

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 859**

51 Int. Cl.:  
**C12N 1/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10173913 .4**
- 96 Fecha de presentación: **24.08.2010**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2302030**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2011**

54 Título: **Reactivos para lisis de células bacterianas**

30 Prioridad:  
**02.09.2009 EP 09011264**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**20.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**20.03.2012**

73 Titular/es:  
**F. Hoffmann-La Roche AG  
Grenzacher Strasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:  
**Birkner, Christian;  
Soukupova, Monika y  
von der Eltz, Herbert**

74 Agente/Representante:  
**Isern Jara, Jorge**

**ES 2 376 859 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

Reactivos para lisis de células bacterianas

- 5 La presente invención se refiere a reactivos y composiciones eficaces para la lisis de células biológicas. Un objetivo específico subyacente en la presente invención es dar a conocer reactivos de lisis capaces de efectuar la lisis de células bacterianas en ausencia de enzimas líticas, tales como (sin que ello sea limitativo), una enzima de degradación de peptidoglicano.
- 10 La invención da a conocer una composición que comprende una fase líquida acuosa, células bacterianas, y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida, caracterizado porque el compuesto iónico es seleccionado entre el grupo que consiste en 1-butil-3-metil-imidazolio-tiocianato, 1-Butil-3-metil-imidazolio-2(2-metoxi-etoxi)etilsulfato (ECO-ENG™41M), 1-Metil-1-[4-(3-Metil-3H-imidazolio-1)-butil-1]-3H-imidazolio-di(tolulilsulfato), y 1-Butil-3-metilimidazolio-octilsulfato. Las composiciones de la invención se utilizan ventajosamente para preparar lisados de células biológicas, particularmente células bacterianas.

**Antecedentes de la invención**

- 20 En el proceso bioquímico de purificación de un analito a partir de un compartimento intracelular, la lisis de células es una de las primeras etapas a llevar a cabo y de mayor importancia. Con respecto a la pureza y rendimiento del analito obtenido finalmente, la forma de llevar a cabo la lisis tiene un impacto significativo sobre estos parámetros. Los métodos del estado de la técnica para llevar a cabo la lisis de células se basan ampliamente en el tratamiento mecánico y/o enzimático del material de muestra. Además, diferentes sustancias químicas son conocidas en el estado de la técnica para la desintegración de estructuras celulares y liberación de analitos. Son ejemplos de ello,
- 25 los agentes caotrópicos y detergentes. En el caso en que uno o varios analitos tengan que ser purificados a partir de células bacterianas, los expertos en la materia están enfrentados a una serie de problemas generados por las características específicas de estas células.

- 30 Las bacterias son un grupo grande de microorganismos unicelulares. De manera típica, las bacterias tienen unas pocas micras de longitud, teniendo una amplia gama de formas comprendida desde esferas a bastones y espirales. Las células bacterianas están rodeadas por una membrana de lípido o membrana celular (a la que también se hace referencia como membrana citoplásmica), que encierra el contenido de la célula y actúa como barrera para retener nutrientes, proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes esenciales del citoplasma que se encuentra dentro de la célula. Dado que son procariontes, las bacterias no tienden a tener orgánulos limitados por membranas en su
- 35 citoplasma y, por lo tanto, contienen pocas estructuras intracelulares grandes.

- En la mayor parte de las bacterias, pero no en todas ellas, una pared celular bacteriana cubre la parte externa de la membrana de la célula. La pared de la célula es una capa resistente, flexible o rígida, que rodea la membrana de la célula. Por lo tanto, está situada por fuera de la membrana de la célula y proporciona a la célula un soporte
- 40 estructural y protección, y actúa también como mecanismo de filtrado. La pared de la célula es esencial para la supervivencia de muchas bacterias. Una función principal de la pared de la célula es la de actuar como recipiente a presión, impidiendo la sobreexpansión cuando entra agua en la célula. Las paredes de las células bacterianas están realizadas a base de peptidoglicano (también conocido como moreina) como componente principal. El peptidoglicano es sintetizado a partir de cadenas de polisacáridos reticuladas por ciertos péptidos que contienen D aminoácidos. Las paredes de células bacterianas son distintas de las paredes de células de plantas y hongos, que están realizadas a base de celulosa y quitina, respectivamente. La pared de las células bacterianas es distinta también de la de las Arqueas, que no contienen peptidoglicano.

- La tinción Gram es un método empírico de diferenciación de especies bacterianas en Gram positivas y Gram
- 50 negativas, basándose en las propiedades químicas y físicas de las paredes de sus células. Si bien la tinción Gram es una herramienta de diagnóstico valiosa, tanto en el campo clínico como en la investigación, no todas las bacterias pueden ser claramente clasificadas por esta técnica, formando, por lo tanto, grupos Gram variable y Gram indeterminante.

- 55 Las bacterias Gram positivas poseen paredes celulares de tipo rejilla gruesa conteniendo muchas capas de peptidoglicano y ácidos teicoicos. Las paredes celulares de las bacterias Gram positivas tienen aspecto púrpura en la tinción Gram. Como contraste, las bacterias Gram negativas tienen una pared celular delgada que consiste solamente de unas pocas capas de peptidoglicano, rodeada por una segunda membrana lipídica que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas. Las paredes celulares de bacterias Gram negativas tienen tinción de color rosa.

- 60 Para purificar un analito a partir de un compartimento intracelular de células bacterianas, se conocen varios métodos para romper las células y liberar sus componentes citoplásmicos.

- Los métodos mecánicos se basan frecuentemente en la utilización de la rotura del material en un molino de bolas por molturación. Al mismo tiempo, se generan fuerzas de cizalladura significativas. Dependiendo del analito a aislar, la cizalladura es una desventaja, por ejemplo, cuando se tienen que purificar ácidos nucleicos.

La homogeneización basada en líquido es la técnica de dislocación de células, más ampliamente utilizada para pequeños volúmenes. Las células son sometidas a lisis al forzar la célula o suspensión de tejidos a través de un espacio estrecho, cizallando de esta manera las paredes de la célula y las membranas. Se conocen tres tipos distintos de homogeneizadores en el estado de la técnica. Un homogeneizador Dounce consiste en un mango redondo de cristal que es impulsado manualmente dentro de un tubo de cristal. Un homogeneizador Potter-Elvehjem consiste en un mango impulsado manualmente o mecánicamente, conformado para acoplarse a un recipiente de forma redonda o cónica. El número de sacudidas y la velocidad a las que éstas son llevadas a cabo, influye en la eficacia de los métodos de homogeneización Dounce y Potter-Elvehjem. No obstante, debido a un funcionamiento básicamente manual, estos homogeneizadores no son adecuados para una elevada manipulación de muestras. Asimismo, resulta difícil el proceso de volúmenes de muestras muy pequeñas.

Una prensa French consiste en un émbolo que es utilizado para aplicar una alta presión a un volumen de muestra, forzándolo a través de un pequeño orificio de la prensa. La prensa French es frecuentemente el método preferido para la rotura mecánica de células bacterianas. No obstante, el dispositivo es caro y tampoco es adecuado para la preparación de muestras con una elevada producción.

La sonicación es otro método de dislocación física, habitualmente utilizada para abrir las células. El método utiliza ondas sonoras de alta frecuencia, pulsadas, para agitar y efectuar la lisis de las bacterias, y en algunos casos, incluso de esporas. Las ondas sonoras son suministradas utilizando un aparato con una sonda vibrante que es sumergida en la suspensión líquida de células. La energía mecánica de la sonda inicia la formación de burbujas de vapor microscópicas que se forman momentáneamente y sufren implosión, provocando ondas de choque que se radian a través de la muestra. Para impedir un calentamiento excesivo, se aplica un tratamiento ultrasónico en muchas ráfagas cortas a una muestra sumergida en un baño de hielo.

De manera alternativa, se puede utilizar el método de congelación/descongelación para la lisis de células bacterianas. La técnica comporta la congelación de una suspensión de células en un baño seco de hielo/etanol o en una nevera, y luego descongelar el material a temperatura ambiente o 37°C. Este método de lisis provoca el hinchamiento de las células y finalmente su rotura, dado que se forman cristales de hielo durante el proceso de congelación, y luego se contraen durante la descongelación. Son necesarios múltiples ciclos para una lisis eficaz, y el proceso puede ser muy largo.

Para hacer el proceso de lisis más eficaz, las células se pueden incubar adicionalmente con lisozima (N acetilmuramida glicanhidrolasa), de manera que las paredes de las células se degradan. La enzima funciona atacando los peptidoglicanos (que se encuentran en las paredes de las células de las bacterias, especialmente de las bacterias Gram positivas) e hidrolizando el enlace glicosídico que conecta el ácido N-acetilmurámico y el cuarto átomo de carbono de la N-acetilglucosamina.

Los detergentes son otros aditivos utilizados en los procesos de lisis de una muestra que contiene células bacterianas. No obstante, un detergente produce frecuentemente espuma que no es deseable en estos procesos. Asimismo, ciertos detergentes desnaturalizan las proteínas. Esto es una desventaja en el caso de que se purifique un analito de proteína. Lo mismo es aplicable a la utilización de agentes caotrópicos como aditivos.

Los métodos del estado de la técnica para la lisis de células bacterianas tienen ciertas desventajas. Por lo tanto, era un objetivo de la invención conseguir métodos alternativos que, como mínimo, superan en parte estas desventajas. Particularmente, era un objetivo de la invención dar a conocer un método para la lisis de células bacterianas Gram positivas y/o Gram negativas. Era otro objetivo de la invención, dar a conocer un método para la lisis de células bacterianas en un volumen pequeño.

En el caso de que el material de la muestra comprenda, no solamente células bacterianas, sino también otros tipos de células, por ejemplo, células de levaduras, es deseable frecuentemente utilizar los métodos de lisis de células que son selectivos para las células objetivo. Por lo tanto, la magnitud de subproductos no deseados liberados de otras células, a parte de las células objetivo, se puede reducir de modo favorable. Otro objetivo de la invención consiste, por lo tanto, en dar a conocer un método para la lisis de células que es específico para células bacterianas, pero no para otras células microbianas, tales como células de hongos o de levaduras.

### **Resumen de la invención**

De acuerdo con la invención, uno o varios de los objetivos antes mencionados, se han cumplido por las realizaciones de la presente invención.

Un primer aspecto de la invención es una composición que comprende una fase acuosa líquida, células bacterianas, y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 560 mM o superior, caracterizado porque el compuesto iónico es seleccionado entre el grupo que consiste en 1-Butil-3-metilimidazolio-tiocianato, 1-Butil-3-metilimidazolio-2-(2-metoxietoxi)etilsulfato (ECOENG™41M), 1-metil-1-[4-(3-metil-3H-imidazolio-1)-butil-1]-3H-imidazolio-di(toluidilsulfato), y 1-butil-3-metilimidazolio-octilsulfato.

Un segundo aspecto de la invención es la utilización de una composición que comprende una fase acuosa líquida y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 560mM o superior, para destruir la pared de la célula de una célula bacteriana, de manera que el compuesto iónico es seleccionado entre el grupo que comprende 1-butil-3-metil-imidazolio-tiocianato, 1-butil-3-metil-imidazolio-2(2-metoxi-etoxi) etilsulfato (ECOENG™41M), 1-metil-1-[4-(3-metil-3H-imidazolio-1)-butil-1]-3H-imidazolio-di(toluisulfato), y 1-Butil-3-metil-imidazolio-octilsulfato.

Un tercer aspecto de la invención es un método para la producción de un lisado de células bacterianas, cuyo método comprende (a) el contacto de las células bacterianas con una composición que comprende una fase acuosa líquida y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida con una concentración aproximada de 560 mM o superior, de manera que el compuesto iónico es seleccionado entre el grupo que consiste en 1-Butil-3-metil-imidazolio-tiocianato, 1-Butil-3-metil-imidazolio-2(2-metoxietoxi) etilsulfato (ECO-ENG™41M), 1-Metil-1-[4-(3-Metil-3H-imidazolio-1)-butil-1]-3H-imidazolio-di(toluisulfato), y 1-Butil-3-metil-imidazolio-octilsulfato, y (b) incubar las células bacterianas con la fase líquida, produciendo de esta manera un lisado de las células bacterianas.

Un cuarto aspecto de la presente invención es una composición que comprende una fase acuosa líquida, células bacterianas Gram negativas y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida con una concentración aproximada de 370 mM o superior, caracterizada porque el compuesto iónico es 1-Butil-3-metil-imidazolio- octilsulfato.

Un quinto aspecto de la invención es la utilización de una composición, de acuerdo con la invención, para la destrucción de la pared celular de células bacterianas Gram negativas.

Un sexto aspecto de la invención es un método para la producción de un lisado de células bacterianas Gram negativas, cuyo método comprende (a) contacto de las células bacterianas con una composición que comprende una fase acuosa líquida y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 370 mM o superior, de manera que el compuesto iónico es 1-Butil-3-metil-imidazolio- octilsulfato; y (b) incubar las células bacterianas con la fase líquida, produciendo de esta manera un lisado de las células bacterianas Gram negativas.

Un séptimo aspecto de la invención consiste en un método de purificación de un ácido nucleico a partir de una célula que comprende las etapas de (a) destruir la pared celular de la célula, si existe pared celular; (b) establecer contacto e incubar la célula con una solución ácida acuosa de 1-Butil-3-metil-imidazolio-tiocianato a una concentración de 1,5 M o superior, formando un lisado; (c) establecer contacto del lisado con una fase sólida que comprende una superficie de sílice, de manera que el ácido nucleico es adsorbido a la superficie; (d) separar la fase sólida de la fase líquida y, opcionalmente, lavar la fase sólida, de manera que el ácido nucleico sigue adsorbido en la misma; y (e) eluir el ácido nucleico de la fase sólida, purificando de esa manera el ácido nucleico.

#### **Descripción detallada de la invención**

Ciertos términos son utilizados con un significado específico o son definidos por primera vez en esta descripción de la presente invención. Para los efectos de la presente invención, los términos utilizados son definidos por sus definiciones aceptables en la técnica, cuando éstas existen, excepto cuando estas definiciones entran en conflicto, o parcialmente en conflicto, con las definiciones indicadas más adelante. En el caso de conflicto en una definición, el significado de un término se define, en primer lugar, por cualquiera de las definiciones indicadas a continuación.

El término “que comprende” es utilizado en la descripción de la invención y en las reivindicaciones con el significado de “incluye pero no necesariamente de forma limitativa”.

Los artículos “un” y “uno” se utilizan en esta descripción para hacer referencia a uno o más de uno de los objetos gramaticales del artículo (es decir, como mínimo, uno). A título de ejemplo, “un catión” significa un catión o más de un catión.

Cuando se designe un rango de valores numéricos, tales como un rango de concentración, el rango puede quedar indicado por la palabra “entre” seguida de un primer valor  $n_1$ , la palabra “y”, y el segundo valor  $n_2$ . Además, el rango designado puede ser indicado por la expresión “en el rango de  $n_1$  a  $n_2$ ”. Si no se indica de otro modo, cuando se indica un rango designado, el límite inferior del rango designado se comprende que es un valor igual al primer valor, o superior al mismo. El límite superior del rango designado se comprende que es, o bien el valor igual al segundo valor, o menor que el segundo valor. De este modo, un valor  $x$  en el rango designado se indica por  $n_1 \leq x \leq n_2$ .

Además, se comprende que el término “aproximadamente”, en combinación con un valor numérico  $n$  indica un valor  $x$  en el intervalo indicado por el valor numérico  $\pm 5\%$  del valor, es decir,  $n - 0,05 * 0,05 * n$ . En el caso en que el término “aproximadamente”, en combinación con un valor numérico  $n$ , describe una realización preferente de la invención, el valor de  $n$  es el más preferente, si no se dice de otro modo.

La invención comprende procesos para el lisado de células, es decir, la formación de un lisado a partir de las mismas. Un "lisado" o una "muestra lisada" puede ser obtenida a partir de una muestra compleja y/o material biológico de muestra que comprende células, preferentemente, células microbianas, y de manera mucho más preferente, células bacterianas, de manera que la integridad estructural de una parte sustancial de las células presentes es dislocada. Con este objetivo, la pared celular, en caso de que exista, tiene que ser destruida. Para liberar el contenido de las células bacterianas dislocadas, el material es tratado con ciertos productos químicos para desintegrar, hacer porosa, disolver, degradar, o desnaturalizar las paredes celulares de las células microbianas. Además, las membranas celulares tienen que ser destruidas. No obstante, después de la eliminación de la pared celular, las células bacterianas son muy inestables, debido típicamente a la falta de función de recipiente a presión y del influjo del agua desde el exterior a través de la membrana celular. Las células que tienen sus paredes celulares eliminadas se rompen, por lo tanto, rápidamente, se liberan componentes citoplásmicos. Estos procedimientos se comprenden dentro del término "lisis".

En el caso de que permanezca materia en partículas, es decir, materia no disuelta del material de la muestra, después del proceso de lisis, la materia en partículas es habitualmente separada del lisado, dando como resultado un lisado transparente. Esto se puede conseguir, por ejemplo, por filtrado o por centrifugación. En este caso, el lisado transparente es procesado adicionalmente, por ejemplo, por purificación de un analito bacteriano (por ejemplo, un ácido nucleico) del lisado. En el contexto de la presente invención, el término "lisado" comprende un lisado transparente.

Un analito preferente a purificar, desde los lisados, según la invención, es un ácido nucleico. El término "ácido nucleico" utilizado en la presente solicitud de patente, indica ADN y ARN, y mezclas de los mismos.

A efectos de purificar ácidos nucleicos a partir de un lisado, el estado de la técnica da a conocer métodos que hacen uso de una agente caotrópico, tal como una sal de guanidina y/o un detergente aniónico, catiónico, zwitteriónico, o no iónico cuando se liberan ácidos nucleicos en el proceso de lisis. En algunos casos, se considera una ventaja utilizar adicionalmente una proteasa que degrada rápidamente enzimas con actividad nucleolítica y otras proteínas no deseadas.

Otro analito preferente a purificar a partir de los lisados, según la invención, es seleccionado del grupo que consiste en una proteína bacteriana, una proteína expresada de forma recombinante, un lípido, un compuesto orgánico con un bajo peso molecular comprendido entre 50 Da (Daltons) y, aproximadamente, 20.000 Da, siendo dicho compuesto orgánico de origen bacteriano, y un compuesto citoplásmico inorgánico.

El término "adsorción"/"absorbente" significa, en general, la adherencia o acoplamiento de moléculas o iones, el "soluto" disuelto en una fase líquida, a una superficie o a una interfaz de una fase sólida. Es un proceso superficial, de manera que las moléculas que se acumulan no penetran realmente en la sustancia en la que son adsorbidas. El término "adsorción" no se debe confundir, por lo tanto, con absorción, que significa el llenado de poros en una fase sólida. La adsorción aumenta la concentración del soluto en las proximidades de la superficie de la fase sólida, con respecto a la concentración en el volumen de la fase líquida, debido a la interacción atractiva entre la fase sólida sumergida en el líquido con el soluto. La unión a la superficie es usualmente débil y reversible. La materia adsorbida en la superficie de la fase sólida puede ser "eluida" de la misma por alteración o intercambio de la fase líquida, en la que está sumergida la fase sólida. Las condiciones se pueden cambiar para desadsorber las moléculas con respecto a la fase sólida. Este proceso también se designa como "elución" de las moléculas a partir de la fase sólida.

El término "fase sólida" a la que se adsorbe un ácido nucleico se entiende como sustrato que es insoluble en las composiciones líquidas, según la invención. Una fase sólida preferente es un sustrato con una superficie capaz de interaccionar con los grupos fosfato del armazón de los ácidos nucleicos. La fase sólida puede adoptar la forma de partículas porosas o no porosas, partículas en polvo o fibras. Una fase sólida que consiste en un material de tipo fibroso que comprende una serie de fibras no tejidas, queda también comprendido en la invención. Son fases sólidas preferentes sustratos porosos y/o no porosos, minerales, tales como sílice u otros materiales con superficies de óxidos (incluyendo, sin que sea limitativo, óxido de circonio, óxido de aluminio y otros óxidos metálicos) o mezclas de los mismos. Las fases sólidas preferentes consisten en vidrio, el término "fase sólida" comprende además partículas que pueden ser atraídas fácilmente recubiertas con un material superficial de óxido, sin que sea limitativo, sílice. El término "partícula, que puede ser atraída magnéticamente" indica una partícula con propiedades magnéticas, paramagnéticas o superparamagnéticas. En una realización preferente, la partícula es desplazable magnéticamente pero no retiene magnetización en ausencia de un campo magnético aplicado exteriormente. Además, se comprende que un sustrato en forma de "polvo" o "material pulverulento" se refiere a un material finamente dividido que cuando es dispersado en una composición líquida produce una suspensión. Los términos "material polvo" o "pulverulento" están destinados a comprender tabletas en las que el material de polvo ha sido compactado pero que proporciona todavía una suspensión cuando se combina con una composición líquida. El término "sílice" utilizado en esta solicitud de patentes indica materiales que están constituidos a base de silicio y oxígeno. Estos materiales comprenden sílice, dióxido de silicio, gel de sílice, gel de sílice ahumado, tierra de diatomeas, celita, talco cuarzo, vidrio y partículas de vidrio, incluyendo todas las composiciones distintas, formas

y tamaños de estos materiales. Las partículas de vidrio pueden comprender, por ejemplo, partículas de sílice cristalinas, vidrios sódico cálcicos, vidrios de borosilicato y vidrios fibrosos no tejidos.

Los términos “acuoso”, “fase acuosa” y “solución acuosa” describen una fase líquida cuya parte de disolvente comprende agua. No obstante, otros disolventes tales como un disolvente orgánico miscible en agua y un líquido iónico pueden encontrarse presente asimismo en la parte de disolvente. En una realización preferente y teniendo en cuenta la presencia de otros disolvente o líquidos iónicos en una solución se considera “acuosa” si entre el 20% y el 100% de la parte de disolvente medida en volumen (v/v) es agua (es decir, de acuerdo con la invención, una fase líquida acuosa contiene, preferentemente, agua en una cantidad relativa mínima de 20% (v/v) de modo, asimismo, preferente un mínimo de 30% (v/v) también preferente, como mínimo, 50% (v/v) también preferente, como mínimo, 75% (v/v), también preferente, como mínimo, 90% (v/v).

Un “líquido iónico” es un líquido que contiene solamente iones. En sentido amplio, este término incluye todas las sales fundidas, por ejemplo, cloruro sódico a temperaturas superiores a 800°C. No obstante, en el contexto de la presente invención, el término “líquido iónico se comprende que indica una sal cuyo punto de fusión es menor, de manera que a temperatura ambiente, la sal se encuentra en un estado líquido de agregación. Además, el líquido iónico en el contexto de la invención es un líquido iónico soluble en agua. El término líquido iónico indica al mismo tiempo una sal compuesta de un catión y un anión. El anión puede ser un anión inorgánico u orgánico. El catión es principalmente un catión orgánico, pero en cualquier caso un ión (anión o catión) es un ión orgánico. El catión puede comprender cationes de imidazolio, cationes de piridinio, cationes de amonio, cationes de fosfonio y cationes de guanidinio sustituidos. Como mínimo, un ión del par de iones tiene una carga deslocalizada. Debido a las interacciones débiles entre ambos iones, los líquidos iónicos muestran un bajo punto de fusión.

Debido a su estructura química, los líquidos iónicos pueden actuar como disolventes para compuestos hidrofílicos y para compuestos hidrofóbicos. Los líquidos iónicos, particularmente aquellos que tienen una parte iónica orgánica, pueden ser utilizados como compuestos tipo detergente, de modo interesante, estos compuestos pueden ser disueltos frecuentemente en soluciones a concentraciones mucho más elevadas que los detergentes convencionales, en reactivos de lisis conocidos.

La presente invención da a conocer nuevas composiciones acuosas que comprenden ciertos líquidos iónicos como reactivos de lisis. Es decir, las paredes de las células bacterianas que contienen péptidoglicanos son destruidas cuando establecen contacto con una solución acuosa que contiene un compuesto iónico seleccionado del grupo iónico que consiste en 1-butil-3-metil-imidazolio-tiocianato (fórmula 1), 1-butil-3-metil-imidazolio-2 (2-metoxietoxi) etilsulfato (ECOENG™41M) (fórmula 2), 1-metil-1-[4-(3-metil-3H-imidazolio-1-)-butil-1-]-3H-imidazolio-di(toluisulfato) (fórmula 3) y 1-butil-3-metil-imidazolio-octilsulfato (fórmula 4). En este contexto, el verbo destruir se comprende que incluye los significados de desintegrar, hacer poroso, disolver, degradar y desnaturalizar.

Las paredes de células bacterianas de células Gram positivas y Gram negativas son destruidas cuando son incubadas con tiocianato de guanidina (GuaSCN) presente en una concentración aproximada de 2,25 M. A una concentración de 375 mM, el GuaSCN es ineficaz para estos objetivos.

Los inventores han descubierto que, de forma interesante, no cualquier líquido iónico con un componente iónico orgánico es capaz de destruir una pared celular bacteriana de la misma manera. Tal como se puede observar en la tabla 2 (ejemplo 4), entre los objetos comprobados hay dos, a saber 1-butil-3-metil-imidazolio-tiocianato (BMIM-SCN) (fórmula 1), y 1-butil-3-metil-imidazolio-2(2-metoxietoxi)-etilsulfato (ECOENG™41M) (fórmula 2), que destruyen las paredes de las células de células, tanto Gram positivas como Gram negativas.

No obstante, en el caso de BMIM-SCN (fórmula 1) (L1.1-3, ver ejemplos 3 y 4), ambos tipos de paredes de células son destruidos solamente cuando este compuesto se encuentra presente en el reactivo de lisis en una concentración de 3 M, que corresponde aproximadamente a 2,25 M en la mezcla con la suspensión bacteriana. Para conseguir el mismo resultado, de forma sorprendente, se requiere solamente una cuarta parte de una concentración cuando se utiliza ECOENG™ 41M (fórmula 2) (presente en el reactivo de lisis L2.1) como ingrediente activo. Las razones para este notable efecto no están claras de momento.

La efectividad de BMIM-SCN (fórmula 1) en la destrucción de paredes de células bacterianas es comparable a la de GuaSCN, por el hecho de que una concentración en la mezcla de 375 mM no llega tampoco a destruir las paredes de las células bacterianas. No obstante, de modo sorprendente, como cuando la concentración de BMIM-SCN (fórmula 1) se incrementa aproximadamente en 50% se observa un efecto interesante. A una concentración aproximada de 562,5 mM en la mezcla, las células Gram negativas son sometidas a lisis, sus paredes celulares son destruidas. De este modo, la presente invención proporciona una solución de lisis para bacterias Gram negativas que comprende una cantidad medida de BMIM-SCN (fórmula 1) en presencia de las bacterias, siendo la concentración de BMIM-SCN (fórmula 1) superior a 375 mM, e igual o menor que aproximadamente 562,5 mM. Además, la presente invención da a conocer una solución de lisis para bacterias Gram negativas que comprende una cantidad medida de BMIM-SCN (fórmula 1) en presencia de las bacterias, siendo una concentración de BMIM-SCN (fórmula 1) superior a 562,5 mM, e igual o menor a aproximadamente 2,25 M. A pesar de ello, son también

posibles concentraciones más elevadas de BMIM-SCN (fórmula 1) a efectos de conseguir el resultado deseado y quedan, por lo tanto, comprendidas dentro de la presente invención.

Otro efecto dependiente de la concentración se puede apreciar con 1-butil-3-metilimidazolio-octilsulfato (fórmula 4) presente en los reactivos de lisis L4.1 y L4.2). A una concentración 247,5 mM o inferior, el compuesto no llega a destruir las paredes de las células bacterianas. No obstante, a una concentración superior a 247,5 mM llegando a 375 mM el compuesto es capaz de destruir las paredes de las células de bacterias Gram negativas. Una vez alcanzada la concentración crítica, se consigue el resultado de la lisis. No obstante, contrariamente a BMIM-SCN (fórmula 1), no se encontró concentración en la que adicionalmente se destruyeran las paredes celulares de las bacterias Gram positivas. La invención da a conocer, por lo tanto, una solución de lisis para bacterias Gram negativas que comprende una cantidad medida de 1-butil-3-metilimidazolio-octilsulfato (fórmula 4) en presencia de las bacterias, siendo la concentración de 1-butil-3-metilimidazolio-octilsulfato (fórmula 4) superior a 247,5 mM, e igual o menor que aproximadamente 375 mM. Además, la presente invención da a conocer una solución de lisis para bacterias Gram negativas que comprenden una cantidad medida de 1-butil-3-metilimidazolio-octilsulfato (fórmula 4) en presencia de la bacteria, siendo la concentración de 1-butil-3-metilimidazolio-octilsulfato superior a 375 mM, e igual menor que aproximadamente 1,7 M.

De manera completamente inesperada y muy sorprendente, el 1-metil-1-[4-(3-metil-3H-imidazolio-1-)-butil-1-]-3H-imidazolio-di(toluisulfato) (fórmula 3) (MITS), ha mostrado destrucción específica de paredes de células Gram positivas en forma dependiente de la concentración. Se ha descubierto que a una concentración de 247,5 mM ni las células Gram negativas ni las células Gram positivas quedaron destruidas. No obstante, un incremento de esta concentración de aproximadamente 50%, o más, tiene como resultado la destrucción de las paredes de células Gram positivas. De este modo, la presente invención da a conocer una solución de lisis para bacterias Gram positivas que comprende una cantidad medida de MITS (fórmula 3) en presencia de las bacterias, siendo la concentración de MITS (fórmula 3) igual o superior a 375 mM y superior hasta aproximadamente 1,7 M.

Los líquidos iónicos capaces de destruir una pared de célula bacteriana comprenden compuestos iónicos anfifílicos. Estas sustancias producen también la dislocación de las biomembranas, así como complejos de biomoléculas. Por lo tanto, una vez que las paredes de las células quedan destruidas, los compartimientos internos de las células son sometidos a lisis por los líquidos iónicos en las composiciones de la presente invención.

En el documento EP 1 983 051 se mostró que en presencia de un líquido iónico, comprendiendo ácidos nucleicos de catión 1-butil-3-metilimidazolio podían ser adsorbidos a la superficie de sílice de una fase sólida. Un efecto similar se mostró para una serie de otros líquidos iónicos.

Con una sustancial ventaja técnica, esta propiedad puede ser utilizada para una etapa de lisis acoplada y extracción, tal como se describe en los ejemplos 5, 6, y 7. De esta forma, tres propiedades diferentes de los líquidos iónicos de las composiciones de la invención pueden ser utilizadas en un proceso de trabajo: En primer lugar, los líquidos iónicos ayudan en la lisis del material de la muestra, solos o en combinación con, por ejemplo, un tratamiento mecánico. En segundo lugar, los líquidos iónicos actúan de manera similar como los detergentes por el hecho de que los componentes celulares son solubilizados en el lisado. En tercer lugar, los líquidos iónicos son capaces de favorecer la adsorción de ácidos nucleicos en una superficie de sílice de una fase sólida, facilitando eficazmente la extracción de los ácidos nucleicos. Esta combinación de características ventajosas permite el diseño de procesos de trabajo eficaces en la preparación de la muestra. De manera notable, en procesos de trabajo, según el estado de la técnica, las combinaciones de un agente caotrópico y un detergente se pueden sustituir por un compuesto único, más versátil, un líquido iónico, tal como BMIM-SCN (fórmula 1).

Con el método de purificación de ácido nucleico, según la presente invención, se puede efectuar el proceso de un gran número de diferentes muestras biológicas. Una muestra preferente puede contener una serie de compuestos orgánicos e inorgánicos que es deseable que sean separados del ácido nucleico. En particular, la muestra puede contener leucocitos y otras células inmunológicamente activas, compuestos químicos con un peso molecular bajo y/o alto, tal como haptenos, antígenos, anticuerpos y ácidos nucleicos. La muestra puede ser también sangre entera, suero de sangre, plasma de sangre, fluido cerebral, esputos, excrementos, muestras de biopsia, tuétano de hueso, lavados nasales, tejidos, orina o mezclas de los mismos. El presente método, de acuerdo con la invención, comprende también muestras biológicas, tal como un fluido procedente de un cuerpo humano o animal; preferentemente, la muestra biológica es sangre, plasma de sangre, suero de sangre u orina. El plasma de sangre es preferentemente EDTA, heparina, o citrato de plasma de sangre. Preferentemente, la muestra biológica comprende células bacterianas, células de hongos o mezclas de los mismos. Una célula de hongo preferente es una célula de levadura.

De manera todavía más detallada, la presente invención describe los siguientes elementos:

1. Una composición que comprende una fase acuosa líquida, células bacterianas y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida con una concentración aproximada de 560 mM o superior, caracterizada porque el compuesto iónico es seleccionado del grupo que consiste en 1-butil-3-metilimidazolio-tiocianato, 1-butil-

3-metil-imidazolio-2(2-metoxietoxi) etilsulfato (ECOENG™41M), 1-metil-1-[4-(3-metil-3H-imidazolio-1-)-butil-1-]-3H-imidazolio-di(toluisulfato) y 1-butyl-3-metil-imidazolio-octilsulfato.

- 5 2. Composición, según la reivindicación 1, caracterizada porque la concentración del compuesto iónico es disuelta en la fase líquida está comprendida aproximadamente entre 560 mM y 2,3 M.
3. Composición, según cualquiera de los puntos 1 y 2, caracterizada porque las células bacterianas son seleccionadas entre el grupo que consiste en bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas.
- 10 4. Composición que comprende una fase acuosa líquida, células bacterianas Gram negativas, y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 370 mM o superior, caracterizado porque el compuesto iónico es 1-butyl-3-metil-imidazolio-octilsulfato.
- 15 5. Composición, según el punto 1, caracterizada porque la concentración de compuesto iónico disuelto en la fase líquida está comprendida aproximadamente entre 370 mM y 2,3 M.
- 20 6. Composición que comprende una fase acuosa líquida, células bacterianas Gram negativas, y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 560 mM, caracterizada porque el compuesto iónico es 1-butyl-3-metil-imidazolio-tiocianato (BMIM-SCN).
- 25 7. Composición que comprende una fase acuosa líquida, células bacterianas Gram negativas, y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración comprendida entre aproximadamente 560 mM y 2,3 M, caracterizada porque el compuesto iónico es seleccionado del grupo que consiste en 1-butyl-3-metilimidazolio-tiocianato, 1-butyl-3-metilimidazolio-2(2-metoxietoxi) etilsulfato (ECOENG™41M) y 1-butyl-3-metilimidazolio-octilsulfato.
- 30 8. Composición, según el punto 7, caracterizado porque la concentración del compuesto iónico disuelto en la fase líquida está comprendida entre 560 mM y 1,7 M, aproximadamente.
- 35 9. Composición que comprende una fase acuosa líquida, células bacterianas Gram negativas, y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 560 mM, caracterizada porque el compuesto iónico es 1-etil-1-[4-(3-metil-3H-imidazolio-1-)-butil-1-]-3H-imidazolio-di(toluisulfato).
- 40 10. Composición que comprende una fase acuosa líquida, células bacterianas Gram positivas, y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 560 mM o superior, caracterizada porque el compuesto iónico es seleccionado entre el grupo que consiste en 1-butyl-3-metil-imidazolio-2(2-metoxietoxi)etilsulfato (ECOENG™41M), 1-metil-1-[4-(3-metil-3H-imidazolio-1-)-butil-1-]-3H-imidazolio-di(toluisulfato), y 1-butyl-3-metil-imidazolio-octilsulfato.
- 45 11. Composición que comprende una fase acuosa líquida, células bacterianas Gram positivas, y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 2,3 M o superior, caracterizado porque el compuesto iónico es 1-butyl-3-metil-imidazolio-tiocianato.
- 50 12. Composición, según cualquiera de los puntos 1 a 11, caracterizada porque el pH de la composición es ácido.
13. Composición, según el punto 12, caracterizada porque el pH ácido está comprendido aproximadamente entre pH 4 y pH 6,5.
- 55 14. Composición, según el punto 13, caracterizada porque el pH es pH 6.
15. Composición, según cualquiera de los puntos 1 a 14, que comprende, además, una sal tampón con capacidad de efecto tampón a un pH ácido.
- 60 16. Composición, según cualquiera de los puntos 1 a 15, que comprende, además, una fase sólida con superficie de sílice.
17. Composición, según el punto 16, caracterizada porque la fase sólida comprende partículas con capacidad de atracción magnética.
- 65 18. Composición, según cualquiera de los puntos 16 y 17, caracterizada porque el compuesto iónico es 1-butyl-3-metil-imidazolio-tiocianato.
19. Composición, según el punto 18, caracterizado porque la concentración del compuesto iónico en la fase acuosa líquida es aproximadamente 1,5 M o superior.



20. Composición que comprende una fase acuosa líquida, un homogenizado de células, y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 1,5 M o superior, caracterizada porque el compuesto iónico es 1-butil-3-metilimidazolio-tiocianato.
- 5 21. Composición, según el punto 20, caracterizado porque el pH de la composición es ácido.
22. Composición, según el punto 21, que comprende, además, una sal tampón con capacidad de efecto tampón a un pH ácido.
- 10 23. Composición, según cualquiera de los puntos 20 a 22, que comprende, además, una fase sólida con una superficie de sílice.
24. Composición, según el punto 23, caracterizada porque la fase sólida comprende partículas con capacidad de atracción magnética.
- 15 25. Composición, según cualquiera de los puntos 20 a 25, caracterizada porque las células son células bacterianas o células de hongos y, de modo más preferente, una célula de levadura.
- 20 26. Utilización de una composición, según cualquiera de los puntos 1 a 3 para la desintegración, hacer porosa, disolver, degradar o desnaturalizar la pared celular de una célula bacteriana.
27. Utilización de una composición, según cualquiera de los puntos 4 a 8, para desintegrar, hacer porosa, disolver, degradar o desnaturalizar la pared celular de una célula bacteriana Gram negativa.
- 25 28. Utilización de una composición, según cualquiera de los puntos 9 a 11, para desintegrar, hacer porosa, disolver, degradar o desnaturalizar la pared celular de una célula bacteriana Gram positiva.
- 30 29. Utilización de una composición, según cualquiera de los puntos 1 a 3, que comprende, además, una fase sólida con una superficie de sílice para la lisis de una célula bacteriana y purificación de un ácido nucleico de la misma.
- 30 30. Utilización de una composición, según el punto 20, y que comprende, además, una fase sólida con superficie de sílice para el lisado de un homogenizado de células y purificación de un ácido nucleico del mismo.
- 35 31. Método para la producción de un lisado de células bacterianas, cuyo método comprende (a) contacto de las células bacterianas con, una composición que comprende una fase acuosa líquida y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida con una concentración aproximada de 560 mM o superior, de manera que el compuesto iónico es seleccionado entre el grupo que consiste en 1-butil-3-metilimidazolio-tiocianato, 1-butil-3-metilimidazolio-2 (2-metoxietoxi) etilsulfato (ECOENG™41M), 1-metil-1-[4-(3-metil-3H-imidazolio-1-)-butil-1-]-3H-imidazolio-di(toluilsulfato) y 1-butil-3-metilimidazolio-octilsulfato, y (b) incubar la célula bacteriana con la fase líquida, produciendo, de esta manera, un lisado de la célula bacteriana.
- 40 32. Método para la producción de un lisado de células bacterianas Gram negativas, cuyo método comprende (a) contacto de las células bacterianas con una composición que comprende una fase acuosa líquida y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 370 mM, de manera que el compuesto iónico es 1-butil-3-metilimidazolio-octilsulfato, y (b) incubar la célula bacteriana con la fase líquida, produciendo, de esta manera, un lisado de la célula bacteriana Gram negativa.
- 45 33. Método para la producción de un lisado de células bacterianas Gram negativas, cuyo método comprende (a) contacto de las células bacterianas con una composición que comprende una fase acuosa líquida y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 560 mM, de manera que el compuesto iónico es 1-butil-3-metilimidazolio-tiocianato (BMIM-SCN), y (b) incubar la célula bacteriana con la fase líquida, produciendo de esta manera un lisado de la célula bacteriana Gram negativa.
- 50 34. Método para la producción de un lisado de una célula bacteriana Gram negativa, cuyo método comprende (a) contacto de la célula bacteriana con una composición que comprende una fase acuosa líquida y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración comprendida aproximadamente entre 560 mM y 2,3 M, de manera que el compuesto iónico es seleccionado a partir del grupo que consiste en 1-butil-3-metilimidazolio-tiocianato, 1-butil-3-metilimidazolio-2 (2-metoxietoxi) etilsulfato (ECOENG™41M) y 1-butil-3-metilimidazolio-octilsulfato, y (b) incubar la célula bacteriana con la fase líquida, produciendo de esta manera un lisado de la célula bacteriana Gram negativa.
- 60 35. Método para la producción de un lisado de una célula bacteriana Gram positiva, cuyo método comprende (a) contacto de la célula bacteriana con una composición que comprende una fase acuosa líquida y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración de 560 mM, de manera que el compuesto
- 65

iónico es 1-metil-1-[4-(3-Metil-3H-imidazolio-1-)-butil-1-]-3H-imidazolio-di(toluil sulfato), y (b) incubar la célula bacteriana con la fase líquida, produciendo de esta manera un lisado de la célula bacteriana Gram positiva.

- 5 36. Método para la producción de un lisado de una célula bacteriana Gram positiva, cuyo método comprende (a) contacto de la célula bacteriana con una composición que comprende una fase acuosa líquida y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 560 mM o superior, de manera que el compuesto iónico es seleccionado entre el grupo que consiste en 1-butil-3-metil-imidazolio-2(2-metoxietoxi) etilsulfato (ECOENG™41M), 1-metil-1-[4-(3-metil-3H-imidazolio-1-)-butil-1-]-3H-imidazolio-di(toluil sulfato), y 1-butil-3-metil-imidazolio-octilsulfato, y (b) incubar la célula bacteriana con la fase líquida, produciendo de esta manera un lisado de la célula bacteriana Gram positiva.
- 10
- 15 37. Método para la producción de un lisado de una célula bacteriana Gram negativa, cuyo método comprende (a) contacto de la célula bacteriana con una composición que comprende una fase acuosa líquida y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 2,3 M o superior, de manera que el compuesto iónico es 1-butil-3-metil-imidazolio-tiocianato, y (b) incubar la célula bacteriana con la fase líquida, produciendo de esta manera un lisado de la célula bacteriana Gram positiva.
- 20 38. Método para la purificación de un ácido nucleico a partir de una célula, comprendiendo las etapas (a) destruir la pared celular de la célula, si existe pared celular; (b) establecer contacto e incubar la célula de una solución acuosa ácida comprendiendo 1-butil-3-metil-imidazolio-tiocianato a una concentración de 1,5 M o superior, formando de esta manera un lisado; (c) contacto del lisado con una fase sólida que comprende una superficie de sílice, de manera que el ácido nucleico es adsorbido en la superficie; (d) separar la fase sólida de la fase líquida y lavar opcionalmente la fase sólida, de manera que el ácido nucleico permanece adsorbido en la misma y (e) eluir el ácido nucleico de la fase sólida purificando de esta manera el ácido nucleico.
- 25

### **Descripción de las figuras**

- 30 **Figura 1** 1-butil-3-metil-imidazolio-tiocianato (fórmula 1)  
**Figura 2** 1-butil-3-metil-imidazolio-2(2-metoxietoxi)etilsulfato (ECOENG™41M) (fórmula 2)  
**Figura 3** 1-metil-1-[4-(3-metil-3H-imidazolio-1-)-butil-1-]-3H-imidazolio-di(toluil sulfato) (fórmula 3)  
**Figura 4** 1-butil-3-metil-imidazolio-octilsulfato (fórmula 4)

### **Ejemplo 1**

#### **Células microbianas**

40 Cepas microbianas (A) *Staphylococcus carnosus* BMTU 7329, (B) *Escherichia coli* BMTU 3294, y (C) *Candida famata* BMTU 7408 fueron cultivadas separadamente en un cultivo líquido utilizando un medio mínimo y condiciones estándar de crecimiento. Se prepararon suspensiones de células que contenían aproximadamente entre  $10^7$  y  $10^8$  células/ml.

#### **Ejemplo 2**

#### **Evaluación de la viabilidad de las células microbianas**

50 Para evaluar que las células y las suspensiones eran células vivas, una parte alícuota de la suspensión de células de *Candida famata* fue analizada con el Kit de Viabilidad de Levadura LIVE/DEAD® (Invitrogen catálogo n° L7009), y partes alícuotas de suspensiones de células de *Staphylococcus carnosus* y *Escherichia coli* fueron analizadas con el Kit de Viabilidad Bacteriana LIVE/DEAD® BacLight™ (Invitrogen catálogo n° L7012).

55 El Kit de Viabilidad de Levadura LIVE/DEAD® suministrado por Invitrogen combina una sonda fluorescente de dos colores para la viabilidad de la levadura FUN® 1, con un reactivo de marcado de la superficie de hongos fluorescente de un tercer color, Calcofluor™ White M2R. El calcofluor es un colorante excitable por rayos ultravioleta que puede ser utilizado como marcador de paredes de células de hongos.

60 De acuerdo con el fabricante, las cepas de viabilidad FUN® 1 y FUN® 2 aprovechan los mecanismos endógenos normales de proceso bioquímico que parecen conservarse entre diferentes especies de levaduras y otros hongos. La conversión de las cepas de células FUN® 1 y FUN® 2 desde una acumulación distribuida en forma difusa de cepa intracelular fluorescente verde de forma compacta consistente de estructuras intravacuolares naranja-rojo o amarillo-naranja fluorescentes, respectivamente, requiere la integridad de la membrana del plasma y capacidad metabólica. Solamente las células metabólicamente activas son marcadas claramente con estructuras intravacuolares fluorescentes (calificadas como "vivas"), mientras que las células muertas muestran una fluorescencia extremadamente brillante, difusa, de color verde-amarillo, calificadas como "muertas". Las células con

65

membranas intactas, pero con poca o ninguna actividad metabólica tienen fluorescencia citoplásmica verde difusa y carecen de cuerpos intravacuolares fluorescentes.

5 Los Kits de Viabilidad Bacteriana LIVE/DEAD® BacLight suministrados por Invitrogen utilizan mezclas del colorante de ácido nucleico verde-fluorescente SYTO® 9, y la cepa de ácido nucleico rojo-fluorescente yoduro de propidio. Estas cepas difieren tanto en sus características espectrales como en su capacidad de penetrar en las células bacterianas sanas. Cuando se utilizan solas, la cepa SYTO® 9 marca, en general, todas las bacterias de una población, tanto las de membranas intactas como las que tienen membranas dañadas. Como contraste, el yoduro de propidio penetra solamente en bacterias con membranas dañadas, provocando una reducción en la fluorescencia del tinte SYTO® 9, cuando ambos colorantes se encuentran presentes.

15 De acuerdo con el manual del fabricante, con la mezcla suministrada de colorantes SYTO® 9 y yoduro de propidio, las bacterias con membranas celulares intactas se tiñen de color verde fluorescente, mientras que las bacterias con membranas dañadas se tiñen de rojo fluorescente. Los máximos de excitación/emisión para estos colorantes son, aproximadamente, de 480/500 nm para cepa SYTO® 9 y 490/635 nm para yoduro de propidio. El fondo permanece virtualmente sin fluorescencia.

20 Un criterio común para la viabilidad bacteriana es la capacidad de reproducción de una bacteria en un medio nutriente apropiado. Los cultivos de bacterias que crecen exponencialmente facilitan típicamente los resultados con el ensayo de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD® BacLight que se correlaciona bien con el ensayo de crecimiento en medio líquidos o sólidos. En ciertas condiciones, no obstante, las bacterias que tienen membranas comprometidas pueden ser capaces de recuperarse y reproducirse, dichas bacterias se pueden calificar como “muertas” en este ensayo. Inversamente, algunas bacterias con membranas intactas pueden ser incapaces de reproducirse en un medio nutriente, y éstas pueden ser calificadas como “vivas”.

25 Los ensayos LIVE/DEAD® fueron llevados a cabo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, si no se ha indicado de otro modo. Se utilizó para microscopía de fluorescencia un microscopio Zeiss Axioplan.

30 Las células microbianas tratadas y no tratadas fueron analizadas adicionalmente utilizando microscopía de luz llevada a cabo con un microscopio Leica Laborlux S.

### Ejemplo 3

#### Reactivos de lisis

Tabla 1: Composiciones de los reactivos de lisis

<i>designación</i>	<i>composición</i>	
Control 1	0,5 M 37,5 mM	tiocianato de guanidina (GuaSCN), TrisHCl, pH 6
Control 2	3 M 37,5 mM	GuaSCN, TrisHCl, pH 6
L1.1	0,5 M 9,4 mM	1-butil-3-metil-imidazolio-tiocianato (BMIM-SCN), TrisHCl, pH 6
L1.2	0,75 M 14,1 mM	BMIM-SCN, TrisHCl, pH 6
L1.3	3 M 56,25 mM	BMIM-SCN, TrisHCl, pH 6
L2.1	0,75 M 50 mM	1-butil-3-metil-imidazolio-2-(2-metoxietoxi)-etilsulfato (ECOENG™41M), MES, pH 6
L3.1	0,5 M 50 mM	1-metil-1-[4-(3-metil-3H-imidazolio-1-)-butil-1-]-3H-imidazolio-di(toluilsulfato) (MITS), MES, pH 6
L3.2	0,75 M 50 mM	MITS, MES, pH 6
L4.1	0,33 M 50 mM	1-butil-3-metil-imidazolio-octilsulfato MES, pH 6
L4.2	0,5 M-2,25 M 50 mM	1-butil-3-metil-imidazolio-octilsulfato MES, pH 6
L5.1	0,75 M-2,25 M 50 mM	1H-Imidazolio, 3-(4-hidroxi-butil)-1-metil-toluilsulfato (MHBMIM) MES, pH 6
L6.1	0,75 M-2,25 M 50 mM	1-hexil-3-metil-imidazolio-bromuro MES, pH 6
L7.1	0,75 M-2,25 M 50 mM	N-butil-piridinio-cloruro MES, pH 6
L8.1	0,75 M-2,25 M 50 mM	N-hexil-piridinio-cloruro MES, pH 6
L9.1	0,75 M-2,25 M 50 mM	3-carbamoil-1-octil-oximetil-piridinio-cloruro MES, pH 6
L10.1	0,75 M-2,25 M 50 mM	1-metil-1-butil-pirrolidinio-tetrafluorborato MES, pH 6
L11.1	0,75 M-2,25 M 50 mM	1-metil-1-octil-pirrolidinio-cloruro MES, pH 6

Todos los reactivos indicados en lo anterior fueron preparados en agua. Otros conjuntos de reactivos con las mismas composiciones respectivas fueron preparados de manera que en cada uno de los reactivos la única diferencia era un valor de pH seleccionado entre 5,5, pH 5, pH 4,5, y pH 4.

40

**Ejemplo 4****Lisis de células microbianas, evaluación microscópica**

5 Una parte alícuota de 200 µl de una suspensión de células de células microbianas, según el ejemplo 1, fue mezclada con una parte alícuota de 600 µl de cada reactivo de lisis, de acuerdo con el ejemplo 3. Cada mezcla fue incubada durante 15 min a 56°C.

10 Además, se realizaron incubaciones a temperatura ambiente durante 30 min. Se llevaron a cabo otros experimentos, de manera que a una temperatura determinada se varió el tiempo de incubación, con respecto al reactivo de lisis correspondiente. La influencia del valor de pH de los reactivos de lisis fue comprobada reduciendo el pH en etapas, descendiendo al valor de pH 4. De manera esencial, los resultados obtenidos bajo dichas condiciones de pH alterado eran comparables a los resultados obtenidos a pH 6.

15 Antes de cada experimento de lisis, se comprobó la viabilidad de las células microbianas subtratadas siguiendo los procedimientos descritos en el ejemplo 2. Para los experimentos de lisis, todas las posibles combinaciones de tampones de lisis L1.1 a L11.1 con suspensiones de células (A), (B), y (C) fueron examinadas. Después de la incubación de una suspensión de células con el respectivo reactivo de lisis, se llevó a cabo una evaluación de viabilidad de las células microbianas en la mezcla incubada, tal como se describe en el ejemplo 2.

20 Una suspensión de células incubadas con bacterias fue calificada como lisado "positivo", si en la mezcla incubada SYTO® 9 no eran detectables estructuras morfológicas susceptibles de tinción correspondientes a las células bacterianas respectivas. De otra forma, cuando se encontraban todavía presentes las estructuras morfológicas SYTO® 9 susceptibles de tinción, la suspensión de células incubada era calificada "negativa". De manera análoga, una suspensión de células con células de levadura fue calificada, aunque se basaba en una tinción Calcofluor™ White M2R.

30 En cada experimento se hizo una comparación directa utilizando el marcado fluorescente sobre una suspensión de células diluida de manera similar, pero sin tratar, como referencia. Para excluir cualquier influencia de un compuesto en los reactivos de lisis en la fluorescencia, se verificó, utilizando microscopía de luz, cualquier presencia o ausencia de estructuras morfológicas correspondientes a las células microbianas respectivas. Los resultados se resumen en la tabla 2.

Tabla 2: Eficacia de reactivos de lisis en células microbianas en suspensión

Designación	(A) Gram positivas	(B) Gram negativas	(C) pared celular de quitina	Concentración de compuesto activo
Control 1	-	-	-	0,375 M
Control 2	+	+	-	2,25 M
L1.1	-	-	-	0,375 M
L1.2	-	+	-	0,5625 M
L1.3	+	+	-	2,25 M
L2.1	+	+	-	0,5625 M
L3.1	-	-	-	0,375 M
L3.2	+	-	-	0,5625 M
L4.1	-	-	-	0,2475 M
L4.2 <sup>§</sup>	-	+	-	0,375 M a 1,6875 M
L5.1 <sup>§</sup>	-	-	-	0,5625 M a 1,6875 M
L6.1 <sup>§</sup>	-	-	-	0,5625 M a 1,6875 M
L7.1 <sup>§</sup>	-	-	-	0,5625 M a 1,6875 M
L8.1 <sup>§</sup>	-	-	-	0,5625 M a 1,6875 M

Una calificación negativa es representada por "-", una calificación positiva por "+".

<sup>§</sup> Las calificaciones no cambiaron con el líquido iónico en el tampón de lisis en un rango de concentración aproximado de 0,5 M a 2,25 M en el tampón de lisis, correspondiendo a una composición final en el rango aproximado de 0,375 M hasta aproximadamente 1,6875 M en la mezcla del tampón de lisis y la suspensión de células.

<sup>§</sup> Las calificaciones no cambiaron con el líquido iónico del tampón de lisis en un rango de concentración en un rango aproximado de 0,75 M hasta 2,25 M, correspondiendo a una concentración final en un rango aproximado de 0,5625 M hasta 1,6875 M aproximadamente en la mezcla del tampón de lisis y la suspensión de células.

35 Se descubrió que bajo las condiciones descritas anteriormente, ninguno de los reactivos de lisis comprobados era efectivo en la desintegración de la estructura de la pared celular de C. famata. De modo sorprendente, solamente L1.3 y L2.1 tenían un efecto similar al Control 2 teniendo un agente caotrópico con una elevada concentración. De modo más sorprendente, L1.2 y L4.2 mostraron especificidad para el lisado de paredes celulares Gram negativa, pero no para paredes celulares Gram positivas. Todavía, de modo más sorprendente y de manera completamente inesperada, las paredes celulares Gram positivas, pero no las Gram negativas fueron objeto de lisis por L3.2.

40

**Ejemplo 5****Lisis de células bacterianas combinadas con purificación de ácido nucleico utilizando columnas de centrifugación**

Las suspensiones bacterianas (A) y (B) fueron dispuestas tal como se escribe en el ejemplo 1. Una parte alícuota de 200 µl de cada suspensión celular fue mezclada con una parte alícuota de 600 µl de un tampón de lisis de Control 2 o L1.3, de acuerdo con el ejemplo 3. Las mezclas fueron incubadas durante 15 minutos a 56°C. Se incubaron en compartimentos separados suspensiones de células (A) y (B).

Cada uno de los lisados fue aplicado a una columna de centrifugación. Con esta finalidad, se utilizaron columnas de centrifugación HIGH PURE™ del kit de aislamiento de plásmidos (Roche Applied Science, Artículo No. 11754777001; Roche Diagnostics GmbH Mannheim) o columnas de centrifugación del kit de NucleoSpin Blood de la firma Macherey & Nagel (Cat. No. 740951.50).

Después de la capa de incubación a 56°C, la mezcla lisada fue colocada en una columna de centrifugación a temperatura ambiente. Cada una de las columnas fue acoplada a un tubo de muestra. Por centrifugación en una microcentrífuga (por ejemplo, Eppendorf 5415 C), de acuerdo con el manual del kit respectivo, el lisado se hizo pasar a través del filtro de cristal de la columna, de manera que los ácidos nucleicos se adsorbieron en la fibra de vidrio en presencia del líquido iónico. Las columnas fueron lavadas a continuación con un tampón de lavado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la columna de centrifugación correspondiente. Los ácidos nucleicos adsorbidos fueron eluidos a partir de las columnas de centrifugación utilizando agua o un tampón de elución, según la especificación de los fabricantes. Los ácidos nucleicos del eluido fueron determinados espectrofotométricamente a 260 nm.

**Ejemplo 6****Lisis de células bacterianas combinada con una purificación de ácido nucleico utilizando partículas con capacidad de atracción magnética**

Se dispusieron suspensiones bacterianas (A) y (B), tal como se describe en el ejemplo 1. Una parte alícuota de 200 µl de cada una de las suspensiones celulares fue mezclada con una parte alícuota de 600 µl de un tampón de lisis de control 2 o L1.3, de acuerdo con el ejemplo 3. Las mezclas fueron incubadas durante 15 minutos a 56°C. Se incubaron en compartimentos separados suspensiones de células (A) y (B).

Se tomaron partículas magnéticas en suspensión de un kit 1 gran volumen (Roche Applied Science, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Article No. 03730972001) de aislamiento de ácido nucleico de tipo compacto MagNA Pure. No obstante, todas las etapas de purificación fueron llevadas a cabo manualmente utilizando tubos Eppendorf® convencionales y una gradilla magnética para tubos Eppendorf®, para aplicar un campo magnético. Se mezcló una parte alícuota de 150 µl de suspensión con cada lisado, y se incubó a temperatura ambiente durante 30 segundos.

A continuación, las partículas fueron inmovilizadas por medio del campo magnético, y separadas de la fase líquida. Las partículas fueron lavadas una vez con 500 µl de un primer tampón de lavado acuoso, consistiendo en 5 M Guanidinium HCl, 38% [v/v] etanol, 20 mM Tris HCl, pH 6,6 y dos veces con 500 µl de un segundo tampón de lavado acuoso, consistiendo en 100 mM NaCl, 50% [v/v] etanol, 10 mM TrisHCl, pH 7,4. Cada lavado fue llevado a cabo eliminando el campo magnético, seguido de la suspensión de las partículas en el tampón de lavado correspondiente. A efectos de eliminar el tampón de lavado, las partículas fueron inmovilizadas nuevamente por medio de un campo magnético, y separadas de la fase líquida.

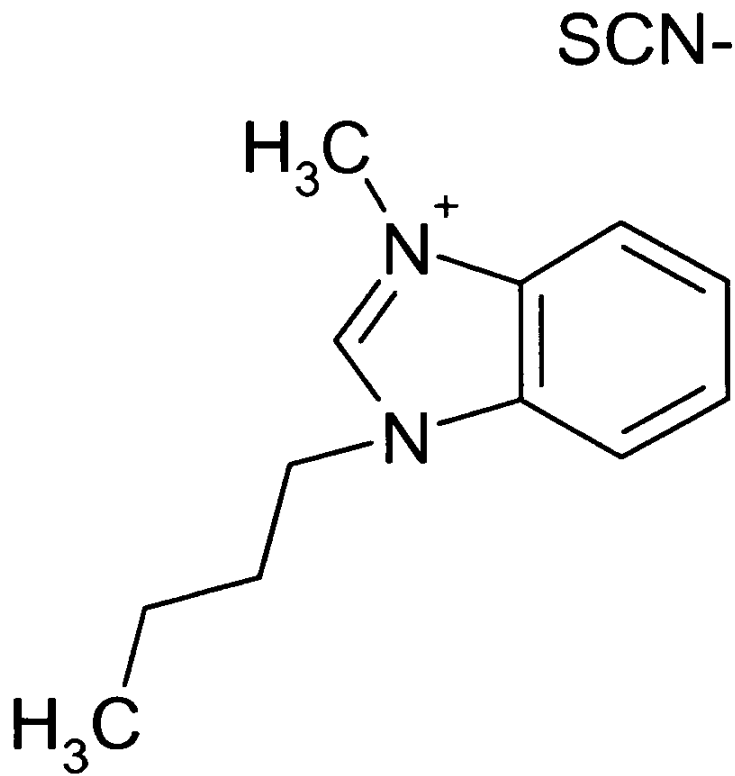
Después de la última etapa de lavado, los ácidos nucleicos adsorbidos fueron eluidos de las partículas por la adición a las mismas de 500 µl de tampón de elución (10 mM Tris HCl, pH 8 en agua) y agitando las partículas del tampón de elución, sometiendo vigorosamente a vortex. A continuación, las partículas fueron sedimentadas por centrifugación, y el sobrenadante con los ácidos nucleicos en solución fue recuperado. Los ácidos nucleicos del sobrenadante fueron determinados espectrofotométricamente a 260 nm.

## REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende una fase líquida acuosa, células bacterianas y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida con una concentración aproximada de 560 mM o superior, caracterizada porque el compuesto iónico es seleccionado del grupo que consiste en 1-Butil-3-metil-imidazolio-tiocianato, 1-butil-3-metil-imidazolio-2(2-metoxi-etoxi) etilsulfato (ECOENG™ 41M), 1-metil-1-[4-(3-Metil-3H-imidazolio-1-)-butil]-1]H-imidazolio-di(toluisulfato, y 1-butil-3-metil-imidazolio-octilsulfato.
2. Composición, según la reivindicación 1, que comprende, además, una sal tampón capaz de acción tampón a pH ácido.
3. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, caracterizada porque el pH de la composición es ácido.
4. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende, además, una fase sólida con una superficie de sílice.
5. Composición, según la reivindicación 4, caracterizada porque la fase sólida comprende partículas susceptibles de atracción magnética.
6. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque el compuesto iónico es en 1-Butil-3-metil-imidazolio-tiocianato.
7. Utilización de una composición que comprende una fase líquida acuosa y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 560 mM o superior, para destruir la pared celular de una célula bacteriana, de manera que el compuesto iónico es seleccionado del grupo que consiste en 1-Butil-3-metil-imidazolio-tiocianato, 1-Butil-3-metil-imidazolio-2 (2-metoxietoxi) etilsulfato (ECOENG™ 41M), 1-metil-1-[4-(3-metil-3H-imidazolio-1-)-butil-1-]-3H-imidazolio-di(toluisulfato, y 1-butil-3-metil-imidazolio-octilsulfato.
8. Método para la producción de un lisado de células bacterianas, cuyo método comprende (a) contacto de las células bacterianas con una composición que comprende una fase líquida acuosa, y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 560 mM o superior, de manera que el compuesto iónico es seleccionado entre el grupo que consiste en 1-Butil-3-metilimidazolio-tiocianato, 1-Butil-3-metil-imidazolio-2 (2-metoxietoxi) etilsulfato (ECOENG™ 41M), 1-Metil-1-[4-(3-Metil-3H-imidazolio-1-)-butil-1-]-3H-imidazolio-di(toluisulfato), y 1-Butil-3-metil-imidazolio-octilsulfato, y (b) incubar la célula bacteriana con la fase líquida, produciendo de esta manera un lisado de la célula bacteriana.
9. Método, según la reivindicación 8, caracterizado porque la célula bacteriana es Gram positiva, el compuesto iónico disuelto en la fase líquida es 1-Metil-1-[4-(3-Metil-3H-imidazolio-1-)-butil-1-]-3H-imidazolio-di(toluisulfato), y la concentración del compuesto iónico en la fase líquida es aproximadamente de 560 mM.
10. Método, de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque la célula bacteriana es Gram negativa, el compuesto iónico disuelto en la fase líquida es [BMIM-SCN], y la concentración del compuesto iónico en la fase líquida es aproximadamente de 560 mM.
11. Composición que comprende una fase líquida acuosa, células bacterianas Gram negativas y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida con una concentración aproximada de 370 mM o superior, caracterizada porque el compuesto iónico es 1-Butil-3-metil-imidazolio-octilsulfato.
12. Utilización de la composición, según la reivindicación 11, para la destrucción de la pared celular de células bacterianas Gram negativas.
13. Método para la producción de un lisado de células bacterianas Gram negativas, cuyo método comprende (a) contacto de las células bacterianas con una composición que comprende una fase líquida acuosa, y un compuesto iónico disuelto en la fase líquida a una concentración aproximada de 370 mM o superior, de manera que el compuesto iónico es 1-Butil-3-metil-imidazolio-octilsulfato, y (b) incubar las células bacterianas con la fase líquida, produciendo de esta manera un lisado de las células bacterianas Gram negativas.
14. Método de purificación de un ácido nucleico de una célula, comprendiendo las etapas de (a) destruir la pared celular de la célula, si existe pared celular; (b) contacto e incubación de la célula con una solución acuosa ácida, comprendiendo 1-Butil-3-metil-imidazolio-tiocianato a una concentración de 1,5 M o superior, formando de esta manera un lisado; (c) contacto del lisado con una fase sólida que comprende una superficie de sílice, de manera que el ácido nucleico es adsorbido a la superficie; (d) separar la fase sólida de la fase líquida y, opcionalmente, lavar la fase sólida, de manera que el ácido nucleico permanece adsorbido en la misma; y (e) eluir el ácido nucleico de la fase sólida, purificando de esta manera el ácido nucleico.

15. Método, según la reivindicación 14, caracterizado porque la célula se encuentra presente en una muestra biológica.

**Fig. 1**





**Fig. 2**

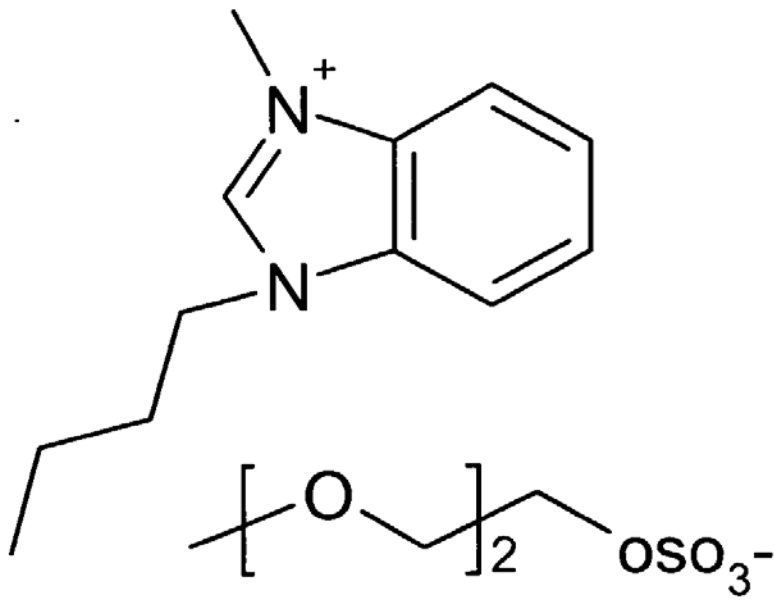
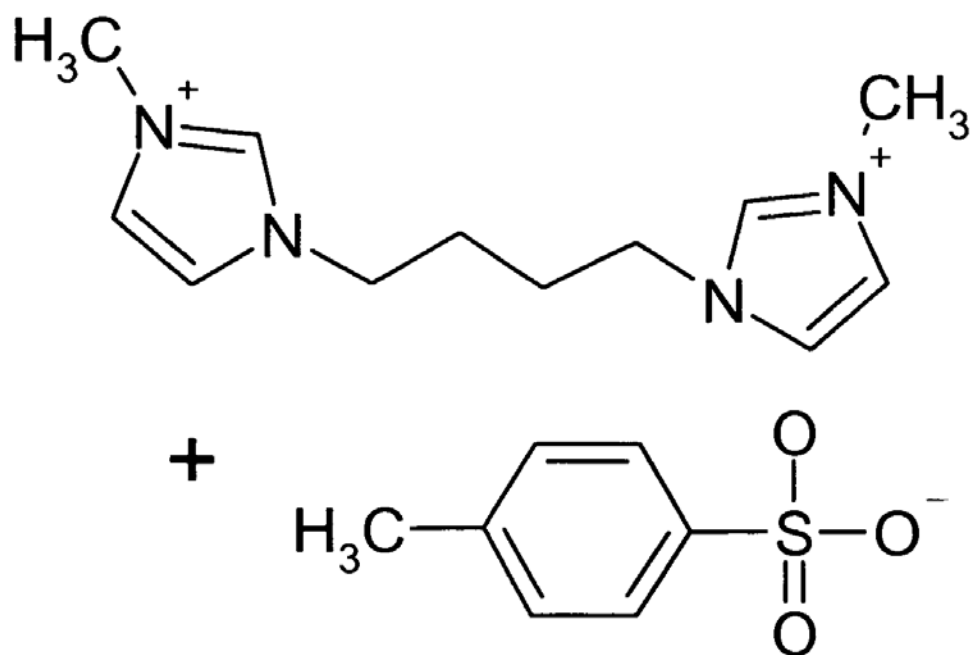


Fig. 3



**Fig. 4**

