

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 336**

51 Int. Cl.:

**C07H 1/08** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2009 E 09757160 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 2285816**

54 Título: **Método para el aislamiento de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**30.05.2008 EP 08009941**

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

**05.06.2015**

73 Titular/es:

**QIAGEN GMBH (100.0%)  
Qiagen Strasse 1  
40724 Hilden, DE**

72 Inventor/es:

**RITT, CHRISTOPH;  
HORLITZ, MARTIN y  
SPRENGER-HAUSSELS, MARKUS**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 537 336 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Método para el aislamiento de ácidos nucleicos

5 La presente invención se refiere a un método para el aislamiento y/o concentración de ácidos nucleicos, en particular de ácidos nucleicos de cadena corta.

10 El aislamiento de ácidos nucleicos como ADN y ARN a partir de materiales vegetales, animales o humanos así como a partir de cultivos celulares o cultivos de virus ocurre por regla general según un patrón básico consistente: los ácidos nucleicos presentes en materiales de partida son primero descompuestos - parcialmente empleando enzimas que degradan proteínas. En etapas subsiguientes los componentes individuales pueden ser separados empleando diferentes métodos. Además, los ácidos nucleicos pueden ser aislados de materiales de muestras, en los cuales ellos están libres, es decir no están en células. De este modo, los ácidos nucleicos pueden existir libres en mezclas artificiales de muestras, pero sin embargo también en muestras naturales como por ejemplo sangre. Tales ácidos nucleicos que circulan libres son denominados también ácidos nucleicos extracelulares.

La mayoría de los métodos conocidos a partir del estado de la técnica para la concentración de los ácidos nucleicos se basa en uno de los dos siguientes principios de separación:

20 Los métodos clásicos se basan en un proceso de una etapa, en el cual después de la adición de un tampón que en la mayoría de los casos contiene un compuesto caotrópico, y después de la adición de un agente orgánico de extracción – mayormente fenol y/o cloroformo- se ejecuta una extracción. Los indeseados materiales acompañantes son descartados con la fase orgánica. A continuación, mediante una separación de fases, los ácidos nucleicos remanentes en la fase acuosa pueden ser separados y con ello aislados. La desventaja esencial de este modo de operación consiste en que aparte del empleo de materiales dañinos para la salud y venenosos como fenol y/o cloroformo, los materiales solubles en agua permanecen como contaminantes en la solución acuosa de ácido nucleicos, los cuales tienen que ser separados en otras etapas de purificación que consumen mucho tiempo.

30 De allí que considerando esta desventaja, se ha introducido en el estado de la técnica un proceso alternativo, el cual se basa en la adsorción selectiva de ácidos nucleicos sobre materiales sólidos de soporte, como por ejemplo dióxido de silicio. Si se requiere, el material de partida que contiene ácidos nucleico es sometido a lisis, bajo condiciones definidas puesto en contacto con el material de soporte, de modo que los ácidos nucleicos puede ligarse sobre el material de soporte; dado el caso, se ejecutan etapas de lavado. Opcionalmente, a continuación los ácidos nucleicos unidos al soporte son sometidos a elución del material de soporte por medio de un tampón adecuado.

35 Por ejemplo, un método adecuado para una multiplicidad de diferentes aplicaciones para el aislamiento de ácidos nucleicos es divulgado en la US 5,234,809 (Boom). Allí se describe un método para el aislamiento de ácidos nucleicos de materiales de partida que contienen ácidos nucleicos, mediante la incubación del material de partida con un tampón caotrópico y una fase sólida que liga ADN. El tampón caotrópico realiza, en tanto sea necesario, tanto la lisis del material de partida como también la unión de los ácidos nucleicos a la fase sólida. El método es bien adecuado para la separación de ácidos nucleicos de pequeñas cantidades de muestra. En WO93/11221 se describe también un método que se basa en un principio similar.

40 EP 1 960 938 divulga un método en el cual a una superficie de sílice se unen ácidos nucleicos en presencia de un compuesto caotrópico y/o un alcohol ramificado o no ramificado. La inmovilización de los ácidos nucleicos ocurre a elevadas temperaturas. WO99/61603 divulga un método de purificación de plásmidos, en el cual los ácidos nucleicos se ligan a un material de sílice en presencia de agentes caotrópicos. La US 2007/106071 se refiere a un método para la purificación de ácidos nucleicos de diferente longitud, en el cual se emplean fases que ligan ácidos nucleicos, con diferentes tamaños de poro.

50 En el estado de la técnica se conocen muchos métodos para la purificación de ácido nucleicos, los cuales consisten en la combinación de una fase sólida con un tampón caotrópico. Puesto que en todos los métodos conocidos, los ácidos nucleicos de cadena larga se ligan a la fase sólida por lo menos tan bien, sin embargo en la mayoría de los casos esencialmente mejor comparados con ácidos nucleicos de cadena corta (por ejemplo con una longitud menor a 1000 pares de bases, 500 pares de bases o incluso 300 pares de bases), los métodos del estado de la técnica no son adecuados para purificar de manera eficiente ácidos nucleicos de cadena corta o bien concretamente concentrarlos respecto a los ácidos nucleicos de cadena larga.

60 La mala aptitud para purificar ácidos nucleicos de cadena corta, es presumiblemente atribuible a que los ácidos nucleicos de cadena corta se ligan mal al material de soporte, comparados con ácidos nucleicos de cadena larga (por

ejemplo ADN genómico). Por ello, en la mayoría de los procesos de purificación establecidos los ácidos nucleicos de cadena corta se pierden en una gran parte y no se encuentran o están representados de manera inadecuada en los ácidos nucleicos purificados. Sin embargo, para determinadas aplicaciones es deseable aislar ácidos nucleicos de cadena corta, o concentrar estos respecto a los ácidos nucleicos de cadena larga.

5 Para concentrar preferiblemente ácidos nucleicos de cadena corta o bien separar ácidos nucleicos de cadena corta de los de cadena larga, se aplicaron ya en el estado de la técnica diferentes principios. Por ejemplo, DE 10 2006 045 391 describe un método para la separación de ácidos nucleicos largos de ácidos nucleicos cortos, en el cual se aplica la muestra varias veces sobre fases sólidas especialmente modificadas. Otro método se basa en el empleo de tampones  
10 especiales de unión, que no contienen sales caotrópicas, sino sales de ácido cítrico, para ligar de este modo en particular ácidos nucleicos de cadena corta (WO 2007/065934).

15 La purificación/concentración de ácidos nucleicos de cadena corta (ARN y ADN) es de importancia central para diferentes ámbitos de aplicación. Un campo en el cual los ácidos nucleicos de cadena corta juegan un papel central es el diagnóstico prenatal. Aparte del ADN particular que circula libre, en la sangre de mujeres embarazadas se encuentra adicionalmente aún ADN que circula libre del feto. Se asume que el ADN fetal que circula libre en la sangre de mujeres embarazadas se diferencia del ADN que circula libre de la madre, en su tamaño. Mientras frecuentemente el ADN materno que circula libre posee una longitud promedio superior a 500 pares de bases, una parte predominante del ADN fetal que circula libre es claramente más pequeña y posee en promedio una longitud inferior a 500 pares de bases. Esta  
20 diferencia de tamaño entre los ácidos nucleicos materno y fetal podría ser empleada para concentrar ADN fetal y con ello poder investigar mejor, en tanto se tuvieran a disposición métodos adecuados de purificación. El uso de ADN que circula libre de origen fetal para el diagnóstico prenatal tendría como ventaja que sería inocuo para el feto respecto a los métodos clásicos como la amniocentesis o la biopsia de vellosidades coriónicas y con ello implicaría menos riesgos. Sin embargo, las cantidades de ADN que circula libre de origen fetal en la sangre son muy bajas. Dependiendo del estado de gestación, en 1 ml de sangre se encuentran entre 20 y 260 copias de ADN fetal. La concentración de ADN que circula libre fetal es con ello incluso menor, pero todavía superior a la concentración de células fetales que circulan libres. Además existe el problema de que la concentración del ADN fetal que circula libre es notablemente pequeña en comparación con el ADN materno que circula libre, de modo que para el aislamiento total del ADN que circula libre de la sangre materna, sólo una fracción del material genético proviene del feto; la parte predominante del material genético  
30 aislado proviene de la madre. Por la elevada cantidad de fondo de ADN materno, en muchos casos se complica la detección de fragmentos genéticos del feto, en algunos casos no es suficiente la sensibilidad en sí misma de métodos de detección tan sensibles como el PCR en tiempo real, para poder detectar el ADN fetal.

35 Los métodos empleados hasta ahora para el aislamiento de ADN que circula libre, de la sangre materna purifican frecuentemente en la misma medida el ADN fetal y el ADN materno, de modo que persiste la relación inconveniente de ADN fetal a ADN materno -el ADN fetal representa sólo una fracción del ADN total. Hasta ahora, no ha ocurrido una concentración de ADN fetal respecto al ADN materno. Además, de modo regular los ácidos nucleicos fetales se purifican incluso peor, puesto que los ácidos nucleicos de cadena corta frecuentemente se capturan menos bien en la purificación. Puesto que ellos son capturados más mal en la purificación, están presentes entonces en la muestra purificada en la  
40 relación, en menor concentración comparada con la muestra de partida. Sin embargo, sería ventajosa una purificación eficiente o concretamente purificación específica de los ácidos nucleicos extracelulares de cadena corta como por ejemplo los ADN fetales, porque con ello se elevaría esencialmente la sensibilidad y con ello la confiabilidad de un diagnóstico prenatal que se basa en ADN fetal que circula libre.

45 De allí que la presente invención basa el objetivo en poner a disposición un método para el aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos, con el cual se aíslan/purifiquen de manera eficiente ácidos nucleicos extracelulares y en particular también ácidos nucleicos de cadena corta. Además, es objetivo de la invención poner a disposición un método para el aislamiento de leche materna del ADN fetal, el cual permita un aislamiento y/o concentración efectivos del ADN fetal.

50 El objetivo es logrado mediante un método para el aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos de cadena corta, en particular ADN y/o ARN, con una longitud de < 1000 pares de bases, desde un material de partida que contiene ácidos nucleicos, caracterizado por las siguientes etapas del método:

- 55 (a) unión de ácidos nucleicos a un material de soporte que liga ácidos nucleicos, en el cual se pone en contacto el material de partida en presencia de un compuesto caotrópico y un alcohol, preferiblemente isopropanol, con el material de soporte que liga ácidos nucleicos, donde el alcohol está presente en una concentración  $\geq 15\%$  (v/v) y  $\leq 32\%$  (v/v) y donde el material de soporte que liga ácidos nucleicos es una fase sólida que liga ácidos nucleicos, elegida de entre el grupo de los materiales que contienen silicio, gel de sílice, dióxido de silicio, vidrio, zeolita, caolín, sílica gel, cerámica, membranas de sílice y partículas magnéticas que exhiben una superficie de sílice o vidrio;
- 60 (b) opcional separación de los ácidos nucleicos unidos, del material de soporte que liga ácidos nucleicos.

5 Según el método de acuerdo con la invención, la inmovilización de los ácidos nucleicos sobre el material de soporte es ejecutada bajo condiciones específicas de reacción. Dos componentes son determinantes para la efectiva unión de los ácidos nucleicos de cadena corta sobre el material de soporte, es decir por lo menos un compuesto caotrópico así como un alcohol ramificado y/o no ramificado. De acuerdo con la invención, es de particular importancia la correcta elección de la concentración de alcohol, la cual para la unión sobre el material de soporte es en la mezcla de muestras, de  $\geq 15\%$  (v/v). Sin embargo, la concentración de alcohol es preferiblemente mayor y por ello está en  $\geq 19\%$  (v/v). Se ha mostrado, que con la elección de la concentración correcta de alcohol, los ácidos nucleicos de cadena corta se ligan muy bien al material de soporte. Una baja concentración de alcohol puede ser compensada en cierta medida con una elevación de la concentración en sustancias caotrópicas. De allí que existe una correlación entre la concentración de alcohol y la concentración de compuestos caotrópicos, sobre la cual trataremos a continuación. El ajuste de acuerdo con la invención de la concentración del alcohol provoca que en particular ácidos nucleicos de cadena corta se ligen de manera eficiente y con ello sean capturados en la purificación.

15 Según una forma de operar, la concentración de alcohol está en un rango de aproximadamente 19 a 32% (v/v), puesto que en este rango los ácidos nucleicos de cadena corta y en particular ADN se ligan particularmente bien y con ello pueden ser aislados. De este modo, dependiendo del ajuste fino de las condiciones de unión, puede ocurrir también una concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta respecto a los ácidos nucleicos de cadena larga. Este ventajoso efecto de concentración es alcanzado en particular en una concentración de alcohol entre 25 y 32% (v/v) y 28 a 32% (v/v). Con estas condiciones, los ácidos nucleicos de cadena corta se unen mejor y con ello preferiblemente sobre el material de soporte, comparados con los ácidos nucleicos de cadena larga, como muestran también los ejemplos. También la concentración de compuestos caotrópicos influye en la unión de los ácidos nucleicos. Con elección de una elevada concentración de compuestos caotrópicos pueden emplearse también bajas concentraciones de alcohol.

25 Según una forma preferida de operar, que es adecuada en particular para el efectivo aislamiento/purificación de ácidos nucleicos extracelulares a partir de una muestra biológica, la concentración de alcohol en la etapa (a) está en un rango de  $\geq 15\%$  y  $\leq 25\%$  (v/v). En la etapa (a) el alcohol puede estar presente en la mezcla por ejemplo en una concentración de aproximadamente 18 a 20% (v/v). Los experimentos han mostrado que también a estas bajas concentraciones de alcohol pueden purificarse de manera eficiente ácidos nucleicos largos y también ácidos nucleicos de cadena corta y con ello capturarse de manera efectiva un amplio espectro de tamaño. Para garantizar una buena captura de los ácidos nucleicos de cadena corta, el compuesto caotrópico debería estar presente en la etapa (a) en una concentración suficientemente alta. Por ello la concentración del compuesto caotrópico en la etapa (a) está en  $\geq 2$  mol/l. Cuál concentración de compuesto caotrópico tiene que ser empleada concretamente, para ligar de manera efectiva los ácidos nucleicos de cadena corta, depende de la fuerza del compuesto caotrópico empleado. De este modo, con el uso de un compuesto caotrópico débil como por ejemplo clorhidrato de guanidinio es necesaria una concentración mayor que con el uso de un compuesto caotrópico más fuerte como por ejemplo tiocianato de guanidinio. Los compuestos caotrópicos con la fuerza adecuada, que promueven la unión de los ácidos nucleicos de cadena corta también con concentraciones bajas de alcohol, pueden ser elegidos sobre la base de la denominada serie de Hofmeister. Según eso, son aniones caotrópicos fuertes  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{NCS}^-$ , y  $\text{Cl}_3\text{CCOO}^-$ . Son cationes caotrópicos fuertes por ejemplo  $\text{Ba}_2^+$  y guanidinio. Preferiblemente, como compuestos caotrópicos se emplean tiocianatos, isotiocianatos y/o percloratos, en particular tiocianato de guanidinio o isotiocianato de guanidinio. Estos compuestos caotrópicos fuertes son empleados preferiblemente en combinación con bajas concentraciones de alcohol de  $\leq 25\%$  (v/v). Las concentraciones adecuadas están en  $\geq 2,0$  mol/l y  $\leq 3,1$  mol/l.

45 De modo opcional pueden emplearse también etapas de lavado. Los ácidos nucleicos ligados al material de soporte son entonces separados del material de soporte, por ejemplo sometidos a elución de una manera de por sí conocida, en tanto se desee una extracción de los ácidos nucleicos de cadena corta. Los ácidos nucleicos aislados/concentrados de acuerdo con la invención pueden ser entonces procesados adicionalmente de manera conocida, por consiguiente ser analizados. Dependiendo del procesamiento adicional o análisis subsiguientes planeados, así mismo es sin embargo posible emplear los ácidos nucleicos unidos al material de soporte y con ello sin elución. Además, puede emplearse el método para eliminar los ácidos nucleicos de una muestra.

55 El método de acuerdo con la invención puede ser ejecutado como método de 1 etapa. La ventaja de un método de 1 etapa radica en que por regla general se alcanza un elevado rendimiento en ácidos nucleicos (total); los ácidos nucleicos se pierden durante la purificación sólo en una pequeña medida. Puesto que con el método de acuerdo con la invención, en la variante de 1 etapa los ácidos nucleicos de cadena corta se ligan de manera efectiva al material de soporte y con ello son aislados/concentrados, el aislamiento/ concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta que así ocurre es ya suficiente para muchas aplicaciones. Un método de 1 etapa es también particularmente cómodo para el usuario, puesto que es rápido y de fácil ejecución. Como prueban los experimentos de comparación mostrados en los ejemplos, 60 el método de 1 etapa de acuerdo con la invención para el aislamiento de ácidos nucleicos de cadena corta, es

claramente superior a los métodos conocidos en el estado de la técnica, porque con el método de acuerdo con la invención puede alcanzarse un efectivo aislamiento de ácidos nucleicos de cadena corta con buen rendimiento y parcialmente incluso también una concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta respecto a los ácidos nucleicos de cadena larga. El método de 1 etapa es adecuado también de manera particular para la purificación efectiva de ácidos nucleicos extracelulares, de una muestra, en particular de un líquido corporal como en particular plasma o suero.

Para determinadas aplicaciones, es ventajoso alcanzar una concentración tan eficiente como sea posible de los ácidos nucleicos de cadena corta respecto a los ácidos nucleicos de cadena larga; los ácidos nucleicos de cadena corta deberían ser extraídos sin o bien con tan poca cantidad de fondo como fuera posible de ácidos nucleicos de cadena larga. En estos casos es deseable purificar tan poca cantidad de ácidos nucleicos de cadena larga como sea posible. Para alcanzar esto de manera particularmente efectiva, según una forma de operar del método de acuerdo con la invención, se ejecuta antes de las verdaderas etapas de aislamiento a) y opcionalmente b) para la separación/elución de los ácidos nucleicos de cadena corta, una etapa (x), mediante la cual se alcanza un eficiente empobrecimiento de los ácidos nucleicos de cadena larga. Mediante el empobrecimiento previo de los ácidos nucleicos de cadena larga, pueden extraerse ácidos nucleicos de cadena corta en forma particularmente pura.

Según esta variante de 2 etapas del método de acuerdo con la invención, se ejecuta la etapa (x) antes de las verdaderas etapas de aislamiento a) y b) para el aislamiento/purificación de los ácidos nucleicos de cadena corta, mediante la cual se alcanza un eficiente empobrecimiento de los ácidos nucleicos de cadena larga. En la etapa de unión (x) ocurre la unión de los ácidos nucleicos al material de soporte en presencia de compuestos caotrópicos y un alcohol ramificado y/o no ramificado. Nuevamente, para el eficiente empobrecimiento de los ácidos nucleicos de cadena larga son cruciales las condiciones de unión y en particular la concentración del alcohol presente durante la unión en la muestra total. A partir de la separación/sobrenadante que contiene en particular los ácidos nucleicos de cadena corta de la etapa (x), se aíslan entonces y con ello se concentran en las subsiguientes etapas a) y opcionalmente b), los ácidos nucleicos de cadena corta.

Según una forma de operar, las etapas a) y b) del método de 1 etapa (ver arriba) son muy similares o bien son casi idénticas a las etapas a) y b) del método de 2 etapas. Para el método de 2 etapas se emplea por último en lugar del material de partida que contiene ácidos nucleicos, la separación/sobrenadante de la etapa (x). De allí que para las etapas a) y b) del método de 2 etapas aplican las mismas condiciones preferidas que las descritas en relación con el método de 1 etapa. A través de la etapa (x) ejecutada antes, ocurre por último adicionalmente un empobrecimiento de los ácidos nucleicos de cadena larga, de modo que estos se encuentran por lo menos en menores cantidades en la separación/sobrenadante. En tanto se desee, en el caso del método de 2 etapas, los ácidos nucleicos de cadena larga pueden así mismo retirarse por elución del material de soporte unido en la etapa (x) y ser empleados nuevamente para otros propósitos.

Como se explicó, el tipo y concentración del compuesto caotrópico tiene una influencia en la unión de los ácidos nucleicos y en particular en la eficiencia de la unión de los ácidos nucleicos de cadena corta. En tanto la concentración de alcohol en la etapa previa (x) y en la subsiguiente etapa (a) sea igual o casi igual, en la etapa (x) se emplea bien sea una concentración inferior de compuestos caotrópicos y/o un compuesto caotrópico más débil que en la etapa (a). Mediante esto se alcanza nuevamente un empobrecimiento los ácidos nucleico de cadena larga y con ello una concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta. Un ejemplo adecuado de un compuesto caotrópico débil, que es empleado en la etapa (x) puede ser por ejemplo clorhidrato de guanidinio.

Diferentes materiales y en particular materiales biológicos pueden usarse como materiales de partida que contienen ácidos nucleicos. A ellos pertenecen por ejemplo virus, fagos y células, como por ejemplo bacterias pero también células humanas, animales o vegetales. Además, el método es adecuado sin embargo en particular también para el aislamiento/concentración de ácidos nucleicos libres de muestras que no contienen células, o muestras procesadas de modo correspondiente. En particular el método de acuerdo con la invención es adecuado por ejemplo para el aislamiento de ácidos nucleicos como ADN y/o ARN, de materiales de muestras de origen humano o animal, en particular muestras clínicas, como sangre, plasma, suero, saliva, orina, líquido cerebral, esputo, heces, punciones, frotis epitelial, biopsias y otros tejidos o muestras de médula ósea. En particular, el método de acuerdo con la invención es adecuado para el aislamiento de ADN fetal de muestras de sangre materna y en particular de plasma sanguíneo materno. Así mismo, el método de acuerdo con la invención es adecuado en particular para el aislamiento de ácidos nucleicos que circulan libremente como ADN y ARN tumorales, de líquidos corporales como en particular plasma y/o suero.

En determinados casos en el método de acuerdo con la invención puede emplearse la muestra sin tratamiento previo. Sin embargo, en muchos casos la muestra tiene que ser primero sometida a digestión mediante un método adecuado y liberarse el material biológico presente en la muestra. Los métodos para la digestión de muestras y células son

conocidos por los expertos y pueden ser de naturaleza química, enzimática o física. También es posible una combinación de estos métodos.

5 Al respecto pueden enfatizarse como ventajosos diferentes factores para diversos materiales biológicos; en principio son bien adecuados los siguientes métodos: Lisis con ayuda de detergentes iónicos y no ionógenos, como por ejemplo SDS, LiDS o Sarkosyl en tampones adecuados, el uso de sales caotrópicas, como por ejemplo clorhidrato de guanidinio (GHCL), tiocianato de guanidinio (GTC), isotiocianato de guanidinio (GITC), yoduro de sodio, perclorato de sodio entre otros; desgarramiento mecánico, como por ejemplo por medio de una prensa de émbolo, ultrasonido, molienda con esferas de vidrio, esferas de níquel, aluminio o en nitrógeno líquido; lisis enzimática como por ejemplo con lizosima, 10 proteinasas, proteinasa K o celulasas o por medio de otras enzimas disponibles comercialmente para la lisis; lisis de las células por medio de bacteriófagos o infecciones con virus; liofilización; choque osmótico; tratamiento con microondas; tratamiento con temperatura, por ejemplo calentamiento o cocción o congelación, por ejemplo en hielo seco o nitrógeno líquido y descongelación; lisis alcalina.

15 Como se explicó, los métodos precedentes representan el estado de la técnica para la lisis, los cuales son suficientemente conocidos y por ello no tienen que ser ilustrados en detalle.

Para la purificación de los ácidos nucleicos que circulan libres como por ejemplo ADN de una muestra de sangre, como por ejemplo para la purificación de ADN fetal de una muestra materna, se separan primero las células y otros 20 componentes sólidos de la sangre (por ejemplo mediante centrifugación), y se procesa nuevamente el plasma así obtenido. Comúnmente, el plasma es libre de células y contiene los ácidos nucleicos que circulan libremente, por ejemplo ADN materno y fetal. En la purificación de ácidos nucleicos de plasma libres no es necesaria ninguna lisis celular para liberar los ácidos nucleicos, puesto que estos ya están presentes en forma libremente circulante. Esto aplica también para otras muestras, en las cuales los ácidos nucleicos están presentes en forma libre y de modo 25 correspondiente no se encuentran en células. Sin embargo, los ácidos nucleicos que circulan libremente pueden estar presentes en forma de complejos con proteínas y/u otros materiales. Por esta razón, se trata primero el material de partida que contiene ácidos nucleicos, por ejemplo el plasma sanguíneo, con tampón de liberación el cual asegura que los ácidos nucleicos son liberados de la forma compleja. El tampón de liberación es en su función y composición similar a un tampón de lisis, el cual es empleado para la descomposición celular; mediante el tampón de liberación se generan 30 en la muestra condiciones adecuadas para la liberación de los ácidos nucleicos, de modo que éstos están presentes en forma no compleja. Mediante la adición del tampón de liberación, tiene más accesibilidad el ácido nucleico para la purificación. De modo correspondiente, el método de acuerdo con la invención puede también ser empleado en materiales de partida libres de células. Dependiendo de la composición, el correspondiente tampón de liberación puede también funcionar como tampón de lisis, para purificar o bien concentrar de manera efectiva ácidos nucleicos. Por regla 35 general, los tampones comunes de lisis pueden ser empleados también como tampones de liberación.

De acuerdo con la invención, el uso de tampones de liberación o bien de lisis que contienen sustancias caotrópicas es particularmente efectivo. Esto en particular, puesto que también la composición del tampón de liberación o bien de lisis influye en las condiciones bajo las cuales los ácidos nucleicos se ligan al material de soporte. Las condiciones de unión 40 en la muestra, que de acuerdo con la invención son determinantes para la efectividad del método de acuerdo con la invención, pueden por ello también ser ajustadas mediante la adecuada elección del tampón de liberación o bien de lisis, por ejemplo en combinación con un tampón de unión. Los tampones de liberación o bien de lisis según la presente invención contienen un compuesto caotrópico, como por ejemplo GTC o GHCL y dado el caso un detergente, como por ejemplo SDS o Tween. Estos agentes pueden estar presentes en solución acuosa o en una solución tampón, es decir 45 como los denominados tampones de liberación o lisis. Como tampones pueden emplearse todos los tampones adecuados como por ejemplo Tris, Bicina, Tricina o tampón de fosfato. De modo alternativo los tampones de liberación o bien de lisis pueden ser añadidos por separado. Las concentraciones y cantidades adecuadas de los agentes de lisis o bien de liberación varían dependiendo de los sistemas en cuestión, tipo de las células etc. y pueden ser determinadas por los expertos. Para aplicaciones específicas, en particular la purificación de ADN fetal de muestras de sangre se han 50 establecido por ejemplo concentraciones en el rango de 2 a 7 M de compuestos caotrópicos, como por ejemplo GTC, GHCL o NaI o perclorato de sodio, agentes alcalinos 0,1 M a 1 M, como por ejemplo NaOH así como detergentes al 0,1 a 50 % en peso (p/v), como en particular detergentes no iónicos como por ejemplo Tween.

55 Durante la unión de los ácidos nucleicos al material de soporte están presentes también compuestos caotrópicos en la mezcla de muestras. Los compuestos caotrópicos pueden provenir por ejemplo del tampón de lisis o bien de liberación y/o también ser añadidos por separado o bien en forma de un tampón de unión. Finalmente, son cruciales las condiciones de unión en la muestra durante la unión de los ácidos nucleicos al material de soporte. Aquí pueden estar presentes los compuestos caotrópicos finalmente hasta el límite de solubilidad. El uso de compuestos caotrópicos es ventajoso para la unión eficiente de los ácidos nucleicos. La concentración de los compuestos caotrópicos en la muestra 60 está durante la unión, preferiblemente en un rango de 1 a 10 mol/l, particularmente preferido en 2 a 6 mol/l. Son

compuestos adecuados por ejemplo yoduro de sodio, perclorato de sodio, tiocianato de guanidinio, isotiocianato de guanidinio y clorhidrato de guanidinio. La correlación de la concentración y tipo de los compuestos caotrópicos empleados y la concentración de alcohol para el ajuste de las condiciones de unión, fueron ya discutidas arriba en detalle. Nos referimos a la manifestación de arriba.

5

Además, durante de unión la muestra puede exhibir detergentes, como por ejemplo detergentes no iónicos y en particular Tween. Los detergentes pueden ser añadidos con el tampón de liberación/lisis, o ser componente del tapón de unión. Los detergentes provocan una eficiente disolución de diferentes componentes en la muestra, así por ejemplo de componentes de suero y plasma. Mediante ello puede impedirse el bloqueo del material de soporte que liga ácidos nucleicos. Esto es ventajoso en particular en el uso de una membrana de sílice.

10

Como se explicó, en el método de acuerdo con la invención, es determinante la concentración de alcohol en la muestra durante la unión de los ácidos nucleicos al material de soporte. Se emplean preferiblemente alcoholes de cadena corta, ramificados o no ramificados con uno a cinco átomos de carbono, como por ejemplo metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanoles o pentanoles. También pueden emplearse mezclas de los correspondientes alcoholes. De modo particularmente preferido se emplea isopropanol o un alcohol o bien mezclas de alcoholes con propiedades similares al isopropanol. De acuerdo con la etapa de unión (etapa de unión (x) para el empobrecimiento de los ácidos nucleicos de cadena larga o etapa de unión a) para la unión de los ácidos nucleicos de cadena corta), varía la concentración del alcohol.

15

20

En tanto en una etapa previa (x) se presenta empobrecimiento de los ácidos nucleicos de cadena larga, se usan concentraciones de alcohol que promueven la unión de los ácidos nucleicos de cadena larga al material de soporte, para poder eliminar mediante ello éstos de la muestra. La interrelación de la concentración de compuesto caotrópico y la concentración de alcohol fue ya discutida arriba en detalle. Nosotros remitimos a la manifestación de arriba. La separación o bien el sobrenadante contienen los ácidos nucleicos de cadena corta deseados, debido al empobrecimiento hasta una gran proporción.

25

En la etapa a) del método de 2 etapas se emplea una elevada concentración de alcohol para la unión preferida de los ácidos nucleicos de cadena corta. Para la mejor unión de los ácidos nucleicos de cadena corta, la concentración de alcohol en la muestra durante la unión es preferiblemente  $\geq 15\%$  (v/v),  $\geq 19\%$  (v/v) y en particular en un rango de aproximadamente 19 a 32%. Para concentraciones por encima de aproximadamente 25% (v/v) se determinó incluso que pudieron concentrarse los ácidos nucleicos de cadena corta respecto a los ácidos nucleicos de cadena larga, en particular en el empobrecimiento previo de los ácidos nucleicos. Esto aplica en particular para el ajuste de la concentración en compuestos caotrópicos; arriba se describen concentraciones adecuadas. Para el uso de elevadas concentraciones de alcohol de  $\geq 25\%$  (v/v) se emplean en la etapa (a) compuestos caotrópicos débiles como por ejemplo clorhidrato de guanidinio o bajas concentraciones de un compuesto caotrópico fuerte. Para el uso de una baja concentración de alcohol de  $\leq 25\%$  (v/v) en la etapa (a) se emplea de manera correspondiente una elevada concentración de compuestos caotrópicos, o también compuestos caotrópicos fuertes como isotiocianato de guanidinio o tiocianato de guanidinio. Este resultado es ventajoso en particular para la purificación de ácidos nucleicos extracelulares como por ejemplo ADN fetal de muestras de sangre, puesto que las muestras como por ejemplo plasma de sangre materna contienen normalmente de manera predominante ácidos nucleicos de cadena larga. De allí que con el método de acuerdo con la invención puede concretamente alcanzarse una purificación efectiva y concretamente una concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta.

30

35

40

45

Según una forma de operar, durante la unión de los ácidos nucleicos al material de soporte, para la unión preferida de los ácidos nucleicos de cadena corta, la mezcla de muestra contiene aproximadamente 30% (v/v) de alcohol. Mediante ello se alcanza un método efectivo para la concentración de ácidos nucleicos de cadena corta para poner a disposición una concentración  $>2$  veces,  $> 5$  veces o concretamente más de 10 veces de los ácidos nucleicos de cadena corta. En general puede determinarse el potencial de concentración del método mediante comparación de los rendimientos de un fragmento de ácidos nucleicos de 200 pares de bases de longitud y un fragmento de ácido nucleicos de 1000 pares de bases de longitud. Con ello, el método de acuerdo con la invención supera también claramente el método del estado de la técnica.

50

Según una forma de operar del método de 1 o 2 etapas, en la etapa (a) el alcohol en la mezcla de prueba está en una concentración que es elegida de entre el grupo

55

- $\geq 19\%$  (v/v);
- $\geq 25\%$  (v/v);
- $\geq 15$  a  $\leq 25$  (v/v)
- $\geq 25$  a  $\leq 32\%$  (v/v);
- $\geq 28$  a  $\leq 32\%$  (v/v).

60

5 En el método de 2 etapas, en el cual en la etapa (x) ocurre un empobrecimiento de los ácidos nucleicos de cadena larga, la concentración de los compuestos caotrópicos en la etapa a) es  $\geq$  la concentración en compuestos caotrópicos en la etapa (x). Claramente se alcanzan mejores resultados cuando no se reduce la concentración de los compuestos caotrópicos en la transición de la etapa (x) del método a la etapa a) del método, sino que se eleva la concentración de alcohol. Preferiblemente en la verdadera etapa de aislamiento a) se emplea incluso una concentración más elevada de compuestos caotrópicos así como una concentración más elevada de alcohol que en la etapa (x), para promover la unión de los ácidos nucleicos de cadena corta al material de soporte.

10 Según una forma de operar, el método de acuerdo con la invención exhibe por lo menos uno de los siguientes rasgos:

- que la concentración de los compuestos caotrópicos en la mezcla en la etapa (x) y/o etapa (a) es  $\geq 1$  mol/l hasta el límite de solubilidad; y/o
- 15 • que la concentración de los compuestos caotrópicos en la mezcla en la etapa (x) y/o etapa (a) es  $\geq 2$  mol/l, 2,4 mol/l o  $\geq 2,6$  mol/l; y/o
- que la concentración de los compuestos caotrópicos en la etapa (a) es  $\geq$  a la concentración de los compuestos caotrópicos en la etapa (x); y/o
- 20 • que el material de partida que contiene ácidos nucleicos es tratado antes con tampón de lisis; y/o
- que el material de partida que contiene ácido nucleicos no contiene células y no se ejecuta lisis celular; y/o
- 25 • que el material de partida que contiene ácidos nucleicos es tratado antes con un tampón de liberación; y/o
- que no se ejecuta extracción con fenol; y/o
- que los ácidos nucleicos aislados son tratados con ADNsa; y/o
- 30 • que por lo menos el 30% de los ácidos nucleicos de cadena corta pueden ser aislados por medio del método; y/o
- que por lo menos el 50% de los ácidos nucleicos de cadena corta pueden ser aislados por medio del método; y/o
- 35 • que por lo menos el 60% de los ácidos nucleicos de cadena corta pueden ser aislados por medio del método; y/o
- que se alcanza una concentración de por lo menos 2 veces de los ácidos nucleicos de cadena corta; y/o
- que se alcanza una concentración de por lo menos 5 veces de los ácidos nucleicos de cadena corta; y/o
- 40 • que se alcanza una concentración de por lo menos 10 veces de los ácidos nucleicos de cadena corta; y/o
- que se aíslan y/o concentran ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud, que son elegidos de entre el grupo de ácidos nucleicos con una longitud de  $\leq 500$  pares de bases,  $\leq 400$  pares de bases y/o  $\leq 300$  pares de bases y/o  $\geq 100$  pares de bases; y/o
- 45 • se aíslan ácidos nucleicos extracelulares.

50 El material de soporte que liga ácidos nucleicos es preferiblemente una fase sólida que liga ácidos nucleicos, del grupo de los materiales que contienen sílice, gel de sílice, dióxido de silicio, vidrio, zeolita, caolín, sílica gel y cerámica. Finalmente es determinante que el material de soporte esté en capacidad de ligar ácidos nucleicos. De modo particularmente preferido se emplean materiales de sílice. Aquí se ha probado tanto el uso de membranas de sílice como también de partículas magnéticas que exhiben una superficie de sílice o de vidrio. Éstas pueden tener esencialmente forma de perla o esfera y exhiben preferiblemente un tamaño de partícula en el rango de 0,02-30  $\mu\text{m}$ , preferiblemente 0,05-15  $\mu\text{m}$  y particularmente preferido de 0,1-10  $\mu\text{m}$ . Por ejemplo en la inscripción internacional de patente WO 55 01/71732 se describen partículas magnéticas que pueden ser empleadas de manera ventajosa en el método de acuerdo con la invención, sobre lo que se hace aquí total referencia sustancial.

60 Después de la incubación de la matriz de soporte con el material que contiene ácidos nucleicos, ocurre la separación de los ácidos nucleicos del líquido remanente de muestra. Esto es logrado en general mediante la separación de los ácidos nucleicos unidos de acuerdo con la invención a la partícula - empleando partículas magnéticas de sílice con ayuda de un



- campo magnético. Por ejemplo, las partículas magnéticas pueden extenderse sobre la pared del matraz en el que había tenido lugar la incubación. A continuación puede eliminarse el líquido con los componentes de la muestra que no se ligaron a las partículas magnéticas. En la etapa (x) se procesa nuevamente sobrenadante (los ácidos nucleicos de cadena larga están unidos las partículas magnéticas); en la etapa a) se ligan los ácidos nucleicos de cadena corta a las partículas magnéticas y en la etapa b) dado el caso después de etapas de lavado opcionalmente se hace elución de las partículas. El procesamiento depende del tipo de matraz en el que ha ocurrido la incubación. Son por ejemplo etapas adecuadas del método para la eliminación del líquido, separación por decantación, aspiración con pipeta, separación por filtración o succión del líquido.
- 10 Como se explicó, también pueden emplearse por ejemplo membranas de sílice. Los líquidos pueden ser eliminados aquí mediante centrifugación o aplicación de vacío o mediante presión. En muchas aplicaciones del método de acuerdo con la invención, en particular en la purificación de ADN fetal de muestras de sangre materna, están presentes los ácidos nucleicos que van a ser purificados, en pequeñas concentraciones en grandes volúmenes. En el uso de una membrana de sílice frecuentemente existe en el estado de la técnica el problema, según el cual grandes volúmenes de muestra pueden obstruir la membrana. Según el método de acuerdo con la invención, sin embargo este problema no ocurre, puesto que pueden emplearse sustancias tampón/concentraciones especiales. Esto es ventajoso en particular cuando se emplean detergentes.
- 15 Los ácidos nucleicos, que pueden ser aislados con el presente método son por ejemplo ADN, ARN, mARN, ácidos nucleicos mitocondriales, modificados por vía epigenética, de cuerda sencilla, de cuerda doble, circulares, plásmidos, cósmidos, artificiales o sintéticos así como cADN y fragmentos de ellos. El método de acuerdo con la invención es adecuado en particular para la concentración de ácidos nucleicos de cadena corta (por ejemplo ADN y ARN en toda forma, incluyendo ARN que no codifica como por ejemplo miARN o ácidos nucleicos sintéticos) con una longitud de  $\leq 1000$  pares de bases,  $\leq 800$  pares de bases,  $\leq 500$  pares de bases, o  $\leq 300$  pares de bases. Según una forma de operar se aíslan y/o concentran ácidos nucleicos de cadena corta con una longitud, que son elegidos de entre el grupo de los ácidos nucleicos con una longitud de  $\leq 500$  pares de bases,  $\leq 400$  pares de bases,  $\leq 300$  pares de bases y/o  $\geq 50$  pares de bases,  $\geq 100$  pares de bases. Preferiblemente se purifica ADN y/o ARN. De modo particularmente eficiente se purifican ADN o ARN de una longitud de  $\geq 50$  nucleótidos. Para la producción de ARN de cadena corta, preferiblemente el ácido nucleico purificado es tratado con ADNsa.
- 20 El tamaño de los ácidos nucleicos aislados puede variar o ser controlado también mediante la elección de la concentración de alcohol, en particular en combinación con la concentración de agentes caotrópicos. El método de acuerdo con la invención hace también posible en ambas variantes (método de 1 etapa y método de 2 etapas) un aislamiento efectivo de ácidos nucleicos de cadena corta. Mediante el ajuste adecuado de condiciones de unión como se describen acá, puede lograrse también una concentración específica de los ácidos nucleicos de cadena corta. El método es adecuado en particular para la concentración de ácidos nucleicos fetales, como prueban también los siguientes ejemplos.
- 25 De allí que el método de acuerdo con la invención puede ser empleado de manera ventajosa, para aislar ácidos nucleicos extracelulares, como aislar por ejemplo ADN fetal de sangre materna. Por ello, con la presente invención se pone a disposición también un método para la concentración de ácidos nucleicos fetales de una muestra de sangre, en particular de plasma o suero sanguíneo, el cual se caracteriza porque el método de acuerdo con la invención es ejecutado para el aislamiento/concentración de ácidos nucleicos de cadena corta. Los detalles del método se han establecido arriba.
- 30 Sin embargo, se encuentran otros ámbitos de aplicación por ejemplo en el campo forense y otros, donde es decisiva la purificación de ácidos nucleicos pequeños. Además, el método de acuerdo con la invención puede ser empleado también en el marco del diagnóstico, para purificar de una muestra por ejemplo ácidos nucleicos tumorales que circulan libremente, como por ejemplo purificar sangre.
- 35 Además, con la presente invención se pone a disposición un método para la concentración de ácidos nucleicos de una muestra, excepto la concentración de ácidos nucleicos fetales de una muestra de sangre, el cual se caracteriza porque el método de acuerdo con la invención es ejecutado para el aislamiento/purificación de ácidos nucleicos de cadena corta. Arriba se han establecido detalles del método.
- 40 El método de acuerdo con la invención es adecuado en particular para la aplicación en el diagnóstico. También puede ser automatizado y de allí que puede ser empleado para la aplicación sobre correspondientes robots de purificación. Además se pone a disposición un kit para el aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos, en particular de ácidos nucleicos de cadena corta, de un material de partida que contiene ácidos nucleicos, que exhibe tampón y/o reactivos y
- 45
- 50
- 55

opcionalmente por lo menos un material de soporte que liga ácidos nucleicos para la ejecución del método de acuerdo con la invención. Los detalles del método se han establecido arriba.

5 Un kit correspondiente puede ser empleado para la purificación del ADN fetal a partir de una muestra de sangre. Además se pone a disposición un kit correspondiente para la purificación de ácidos nucleicos de cadena corta de una muestra, a excepción de la concentración de ADN fetal de una muestra de sangre.

10 Los kits de acuerdo con la invención pueden ser utilizados en particular en el campo del diagnóstico y para propósitos medicinales. Ellos pueden ser empleados de manera automatizada.

#### EJEMPLOS

15 La presente invención es ilustrada ahora mediante ejemplos. Los ensayos ejecutados ocurrieron en virtud de los escritos de experimento descritos a continuación. Los ejemplos que no son registrados en las reivindicaciones son ejemplos de comparación.

20 El punto de partida para la aplicación del método de acuerdo con la invención, para el aislamiento de ADN fetal que circula libremente de sangre materna con simultánea concentración del ADN fetal respecto al ADN materno, es el hallazgo descrito en la literatura según el cual se diferencia la longitud promedio de ambas especies de ácido nucleicos. Actualmente se asume de ello, que la longitud promedio de ADN fetal es inferior a 500 pares de bases, la longitud promedio de ADN materno es superior a 500 pares de bases.

#### Ejemplo 1: Prueba para la determinación de la longitud promedio de ADN fetal y materno

25 Se emplearon tres conjuntos diferentes de plasma, que habían sido construidos a partir de sangre de mujeres embarazadas con fetos humanos, para la investigación de la distribución de tamaño del ADN que circula libremente allí encontrado. Los conjuntos de plasma eran conjuntos A, B y C. El conjunto A contenía plasma de muestras de sangre de mujeres embarazadas en el primer al tercer trimestre de la gestación. Los conjuntos B y C contenían en cada caso plasma de sangre que habían sido tomados de mujeres embarazadas en el primer y segundo trimestre de la gestación; un punto de tiempo, que contiene aún pequeñas cantidades de ADN fetal que circula libremente, pero es de gran relevancia para el punto de tiempo de diagnóstico clínico.

35 Como material de partida se emplearon 10 ml de plasma y para el conjunto A 5 ml de plasma. Los procedimientos fueron según el protocolo QIAamp Blood DNA Midi (QIAGEN), el cual se ajustó a un volumen de 10 ml. Se realizó elución en cada caso con 300 µl de tampón AE (QIAGEN, disponible comercialmente). Después de la elución se realizó una precipitación con etanol/acetato de sodio y se incorporaron las pellas secas en 15 µl de tampón EB (QIAGEN, disponible comercialmente). Después de una electroforesis en gel de agarosa se recortaron las fracciones grandes individuales del gel y se ejecutó una extracción de gel según el protocolo al vacío QIAquick para la extracción del gel. Se realizó extracción por fracción de gel en 100 µl; en el subsiguiente PCR se emplearon en cada caso 20 µl del producto de la elución en una determinación doble. Se realizó amplificación con cebadores correspondientes hasta un locus del SRY para la detección del ADN fetal que circula libremente. SRY es detectable sólo para individuos humanos. Puesto que se empleó exclusivamente sangre de embarazadas, que con seguridad tienen un feto humano, todas las señales SRY eran atribuibles a origen de ADN fetal. Además se realizó amplificación con cebadores correspondientes al locus c-myc para la detección ADN total que circula libre en sangre materna. La ampliación fue realizada en un instrumento ABI 7500 (Applied Biosystems). Al respecto surgieron los resultados mostrados en las Fig. 1 y Fig. 2. La Fig. 1 muestra la distribución de tamaño del ADN fetal en función de los conjuntos empleados. La Fig. 2 muestra la distribución de tamaño del ADN fetal en función de los conjuntos empleados.

45 Este experimento muestra que, como se describe en la literatura, el ADN fetal está presente sólo en fragmentos cortos. Al respecto, la fracción principal está claramente en la fracción inferior a 300 pares de bases, una parte significativa muestra longitudes de fragmento de 300 a 500 pares de bases. Sólo muy poco del ADN fetal que circula libremente en la sangre materna tiene una longitud mayor a 500 pares de bases. Por otro lado, no todo el ADN materno es mayor a 500 pares de bases. En aproximadamente la mitad del ADN materno, que circula libremente en la sangre, tiene así mismo una longitud de sólo 500 pares de bases y menos, sin embargo la otra mitad tiene claramente una longitud mayor a 500 pares de bases. Por medio de un fraccionamiento de tamaño de los ácidos nucleicos aislados/concentrados, se alcanza de acuerdo con ello una concentración significativa de ADN fetal respecto al ADN materno.

#### Ejemplo 2

5 Para simular la diferente distribución de tamaño de ADN fetal (la fracción predominante tiene una longitud inferior a 300 pares de bases, ver ejemplo 1) y ADN materno (en lo esencial con una longitud mayor a 500 pares de bases), se añadieron al plasma sanguíneo como base de fondo dos productos de amplificación diferentes de PCR. Al respecto, un fragmento de 219 pares de bases debería simular el ADN fetal, un fragmento de 1018 pares de bases de longitud debería simular el ADN materno. En un primer experimento se emplearon para ello cantidades relativamente altas de este producto de amplificación de PCR, es decir en cada caso  $2 \times 10^6$  copias en 600  $\mu$ l de plasma. Al respecto, se procedió según el siguiente protocolo:

10 A 600  $\mu$ l de plasma en un matraz de 5 ml se añadieron 90  $\mu$ l de proteasa (QIAGEN) y 600  $\mu$ l de tampón AL (QIAGEN, obtenible comercialmente) que contenía guanidina. Después de mezclar mediante aparato Vortexen se incubó la carga para la lisis por 15 min a 56 °C. Después de la lisis se añadieron los productos de amplificación de PCR de 219 o 1018 pares de bases de longitud al producto de la lisis. Se ajustaron las condiciones de unión con 100  $\mu$ l de isopropanol de modo que mediante ello en la muestra total resultó una concentración de 6,9 % (p/v) de isopropanol.

15 Después de mezclar mediante aparato Vortexen se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Para la unión se añadieron 50  $\mu$ l de partículas magnéticas MagAttract con superficie de sílice (QIAGEN) y se dejó unir la carga por 5 min sobre un agitador. Después de la unión, se separaron por medio de un imán las partículas del residuo y se removió el sobrenadante. El sobrenadante fue mantenido a 4 °C hasta el otro tratamiento.

20 Tratamiento de las partículas MagAttract

25 Después de la remoción del sobrenadante se mezclaron sobre un agitador de placas las partículas magnéticas con 750  $\mu$ l de tampón AW1 (QIAGEN, obtenible comercialmente) por 5 min y a continuación se transfirió la suspensión de partículas a un matraz de reacción de 1,5 ml. Después de la separación magnética en este matraz, se removió el sobrenadante y se descartó. A continuación se lavaron las partículas aún (en cada caso después de 5 min de incubación sobre un agitador) con 750  $\mu$ l de tampón AW2 (QIAGEN, obtenible comercialmente) y 750  $\mu$ l de etanol, uno después de otro. Después de la etapa de lavado con alcohol, las partículas se secaron en un bloque caliente por 10 min a 56 °C. Para la elución de los ácidos nucleicos unidos a las partículas se emplearon 200  $\mu$ l de agua libre de ARNse (QIAGEN), donde para la elución se agitó nuevamente por 5 min. Después de la separación magnética, el producto de elución fue transferido a un nuevo matraz.

30 Tratamiento del sobrenadante de la unión

35 La separación/sobrenadante de la unión (el material no unido a las partículas magnéticas) fue acondicionado como sigue. Al sobrenadante después de la unión se añadieron 2 ml de tampón B6 (GuHCl 2,5 M, 50% isopropanol), de modo que resultó una concentración de isopropanol de 32,4% (v/v), se mezcló mediante aparato Vortexen y se incubó a temperatura ambiente por 10 min.

40 Después de la incubación se añadieron 50  $\mu$ l de partículas MagAttract y se procedió de manera exacta a como se describió para la primera carga de unión (lavado con AW1 (QIAGEN, obtenible comercialmente), AW2 (QIAGEN, obtenible comercialmente), etanol, elución en agua libre de ARNsa). De modo alternativo se añadieron al sobrenadante después de la unión 2 ml de isopropanol 100% (tampón B11), de modo que resultó una concentración de isopropanol de 61,9% (v/v). Se tomaron de los productos de elución alícuotas iguales y con ayuda de un PCR en tiempo real se realizó amplificación a un Amplicon de 119 pares de bases, de modo que tanto del fragmento de 219 pares de bases como también del fragmento de 1018 pares de bases resultó un fragmento idéntico. La detección del Amplicon ocurrió en el curso del PCR con ayuda de SYBR Green.

45 Al respecto, resulta el cuadro mostrado en la Fig. 3.

50 Este experimento muestra que tanto del fragmento de 219 pares de bases como también del fragmento de 1018 pares de bases, bajo las condiciones elegidas de unión, sólo pocos ácidos nucleicos se ligan a la primera partícula de MagAttract, en cada caso aproximadamente sólo 10%. Por nuevo ajuste de las condiciones de unión con tampón B6 o bien B11 resulta sin embargo de manera sorprendente una diferencia en el rendimiento en función del tamaño del fragmento. Mientras que con ayuda de tampón B6 puede recuperarse sobre 80% del ADN corto (el cual representa el ADN fetal), para el ADN largo (el cual representa el ADN materno) resulta sólo un rendimiento de aproximadamente 50%. Por el uso de tampón B11 no surgen por el contrario diferencias esenciales en el rendimiento entre las dos longitudes de fragmento de ADN.

Este ensayo muestra que con ayuda de un sistema de unión de dos etapas, con ayuda de dos fases sólidas bajo condiciones adecuadas, puede concentrarse el ADN fetal respecto al ADN materno, donde están para registrarse sólo muy pequeñas pérdidas rendimiento en ADN fetal.

5 Ejemplo 3

Se procedió como se describe en el ejemplo 2, sólo que esta vez se emplearon sólo 200.000 copias del fragmento definido, para simular un cuadro realista del verdadero número de copias que circulan libremente en la sangre. Esta vez estaban unidas a la matriz bajo las primeras condiciones con 100 µl de tampón B11 (ver arriba) + 1,2 ml de tampón B6, de modo que resultó una concentración en isopropanol de 20,3% (v/v) (ver arriba). Para las condiciones alternativas para la unión sobre la matriz se añadieron 100 µl de tampón B11 y 2,0 ml de tampón B6 para el producto de la lisis de plasma. Además, en la carga de unión se unieron los fragmentos de ADN bajo las dos condiciones de tampón arriba mencionadas, en cada caso a una matriz MagAttract o bien minicolumna QIAamp.

15 Para ello se procedió como sigue. Los tampones B11 y B6 fueron añadidos al sobrenadante, mezclados, e incubados por 10 min a temperatura ambiente. Se purificó el producto de la lisis de dos muestras y se añadió con ayuda de un tubo de extensión (QIAGEN) bajo vacío a una minicolumna QIAamp (QIAGEN). Se lavó con 1000 µl (para unión sobre partículas MagAttract) o bien 750 µl (para unión sobre minicolumnas QIAamp) AW1 (QIAGEN, disponible comercialmente), AW2 (QIAGEN, disponible comercialmente) y etanol, uno después de otro. Para el secado se realizó  
20 centrifugación a las columnas por 3 min a 14.000 rpm y se colocaron las columnas por 5 min en un bloque caliente a 56 °C. Las partículas MagAttract fueron tratadas como se describe en el ejemplo 2). Aquí se realizó elución también con 200 µl de agua libre de ARNs (centrifugación por 1 min a 14.000 rpm). El subsiguiente PCR en tiempo real dio al respecto el cuadro mostrado en la Fig. 4.

25 Este ensayo mostró de manera sorprendente que para la misma composición de tampón, escasamente hace una diferencia si como fase sólida se emplean partículas magnéticas o una membrana de sílice. Por adición de 1.2 ml de tampón B6 se concentraron fragmentos largos de ADN (aproximadamente 1000 pares de bases) en la muestra que contenía ADN, mientras que de manera sorprendente, contrariamente, con la adición de 2,0 ml de tampón B6 se concentraron fragmentos cortos de ADN (aproximadamente 200 pares de bases). Con el empleo de una membrana de sílice (QIAamp Mini) el rendimiento en ADN es en total más alto que con partículas MagAttract, sin embargo también es  
30 menos marcada la unión de ADN que depende del tamaño. Una combinación de partículas magnéticas (primera matriz) y membrana de sílice (segunda matriz) en una extracción de ADN en dos etapas (para la cual se emplea nuevamente el sobrenadante que contenía ADN de la primera unión y está unido a una membrana de sílice) es adecuado por ello de manera sobresaliente, para concentrar de manera eficiente fragmentos cortos de ADN en dos etapas y con ello  
35 también concentrar ADN fetal respecto a ADN materno en la segunda matriz.

Ejemplo 4

Se procedió de manera similar a lo indicado en el ejemplo 3, sólo que esta vez se trabajó con una muestra real de sangre y se utilizó un método de unión de dos etapas. Al respecto, para la primera etapa de unión se añadió a la muestra 1.2 ml de tampón B6, se ajustó entonces la separación o bien el sobrenadante de la primera etapa de unión con tampón B6 adicional hasta un total de 2,0 ml de tampón B6. El material de partida era un conjunto de muestras de plasma de mujeres embarazadas del primer y segundo trimestre, de las cuales había seguridad que esperaba un niño. Para la detección del ADN fetal se realizó amplificación en el subsiguiente PCR en tiempo real del locus SRY, para la detección del ADN total, del locus 18S (ver también ejemplo 1). Para la comparación se ejecutó un protocolo de una columna según el protocolo al vacío para virus QIAamp MinElute, el cual corresponde al estado de la técnica. En la Fig. 5 se muestran los resultados.

El resultado de este experimento es coherente con el resultado del ejemplo 3, que demostró que el sistema artificial con fragmentos de 219 pares de bases y 1018 pares de bases es una buena simulación para la situación real (ejemplo 4). Mientras que mediante la primera matriz el resultado es tan bueno como que no se pierde ADN fetal, cantidades significativas de ADN materno se ligan ya a la primera matriz (aquí: partículas magnéticas MagAttract). De allí que se reduce de manera efectiva la cantidad de ADN materno en esta etapa (x) y también ya se reduce la cantidad durante la purificación en la segunda columna. En la comparación con el estado de la técnica (MinElute de una etapa) el método de dos matrices trae no sólo un conteo absoluto aumentado de ADN fetal, sino que provoca mediante la por lo menos parcial reducción del ADN materno por la primera matriz, también una relación claramente mejor del ADN fetal al materno, lo cual promueve claramente la capacidad para ser detectada de la sustancia hereditaria fetal en sangre materna. La Fig. 6 clarifica una vez más la relación mejorada de ADN fetal a ADN materno. Mientras que en la purificación de una etapa según el estado de la técnica surge una proporción de aproximadamente 15% de ADN fetal en

el producto de elución (determinado de manera cuantitativa sobre el SRY/18S dúplex PCR en tiempo real), la proporción en una purificación de dos etapas es más que duplicada con una proporción de 30 a 40%.

Ejemplo 5

5 Se procedió como se describe en el ejemplo 4, sólo que esta vez se empleó un volumen mayor de plasma sanguíneo (3 ml por carga). Además se compararon mutuamente diferentes combinaciones de superficies de unión (partículas MagAttract y mini columnas QIAamp) así como diferentes cantidades de MagAttract. Adicionalmente se realizó lisis según el protocolo de membrana de dos etapas por 30 min, no sólo por 15 min. En la Fig. 7 se muestran los resultados. Este experimento confirma los resultados de los experimentos realizados antes. La comparación con el protocolo de una etapa del estado de la técnica da con el protocolo de dos etapas según la invención siempre relaciones mejoradas de ADN fetal a ADN materno y concretamente independiente de si en la segunda etapa de unión se emplean partículas magnéticas con superficie de sílice o membranas de sílice. Al respecto, una lisis prolongada de 30 min parece mejorar aún adicionalmente la relación de ADN fetal a ADN materno a favor del ADN fetal, de modo que mediante ello puede reducirse claramente la cantidad de ADN materno. Este mejoramiento de la relación es mostrado también en la Fig. 8.

Mientras que en el protocolo de una matriz según el estado de la técnica surge sólo una relación de ADN fetal a ADN materno de aproximadamente 15%, mediante el protocolo de dos matrices esta relación se eleva hasta 50% de ADN fetal. La proporción de ADN fetal en el ADN que circula purificado de plasma materno puede ser elevada claramente también en comparación con el estado de la técnica.

La tabla de la Fig. 9 muestra además diferentes condiciones de reacción en la muestra, bajo las cuales ocurre la unión de los ácidos nucleicos al material de soporte (según el método de 1 etapa de acuerdo con la invención). Como material de soporte se emplearon partículas MagAttract. En la Fig. 10 se muestran los resultados.

Ejemplo 6

Para comparar la eficiencia del método de acuerdo con la invención para la extracción de ADN que circula libremente de plasma humano, se compararon mutuamente los siguientes protocolos:

1. El método de 1 etapa empleado en el estado de la técnica de ADN que circula libremente, es decir, el protocolo de virus QIAamp MinElute modificado indicado a continuación
2. El protocolo de 1 etapa según la presente invención para la extracción/aislamiento de ADN que circula libremente ("un paso").

Para esta investigación se emplearon y probaron conjuntos de plasma de donantes humanos, en cuatro repeticiones de extracción por protocolo. La extracción de ADN ocurrió según los respectivos protocolos. Se emplearon 5 ml de plasma; el ADN fue sometido a elución en 50 µl.

1. Protocolo al vacío para virus QIAamp MinElute modificado

- Estado de la técnica

Los ácidos nucleicos que circulan libremente fueron aislados de 5 ml de plasma de EDTA. El protocolo ocurrió como sigue:

Liberación -condiciones

Se tomaron con pipeta 750 µl de proteasa QIAGEN (disueltos en solvente de proteasa) en un matraz de 50 ml. Después se añadieron 5 ml de plasma y 5 ml del tampón AL que contenía guanidina (con 5,6 µg de vehículo ARN). Se cerró el matraz y se agitó bien con Vórtex, para obtener una solución homogénea. Se incubó entonces la solución homogénea por 30 minutos a 56°C en el baño de agua.

Adición del fragmento marcador

Después se añadieron hasta dar mezcla homogénea 20 µl de una mezcla de fragmento marcador, para simular la situación de ácidos nucleicos fetales mezclados con ácidos nucleicos maternos. Para ello se añadieron 200.000 copias de fragmentos de 219 pares de bases (correspondientes al ADN fetal) y 200,000 copias de fragmentos de 1.018 pares de bases (correspondientes al ADN materno).

Unión

5 Se añadieron 6 ml de etanol al producto de la lisis. Se agitó la mezcla por medio de Vórtex y se incubó 5 minutos sobre el hielo. El producto de la lisis fue cargado sobre una minicolumna QIAamp, donde se fijó un tubo de extensión a un dispositivo de vacío QIAvac 24. Se tiró el producto de la lisis mediante la aplicación de vacío a través de la columna. Se retiraron cuidadosamente los tubos de extensión.

Etapas de lavado

10 Se añadieron a la columna 600 µl del tampón AW1 (QIAGEN, obtenible comercialmente) y se aplicó vacío. Esta etapa de lavado fue repetida con 750 µl del tampón AW2 (QIAGEN, obtenible comercialmente) y con 750 µl de etanol.

15 Se colocaron las columnas en tubos de recolección de 2 ml, se realizó centrifugación por 3 minutos a 14.000 rpm. Después se transfirieron las columnas a tubos de recolección frescos y se secaron en un bloque caliente a 56°C por 10 minutos.

Elución

20 Se colocaron las columnas secas en matraces de 1,5, ml y se añadieron 50 µl del tampón AVE (QIAGEN, obtenible comercialmente) a cada columna; incubación por 3 minutos y centrifugación por un minuto a 14.000 rpm.

Los ácidos nucleicos así obtenidos se encuentran en el producto de elución.

2. Aislamiento de los ácidos nucleico que circula libremente según el método de 1 etapa de acuerdo con la invención

25 Liberación

30 Se tomaron con pipeta 750 µl de proteasa QIAGEN (disueltos en solvente de proteasa) en un matraz de 50 ml. Se añadieron allí 5 ml de plasma y 5 ml del tampón AL de lisis/liberación que contenía guanidina (QIAGEN, disponible comercialmente, sin vehículo ARN).

Se cerró el matraz y se agitó bien con Vórtex, para formar una solución homogénea. Se incubó la solución homogénea por 30 minutos a 56°C en el baño de agua.

35 Adición de los fragmentos marcadores

También aquí se añadieron nuevamente 20 µl de una mezcla de fragmento marcador (200.000 copias de fragmentos de 200 pares de bases y 200.000 copias de fragmentos de 1.000 pares de bases, para simular la relación de ADN fetal a ADN materno).

40 Unión

45 Después de ello se ajustaron mediante adición de tampón de unión las siguientes condiciones de unión: aproximadamente 25 a 35% de isopropanol y más de 2M de compuestos caotrópicos. Son decisivas las condiciones de reacción en la muestra total y no en el tampón, puesto que las condiciones de reacción en la mezcla son cruciales para la eficiencia de unión de los ácidos nucleicos de cadena corta al material de soporte.

Se agitó la muestra con Vórtex y se incubó por 5 minutos sobre hielo.

50 El producto de la lisis mezclado con el tampón de unión fue cargado entonces sobre una minicolumna QIAamp con tubo de extensión, el cual estaba fijo a un dispositivo de vacío QIAvac 24. El producto de la lisis fue tirado a través de la columna mediante aplicación de vacío. Los tubos de extensión fueron entonces retirados cuidadosamente.

55 Etapas de lavado

Se añadieron sobre la columna 600 µl de un tampón de lavado, como por ejemplo AW1 (QIAGEN, disponible comercialmente), y se succionaron por medio de vacío. Pueden seguir otras etapas de lavado con 750 µl del tampón AW2 (QIAGEN, disponible comercialmente) y con 750 µl de etanol.

Se colocaron las columnas lavadas en tubos de recolección de 2 ml y se aplicó centrifugación por 3 minutos a 14.000 rpm. Se colocaron entonces las columnas en tubos frescos de recolección y se secaron en un bloque caliente a 56°C por 10 minutos.

5 Elución

Se colocaron las columnas en matraces de 1,5 ml y se añadieron a la columna 50 µl del tampón de elución AVE (QIAGEN, obtenible comercialmente), la incubación ocurrió por 3 minutos, después de ello ocurrió una etapa de centrifugación por un minuto a 14.000 rpm. Los ácidos nucleicos de cadena corta predominantes se encuentran en el producto de elución.

3. Resultados

15 El rendimiento en ADN según los protocolos individuales fue medido mediante un PCR cuantitativo, en tiempo real, dúplex donde se emplearon sondas Taqman (4 repeticiones de PCR por extracción de ADN). El ADN fue determinado por un lado mediante un objetivo Y-cromosómico (DYS14) y un objetivo 18S rADN específico. Mediante ambos métodos se determinó finalmente la concentración del ADN en la muestra. Puesto que el 18S rADN está en ambos cromosomas, ellos están en una cantidad que duplica el objetivo Y cromosómico. El rendimiento en ADN fue indicado como copias de genoma haploide por ml de plasma.

20 La concentración de pequeños fragmentos de ADN fue determinada independientemente, en los fragmentos concentrados de 200 pares de bases y 1.000 pares de bases de ADN en un PCR dúplex en tiempo real.

25 Los resultados son representados en las figuras 11 y siguientes.

La figura 11 muestra el rendimiento en ADN por muestra (se probaron 4 muestras por cada método de extracción). Así, se muestra el contenido total de ADN que fue obtenido por medio de los métodos individuales. Como muestra la vista general, con el método de 1 etapa se alcanza un rendimiento claramente superior comparado con el método conocido de 1 etapa del estado de la técnica (MinElute). El rendimiento en ADN es varias veces mayor, lo cual es particularmente ventajoso para la determinación de ácidos nucleicos de baja expresión/presencia.

35 La figura 12 muestra el rendimiento de los 200 pares de bases (simulan los ácidos nucleicos fetales) y 1.000 pares de bases (simulan los fragmentos maternos de cadena larga) de fragmentos de ADN inyectados. Como se establece arriba, se inyectaron los fragmentos de 200 pares de bases y los fragmentos de 1.000 pares de bases en una relación de 1:1, es decir por cada 200.000 copias. La gráfica de la figura 12 muestra si en los ácidos nucleicos purificados la relación de ácidos nucleicos de cadena corta a ácidos nucleicos de cadena larga sigue siendo 1:1, o si se alcanzó una concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta. Como muestra la figura 12, el método de 1 etapa del estado de la técnica (MinElute) tiene una relación de ácidos nucleicos de cadena larga a ácidos nucleicos de cadena corta de aproximadamente 1:1. De allí que no se logra concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta. Bajo la Fig. 12 se muestra también de manera tabular, como fueron obtenidos muchos de los fragmentos individuales (200 pares de bases y 1.000 pares de bases) de la muestra. De este modo, la información indica por ejemplo que 62,5% de fragmentos de 200 pares de bases y 36% de fragmentos de 1.000 pares de bases fueron purificados, que el 62,5% de las 200.000 copias inyectadas inicialmente de los fragmentos de 200 pares de bases fueron purificadas y con ello aisladas y 36% de las 200.000 copias de los fragmentos de 1.000 pares de bases. Como se muestra, con el método de 1 etapa de acuerdo con la invención se alcanza una clara concentración de los ácidos nucleicos de cadena corta respecto a los ácidos nucleicos de cadena larga. La relación no es mayor a 1:1 (como se inyectaron), sino que se concentraron claramente más ácidos nucleicos de cadena corta y con ello se concentraron en el producto de elución. De allí que el método acuerdo con la invención supera claramente al del estado de la técnica.

50 En la figura 13 se muestra adicionalmente la relación de los fragmentos purificados de 200 pares de bases a los de 1.000 pares de bases. Mientras en el método de 1 etapa conocido en el estado de la técnica se alcanzan valores de aproximadamente 1, la relación en el método de 1 etapa de acuerdo con la invención está desplazada claramente en la dirección de los ácidos nucleicos de cadena corta, los cuales de manera correspondiente son preferiblemente concentrados/aislados. En el método de 2 etapas de acuerdo con la invención, en el cual los ácidos nucleicos de cadena larga son primero empobrecidos en una etapa previa, se logra incluso una concentración de 5 a 10 veces.

60 Como muestran los resultados, el método de 1 etapa de acuerdo con la invención es claramente superior al método de 1 etapa conocido del estado de la técnica. El método de 1 etapa de acuerdo con la invención concentra ácidos nucleicos pequeños durante la preparación, lo que es atribuible a las condiciones únicas de reacción durante la unión, lo cual conduce a una unión preferida de ácidos nucleicos de cadena corta.

Ejemplo 7

A continuación se describe el aislamiento de ácidos nucleicos, en particular ARN circulante, de 5 ml de plasma o suero.

5 Se añaden 1350 µl de tampón AVE (QIAGEN, disponible comercialmente, contiene guanidina) en un matraz a 1350 µg de vehículo ARN liofilizado, de modo que se obtiene una solución de 1 µg/µl. Se mezcla entonces la solución de 1 µg/µl con el tampón AL (QIAGEN, obtenible comercialmente, contiene guanidina). Se ajusta la relación de mezcla de acuerdo al número de muestras. Para el tratamiento de una muestra se mezclan 8,5 ml de tampón AL con 5,6 µl de tampón AVE.  
10 Para más muestras tienen que ajustarse de modo correspondiente las relaciones. Para la mezcla, el matraz es girado 10 veces en ambas direcciones.

15 Se añaden 6 ml de solución de proteasa (QIAGEN, obtenible comercialmente) a una proteasa liofilizada QIAGEN (7.5 A.U, obtenible comercialmente) y se mezcla cuidadosamente.

Se toman con pipeta 500 µl de proteasa QIAGEN en un matraz de 50 ml (tubo) y se añaden los 5 ml de plasma. Después se añaden allí 8,5 ml de tampón AL, mezclados con vehículo ARN (ver arriba) y se agita con Vórtex, para mezclar las sustancias.

20 Se incuba la muestra mezclada por 30 minutos a 56°C.

25 Se añaden 7,5 ml de un tampón de unión al producto de la lisis (contiene aproximadamente 0,5 a 1,5 mol/l de guanidinio, preferiblemente 1 mol/l, e isopropanol aproximadamente 60 - 90 % (v/v); preferiblemente más de 70%). Se agita con Vórtex la mezcla por 30 segundos y se incuba por 5 minutos sobre hielo. Se inserta una minicolumna QIAamp en un VacConnector a un QIAvac 24 Plus y se coloca un tubo de extensión en la minicolumna abierta QIAamp.

Se empaca el producto de la lisis en el tubo de extensión y se aplica vacío. Una vez se pasa el producto de la lisis a través de la columna, se desconecta la bomba de vacío y se equilibra la presión. Se descarta el tubo de extensión.

30 Se retira la columna del soporte de vacío y se transfiere a un matraz de recolección de 2 ml. Se aplica centrifugación a la columna por 1 min a 14000 rpm.

35 Para la preparación de ARN se transfieren con pipeta 10 µl de solución madre de ADNsa I a 70 µl de tampón RDD (QIAGEN, obtenible comercialmente). Se mezcla mediante girando el tubo. Al tampón RDD se añade el juego ADNsa libre de ARNsa (QIAGEN, CAT.No.79254).

40 Se colocan nuevamente las columnas en el soporte de vacío QIAvac 24 Plus. La mezcla de ADNsa I es transferida con pipeta directamente a la minimembrana de gel de sílice QIAamp y se incuba a temperaturas moderadas (20 a 30°C) por 15 minutos.

Después se transfieren con pipeta 600 µl de tampón AW1 (QIAGEN, obtenible comercialmente) a la minicolumna QIAamp. Después se aplica vacío para pasar la mezcla a través de la columna. A continuación se añaden 750 µl de tampón AW2 (QIAGEN, obtenible comercialmente) y se pasan a través de la columna mediante aplicación de vacío.

45 A continuación se añaden a la columna 750 µl de etanol (96-100%) y por medio de vacío se pasan a través de ella. A continuación se retira la minicolumna QIAamp del soporte de vacío y se descarta el VacConnector. Se colocan las columnas en un matraz receptor limpio de 2 ml y se aplica centrifugación a 20.000x g, 14.000 rpm por 3 minutos.

50 Se coloca la columna en un nuevo matraz receptor de 2 ml y con la tapa abierta se seca por 10 minutos a 56°C. Se coloca entonces la minicolumna QIAamp en un matraz de microcentrifugación limpio de 1,5 ml y se descarta el matraz de recolección. Se transfieren con pipeta 20 a 60 µl de tampón AVE (QIAGEN, obtenible comercialmente) al centro de la minimembrana QIAamp. Con la tapa abierta ocurre una incubación por 3 min.

55 A continuación ocurre una etapa de centrifugación a 20.000 x g, 14.000 rpm por 1 min para realizar la elución de ARN. A continuación se añade un inhibidor de ARNsa.

Con el correspondiente protocolo se purifica ARN de cadena corta.

Ejemplo 8



## ES 2 537 336 T3

A continuación se describe otra variante preferida del método de 1 etapa, en la cual se usan concentraciones de alcohol inferiores a 25% (v/v).

5 Esta variante es adecuada en particular para el aislamiento de ADN circulante y (m)ARN de 5 ml de plasma, suero u otro líquido corporal libre de células. A continuación se empleó este método, para purificar ácidos nucleicos circulantes de 5 ml de plasma (ver Fig. 14).

### Lisis

10 Durante la lisis se emplean aproximadamente 1,7 a 2,2 mol/l de tiocianato de guanidinio y 7,5 a 9 (p/v) de detergente.

Para ello se transfieren con pipeta 500 µl de proteinasa K QIAGEN a una cánula de 50 ml y se añaden 5 ml de plasma. Se agregan 4.0 ml de tampón ACL (QIAGEN, contiene 5.6 µg de vehículo RNA), se cierra la tapa y se mezcla mediante pulsos de Vórtex por 30 s.

15 Se calienta la muestra a 60°C y se incuba por 30 min. Se escurre brevemente la cánula, para remover las gotas del lado interior de la tapa.

### Unión

20 Durante la unión se emplean entre 2,1 y 2,5 mol/l de tiocianato de guanidinio, 9 a 11 % (p/v) de detergente así como 19 a 21 % (v/v) de isopropanol. Para ello se añadieron 9.0 ml de tampón ACB tampón (QIAGEN) al producto de la lisis, se cerró la tapa y se mezcló exhaustivamente mediante pulsos de Vórtex por 15-30 s. Se incuba la mezcla por 5 min sobre hielo.

25 Para la purificación puede emplearse una columna (minicolumna QIAamp). Se coloca la columna en un VacConnector y se coloca un tubo de alargamiento de 20 ml en la columna abierta. Al respecto, el tubo de alargamiento tiene que emplearse fijo en la columna, para prevenir una pérdida de la muestra. El producto de la lisis de la etapa es introducido en la cánula de alargamiento de la columna y se pone en funcionamiento la bomba de vacío. Cuando la totalidad del producto de la lisis ha pasado a través de la columna, se desconecta la bomba de vacío y se reduce la presión a 0 mbar. La cánula de alargamiento es retirada cuidadosamente.

### Lavado

35 Para el lavado se añaden 600 µl de tampón ACW1 (QIAGEN) a la columna. Se deja abierta la tapa de la columna y se pone en funcionamiento la bomba de vacío. Una vez todo el tampón ACW1 ha pasado a través de la columna, se desconecta la bomba de vacío y se reduce la presión a 0 mbar.

40 Se añaden a la columna 750 µl de tampón del tampón de lavado ACW2 (QIAGEN). Se deja abierta la tapa de la columna y se conecta la bomba de vacío. Después de que la totalidad del tampón ACW2 ha pasado por la columna, se desconecta la bomba de vacío y se reduce la presión a 0 mbar.

45 Después de ello se agregan 750 µl de etanol (96-100%) a la columna. Se deja abierta la tapa de la columna y se conecta la bomba de vacío. Después de que la totalidad del etanol ha pasado a través de la columna, se desconecta la bomba de vacío y se reduce la presión a 0 mbar.

Se sella la tapa de la columna y se coloca la columna en una cánula limpia de recolección. Después de ello se hace centrifugación a la columna con toda velocidad (20,000 x g, 14,000 rpm) por 3 min.

### Elución

Se coloca la columna en una nueva cánula de recolección de 2 ml, se cierra la tapa y se incuba el compuesto a 56°C por 10 min, para secar por completo la membrana.

55 Se coloca la columna en una cánula de elución limpia de 1.5 ml y se retira la cánula de recolección. Se aplican 20-150 µl de tampón de elución (tampón AVE, QIAGEN) en el centro de la membrana de la columna. Se coloca la tapa y se incuba a temperatura ambiente por 3 min.

60 Se hace centrifugación a toda velocidad por 1 min (20,000 x g; 14,000 rpm), para realizar la elución de los ácidos nucleicos. En el producto de elución están presentes tanto el ADN como también ARN circulantes.

5 En la in Fig. 14 se muestran los resultados de la purificación según el protocolo del ejemplo 8. Se purificó como  
 10 referencia ADN que circula libremente libre de células según el protocolo del ejemplo 8 (combinación de plasma de 5 ml)  
 y el kit de vacío de virus QIAamp MinElute (1 ml de plasma). El volumen de elución fue de 100 µl. El rendimiento en ADN  
 fue determinado de manera cuantitativa en un PCR dúplex en tiempo real, donde encontraron aplicación una secuencia  
 objetivo de 500 pares de bases y una de 66 pares de bases de longitud en la región que codifica para el 18S de ARN  
 ribosomal. Para el PCR en tiempo real se empleó el kit QuantiTect Multiplex PCR. Las extracciones de ácidos nucleicos  
 fueron ejecutadas en 6 replicaciones por cada condición. Se ve que el protocolo según el ejemplo 8 alcanza un  
 rendimiento más alto en ADN circulante en comparación con un método convencional correspondiente al estado de la  
 técnica. Al respecto, el rendimiento es claramente superior al que se esperaría debido al mayor volumen de muestra.

Ejemplo 9

15 El ejemplo 9 muestra un método preferido para la purificación de ARN de muestras, en particular de plasma, suero u  
 otros líquidos corporales. Las concentraciones citadas a continuación son aplicadas para una muestra de 5 ml.

En el siguiente protocolo, para la purificación de ARN se emplearon 5 ml de plasma (ver Fig. 15).

20 Al respecto se ejecuta el método como se describe en el Ejemplo 8. Sin embargo, para la purificación selectiva de ARN,  
 a continuación de la unión y antes de la ejecución de la etapa de lavado, se realiza aún otra etapa de ADNsa, en la cual  
 se hace digestión del ADN mediante uso de DNasa I:

25 Se transfiere la columna a una cánula de recolección de 2 ml y se realiza centrifugación por 1 min a 14,000 rpm.  
 Mediante esta etapa se eliminan residuos de producto de la lisis, que dado el caso podrían interferir con la digestión de  
 la ADNsa. Se añade por cada muestra 10 µl de solución madre de ADNsa a 70 µl de tampón RDD (QIAGEN) y se  
 mezcla mediante inversión de las muestras.

30 Se llevan nuevamente las columnas a sus posiciones originales. La mezcla de incubación ADNsa I (80 µl) es aplicada  
 sobre la membrana de gel de sílice de la columna e incubada a temperaturas moderadas (20-30°C) por 15 min.

A continuación se lava y se hace elución como se describe en el Ejemplo 8.

35 En la Fig. 15 se muestran los resultados. Se purificó ARN que circula libremente libre de células, según el Ejemplo 9 (5  
 ml de plasma; incluyendo tratamiento con ADNsa del protocolo de columna QIAamp It.) y se purificó como referencia el  
 kit al vacío de virus QIAamp MinElute (1 ml de plasma). El volumen de elución fue de 100 µl. El rendimiento de ARN fue  
 determinado de manera cuantitativa en un RT-PCR en tiempo real, el cual era específico para GAPDH, c-fos, y beta-  
 Globina mRNAs. Para el RT-PCR en tiempo real se empleó el kit QuantiTect Multiplex RT-PCR. Las extracciones de  
 ácidos nucleicos fueron ejecutadas en 6 replicaciones por cada condición.

40 En virtud de los bajos valores Ct ("ciclo de umbral"), se reconoce que con el protocolo del método según el Ejemplo 9 se  
 logró un rendimiento más alto en mARN circulante en comparación con un método correspondiente convencional del  
 estado de la técnica. Al respecto, el rendimiento es claramente más alto del que se esperaría debido al mayor volumen  
 de muestra.

45

50

55

Reivindicaciones

- 5 1. Método para el aislamiento y/o purificación de ácidos nucleicos de cadena corta, en particular ADN y/o ARN, con una longitud de < 1000 pares de bases, de un material de partida que contiene ácido nucleico, **caracterizado por** las siguientes etapas del método:
- 10 (a) unión de los ácidos nucleicos a un material de soporte que liga ácidos nucleicos, en la cual se pone en contacto el material de partida con el material de soporte que liga ácidos nucleicos, en presencia de por lo menos un compuesto caotrópico y por lo menos un alcohol ramificado y/o no ramificado, preferiblemente isopropanol, donde el alcohol está presente en una concentración  $\geq 15\%$  (v/v) y  $\leq 32\%$  (v/v) y donde el material de soporte que liga ácidos nucleicos es una fase sólida que liga ácidos nucleicos, elegida de entre el grupo de los materiales que contienen sílice, en gel de sílice, dióxido de silicio, vidrio, zeolita, caolín, sílica gel, cerámica, membranas de sílice y partículas magnéticas, que exhiben una superficie de sílice o de vidrio;
- 15 (b) opcional elución de los ácidos nucleicos unidos, del material de soporte que liga ácidos nucleicos.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado porque** en la etapa (a) el alcohol está presente en la mezcla en una concentración de  $\leq 25\%$  (v/v).
3. Método según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** la concentración del compuesto caotrópico en la etapa a) está en  $\geq 2$  mol/l y  $\leq 3,5$  mol/l y el compuesto caotrópico es elegido de entre el grupo de los tiocianatos, isotiocianatos o percloratos.
- 25 4. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por** uno o varios de los siguientes rasgos:
- a. que la concentración de los compuestos caotrópicos en la mezcla en la etapa (a) es  $\leq 4$  mol/l,  $\leq 3,5$  mol/l,  $\leq 3,2$  mol/l o  $\leq 3,1$  mol/l; y/o
- 30 b. que el por lo menos un compuesto caotrópico en la etapa (a) es un tiocianato, isotiocianato o perclorato; y/o
- c. que por lo menos 30%, 50% y preferiblemente por lo menos 60% de los ácidos nucleicos de cadena corta presentes en el material de partida pueden ser separados por medio del método; y/o
- 35 d. que los ácidos nucleicos de cadena corta son aislados y/o enriquecidos con una longitud, que son elegidos de entre el grupo de los ácidos nucleicos con una longitud de  $\leq 500$  pares de bases,  $\leq 400$  pares de bases y/o  $\leq 300$  pares de bases y/o  $\geq 50$  pares de bases y/o  $\geq 100$  pares de bases.
- 40 5. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos extracelulares.
6. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el ácido nucleico que va a ser aislado/concentrado es ADN.
- 45 7. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** el material de soporte que liga ácidos nucleicos es elegido de entre partículas magnéticas de sílice o vidrio.
8. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 7, para el aislamiento y/o concentración de ácido nucleicos extracelulares, en particular fetales, de una muestra de sangre, en particular suero o plasma de sangre.
- 50 9. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 8 para el aislamiento y/o concentración de ácido nucleicos extracelulares y/o de cadena corta de una muestra, excluyendo la concentración de ácidos nucleicos fetales de una muestra de sangre.
- 55 10. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 9, para el aislamiento y/o concentración de ácidos nucleicos de cadena corta a partir de sangre, plasma, suero, orina y líquido cerebral.
- 60 11. Método según una o varias de las reivindicaciones 5 a 10, para el aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares elegidos de entre ADN fetal, ADN y ARN tumoral, de plasma y/o suero.

12. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** primero se hace lisis a la muestra y/o se liberan ácidos nucleicos.
- 5 13. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** el alcohol es isopropanol.
14. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado porque** no se realiza ninguna extracción con fenol.
- 10 15. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado porque** los ácidos nucleicos de cadena corta son de cadena individual o cadena doble.
- 15 16. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado porque** la concentración de alcohol en la etapa a) está en un rango de  $\geq 15\%$  (v/v) y  $\leq 25\%$  (v/v) y la concentración del compuesto caotrópico en la etapa a) está en  $\geq 2$  mol/l.
17. Método según la reivindicación 16, **caracterizado porque** el compuesto caotrópico es tiocianato de guanidinio o isotiocianato de guanidinio.
- 20 18. Método según la reivindicación 16 o 17, **caracterizado porque** el alcohol en la etapa a) está en una concentración de 18 a 20% (v/v).
- 25 19. Método según una o varias de las reivindicaciones 16 a 18, **caracterizado porque** la concentración de alcohol en la etapa a) es  $\leq 25\%$  (v/v) y la concentración del compuesto caotrópico en la etapa a) está en  $\geq 2$  mol/l y  $\leq 3.1$  mol/l y donde el compuesto caotrópico es tiocianato de guanidinio o isotiocianato de guanidinio.
- 30 20. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 19, **caracterizado porque** el material de soporte que liga ácidos nucleicos se encuentra en una columna.
21. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 20, **caracterizado porque** el material de soporte que liga ácidos nucleicos es una membrana de sílice.
- 35 22. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 21, **caracterizado porque** durante la unión están presentes detergentes, preferiblemente detergentes no iónicos.
23. Método según una o varias de las reivindicaciones 1 a 22 para la aplicación en el diagnóstico.

Fig. 1

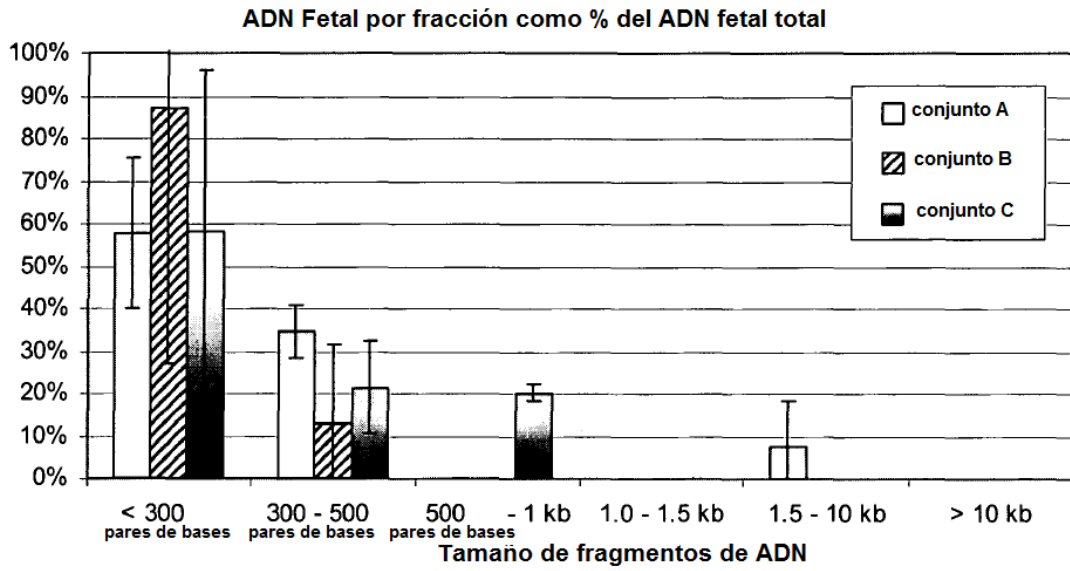


Fig. 2

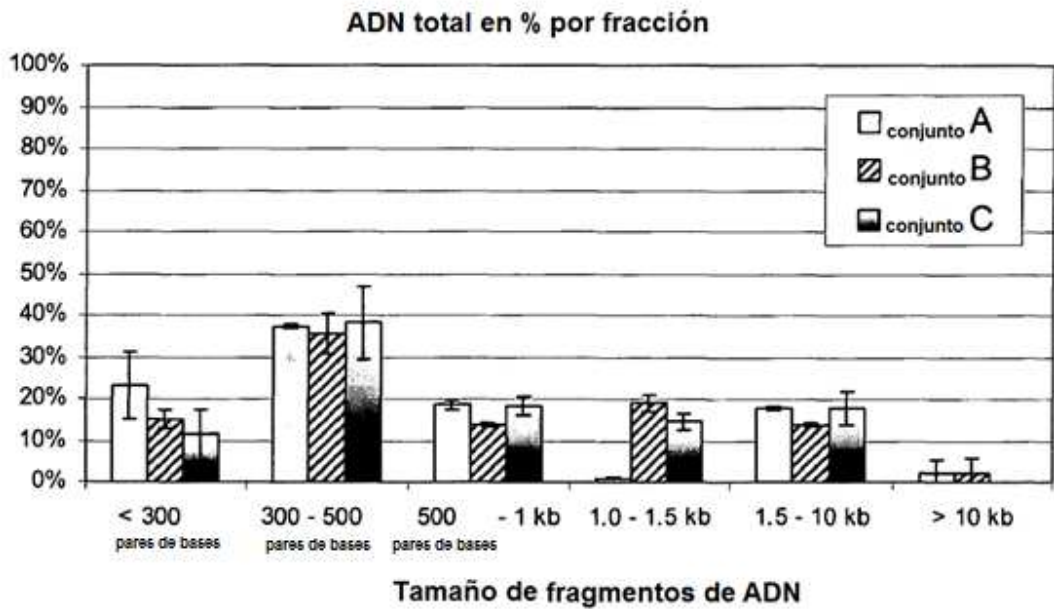


Fig. 3

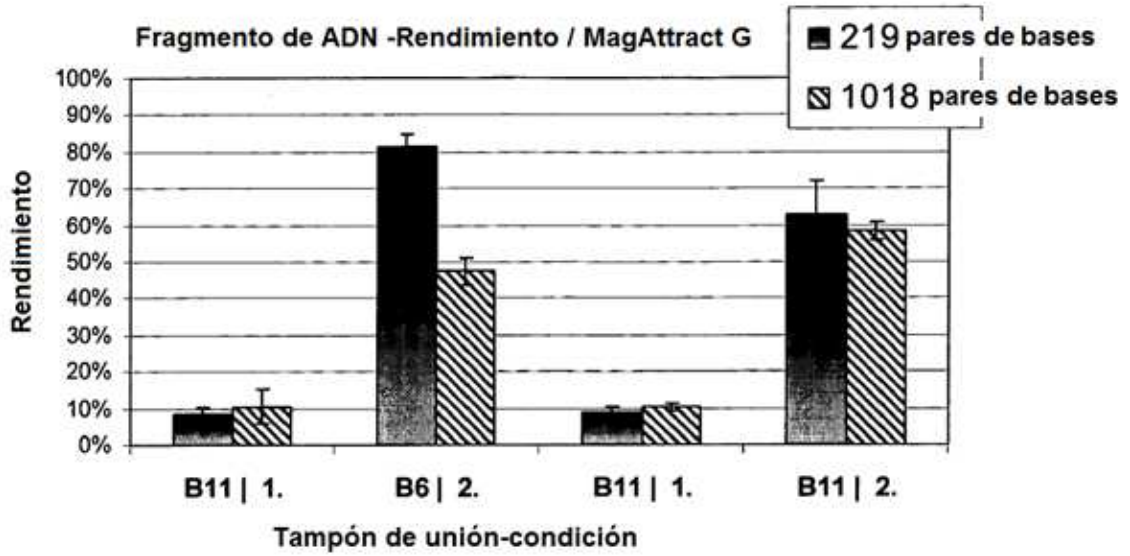


Fig. 4

Rendimiento de fragmentos de ADN / MagAttract / QIAamp Mini

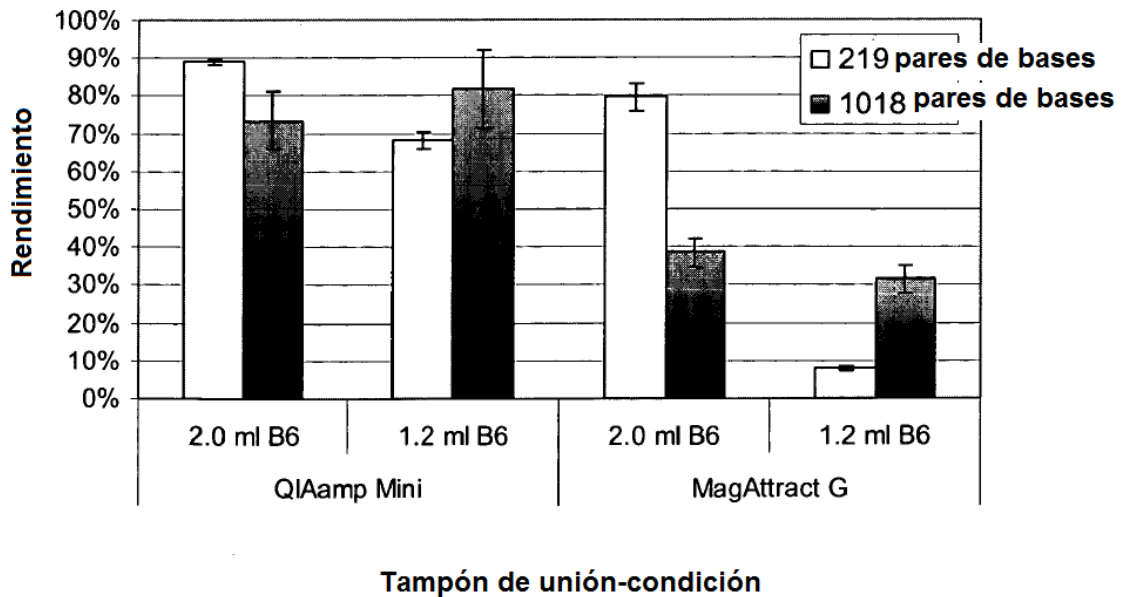


Fig. 5

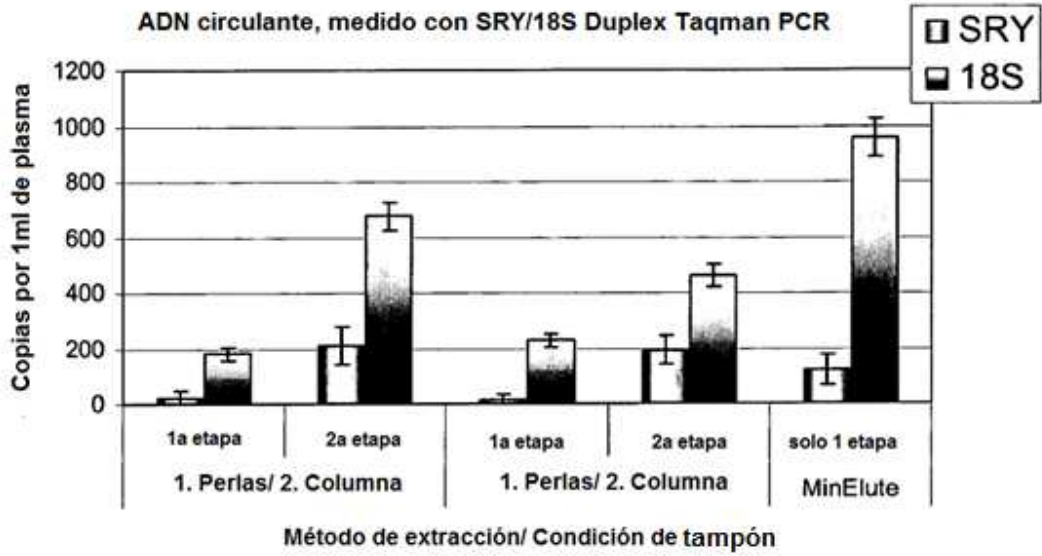


Fig. 6

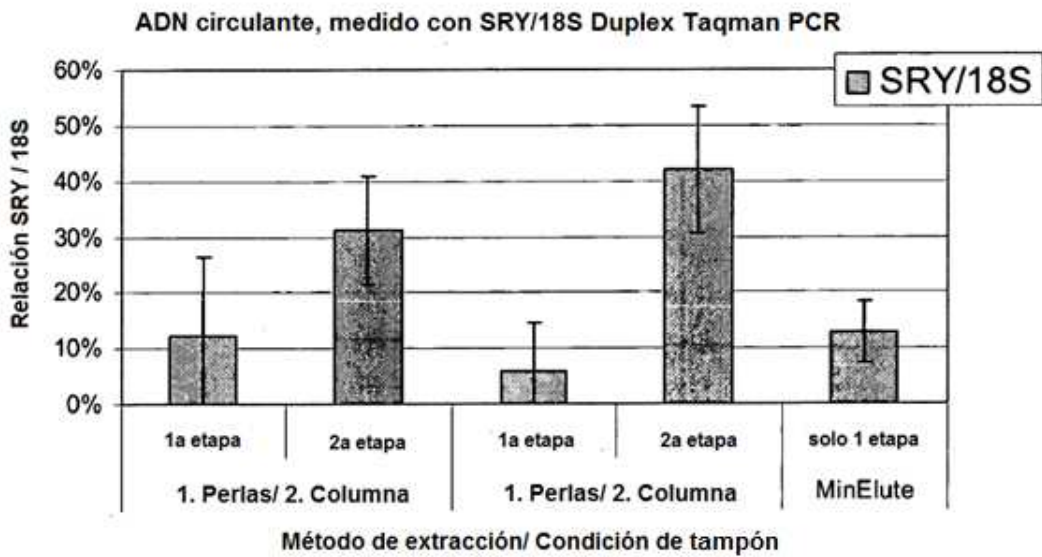


Fig. 7

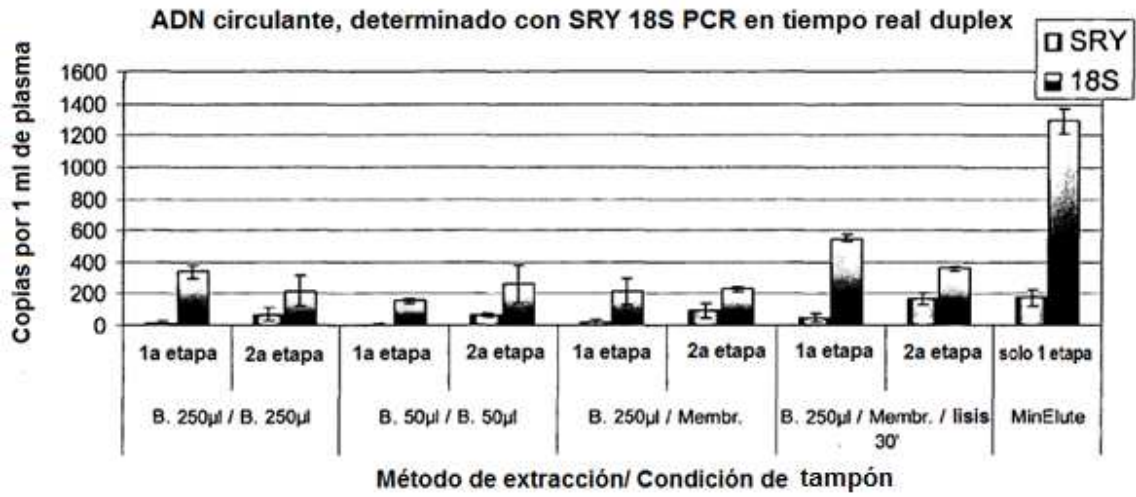


Fig. 8

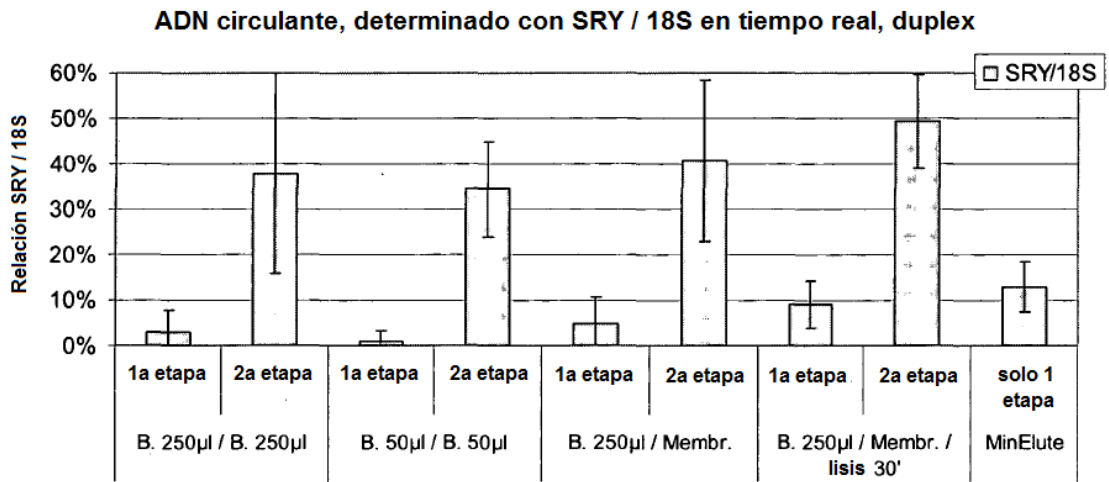




Fig. 9

Protocolo	Tampón de unión - Ejemplo	Volumen total de la muestra [ml]	Volumen añadido de tampón de unión [ml]	GuHCl [mol/l]	Isopropanol [%]
1 etapa	B3	22,32	13,32	4,00	20,00
	B4	22,32	13,32	3,50	30,00
	B5	22,32	13,32	3,00	40,00
	B6	22,32	13,32	2,50	50,00
	B7	22,32	13,32	2,00	60,00
	B8	22,32	13,32	1,50	70,00
	B9	22,32	13,32	1,00	80,00
	B11	22,32	13,32	0,00	100,00

Fig. 10

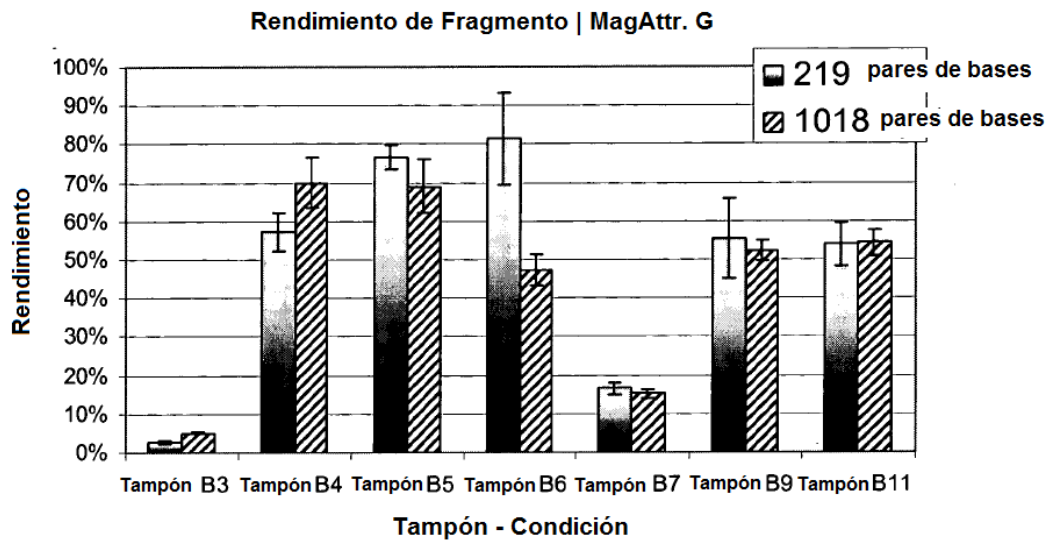


Fig. 11

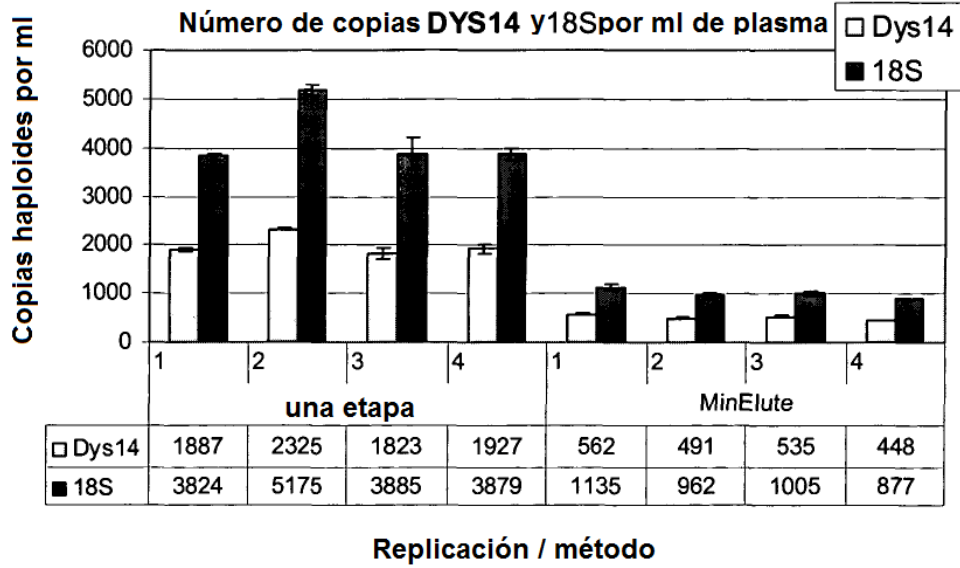


Fig. 12

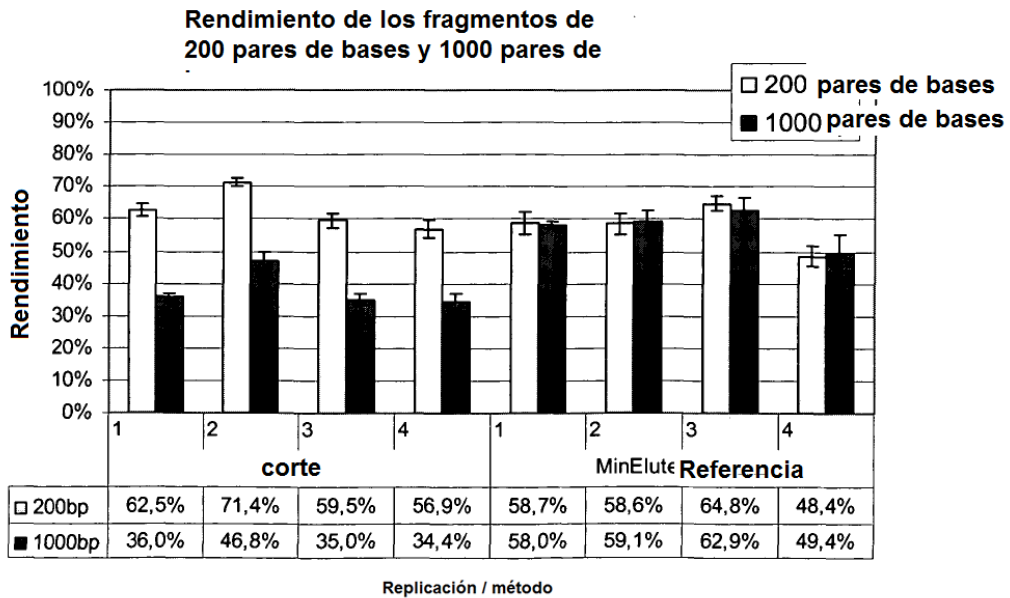


Fig. 13

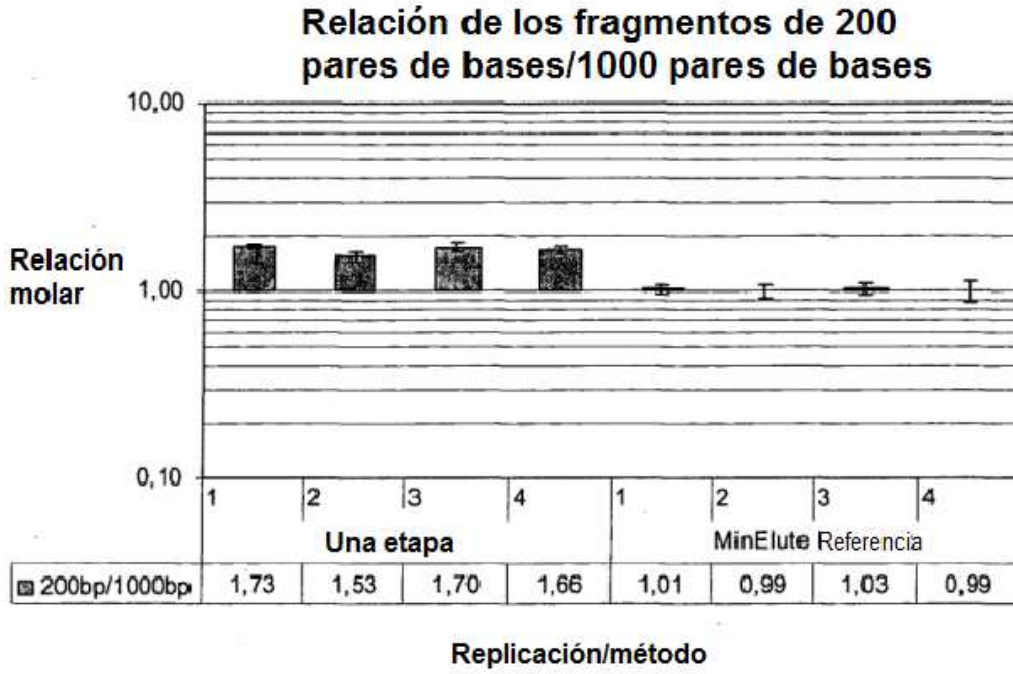


Fig. 14

Extracción de ADN circulante de plasma

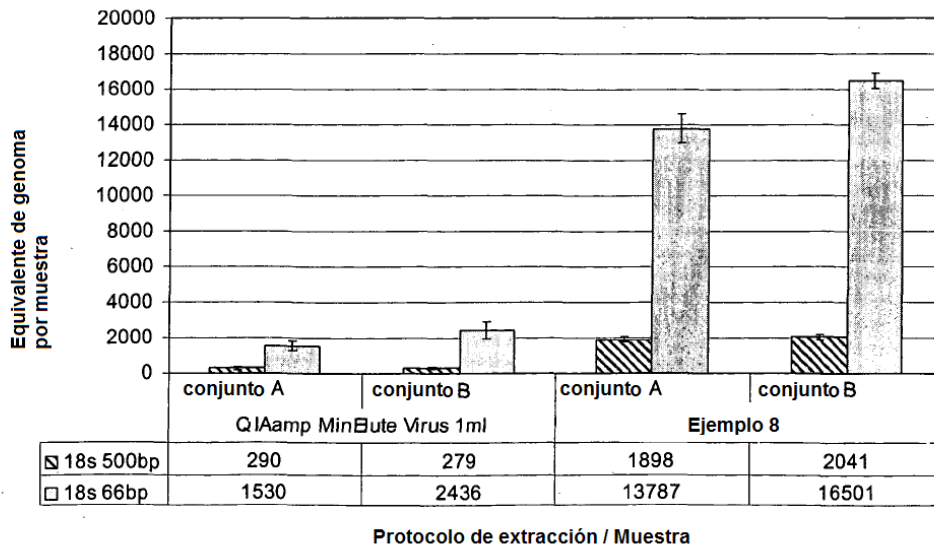


Fig. 15

**Extracción de ARN circulante de plasma**

