

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 630**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2006 E 06830479 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 1960522**

54 Título: **Procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos de cadena corta**

30 Prioridad:

09.12.2005 DE 102005059315

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

01.06.2016

73 Titular/es:

**QIAGEN GMBH (100.0%)
QIAGEN STRASSE 1
40724 HILDEN, DE**

72 Inventor/es:

**RITT, CHRISTOPH;
HIMMELREICH, RALF y
WEBER, MARTIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 572 630 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos de cadena corta

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud de menos de 300 nucleótidos, y al uso de un kit para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud de menos de 300 nucleótidos. También se da a conocer el kit y el uso de una matriz de intercambio aniónico, así como un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad.

10 Desde que hace algunos años se descubrió que los ácidos ribonucleicos (ARN) pequeños adoptan una función reguladora esencial en la expresión génica esencial, siempre aparecen ARN pequeños, que siempre son más cortos de 300 nucleótidos, especialmente más cortos de 100 nucleótidos, en el objetivo de las investigaciones científicas. Especialmente los micro-ARN (miARN) han despertado la atención de muchos investigadores. Los miARN son una clase evolutivamente conservada de ARN no codificante pequeño de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud
15 cuya compleja función es cada vez más evidente en la regulación de la expresión génica. Los miARN se encontraron en cualquier organismo eucariota investigado y casi cada tejido, así entre otros en hongos, plantas, insectos y mamíferos. Además de los miARN también se descubrieron otros ARN pequeños que también desempeñan una función fundamental en las funciones celulares. A éstos pertenecen, por ejemplo, ARN interferente pequeño (ARNip), ARN nuclear pequeño (ARNnp) y ARN nucleolar pequeño (ARNnop).

20 Para poder investigar la función celular de estos ARN cortos que son más cortos de 300 nucleótidos, éstos deben ser lo más puros posible y purificarse con alto rendimiento de los sistemas biológicos que van a investigarse. Por tanto, existe una gran necesidad de especificar un procedimiento con el que puedan purificarse o aislarse aquellos ARN cortos de sistemas biológicos complejos, especialmente de lisados de células.

25 Para, en general, aislar ácidos nucleicos de muestras biológicas, éstos deben separarse de los restantes constituyentes celulares, como proteínas, azúcares, lípidos y otros componentes. Por el estado de la técnica se conocen muchos procedimientos para la separación de ácidos nucleicos de los materiales de partida más distintos, como, por ejemplo, de cultivos celulares, de tejidos de origen vegetal y animal, así como de fluidos corporales. Un procedimiento contiene, por ejemplo, la extracción de soluciones de partida generalmente acuosa con ayuda de disolventes orgánicos, como fenol y cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987), seguido de una precipitación de los ácidos nucleicos con ayuda de alcoholes, como etanol o isopropanol, en la fase acuosa (Sambrook, J., Fritsch, E. F. en T. Maniatis, CSH, "Molecular Cloning", 1989). Otro procedimiento contiene la inmovilización de ácidos nucleicos sobre una fase sólida, por ejemplo, mediante tecnología de adsorción en sílice. Estos procedimientos tienen todos la
30 desventaja de que no pueden aislarse o solo insuficientemente ácidos nucleicos más pequeños, o al menos purificarse.

35 Para solucionar este problema, del estado de la técnica se conocen procedimientos para el enriquecimiento específico de poblaciones de ARN pequeño que se basan en la tecnología de membranas de sílice. En el caso de este procedimiento, después de la lisis de las células, al lisado celular se añade una cantidad determinada, relativamente pequeña, de alcohol y al menos una parte de los ácidos nucleicos más largos se unen bajo condiciones de unión caotrópicas a la membrana de sílice. Sin embargo, la cantidad de alcohol en los procedimientos de purificación descritos en el estado de la técnica es demasiado pequeña para unir eficazmente, incluso ácidos nucleicos pequeños, a la membrana de sílice, de manera que estos ARN pequeños quedan en la retención. En la retención aumenta ahora la concentración de alcohol y la retención se une a una segunda membrana de sílice. Después de la etapa de lavado, el ARN pequeño se eluye junto con todos los otros ácidos nucleicos que no se unieron a la primera columna (véase, por ejemplo, kit *mirVana*[®] de la empresa Ambion, Austin, EE.UU., o RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit de la empresa QIAGEN, Hilden, Alemania, a ser usados mediante los "protocolos desarrollado para el usuario").

40 Tanto el procedimiento de QIAGEN como también el de Ambion tienen la desventaja de que deben usarse dos fases sólidas y no es posible obtener el ARN pequeño deseado solo con la ayuda de una única etapa de unión. Además, con este procedimiento no es posible, por ejemplo, aislar exclusivamente miARN con un tamaño de aproximadamente 22 nucleótidos sin aislarse al mismo tiempo ARNt y otros ácidos nucleicos mayores. Aunque con este procedimiento puede enriquecerse eventualmente el ARN pequeño, especialmente el miARN, a un cierto grado, sin embargo, al igual que antes, todavía está contaminado con otros ácidos nucleicos, especialmente con ARN de transferencia (ARNt).

45 Guenther R. H. et al. ("Purification of transfer ARN species by single-step ion-exchange high-performance liquid chromatography", Journal of chromatography, 1 de julio de 1988, Vol. 444, 1 de julio de 1988 (01-07-1988), páginas 79-87) describen la purificación de determinadas especies de ARNt mediante columnas de intercambio aniónico de DEAE. El documento US 5.990.301 A1 describe un procedimiento para aislar y purificar oligonucleótidos de sistemas bacterianos y virales mediante columnas de intercambio aniónico. El documento WO 03/080834 A describe un procedimiento basado en columna para separar oligonucleótidos de impurezas. Drager R. et al. ("High - performance anion-exchange chromatography of oligonucleotides", Analytical Biochemistry 1985, EE.UU., Vol. 145, Nr. 1, 1985, páginas 47 - 56) describen un procedimiento basado en columna para separar oligonucleótidos y especies de ARNt.

Chiang et al. ("Application of supermagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells", Journal of chromatography B: Biomedical, Sciences & Applications, Elsevier, Ámsterdam, NL, Vol. 822, Nr. 1-2, 5 de agosto de 2005 (05-08-2005), páginas 54 - 60) describen la preparación de nanopartículas superparamagnéticas de Fe_3O_4 que están recubiertas con polietilenimina. Las partículas se utilizan para la purificación de ADN de plásmido. El documento US 2005/106589 A1 describe procedimientos para aislar ácidos nucleicos. A este respecto, para la purificación de ADN de plásmido se utilizan un tampón de lisado, partículas magnéticas recubiertas con una matriz de intercambio aniónico y un tampón de elución. El documento US 2005/130196 A1 describe el uso de partículas magnéticas con matriz de intercambio aniónico para la purificación de amplicones de PCR.

La presente invención se basó en el objetivo de vencer las desventajas resultantes del estado de la técnica.

Especialmente, la presente invención se basó en el objetivo de dar a conocer un procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos pequeños, especialmente de miARN, con el que pudieran enriquecerse ácidos nucleicos pequeños de composiciones biológicas complejas como, por ejemplo, de lisados celulares, con las menos etapas de procedimiento posibles.

También era un objetivo de la presente invención dar a conocer un procedimiento para purificar ácidos nucleicos pequeños con el que fuera posible separar especialmente ácidos nucleicos con una longitud de 25 nucleótidos o menos como, por ejemplo, miARN, no solo de ácidos nucleicos con una longitud de más de 300 nucleótidos de otros componentes en una composición biológica compleja como, por ejemplo, un lisado celular, sino separar específicamente estos ácidos nucleicos pequeños también de otros ácidos nucleicos con una longitud de menos de 300 y más de 25 nucleótidos, por ejemplo, de ARNt.

También deberá especificarse un procedimiento con el que pueda regenerarse a ser posible individualmente una exclusión de tamaño deseada para ARN que va a purificarse.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un procedimiento que pueda realizarse sin cambio del recipiente de reacción – la llamada "reacción de una sola etapa" - y, por tanto, reduzca a un mínimo el riesgo de confusión de las muestras que van a analizarse.

Además, la presente invención se basó en el objetivo de dar a conocer un kit con cuya ayuda pudiera realizarse la ventajosa purificación anteriormente descrita de ácidos nucleicos pequeños, especialmente de ARN pequeño, de composiciones biológicas complejas.

Una contribución al logro de los objetivos mencionados al principio se hace por un procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud de menos de 300 nucleótidos según las reivindicaciones 1-18.

Una contribución al logro de los objetivos mencionados al principio se hace por un procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud de menos de 300 nucleótidos, preferiblemente menos de 200 nucleótidos, con especial preferencia menos de 100 nucleótidos, además preferiblemente menos de 50 nucleótidos y lo más preferido menos de 25 nucleótidos, de una muestra, que se selecciona de plasma, suero, un fluido corporal, un frotis y un lisado celular, que comprende las etapas de procedimiento

i) Proporcionar una fase fluida P_1 , preferiblemente acuosa, que contiene

(α_1) al menos un ácido nucleico con una longitud de menos de 300 nucleótidos, preferiblemente menos de 200 nucleótidos, con especial preferencia menos de 100 nucleótidos, además preferiblemente menos de 50 nucleótidos, y lo más preferido menos de 25 nucleótidos, así como

(α_2) al menos un componente distinto de este ácido nucleico (α_1),

ii) poner en contacto la fase P_1 con una matriz de intercambio aniónico para unir el ácido nucleico (α_1) a la matriz de intercambio aniónico, realizándose la unión de los ácidos nucleicos a la matriz de intercambio aniónico a un valor de pH en un intervalo de 3 a 7, presentando la matriz de intercambio aniónico grupos funcionales seleccionados del grupo constituido por grupos amino, grupos hidracina y grupos imina que están al menos parcialmente presentes en forma catiónica en las condiciones bajo las que se pone en contacto la fase acuosa P_1 con la matriz de intercambio aniónico y estando presente la matriz de intercambio aniónico en forma de un recubrimiento sobre partículas magnéticas y moviéndose continuamente para la unión de los ácidos nucleicos la fase acuosa P_1 puesta en contacto con las partículas, y separándose las partículas magnéticas como agregados magnéticos de la fase acuosa P_1 ,

iii) dado el caso lavar la matriz de intercambio aniónico con un tampón de lavado, permaneciendo el ácido nucleico (α_1) unido a la matriz de intercambio aniónico, así como

iv) eluir el ácido nucleico (α_1) unido a la matriz de intercambio aniónico de la matriz de intercambio aniónico mediante la sustitución de la fase acuosa P_1 o del tampón de lavado con un tampón de elución manteniendo una

fase fluida P₂, preferiblemente acuosa, que contiene el ácido nucleico (α_1).

Se comprobó muy sorprendentemente que los ácidos nucleicos pequeños con una longitud de menos de 300 nucleótidos pueden enriquecerse de composiciones biológicas complejas, que además de estos ácidos nucleicos pequeños pueden contener numerosos otros componentes, mediante unión a una matriz de intercambio aniónico y posterior lavado y elución, sin que sea necesario enriquecer inicialmente ácidos nucleicos más largos, como esto es necesario en los procedimientos de QIAGEN y Ambion descritos al principio.

Según una forma de realización preferida del procedimiento según la invención, en el caso del ácido nucleico (α_1) que va a enriquecerse se trata de un ARN monocatenario o bicatenario, preferiblemente bicatenario. Especialmente se prefiere que en el caso del ARN con una longitud de menos de 300 nucleótidos se trate de un ARN seleccionado del grupo que contiene miARN, pre-miARN, ARNip, ARNnp, ARNnop, ARNt, 5S-ARNr, 5,8S-ARNr o mezclas de al menos dos de ellos, especialmente se trate de una mezcla de miARN y ARNt, siendo el más preferido miARN con una longitud en un intervalo de 15 a 30 nucleótidos, además preferiblemente 17 a 24 nucleótidos, y todavía más preferiblemente con una longitud de 20 a 23 nucleótidos como ácido nucleico (α_1).

Por los términos "5S-ARNr" o "5,8S-ARNr" se entiende ácidos ribonucleicos no codificantes que pueden encontrarse en ribosomas eucariotas. Por el término "ARNt" se entiende un ácido ribonucleico que está constituido por aproximadamente 80 nucleótidos y aparecen en los apareamientos de bases conjugadas (adenina y uracilo; citosina y guanina). Estos apareamientos son la causa de la estructura similar a hoja de trébol del ARNt. Por el término "ARNip" se entiende ácidos ribonucleicos con una longitud de aproximadamente 22 nucleótidos que se forman por la disociación de un ARN bicatenario (ARNbc) por la enzima "Dicer" y se incorporan en el complejo enzimático "RISC" (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Por el término "ARNnp" se entiende ARN catalíticamente activo de aproximadamente 100 a 300 pares de bases de tamaño en el núcleo celular de eucariotas. Estos ARNnp se encuentran siempre asociados a proteínas en las llamadas RNPnp (ribonucleoproteínas nucleares pequeñas) y son responsables del corte y empalme de intrones de pre-ARNm en ARNm. Por el término "ARNnop" se entiende una clase de ácidos ribonucleicos que participan en la modificación química del ARN ribosómico (ARNr) y otros genes de ARN, por ejemplo, en su metilación. Forman un constituyente de la llamada RNPnop (ribonucleoproteína nucleolar pequeña). Por el término "miARN" se entiende ácidos nucleicos pequeños que sirven para la regulación de procesos de desarrollo en plantas y animales. Se unen específicamente a ARNm e impiden su actividad en la traducción, de manera que, por ejemplo, no se producen factores de crecimiento en cantidad excesiva. Los miARN son moléculas de ARN monocatenarias que se forman a partir de un precursor bicatenario.

En el caso de los ácidos nucleicos con una longitud de como máximo 300 nucleótidos (α_1) de distintos componentes (α_2) se trata especialmente de ácidos nucleicos con una longitud de al menos 300 nucleótidos (α_2'), así como de componentes (α_2'') distintos de ácidos nucleicos.

Los ácidos nucleicos con una longitud de al menos 300 nucleótidos (α_2') comprenden especialmente ADN monocatenario o bicatenario o moléculas de ARN monocatenario o bicatenario, por ejemplo, ARNm, 18S-ARNr o 28S-ARNr.

Como componentes (α_2'') distintos de los ácidos nucleicos se consideran especialmente aquellos componentes que liberan una célula en la lisis. Estos componentes comprenden en consecuencia especialmente proteínas, lípidos, polipéptidos o polisacáridos.

En el fluido proporcionado en la etapa de procedimiento i), preferiblemente la fase acuosa P₁, puede tratarse de un plasma, de un suero, de un fluido corporal como, por ejemplo, sangre, orina, esperma, saliva, líquido cefalorraquídeo, esputo o un frotis, o bien de un lisado celular, por ejemplo, un lisado de células de tejidos animales o vegetales, de microorganismos como, por ejemplo, bacterias, hongos o levaduras, de cultivo de tejido o de células, o de células de fluidos corporales, como, por ejemplo, de sangre.

Según una forma de realización especial del procedimiento según la invención, en el caso del fluido proporcionado en la etapa de procedimiento i), preferiblemente la fase acuosa P₁, se trata de un lisado celular que puede obtenerse mediante un procedimiento, que comprende las etapas de procedimiento:

- I) Proporcionar células,
- II) lisar las células obteniendo un lisado celular, así como
- III) dado el caso separar al menos parcialmente el al menos un componente (α_2) distinto del ácido nucleico (α_1) del lisado celular.

En el caso de las células que se proporcionan en la etapa de procedimiento I) puede tratarse de sección de tejido dado el caso fijada o un fragmento de tejido dado el caso fijado, de células adherentes cultivadas, de células cultivadas en suspensión, o bien de una célula en un fluido corporal.

Siempre y cuando en el caso de las células se trate de células adherentes o de células que se encuentran en un ensamblaje de tejido, la etapa de procedimiento I) puede dado el caso comprender el lavado de las células adheridas o del tejido, el desprendimiento de las células adheridas o la eliminación de las células del ensamblaje de tejido con soluciones enzimáticas adecuadas, con soluciones que contienen compuestos complejantes como, por ejemplo, EDTA, o mezclas de las mismas, dado el caso la separación de determinadas poblaciones celulares de las suspensiones celulares así obtenidas, por ejemplo, mediante un citómetro, la sedimentación de las células desprendidas o separadas, el lavado del sedimento celular así obtenido, así como dado el caso la resuspensión en un tampón de suspensión adecuado. Pero también sería concebible lisar las células adherentes, dado el caso después de una etapa de lavado, sin desprendimiento previo.

Siempre y cuando en el caso de las células se trate de células cultivadas en suspensión o de células en un fluido corporal, la etapa de procedimiento I) comprende preferiblemente la sedimentación de las células suspensas, dado el caso después de una separación de determinadas poblaciones celulares, por ejemplo, mediante un citómetro, el lavado del sedimento celular así obtenido, así como dado el caso la resuspensión en un tampón de suspensión adecuado.

El tampón de suspensión en el que dado el caso se resuspenden las células sedimentadas contiene preferiblemente una o varias sustancias tampón, así como dado el caso uno o varios compuestos complejantes. El valor de pH del tampón de suspensión puede variar sobre un amplio intervalo, y para la realización del procedimiento según la invención se encuentra preferiblemente en un intervalo de pH 3 a 11, además preferiblemente en un intervalo de 5 a 10, y lo más preferido en un intervalo de pH 7 a 9. A este respecto, pueden usarse los sistemas de tampón conocidos para el experto para el ajuste del valor de pH. Según la invención se usan preferiblemente sistemas tampón basados en tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS), ácido morfolinopropanosulfónico (MOPS) o ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazino]etanosulfónico (HEPES), que contienen el componente tampón en una concentración en un intervalo de 0,5 a 100 mmol/l, además preferiblemente en un intervalo de 1 a 50 mmol/l, y lo más preferido en un intervalo de 2,5 a 25 mmol/l. También serían concebibles sistemas tampón basados en acetato alcalino/ácido acético o mezclas de un sistema tampón de acetato alcalino/ácido acético y un sistema tampón de tris(hidroximetil)aminometano. Como compuestos complejantes también pueden utilizarse todos los compuestos que están en situación de complejar, especialmente iones calcio. Un compuesto complejante preferido es etilendiamintetraacetato (EDTA), que en el tampón de suspensión se encuentra preferiblemente en una cantidad en un intervalo de 0,01 a 20 mmol/l, además preferiblemente 0,1 a 15 mmol/l, y lo más preferido 0,5 a 5 mmol/l.

La cantidad de tampón de suspensión que va a utilizarse depende del número de células proporcionadas. Normalmente, el tampón de suspensión se utiliza en una cantidad en un intervalo de 10 a 2.000 μ l, con especial preferencia 50 a 1.000 μ l, y lo más preferido 100 a 500 μ l por 10^6 células.

Un tampón de suspensión adecuado según la invención es especialmente un tampón que contiene 0,5 a 100 mmol/l, con especial preferencia 1 a 50 mmol/l, y lo más preferido aproximadamente 2,5 a 25 mmol/l, de tris(hidroximetil)aminometano y 0,01 a 20 mmol/l, con especial preferencia 0,1 a 15 mmol/l, y lo más preferido 0,5 a 5 mmol/l de EDTA y que presenta un valor de pH en un intervalo de 7 a 9, con especial preferencia de aproximadamente 8.

En la etapa de procedimiento II) se lisar las células proporcionadas, pudiendo utilizarse para lisar las células todos los procesos de lisis conocidos para el experto que son adecuados para liberar especialmente material de ARN de células. Como procesos de lisis se consideran especialmente la lisis mediante la acción de calor, la lisis mediante la acción de fuerzas mecánicas, la lisis mediante enzimas como, por ejemplo, proteína cinasa K, o la lisis mediante la puesta en contacto de las células con un tampón de lisis que contiene un detergente o un compuesto caótopo o mediante soluciones hipotónicas. Dado el caso también pueden combinarse entre sí las medidas previamente mencionadas, por ejemplo, rompiendo mecánicamente las células en un tampón de lisis que contiene un detergente o un compuesto caótopo o utilizando, por ejemplo, un tampón de lisis que contiene proteína cinasa K junto con un compuesto caótopo.

Según la invención, la lisis de las células se realiza con especial preferencia mediante un tampón de lisis que contiene un detergente, una enzima, un compuesto caótopo o una mezcla de al menos dos de estos componentes.

Detergentes adecuados son conocidos en gran número por el estado de la técnica. Según la invención, los detergentes especialmente preferidos se seleccionan del grupo que contiene dodecilsulfato de sodio (SDS), éter fenólico de polietilenglicol como, por ejemplo, Triton-X-100, Tween, NP-40, o mezclas de los mismos, prefiriéndose especialmente SDS y Triton-X-100 como detergentes. Siempre y cuando se utilice SDS como detergente, según la invención se prefiere además que por mol de SDS se usen 1 a 30 moles, preferiblemente 2 a 20 moles, y lo más preferido 3 a 6 moles de NaOH o KOH, con especial preferencia NaOH, para lisar las células. Siempre y cuando el tampón de lisis contenga detergentes, en el procedimiento según la invención se prefiere además que el lisado de las células en la etapa de procedimiento II) se realice en presencia de 0,01 a 100 μ moles, con especial preferencia 0,1 a 50 μ moles, y lo más preferido 0,25 a 5 μ moles de detergente por 10^6 células. Normalmente, en el uso de un detergente para el lisado de las células el lisado de las células se realiza en presencia de una concentración de detergente del 0,005 al 5 % (v/v), con especial preferencia 0,01 al 1 % (v/v) y lo más preferido 0,025 al 0,5 % (v/v),

siempre y cuando en el caso del detergente se trate de un compuesto líquido a temperatura ambiente y presión atmosférica, o bien en presencia de una concentración de detergente del 0,01 al 1 % en peso, con especial preferencia 0,25 al 5 % en peso, y lo más preferido 0,05 al 0,4 % en peso, siempre y cuando en el caso del detergente se trate de un compuesto sólido a temperatura ambiente y presión atmosférica.

5 Como compuesto caótropro se prefieren sales especialmente caótroproas. Por una sal caótroproa se entiende en el sentido de la invención preferiblemente una sal que tiene una alta afinidad (esfuerzo por, atracción) con el agua y, por tanto, forma una gran envoltura de hidrato sólida (adición tipo cáscara de moléculas de agua). Sales caótroproas preferidas son especialmente isotiocianato de guanidinio o clorhidrato de guanidinio, prefiriéndose especialmente el isotiocianato de guanidinio. Siempre y cuando para el lisado de las células se utilicen sales caótroproas, es además en el procedimiento según la invención preferible que el lisado de las células en la etapa de procedimiento II) se realice a una concentración de sal caótroproa de 0,5 a 10 mol/l, con especial preferencia de 1 a 5 mol/l, y lo más preferido de 2 a 3,5 mol/l. Siempre y cuando el tampón de lisis contenga sales caótroproas, dado el caso también puede ser ventajoso que el tampón de lisis contenga un disolvente orgánico miscible con agua, por ejemplo, un alcohol miscible con agua como etanol o isopropanol, en una cantidad en un intervalo del 10 al 60 % en volumen, con especial preferencia 20 al 50 % en volumen.

20 Como enzima se prefieren especialmente proteasas, prefiriéndose especialmente entre éstas tripsina, proteinasa K, quimotripsina, papaína, pepsina, Pronase y endoproteinasa Lys-C, y prefiriéndose principalmente proteinasa K. La concentración de la enzima en el tampón de lisis se encuentra preferiblemente en un intervalo del 0,01 al 10 % en peso, con especial preferencia 0,1 al 5 % en peso, y lo más preferido 0,2 a 1 % en peso, respectivamente referido al peso total del tampón de lisis.

25 La concentración de detergente, de sal caótroproa o de una enzima en el tampón de lisis depende, entre otras cosas, de la cantidad de células que van a lisarse, así como del modo y manera de proporcionar las células en la etapa de procedimiento I). Si las células que van a lisarse se suspenden inicialmente en un tampón de suspensión, entonces el tampón de lisis contiene el detergente, la sal caótroproa o la enzima en una concentración que es mayor que la concentración de estos componentes, que estarán presentes durante el lisado de las células. Este tampón de lisis concentrado se añade entonces a la suspensión celular en una cantidad tal que es suficiente para ajustar en la suspensión celular una concentración de sal caótroproa, detergente o enzima necesaria para lisar lo más completamente posible las células y anteriormente descrita. Si, por el contrario, el tampón de lisis se aplica, por ejemplo, directamente a las células adherentes o se pone en contacto con un sedimento celular, entonces el tampón de lisis contiene el detergente, la sal caótroproa o la enzima preferiblemente en la concentración que también está presente durante el lisado de las células.

35 Según una forma de realización especial del procedimiento según la invención, el lisado de las células se realiza en presencia de 0,1 a 1 mol/l, con especial preferencia 0,2 a 0,8 mol/l, y lo más preferido 0,3 a 0,7 mol/l, de una sal alcalina, prefiriéndose cloruro sódico, cloruro de potasio y cloruro de litio, y prefiriéndose especialmente cloruro sódico. Si las células que van a lisarse se suspenden inicialmente en tampón de suspensión, entonces puede o bien añadirse al tampón de suspensión una cantidad correspondiente de la sal alcalina o bien añadirse un tampón de lisis al tampón de suspensión que contiene la sal alcalina en concentración correspondientemente mayor. Por el contrario, si el tampón de lisis, por ejemplo, se aplica directamente sobre células adherentes o se pone en contacto con un sedimento celular, entonces se prefiere que el tampón de lisis contenga la sal alcalina en el intervalo de concentraciones anteriormente descrito.

40 Un tampón de lisis especialmente adecuado según la invención que pueda añadirse a una suspensión de células es un tampón que contiene 1 a 200 mmol/l, con especial preferencia 5 a 150 mmol/l, y lo más preferido aproximadamente 10 a 100 mmol/l de NaOH y 0,01 al 1 % (v/v), con especial preferencia 0,025 al 0,5 % (v/v) y lo más preferido 0,05 al 0,4 % (v/v) de SDS y que presente un valor de pH en un intervalo de 5 a 7, con especial preferencia de aproximadamente 5,5. A este respecto, se prefiere que este tampón de lisis se añada a la suspensión de células en una relación de volumen de preferiblemente 3 : 1 a 1 : 3, con especial preferencia 2 : 1 a 1 : 2, y lo más preferido en una relación de volumen de aproximadamente 1 : 1.

55 Un tampón de lisis especialmente adecuado según la invención que puede añadirse a un sedimento celular, células adherentes o una sección de tejido o fragmento de tejido, es

- un tampón que contiene 0,1 a 1 mol/l, con especial preferencia 0,25 a 0,75 mol/l, y lo más preferido aproximadamente 0,4 a 0,6 mol/l de NaCl y 0,1 al 10 % (v/v), con especial preferencia 0,5 al 5 % (v/v), y lo más preferido 0,75 al 1,5 % (v/v) de Triton-X-100 y que presenta un valor de pH en un intervalo de 6 a 8, con especial preferencia de aproximadamente 7,
- o
- un tampón que contiene 0,5 a 10 mol/l, con especial preferencia 1 a 5 mol/l, y lo más preferido aproximadamente 1,5 a 3 mol/l de isotiocianato de guanidinio, 1 a 50 mmol/l, con especial preferencia 5 a 40 mmol/l, y lo más preferido 10 a 20 mmol/l de citrato de sodio, así como 10 al 60 % (v/v), con especial preferencia 20 al 50 % (v/v) y lo más preferido 30 al 40 % (v/v) de etanol y que presenta un valor de pH en un

intervalo de 6 a 8, con especial preferencia de aproximadamente 7,

en el que este tampón de lisis se añade a las células que van a lisarse preferiblemente en una cantidad en un intervalo de 50 a 2.000 μ l, con especial preferencia 100 a 1.000 μ l y lo más preferido 150 a 300 μ l por 10^6 células.

Cuando en el caso de las células se trata de una sección de tejido o un fragmento de tejido, entonces el proporcionar las células en la etapa de procedimiento I) comprende preferiblemente la puesta en contacto de la sección de tejido o del fragmento de tejido con nitrógeno líquido inmediatamente después de la extracción de una planta o un animal. La sección de tejido o el fragmento de tejido se ponen directamente en contacto con el tampón de lisis y dado el caso se homogeneizan mediante un dispositivo de homogeneización adecuado.

Después de haberse puesto en contacto las células con el tampón de lisis, se realiza el lisado de las células preferiblemente en un intervalo de temperatura de 15 a 40 °C, sin embargo con especial preferencia a temperatura ambiente durante una duración en un intervalo de 1 a 60 minutos, con especial preferencia 2 a 15 minutos.

Antes de que el lisado celular se ponga en contacto como fase acuosa P_1 en la etapa de procedimiento ii) con la matriz de intercambio aniónico, según una forma de realización especial del procedimiento según la invención todavía puede ser ventajoso separar previamente del lisado celular uno o varios de los componentes (α_2) distintos del ácido nucleico (α_1). Para esta separación pueden en principio usarse todos los procedimientos de separación conocidos para el experto como, por ejemplo, reacciones de precipitación, una separación mediante diálisis o cromatografía, o bien una extracción, prefiriéndose con especial preferencia una extracción, especialmente una extracción con fenol o mezclas de fenol y cloroformo, y prefiriéndose lo que más una extracción con fenol ácido.

A este respecto, el fenol ácido se pone en contacto con el lisado celular preferiblemente en una relación volumétrica en un intervalo de 3 : 1 a 1 : 3, con especial preferencia de 2 : 1 a 1 : 2, y lo más preferido en una relación volumétrica de aproximadamente 1 : 1 y se mezclan cuidadosamente, por ejemplo, con vórtex. A continuación, la composición se centrifuga y la fase acuosa se separa de la fase orgánica. De esta manera, uno o varios de los componentes distintos del ácido nucleico (α_1) se han enriquecido en la fase acuosa separada, que ahora se introduce como fase P_1 a la etapa de procedimiento ii).

En la etapa de procedimiento ii) del procedimiento según la invención, la fase acuosa P_1 se pone ahora en contacto con una matriz de intercambio aniónico para unir el ácido nucleico (α_1) a la matriz de intercambio aniónico.

Según la reivindicación 1, en la etapa ii) se realiza poner en contacto la fase P_1 con una matriz de intercambio aniónico para unir el ácido nucleico (α_1) a la matriz de intercambio aniónico, realizándose la unión de los ácidos nucleicos a la matriz de intercambio aniónico a un valor de pH en un intervalo de 3 a 7, presentando la matriz de intercambio aniónico grupos funcionales seleccionados del grupo constituido por grupos amino, grupos hidracina y grupos imina que están al menos parcialmente presentes en forma catiónica en las condiciones bajo las que se pone en contacto la fase acuosa P_1 con la matriz de intercambio aniónico y estando presente la matriz de intercambio aniónico en forma de un recubrimiento sobre partículas magnéticas y moviéndose continuamente para la unión de los ácidos nucleicos la fase acuosa P_1 puesta en contacto con las partículas, y separándose las partículas magnéticas de la fase acuosa P_1 como agregados magnéticos.

Como matriz de intercambio aniónico pueden utilizarse a este respecto en principio todos los materiales reivindicados, que presentan los grupos funcionales reivindicados, que a las condiciones, bajo las que se pone en contacto la fase acuosa P_1 con la matriz de intercambio aniónico, especialmente bajo las condiciones de pH, están presentes al menos parcialmente en forma catiónica.

En el caso de la matriz de intercambio aniónico se trata preferiblemente de un sólido que comprende un esqueleto básico eléctricamente neutro. Este esqueleto básico se define por el tamaño, forma, porosidad, propiedades mecánicas y los grupos funcionales positivamente cargados, unidos preferiblemente covalentemente al esqueleto sólido. Las tres clases más frecuentes de materiales del esqueleto básico son ácido silícico, polisacáridos y poliolefinas sintéticas, utilizándose como poliolefinas principalmente resinas de poliestireno o poli(met)acrilo. Las resinas de poli(met)acrilo comprenden polímeros de numerosas amidas de ácido (met)acrílico sustituidas (= poli(met)acrilamidas) y ésteres de ácido (met)acrílico (= poli(met)-acrilatos), pudiendo llevar el monómero de ácido (met)acrílico sustituyentes alquilo en el carbono C-2 o en C-3. Como grupos funcionales, que están unidos al esqueleto básico, se prefieren especialmente grupos funcionales seleccionados del grupo que contiene grupos amino primarios, secundarios o terciarios, grupos hidracina y grupos imina. Como matriz de intercambio aniónico más preferida son los materiales de esqueleto a los que están unidos covalentemente grupos dietilaminoetilo (DEAE, $[\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-]_n$), especialmente DEAE-celulosa, así como polietileniminas lineales o ramificadas, que comprenden grupos $[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-]$ y/o grupos $[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)-]$. Según la invención, la matriz de intercambio aniónico se encuentra en forma de un recubrimiento sobre partículas magnéticas, lo más preferido sobre superparamagnéticas, ferrimagnéticas o ferromagnéticas. Las partículas magnéticas presentan en comparación con las partículas no magnéticas la ventaja de formar agregados magnéticos y, por tanto, pueden separarse cuidadosa, rápida y eficazmente de la fase acuosa P_1 .

Las partículas magnéticas preferidas que pueden recubrirse con la matriz de intercambio aniónico pueden obtenerse, por ejemplo, en las empresas Dynal, Advanced Magnetics Inc., Biotechnologies Ltd., Amersham, Promega, Scigen, Advanced Genetic Technologies y Seradyn. Partículas magnéticas adecuadas son especialmente aquellas que se describen en el documento WO-A-83/03920, así como las partículas comercializadas como DYNABEADS por la empresa Dynal AS (Oslo, Noruega). Si se utilizan polietileniminas como matriz de intercambio aniónico, entonces se prefieren especialmente partículas magnéticas funcionalizadas con epóxido, por ejemplo, aquellas que pueden obtenerse con el nombre "M-PVA E0x" de la empresa Chemagen AG, Baesweiler, Alemania. También sería concebible la utilización de partículas funcionalizadas con carboxilato que también pueden obtenerse de la empresa Chemagen AG con los nombres de productos "M-PVA C11" o "M-PVA C12". Las partículas magnéticas presentan preferiblemente un diámetro de partícula medio en un intervalo de 0,1 a 100 μm , con especial preferencia 0,5 a 50 μm , y lo más preferido 1 a 10 μm , mientras que la superficie específica se encuentra preferiblemente en un intervalo de 0,5 a 250 m^2/g , con especial preferencia en un intervalo de 1 a 50 m^2/g .

Según la invención, la unión del ácido nucleico ($\alpha 1$) a la matriz de intercambio aniónico en la etapa de procedimiento ii) se realiza a un valor de pH en un intervalo de 3 a 7 y lo más preferido en un intervalo de 4 a 6.

Siempre y cuando la fase acuosa P_1 utilizada en la etapa de procedimiento ii) presente un valor de pH que se desvía de estos valores de pH, lo que puede ser especialmente el caso en el uso de un tampón de lisis que contiene SDS alcalino, entonces puede ser necesario ajustar el valor de pH en la fase acuosa antes o durante la puesta en contacto de la fase acuosa P_1 con la matriz de intercambio aniónico, por ejemplo, mediante la adición de un tampón de neutralización al valor deseado. Este tampón de neutralización contiene preferiblemente una sal alcalina de ácido acético, con especial preferencia acetato de potasio, en una concentración en un intervalo de 10 a 10.000 mmol/l , con especial preferencia en un intervalo de 50 a 5.000 mmol/l , y lo más preferido en un intervalo de 100 a 1.000 mmol/l , presentando la solución de neutralización preferiblemente un valor de pH en un intervalo de 2 a 8, con especial preferencia en un intervalo de 4 a 6. El ajuste del valor de pH a un valor dentro de los intervalos anteriormente descritos en la solución de la sal alcalina de ácido acético se realiza preferiblemente mediante la adición de ácido acético.

Además, según una forma de realización especial del procedimiento según la invención puede ser preferible que la unión del ácido nucleico ($\alpha 1$) a la matriz de intercambio aniónico en la etapa de procedimiento ii) se realice en presencia de una sal alcalina, preferiblemente en presencia de cloruro de potasio, cloruro sódico o cloruro de litio, pero con especial preferencia en presencia de cloruro sódico, encontrándose la concentración de estas sales alcalinas en la unión preferiblemente en un intervalo de 0,01 a 10 mol/l , con especial preferencia en un intervalo de 0,05 a 5 mol/l , y lo más preferido en un intervalo de 0,25 a 0,75 mol/l . El ajuste de estas concentraciones de sal durante la unión puede realizarse o bien por el hecho de que se añada a la fase acuosa P_1 ya presente, por ejemplo, un lisado celular, una solución salina correspondientemente concentrada, o bien suspendiendo células en presencia de un tampón de suspensión o lisándose bien en presencia de un tampón de lisis, que presenta una concentración de sales correspondientes.

Además, según otra forma de realización especial del procedimiento según la invención puede preferirse que la unión del ácido nucleico ($\alpha 1$) a la matriz de intercambio aniónico en la etapa de procedimiento ii) se realice en presencia de una sustancia caótrópica, especialmente de una sal caótrópica como, por ejemplo, isocianato de guanidinio, encontrándose la concentración de estas sales caótrópicas en la unión preferiblemente en un intervalo de 0,1 a 10 mol/l , con especial preferencia en un intervalo de 0,5 a 5 mol/l , y lo más preferido en un intervalo de 1 a 3 mol/l . Además, en esta forma de realización especial del procedimiento según la invención también puede ser ventajoso realizar la unión en presencia de disolventes orgánicos miscibles con agua, especialmente en presencia de alcoholes como etanol o isopropanol en una concentración en un intervalo del 10 al 70 % en volumen, con especial preferencia 20 al 60 % en volumen.

En la utilización de partículas recubiertas con la matriz de intercambio aniónico la unión se realiza preferiblemente de manera que la fase acuosa P_1 puesta en contacto con las partículas se mueva continuamente, por ejemplo, mediante un agitador, realizándose también en este caso la unión preferiblemente a temperaturas en un intervalo de 1 a 30 $^{\circ}\text{C}$, con especial preferencia 2 a 25 $^{\circ}\text{C}$, por ejemplo, a temperatura ambiente.

Después de la unión de los ácidos nucleicos ($\alpha 1$) a la matriz de intercambio aniónico, éstos pueden lavarse en una etapa de procedimiento iii) dado el caso mediante un tampón de lavado. En una utilización de partículas magnéticas recubiertas con una matriz de intercambio aniónico, el lavado se realiza preferiblemente de manera que el recipiente de reacción, en el que se encuentran las partículas magnéticas que se ponen en contacto con la fase acuosa P_1 , se pone en contacto con un imán, de manera que debido al campo magnético las partículas magnéticas se adhieren a las paredes internas del recipiente de reacción. Bajo estas circunstancias, la fase acuosa P_1 puede retirarse fácilmente y sustituirse por el tampón de lavado. Dispositivos adecuados para esto pueden obtenerse, por ejemplo, de la empresa Dynal, Oslo, Noruega.

En el caso del tampón de lavado puede tratarse, por ejemplo, de agua libre de RNasa, de mezclas de agua y disolventes orgánicos solubles en agua como, por ejemplo, mezclas de agua con 1 al 80 % en volumen de un alcohol soluble en agua, por ejemplo, con 1 al 80 % en volumen de etanol o isopropanol, o de soluciones salinas

acuosas, especialmente soluciones acuosas de acetato, por ejemplo, solución acuosa de acetato de sodio con una concentración de acetato de sodio en un intervalo de 1 a 50 mmol/l, con especial preferencia 5 a 25 mmol/l, prefiriéndose especialmente el tampón de lavado preferiblemente a un valor de pH en un intervalo de 4 a 9.

- 5 La etapa del lavado puede repetirse, dependiendo de la necesidad, una vez, dos, tres veces, dado el caso también más frecuentemente, utilizando un tampón de lavado respectivamente nuevo.

Después de la unión del ácido nucleico ($\alpha 1$) a la matriz de intercambio aniónico en la etapa de procedimiento ii) y dado el caso el lavado en la etapa de procedimiento iii), en la etapa de procedimiento iv) se realiza la separación del ácido nucleico ($\alpha 1$) unido a la matriz de intercambio aniónico de la matriz de intercambio aniónico manteniendo una fase fluida P_2 , preferiblemente acuosa, que contiene el ácido nucleico ($\alpha 1$).

Según la reivindicación 1, la separación se realiza mediante elución.

- 15 La elución se realiza preferiblemente poniendo en contacto la matriz de intercambio aniónico con un tampón de elución que disuelve el enlace entre los grupos funcionales de la matriz de intercambio aniónico y del ácido nucleico ($\alpha 1$), de manera que como fase líquida P_2 se obtiene un eluato que contiene el ácido nucleico ($\alpha 1$).

En una utilización de partículas magnéticas recubiertas con una matriz de intercambio aniónico, la elución se realiza preferiblemente de manera que el recipiente de reacción, en el que se encuentran las partículas magnéticas que se ponen en contacto con la fase acuosa P_1 o el tampón de lavado, se pone en contacto con un imán, de manera que debido al campo magnético las partículas magnéticas se adhieren a las paredes internas del recipiente de reacción. Bajo estas circunstancias, la fase acuosa P_1 puede retirarse fácilmente y sustituirse por el tampón de elución.

- 20 En el caso del tampón de elución se trata preferiblemente de una solución salina acuosa, especialmente de soluciones acuosas que contiene haluros de metal alcalino como, por ejemplo, NaCl, KCl o LiCl, haluros de metal alcalinotérreo como, por ejemplo, $CaCl_2$ o $MgCl_2$, sales de amonio como, por ejemplo, cloruro de amonio o sulfato de amonio o mezclas de al menos dos de estas sales, pudiendo también contener el tampón de elución dado el caso sistemas tampón como, por ejemplo, acetato alcalino/ácido acético o sistemas tampón basados en tris(hidroximetil)amino-metano.

Según una forma de realización especial del procedimiento según la invención, el tampón de elución contiene sales de calcio solubles en agua como $CaCl_2$, sales de magnesio solubles en agua como $MgCl_2$, sales de amonio solubles en agua como sulfato de amonio o cloruro de amonio, o mezclas de al menos dos de estas sales. Si el tampón de elución contiene $CaCl_2$, entonces esta sal se encuentra preferiblemente en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l, con especial preferencia 5 a 500 mmol/l, y lo más preferido 10 a 100 mmol/l. Si el tampón de elución contiene $MgCl_2$, entonces esta sal se encuentra preferiblemente en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l, con especial preferencia 5 a 500 mmol/l, y lo más preferido 10 a 100 mmol/l. Si el tampón de elución contiene sulfato de amonio y/o cloruro de amonio, entonces estas sales se encuentran preferiblemente en una concentración total en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l, con especial preferencia 5 a 500 mmol/l, y lo más preferido 20 a 300 mmol/l. El valor de pH del tampón de elución se encuentra preferiblemente en un intervalo de 5 a 12, preferiblemente 6 a 10, y con especial preferencia 7 a 10.

Especialmente, tampones de elución que contienen como sales preferiblemente exclusivamente sales de calcio, especialmente $CaCl_2$, y/o sales de amonio, preferiblemente sulfato de amonio y/o cloruro de amonio, son especialmente adecuados para enriquecer selectivamente miARN en comparación con ARNt. Así, con los tampones de elución constituidos por agua y $CaCl_2$ en una concentración de preferiblemente hasta 60 mmol/l y también con tampones de elución constituidos por agua y sulfato de amonio o cloruro de amonio en una concentración de preferiblemente hasta 170 a 200 mmol/l puede lograrse un buen enriquecimiento de miARN con enriquecimiento simultáneo de ARNt, de manera que estos tampones de elución son especialmente adecuados para el enriquecimiento selectivo de miARN a partir de composiciones que contienen miARN y ARNt.

Tampones de elución especialmente adecuados según la invención son

- 55 - un tampón de elución EP_1 que contiene 1 a 10.000 mmol/l, con especial preferencia 10 a 5.000 mmol/l, y lo más preferido 50 a 1.000 mmol/l de TRIS, 1 a 1.000 mmol/l, preferiblemente 5 a 800 mmol/l, y lo más preferido 10 a 500 mmol/l de una sal alcalina, preferiblemente NaCl o KCl, 1 a 400 mmol/l, con especial preferencia 10 a 300 mmol/l, y lo más preferido 50 a 200 mmol/l de una sal de amonio, preferiblemente sulfato de amonio o cloruro de amonio, así como 0,1 a 200 mmol/l, con especial preferencia 0,5 a 100 mmol/l, y lo más preferido 1 a 50 mmol/l de una sal de magnesio, preferiblemente cloruro de magnesio, disuelto en agua, y que presenta preferiblemente un valor de pH en un intervalo de 7 a 11, con especial preferencia 8 a 10;
- 60 - un tampón de elución EP_2 que contiene 1 a 1.000 mmol/l, con especial preferencia 5 a 500 mmol/l, y lo más preferido 10 a 100 mmol/l de una sal de magnesio, preferiblemente cloruro de magnesio, disuelto en agua, y que presenta preferiblemente un valor de pH en un intervalo de 6 a 10, con especial preferencia 7 a 9;

- un tampón de elución EP₃ que contiene 1 a 1.000 mmol/l, con especial preferencia 5 a 500 mmol/l, y lo más preferido 10 a 100 mmol/l de una sal de calcio, preferiblemente cloruro de calcio, disuelto en agua, y que presenta preferiblemente un valor de pH en un intervalo de 6 a 10, con especial preferencia 7 a 9;
- 5 - un tampón de elución EP₄ que contiene 1 a 1.000 mmol/l, con especial preferencia 5 a 500 mmol/l, y lo más preferido 20 a 300 mmol/l de una sal de amonio, preferiblemente cloruro de amonio o sulfato de amonio, disuelto en agua, y que presenta preferiblemente un valor de pH en un intervalo de 6 a 10, con especial preferencia 7 a 9;
- 10 - un tampón de elución EP₅ que contiene 1 a 2.000 mmol/l, con especial preferencia 10 a 1.000 mmol/l, y lo más preferido 100 a 500 mmol/l de una sal alcalina, preferiblemente cloruro de potasio, cloruro sódico o cloruro de litio, disuelto en agua, y que presenta preferiblemente un valor de pH en un intervalo de 6 a 10, con especial preferencia 7 a 9.

15 Especialmente son adecuados los tampones de elución EP₁ a EP₄, para purificar miARN a partir de composiciones que contienen miARN y ARNt, mientras que el tampón de elución EP₅ es especialmente adecuado para purificar en general ácidos nucleicos con una longitud de menos de 300 nucleótidos, especialmente menos de 100 nucleótidos, de composiciones que, además de estos nucleótidos, contienen ácidos nucleicos todavía más largos. Al aumentar la concentración de Mg²⁺, Ca²⁺ o NH₄⁺ en los tampones de elución EP₂ a EP₄, puede además regularse selectivamente el enriquecimiento de miARN en comparación con ARNt a partir de composiciones que contienen miARN y ARNt.

20 Según una forma de realización especial del procedimiento según la invención, se prefiere que la cantidad relativa de ARN con una longitud de menos de 300 nucleótidos, preferiblemente menos de 100 nucleótidos, y lo más preferido menos de 25 nucleótidos, en la fase acuosa P₂, referido a la cantidad total de ARN en la fase acuosa P₂, sea mayor de un factor de al menos 2, con especial preferencia al menos 4, además preferiblemente al menos 6, además incluso más preferiblemente al menos 10 y lo más preferido al menos 20, que la cantidad relativa de ARN con una longitud de menos de 300 nucleótidos, preferiblemente menos de 100 nucleótidos y lo más preferido menos de 25 nucleótidos, en la fase acuosa P₁, referido a la cantidad total de ARN en la fase acuosa P₁.

25 En otra forma de realización especial del procedimiento según la invención, especialmente en aquella forma de realización en la que se utiliza un tampón de elución EP₁ a EP₄, se prefiere que la cantidad relativa de miARN en la fase acuosa P₂, referido a la cantidad total de miARN y ARNt en la fase acuosa P₂, sea mayor de un factor de al menos 2, con especial preferencia al menos 4, además preferiblemente al menos 6, además más preferiblemente al menos 10 y lo más preferido al menos 20, que la cantidad relativa de miARN en la fase acuosa P₁, referido a la cantidad total de miARN y ARNt en la fase acuosa P₁.

30 También se da a conocer un kit para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud de menos de 300 nucleótidos, preferiblemente menos de 100 nucleótidos, y lo más preferido menos de 25 nucleótidos, que comprende:

- 40 (β1) un tampón de lisis o un concentrado de tampón de lisis,
- (β2) una matriz de intercambio aniónico,
- 45 (β3) un tampón de elución,
- (β4) dado el caso un tampón de suspensión,
- (β5) dado el caso un tampón de neutralización,
- 50 (β6) dado el caso un tampón de lavado, así como
- (β7) dado el caso una sustancia de extracción, por ejemplo fenol, un alcohol como, por ejemplo, etanol, o mezclas de los mismos.

55 Con un kit tal puede realizarse el procedimiento anteriormente descrito.

60 Como tampón de suspensión (β4), tampón de lisis (β1), tampón de neutralización (β5), tampón de lavado (β6) y tampón de elución (β3) se prefieren aquellos tampones que ya se han mencionado como tampones preferidos en relación con el procedimiento según la invención. En el caso del concentrado de tampón de lisis se trata de un tapón que contiene el compuesto efectivo para la lisis, especialmente el detergente o la sal caótrota, en una concentración que es mayor que la concentración presente en la lisis de las células. Un concentrado de tampón de lisis tal se utiliza entonces especialmente cuando como material de partida, del que se aislarán los ácidos nucleicos de cadena corta, se utilizarán suspensiones celulares en las que entonces pueden ajustarse las condiciones de lisis necesarias para la lisis mediante la adición de cantidades definidas de concentrado de tampón de lisis.

Como matriz de intercambio aniónico ($\beta 2$) también se consideran materiales que ya se mencionaron como matriz de intercambio aniónico preferida en relación con el procedimiento para el enriquecimiento de ácidos nucleicos, por ejemplo, especialmente también con una partícula magnética o no magnética recubierta con matriz de intercambio aniónico.

5 Según una forma de realización especial del kit, éste contiene como matriz de intercambio aniónico ($\beta 2$) partículas magnéticas recubiertas con una matriz de intercambio aniónico y, como tampón de elución ($\beta 3$), uno de los tampones seleccionados del grupo que contiene EP₁, EP₂, EP₃ y EP₄.

10 Una contribución al logro de los objetivos mencionados al principio también se hace por el uso de un kit para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud de menos de 300 nucleótidos según las reivindicaciones 19-20 en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1-18.

15 Además, se da a conocer el uso del kit anteriormente descrito en el procedimiento descrito al principio para purificar ácidos nucleicos con una longitud de menos de 300 nucleótidos, preferiblemente menos de 200 nucleótidos, con especial preferencia menos de 100 nucleótidos, además preferiblemente menos de 50 nucleótidos, y lo más preferido menos de 25 nucleótidos.

20 También se da a conocer el uso de una matriz de intercambio aniónico para purificar ácidos nucleicos con una longitud de menos de 300 nucleótidos, preferiblemente menos de 200 nucleótidos, con especial preferencia menos de 100 nucleótidos, además preferiblemente menos de 50 nucleótidos y lo más preferido menos de 25 nucleótidos, prefiriéndose como matriz de intercambio aniónico y como nucleótidos aquellos compuestos que ya se mencionaron al principio como componentes preferidos en relación con el procedimiento según la invención para purificar ácidos nucleicos.

25 También se da a conocer un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad una contribución al logro de los objetivos mencionados al principio, que comprende las etapas de procedimiento:

30 (γ1) Diagnóstico de la enfermedad mediante un procedimiento de diagnóstico que comprende el enriquecimiento de los ácidos nucleicos con una longitud de menos de 300 nucleótidos, preferiblemente menos de 200 nucleótidos, con especial preferencia menos de 100 nucleótidos, además preferiblemente menos de 50 nucleótidos, y lo más preferido menos de 25 nucleótidos, según el procedimiento de purificación descrito al principio, así como
 35 (γ2) tratamiento terapéutico de la enfermedad diagnosticada.

Como enfermedad que va a tratarse se consideran todas las enfermedades cuya causa o transcurso se correlaciona de cualquier forma con el tipo y cantidad de ácidos nucleicos presentes en determinadas células del cuerpo o fluidos corporales con una longitud de menos de 300 nucleótidos, preferiblemente menos de 200 nucleótidos, con especial preferencia menos de 100 nucleótidos, además preferiblemente menos de 50 nucleótidos y lo más preferido menos de 25 nucleótidos, pero especialmente con el tipo y cantidad de miARN, a no ser que un cambio del tipo y cantidad de estos ácidos nucleicos, en comparación con un paciente sano, sea la causa de la enfermedad o que un cambio del tipo y cantidad de estos ácidos nucleicos, en comparación con un paciente sano, sea una consecuencia de la enfermedad.

45 La invención se explica ahora más detalladamente mediante figuras y ejemplos no limitantes.

La Figura 1 muestra un gel de poliacrilamida al 15 % teñido con nitrato de plata, con el que se separó el eluato obtenido en el Ejemplo 1 (aplicación doble en el gel; a = tampón de lavado después del primer lavado, b = tampón de lavado después del segundo lavado, c = eluato).

50 La Figura 2 muestra un gel de poliacrilamida al 15 % teñido con nitrato de plata, con el que se separó el eluato obtenido en el Ejemplo 2 (aplicación doble en el gel).

La Figura 3 muestra un gel de poliacrilamida al 15 % teñido con nitrato de plata, con el que se separó el eluato obtenido en el Ejemplo 3 (aplicación doble en el gel).

55 La Figura 4 muestra un gel de poliacrilamida al 15 % teñido con nitrato de plata, con el que se separó el eluato obtenido en el Ejemplo 4 (aplicación doble en el gel).

60 La Figura 5 muestra un gel de poliacrilamida al 15 % teñido con nitrato de plata, con el que se separó el eluato obtenido en el Ejemplo 5 (aplicación doble en el gel).

Ejemplos

65 En los siguientes ejemplos se añadieron cantidades conocidas de miARN a un fondo celular.

Ejemplo 1

Se mezclaron 10^6 células con $1 \mu\text{g}$ de miARN antisentido miR177 y se lisaron con ayuda de $550 \mu\text{l}$ de un tampón de lisis que contenía NaCl 0,5 M, 1 % (v/v) de Triton-X-100. Después de incubación de 10 minutos sobre hielo se añadieron $550 \mu\text{l}$ de fenol ácido. Después de agitar con vórtex se centrifugó durante 5 minutos a $20.800 \times g$, se eliminó la fase acuosa y se mezcló con $652 \mu\text{g}$ de partículas magnéticas recubiertas con polietilenimina.

Las partículas se obtuvieron suspendiendo 4 g de partículas magnéticas funcionalizadas con epóxido (partículas M-PVA E0x de la empresa Chemagen AG, Baesweiler, Alemania) en 50 ml de una solución al 10 % de polietilenimina de peso molecular alto (Sigma-Aldrich, N° de cat. de Aldrich 40,872-7) en agua, pH 10, transfiriendo a un matraz redondo y calentando con agitación durante 10 horas a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Después, esta mezcla se lavó seis veces con agua desalada con separación magnética.

Después de agitar 5 minutos sobre un agitador de placa, el sobrenadante se desechó y se lavó dos veces con $500 \mu\text{l}$ de agua, que se había ajustado a pH 4,7, 5,5, 7,0 o 8,5 (carriles a y b en el gel de la Figura 1). Se eluyó con $20 \mu\text{l}$ de un tampón que contenía 1 mol/l de Tris/Cl, pH 9,5, 400 mmol/l de KCl, 100 mmol/l de sulfato de amonio y 30 mmol/l de MgCl_2 . Las alícuotas del eluato se cargaron sobre un gel de poliacrilamida al 15 % y se tiñeron con nitrato de plata (carriles c en la Figura 1).

Con 0,5 mol/l de NaCl como tampón de lisis pueden purificarse eficientemente miARN, en los eluatos tan solo se encuentran durante la elución miARN y ARNt, todas las especies de ácido nucleico restantes se han enriquecido por el procedimiento de purificación.

Ejemplo 2

Se mezclaron 10^6 células con $1 \mu\text{g}$ de ARN antisentido let7a, se lisaron y se unieron a partículas magnéticas, como se especifica en el Ejemplo 1. Después de dos etapas de lavado con agua se eluyó con $20 \mu\text{l}$ de tampón, usándose como tampón de elución 100 mmol/l de NaCl, 250 mmol/l de NaCl, 400 mmol/l de NaCl, 100 mmol/l de KCl, 250 mmol/l de KCl y 400 mmol/l de KCl. Las alícuotas de los eluatos se cargaron sobre un gel de poliacrilamida al 15 % y se tiñeron con nitrato de plata (Figura 2).

En este experimento es evidente que las sales son adecuadas en diferentes molaridades para la elución. En el uso de NaCl, KCl y LiCl (datos no mostrados) como tampón de elución pueden purificarse en alta cantidad tanto ARNt como también miARN.

Ejemplo 3

Se procedió como en el Ejemplo 2, utilizándose como tampón de elución tampones con 10 a 100 mmol/l de MgCl_2 . Las alícuotas de los eluatos se cargaron sobre un gel de poliacrilamida al 15 % y se tiñeron con nitrato de plata (Figura 3).

Este experimento muestra que con ayuda de MgCl_2 como tampón de elución también pueden purificarse miARN. Si se usan molaridades bajas de MgCl_2 como tampón de elución, se enriquecen relativamente los ARNt, así como ácidos nucleicos más largos, mientras que los miARN pueden encontrarse de nuevo con muy buen rendimiento.

Ejemplo 4

Se procedió como en el Ejemplo 2, utilizándose como tampón de elución tampones con 10 a 85 mmol/l de CaCl_2 . Las alícuotas de los eluatos se cargaron sobre un gel de poliacrilamida al 15 % y se tiñeron con nitrato de plata (Figura 4).

Hasta una molaridad de CaCl_2 de aproximadamente 50 mmol/l pueden eluir miARN con muy buena tasa de recuperación, mientras que en los eluatos solo están presentes trazas de ARNt. Si la molaridad se aumenta más, también pueden eluirse adicionalmente ARNt con buena tasa de recuperación.

Ejemplo 5

Se procedió como en el Ejemplo 2, utilizándose como tampón de elución tampones con 25 a 400 mmol/l de sulfato de amonio o 25 a 400 mmol/l de cloruro de amonio. Las alícuotas de los eluatos se cargaron sobre un gel de poliacrilamida al 15 % y se tiñeron con nitrato de plata (Figura 5).

Sobre todo las sales de amonio, junto con el cloruro de calcio, muestran en la elución las mejores propiedades, para lograr un alto rendimiento de miARN con rendimiento de ARNt simultáneo el más bajo posible. Hasta una concentración de sal de amonio en el eluato a aproximadamente 170 a 200 mmol/l, el rendimiento de ARNt permanece relativamente bajo, mientras que el rendimiento de miARN a estas molaridades es muy bueno. A partir de una concentración de aproximadamente 400 mmol/l también puede encontrarse mucho ARNt en los eluatos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para enriquecer ácidos nucleicos con una longitud de menos de 300 nucleótidos de una muestra que se selecciona del grupo constituido por plasma, suero, un fluido corporal, un frotis y un lisado celular, que comprende las etapas de procedimiento
- 5
- i) Proporcionar una fase fluida P₁, preferiblemente acuosa, que contiene
- (α1) al menos un ácido nucleico con una longitud de menos de 300 nucleótidos, así como
- 10 (α2) al menos un componente distinto de este ácido nucleico (α1),
- ii) poner en contacto la fase P₁ con una matriz de intercambio aniónico para unir el ácido nucleico (α1) a la matriz de intercambio aniónico, realizándose la unión de los ácidos nucleicos a la matriz de intercambio aniónico a un valor de pH en un intervalo de 3 a 7, presentando la matriz de intercambio aniónico grupos funcionales seleccionados del grupo constituido por grupos amino, grupos hidracina y grupos imina que están al menos
- 15 parcialmente presentes en forma catiónica en las condiciones bajo las que se pone en contacto la fase acuosa P₁ con la matriz de intercambio aniónico, y estando la matriz de intercambio aniónico presente en forma de un recubrimiento sobre partículas magnéticas y para la unión de los ácidos nucleicos la fase acuosa P₁ puesta en contacto con las partículas se mueve continuamente, y separándose las partículas magnéticas de la fase acuosa P₁ como agregados magnéticos,
- 20 iii) dado el caso lavar la matriz de intercambio aniónico con un tampón de lavado, permaneciendo el ácido nucleico (α1) unido a la matriz de intercambio aniónico, así como
- iv) eluir el ácido nucleico (α1) unido a la matriz de intercambio aniónico de la matriz de intercambio aniónico mediante la sustitución de la fase acuosa P₁ o del tampón de lavado con un tampón de elución manteniendo una
- 25 fase acuosa P₂ que contiene el ácido nucleico (α1).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en el caso del ácido nucleico (α1) se trata de un ARN.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que el ARN se selecciona del grupo que contiene miARN, pre-miARN, ARNip, ARNnp, ARNnop, ARNt, 5S-ARNr, 5,8S-ARNr o mezclas de al menos dos de ellos, o en el que en el caso del ARN se trata de miARN, pre-miARN, ARNt o mezclas de miARN y ARNt.
- 30
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que en el caso de la fase fluida P₁ proporcionada en la etapa de procedimiento i) se trata de un material que se selecciona del grupo constituido por plasma, suero, un fluido corporal y un lisado celular.
- 35
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el fluido corporal es sangre, orina, espermatozoides, saliva, líquido cefalorraquídeo o esputo.
- 40
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que como tampón de elución se utiliza una solución salina acuosa.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado por que** el tampón de elución es una solución acuosa que contiene haluros alcalinos, haluros alcalinotérreos, sales de amonio o mezclas de al menos dos de estas sales y en el que el tampón de elución también puede contener sistemas tampón.
- 45
8. Procedimiento según las reivindicaciones 6 o 7, **caracterizado por que** el tampón de elución contiene sales de calcio solubles en agua, preferiblemente CaCl₂, sales de magnesio solubles en agua, preferiblemente MgCl₂, sales de amonio solubles en agua, preferiblemente sulfato de amonio o cloruro de amonio, o mezclas de al menos dos de estas sales.
- 50
9. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizado por que** el tampón de elución contiene CaCl₂ y presenta una de las siguientes características:
- 55
- a) el CaCl₂ se encuentra en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l;
- b) el CaCl₂ se encuentra en una concentración en un intervalo de 5 a 500 mmol/l;
- c) el CaCl₂ se encuentra en una concentración en un intervalo de 10 a 100 mmol/l.
10. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizado por que** el tampón de elución contiene MgCl₂ y presenta una de las siguientes características:
- 60
- a) el MgCl₂ se encuentra en una concentración en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l;
- b) el MgCl₂ se encuentra en una concentración en un intervalo de 5 a 500 mmol/l;
- 65 c) el MgCl₂ se encuentra en una concentración en un intervalo de 10 a 100 mmol/l.

11. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizado por que** el tampón de elución contiene sulfato de amonio y/o cloruro de amonio y presenta una de las siguientes características:

- a) estas sales se encuentran en una concentración total en un intervalo de 1 a 1.000 mmol/l;
- b) estas sales se encuentran en una concentración total en un intervalo de 5 a 500 mmol/l;
- c) estas sales se encuentran en una concentración total en un intervalo de 20 a 300 mmol/l.

12. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado por que** el valor de pH del tampón de elución se encuentra en un intervalo de 5 a 12.

13. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se utiliza un tampón de elución, que contiene exclusivamente sales de calcio, preferiblemente CaCl_2 , y/o sales de amonio, preferiblemente sulfato de amonio y/o cloruro de amonio.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado por que** se utiliza un tampón de elución constituido por agua y CaCl_2 en una concentración de hasta 60 mmol/l o constituido por agua y sulfato de amonio o cloruro de amonio en una concentración de hasta 170 a 200 mmol/l.

15. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que el tampón de elución se selecciona de:

a) tampón de elución EP_1 , que contiene disueltos en agua

- i) 1 a 10.000 mmol/l, 10 a 5.000 mmol/l o 50 a 1.000 mmol/l de TRIS,
- ii) 1 a 1.000 mmol/l, 5 a 800 mmol/l o 10 a 500 mmol/l de una sal alcalina, preferiblemente NaCl o KCl,
- iii) 1 a 400 mmol/l, 10 a 300 mmol/l o 50 a 200 mmol/l de una sal de amonio, preferiblemente sulfato de amonio o cloruro de amonio y
- iv) 0,1 a 200 mmol/l, 0,5 a 100 mmol/l o 1 a 50 mmol/l de una sal de magnesio, preferiblemente cloruro de magnesio,

presentando el tampón de elución EP_1 preferiblemente un valor de pH en un intervalo de 7 a 11, con especial preferencia de 8 a 10;

b) tampón de elución EP_2 , que contiene disueltos en agua 1 a 1.000 mmol/l, 5 a 500 mmol/l o 10 a 100 mmol/l de una sal de magnesio, preferiblemente cloruro de magnesio, presentando el tampón de elución EP_2 preferiblemente un valor de pH en un intervalo de 6 a 10, con especial preferencia de 7 a 9;

c) tampón de elución EP_3 , que contiene disueltos en agua 1 a 1.000 mmol/l, 5 a 500 mmol/l o 10 a 100 mmol/l de una sal de calcio, preferiblemente cloruro de calcio, presentando el tampón de elución EP_3 preferiblemente un valor de pH en un intervalo de 6 a 10, con especial preferencia de 7 a 9;

d) tampón de elución EP_4 , que contiene disueltos en agua 1 a 1.000 mmol/l, 5 a 500 mmol/l o 20 a 300 mmol/l de una sal de amonio, preferiblemente cloruro de amonio o sulfato de amonio, presentando el tampón de elución EP_4 preferiblemente un valor de pH en un intervalo de 6 a 10, con especial preferencia de 7 a 9;

e) tampón de elución EP_5 que contiene disueltos en agua 1 a 2.000 mmol/l, 10 a 1.000 mmol/l o 100 a 500 mmol/l de una sal alcalina, preferiblemente cloruro de potasio, cloruro sódico o cloruro de litio, presentando el tampón de elución EP_5 preferiblemente un valor de pH en un intervalo de 6 a 10, con especial preferencia de 7 a 9.

16. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que la fase acuosa P_1 proporcionada en la etapa de procedimiento i) es un lisado celular y en el que el lisado celular puede obtenerse mediante un procedimiento que comprende las etapas de procedimiento:

- I) Proporcionar células,
- II) lisar las células obteniendo un lisado celular, así como
- III) dado el caso separar del lisado celular al menos parcialmente el al menos un componente (α_2) distinto del ácido nucleico (α_1).

17. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 16, en el que la cantidad relativa de ARN con una longitud de menos de 300 nucleótidos en la fase P_2 , referida a la cantidad total de ARN en la fase P_2 , es mayor en un factor de al menos 2 que la cantidad relativa de ARN con una longitud de menos de 300 nucleótidos en la fase P_1 , referido a la cantidad total de ARN en la fase P_1 , o la cantidad relativa de miARN en la fase acuosa P_2 , referido a la cantidad total de miARN y ARNt en la fase acuosa P_2 , es mayor en un factor de al menos 2 que la cantidad relativa de miARN en la fase acuosa P_1 , referido a la cantidad total de miARN y ARNt en la fase acuosa P_1 .

18. Procedimiento según una o varias de las reivindicaciones 1 a 17, **caracterizado por que** la unión del ácido nucleico (α_1) a la matriz de intercambio aniónico en la etapa de procedimiento ii) se realiza en presencia de una sal alcalina, preferiblemente cloruro sódico, encontrándose la concentración de la sal alcalina en la unión en un intervalo de 0,01 a 10 mol/l, preferiblemente de 0,05 a 5 mol/l, con especial preferencia de 0,25 a 0,75 mol/l.

19. Uso de un kit para el enriquecimiento de ácidos nucleicos con una longitud de menos de 300 nucleótidos en un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende:

- 5 (β1) un tampón de lisis o un concentrado de tampón de lisis,
 (β2) una matriz de intercambio aniónico, estando la matriz de intercambio aniónico presente en forma de un recubrimiento sobre partículas magnéticas y presentando la matriz de intercambio aniónico (β2) grupos funcionales seleccionados del grupo constituido por grupos amino, grupos hidracina y grupos imina,
 (β3) un tampón de elución seleccionado de:

- 10 (β3.1) tampón de elución EP₁, que contiene disueltos en agua
- i) 1 a 10.000 mmol/l, 10 a 5.000 mmol/l o 50 a 1.000 mmol/l de TRIS,
 - 15 ii) 1 a 1.000 mmol/l, 5 a 800 mmol/l o 10 a 500 mmol/l de una sal alcalina, preferiblemente NaCl o KCl,
 - iii) 1 a 400 mmol/l, 10 a 300 mol/l o 50 a 200 mmol/l de una sal de amonio, preferiblemente sulfato de amonio o cloruro de amonio y
 - iv) 0,1 a 200 mmol/l, 0,5 a 100 mmol/l o 1 a 50 mmol/l de una sal de magnesio, preferiblemente cloruro de magnesio,

- 20 (β3.2) tampón de elución EP₂, que contiene disueltos en agua 1 a 1.000 mmol/l, 5 a 500 mmol/l o 10 a 100 mmol/l de una sal de magnesio, preferiblemente cloruro de magnesio,
 (β3.3) tampón de elución EP₃, que contiene disueltos en agua 1 a 1.000 mmol/l, 5 a 500 mmol/l o 10 a 100 mmol/l de una sal de calcio, preferiblemente cloruro de calcio,
 (β3.4) tampón de elución EP₄, que contiene disueltos en agua 1 a 1.000 mmol/l, 5 a 500 mmol/l o 20 a 300 mmol/l de una sal de amonio, preferiblemente cloruro de amonio o sulfato de amonio,
 25 (β3.5) tampón de elución EP₅ que contiene disueltos en agua 10 a 500 mmol/l de una sal alcalina, concretamente cloruro de potasio o cloruro de litio,

- 30 (β4) dado el caso un tampón de suspensión,
 (β5) dado el caso un tampón de neutralización,
 (β6) dado el caso un tampón de lavado, así como
 (β7) dado el caso una sustancias de extracción.

35 20. Uso según la reivindicación 19, en el que el tampón de elución EP₁ presenta un valor de pH en un intervalo de 7 a 11, con especial preferencia de 8 a 10; el tampón de elución EP₂ presenta un valor de pH en un intervalo de 6 a 10, con especial preferencia de 7 a 9; el tampón de elución EP₃ presenta un valor de pH en un intervalo de 6 a 10, con especial preferencia de 7 a 9, el tampón de elución EP₄ presenta un valor de pH en un intervalo de 6 a 10, con especial preferencia de 7 a 9 y el tampón de elución EP₅ presenta un valor de pH en un intervalo de 6 a 10, con especial preferencia de 7 a 9.

40

Fig. 1/5

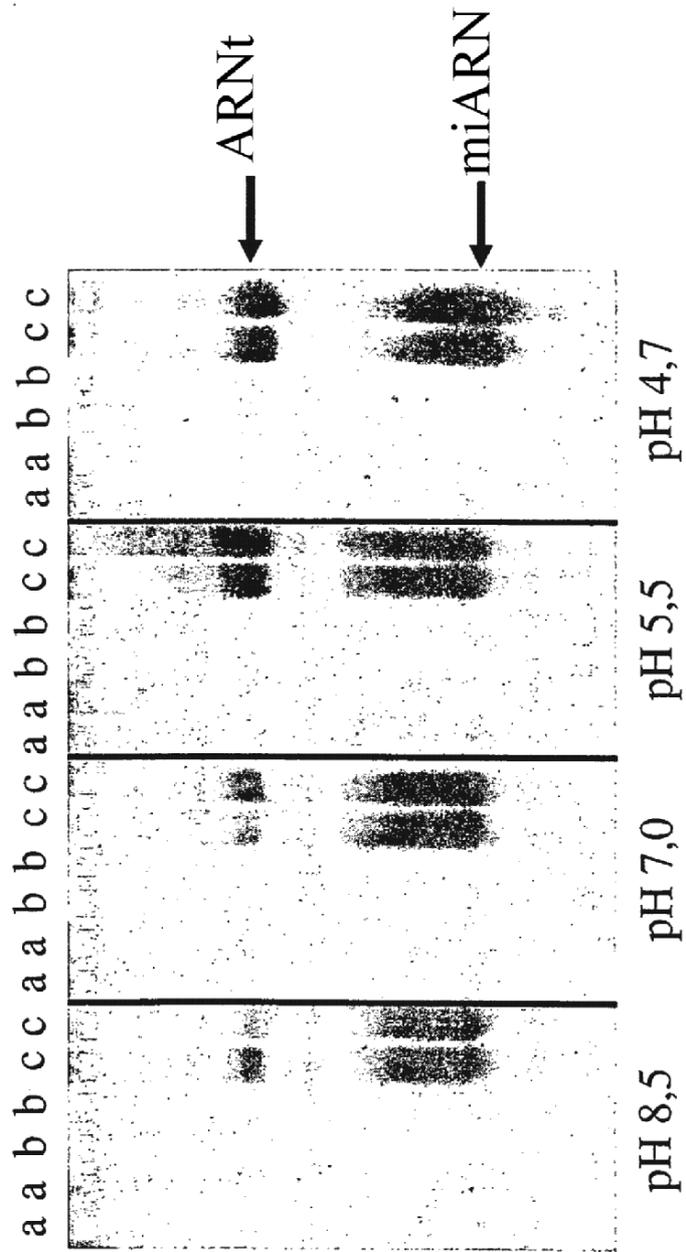


Fig. 2/5

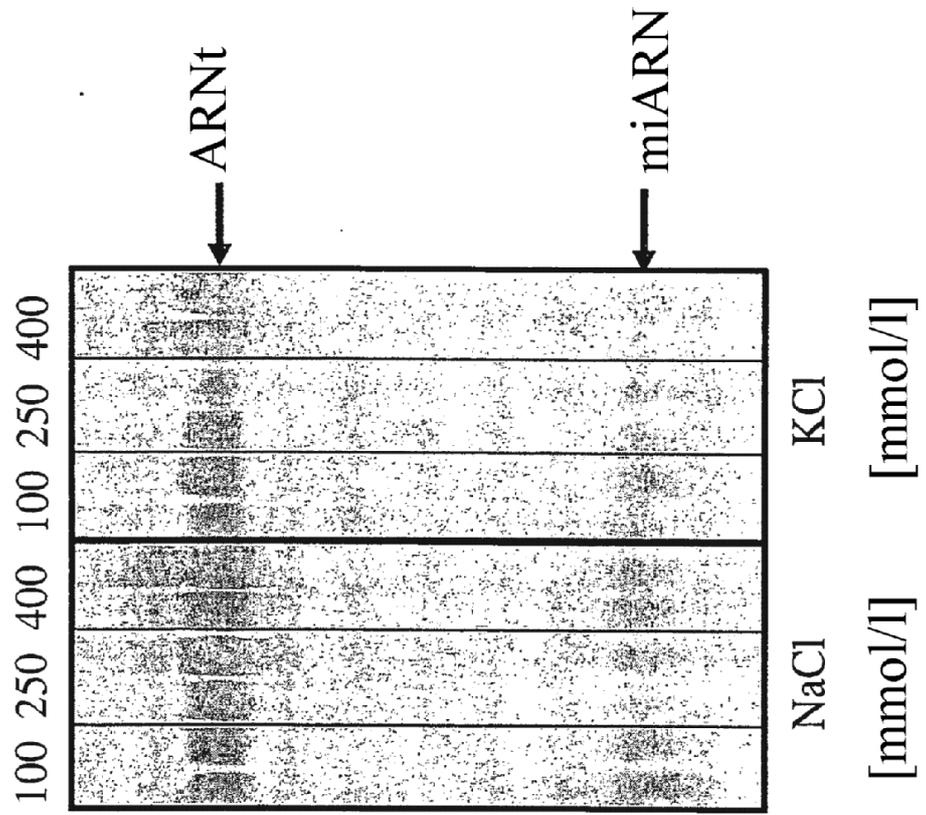


Fig. 3/5

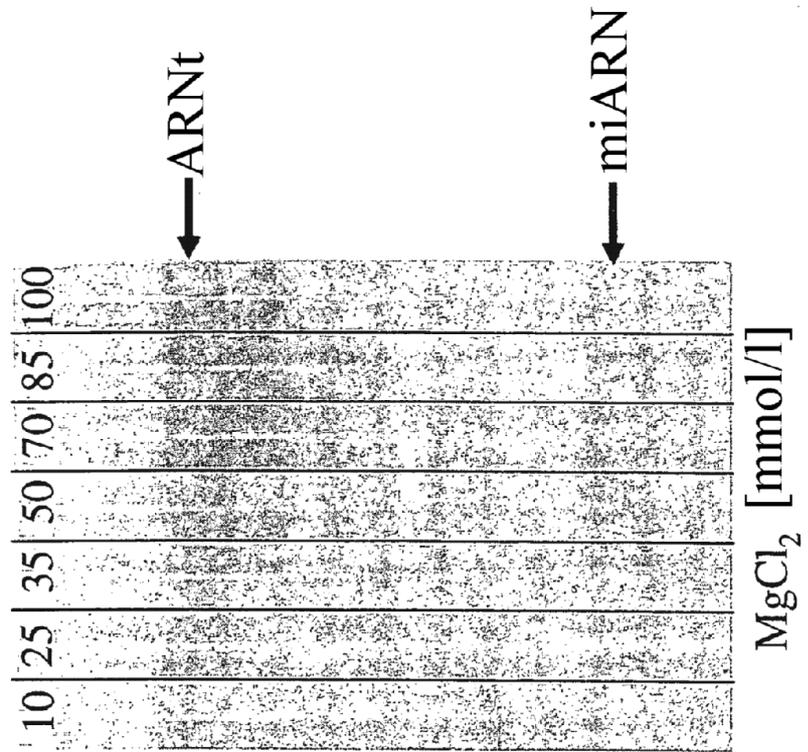


Fig. 4/5

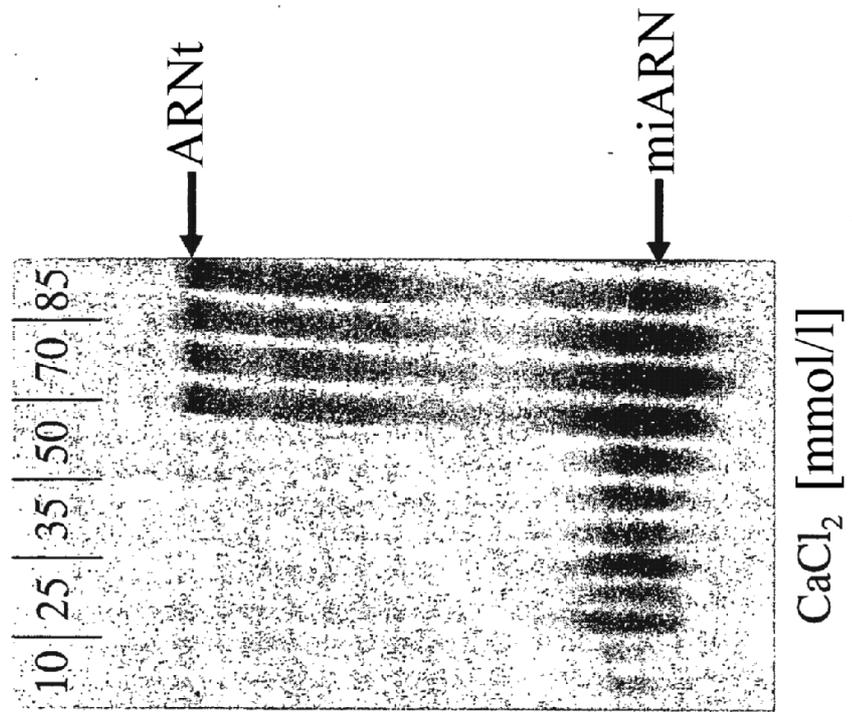


Fig. 5/5

