en el intervalo de 10-11 normalmente, tal como lo prueba por ejemplo, en la Tabla 12.2 de Organic Chemistry, 2a Ed., Allinger, et al., Eds., Worth Publishers, Inc. (1976). Sin embargo, de acuerdo con la información facilitada por el fabricante de PAMAM (0), Dendritech of Midland, Michigan, es probable que de hecho PAMAM tengan pKa en el intervalo de 5,5 (para las aminas terciarias en el interior de la molécula) - 9,5 (para las aminas primarias en la superficie de las moléculas de PAMAM). El artículo Tomalia, et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 29, 138-175 (1990), en la página 163, columna derecha de la publicación, se hace referencia a estos datos.

PAMAM(0) es eficaz como agente de unión para ADN en los procesos descritos en el presente documento al menos en parte porque los grupos amina de PAMAM(0) tienen un pKa comprendido entre 5 - 9. Por tanto, a un pH bajo, normalmente está cargado positivamente - y puede llevar incluso cargas positivas múltiples por molécula que tienen lugar a partir de las protonaciones de los grupos amina a pH más bajos que su pKa - y por tanto es capaz de unirse fuertemente a los polinucleótidos, como ADN y ARN, que normalmente comprenden polianiones (de carga negativa predominantemente) en solución.

Durante el uso de la molécula PAMAM (0) en los procesos descritos en el presente documento, el pH del tampón de unión (normalmente TRIS) utilizado para lisar células en el mismo momento en el que se une el ADN liberado con las partículas, es aproximadamente 7-8. A este pH, todas las aminas (6 grupos posibles por cada molécula PEI, distribuidas por Sigma) permanecen protonadas (con carga positiva) y, por tanto, atraen intensamente las moléculas de ADN cargadas negativamente para su unión hacia las perlas.

Las moléculas PAMAM (0) también son ventajosas porque son resistentes, por ejemplo son inmunes, a la degradación de enzimas líticas, enzimas de proteasa (por ejemplo mezclas de endo- y exo-proteasas, como pronasa que escinden los enlaces péptido), sustancias químicas duras, como detergentes, y calor hasta 95 °C, y como tales son capaces de unirse a ARN y ADN durante el proceso de lisis también. Por lo tanto, la lisis de células y la unión de ARN y/o ADN se pueden combinar en una sola etapa (sincrónica), en virtud de lo cual se ahorra tiempo y al menos una etapa de procesamiento. La unión fuerte de moléculas de ARN y/o ADN a PAMAM (0) permite un rápido lavado de las perlas de afinidad revestidas en PAMAM (0) para retirar los inhibidores de PCR utilizando una solución de lavado. La retirada de ARN y/o ADN desde las perlas de afinidad se lleva a efecto elevando la temperatura en presencia de un reactivo de retirada patentado. Dado que la cantidad de las perlas utilizada es muy reducida, ($< 1 \mu l$), el ARN y/o el ADN se

pueden liberar en un volumen final de tan solo 3 microlitros. El ARN y/o ADN liberado se neutraliza a un volumen final de 5 a 50 microlitros utilizando un reactivo de neutralización y queda listo entonces para PCR en dirección 3'.

- Normalmente, la cantidad de la muestra introducida es aproximadamente 500 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 250 microlitros o menos, aproximadamente 100 microlitros o menos, aproximadamente 50 microlitros o menos, aproximadamente 25 microlitros o menos, aproximadamente 10 microlitros o menos). En algunas realizaciones, la cantidad de la muestra es aproximadamente 2 microlitros o menos (por ejemplo, aproximadamente 0,5 microlitros o menos).
- 10 PAMAM(0) proporciona una recuperación de ARN y ADN excelente, sobre la base en parte de su alta capacidad de unión y su alta eficiencia de liberación. En general, la relación entre la masa de partículas y la masa de ARN o ADN retenida por las partículas no es más de aproximadamente 25 o más (por ejemplo, no más de aproximadamente 20, no más de aproximadamente 10). Por ejemplo, En algunas realizaciones, aproximadamente 1 gramo de partículas retiene aproximadamente 100 miligramos de ARN o ADN; cuando se utiliza en cantidades más reducidas, se pueden
- 15 obtener relaciones similares (por ejemplo, una capacidad de unión de ~100 µg de ARN o ADN /mg perlas).

Otro aparato para captura de ADN

- En otros ejemplos, se puede configurar el soporta sólido como un elemento de retención (por ejemplo, un elemento poroso como pueda ser una columna, un filtro, una membrana porosa, un filtro microporoso o una matriz de ge que tiene múltiples aperturas, como poros y/o canales, a través de los cuales pasa el ARN y/o ADN), a través del cual debe pasar el material de muestra (que contiene ARN y/o ADN). Dicho elemento de retención puede estar formado de múltiples partículas modificadas en su superficie restringidas en una geometría adecuada. En algunos ejemplos, el elemento de retención comprende una o más membranas de filtro disponibles, por ejemplo, de Osmonics, que se
- 20 forman de polímeros que pueden estar modificados en su superficie también y utilizarse para retener ARN y/o ADN. En algunos ejemplos, un elemento de retención está configurado como una pluralidad de superficies (por ejemplo, paredes o tabiques deflectores) a través de los cuales pasa la muestra. Las paredes o tabiques deflectores se modifican para retener ARN y/o ADN, en preferencia, por ejemplo, inhibidores de PCR. Dicho elemento de retención se utiliza normalmente cuando las micropartículas no son magnéticas.
- 30 A medida que se desplaza la solución de muestra través de la región de procesamiento que contiene dicho elemento de retención (adecuadamente modificado para retener preferentemente ARN y/o ADN), se retiene el ARN y/o ADN al mismo tiempo que se retienen menos (no se retienen) el líquido y otros componentes de la solución (por ejemplo, inhibidores) y salen de la región de procesamiento. Normalmente, dicho elemento de retención retiene al menos
- 35 aproximadamente 50 % de las moléculas de ARN y/o ADN (al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %) de las moléculas de ARN y/o ADN presentes en la muestra que entran en la región de procesamiento. La región de procesamiento está normalmente a una temperatura de aproximadamente 50 °C o menos (por ejemplo, 30 °C o menos) durante la introducción de la muestra. El procesamiento puede continuar lavando el elemento de retención con una solución de lavado para separar los
- 40 inhibidores que quedan del ARN y/o ADN retenidos por el elemento de retención.

- En algunas realizaciones, los procesos de preparación de la muestra descritos en el presente documento se realizan dentro de un dispositivo microfluídico, como por ejemplo un cartucho microfluídico configurado para recibir una muestra y capturar moléculas de ARN y/o ADN desde la muestra en un soporte sólida contenido en él. En la solicitud de patente
- 45 de Estados Unidos No. 2006/0166233 y la patente internacional WO2008/061165 se describen ejemplos de cartuchos microfluídicos.

- Dichos cartuchos pueden incluir uno o más accionadores configurados para desplazar las microgotitas de las distintas soluciones líquidas dentro del cartucho, una cámara configurada para lisar las células en la muestra y uno o más
- 50 canales y válvulas asociadas configurados para dirigir, interrumpir o desviar el líquido dentro del cartucho.

- Si bien la preparación de la muestra se ha descrito como una secuencia de operaciones que se llevan a cabo en un solo emplazamiento, como pueda ser un tubo de proceso o un cartucho microfluídico, se pueden emplear otras configuraciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede retirar el elemento de retención que lleva el material
- 55 de afinidad con polinucleótido de una región donde tiene lugar la captura de ADN y/o ARN para un posterior procesamiento en otro lugar. Por ejemplo, el elemento de retención puede ponerse en contacto con una mezcla que comprende ADN y/o ARN e inhibidores en un emplazamiento y después desplazarlo a otro emplazamiento en la que se retiran el ARN y/o el ADN desde el elemento de retención.

- 60 *Otras ventajas del material de captura de ADN descrito en el presente documento*

- Los reactivos de extracción y los procesos de preparación de la muestra descritos en el presente documento ofrecen comportamientos superiores en comparación con los kit disponibles actualmente listos para su uso para la preparación de muestras. Las ventajas de los materiales y procedimientos del presente documento incluyen las siguientes.

65

Un procedimiento de preparación de muestra sencillo que tiene menos etapas (tan solo seis a partir de la muestra en bruto para purificar ARN y/o ADN) y en el que se utilizan menos envases que en otros procedimientos.

Se puede incluir asimismo ADN de control de la extracción (celular, plásmido o desnudo) junto con las perlas de afinidad. Un ADN de control interno puede incluirse con los reactivos de lisis de manera que el ADN de control interno se co-purifique con el otro ADN (por ejemplo el ADN diana) presente en la muestra clínica y que se eluya entre el ADN liberado final. Durante la amplificación del ADN eluido, se amplifica el ADN de control interno y se puede detectar posteriormente utilizando un fluoróforo por separado desde el ADN diana. Esto da una confirmación extra de que el proceso de preparación de la muestra ha funcionado según lo requerido.

La descripción del presente documento ha incluido una caracterización de las propiedades y el uso de micropartículas revestidas en PAMAM (Generación 0). Las personas especializadas en este campo entenderán que se pueden utilizar adecuadamente otras moléculas de afinidad en los procesos descritos en el presente documento, tal como se describen en otros documentos (por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense 20060166233.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Proceso de preparación de muestra

Se pueden realizar las siguientes seis etapas en tan solo 20 minutos para una sola muestra, 30 minutos para un lote de 12 muestras, utilizando un kit de reactivos, tal como se describe en el presente documento. Asimismo, se pueden automatizar fácilmente las etapas en un sistema descrito en la Solicitud de patente provisional de Estados Unidos No. 60/959,437, registrada el 13 de julio de 2007. Las etapas también se muestran esquemáticamente en la FIG. 1, tal como se describe a lo largo del presente documento.

Un ejemplo de proceso es el siguiente:

1. Se mezclan 500 µl de la muestra clínica con 500 µl de tampón de lisis y perlas de afinidad magnéticas, unidas en su superficie con PAMAM (0). Los kits para detectar los virus como eV13 incluyen algunas enzimas líticas disueltas también en tampón de lisis.

2. Se incuba la mezcla de la muestra, el tampón de lisis y las perlas a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y 60 °C durante 5-10 minutos, para lisar las células y unir el ARN y/o ADN a las perlas de afinidad.

3. Se separan las perlas magnéticas y se retira la mayor parte posible de la solución del sobrenadante.

4. Se lavan las perlas con reactivo de lavado.

5. Se liberan el ARN y/o ADN de las perlas por calentamiento de las perlas durante 3 minutos a 85 °C en presencia tan solo 3 microlitros de solución de liberación.

6. Se retira el ARN y/o ADN liberado y se neutraliza la solución con un reactivo de neutralización, como tampón Tris tampón, para crear ARN y/o ADN listo para PCR.

Otro ejemplo de proceso es el siguiente.

- Muestra: Se mezclan 500 µl de plasma con 500 µl tampón de preparación o hisopo de inmersión en 1 ml de tampón de preparación ARN.

- Opcionalmente, se puede prefiltrar la mezcla.

- Se incuba a 60 °C durante 10 min.; se limpia con enzimas proteolíticas si es necesario (solo el hisopo) y se lleva a efecto la captura de ARN y/o DNA con perlas de afinidad (magnéticas) revestidas con PAMAM (G0) tal como se describe con mayor detalle más adelante en el presente documento.

- Opcionalmente, en el caso donde se desea determinar ARN se aplica tratamiento con ADNasa (por ejemplo con 7U ADNasa a 37 grados C durante 10 min.) a la mezcla.

- Se lavan las perlas unidas a ARN con 100 µl de reactivo de lavado (2X) tal como se describe con mayor detalle más adelante.

- Se libera el ARN de las perlas con calor (85 °C; 3 min) en presencia de reactivo de liberación tal como se describe con mayor detalle más adelante, liberando así ARN listo para la RT-PCR.

Ejemplo 2: Aplicación a una amplia variedad de matrices

Los procedimientos descritos en el presente documento funcionan para diversas matrices de muestra, incluyendo tanto muestras clínicas como no clínicas, según la siguiente lista no exhaustiva.

- Hisopo nasal

- LCR

- Hisopo nasal en M4

- Hisopo nasal en UTM

- Plasma

Ejemplo 3: Resultados representativos

- La FIG. 3 presenta el uso de un reactivo de extracción de ARN, PAMAM (0) y un proceso tal como se describe con mayor detalle en el presente documento más adelante, para aislar y purificar ARN de enterovirus 13 (EV13) desde hisopos nasales, utilizando un tampón de lisis tal como se describe a lo largo del presente documento. El gráfico
- 5 presenta las curvas de PCR para varias muestras con adiciones de 2×10^4 , 2000, 200, 50, y 20 copias/1 ml de tampón de preparación de ARN. Se liberó el ARN en 10 μ l, pero se utilizaron solamente 2 μ l del ARN liberado para RT-PCR, que se realizó utilizando el kit de RT-PCR de Qiagen. Las curvas de PCR suben desde el eje en orden de concentración decreciente, de izquierda a derecha.
- 10 La FIG. 4 presenta el uso del reactivo de extracción de ARN, PAMAM (0) y un proceso tal como se describe más adelante en el presente documento, para aislar y purificar ARN de enterovirus (EV13) de hisopos nasales, recogidas en medios M4. El gráfico presenta las curvas de PCR para varias muestras con adiciones de 1000, 100 y 50, copias/1 ml de la muestra. Las curvas de PCR se elevan desde el eje en orden de concentración decreciente, de izquierda a derecha.
- 15 La FIG. 5 muestra una comparación de la extracción de ARN utilizando perlas de PAMAM (0) entre muestras de tampón y plasma. Se utilizaron 500 copias de ARN de EV13 por 1 ml tanto en las muestras de tampón como las de plasma de acuerdo con un proceso, tal como se describe con mayor detalle en el presente documento.
- 20 La FIG. 6 muestra la extracción de ADN, utilizando perlas de PAMAM (0). Se extrajeron 2,5 pg ADN con adiciones en un tampón M4, o un tampón de lisis tal como se describe en el presente documento utilizando el proceso para extraer ARN de un tampón de recogida M4 tal como se describe con mayor detalle en el presente documento.
- La FIG. 7 muestra las curvas de PCR para la extracción de ARN desde una muestra de plasma de 500 μ l que contiene
- 25 200 copias de ARN EV13, utilizando tratamiento con 7U ADNasa.

La FIG. 8 muestra ejemplos de la sensibilidad del proceso. El análisis Probit revela una LoD de 50 copias /200 ml LCR.

Ejemplo 4: Ejemplo de protocolo para la extracción de ARN desde M4, hisopo seco en 1X tampón TCEP, muestras THB

30

Proceso previo de preparación de muestra (solamente requieren filtración las muestras de hisopo)

Etapas	Acción
1	Pipetear 500 μ l de la muestra en un tubo (tubo con tapón a presión 1,7 ml DOT) que contiene 500 μ l de tampón TCEP
2	Pipetear de arriba a abajo 2x, y a continuación pipetear la cantidad entera en la jeringuilla de 3 ml
3	Insertar el émbolo en la jeringuilla y filtrar el contenido en un tubo limpio (tubo con tapón a presión 1,7 ml DOT), aplicando presión hasta que se expulsa el líquido y empieza a salir la espuma del filtro (evitar que la espuma llegue a la muestra).

35 *Extracción de ARN y PCR prep.*

Etapas	Acción
1	Pipetear muestra (500 μ l de muestra, más 500 μ l de tampón TCEP) en un tubo con tapón a presión 1,7 ml DOT que contiene 30 μ l de perlas magnéticas de ARN. Cerrar e invertir el tubo de reacción 5 veces o hasta que se dispersan las perlas (o se disuelven en el caso de perlas liofilizadas).
2	Inmediatamente colocar las muestras en un baño de agua a 60 °C, e incubar durante 10 min (10,5 minutos, máximo).
3	Retirar muestras del baño de agua y secar la parte exterior del tubo con un paño absorbente.
4	Colocar los tubos sobre una rejilla magnética y permitir que tenga lugar la separación durante 1 minuto (1,5 minutos máx).
5	Utilizando una pipeta nueva para cada muestra, aspirar cuidadosamente 1 ml de sobrenadante de cada muestra (sin perturbar las perlas), utilizando una pipeta de 1 ml. Descartar el sobrenadante. Asegurarse de retirar cualquier líquido que quede en el tapón del tubo.
6	Tras la retirada del sobrenadantes inicial de todas las muestras, retirar cualquier líquido que quede utilizando una punta pipeta de 1 ml nueva para cada muestra.
7	Colocar tubos en una rejilla para tubos no magnética y añadir 100 μ l de tampón de lavado (0,1 mM Tris, pH 7,5) a cada tubo utilizando una punta de pipeta de 200 μ l. Pipetear de arriba a abajo 10 veces, o hasta resuspender todas las perlas magnéticas y que no quede pegada ninguna perla en la punta de la pipeta.
8	Colocar los tubos sobre la rejilla magnética durante 30 segundos, dejando que se separen las perlas.

9	Aspirar cuidadosamente el sobrenadante de todas las muestras utilizando una punta de pipeta de 200 µl. Descartar el sobrenadante. Utilizando una punta nueva de 20 µl para cada muestra, aspirar cualquier líquido que quede en la muestra (es decir, líquido que se ha "sedimentado" tras la primera etapa de aspiración) y descartar el líquido.
10	Colocar los tubos en una rejilla de tubos no magnética y añadir 10 µl de Tampón de liberación (20 mM Bis-Tris Propano o 20 mM Tris pH 9). Agitar con vórtice durante 10 segundos o hasta resuspender las perlas.
11	Colocar las muestras en un bloque de calor a 85 °C durante 3 minutos (3,5 minutos máx.).
12	Retirar las muestras del bloque de calor y colocar encima de la rejilla magnética durante 30 segundos (1 minutos máx.).
13	Manteniendo los tubos sobre la rejilla magnética, retirar todo el líquido, evitando cuidadosamente las perlas magnéticas a un lado del tubo y colocar en un tubo 0,65 ml DOT.
14	Mezclar la muestra pipeteando de arriba a abajo una vez. La muestra queda lista ahora para PCR.
15	Preparar la mezcla de PCR utilizando un kit Quantitect con adiciones de cebadores 0,6 uM y extra platinum taq.
16	Añadir 8 µl de la mezcla en instrumentos capilares Rotorgene o LC, añadir 2 µl de ARN.
17	Poner en marcha el programa RT PCR del siguiente modo: 50 grados durante 20 min (etapa a temperatura ambiente), 95 grados durante 5 min (desnaturalización), ciclar a 95-2 s, 58-50 s (50 ciclos)

Ejemplo 5: Protocolo de ejemplo para la extracción de ARN de muestras de plasma

Extracción de ARN y PCR prep.

5

Etapas	Acción
1	Pipetear la muestra (500 µl de muestra, más 500 µl de tampón TCEP, 70 µl 10 % SDS) en un tubo con tapón a presión 1,7 ml DOT que contiene 30 ml de perlas magnéticas de ARN. Cerrar e invertir el tubo de reacción 5 veces o hasta que se dispersan las perlas (o se disuelven en el caso de perlas liofilizadas).
2	Inmediatamente colocar las muestras en un baño de agua a 60 °C, e incubar durante 10 min (10,5 minutos, máximo).
3	Retirar las muestras del baño de agua y secar la parte exterior del tubo con un paño absorbente.
4	Colocar los tubos sobre una rejilla magnética y permitir que tenga lugar la separación durante 1 minuto (1,5 minutos máx.).
5	Utilizando una pipeta nueva para cada muestra, aspirar cuidadosamente 1 ml de sobrenadante de cada muestra (sin perturbar las perlas), utilizando una pipeta 1 ml. Descartar el sobrenadante. Asegurarse de retirar cualquier líquido que quede en el tapón del tubo.
6	Tras la retirada del sobrenadantes inicial de todas las muestras, retirar cualquier líquido que quede utilizando una punta pipeta de 1 ml nueva para cada muestra.
7	Añadir 250 µl de tampón ADNasa con 1 aglomerado de ADNasa o 5 unidades de ADNasa líquida. Resuspender las perlas por agitación con vórtice o pipeteado.
8	Se incuba a 37 durante 10 min.
9	Colocar los tubos sobre una rejilla magnética y permitir la separación para proceder durante 1 minuto (1,5 minutos máx.).
10	Utilizando una pipeta nueva para cada muestra, aspirar cuidadosamente 1 ml de sobrenadante de cada muestra (sin perturbar las perlas), utilizando una pipeta de 1 ml. Descartar el sobrenadante. Asegurarse de retirar cualquier líquido que quede en el tapón del tubo.
11	Colocar tubos en una rejilla para tubos no magnética y añadir 100 µl de tampón de lavado (0,1 mM Tris, pH 7,5) a cada tubo utilizando una punta de pipeta de 200 µl. Pipetear de arriba a abajo 10 veces, o hasta resuspender que todas las perlas magnéticas y que no queda pegada ninguna perla en la punta de la pipeta.
12	Colocar los tubos sobre la rejilla magnética durante 30 segundos, dejando que se separen las perlas.
13	Aspirar cuidadosamente el sobrenadante de todas las muestras utilizando una punta de pipeta de 200 µl. Descartar el sobrenadante. Utilizando una punta nueva de 20 µl para cada muestra, aspirar cualquier líquido que quede en la muestra (es decir, líquido que se ha "sedimentado" tras la primera etapa de aspiración) y descartar el líquido.
14	Colocar los tubos en una rejilla de tubos no magnética y añadir 10 pl de Tampón de liberación (20 mM Bis-Tris Propano o 20 mM Tris pH 9). Agitar con vórtice durante 10 segundos o hasta resuspender las perlas.
15	Colocar las muestras en un bloque de calor a 85 °C durante 3 minutos (3,5 minutos máx.).

16	Retirar las muestras del bloque de calor y colocar encima de la rejilla magnética durante 30 segundos (1 minutos max.).
17	Manteniendo los tubos sobre la rejilla magnética, retirar todo el líquido, evitando cuidadosamente las perlas magnéticas a un lado del tubo y colocar en un tubo 0,65 ml DOT.
18	Mezclar la muestra pipeteando de arriba a abajo una vez. La muestra queda lista ahora para PCR.
19	Preparar la mezcla de PCR utilizando un kit Quantitect con la adición de cebadores 0,6 uM y extra platinum taq.
20	Añadir 8 µl de la mezcla en instrumentos capilares Rotorgene o LC, añadir 2 µl de ARN.
21	Poner en marcha el programa RT PCR del siguiente modo: 50 grados durante 20 min (etapa a temperatura ambiente), 95 grados durante 5 min (desnaturalización), ciclar a 95-2 s, 58-50 s (50 ciclos)

Ejemplo 6: Proceso de ensamblaje para 2X tampón TCEP para extracciones de ARN

El procedimiento en este ejemplo proporciona un método apropiado para preparar 50 ml de 2 x tampón TCEP (20 mM Tris HCl pH 7,0, 2 % Tx-100, 10 mM TCEP) utilizado en extracciones de ARN, tal como se describe en el 10 presente documento con mayor detalle. A continuación, se ofrece una lista de los reactivos utilizados en el proceso.

- 5 Tris HCl pH 7,0, 2 % Tx-100, 10 mM TCEP) utilizado en extracciones de ARN, tal como se describe en el 10 presente documento con mayor detalle. A continuación, se ofrece una lista de los reactivos utilizados en el proceso.
- 1 M Tris-HCl pH 7,0
- 100 % de Tritón X-100 ('Tx-100')
- TCEP (clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina)
- 10 - Agua ultra pura

A continuación, se ofrece una lista del equipo utilizado en el proceso.

- Campana de flujo laminar
- Filtro de pipeta serológica
- 15 - Pipeta serológica
- Agitador tipo vórtice
- Envase de tamaño apropiado
- Cilindro graduado esterilizado nuevo
- Equipo de protección personal apropiado (PPE)
- 20 - Etiqueta de producto

El operador que realice este procedimiento debe saber cómo preparar los tampones y poseer una técnica de pipeteado excelente y deberá ejercer las técnicas de esterilización de laboratorio generales, preparar la solución en una campana de flujo laminar para esterilización y tomar precauciones para no contaminar los reactivos de reserva. En todas las 25 ocasiones, el operador deberá llevar guantes y una bata de laboratorio.

Preparación de 50 ml de 2X Tampón TCEP (20 mM Tris HCl pH 7,0, 2 % Tx-100, 10 mM TCEP)

Etapa	Acción	Para 50 ml
1	Verificar la disponibilidad del reactivo y la caducidad. Realizar también un examen visual de los reactivos de reserva	
2	Fijar la etiqueta de producto en el envase apropiado	
3	Utilizar una pipeta serológica o un cilindro graduado nuevo, dispensar agua ultra pura en el envase	45 ml H ₂ O
4	Usar una pipeta serológica o un cilindro graduado nuevo para dispensar 1M Tris-HCl pH 7,0 en un envase	1 ml Tris-HCl
5	Pesar una cantidad apropiada de TCEP y añadir al envase	143 mg
6	Agitar con vórtice/agitar a fondo para mezclar. No añadir Triton hasta que no se disuelve completamente TCEP	
7	Utilizar una pipeta serológica para añadir Triton X-100 al envase con cuidado para que salga toda la solución de la pipeta.	4 ml
8	Agitar con vórtice/agitar a fondo para mezclar	
9	Almacenar a temperatura ambiente.	

30 Ejemplo 7: Proceso de ejemplo para la preparación de microesferas de afinidad de ARN magnético

Este procedimiento proporciona un método apropiado para un lote de microesferas magnéticas revestidas con PANAM(0), denominadas habitualmente microesferas de afinidad de ARN magnéticas. Un lote consiste en 1 a 10 ml de síntesis con el resultado de 6 ml de microesferas de afinidad de ARN magnéticas. En la FIG. 9 se muestra un 35 gráfico de flujo del proceso. A continuación, se ofrece una lista del equipo utilizado en el proceso.

- Agitador de tipo vórtice
- Microcentrífuga

- Rejilla magnética
- Tubos de microcentrifuga de 1,7 ml
- Recipientes de muestra de 4-oz (0,11 litros)
- Tubos cónicos de 50 ml
- 5 - Tubos cónicos de 15 ml
- Centrífuga
- Medidor de pH
- Pipeteadores
- Puntas de pipeteadores
- 10 - Desmembrador ultrasónico
- Frasco de lavado H2O_d
- Paños de trabajo
- Balanza
- Marcador de laboratorio
- 15 - Guantes y bata
- Agitador orbital
- Cinta de etiquetado
- Filtro de pipeta
- Pipetas serológicas
- 20

- El operador que realice el procedimiento debe ser competente en el uso de la microbalanza, las pipetas, el medidor de pH y el desmembrador ultrasónico y la microcentrifuga y debe saber cómo preparar tampones y poseer una excelente técnica de pipeteado. El operador deberá llevar guantes, bata y gafas protectoras en todas las ocasiones. Durante la etapa de sonicación deberán utilizarse auriculares protectores. Todas las soluciones deberán prepararse en una campana de flujo laminar.

Procedimiento - Preparación de Tampones

Etapas	Acción
1	Verificar la disponibilidad y comprobar las fechas de caducidad de todas las soluciones y reactivos
2	Examinar visualmente todas las soluciones de reserva y reactivos en cuanto a la precipitación o el cambio de color. No utilizar si se ha producido precipitación o cambios de color.
3	Equilibrar todas las soluciones de reserva y reactivos en partes alícuotas a temperatura ambiente. Sacar EDAC y NHS a -20°C y equilibrar a temperatura ambiente antes de su uso; se debe tardar en esta operación aproximadamente una hora.

- 30 Preparación de 70 ml de tampón SN-B (tampón MES 50 mM pH 6,1, Triton X-100 al 0,15%)

Etapas	Acción	Para 70 ml
1	Etiquetar un envase de 4-oz o 500 ml con "Tampón SN-B", la fecha y las iniciales	
2	Usar pipeta serológica para introducir SN-C en frasco	7ml
3	Con P5000, 10 % Triton X-100 en el frasco	420 ul
4	Usar un cilindro graduado para añadir agua ultra pura al frasco	62,5 ml
5	Mezclar bien por inversión	
6	Comprobar el pH de la solución, que deberá estar entre 5,8 - 6,5.	
7	Almacenar a 4 °C durante toda la noche en incubación pero descartar tras completar la fabricación del lote	

Preparación de 50 ml de tampón SN-G (tampón Tris 50 mM pH 7,5, Triton X-100 al 0,1%)

Etapas	Acción	Para 70 ml
1	Etiquetar un tubo cónico de 50 ml con "Tampón SN-G", fecha e iniciales	
2	Usar una pipeta serológica para añadir 1M Tris pH 7,5 al frasco	ml
3	Con un P5000, 10 % Triton X-100 al frasco	200 ul
4	Usar un cilindro graduado para añadir agua ultra pura al frasco	47,3 ml
5	Mezclar bien por inversión	
6	Comprobar el pH de la solución, que deberá ser entre 7,2 - 7,7	
7	Almacenar a temperatura ambiente durante la fabricación del lote fabricación del lote, pero descartar después de que se complete la fabricación del lote	

- 35 Preparación de 10 ml de tampón SN-H (MES 50 mM pH 6,1, sin Triton)

Etapas	Acción	Para 70 ml
1	Etiquetar un tubo cónico de 15 ml con "Tampón SN-H", fecha e iniciales	

2	Usar una pipeta serológica para añadir Tampón C al frasco	1 ml
3	Usar a cilindro graduado para añadir agua ultra pura al frasco	9 ml
4	Mezclar bien por inversión	
5	Comprobar el pH de la solución, que deberá estar comprendido entre 5,8-6,5	
6	Almacenar a temperatura ambiente durante la fabricación del lote pero descartar tras completar la fabricación del lote	

Etapas a realizar en el día 1, que incluyen las siguientes.

Etapas	Acción
1	Calcular la cantidad de microesferas carboxiladas. Dividir 10 ml por % en sólidos para calcular la cantidad de microesferas necesarias para la reacción. 5 reacciones por conjunto. Multiplicar este número por 5 para conseguir la cantidad total de microesferas para el conjunto completo
2	Agitar con vórtice el vial que contiene las microesferas muy bien (durante aproximadamente 1 minuto)
3	Etiquetar tubos cónicos 1 - 50 ml con número de lote, fecha e iniciales
4	Pipetear la cantidad apropiada de microesferas en un tubo cónico de 50 ml
5	Colocar los tubos cónicos en una rejilla magnética y dejar asentar hasta que las perlas son capturadas completamente por el imán. Retirar sobrenadante cuidadosamente

Lavado tampón MES		Para 30 ml
6	Añadir Tampón SN-B a cada tubo y agitar con vórtice para mezclar Colocar los tubos cónicos en una rejilla magnética y dejar reposar hasta que se capturan las perlas completamente con el imán. Retirar el sobrenadante cuidadosamente. repetir el lavado 2 veces más	10 ml
Preparar sulfo-NHS		
7	Pesar una pequeña cantidad de sulfo-NHS balanza para papel y multiplicar el peso (en mg) por 20 para calcular los μ l de agua ultra pura que se deben añadir para obtener una solución de 50 mg/ml. Se necesitan 1,5 ml para 1 reacción (75 mg). Añadir a un tubo de 1,7 ml y mezclar bien. $\text{Pesar (mg)} \times 20 = \mu\text{l agua ultra pura necesaria.}$ Añadir agua ultra pura y agitar con vórtice hasta que se resuspende. Se deberá preparar la solución NHS inmediatamente antes de su uso y descartar al cabo de 15 min	

5

Activación (preparar EDAC en sangre)		
8	Añadir los reactivos en el siguiente orden a cada tubo cónico	Para 30 ml
	(i) ddH ₂ O	5000 μ l
	(ii) tampón SN-C	1000 μ l
	(iii) sulfo-NHS 50 mg/ml	1500 μ l
	Sonicar utilizando un desmembrador ultrasonido a una potencia de 12 durante un período apropiado asegurándose de que la sonda está sumergida en todas las ocasiones. Limpiar la sonda con H ₂ O _d y secar con un trapo antes de la sonicación	10 segundos
9	Inmediatamente preparar 5 mg/ml EDAC en la campana. Se deberá preparar la solución de EDAC inmediatamente antes de su uso, descartar al cabo de 15 min. Pesar una pequeña cantidad de EDAC en papel de peso y multiplicar el peso (en mg) por 200 para calcular los μ l de agua ultra pura necesarios para obtener una solución de 5 mg/ml. Se necesitan 2480 μ l en total (12,4 mg). Preparar en tubos cónicos de 50 ml. $\text{Pesar (mg)} \times 200 = (\mu\text{l}) \text{ agua ultra pura que se debe añadir}$ Agitar con vórtice a fondo después de añadir H ₂ O ultra pura	
10	Añadir los siguientes: (i) 10% Triton X-100 (ii) 5 mg/ml EDAC (añadir solución de EDAC	10 μ l 2480 μ l

	cuidadosamente; gota a gota mientras se agita con vórtice la solución a una velocidad muy baja). (iii) sulfo-NHS 50 mg/ml	1500 ul
Mezclas bien mediante vórtice		
11	Registrar el número de veces que EDAC abrió el frasco. Descartar tras 5 usos.	
12	Asegurar los tubos para el agitador orbital con cinta de etiquetado e incubar a temperatura ambiente en el ajuste 6 (o en un ajuste en el que las microesferas se mezclan bien)	30 min
13	Tras la incubación, centrifugar durante 5 min a una velocidad máxima y a continuación colocar en el imán. Retirar el sobrenadante cuidadosamente pero completamente	5 min

Lavado tampón MES		para 30 ml
14	Añadir tampón SN-B a cada tubo y agitar con vórtice para mezclar. Colocar tubos cónicos en una rejilla magnética y dejar en reposo hasta que las perlas son capturadas totalmente por el imán. Retirar el sobrenadante cuidadosamente. Repetir el lavado 2 veces más.	10 ml

Acoplamiento		
15	Preparar la reacción de acoplamiento:	Para 10 ml
	(i) añadir tampón H	6 ml
	Sonicar utilizando un desmembrador ultrasónico a una potencia de 9 durante un período de tiempo apropiado para asegurar que la sonda se sumerge. Limpiar la sonda con H ₂ O d u secar con un trapo absorbente después de la sonicación	10 s
	(ii) Añadir PAMAM (G0) (añadir solución cuidadosamente gota a gota al mismo tiempo que se agita con vórtice la solución a baja velocidad) (iii) Mezclar con agitación con vórtice	250 ul
16	Asegurar el tubo a un agitador orbital con cinta de etiquetado. Incubar durante toda la noche a un ajuste de 6 a temperatura ambiente (o a un ajuste en el que se mezclan bien las microesferas)	
17	Almacenar los tampones SN-B, H y G a 4 °C durante toda la noche. Retornar las reservas de NHS y eDaC a -20° C. Retornar el tampón SN-C a 4 °C	

Las etapas a realizar en el día 2 incluyen las siguientes

5

Etapas	Acción
18	Después de incubar durante toda la noche, retirar los tampones SN-B y G de 4 °C y equilibrar a temperatura ambiente (aproximadamente 1 h).
19	Centrifugar los tubos durante 5 min a una velocidad máxima y colocar sobre una rejilla magnética. Retirar el sobrenadante cuidadosamente pero completamente

Lavados Tri		Para 30 ml
20	Añadir Tampón SN G a cada tubo y agitar con vórtice para mezclar. Limpiar la sonda con H ₂ O d y secar con un paño absorbente antes y después de la sonicación. Colocar los tubos cónicos sobre una rejilla magnética y dejar asentar hasta que el imán captura completamente las perlas. Retirar sobrenadante cuidadosamente. Repetir el lavado 2 veces más	10 ml

Resuspensión final		
21	Resuspender cada reacción en tampón SN-B por sonicación utilizando un desmembrador ultrasónico a una potencia de 12 durante 10 segundos (asegurar que la sonda está sumergida). Lavar la sonda con H ₂ O d y secar con un paño absorbente antes y después de la sonicación.	6 ml

22	Fijar la etiqueta apropiada en el tubo
23	Descartar todos los tampones. Almacenar el tampón SN-C a 4 °C
24	Almacenar a 4 °C. Es estable durante 1 mes si se almacena apropiadamente

La descripción anterior pretende ilustrar diversos aspectos de la presente tecnología.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para aislar polinucleótidos a partir de una muestra que contiene células, comprendiendo el procedimiento:
- 5 poner en contacto la muestra con una solución de lisis que tiene un primer pH entre 4 y 8 y una pluralidad de partículas de unión recubiertas de PAMAM, de modo que los polinucleótidos se liberan de las células y se unen a PAMAM, creando así partículas de unión unidas con polinucleótidos y una solución que contiene materia celular residual; compactar las partículas de unión; eliminar la solución que contiene materia celular residual;
- 10 lavar las partículas de unión; y liberar los polinucleótidos de las partículas de unión poniendo en contacto las partículas de unión con una solución de liberación, liberando en base a un cambio del primer pH a un segundo pH más básico; en el que la PAMAM tiene un peso molecular entre 500 y 600 Daltons.
- 15 2. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que los polinucleótidos son ADN o ARN, o tanto ARN como ADN.
3. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución de lisis se calienta hasta una temperatura insuficiente para hervir el líquido en presencia de las partículas.
- 20 4. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que poner en contacto la muestra con una solución de lisis que tiene un pH entre 4 y 8 comprende incubar la partícula de unión a un pH menor que el pKa de las moléculas de PAMAM.
5. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que la puesta en contacto, compactación, eliminación, lavado y liberación tienen lugar en un solo recipiente.
- 25 6. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que la solución de liberación tiene un volumen de menos de 3 microlitros.
7. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que los polinucleótidos comprenden moléculas de ARN y la solución de liberación tiene un pH > 9.
- 30 8. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que los polinucleótidos comprenden moléculas de ADN y la solución de liberación tiene un pH > 12.
9. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que los polinucleótidos comprenden una mezcla de moléculas de ADN y
- 35 ARN, y se emplean dos soluciones de liberación sucesivas, en donde una primera solución de liberación tiene un pH en el intervalo de 9 - 12, y la segunda solución de liberación tiene un pH en el intervalo de 12 - 14.
10. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que las moléculas de PAMAM están fabricadas de un núcleo de monómero de etilendiamina o en el que las moléculas de PAMAM están fabricadas de un núcleo de monómero
- 40 seleccionado del grupo que consiste en 1,2-propilendiamina, 1,3-propilendiamina, 1,2-butilendiamina, 1,3-butilendiamina y 1,4-butilendiamina.
11. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que las partículas de unión son perlas carboxiladas o partículas magnéticas.
- 45 12. Procedimiento de la reivindicación 11, en el que un grupo amina del total de posibles grupos amina en una molécula de PAMAM se consume para unirse con el grupo carboxílico de la superficie de la partícula de unión para formar un enlace carbodiimida.
- 50 13. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que las moléculas de PAMAM en las partículas de unión consisten en exactamente cinco grupos amina disponibles para la protonación.
14. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que la unión de las moléculas PAMAM se realiza mediante enlaces covalentes.
- 55 15. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que el lavado de las partículas de unión comprenden lavar las partículas de unión que están unidas a moléculas de ARN y/o ADN y moléculas unidas de forma no específica, y en el que el lavado elimina las moléculas unidas de forma no específica, dejando las partículas de unión recubiertas de PAMAM y moléculas de ARN y/o ADN unidas a las mismas.
- 60 16. Procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además neutralizar los polinucleótidos liberados, produciendo así polinucleótidos listos para PCR.
17. Procedimiento de la reivindicación 1, en el que las moléculas de ARN y/o ADN liberadas se pueden recolectar por
- 65 separado en un formato listo para PCR.

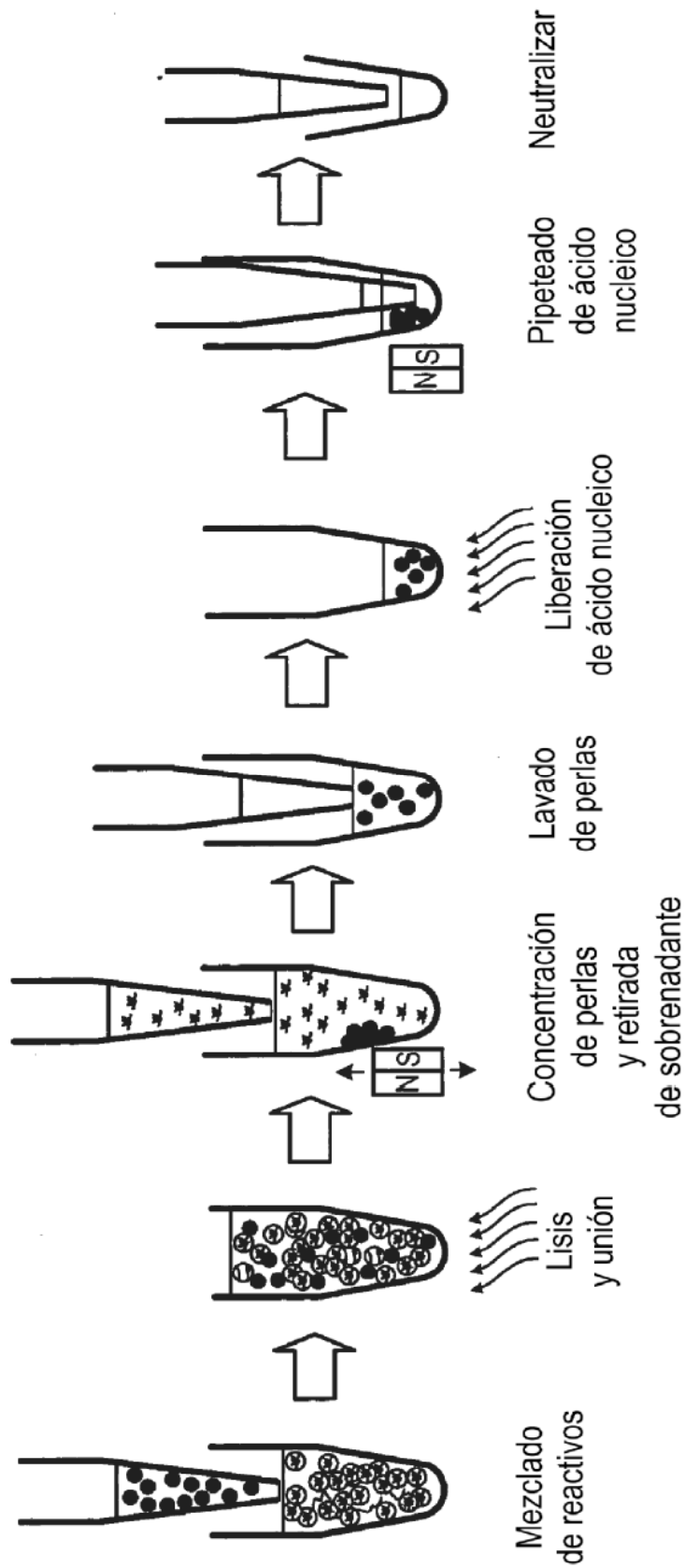


FIG. 1

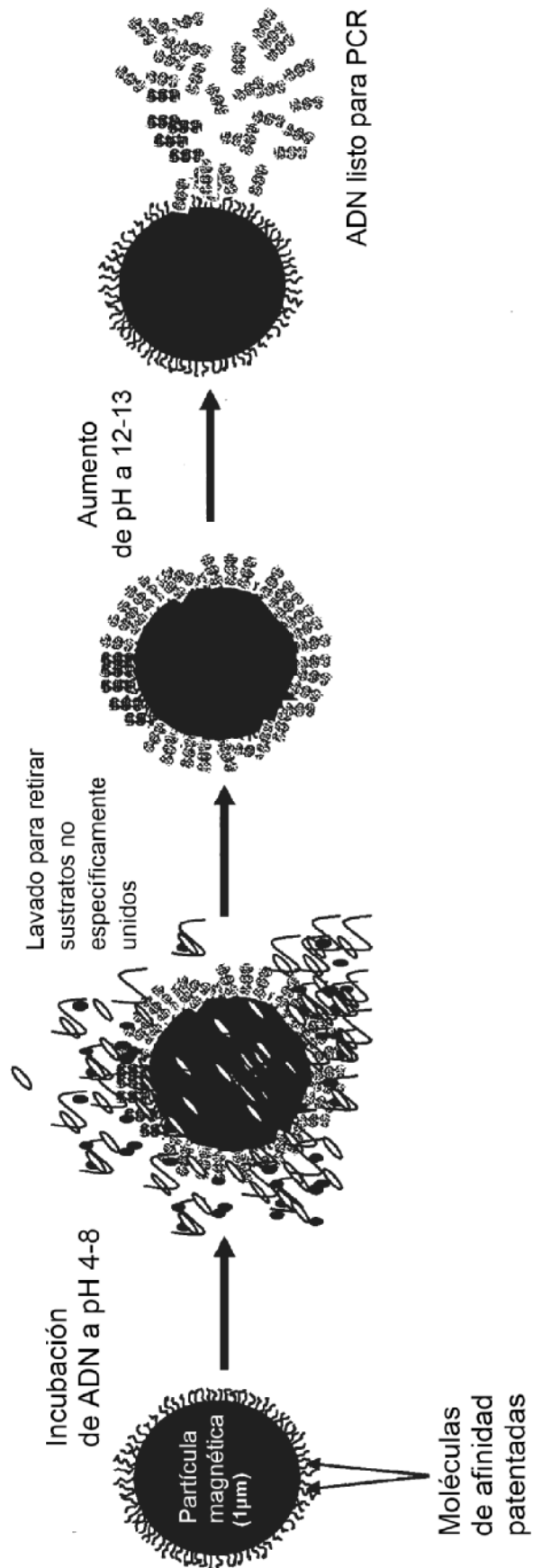


FIG. 2

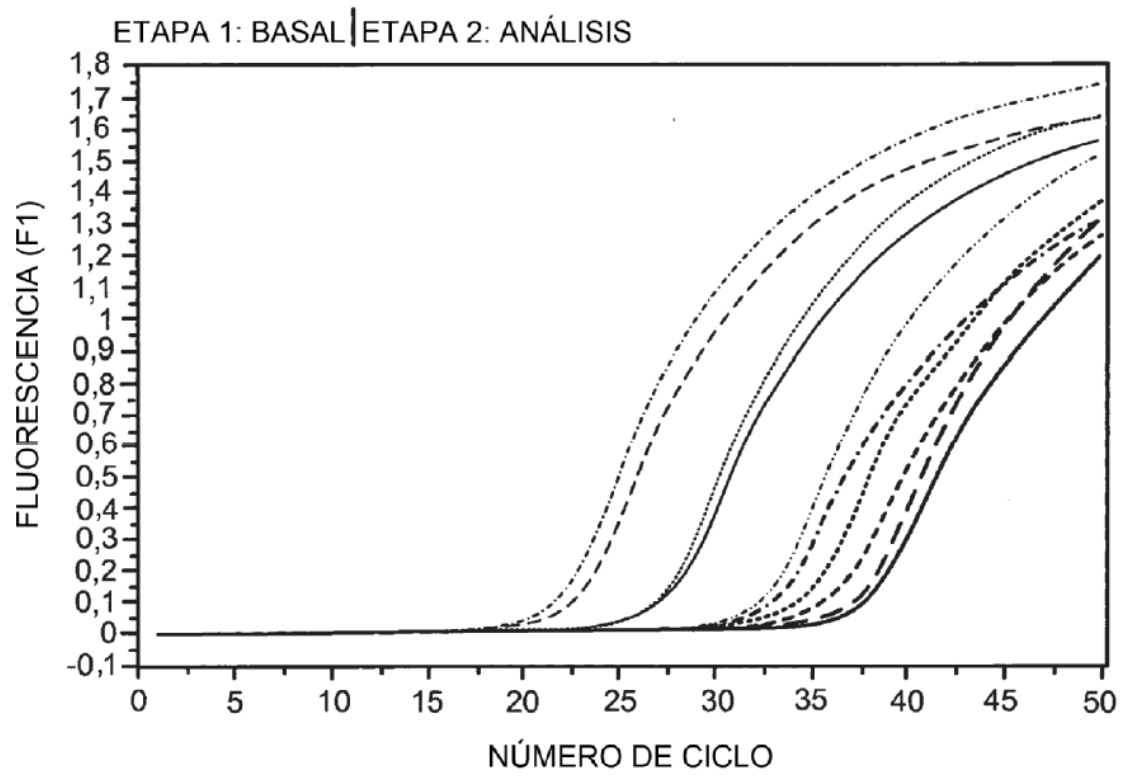
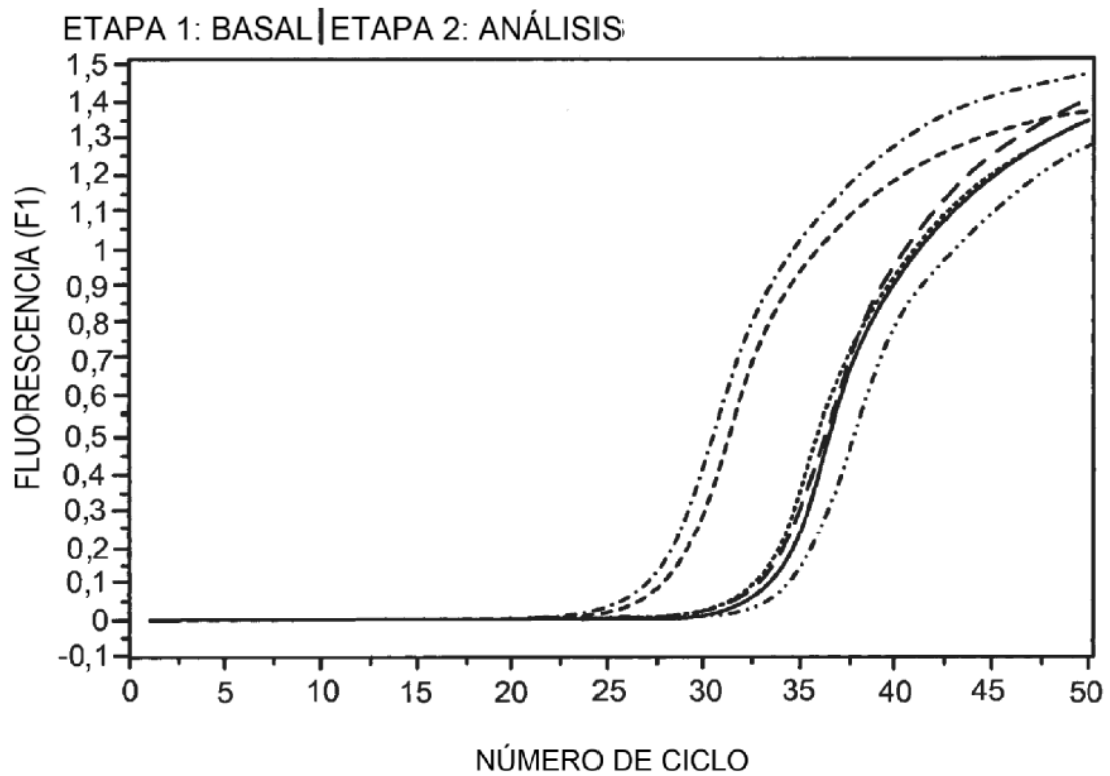
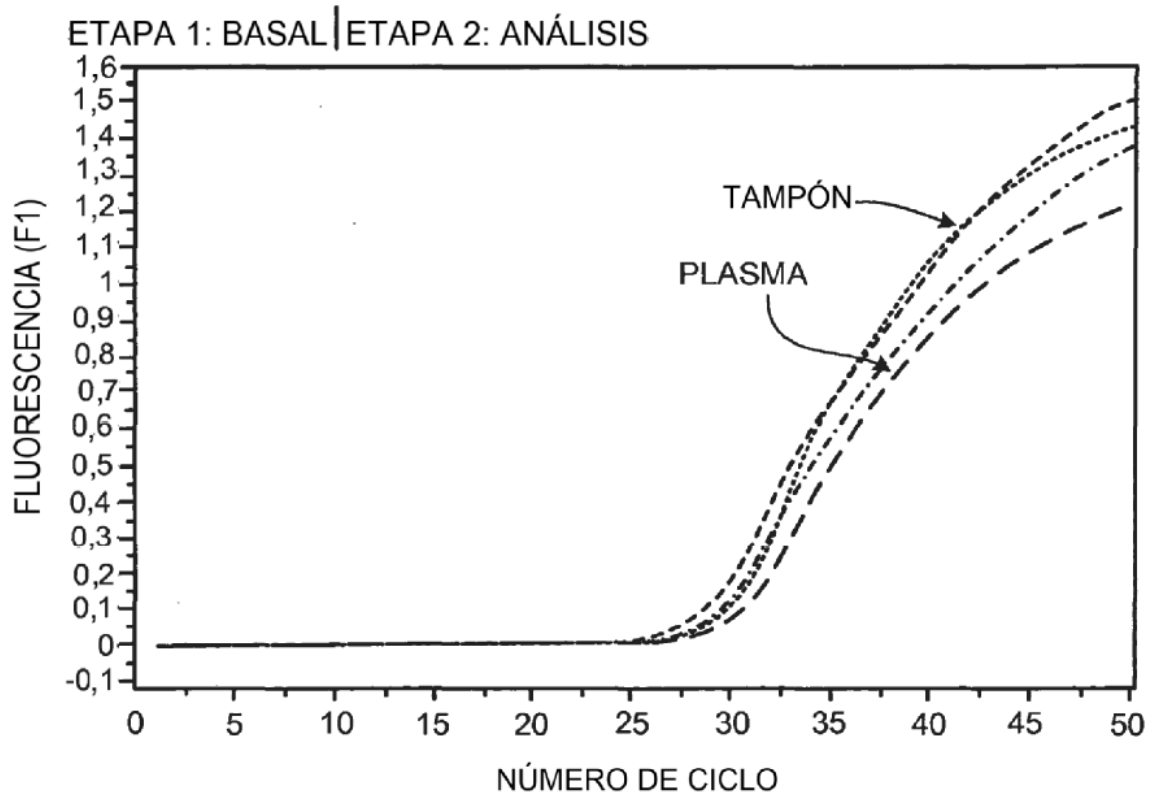


FIG. 3



EXTRACCIÓN DE ARN EV13 EN TORUNDA NASAL RECOGIDA
EN MEDIOS M4; ARN FIJADO EN MUESTRAS DE TORUNDA
NASAL A 1000, 100 Y 50 COPIAS POR 1 ML DE MUESTRA

FIG. 4



COMPARACIÓN DE EXTRACCIÓN DE ARN DESDE MUESTRAS
DE TAMPÓN Y PLASMA; 50 COPIAS
DE ARN EV13 POR 1 ML DE MUESTRA EN PLASMA O TAMPÓN
DE RECOGIDA

FIG. 5

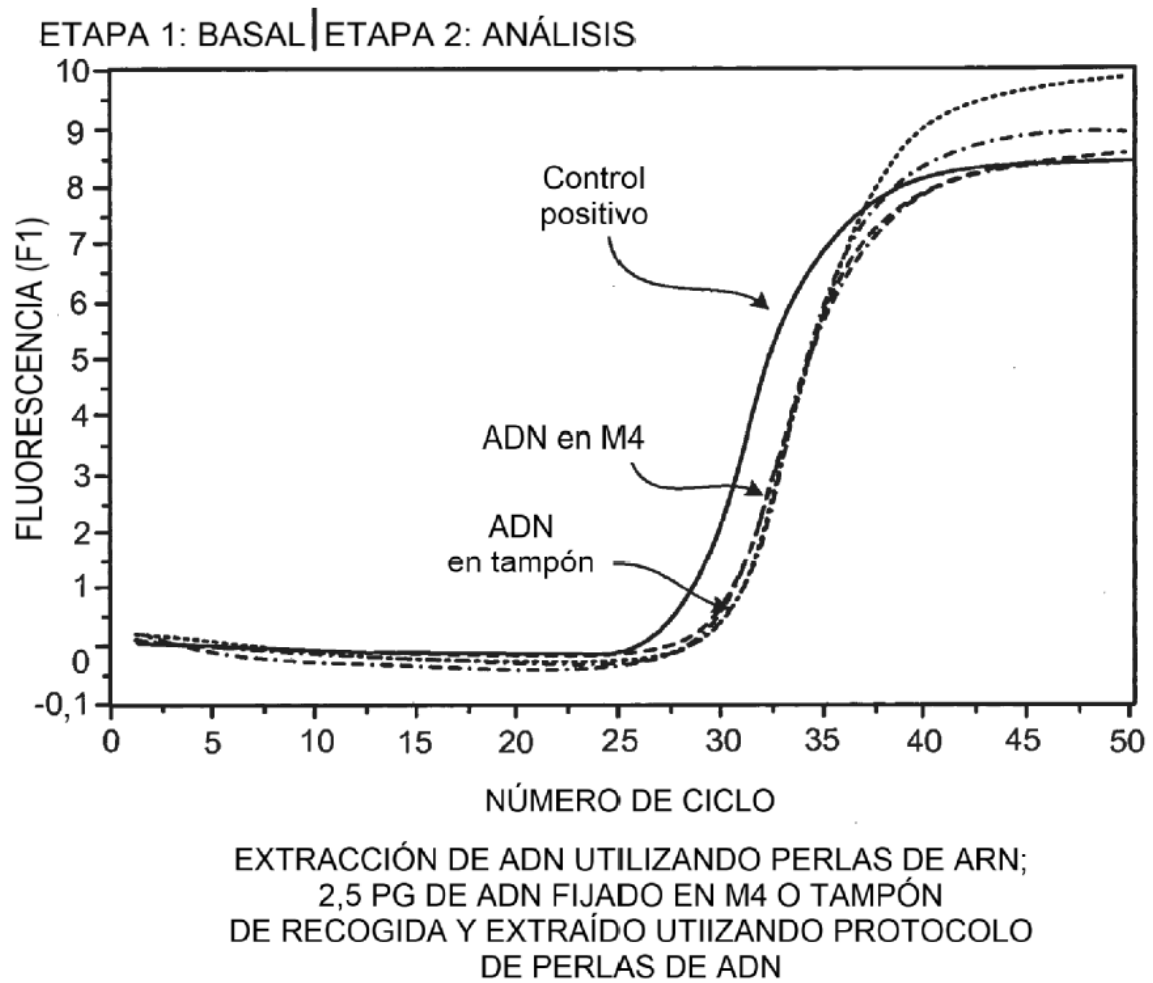


FIG. 6

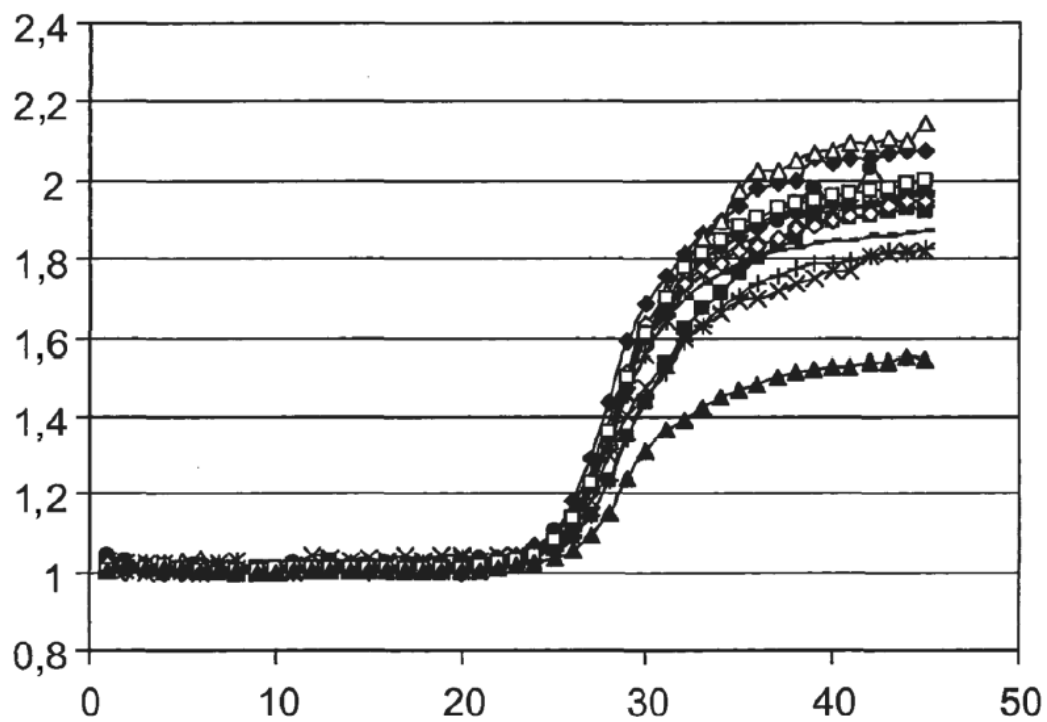


FIG. 7

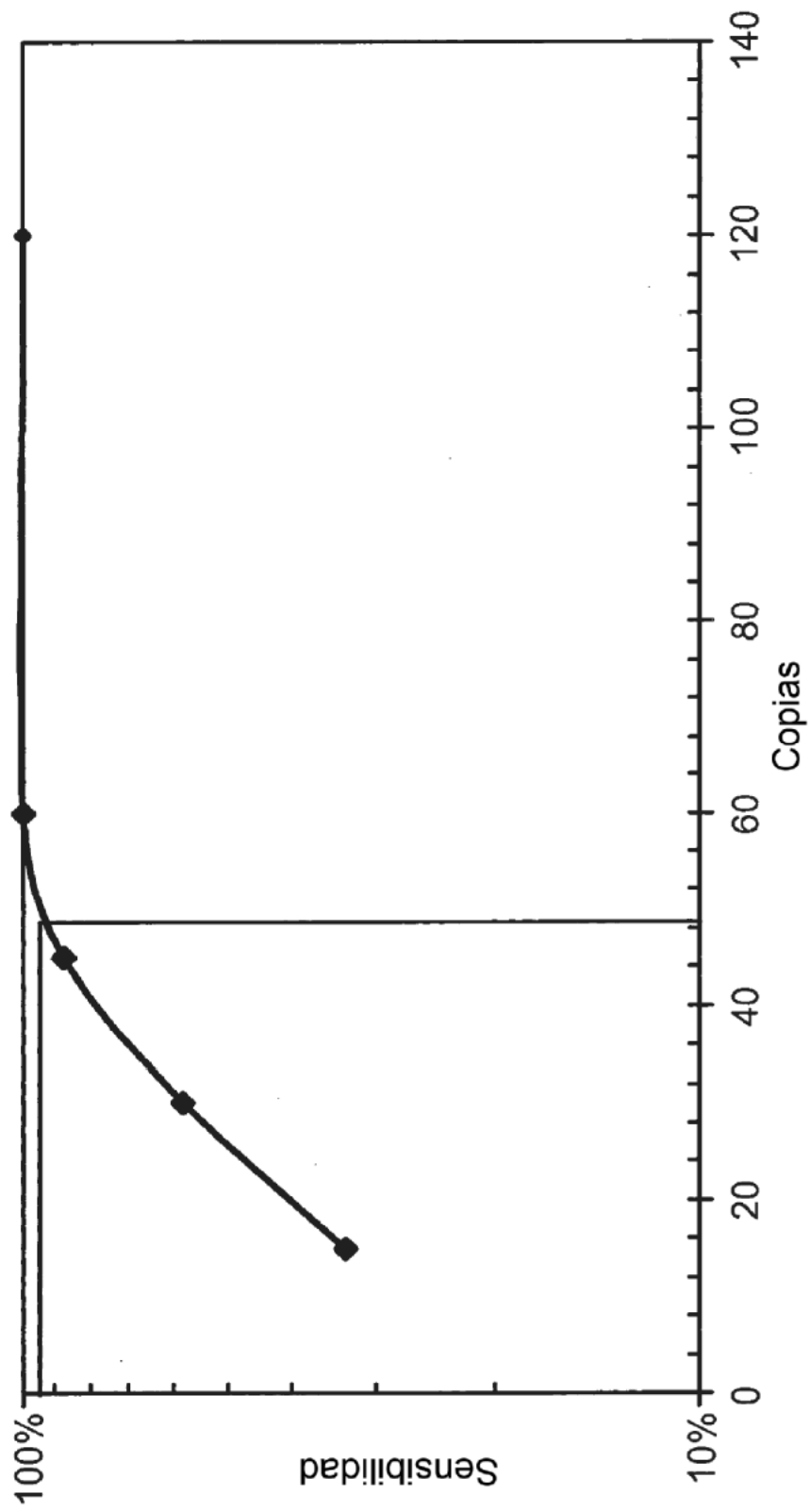


FIG. 8

