

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 277**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2010 E 14181813 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2816111**

54 Título: **Métodos, composiciones y kits de generación de muestras empobrecidas en ARNr o de aislamiento del ARNr de las muestras**

30 Prioridad:

14.08.2009 US 234044 P

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

07.06.2016

73 Titular/es:

**EPICENTRE TECHNOLOGIES CORPORATION
(100.0%)
726 Post Road
Madison, WI 53713, US**

72 Inventor/es:

SOOKNANAN, ROY R.

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 573 277 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

Métodos, composiciones y kits de generación de muestras empobrecidas en ARNr o de aislamiento del ARNr de las muestras

5

[0001] La presente solicitud reivindica la prioridad con respecto a la solicitud provisional de EE.UU. con número de serie 61/234.044, presentada el 14 de agosto de 2009.

Campo de la invención

10

[0002] La presente invención se refiere a métodos, composiciones y kits para la generación de muestras empobrecidas en ARNr y para el aislamiento del ARNr de muestras. En particular, la presente invención proporciona composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que presentan secuencias complementarias a esencialmente toda al menos una molécula de ARNr de longitud completa codificada por un gen de ARNr (por ejemplo, composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que presentan secuencias que, bien solas o en combinación, son complementarias a esencialmente toda o a la secuencia completa de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 28S, 26S, 25S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S) y métodos de uso de dichas composiciones para generar muestras empobrecidas en ARNr o para aislar ARNr de muestras.

Antecedentes de la invención

[0003] Dado que el ARNr comprende del aproximadamente 95 % al aproximadamente 98 % del ARN de una célula, su presencia puede complicar diversos tipos de análisis de otras moléculas de ARN de interés en una muestra (por ejemplo, el análisis de expresión génica mediante matrices o micromatrices, la secuenciación de nueva generación de moléculas de ADNc marcadas creadas a partir de uno o más tipos de moléculas de ARN en muestras (por ejemplo, usando los métodos de secuenciación digitales masivamente paralelos denominados "ARN-Seq"), etc.). Los problemas causados por el ARNr son especialmente difíciles para el análisis de moléculas de ARN de interés que estén fragmentadas. Por ejemplo, un problema considerable y continuo en la técnica es encontrar mejores métodos de extracción del ARNr degradado de secciones de tejidos fijados con formalina embebidos en parafina (FFPE). Si se pudiera disponer de mejores métodos para retirar el ARNr degradado de muestras (por ejemplo, muestras derivadas de FFPE), se cree que las enormes cantidades de muestras clínicas, para las que se registran los resultados médicos de diversas enfermedades y diversos tratamientos en los registros médicos, proporcionarían información sumamente valiosa relacionada con la identificación de los ARN implicados en la causa, el mantenimiento, la respuesta, el diagnóstico o el pronóstico de muchas enfermedades tales como el cáncer. Además, mejores métodos para la extracción del ARNr, incluyendo el ARNr degradado, de moléculas de ARN distintas del ARNr de interés mejorarían en gran medida la aplicabilidad y el éxito de los métodos que comprenden la degradación deliberada del ARN como parte del método en particular (tal como el método de Ingolia *et al.*, *Science* 324: 218-23, 2009).

[0004] El documento WO 2007/019444 A2 desvela un método de extracción del ARNr usando oligonucleótidos biotinilados. Los oligonucleótidos biotinilados usados para retirar el ARNr resultan ser de aproximadamente 20 nucleobases de longitud. Comprenden solo un marcador de afinidad.

45

[0005] El manual para el kit RiboMinus™ de Invitrogen: "RiboMinus Transcriptome Isolation Kit (Human/Mouse)", obtenido de Internet en URL: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ribominus_human_mouse_man.pdf, el 12 de marzo de 2012, desvela un método de extracción del ARNr usando sondas de oligonucleótido que están biotiniladas. Las sondas comprenden un marcador de afinidad.

50

[0006] Su y Sordillo en "Molecular Biotechnology", vol. 10, n.º 1, agosto de 1998, en las páginas 83-85, desvelan un método sencillo de enriquecimiento en ARNm a partir de ARN procariota total. El método usa ARNr antisentido marcado con biotina para retirar el ARNr.

55 Sumario de la invención

[0007] La presente invención proporciona métodos, composiciones y kits, según lo definido en las reivindicaciones, de generación de muestras empobrecidas en ARNr o de aislamiento del ARNr de las muestras. En particular, la presente invención proporciona métodos de generación de composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, kits que comprenden dichas composiciones y métodos de uso de dichas composiciones para generar muestras empobrecidas en ARNr o para aislar ARNr de una muestra (por ejemplo, para su posterior análisis y uso).

[0008] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de generación de una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que presentan secuencias que, bien solas o

en combinación, son complementarias a la secuencia completa de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 28S, 26S, 25S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S, en los que la composición es para su uso en un método de generación de una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento del ARNr de una muestra. En algunas realizaciones, la composición comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que presentan secuencias que, bien solas o en combinación, son complementarias a múltiples moléculas de ARNr diferentes seleccionadas entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 28S, 26S, 25S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S de una o varias células u organismos. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de uso de la composición que comprende las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad para la generación de una muestra empobrecida en ARNr y/o para el aislamiento del ARNr de una muestra.

[0009] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que, bien solas o en combinación, muestran una o más secuencias que son complementarias a esencialmente toda la secuencia mostrada por al menos una molécula de ARNr de longitud completa seleccionada entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 28S, 26S, 25S, 18S, 5,8S y/o 5S, y moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que, bien solas o en combinación, muestran una o más secuencias que son complementarias a esencialmente toda la secuencia mostrada por la al menos una molécula de ARNr de longitud completa seleccionada entre moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S. En realizaciones particulares, la al menos una molécula de ARNr citoplasmática de longitud completa incluye tanto el ARNr 28S y como el ARNr 18S (o tanto el ARNr 25S como el ARNr 18S, o tanto el ARNr 26S como el ARNr 18S) de una o múltiples células, tejidos, órganos u organismos eucariotas. En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ARNr de longitud completa incluye tanto el ARNr 23S como el ARNr 16S de uno o varios organismos procariotas. En algunas realizaciones en las que la al menos una molécula de ARNr de longitud completa incluye tanto el ARNr 28S como el ARNr 18S (o tanto el ARNr 25S como el ARNr 18S, o tanto el ARNr 26S como el ARNr 18S) de una o múltiples células, tejidos, órganos u organismos eucariotas, las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad también corresponden a la molécula de ARNr 5,8S y la molécula de ARNr 5S de una o múltiples células, tejidos, órganos u organismos eucariotas. En algunas realizaciones, las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad también corresponden a al menos una molécula de ARNr de longitud completa que incluye moléculas de ARNr mitocondrial eucariotas tanto 12S como 16S de una o múltiples células, tejidos, órganos u organismos eucariotas. En algunas realizaciones, las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad también corresponden a al menos una molécula de ARNr de longitud completa que incluye tanto el ARNr 23S como el ARNr 16S de uno o varios organismos procariotas, y en algunas realizaciones, las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad también corresponden a al menos una molécula de ARNr de longitud completa que incluye las moléculas de ARNr 5S de uno o varios organismos procariotas. En realizaciones adicionales de cualquiera de las composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, las composiciones están esencialmente exentas de moléculas de ARN distintas del ARNr que comprenden los marcadores de afinidad. En realizaciones adicionales de cualquiera de las composiciones que comprenden las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, las composiciones comprenden además una matriz de unión que comprende moléculas de unión al marcador de afinidad.

[0010] En algunas realizaciones en las que la composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad corresponde a la totalidad de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 28S, 26S, 25S y 18S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S y 16S, dichas moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad se fragmentan (por ejemplo, mediante la fragmentación con nucleasa controlada o mediante la fragmentación controlada usando un catión de metal divalente, tal como Mg²⁺, y calor). En algunas realizaciones, la composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad fragmentadas comprende fragmentos que varían en tamaño de aproximadamente 3.500 nucleótidos a aproximadamente 240 nucleótidos.

[0011] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método de generación de una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que comprende: a) generar moléculas de ADN bicatenario que comprenden un promotor de ARN polimerasa que dirige la síntesis de ARN del ARN antisentido correspondiente a la totalidad de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 8,5S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S; y b) poner en contacto las moléculas de ADN bicatenario que comprenden el promotor de la ARN polimerasa con una ARN polimerasa y ribonucleósido-5'-trifosfatos complementarios a todas las nucleobases, incluyendo al menos un par de ribonucleósido-5'-trifosfatos complementario a la misma nucleobase, uno de cuyos pares comprende un marcador de afinidad y el otro de cuyos pares no comprende un marcador de afinidad, e incubar en condiciones en las que se generen moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad correspondientes a esencialmente toda de la secuencia de la al menos una molécula de ARNr.

[0012] Con respecto a dichos métodos, el trabajo realizado durante el desarrollo de las realizaciones de la

presente invención determinó que la concentración de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprendían el marcador de afinidad en comparación con la concentración de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que carecían del marcador de afinidad en el al menos un par de ribonucleósido-5'-trifosfatos complementarios a la misma nucleobase era importante para generar una composición que comprendiera moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que se pudieran usar para retirar >95 % de la al menos una molécula de ARNr de una muestra, y que era necesario que la concentración relativa de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprendían el marcador de afinidad fuera superior a la usada previamente en la técnica. En algunas realizaciones del presente método de generación de una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido, al menos aproximadamente el 35 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el al menos un par de ribonucleósido-5'-trifosfatos comprenden un marcador de afinidad, y aproximadamente el 65 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el par no tienen un marcador de afinidad. En algunas realizaciones del presente método, al menos aproximadamente el 40 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el al menos un par de ribonucleósido-5'-trifosfatos tienen un marcador de afinidad, y aproximadamente el 60 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el par no tienen un marcador de afinidad. En algunas realizaciones del presente método, al menos aproximadamente el 50 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el al menos un par de ribonucleósido-5'-trifosfatos tienen un marcador de afinidad, y aproximadamente el 50 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el par no tienen un marcador de afinidad. En algunas realizaciones del presente método, al menos aproximadamente el 60 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el al menos un par de ribonucleósido-5'-trifosfatos tienen un marcador de afinidad, y aproximadamente el 40 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el par no tienen un marcador de afinidad. En algunas realizaciones del presente método, en las que la al menos una molécula de ARNr se selecciona entre ARNr citoplasmático eucariota 5,8S y 5S, y ARNr 5S procariota, al menos aproximadamente el 75 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el al menos un par de ribonucleósido-5'-trifosfatos tienen un marcador de afinidad, y el 25 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el par no tienen un marcador de afinidad.

[0013] En algunas otras realizaciones, la presente invención proporciona un método de generación de una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que comprende: a) generar moléculas de ADN bicatenario que comprenden un promotor de ARN polimerasa que dirige la síntesis de ARN del ARN antisentido correspondiente a la totalidad de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y 23S, moléculas de ARNr procariota 16S y 5S; b) poner en contacto las moléculas de ADN bicatenario que comprenden el promotor de la ARN polimerasa con una ARN polimerasa y ribonucleósido-5'-trifosfatos complementarios a la totalidad de las nucleobases, incluyendo al menos un ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenda un resto reactivo al marcador de afinidad (por ejemplo, un grupo alilamino en la posición de uridina) e incubar en condiciones en las que se generen moléculas de ARNr antisentido que comprendan el resto reactivo al marcador de afinidad, moléculas de ARNr antisentido que correspondan a esencialmente la totalidad de la secuencia de la al menos una molécula de ARNr; y c) poner en contacto las moléculas de ARNr antisentido que comprenden el resto reactivo al marcador de afinidad con una cantidad de un reactivo de marcador de afinidad (por ejemplo, Biotina-X-X-NHS, EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI) en condiciones en las que el reactivo de marcador de afinidad reaccione con al menos una parte de los restos reactivos al marcador de afinidad en las moléculas de ARNr antisentido que comprenden el resto reactivo al marcador de afinidad, y se generen moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad.

[0014] El trabajo realizado durante el desarrollo de las realizaciones de la presente invención encontró que el número relativo de los marcadores de afinidad por el número dado de nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad es importante para generar una composición que comprenda moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que se pueda usar para retirar >95 % de la al menos una molécula de ARNr de una muestra, y que el número de los marcadores de afinidad por el número dado de nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad generadas usando el método varía en función de la cantidad de los restos reactivos al marcador de afinidad presentes en las moléculas de ARNr antisentido generadas en la etapa b), de las propiedades y de la concentración del reactivo al marcador de afinidad, de las condiciones de reacción y del tiempo de reacción. Así pues, en algunas realizaciones del presente método, el 100 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden una determinada nucleobase tiene un resto reactivo al marcador de afinidad. En algunas otras realizaciones del presente método, el ribonucleósido-5'-trifosfato incluye al menos un par de ribonucleósido-5'-trifosfatos complementarios a la misma nucleobase, uno de cuyos pares comprende un resto reactivo al marcador de afinidad (por ejemplo, UTP que tiene un grupo reactivo alilamino en la posición de la uridina o "AA-UTP") y el otro par no comprende un marcador de afinidad. En algunas realizaciones del presente método, al menos aproximadamente el 50 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el al menos un par de ribonucleósido-5'-trifosfatos tiene un resto reactivo al marcador de afinidad, y aproximadamente el 50 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el par no tiene un resto reactivo al marcador de afinidad. En algunas realizaciones del presente método, al menos aproximadamente el 75 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el al menos un par de ribonucleósido-5'-trifosfatos tiene un resto reactivo al marcador de afinidad, y el 25 % de las moléculas de ribonucleósido-5'-trifosfato que comprenden el par no tiene un resto reactivo al marcador de afinidad. En algunas realizaciones del presente método, el reactivo de

marcador de afinidad es un reactivo de biotilación (por ejemplo, Biotina-X-X-NHS) y el marcador de afinidad comprende biotina. En algunas realizaciones, la biotina está unida a través de un brazo espaciador a la nucleobase (por ejemplo, un brazo espaciador unido al grupo allamino en la posición de la uridina, por ejemplo, de la incorporación de AA-UTP).

5

[0015] En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona un método de generación de una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido que comprende: a) generar moléculas de ADN bicatenario que comprenden un promotor de ARN polimerasa que dirige la síntesis de ARN del ARN antisentido correspondiente a la totalidad de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S; y b) poner en contacto las moléculas de ADN bicatenario que comprenden el promotor de la ARN polimerasa con una ARN polimerasa y ribonucleósido-5'-trifosfatos complementarios a la totalidad de las nucleobases, incluyendo al menos un par de ribonucleósido-5'-trifosfatos complementarios a la misma nucleobase, uno de cuyos pares comprende un marcador de afinidad y el otro par no comprende un marcador de afinidad; e incubar en condiciones en las que se generen moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad correspondientes a esencialmente la totalidad de la secuencia de la al menos una molécula de ARNr, estando los marcadores de afinidad presentes en una proporción de al menos dos marcadores de afinidad por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad (por ejemplo, basándose en la cuantificación de la fluorescencia de 200 ng de ARNr antisentido marcado por afinidad de acuerdo con las instrucciones suministradas con el kit de cuantificación de la biotina por fluorescencia, Pierce Biotechnology, Rockford, IL; n.º de cat. Thermo 46610) tras la digestión del ARNr antisentido marcado por afinidad con RNasa 1 a 36 °C durante 45 min e inactivación térmica de la enzima de acuerdo con la bibliografía sobre la RNasa 1 proporcionada por el fabricante, EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI). En algunas otras realizaciones del presente método, los marcadores de afinidad están presentes en una proporción de al menos aproximadamente tres a cinco marcadores de afinidad por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad (por ejemplo, basándose en los datos de fluorescencia obtenidos usando el kit de cuantificación de la biotina por fluorescencia de Pierce). En algunas otras realizaciones del presente método, los marcadores de afinidad están presentes en una proporción de al menos aproximadamente cuatro a seis marcadores de afinidad por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad (por ejemplo, basándose en los datos de fluorescencia obtenidos usando el kit de cuantificación de la biotina por fluorescencia de Pierce). En algunas otras realizaciones del presente método, los marcadores de afinidad están presentes en una proporción de al menos aproximadamente seis a ocho marcadores de afinidad por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad (por ejemplo, basándose en los datos de fluorescencia obtenidos usando el kit de cuantificación de la biotina por fluorescencia de Pierce). En algunas realizaciones del presente método en las que la al menos una molécula de ARNr se selecciona entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 28S, 26S, 25S y 18S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S y 16S, al menos del aproximadamente 35 % al aproximadamente 50 % de los ribonucleósido-5'-trifosfatos que comprenden el al menos un par de ribonucleósido-5'-trifosfatos complementarios a la misma nucleobase comprende el marcador de afinidad (por ejemplo, un marcador de afinidad que comprende biotina; por ejemplo, biotina-16-UTP), y los marcadores de afinidad están presentes en las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad generadas en una proporción de al menos aproximadamente dos a ocho marcadores de afinidad por cada cien nucleobases (por ejemplo, basándose en los datos de fluorescencia obtenidos usando el kit de cuantificación de la biotina por fluorescencia de Pierce). En algunas realizaciones del presente método en las que la al menos una molécula de ARNr se selecciona entre moléculas de ARNr eucariota 5,8S y 5S, y moléculas de ARNr procariota 5S, al menos del aproximadamente 60 % al aproximadamente 75 % de los ribonucleósido-5'-trifosfatos que comprenden el al menos un par de ribonucleósido-5'-trifosfatos complementarios a la misma nucleobase comprende el marcador de afinidad (por ejemplo, un marcador de afinidad que comprende biotina; por ejemplo, biotina-16-UTP), y los marcadores de afinidad están presentes en las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad generadas en una proporción de al menos aproximadamente dos a ocho marcadores de afinidad por cada cien nucleobases (por ejemplo, basándose en los datos de fluorescencia obtenidos usando el kit de cuantificación de la biotina por fluorescencia de Pierce).

[0016] En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona un método de generación de una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido que comprende: a) generar moléculas de ADN bicatenario que comprenden un promotor de ARN polimerasa que dirige la síntesis de ARN del ARN antisentido correspondiente a la totalidad de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S; b) poner en contacto las moléculas de ADN bicatenario que comprenden el promotor de la ARN polimerasa con una ARN polimerasa y ribonucleósido-5'-trifosfatos complementarios a la totalidad de las nucleobases, incluyendo al menos un ribonucleósido-5'-trifosfato que comprende un resto reactivo al marcador de afinidad (por ejemplo, un grupo allamino en la posición 5 de la uridina), e incubar en condiciones en las que se generen moléculas de ARNr antisentido que comprenden el resto reactivo al marcador de afinidad, moléculas de ARNr antisentido que corresponden a esencialmente la totalidad de la secuencia de la al menos una molécula de ARNr; y c) poner en contacto las moléculas de ARNr antisentido que comprenden el resto reactivo al marcador de afinidad con una cantidad de un reactivo de marcador de afinidad (por ejemplo,

65

Biotina-X-X-NHS, EPICENTRE Biotechnologies, Madison, WI) en condiciones en las que el reactivo de marcador de afinidad reaccione con los restos reactivos al marcador de afinidad en las moléculas de ARNr antisentido que comprenden el resto reactivo al marcador de afinidad y se generen moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, estando los marcadores de afinidad presentes en una proporción de al menos aproximadamente dos marcadores de afinidad por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad (por ejemplo, basándose en la cuantificación de la fluorescencia de moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad digeridas por RNasa 1 (200 nanogramos) usando el kit de cuantificación de la biotina por fluorescencia de Pierce Biotechnology, Rockford, IL). En algunas otras realizaciones del presente método, los marcadores de afinidad están presentes en una proporción de al menos aproximadamente tres a cinco marcadores de afinidad por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad (por ejemplo, basándose en los datos de fluorescencia obtenidos usando el kit de cuantificación de la biotina por fluorescencia de Pierce). En algunas otras realizaciones del presente método, los marcadores de afinidad están presentes en una proporción de al menos aproximadamente cuatro a seis marcadores de afinidad por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad (por ejemplo, basándose en los datos de fluorescencia obtenidos usando el kit de cuantificación de la biotina por fluorescencia de Pierce). En algunas otras realizaciones del presente método, los marcadores de afinidad están presentes en una proporción de al menos aproximadamente seis a ocho marcadores de afinidad por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad (por ejemplo, basándose en los datos de fluorescencia obtenidos usando el kit de cuantificación de la biotina por fluorescencia de Pierce).

[0017] En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos del presente documento para generar moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, el marcador de afinidad comprende biotina. En algunas realizaciones, la biotina está unida a través de un brazo espaciador a la posición de la uridina. En algunas realizaciones de cualquiera de estos métodos, la ARN polimerasa se selecciona entre ARN polimerasa de T7, ARN polimerasa de T3 y ARN polimerasa de SP6. En algunas realizaciones de cualquiera de estos métodos, en las que la al menos una molécula de ARNr se selecciona entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S y 28S, la ARN polimerasa es ARN polimerasa de SP6. En algunas realizaciones de cualquiera de estos métodos, en las que la al menos una molécula de ARNr es un ARNr procariota 23S, la ARN polimerasa es ARN polimerasa de SP6.

[0018] En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos anteriores para generar moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, los métodos comprenden además, tras la generación de las moléculas de ARNr antisentido, poner en contacto las moléculas de ADN bicatenario que comprenden el promotor de la ARN polimerasa con una enzima DNasa en condiciones en las que se digieren las moléculas de ADN bicatenario que comprenden el promotor de la ARN polimerasa.

[0019] En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de generación de moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, la etapa a) del método (que comprende "generar moléculas de ADN bicatenario que comprendan un promotor de ARN polimerasa que dirija la síntesis de ARN del ARN antisentido correspondiente a la totalidad de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S") comprende bien: i) incubar la al menos una molécula de ARNr con una ADN polimerasa y al menos un par de cebadores en condiciones en las que se generen las moléculas de ADN bicatenario que comprenden un promotor de ARN polimerasa que sea capaz de dirigir la síntesis de ARN del ARN antisentido correspondiente a la totalidad de la al menos una molécula de ARNr, comprendiendo cada dicho al menos un par de cebadores un cebador directo y un cebador inverso, en la que el cebador inverso se aparea a la al menos una molécula de ARNr y tiene una parte 5' que presenta la secuencia de una cadena de un promotor de ARN polimerasa, y el cebador directo se aparea al ADN generado a partir del cebador inverso; o: ii) incubar la al menos una molécula de ARNr con una ADN polimerasa y al menos un par de cebadores en condiciones en las que se generen moléculas de ADN bicatenario, comprendiendo dicho al menos un par de cebadores un cebador directo y un cebador inverso, en la que el cebador inverso ceba la síntesis de ADN tras aparearse a la al menos una molécula de ARNr, y el cebador directo ceba la síntesis de ADN tras aparearse al ADN generado a partir de la extensión de la ADN polimerasa del cebador inverso y, a continuación, ligar dichas moléculas de ADN bicatenario generadas a partir de cada al menos un par de cebadores en un vector de ADN que comprenda un promotor de ARN polimerasa, en la que el promotor de la ARN polimerasa es capaz de dirigir la síntesis del ARN antisentido que sea complementario a la al menos una molécula de ARNr usando dicho ADN bicatenario que se liga en dicho vector de ADN como molde.

[0020] En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de generación de moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, la etapa a) del método (que comprende "generar moléculas de ADN bicatenario que comprendan un promotor de ARN polimerasa que dirija la síntesis de ARN del ARN antisentido correspondiente a la totalidad de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S") comprende obtener un fragmento de ADN genómico que codifique la al menos una molécula de ARNr, y bien: i) poner en contacto dicho fragmento de ADN genómico con una ADN polimerasa y al menos un par de cebadores, teniendo el primer cebador de cada uno de dicho al menos un par de cebadores una parte 5' que presenta la secuencia de una cadena de un promotor de ARN polimerasa y una parte 3' que es complementaria a

una parte de una primera cadena el fragmento de ADN genómico, y siendo el segundo cebador de cada dicho al menos un par de cebadores complementario a una parte de la segunda cadena del fragmento de ADN genómico, e incubar en condiciones en las que se generen copias de ADN bicatenario que contengan el promotor de la ARN polimerasa de al menos una parte del fragmento de ADN genómico, en la que el promotor de la ARN polimerasa es capaz de dirigir la síntesis de ARN del ARN antisentido correspondiente a la totalidad de la al menos una molécula de ARNr; o: ii) ligar dicho fragmento de ADN genómico o un producto de amplificación por PCR del mismo en un vector de ADN que comprenda un promotor de ARN polimerasa, obteniéndose un clon genómico, en la que el promotor de la ARN polimerasa de dicho clon genómico es capaz de dirigir la síntesis del ARN antisentido que sea complementario a la al menos una molécula de ARNr usando dicho ADN bicatenario que está ligado en dicho vector de ADN como molde.

[0021] En algunas realizaciones de los métodos de generación de moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad y de las composiciones generadas usando el método, las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad no presentan ninguna secuencia espaciadora transcrita interna de ARNr. En algunas otras realizaciones, las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad presentan secuencias espaciadoras transcritas internas seleccionadas entre: i) una secuencia presentada por la región espaciadora de ARNr de ITS1, que está ubicada entre un gen de ARNr 18S eucariota y un gen de ARNr 5,8S eucariota; ii) una secuencia presentada por la región espaciadora de ARNr de ITS2, que está ubicada entre un gen de ARNr 5,8S eucariota y un gen de ARNr 18S eucariota; iii) una secuencia presentada por una ITS 16S-23S procariota; e iv) una secuencia presentada por una ITS de ARNr 23S-5S procariota.

[0022] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que están unidas a una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad, en la que las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, solas o en combinación, presentan secuencias correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr de longitud completa seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S.

[0023] Una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que están unidas a una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad se genera mediante la incubación de la composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad con una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad en condiciones de unión, en la que el marcador de afinidad se une a las moléculas de unión a marcadores de afinidad que están unidas a la matriz o al soporte sólido (por ejemplo, micropartículas), formándose un par de unión específico. En algunas realizaciones, el presente método comprende además la etapa de lavar la composición en condiciones en las que se retiren las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que no se unan específicamente a la matriz de unión, generando así una composición purificada que comprenda moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que se unan a la matriz de unión.

[0024] En realizaciones particulares de dicho aspecto de la invención, la composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que están unidas a una matriz de unión puede ser cualquier composición de moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad descrita en el presente documento, y se puede generar usando cualquier método de generación de una composición que comprenda moléculas de ARNr antisentido descrita en el presente documento.

[0025] En una realización particular de esta composición, las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad comprenden biotina como marcador de afinidad, en la que la biotina se une a al menos aproximadamente dos nucleobases por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido y la matriz de unión comprende una micropartícula a la que se une una molécula de unión a marcador de afinidad que comprende estreptavidina o avidina. En algunas otras realizaciones de esta composición, las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad comprenden biotina como marcador de afinidad, en la que la biotina se une a al menos aproximadamente dos a cuatro nucleobases por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido, o a al menos tres a cinco nucleobases por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido, o a al menos cuatro a seis nucleobases por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido, o a al menos seis a ocho nucleobases por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido.

[0026] En algunas realizaciones de la invención, se usa cualquiera de las composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, incluyendo cualquiera de las composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que están unidas a una matriz de unión, en un método de la invención para generar una muestra empobrecida en ARNr o para aislar esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa.

[0027] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de generación de una muestra empobrecida en ARNr a partir de una muestra inicial que comprenden: a) proporcionar i) una muestra inicial que

comprende moléculas de ARN, en la que las moléculas de ARN comprenden moléculas de ARNr y al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés; ii) una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que, solas o en combinación, presentan secuencias correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr de longitud completa seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S; e iii) una matriz de unión (por ejemplo, micropartículas) que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad; b) poner en contacto la muestra inicial con la composición en condiciones que permitan que al menos parte de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad y al menos parte de las moléculas de ARNr formen híbridos de ARNr bicatenarios, generando así una muestra tratada;

5 c) poner en contacto la muestra tratada con la matriz de unión en condiciones que permitan que al menos una parte de los híbridos de ARNr bicatenarios se unan a la matriz de unión y se retiren de la muestra tratada, generando así una muestra empobrecida en ARNr, estando la muestra empobrecida en ARNr esencialmente exenta de secuencias de ARNr presentadas por la al menos una molécula de ARNr y comprendiendo esencialmente la totalidad de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés presente en la muestra inicial (por ejemplo, al menos

10 >90 % ..., >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ... o >99,9 % de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés presente en la muestra inicial).

[0028] En ciertas realizaciones, se repiten una o más etapas y/o se realizan métodos adicionales para generar la muestra empobrecida en ARNr. En realizaciones particulares, los métodos se realizan con series repetidas de

20 sustracción para generar la muestra empobrecida en ARNr. En realizaciones particulares, al menos una parte de las moléculas de ARN de la muestra inicial están muy fragmentadas y la muestra empobrecida en ARNr está al menos 50 % ... 60 % ... 70 % ... 80 % ... 90,0 % ... 95 % ... 98 % ... 99 % ... o 100 % exenta de secuencias de ARNr presentadas por la al menos una molécula de ARNr.

[0029] En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de generación de una muestra empobrecida en ARNr a partir de una muestra inicial que comprenden: a) proporcionar: i) una muestra inicial que comprende moléculas de ARN, en la que las moléculas de ARN comprenden moléculas de ARNr y al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés; ii) una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que, solas o en combinación, son complementarias a esencialmente la totalidad de la

30 secuencia presentada por la al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S; e iii) una matriz de unión (por ejemplo, micropartículas) que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad; b) poner en contacto la muestra inicial con la composición en condiciones que permitan que al menos parte de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad y al menos parte de las

35 moléculas de ARNr formen híbridos de ARNr bicatenarios, generando así una muestra tratada; c) poner en contacto la muestra tratada con la matriz de unión en condiciones que permitan que al menos una parte de los híbridos de ARNr bicatenarios se unan a la matriz de unión y se retiren de la muestra tratada, generando así una muestra empobrecida en ARNr, en la que la muestra empobrecida en ARNr comprende esencialmente la totalidad de (por ejemplo, >90 %..., >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ..., o >99,9 %) de la al menos una molécula de ARN

40 distinto del ARNr de interés presente en la muestra inicial y está esencialmente exenta de (por ejemplo, >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ..., o >99,9 % exenta) de secuencias de ARNr presentadas por la al menos una molécula de ARNr presente en la muestra inicial.

[0030] En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona métodos de generación de una muestra empobrecida en ARNr a partir de una muestra inicial que comprenden: a) proporcionar: i) una muestra inicial que comprende moléculas de ARN, en la que las moléculas de ARN comprenden moléculas de ARNr y al menos una molécula no de ARNr de ARN de interés; ii) una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad complementarias a esencialmente la totalidad de la secuencia presentada por la al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y

50 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S, estando los marcadores de afinidad presentes en las moléculas de ARNr antisentido en una proporción de al menos aproximadamente dos a al menos cuatro marcadores de afinidad por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido; e iii) una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad; b) poner en contacto la muestra inicial con la composición en condiciones que permitan que al menos parte de las moléculas

55 de ARNr antisentido marcadas por afinidad y al menos parte de las moléculas de ARNr formen híbridos de ARNr bicatenarios, generando así una muestra tratada; c) poner en contacto la muestra tratada con la matriz de unión en condiciones en las que al menos una parte de los híbridos de ARNr bicatenarios se unan a la matriz de unión y se retiren de la muestra tratada, generando así una muestra empobrecida en ARNr, en la que la muestra empobrecida en ARNr comprenda esencialmente la totalidad (por ejemplo, >90 %..., >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ..., o

60 >99,9 %) de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés presente en la muestra inicial y esté esencialmente exenta (por ejemplo, >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ..., o >99,9 % exenta) de moléculas que, bien solas o en combinación, presentan la secuencias de al menos una molécula de ARNr presente en la muestra inicial.

[0031] En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de generación de una muestra

empobrecida en ARNr a partir de una muestra inicial que comprenden: a) proporcionar; i) una muestra inicial que comprende moléculas de ARN, en la que las moléculas de ARN comprenden moléculas de ARNr y al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés; ii) una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad complementarias a esencialmente la totalidad de la secuencia presentada por la al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S; e iii) una matriz de unión (por ejemplo, micropartículas) que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad; b) poner en contacto la muestra inicial con la composición en condiciones que permitan que al menos parte de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad y al menos parte de las moléculas de ARNr formen híbridos de ARNr bicatenarios, generando así una muestra tratada; c) poner en contacto la muestra tratada con la matriz de unión en condiciones que permitan que al menos una parte de los híbridos de ARNr bicatenarios se unan a la matriz de unión y se retiren de la muestra tratada, generando así una muestra empobrecida en ARNr, en la que la muestra empobrecida en ARNr comprende esencialmente la totalidad (por ejemplo, >90 %..., >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ..., o >99,9 %) de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés presente en la muestra inicial) y en la que, la muestra empobrecida en ARNr bien: i) está >99,0 % exenta (por ejemplo, >99,0 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, 99,95 % o 99,99 % exenta) de moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan una secuencia de al menos una molécula de ARNr presente en la muestra inicial, o ii) contiene niveles no detectables de la al menos una molécula de ARNr de la muestra inicial medidos usando electroforesis de gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

[0032] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de generación de una muestra empobrecida en ARNr a partir de una muestra inicial que comprenden: a) proporcionar i) una muestra inicial que comprende moléculas de ARN, en la que las moléculas de ARN comprenden moléculas de ARNr y al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés; e ii) una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que están unidas a una matriz de unión (por ejemplo, micropartículas que comprenden moléculas de unión a marcadores de afinidad), en la que las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, solas o en combinación, presentan secuencias correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr de longitud completa seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S; b) poner en contacto la muestra inicial con la composición en condiciones que permitan que al menos parte de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad de la composición y al menos parte de las moléculas de ARNr formen híbridos de ARNr bicatenarios que se unan a la matriz de unión, generando así una muestra tratada; y c) retirar la matriz de unión a la que se han unido los híbridos de ARNr bicatenarios, generando así una muestra empobrecida en ARNr, en la que la muestra empobrecida en ARNr: i) está esencialmente exenta de secuencias de ARNr presentadas por la al menos una molécula de ARNr y comprende esencialmente la totalidad de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés presente en la muestra inicial (por ejemplo, al menos >90 % ..., >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ..., o >99,9 % de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés presente en la muestra inicial) e ii) bien, está esencialmente exenta (por ejemplo, >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ..., o >99,9 % exenta) de secuencias de ARNr presentadas por la al menos una molécula de ARNr presente en la muestra inicial o contiene niveles no detectables de la al menos una molécula de ARNr de la muestra inicial medidos usando electroforesis de gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. En realizaciones particulares del presente método de la invención, la composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que están unidas a una matriz de unión es cualquier composición de moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad descrita en el presente documento y/o se genera usando cualquier método de generación de una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido descrita en el presente documento.

[0033] En realizaciones particulares de cualquiera de los métodos de generación de una muestra empobrecida en ARNr, la muestra empobrecida en ARNr está un 98,0 % exenta de moléculas de ARNr que presentan secuencias de la al menos una molécula de ARNr (por ejemplo, 98,0 % exenta, 98,5 % exenta, 99,0 % exenta, 99,5 % exenta, 99,7 % exenta, 99,9 % exenta, 99,99 % exenta o 100 % exenta). En otras realizaciones, la al menos una molécula de ARNr incluye tanto el ARNr 28S como el ARNr 18S, y la muestra empobrecida en ARNr está 99,0 % exenta (por ejemplo, 99,5 % exenta) de moléculas de ARNr que presentan secuencias del gen de ARNr 28S y del gen de ARNr 18S. En otras realizaciones, la muestra empobrecida en ARNr contiene niveles no detectables de moléculas de ARNr que presentan secuencias de la al menos una molécula de ARNr (por ejemplo, no detectables medidos usando electroforesis de gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio). En algunas realizaciones del método, la composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad no presenta ninguna secuencia espaciadora transcrita interna de ARNr. En algunas otras realizaciones del método, la composición que comprende las moléculas de ARNr antisentido presenta secuencias espaciadoras transcritas internas seleccionadas entre: i) una secuencia presentada por la región espaciadora de ARNr de ITS1, que está ubicada entre un gen de ARNr 18S eucariota y un gen de ARNr 5,8S eucariota; ii) una secuencia presentada por la región espaciadora de ARNr de ITS2, que está ubicada entre un gen de ARNr 5,8S eucariota y un gen de ARNr 28S eucariota; iii) una secuencia presentada por una ITS 16S-23S procariota; e iv) una secuencia presentada por una ITS de ARNr 23S-5S procariota. En realizaciones particulares de los métodos de generación de muestras empobrecidas en ARNr o de aislamiento del ARNr de una muestra, la etapa b) se realiza usando una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido que no presentan ninguna secuencia espaciadora transcrita interna de ARNr, mientras que, en

otras realizaciones, la etapa b) se realiza usando una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que presentan una o más de las secuencias espaciadoras transcritas internas.

[0034] En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de generación de una muestra empobrecida en ARNr a partir de una muestra inicial en la que la muestra inicial comprende moléculas de ARN que comprenden moléculas de ARNr y al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés, las moléculas de ARN de la muestra inicial se fragmentan (por ejemplo, a partir de una muestra de FFPE o de otra muestra que comprenda moléculas de ARN degradadas, o de una muestra en la que las moléculas de ARN se degraden deliberadamente (por ejemplo, mediante la incubación en presencia de calor y Mg²⁺) antes de proporcionarse a la muestra inicial). En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de la invención de generación de una muestra empobrecida en ARNr, la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés comprende múltiples moléculas de ARN distinto del ARNr de interés. En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés comprende esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN distinto del ARNr presentes en la muestra inicial (por ejemplo, incluyendo tanto las moléculas de ARN distinto del ARNr intactas como fragmentadas presentes en la muestra inicial). En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés comprende esencialmente la totalidad de las moléculas de ARNm eucariotas presentes en la muestra inicial. En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés comprende esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN distinto del ARNr que comprenden el transcriptoma (menos la al menos una molécula de ARNr) de una o varias células, tejidos, órganos u organismos eucariotas (por ejemplo, para su uso en la fabricación de moldes de secuenciación o ácido nucleico diana marcado, por ejemplo, para el análisis de la expresión o de la expresión relativa de dicha al menos una molécula de ARN distinto del ARNr mediante análisis de la expresión digital o análisis de micromatriz, respectivamente). En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés comprende las moléculas de ARN distinto del ARNr que comprenden un transcriptoma (menos la al menos una molécula de ARNr) de una o varias células, tejidos, órganos u organismos eucariotas (por ejemplo, para su uso en la fabricación de moldes de secuenciación o ácido nucleico diana marcado, por ejemplo, para el análisis de la expresión o de la expresión relativa de dichas moléculas de ARN distinto del ARNr mediante análisis de la expresión digital o análisis de micromatriz, respectivamente, por ejemplo, para el análisis médico o agrícola). En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés comprende una subfracción de las moléculas de ARN distinto del ARNr que comprenden el transcriptoma (menos la al menos una molécula de ARNr) de una o varias células, tejidos, órganos u organismos eucariotas (por ejemplo, una subfracción seleccionada entre moléculas de ARNm, moléculas de ARNm, moléculas de ARNnc, ARNpiwi, ARNsn, etc.) (por ejemplo, para su uso en la fabricación de moldes de secuenciación o ácido nucleico diana marcado, por ejemplo, para el análisis de la expresión o de la expresión relativa de dicha subfracción de moléculas de ARN distinto del ARNr, por ejemplo, mediante análisis de la expresión digital o análisis de micromatriz, respectivamente, por ejemplo, mediante análisis médico o agrícola). En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés comprende esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN distinto del ARNr que comprenden un transcriptoma (menos la al menos una molécula de ARNr) de una o varias células procariotas o de una o varias células que comprenden células tanto eucariotas como procariotas. En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés comprende o consiste en una o varias moléculas de ARN que presentan secuencias de ácido nucleico específicas (por ejemplo, en las que la presencia o ausencia o la cantidad de dicha una o varias moléculas de ARN que presentan las secuencias de ácido nucleico específicas se usa para detectar un patógeno o una afección médica, por ejemplo, para rastrear (por ejemplo, para rastrear la presencia de un patógeno en agua, en una superficie, tal como una superficie hospitalaria, etc.), o por ejemplo, para el ensayo de diagnóstico o teranóstico (por ejemplo, para el diagnóstico o control de la cantidad de un patógeno, o el estado de una enfermedad o afección médica para decidir sobre una terapia o un tratamiento).

[0035] En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de la invención de generación de una muestra empobrecida en ARNr, el método comprende además el uso de la muestra empobrecida en ARNr o de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés contenida en la misma para su análisis o uso posterior. En algunas realizaciones, el método comprende además el uso de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés como parte de un método de generación de moldes para la secuenciación de ADN de la nueva generación (por ejemplo, para el análisis de la expresión digital o ARN-Seq, perfilado de ARNm, etc.). En algunas realizaciones del método de generación de una muestra empobrecida en ARNr, el método comprende además el uso de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés como parte de un método de generación de moléculas de ácido nucleico diana marcadas para la hibridación a sondas de una matriz o micromatriz sobre una superficie porosa o no porosa (por ejemplo, a sondas sobre una matriz o micromatriz, una transferencia puntual, etc.). En algunas realizaciones del método de generación de una muestra empobrecida en ARNr, el método comprende además el uso de la muestra empobrecida en ARNr para realizar un ensayo de diagnóstico o teranóstico para detectar la presencia de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés (por ejemplo, en el que la presencia o cantidad de dicha al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés es indicativa de la presencia o estado de salud o estado patológico). En algunas realizaciones del método de generación de una muestra empobrecida en ARNr, el método comprende además amplificar la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés para un análisis o uso posterior. En algunas realizaciones del método de generación de una muestra empobrecida en ARNr, el método comprende además el uso de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés o un producto de amplificación de la misma para la transfección de una célula eucariota (por

ejemplo, una célula presentadora de antígeno (APC), tal como una célula dendrítica, un macrófago o una APC artificial para uso inmunoterapéutico). En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés o un producto de amplificación de la misma se usa para la transfección de una célula humana o animal del mismo individuo del que se obtuvo la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés (por ejemplo, para fabricar una vacuna que comprenda la célula transfectada en APC para uso inmunoterapéutico para tratar una enfermedad, por ejemplo, cáncer, en un individuo humano o animal). En algunas realizaciones, la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés o un producto de amplificación de la misma se usa para la transfección de una célula de un ser humano o animal diferente de la célula de la que se obtuvo la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés (por ejemplo, para fabricar una vacuna que comprenda la célula transfectada en APC para uso inmunoterapéutico para tratar una enfermedad, por ejemplo, cáncer, en un individuo humano o animal). En ciertas realizaciones, la vacuna de ARN se fabrica usando la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés de un primer individuo, y la vacuna de ARN se usa para vacunar a un segundo individuo. En algunas realizaciones del método de generación de una muestra empobrecida en ARNr, el método comprende además el uso de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés o un producto de amplificación de la misma para fabricar una vacuna de ARN de uso terapéutico. En algunas realizaciones del método, la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés o un producto de amplificación de ARN sentido de la misma se usa para fabricar una vacuna de ARN que se usa para inocularla directamente en un paciente para uso terapéutico. En algunas realizaciones, la vacuna de ARN se fabrica usando la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés de una célula, de un tejido o de un órgano de un primer individuo y la vacuna de ARN se administra a dicho primer individuo como un tratamiento inmunoterapéutico. En algunas realizaciones, la vacuna de ARN se fabrica usando la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés de un primer individuo y la vacuna de ARN se usa para vacunar a un segundo individuo.

[0036] En otras realizaciones más, la invención proporciona métodos de uso de la composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan una secuencia de la al menos una molécula de ARNr de longitud completa seleccionada entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y 23S, moléculas de ARNr procariota 16S y 5S.

[0037] Así pues, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa, método que comprende: a) proporcionar i) una muestra inicial que comprende moléculas de ARN, en la que las moléculas de ARN comprenden moléculas de ARNr y moléculas de ARN distinto de ARNr; ii) una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que presenta secuencias correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr de longitud completa seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S; e iii) una matriz de unión (por ejemplo, micropartículas) que comprenden moléculas de unión a marcadores de afinidad; b) poner en contacto la muestra inicial con la composición en condiciones que permitan que al menos parte de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad y al menos parte de las moléculas de ARNr formen híbridos de ARNr bicatenario, generando así una muestra tratada; c) poner en contacto la muestra tratada con la matriz de unión en condiciones que permitan que al menos una parte de los híbridos de ARNr bicatenarios se unan a la matriz de unión; d) retirar la matriz de unión a la que se han unido los híbridos de ARNr bicatenarios que comprenden las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad y la al menos parte de las moléculas de ARNr de la muestra tratada; y e) incubar la matriz de unión en una solución en condiciones en las que la al menos parte de las moléculas de ARNr de la muestra tratada se liberen en la solución, aislando así esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan una secuencia de al menos una molécula de ARNr de longitud completa presente en la muestra inicial (por ejemplo, al menos >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ... o >99,9 % de la al menos una molécula de ARNr de longitud completa presente en la muestra inicial).

[0038] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa, método que comprenden: a) proporcionar i) una muestra inicial que comprende moléculas de ARN, en la que las moléculas de ARN comprenden moléculas de ARNr y moléculas de ARN distinto del ARNr; ii) una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que presentan secuencias correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr de longitud completa seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S; e iii) una matriz de unión (por ejemplo, micropartículas) que comprenden moléculas de unión a marcadores de afinidad; b) poner en contacto la muestra inicial con la composición en condiciones que permitan que al menos parte de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad y al menos parte de las moléculas de ARNr formen híbridos de ARNr bicatenarios, generando así una muestra tratada; c) poner en contacto la muestra tratada con la matriz de unión en condiciones que permitan que al menos una parte de los híbridos de ARNr bicatenarios se una a la matriz de unión; d) retirar la matriz de unión a la que se han unido los híbridos de ARNr bicatenarios que comprenden las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad y la al menos parte de las moléculas de ARNr de la muestra

- tratada; y e) incubar la matriz de unión en una solución en condiciones en las que la al menos parte de las moléculas de ARNr de la muestra tratada se liberen en la solución, generando así una muestra de ARNr aislada que comprende esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan una secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa presente en la muestra inicial (por ejemplo, al menos >90 % ..., >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ... o >99,9 % de la al menos una molécula de ARNr de longitud completa presente en la muestra inicial) y en la que la muestra de ARNr aislada está esencialmente exenta (por ejemplo, al menos >90 % ..., >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ... o >99,9 % exenta) de las moléculas de ARN distinto del ARNr presentes en la muestra inicial.
- 5
- 10 **[0039]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa, método que comprende: a) proporcionar i) una muestra inicial que comprende moléculas de ARN, en la que las moléculas de ARN comprenden moléculas de ARNr y moléculas de ARN distinto del ARNr; ii) una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad
- 15 que presenta secuencias correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr de longitud completa seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S; e iii) una matriz de unión (por ejemplo, micropartículas) que comprenden moléculas de unión a marcadores de afinidad; b) poner en contacto la muestra inicial con la composición en condiciones que permitan que al menos parte de las
- 20 moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad y al menos parte de las moléculas de ARNr formen híbridos de ARNr bicatenarios, generando así una muestra tratada; c) poner en contacto la muestra tratada con la matriz de unión en condiciones que permitan que al menos una parte de los híbridos de ARNr bicatenarios se unan a la matriz de unión; d) retirar la matriz de unión a la que se unen los híbridos de ARNr bicatenarios que comprenden las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad y la al menos parte de las moléculas de ARNr de la muestra
- 25 tratada; y e) incubar la matriz de unión en una solución en condiciones en las que la al menos parte de las moléculas de ARNr de la muestra tratada se liberen en la solución, generando así una muestra de ARNr aislada que comprende esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan una secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa presente en la muestra inicial (por ejemplo, al menos >90 % ..., >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ... o >99,9 % de la al menos una molécula de ARNr de
- 30 longitud completa presente en la muestra inicial) y en la que, bien i) la muestra de ARNr aislada está esencialmente exenta (por ejemplo, al menos >90 % ..., >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ... o >99,9 % exenta) de las moléculas de ARN distinto del ARNr presentes en la muestra inicial, o ii) contiene niveles no detectables de ARN distinto del ARNr de la muestra inicial medidos usando electroforesis de gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.
- 35
- [0040]** En algunas realizaciones de los métodos de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa, la muestra de ARNr aislada procede de una muestra inicial (por ejemplo, que comprende una muestra biológica, incluyendo una muestra médica, tal como saliva, esputo, heces, orina o una muestra celular, tisular u
- 40 orgánica, una muestra medioambiental, una muestra metagenómica o cualquier otro tipo de muestra que pueda contener el ARN de interés), independientemente de que la muestra no se prepare o se prepare (por ejemplo, por fijación usando una solución, por ejemplo, formalina o etanol; montaje en un portaobjetos; o mediante el uso de otros procedimientos conocidos en la técnica) y el ARNr aislado se analiza para determinar el género, la especie o la cepa de origen, indicando así qué género, especie o cepa en particular estaba presente en la muestra inicial y, por lo
- 45 tanto, en la muestra o entorno en particular del que se recogió la muestra. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el método se usa para identificar y estudiar los organismos presentes en un "microbioma" de ser humano, animal o planta, por ejemplo, para aplicaciones de investigación, medicina o agricultura. En algunas realizaciones, la muestra de ARNr aislada procede de una muestra inicial que comprende una muestra de una muestra humana, animal o vegetal que se proporciona para ensayos o análisis de diagnóstico o terapéutico médico (por ejemplo, para detectar
- 50 un microorganismo patógeno, tal como un patógeno fungicida o bacteriano, que esté o pueda estar relacionado con o sea causante de un estado patológico, por ejemplo, una bacteria patógena que se pueda detectar o diagnosticar basándose en el análisis de al menos una molécula de ARNr, por ejemplo, según lo descrito por Chakravorty, S. *et al.*, *J. Microbiol. Methods* 69: 330-339, 2007 y por Millar, B. C. *et al.* en *Current Issues Mol. Biol.* 9: 30 21-40, 2007). En algunas realizaciones, la muestra de ARNr aislada se analiza usando cualquiera de los muchos métodos de
- 55 secuenciación de nueva generación conocidos en la técnica (por ejemplo, tras el marcaje del extremo 3', o de los extremos 3' y 5' de las moléculas aisladas de ARNr y de su transcripción inversa para fabricar moldes de ADN monocatenario lineal marcado o desmarcado, o moldes de ADN monocatenario circular para la secuenciación de nueva generación (por ejemplo, usando una plataforma de secuenciación Roche 454™, Illumina Solexa™, Life Technologies SOLID™, Pacific Biosciences, Intelligent Biosistemas, Helicos, Qiagen, u otra plataforma de
- 60 secuenciación de nueva generación). En otras realizaciones más, la muestra de ARNr aislada se analiza mediante PCR en tiempo real.
- [0041]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia en al menos una
- 65 molécula de ARNr de longitud completa, método que comprende: a) proporcionar i) una muestra inicial que

comprende moléculas de ARN, en la que las moléculas de ARN comprenden moléculas de ARNr y moléculas de ARN distinto del ARNr; e ii) una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que están unidas a una matriz de unión (por ejemplo, micropartículas que comprenden moléculas de unión a marcadores de afinidad), en la que las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, solas o en combinación, presentan secuencias correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr de longitud completa seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S; b) poner en contacto la muestra inicial con la composición en condiciones que permitan que al menos algunas de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad de la composición y al menos parte de las moléculas de ARNr formen híbridos de ARNr bicatenarios que se unan a la matriz de unión, generando así una muestra tratada; y c) retirar la matriz de unión a la que están unidos los híbridos de ARNr bicatenarios, aislando así esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa. En algunas realizaciones del presente método, el método comprende además la etapa de lavar la matriz de unión a la que están unidos los híbridos de ARNr bicatenarios para retirar las moléculas de ARN distinto del ARNr no unidas específicamente de la muestra. En algunas realizaciones, la muestra tratada se conserva sobre la matriz de unión para su futuro análisis o uso. En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de incubar la matriz de unión en una solución en condiciones en las que la al menos parte de las moléculas de ARNr de la muestra tratada se liberen en la solución, generando así una solución de la muestra de ARNr aislada que comprende esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan una secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa presente en la muestra inicial (por ejemplo, al menos >90 % ..., >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ... o >99,9 % de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan una secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa presente en la muestra inicial) y en la que, bien i) la muestra de ARNr aislada está esencialmente exenta (por ejemplo, al menos >90 % ..., >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ... o >99,9 % exenta) de las moléculas de ARN distinto del ARNr presentes en la muestra inicial, o ii) contiene niveles no detectables de ARN distinto del ARNr de la muestra inicial medidos usando electroforesis de gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. En algunas realizaciones, la muestra de ARNr aislada es de una muestra medioambiental o metagenómica, y el ARNr aislado se analiza para determinar los géneros, las especies o las cepas que estaban presentes en la muestra y, por lo tanto, el ambiente particular del que se recogió la muestra. En algunas realizaciones, la muestra de ARNr aislada se analiza (por ejemplo, mediante secuenciación de nueva generación, PCR de transcripción inversa en tiempo real u otro método, tal como un método descrito en cualquier parte del presente documento).

[0042] En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de la invención de generación de una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia de al menos una molécula de ARNr de longitud completa, el método usa cualquiera de las composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad obtenidas usando cualquiera de los métodos descritos en el presente documento para generar moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad.

[0043] En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de generación de una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento de esencialmente la totalidad del ARNr que, bien solas o en combinación, presenta una secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa a partir de una muestra inicial, la composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que están unidas a una matriz de unión comprende biotina como marcador de afinidad, en la que la biotina se une a al menos aproximadamente dos a ocho nucleobases por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido, y la matriz de unión comprende micropartículas a las que la estreptavidina y la avidina se unen como molécula de unión a marcador de afinidad. En algunas otras realizaciones del presente método, las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad comprenden biotina como marcador de afinidad, en las que la biotina se une a al menos aproximadamente dos a cuatro nucleobases por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido, o a al menos aproximadamente tres a cinco nucleobases por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido, o a al menos aproximadamente cuatro a seis nucleobases por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido, o a al menos aproximadamente seis a ocho nucleobases por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido.

[0044] En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de la invención de generación de una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento de esencialmente la totalidad del ARNr que, bien solo o en combinación, presenta una secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa a partir de una muestra inicial, la muestra inicial contiene ARN degradado, y el método se usa para generar una muestra empobrecida en ARNr para su posterior análisis y uso. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la muestra inicial es una muestra de FFPE que contiene ARN degradado, y el método se usa para generar una muestra empobrecida en ARNr que contenga al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés, en el que la muestra empobrecida en ARNr se usa para analizar la expresión o expresión relativa de una o más moléculas de ARN, seleccionadas entre ARNm, ARNm, ARNnc, ARNpiwi y ARN que comprende el transcriptoma completo (menos el ARNr) de una o varias células, tejidos, órganos u organismos, seleccionándose el método de análisis entre análisis de micromatrices (por ejemplo,

Affymetrix, NimbleGen Sistemas, Agilent Sistemas), secuenciación de nueva generación (o el denominado análisis "digital"), incluyendo, entre otros, métodos y técnicas de secuenciación de ARN de nueva generación denominados mediante expresiones tales como "ARN-Seq" "perfilado de ARNm digital", "perfilado de transcriptomas" y "perfilado de ribosomas" (por ejemplo, Ingolia *et al.*, *Science* 324: 218-223, 2009), análisis de rastreo y análisis usando un ensayo de diagnóstico o teranóstico, incluyendo un ensayo de diagnóstico o teranóstico que comprenda qPCR de transcripción inversa, y un ensayo de diagnóstico o teranóstico que comprenda amplificación y/o detección de ARN de una secuenciación usando una sonda marcada.

[0045] En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos de la invención de uso de una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad para generar una muestra empobrecida en ARNr o para aislar esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia de al menos una molécula de ARNr de longitud completa, la composición de moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad se genera a partir de una primera especie u organismo, y se usa para generar una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan una secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa de una segunda especie u organismo diferente de la primera especie u organismo (por ejemplo, la primera especie u organismo es ratón o rata, y la segunda especie u organismo es ser humano). En algunas realizaciones, las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad se generan a partir de al menos una cualquiera molécula de ARNr de la primera especie de organismo en la que dichas moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad se hibridan con secuencias presentes en la totalidad de la al menos una molécula de ARNr presente en la muestra inicial de la segunda especie u organismo en las condiciones usadas en el método de generación de una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento de al menos una molécula de ARNr de la muestra inicial. En realizaciones adicionales, la primera especie u organismo es un mamífero no humano (por ejemplo, gato, perro, oveja, ratón, rata, mono, etc.) y la segunda especie u organismo es *Homo sapiens*. En realizaciones particulares, la primera especie u organismo comprende bacterias distintas de *E. coli*, y la segunda especie u organismo es *E. coli*. En algunas realizaciones, el método de generación de una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan una secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa se realiza usando una muestra metagenómica o medioambiental que contiene múltiples especies u organismos. Así pues, en algunas realizaciones en las que la composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad corresponde a al menos una molécula de ARNr procariota de longitud completa (por ejemplo, generada a partir de al menos una molécula de ARNr de longitud completa de *E. coli*), la composición se usa para generar una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan una secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa que comprende múltiples moléculas de ARNr de múltiples especies u organismos.

[0046] En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de la invención de generación de una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia de al menos una molécula de ARNr de longitud completa, en lugar de usar las composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, el método usa composiciones que comprenden moléculas de ADN monocatenario marcadas por afinidad que, solas o en combinación, son complementarias a esencialmente la totalidad de la secuencia presentada por la al menos una molécula de ARNr de longitud completa seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S, estando los marcadores de afinidad presentes en una proporción de al menos aproximadamente dos a al menos cuatro marcadores de afinidad por cada cien nucleobases de las moléculas de ADN monocatenario marcadas por afinidad.

[0047] Con el trabajo realizado durante los desarrollos de la presente invención, se encontró que el método se puede realizar usando muestras en las que la muestra inicial comprende, en general, cualquier cantidad de moléculas de ARN totales. En una realización, la cantidad del ARN total presente en la muestra inicial es de entre aproximadamente 10 picogramos y 50 nanogramos. En otra realización, la cantidad de ARN total presente en la muestra inicial es de entre aproximadamente 50 nanogramos y un microgramo. En otra realización más, la cantidad de ARN total presente en la muestra inicial es de entre aproximadamente un microgramo y cinco microgramos. En algunas realizaciones de estos métodos, al menos una parte de las moléculas de ARN de la muestra inicial está muy fragmentada (por ejemplo, digerida previamente con una enzima RNasa o de muestras de ARN más antiguas). En algunas realizaciones de estos métodos, las moléculas de ARN de la muestra inicial son de una muestra embebida en parafina (por ejemplo, muestra fijada con formalina y embebida en parafina). En realizaciones adicionales de estos métodos, las moléculas de ARN antisentido marcadas por afinidad corresponden a la al menos una molécula de ARNr de la misma especie u organismo (por ejemplo, moléculas de ARN antisentido marcadas por afinidad corresponden a la al menos una molécula de ARNr de células humanas o las moléculas de ARN antisentido marcadas por afinidad corresponden a la al menos una molécula de ARNr de células de *E. coli*). En ciertas realizaciones de estos métodos en los que las moléculas de ARN antisentido marcadas por afinidad corresponden a la al menos una molécula de ARNr de células humanas, la al menos una molécula de ARNr es ARNr 28S humano.

65

[0048] En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos de la invención de generación de una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia de al menos una molécula de ARNr de longitud completa, la proporción de las moléculas de unión a marcadores de afinidad con respecto a los marcadores de afinidad durante la puesta en contacto de la etapa b) es de al menos 2 con respecto a 1 (por ejemplo, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1... o 10:1).

[0049] En ciertas realizaciones de cualquiera de los métodos de la invención de generación de una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia de al menos una molécula de ARNr de longitud completa, la muestra inicial que comprende moléculas de ARN representa ARN total aislado de una muestra de célula o de tejido, o de una muestra medioambiental (por ejemplo, de una línea celular, una muestra de biopsia de tejido, una muestra de fluido corporal, un hisopo de una superficie hospitalaria, una muestra de agua, etc.). En algunas realizaciones de estos métodos, el método comprende además proporcionar una muestra de ARN de control (por ejemplo, que comprenda ARN total) de una muestra celular o tisular, así como realizar el método usando la muestra de control. En ciertas realizaciones, la muestra de control comprende ARN total de células HeLa y/o de células de *E. coli*.

[0050] En realizaciones adicionales de cualquiera de los métodos de la invención de generación de una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia de al menos una molécula de ARNr de longitud completa, la muestra inicial está esencialmente exenta de sales y/o líquidos orgánicos. En otras de estas realizaciones, la muestra inicial comprende agua exenta de RNasa y/o tampón de TE. En realizaciones particulares, el método comprende además tratar la muestra empobrecida en ARNr o la muestra de ARNr aislada en condiciones que permitan que las moléculas de ARN presentes en la muestra además se purifiquen (por ejemplo, mediante purificación posterior usando precipitación en etanol, isopropanol o acetato de amonio). En realizaciones particulares, la muestra empobrecida en ARNr o la muestra de ARNr aislada se usa en métodos de análisis posterior, tal como para el análisis mediante secuenciación de nueva generación, para preparar diana marcada para el análisis de micromatrices, para análisis de rastreo o diagnóstico o teranóstico (por ejemplo, usando un kit de rastreo, diagnóstico o teranóstico vegetal, humano o animal). En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de la muestra empobrecida en ARNr o la muestra de ARNr aislada se amplifican antes de un análisis posterior. En otras realizaciones de estos métodos, la puesta en contacto de la etapa b) se realiza en presencia de un inhibidor de RNasa. En algunas realizaciones, las composiciones usadas en el método comprenden además agua exenta de RNasa.

[0051] En realizaciones adicionales de cualquiera de los métodos de la invención de generación de una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia de al menos una molécula de ARNr de longitud completa, las condiciones de la etapa b) comprenden incubar a una temperatura de aproximadamente 60-75 °C durante un primer período de tiempo (por ejemplo, 5-15 minutos) e incubar a aproximadamente la temperatura ambiente durante un segundo período de tiempo (por ejemplo, 10-25 minutos). En algunas realizaciones de estos métodos, las condiciones de la etapa b) incluyen la presencia de tampón de hibridación. En realizaciones particulares de estos métodos, las condiciones de la etapa c) incluyen al menos el mezclado ocasional a la temperatura ambiente y/o a 35-60 °C o 25-70 °C, o a aproximadamente 50 °C. En realizaciones adicionales de estos métodos, la matriz de unión comprende una pluralidad de partículas individuales (por ejemplo, nanopartícula, partículas magnéticas, perlas macroporosas, etc.) En realizaciones adicionales de estos métodos, la matriz de unión comprende una columna de unión o una membrana. En algunas realizaciones de estos métodos, los marcadores de afinidad se seleccionan entre biotina, avidina o estreptavidina, digoxigenina, anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) y otras moléculas de unión útiles. En ciertas realizaciones de estos métodos, las moléculas de unión a marcadores de afinidad se seleccionan entre biotina, avidina o estreptavidina, digoxigenina, anticuerpos (o fragmentos de anticuerpo) y otras moléculas de unión útiles.

[0052] En algunas realizaciones de la invención, una o más de las secuencias de la al menos una molécula de ARNr, o de una o más de las moléculas de ARN distinto del ARNr, o de una o más de otras moléculas de ácido nucleico presentes en la muestra inicial se amplifican (por ejemplo, usando cualquier método apropiado conocido en la técnica para la amplificación de ARN y/o ADN, por ejemplo, PCR en tiempo real o PCR de transcripción inversa, amplificación mediada por transcripción, amplificación de ARN usando un kit RiboMultiplier™, Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, amplificación de desplazamiento de cadena, LAMP, ICAN™, UCAN™ (TAKARA), amplificación de círculo rodante, etc.) bien, antes o después de generar la muestra empobrecida en ARNr o de aislar la al menos una molécula de ARNr, respectivamente, usando uno de los métodos de la presente invención para generar una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento de esencialmente la totalidad de las moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan la secuencia en al menos una molécula de ARNr de longitud completa. En algunas de estas realizaciones, la muestra que comprende la una o más respectivas secuencias amplificadas de moléculas de ARN distinto del ARNr, o moléculas de ARNr y/u otras moléculas de ácido nucleico se usa para un análisis posterior.

[0053] En otras realizaciones, la presente invención proporciona una composición que comprende moléculas de

- ARNr antisentido correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S, en la que las moléculas de ARNr antisentido comprenden marcadores de afinidad, estando la composición esencialmente exenta de moléculas de ARN distinto del ARNr que comprenden los marcadores de afinidad. En ciertas realizaciones, la composición comprende además una matriz de unión, en la que la matriz de unión comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad (por ejemplo, micropartículas). En realizaciones particulares, las moléculas de ARNr antisentido se unen a la matriz de unión mediante la interacción del marcador de afinidad y las moléculas de unión al marcador de afinidad
- 5
- 10 **[0054]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que comprenden: a) una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, 12S y 16S moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S, en la que las moléculas de ARNr antisentido comprenden marcadores de afinidad; y b) moléculas de ARN distinto del ARNr que están exentas de marcador de afinidad. En ciertas realizaciones, las composiciones comprenden además una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad.
- 15
- [0055]** En realizaciones particulares, la presente invención proporciona composiciones que comprenden una muestra empobrecida en ARNr que comprende moléculas de ARN distinto del ARNr, estando la composición esencialmente exenta de secuencias de ARNr presentadas por al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S.
- 20
- [0056]** En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S, en las que las moléculas de ARNr antisentido comprenden marcadores de afinidad y en las que la composición está esencialmente exenta de moléculas de ARN distinto del ARNr que comprenden los marcadores de afinidad.
- 25
- [0057]** En otras realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que comprenden: a) composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S, en las que las moléculas de ARNr antisentido comprenden marcadores de afinidad; y b) moléculas de ARN distinto del ARNr que están exentas de marcadores de afinidad. En realizaciones adicionales, las composiciones comprenden además una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad.
- 30
- [0058]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que comprenden: una muestra empobrecida en ARNr que comprende moléculas de ARN distinto del ARNr, estando la composición esencialmente exenta de secuencias de ARNr presentadas por al menos una molécula de ARNr seleccionada entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S. En algunas realizaciones particulares, las composiciones están esencialmente exentas de secuencias de ARNr presentadas por dos, tres o cuatro moléculas de ARNr seleccionadas entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S. En algunas realizaciones particulares, las composiciones están esencialmente exentas de secuencias de ARNr presentadas por moléculas de ARNr mitocondrial eucariota tanto 12S como 16S.
- 35
- [0059]** En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que comprenden: a) composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S, en las que las moléculas de ARNr antisentido comprenden marcadores de afinidad y en las que las moléculas de ARNr antisentido proceden de una primera especie u organismo; y b) moléculas de ARN distinto del ARNr que están exentas de marcadores de afinidad, en las que las moléculas de ARN distinto del ARNr proceden de una segunda especie u organismo diferente de la primera especie u organismo. En otras realizaciones, las composiciones comprenden además una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad.
- 40
- [0060]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones que comprenden: a) moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S, estando los marcadores de afinidad presentes en las moléculas de ARNr antisentido en una proporción de al menos aproximadamente dos a ocho marcadores de afinidad por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido; y b) moléculas de ARN distinto del ARNr que están exentas de marcadores de afinidad. En algunas realizaciones, la composición
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad de una primera especie u organismo y moléculas de ARN distinto del ARNr que están exentas de marcadores de afinidad de una segunda especie u organismo. En ciertas realizaciones, las composiciones comprenden además una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad.

5

[0061] En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona composiciones que comprenden: una muestra empobrecida en ARNr que comprenden moléculas de ARN distinto del ARNr, estando la composición al menos aproximadamente un 99,0 % exenta de secuencias de ARNr presentadas por al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S.

10

[0062] La presente invención proporciona kits o sistemas de realización de cualquiera de los métodos de la invención, incluyendo cualquiera de las etapas de dichos métodos.

15 **[0063]** Por ejemplo, en algunas realizaciones adicionales, la presente invención proporciona kits y sistemas que comprenden: a) un primer componente que comprende una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido complementarias a esencialmente la totalidad de la secuencia presentada por la al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S, en el que las moléculas de ARNr antisentido comprenden marcadores de afinidad y en el que la composición está esencialmente exenta de moléculas de ARN distinto del ARNr que comprenden los marcadores de afinidad; y b) al menos un segundo componente seleccionado del grupo que consiste en: i) una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad; ii) una muestra de control que comprende ARN total de una muestra celular o tisular; iii) una solución que comprende un inhibidor de RNasa; iv) una solución de lavado de la matriz de unión que está exenta de RNasa; v) un volumen de agua exenta de RNasa; vi) un tampón de hibridación; vii) un reactivo de purificación de ARN total; y viii) una solución de resuspensión de la matriz de unión, en la que dicha solución está exenta de RNasa. En ciertas realizaciones, el segundo componente es la matriz de unión. En realizaciones adicionales, el segundo componente es la muestra de control. En algunas realizaciones, el segundo componente es la solución que comprende un inhibidor de RNasa.

20

25 **[0064]** En algunas realizaciones, la presente invención proporciona kits y sistemas que comprenden: a) un primer componente que comprende una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido complementarias a esencialmente la totalidad de la secuencia presentada por la al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S, en el que las moléculas de ARNr antisentido comprenden marcadores de afinidad y en el que la composición está esencialmente exenta de moléculas de ARN distinto del ARNr que comprenden los marcadores de afinidad; y b) al menos un segundo componente seleccionado del grupo que consiste en: i) una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad; ii) una muestra de control que comprende ARN total de una muestra celular o tisular; iii) una solución que comprende un inhibidor de RNasa; iv) una solución de lavado de la matriz de unión que está exenta de RNasa; v) un volumen de agua exenta de RNasa; vi) un tampón de hibridación; y vii) un reactivo de purificación de ARN total.

30

35 **[0065]** En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona kits y sistemas que comprenden: a) un primer componente que comprende una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad complementarias a esencialmente la totalidad de la secuencia presentada por la al menos una molécula de ARNr seleccionada entre: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S, en el que las moléculas de ARNr antisentido comprenden marcadores de afinidad, estando los marcadores de afinidad presentes en las moléculas de ARNr antisentido en una proporción de al menos aproximadamente dos a ocho marcadores de afinidad por cada cien nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido, y en el que la composición está esencialmente exenta de moléculas de ARN distinto del ARNr que comprenden los marcadores de afinidad; y b) al menos un segundo componente seleccionado del grupo que consiste en: i) una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad; ii) una muestra de control que comprende ARN total de una muestra celular o tisular; iii) una solución que comprende un inhibidor de RNasa; iv) una solución de lavado de la matriz de unión que está exenta de RNasa; v) un volumen de agua exenta de RNasa; vi) un tampón de hibridación; y vii) un reactivo de purificación de ARN total.

45

50 **[0066]** En algunas realizaciones de un kit o sistema, los marcadores de afinidad están presentes en la composición de moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad en una proporción de al menos aproximadamente dos a aproximadamente ocho marcadores de afinidad por cada 100 nucleobases de las moléculas de ARNr antisentido (por ejemplo, al menos 2:100, 3:100, 4:100, 5:100, 6:100, 7:100 o 8:100). En ciertas realizaciones, el marcador de afinidad solo se asocia con una nucleobase de las moléculas de ARNr antisentido. En algunas de estas realizaciones, los marcadores de afinidad solo se asocian con un tipo de nucleobase seleccionada entre: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y uracilo (U).

55

[0067] En otras realizaciones de un kit o sistema, las composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad corresponden a al menos el 95,0 % de la totalidad de la al menos una secuencia de ARNr (por ejemplo, 95,0 % ... 95,5 % ... 96,0 % ... 96,5 % ... 97,0 % ... 97,5 % ... 98 % ... 98,5 % ... 99,0 % ... 99,5 % ... 99,9 % ... o 100 % de la al menos una molécula de ARNr (por ejemplo, en las que las composiciones comprenden moléculas de ARNr antisentido que presentan, solas o en combinación, secuencias correspondientes a la totalidad de la secuencia de ARNr de longitud completa para una determinada molécula de ARNr).

Breve descripción de las figuras

[0068] El anterior sumario y la descripción se entienden mejor cuando se leen en combinación con las figuras anexas que se incluyen a modo de ejemplo y no a modo de limitación.

La Figura 1A muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que contiene los siguientes amplicones de PCR: Carril M-escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - 300 ng de amplicón de PCR para ARNr 18S humano; Carril 2 - 300 ng de amplicón de PCR para ARNr 5,8S humano; Carril 3 - 300 ng de amplicón de PCR para ARNr 5S humano; Carril 4 - 300 ng de amplicón de PCR para segmento 5' de ARNr 23S de *E. coli*; Carril 5 - 300 ng de amplicón de PCR para segmento 3' de ARNr 23S de *E. coli*; Carril 6 - 300 ng de amplicón de PCR para ARNr 16S de *E. coli*; y Carril 7 - 300 ng de amplicón de PCR para ARNr 5SS de *E. coli*.

La Figura 1B muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que contiene las siguientes secuencias antisentido: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - 300 ng de ARNr 18S antisentido humano; Carril 2 - 300 ng de ARNr 5,8S antisentido humano; Carril 3 - 300 ng de ARNr 5S antisentido humano; Carril 4 - 300 ng de segmento 5' de ARNr 23S de *E. coli*; Carril 5 - 300 ng de segmento 3' de ARNr 23S de *E. coli*; Carril 6 - 300 ng de ARNr 16S antisentido de *E. coli*; y Carril 7 - 300 ng de ARNr 5S antisentido de *E. coli*.

La Figura 1C muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que contiene los siguientes carriles: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - 300 ng de ARNr antisentido biotinilado 28S a base de T7; y Carril 2 - 300 ng de ARNr antisentido biotinilado 28S a base de SP6.

La Figura 2A muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - ARNr antisentido biotinilado tras la purificación con microesferas directamente sobre la columna; Carril 2 - ARNr antisentido biotinilado tras la purificación del sobrenadante tras la extracción de las microesferas; y Carril 3 - control de ARNr antisentido biotinilado.

La Figura 2B muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - control de ARNr antisentido biotinilado; Carril 2 - ARNr antisentido biotinilado tras la purificación tras 20 µl de microesferas; Carril 3 - ARNr antisentido biotinilado tras la purificación tras 2 x 20 µl de microesferas; y Carril 4 - ARNr antisentido biotinilado tras la purificación tras 40 µl de microesferas.

La Figura 3A muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - ARNr antisentido biotinilado al 10 % menos microesferas; Carril 2 - ARNr antisentido biotinilado al 10 % más 20 µl de microesferas; Carril 3 - ARNr antisentido biotinilado al 10 % más 40 µl de microesferas; Carril 4 - ARNr antisentido biotinilado al 20 % menos microesferas; Carril 5 - ARNr antisentido biotinilado al 20 % más 20 µl de microesferas; y Carril 6 - ARNr antisentido biotinilado al 20 % más 40 µl de microesferas.

La Figura 3B muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - ARNr antisentido biotinilado al 35 % menos microesferas de estreptavidina; Carril 2 - ARNr antisentido biotinilado al 35 % más microesferas de estreptavidina; Carril 3 - ARNr antisentido biotinilado al 50 % menos microesferas de estreptavidina; Carril 4 - ARNr antisentido biotinilado al 50 % más microesferas de estreptavidina; Carril 5 - ARNr antisentido biotinilado al 60 % menos microesferas de estreptavidina; y Carril 6 - ARNr antisentido biotinilado al 60 % más microesferas de estreptavidina.

La Figura 3C muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - PCR de ARNr antisentido biotinilado al 35 % menos microesferas de estreptavidina; Carril 2 - PCR de ARNr antisentido biotinilado al 35 % más microesferas de estreptavidina; Carril 3 - PCR de ARNr antisentido biotinilado al 50 % menos microesferas de estreptavidina; Carril 4 - PCR de ARNr antisentido biotinilado al 50 % más microesferas de estreptavidina; Carril 5 - PCR de ARNr antisentido biotinilado al 60 % menos microesferas de estreptavidina; y Carril 6 - PCR de ARNr antisentido biotinilado al 60 % más microesferas de estreptavidina. El Panel 1 muestra cebadores de ARNr 23S-5'. El Panel 2 muestra cebadores de ARNr 23S-3'. El Panel 3 muestra cebadores de ARNr 16S-5'. El Panel 4 muestra cebadores de ARNr 16S-3'.

La Figura 4 muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - Sustracción de la mezcla de ARN total de *L. plantarum* más ARNr antisentido biotinilado de *E. coli*; y Carril 2 - Sustracción de la mezcla de ARN total de *L. plantarum* menos ARNr antisentido biotinilado de *E. coli*.

La Figura 5, paneles A - D, que muestran lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carriles 1, 2 - resultado de la PCR para 50 ng ARN total de *E. coli* de entrada más sustracción; Carriles 3, 4 - resultado de la PCR para 100 ng ARN total de *E. coli* de entrada más sustracción; Carriles 5, 6 - resultado de la PCR para 500 ng ARN total de *E. coli* de entrada más sustracción; Carriles 7, 8 - resultado de la PCR para 1.000 ng ARN total de *E. coli* de entrada más sustracción; Carriles 9, 10 - resultado de la PCR para 2.500 ng ARN total de *E. coli* de entrada más sustracción; Carriles 11, 12 - resultado de la PCR para 5.000 ng ARN total de *E. coli* de entrada más sustracción; Carriles 13, 14 - resultado de la PCR para 500 ng ARN total de *E. coli* de entrada menos sustracción; y Carril 15 - resultado de PCR para la reacción de control sin molde. El Panel 5A muestra la RT-PCR de ARNr 23S-5'. El Panel 5B muestra la RT-PCR de ARNr 16S-5'. El Panel 5C muestra la RT-PCR de ARNr 5S.

El Panel 5D muestra la RT-PCR de ARNm de *ompA*.

La Figura 6A muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - 300 ng de ARN total de *E. coli* intacto; y Carril 2 - 300 ng de ARN total de *E. coli* fragmentado.

La Figura 6B muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - ARN total de *E. coli* intacto menos sustracción; Carril 2 - ARN total de *E. coli* intacto más sustracción; Carril 3 - ARN total de *E. coli* fragmentado menos sustracción; y Carril 4 - ARN total de *E. coli* fragmentado más sustracción. El Panel 1 muestra un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. El Panel 2 muestra la transferencia Northern de ARNm de *ompA*. El Panel 3 muestra la transferencia Northern de ARNr 23S. El Panel 4 muestra la transferencia Northern de ARNr 16S. El Panel 5 muestra la transferencia Northern de ARNr 5S.

La Figura 6C muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - ARN total de *E. coli* intacto menos sustracción; Carril 2 - ARN total de *E. coli* intacto más sustracción; Carril 3 - ARN total de *E. coli* fragmentado menos sustracción; y Carril 4 - ARN total de *E. coli* fragmentado más sustracción. El Panel 1 muestra la RT-PCR de *ompA*. El Panel 2 muestra la RT-PCR 5' de ARNr 23S. El Panel 3 muestra la RT-PCR 5' de ARNr 16S. El Panel 4 muestra la RT-PCR 5' de ARNr 5S.

La Figura 7A muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - ARNr antisentido biotinilado 28S; Carril 2 - ARNr antisentido biotinilado 18S; Carril 3 - ARN total humano; Carril 4 - ARN total humano más ARNr antisentido biotinilado 28S; Carril 5 - ARN total humano más ARNr antisentido biotinilado 18S; Carril 6 - ARN total de ratón; Carril 7 - ARN total de ratón más ARNr antisentido biotinilado 28S; Carril 8 - ARN total de ratón más ARNr antisentido biotinilado 18S; Carril 9 - ARN total de rata; Carril 10 - ARN total de rata más ARNr antisentido biotinilado 28S; y Carril 11 - ARN total de rata más ARNr antisentido biotinilado 18S.

La Figura 7B muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - ARN total humano (HeLa) menos sustracción; Carril 2 - ARN total humano (HeLa) más sustracción; Carril 3 - ARN total de ratón (3T3) menos sustracción; Carril 4 - ARN total de ratón (3T3) menos sustracción; Carril 5 - ARN total de rata (NRK) menos sustracción; y Carril 6 - ARN total de rata (NRK) más sustracción.

La Figura 8 muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - resultado de PCR para 100 ng de ARN total humano de entrada más sustracción; Carril 2 - resultado de PCR para 500 ng de ARN total humano de entrada más sustracción; Carril 3 - resultado de PCR para 5,0 µg de ARN total humano de entrada más sustracción; Carril 4 - resultado de PCR para 500 ng de ARN total humano de entrada menos sustracción; y Carril 5 - resultado de PCR para la reacción de control sin molde. El Panel A muestra la RT-PCR de ARNr 28S 5'. El Panel B muestra la RT-PCR de ARNr 28S 3'. El Panel C muestra la RT-PCR de ARNr 18S 5'. El Panel D muestra la RT-PCR de ARNr 18S 3'. El Panel E muestra la RT-PCR de ARNr 5,8S. El Panel F muestra la RT-PCR de ARNr 5S. El Panel G muestra la RT-PCR de ARNm de GAPDH 5'. La Figura 9A muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - ARN total de HeLa intacto menos sustracción; Carril 2 - ARN total de HeLa intacto más sustracción; Carril 3 - ARN total de HeLa fragmentado (1 minuto) menos sustracción; Carril 4 - ARN total de HeLa fragmentado (1 minuto) más sustracción; Carril 5 - ARN total de HeLa fragmentado (2 minutos) menos sustracción; Carril 6 - ARN total de HeLa fragmentado (2 minutos) más sustracción; Carril 7 - ARN total de HeLa fragmentado (3 minutos) menos sustracción; y Carril 8 - ARN total de HeLa fragmentado (3 minutos) más sustracción.

La Figura 9B muestra lo siguiente: Carril 1 - resultado de PCR para ARN total de HeLa intacto menos sustracción; Carril 2 - resultado de PCR para ARN total de HeLa intacto más sustracción; Carril 3 - resultado de PCR para ARN total de HeLa fragmentado (1 minuto) menos sustracción; Carril 4 - resultado de PCR para ARN total de HeLa fragmentado (1 minuto) más sustracción; Carril 5 - resultado de PCR para ARN total de HeLa fragmentado (2 minutos) menos sustracción; Carril 6 - resultado de PCR para ARN total de HeLa fragmentado (2 minutos) más sustracción; Carril 7 - resultado de PCR para ARN total de HeLa fragmentado (3 minutos) menos sustracción; Carril 8 - resultado de PCR para ARN total de HeLa fragmentado (3 minutos) más sustracción; y Carril 9 - resultado de PCR para la reacción de control sin molde. El Panel 1 muestra ARNr 28S 5'. El Panel 2 muestra ARNr 18S 5'. El Panel 3 muestra ARNr 5,8S. El Panel 4 muestra ARNr 5S. El Panel 5 muestra ARNm de GAPDH 5'.

La Figura 10A muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - ARN total de *E. coli* intacto menos sustracción; Carril 2 - ARN total de *E. coli* intacto más sustracción; Carril 3 - ARN total de *E. coli* fragmentado menos sustracción; y Carril 4 - ARN total de *E. coli* fragmentado más sustracción. El Panel 1 muestra ARNm de *ompA*. El Panel 2 muestra ARNr 23S. El Panel 3 muestra ARNr 16S. El Panel 4 muestra ARNr 5S.

La Figura 10B muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - resultado de PCR para ARN total de *E. coli* intacto menos sustracción; Carril 2 - resultado de PCR para ARN total de *E. coli* intacto más sustracción; Carril 3 - resultado de PCR para ARN total de *E. coli* fragmentado menos sustracción; y Carril 4 - resultado de PCR para ARN total de *E. coli* fragmentado más sustracción. El Panel 1 muestra ARNm de *ompA*. El Panel 2 muestra ARNr 23S. El Panel 3 muestra ARNr 16S. El Panel 4 muestra ARNr 5S.

La Figura 11A muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - ARN total de HeLa intacto menos sustracción; Carril 2 - ARN total de HeLa intacto más sustracción; Carril 3 - ARN total de HeLa fragmentado menos sustracción; y Carril 4 - ARN total de HeLa fragmentado más sustracción. El Panel 1 muestra los resultados de un método ilustrativo de la presente invención. El Panel 2 muestra los resultados del método OLIGOTEX.

La Figura 11B muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - resultados de PCR para ARN total de HeLa intacto menos sustracción; Carril 2 - resultados de PCR para el ARN total de HeLa

intacto más sustracción; Carril 3 - resultados de PCR para el ARN total de HeLa fragmentado menos sustracción; y Carril 4 - resultados de PCR para el ARN total de HeLa fragmentado más sustracción. El Panel 1 muestra ARNr 28S-5'. El Panel 2 muestra ARNr 28S-3'. El Panel 3 muestra ARNr 18S-5'. El Panel 4 muestra ARNr 18S-3'. El Panel 5 muestra ARNr 5,8S. El Panel 6 muestra ARNr 5S.

5 La Figura 11C muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - resultados de PCR para ARN total de HeLa intacto menos sustracción; Carril 2 - resultados de PCR para ARN total de HeLa intacto más sustracción; Carril 3 - resultados de PCR para ARN total de HeLa fragmentado menos sustracción; y Carril 4 - resultados de PCR para ARN total de HeLa fragmentado más sustracción. El Panel 1 muestra GAPDH-5'. El Panel 2 muestra GAPDH-3'. El Panel 3 muestra PGK1-5'. El Panel 4 muestra PGK1-3'.

10 La Figura 11D muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - resultados de PCR para ARN total de HeLa intacto menos sustracción; Carril 2 - resultados de PCR para ARN total de HeLa intacto más sustracción; Carril 3 - resultados de PCR para ARN total de HeLa fragmentado menos sustracción; y Carril 4 - resultados de PCR para ARN total de HeLa fragmentado más sustracción. El Panel 1 muestra ARN de Poly A n.º 1. El Panel 2 muestra ARN de Poly A n.º 3. El Panel 3 muestra ARN de Poly A n.º 15. El Panel 4 muestra ARN biomórfico n.º 5.

15 La Figura 12A muestra lo siguiente: Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - ARN total de HeLa intacto menos sustracción; Carril 2 - ARN total de HeLa intacto más sustracción; Carril 3 - ARN total de HeLa fragmentado menos sustracción; y Carril 4 - ARN total de HeLa fragmentado más sustracción.

20 La Figura 12B muestra Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - resultados de PCR para ARN total de HeLa intacto menos sustracción; Carril 2 - resultados de PCR para ARN total de HeLa intacto más sustracción; Carril 3 - resultados de PCR para ARN total de HeLa fragmentado menos sustracción; y Carril 4 - resultados de PCR para ARN total de HeLa fragmentado más sustracción; Panel 1 - ARNr 28S-5'; Panel 2 - ARNr 28S-3'; Panel 3 - ARNr 18S-5'; Panel 4 - ARNr 18S-3'; Panel 5 - ARNr 5,8S; y Panel 6 - ARNr 5S.

25 La Figura 12C muestra Carril M - escalera de peso molecular de ADN; Carril 1 - resultados de PCR para ARN total de HeLa intacto menos sustracción; Carril 2 - resultados de PCR para ARN total intacto de HeLa más sustracción; Carril 3 - resultados de PCR para ARN total fragmentado de HeLa menos sustracción; Carril 4 - resultados de PCR para ARN total fragmentado de HeLa más sustracción; Panel 1 - GAPDH-5'; y Panel 2 - GAPDH-3'.

30 Definiciones

[0069] Se ha de entender que la terminología usada en el presente documento solo tiene el propósito de describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitante. Además, salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Al describir y reivindicar la presente invención, se usarán las siguientes terminología y variantes gramaticales de acuerdo con las definiciones establecidas a continuación.

[0070] Cuando, en el presente documento, se usan expresiones tales como "por ejemplo", "tal/es como", "incluye", "que incluye" o variaciones de las mismas, estas expresiones no se considerarán expresiones limitantes, y se interpretarán en el sentido de "pero no limitado a" o "sin limitación".

[0071] Como se usa en el presente documento, una "composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad" significa "una composición que comprende moléculas de ARN que, bien solas o en combinación, presentan una o más secuencias que son complementarias a esencialmente la totalidad de la secuencia presentada por la al menos una molécula de ARNr de longitud completa, en la que al menos una parte de los nucleótidos de dichas moléculas de ARN están unidas a un marcador de afinidad.

[0072] Como se usa en el presente documento, la expresión "una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr" o "una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido correspondientes a esencialmente la totalidad de" (o "la totalidad de la secuencia presentada por") "al menos una molécula de ARNr" o "una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido que, solas o en combinación, son complementarias a esencialmente la totalidad" (o "la totalidad de la secuencia") "de al menos una molécula de ARNr de longitud completa" se refiere a una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad que presentan, que se hibridarán específicamente con o se aparearán con o formarán complejo con, al menos el 95 % de las moléculas de ARN o fragmentos de moléculas de ARN que presentan una secuencia de una determinada molécula de ARNr de longitud completa. Preferentemente, las moléculas de ARNr antisentido de la composición se hibridarán específicamente con al menos el 95 % de las moléculas de una molécula de ARNr en particular o fragmentos de la misma en una muestra, de manera que, cuando se marquen por afinidad, dichas moléculas de ARNr antisentido se puedan usar con una matriz de unión para retirar al menos aproximadamente el 95 % de las moléculas de ARN o fragmentos de moléculas de ARN que presentan una secuencia de dicha molécula de ARNr en particular de la muestra. No es necesario que las secuencias de ácido nucleico antisentido presentadas en la composición compartan el 95 % de identidad de secuencia con el complemento de una determinada molécula de ARNr, sino que basta con que las secuencias de ácido nucleico antisentido sean capaces de hibridarse, aparearse o formar complejo específicamente con al menos

el 95 % de las moléculas de ARN o fragmentos de moléculas de ARN que presentan una secuencia de dicha molécula de ARNr en particular. No es necesario que las secuencias de ácido nucleico antisentido de la composición estén presentes en una sola cadena de ácido nucleico (aunque pueden estar), sino que la composición que comprende la molécula de ARNr antisentido puede consistir en fragmentos de ARNr antisentido que se hibridarán colectivamente con al menos el 95 % de las moléculas de ARN o fragmentos de moléculas de ARN que presentan una secuencia de una determinada molécula de ARNr. En ciertas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico antisentido se hibridarán específicamente con al menos el 95 %...96 % ... 97 % ... 98 % ... 98,5 % ... 99,0 % ... 99,3 % ... 99,5 % ... 99,8 %, 99,0 %...99,5 %...99,9 %...o 100 % de las moléculas de ARN o fragmentos de moléculas de ARN que presentan la secuencia de una molécula de ARNr en particular.

10

[0073] Como se usa en el presente documento, la expresión "una muestra empobrecida en ARNr que comprende esencialmente la totalidad de dicha al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés presente en dicha muestra inicial" se refiere a una muestra purificada que inicialmente contenía moléculas de ARNr y una primera cantidad de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés y que se ha purificado mediante la extracción de una cierta cantidad de moléculas de ARNr, conservando a la vez al menos el 90 % de dicha primera cantidad de dicha al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés. En ciertas realizaciones, al menos el 91 % ... 93 % ... 96 % ... 97 % ... 98 % ... 98,5 % ... 99,0 % ... 99,3 % ... 99,5 % ... 99,8 % ...o 99,9 % de dicha primera cantidad de dicha al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés está presente en la muestra empobrecida en ARNr. Los expertos en la materia conocerán o encontrarán fácilmente métodos de ensayo para la primera cantidad de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés de la muestra inicial y de ensayo para la cantidad de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés que queda en la muestra empobrecida en ARNr, y de uso de la información para calcular el porcentaje de dicha primera cantidad de dicha al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés que está presente en la muestra empobrecida en ARNr. Por ejemplo, en una realización, el porcentaje de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés que queda en la muestra empobrecida en ARNr se determina basándose en las cantidades de la al menos una molécula de ARN distinto del ARNr de interés de la muestra inicial y de la muestra empobrecida en ARNr determinadas usando PCR de transcripción inversa en tiempo real (también denominada "RT-qPCR").

15

20

25

[0074] Como se usa en el presente documento, la expresión "una muestra de ARNr aislada que está esencialmente exenta de las moléculas de ARN distinto del ARNr presentes en la muestra inicial" se refiere a una muestra purificada que inicialmente contenía moléculas de ARN distinto del ARNr y una primera cantidad de la al menos una molécula de ARNr y que se ha purificado retirando una cierta cantidad de las moléculas de ARN distinto del ARNr, conservando a la vez al menos el 90 % de dicha primera cantidad de dicha al menos una molécula de ARNr. En ciertas realizaciones, al menos >90 % ..., >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ... o >99,9 % de dicha primera cantidad de dicha al menos una molécula de ARNr está presente en la muestra de ARNr aislada. En ciertas realizaciones, al menos >90 %..., >95 % ..., >98 % ..., >99 % ..., >99,8 % ...o >99,9 % de las moléculas de ARN distinto del ARNr que estaban presentes en la muestra inicial no están presentes en la muestra de ARNr aislada (por ejemplo, en la que las cantidades de la al menos una molécula de ARNr y/o de las moléculas distintas de ARNr se determinan usando RT-qPCR como se ha descrito anteriormente).

40

[0075] Como se usa en el presente documento, la expresión "esencialmente exenta de moléculas de ARN que presentan secuencias de la al menos una molécula de ARNr" se refiere a una muestra purificada en la que el 5 % o menos de todas las moléculas presentes en la muestra inicial que presentaban una secuencia de ácido nucleico de dicha al menos una molécula de ARNr siguen presentes en la muestra empobrecida en ARNr. En ciertas realizaciones, el 5 % ... 4 % ... 3 % ... 2 % ... 1,5 % ... 1,0 % ... 0,5 %... o 0,1 % o menos de todas las moléculas presentes en la muestra inicial que presentaban una secuencia de ácido nucleico de una determinada molécula de ARNr siguen presentes en la muestra purificada. Los expertos en la materia conocerán o encontrará fácilmente métodos de ensayo de las cantidades de moléculas de ARN que presentan secuencias de la al menos una molécula de ARNr que están presentes en la muestra inicial y en la muestra empobrecida en ARNr. Por ejemplo, en una realización, el porcentaje de moléculas de ARN que presentan secuencias de la al menos una molécula de ARNr se determina basándose en las cantidades de las moléculas de ARN que presentan secuencias de la al menos una molécula de ARNr en la muestra inicial y en la muestra empobrecida en ARNr determinadas usando la PCR de transcripción inversa en tiempo real (también denominada "RT-qPCR").

50

[0076] Como se usa en el presente documento, la expresión "esencialmente exenta de moléculas de ARN distinto del ARNr que comprenden marcadores de afinidad" se refiere a una composición en la que el 2 % o menos de todas las secuencias de ácido nucleico marcadas por afinidad presentes son moléculas de ARN distinto del ARNr que tienen marcadores de afinidad. En ciertas realizaciones, el 2 % ... 1,5 % ... 1,0 % ... 0,5 % ... 0,1 % o menos de todas las moléculas de ácido nucleico marcadas por afinidad presentes son moléculas de ARN distinto del ARNr que tienen marcadores de afinidad.

60

[0077] Como se usan en el presente documento, las expresiones "una muestra empobrecida en ARNr" o "una muestra que está esencialmente exenta de moléculas de ARNr", a veces, se denomina en el presente documento "una muestra con el ARNr sustraído" o "una muestra sustraída" y los "métodos de generación de muestras empobrecidas en ARNr" o los "métodos de aislamiento del ARNr de muestras" a veces se denominan en el presente

65

documento "métodos de sustracción del ARNr" o, de manera más sencilla, "sustracción del ARNr". La expresión "sustracción del ARNr" en el presente documento significará y se referirá a "un método de generación de una muestra empobrecida en ARNr o un método de aislamiento del ARNr de una muestra". De igual manera, cuando se usa una forma del verbo "sustraer" en el presente documento, significará "un método o el proceso de realización de un método de generación de una muestra empobrecida en ARNr o de aislamiento del ARNr de una muestra" y el término "sustraído/a", en el presente documento, significará o se referirá al estado empobrecido en ARNr de la muestra tras la realización del método o del proceso.

[0078] Como se usa en el presente documento, la expresión "matriz de unión" se refiere a cualquier tipo de sustrato, ya sea poroso o no poroso, que se unirá a moléculas de ácido nucleico marcadas por afinidad tales como moléculas de ácido nucleico marcadas por afinidad y las secuencias a las que se hibridan, que se pueden retirar preferentemente de una muestra. Las moléculas de unión a marcadores de afinidad se asocian con la matriz de unión para permitir que la matriz de unión se una a las moléculas de ácido nucleico marcadas por afinidad. Los ejemplos de dichas matrices de unión incluyen, pero sin limitación, membranas o partículas de nailon, membranas o partículas de sílice, membranas o partículas de acetato de celulosa, membranas o partículas compuestas de sílice y Fe_2O_3 y otras membranas, fibras, placas recubiertas, soportes sólidos y partículas similares.

[0079] Como se usa en el presente documento, un "par de unión específica" se refiere a dos moléculas que tienen afinidad por y "se unen" entre sí en ciertas condiciones, lo que se refiere "condiciones de unión". La biotina y la estreptavidina o la avidina son ejemplos de un "par de unión específica" o "moléculas de unión por afinidad", pero la invención no se limita al uso de este par de unión específica en particular. En muchas realizaciones de la presente invención, un miembro de un determinado par de unión específica se conoce como la "molécula de marcador de afinidad" o el "marcador de afinidad", y el otro, como la "molécula de unión al marcador de afinidad". Por ejemplo, pero sin limitación, en algunas realizaciones, la biotina se denomina marcador de afinidad o molécula de marcador de afinidad, y una molécula de estreptavidina o avidina, ya esté libre, unida a una superficie, unida a otra molécula o marcada con una molécula detectable tal como un colorante, se conoce como la molécula de unión al marcador de afinidad. En otras realizaciones, la estreptavidina es el marcador de afinidad y la biotina es la molécula de unión al marcador de afinidad, ya que la estreptavidina y la biotina funcionan juntas como un par de unión específica o como moléculas de unión por afinidad. En la técnica, se conoce una amplia variedad de otros pares de unión específica o moléculas de unión por afinidad, que incluyen tanto moléculas de marcador de afinidad como moléculas de unión a marcador de afinidad (por ejemplo, véase la patente de los EE.UU. n.º 6.562.575), que se puede usar en la presente invención. Por ejemplo, un antígeno (que en sí mismo puede ser un anticuerpo) y un anticuerpo, incluyendo un anticuerpo monoclonal, que se une al antígeno es un par de unión específica. Además, un anticuerpo y una proteína de unión a anticuerpo, tales como la Proteína A de *Staphylococcus aureus*, se puede emplear como par de unión específica. Otros ejemplos de pares de unión específica incluyen, pero sin limitación, un resto de hidrato de carbono que es unido específicamente por una lectina y la lectina; una hormona y un receptor para la hormona; y una enzima y un inhibidor de la enzima. Por lo general, las moléculas que comprenden un par de unión específica interactúan entre sí a través de enlaces no covalentes tales como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas (incluyendo el apilamiento de las moléculas aromáticas), fuerzas de van der Waals y puentes de sal. Sin estar ligado por la teoría, en la técnica, se cree que este tipo de enlaces no covalentes genera la unión, en parte debido a las formas o estructuras complementarias de las moléculas implicadas en el par de unión. El término "unión" de acuerdo con la invención se refiere a la interacción entre una molécula de unión por afinidad o pares de unión específica (por ejemplo, entre biotina como una molécula de marcador de afinidad y estreptavidina como una molécula de unión al marcador de afinidad) como resultado de enlaces no covalentes tales como, pero sin limitación, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas, enlaces de van der Waals y enlaces iónicos. Basándose en la definición de "unión" y la amplia variedad de moléculas de unión por afinidad o pares de unión específica, es evidente que las "condiciones de unión" varían para los diferentes pares de unión específica. Los expertos en la materia pueden determinar fácilmente las condiciones en las que, en una muestra, se produce la unión entre las moléculas de unión por afinidad. En particular, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente las condiciones que permitan la unión entre moléculas de unión por afinidad que se considerarían en la técnica "unión específica". Como se entiende en la técnica, dicha especificidad, por lo general, se debe a la mayor afinidad entre las moléculas de unión por afinidad que por otras sustancias y componentes (por ejemplo, paredes de los vasos, soportes sólidos) en una muestra. En ciertos casos, la especificidad también podría implicar, o podría deberse a, una asociación significativamente más rápida de las moléculas de unión por afinidad que con otras sustancias y componentes en una muestra.

[0080] En algunas realizaciones de la invención, se usa un "reactivo marcador de afinidad" y/o "marcador de afinidad que tiene un resto reactivo", que en el presente documento pretende significar una molécula que comprende tanto un marcador de afinidad como un grupo o resto químico reactivo que es capaz de reaccionar con uno o más átomos o grupos de la molécula con la que reacciona para formar uno o más enlaces químicos covalentes entre la molécula que comprende el marcador de afinidad y la molécula con la que reacciona. A modo de ejemplo, pero sin limitación, en algunas realizaciones, el reactivo marcador de afinidad es un reactivo de acilación (por ejemplo, un éster de *N*-hidroxisuccinimidilo), en el que el marcador de afinidad está unido químicamente a un átomo de la molécula con la que reacciona a través de un enlace de acilo. En otras realizaciones, el reactivo marcador de afinidad es un reactivo de alquilación, grupo, en el que el marcador de afinidad está unido químicamente a un átomo

de la molécula con la que reacciona a través de un enlace de alquilo. En otras realizaciones, el reactivo marcador de afinidad reacciona a través de un tipo electrocíclico de reacción química, tal como una cicloadición 1,3-dipolar (por ejemplo, la cicloadición de un alquino con una azida). Así pues, el término resto "reactivo" con respecto a, por ejemplo, un "reactivo marcador de afinidad" o "marcador de afinidad que tiene un resto reactivo" se usa para referirse a un resto o grupo que participa en o es responsable de la reacción química mediante la cual una molécula que comprende el marcador de afinidad reacciona químicamente para formar un enlace químico covalente con uno o más átomos de la molécula con la que reacciona, en lugar de la unión que se produce entre las moléculas de unión por afinidad debidas a fuerzas y enlaces no covalentes.

- 10 **[0081]** Cuando se hace referencia a la unión de la "molécula de unión a marcador de afinidad" tal como estreptavidina o avidina, directamente a la superficie o al soporte sólido, por lo general, pero no siempre, se entiende que la molécula de unión a marcador de afinidad se une covalentemente a la superficie por medio de un enlazador químico que está unido a la superficie y a la molécula de unión a marcador de afinidad. Cuando se hace referencia a la unión de la "molécula de unión a marcador de afinidad", tal como estreptavidina o avidina, indirectamente a la superficie, se entiende que la molécula de unión a marcador de afinidad se une a otra molécula con la que tiene afinidad (por ejemplo, un anticuerpo anti-estreptavidina) que, a su vez, se une a la superficie. En algunas realizaciones, la molécula de unión a marcador de afinidad, tal como estreptavidina o avidina, no se une a una superficie, sino que está unida por otra molécula, tal como un anticuerpo o Proteína A, y el ARN protegido terminalmente por nucleótidos modificados biotinilado se recupera por precipitación o por la unión a un segundo anticuerpo u otra molécula usando métodos y composiciones conocidos en la técnica.

[0082] Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa que abarca más o menos el 25 %. Por ejemplo, "aproximadamente 200 nucleótidos" se refiere a un intervalo que engloba entre 150 y 250 nucleótidos.

- 25 **[0083]** Como se usa en el presente documento, el término "hibridación" o "hibridar" se usan en referencia al apareamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) se ve influenciada por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, la rigurosidad de las condiciones implicadas, la temperatura de fusión (T_m) del híbrido formado y la proporción de G:C en los ácidos nucleicos. Una sola molécula que contiene apareamiento de ácidos nucleicos complementarios dentro de su estructura se dice que está "auto-hibridada". Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se puede encontrar en Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, parte I, capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier (1993).

35 Descripción detallada

- [0084]** La presente invención proporciona métodos, composiciones y kits según lo definido en las reivindicaciones para la generación de muestras empobrecidas en ARNr y para el aislamiento del ARNr de las muestras. En particular, la presente invención proporciona composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad correspondientes a esencialmente toda la secuencia de al menos una molécula de ARNr (por ejemplo, un ARNr eucariota 28S, 26S, 25S, 18S, 5,8S y/o 5S, y/o un ARNr procarriota 23S, 16S y/o 5S) y métodos de uso de dichas composiciones para generar muestras empobrecidas en ARNr.

- 45 **[0085]** El ARN ribosomal constituye una masa mayor parte del contenido de ARN de una célula y, por tanto, presenta una carga tremenda de contaminación de fondo cuando se estudian las transcripciones menos abundantes y, a menudo, más relevantes. Hay métodos de reducción del ARNr disponibles, pero son muy limitantes, ya que, por ejemplo, solo requieren las muestras de "ARN intacto de alta calidad" para una buena extracción del ARNr. Los fragmentos de ARNr de la muestra sin las secuencias de consenso complementarias no se retirarán usando los métodos de la técnica y, por lo tanto, siguen contribuyendo a la contaminación importante de ARNr de la muestra, lo que limita la eficacia del análisis de transcripción cadena abajo y aumenta significativamente la carga de los costes del uso innecesario de bienes consumibles y mano de obra. Además, incluso en el mejor de los casos, en el que el ARN en la muestra comprende el denominado "ARN total intacto", la muestra puede todavía comprender una población de ARNr fragmentado, que sigue dando lugar a un fondo de ARNr usando los métodos de la técnica. Aún más, los métodos de la técnica no eliminan cantidades suficientes de toda la secuencia mostrada por las moléculas de ARNr, por lo que el fondo de ARNr es alto cuando la muestra se usa para los métodos de análisis modernos tales como para la generación de moldes de secuenciación marcados de ARN de su uso en la secuenciación de nueva generación (por ejemplo, para los denominados métodos de expresión génica "digital"). Por ejemplo, se ha informado que más de la mitad de las lecturas de secuencias puede ser para secuencias de ARNr, incluso después de una o más series de extracción del ARNr usando métodos comerciales conocidos en la técnica (por ejemplo, usando RiboMinus™, Life Technologies, Carlsbad, CA). Otro requisito de estos métodos existentes es la necesidad de un tamaño de muestra relativamente grande, que, con frecuencia, es prohibitivo. A menudo, el ARN total extraído de muestras de células/tejidos conservadas, especialmente, a largo plazo está invariablemente muy fragmentado y limitado en cantidad. Por lo tanto, se requiere un método para retirar de forma simultánea el ARNr tanto fragmentado como intacto, y para ello, se necesita de un tamaño pequeño de la muestra.

[0086] La presente invención aborda dicha necesidad, ya que proporciona, por ejemplo, métodos de extracción eficaz de moléculas de ARNr bien totalmente fragmentado o fragmentado de forma variable, dejando las transcripciones de ARN distinto del ARNr, en general, invariables. Además, el método funciona independientemente de cualquier "característica única" de las transcripciones de ARN no ribosomal tales como, una cola poli(A) como en el caso del ARNm eucariota y, por tanto, no presenta ningún sesgo de selección en la recuperación de todas las transcripciones de ARN no ribosomal. En ciertas realizaciones para lograr estos objetivos, se sintetizan uno o más ARNr antisentido marcados por afinidad que representan esencialmente la totalidad de la secuencia de longitud completa de cada ARNr en su totalidad o en parte (por ejemplo, eucariota 28S, 26S, 25S, 18S, 5,8S y/o 5S y/o procariota 23S, 16S y 5S) y se hibridan a sus respectivas secuencias de ARNr complementarias en la muestra de ensayo, y los híbridos, así como cualquier molécula de ARNr antisentido marcada por afinidad sin hibridar residual, se retiran luego físicamente usando moléculas de unión a marcador de afinidad (por ejemplo, ligadas a una matriz de unión), dejando invariables las transcripciones de ARN distinto del ARNr. Dado que esencialmente la totalidad de (o toda) la secuencia de al menos uno, y preferentemente cada ARNr, se representa en la composición que comprende moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad, cualquier fragmento de tamaño del ARNr nativo contenido en las muestras también es capaz de formar híbridos en las mismas condiciones de hibridación y retirarse eficazmente junto con cualquier secuencia de ARNr intacto que también pueda estar presente.

[0087] En realizaciones particulares, para lograr la extracción eficaz del ARNr, se usa un exceso molar de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad en la reacción de hibridación, lo que conduce el proceso de formación de híbridos a su finalización. Las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad en exceso también se pueden eliminar, ya que estas moléculas por sí mismas pueden contribuir a varios tipos de fondo en diferentes métodos o análisis cadena abajo. Para lograr esto, las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad contienen preferentemente una cantidad óptima de moléculas de marcador de afinidad, y se usa una cantidad apropiada de la matriz de unión que comprende las moléculas de unión al marcador de afinidad para retirar las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad tanto hibridadas a ARNr como sin hibridar. Como se describe en los ejemplos, se desarrollaron condiciones que permiten la realización de los métodos usando muestras que comprenden un intervalo dinámico más amplio de ARN total que los métodos existentes, incluyendo el uso de muestras que comprenden cantidades submicrográficas de ARN total.

30 *Secuencias de ARNr y cebadores ilustrativos*

[0088] La presente invención incluye composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad correspondientes a esencialmente la totalidad de al menos una molécula de ARNr. La presente invención no se limita a composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido que presentan secuencias que son exactamente complementarias a determinadas moléculas de ARNr en la muestra, sino que incluye composiciones que comprenden moléculas de ARNr antisentido que se hibridan con o se aparean o forman complejo con cualquier molécula de ARNr de la muestra, sean o no dichas moléculas de ARNr del mismo organismo.

40 *Realización ilustrativa*

[0089] A continuación, se describe una realización ilustrativa que se puede usar para generar muestras empobrecidas en ARNr usando microesferas ligadas a moléculas de unión a marcador de afinidad (de aquí en adelante "microesferas de unión" o "microesferas"). Dicha realización no pretende limitarse a la presente invención, sino que simplemente es una realización ilustrativa.

[0090] Se lavan las microesferas de unión y se suspenden en solución (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 1 M, EDTA 1 mM y Triton-X100 exento de RNasa al 0,0005 %). Se deja que las microesferas de unión alcancen la temperatura ambiente. Se agitan vigorosamente con formación de vórtice las microesferas durante 20 segundos para producir una suspensión homogénea. Para cada reacción, se aplican con una pipeta 25 μ l de las microesferas resuspendidas en un tubo de lavado de las microesferas. Se centrifugan las microesferas dispensadas a 10.000 rpm en un microcentrifugador de mesa de laboratorio durante 3 minutos. Se retira con pipeta cuidadosamente y se desecha el sobrenadante, sin perturbar el sedimento de microesferas. Se lavan las microesferas mediante la adición de 1 volumen de solución de lavado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 1 M y EDTA 1 mM) igual al volumen original de microesferas (por ejemplo, añadir 25 μ l de solución de lavado por cada 25 μ l de microesferas) al tubo. Se vuelven a suspender las microesferas mediante mezclado vigoroso con formación de vórtice. Se centrifuga el tubo a 10.000 rpm durante 3 minutos en un microcentrifugador de mesa de trabajo. Se retira con una pipeta cuidadosamente y se desecha el sobrenadante, sin perturbar el sedimento de microesferas. Se repiten las etapas de lavado, resuspensión, centrifugación y extracción con pipeta.

[0091] Se vuelven a suspender las microesferas en 1 volumen de solución de resuspensión. Por ejemplo, se añaden 25 μ l de solución de resuspensión por cada 25 μ l de las microesferas que se usaron originalmente. Se vuelven a suspender las microesferas mediante mezclado vigoroso con formación de vórtice para producir una suspensión homogénea. Se añaden 0,25 μ l de inhibidor de RNasa ScriptGuard™ (EPICENTRE, Madison, WI) en el tubo por cada 25 μ l de microesferas resuspendidas y se conservan a temperatura ambiente.

[0092] Para una muestra que contiene, por ejemplo, de 50 ng a 1 ug de ARN total (por ejemplo, humano, de ratón o de rata), en un tubo de microcentrifugación de paredes finas de 0,2 ml, se combinan: tampón de reacción x 10 (Tris-HCl 0,5 M, pH 7 0,5 y NaCl 1 M), una muestra de ARN total, una solución de extracción de ARNr (1,2 pmol de cada una de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad correspondientes a moléculas de ARNr humano 28S, 18S, 5,8S y 5S) y agua exenta de RNasa. Se mezcla/n suavemente la/s reacción/es y se incuban a 68 °C durante 10 minutos. Se retira/n el/los tubo/s de reacción a temperatura ambiente y se incuba/n durante al menos 15 minutos.

[0093] Se vuelven a suspender las anteriores microesferas lavadas pipeteando arriba y abajo. Para cada muestra, se pipetearon 25 µl de las microesferas a un nuevo tubo de microcentrifugación de 1,5 ml exento de RNasa. Se añade la muestra de ARN total a temperatura ambiente al tubo apropiado que contiene las microesferas. Se mezcla bien con la pipeta el contenido del tubo hacia arriba y abajo. Se incuba cada tubo a temperatura ambiente durante 15 minutos con la mezcla ocasional (cada 3-4 minutos) con formación suave de vórtice (baja sedimentación por gravedad) durante 5 segundos. Se coloca el tubo a 37 °C durante 5 minutos. Inmediatamente, se centrifuga el tubo a 14.000 rpm en un microcentrifugador durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se retira con pipeta cuidadosamente cada sobrenadante, que contiene la muestra empobrecida en ARNr, a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml exento de RNasa. Si quedan microesferas todavía visibles en la muestra, y se desea el uso de la precipitación con etanol, se repite el procedimiento anterior. La muestra empobrecida en ARNr se puede purificar, por ejemplo, mediante precipitación con etanol o método de columna.

[0094] Para la precipitación con etanol, se ajusta el volumen de cada muestra a 180 µl usando agua exenta de RNasa. Se añaden 18 µl de acetato de sodio 3 M a cada tubo. Se añaden 2 µl de glucógeno (10 mg/ml) a cada tubo y se mezcla bien suavemente con formación de vórtice. Se añaden 3 volúmenes (600 µl) de etanol al 100 % enfriado con hielo a cada tubo y se mezcla bien suavemente con formación de vórtice. Se colocan los tubos a -20 °C durante al menos 1 hora. Se centrifugan los tubos a > 10.000 x g en un microcentrifugador durante 30 minutos. Se retira con cuidado el sobrenadante y se desecha. Se lava el precipitado con etanol al 70 % enfriado con hielo y se centrifuga a > 10.000 x g durante 5 minutos. Se retira con cuidado el sobrenadante y se desecha. Se repite la etapa de etanol y centrifugación. Se centrifuga brevemente para recoger cualquier sobrenadante residual. Se retira con cuidado el sobrenadante y se desecha, y se deja que el sedimento se seque al aire a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se disuelve el sedimento en el volumen deseado de agua exenta de RNasa o tampón.

[0095] Para la purificación en columna, se puede usar la columna RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research; números de catálogo R1015, R1016) para purificar la muestra de ARN empobrecida en ARNr. Si se usa la columna RNA Clean & Concentrator™-5, se ha de seguir el procedimiento del fabricante titulado "Recuperación del ARN total, incluyendo los pequeños ARN". El ARN eluido se puede usar inmediatamente después de conservarlo a una temperatura de -70 °C a -80 °C.

Tecnologías de secuenciación

[0096] Las muestras de ARN purificado generadas de acuerdo con la presente invención se pueden secuenciar usando cualquier tipo de tecnología de secuenciación adecuada. La presente invención no está limitada por el tipo de método de secuenciación empleado. A continuación, se describen métodos de secuenciación ilustrativos.

[0097] Los ejemplos no limitantes ilustrativos de las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos incluyen, pero sin limitación, secuenciación de terminador de cadena (Sanger) y secuenciación del terminador de colorante. La secuenciación de terminador de cadena usa la terminación específica de secuencia de una reacción de síntesis de ADN usando sustratos de nucleótidos modificados. La extensión se inicia en un sitio específico en el ADN del molde usando un cebador de oligonucleótido radiactivo corto, u otro marcado, complementario al molde en esa región. El cebador de oligonucleótido se extiende usando una ADN polimerasa, cuatro bases de desoxinucleótido convencionales, y una baja concentración de un nucleótido de terminación de cadena, lo más comúnmente un di-desoxinucleótido. Esta reacción se repitió en cuatro tubos separados con cada una de las bases turnándose como el di-desoxinucleótido. La incorporación limitada del nucleótido de terminación de cadena por la ADN polimerasa da lugar a una serie de fragmentos de ADN relacionados que solamente se terminan en las posiciones en las que se usa un di-desoxinucleótido en particular. Para cada tubo de reacción, los fragmentos se separan por tamaños mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida en plancha o un tubo capilar lleno de un polímero viscoso. La secuencia está determinada por la lectura de qué carril produce una marca visualizada desde el cebador marcado a medida que se rastrea desde la parte superior del gel hacia la parte inferior.

[0098] La secuenciación de terminador de colorante marca alternativamente los terminadores. Se puede realizar la secuenciación completa en una sola reacción mediante el marcaje de cada uno de los terminadores de cadena de di-desoxinucleótido con un colorante fluorescente separado, que emite fluorescencia a una longitud de onda diferente.

[0099] Como alternativa a los métodos de secuenciación de Sanger y de terminador de colorante, ha surgido un conjunto de métodos denominados técnicas de "secuenciación de nueva generación" (Voelkerding *et al.*, *Clinical*

Chem., 55: 641-658, 2009; MacLean *et al.*, *Nature Rev. Microbiol.*, 7: 287-296). La mayoría de los métodos actuales describen el uso de la tecnología de secuenciación de nueva generación para la secuenciación *de novo* de genomas completos para determinar la secuencia de ácido nucleico principal de un organismo. Además, la re-secuenciación dirigida (secuenciación en profundidad) permite la detección de mutaciones sensibles en una población de la secuencia de tipo silvestre. Algunos ejemplos incluyen el trabajo reciente que describe la identificación de variantes resistentes a los fármacos contra el VIH, así como las mutaciones de EGFR para la determinación de la respuesta a fármacos terapéuticos anti-TK. Publicaciones recientes describen el uso de secuencias de cebador de código de barras que permite la secuenciación simultánea de múltiples muestras durante una serie típica de secuenciación incluyendo, por ejemplo: Margulies, M. *et al.* "Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactors", *Nature*, 437, 376-80 (2005); Mikkelsen, T. *et al.* "Genome-Wide Maps of Chromatin State in Pluripotent and Lineage-Committed Cells", *Nature*, 448, 553-60 (2007); McLaughlin, S. *et al.* "Whole-Genome Resequencing with Short Reads: Accurate Mutation Discovery with Mate Pairs and Quality Values", ASHG Annual Meeting (2007); Shendure J. *et al.* "Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome", *Science*, 309, 1728-32 (2005); Harris, T. *et al.* "Single-Molecule DNA Sequencing of a Viral Genome", *Science*, 320, 106-9 (2008); Simen, B. *et al.* "Prevalence of Low Abundance Drug Resistant Variants by Ultra Deep Sequencing in Chronically HIV-infected Antiretroviral (ARV) Naive Patients and the Impact on Virologic Outcomes", 16th International HIV Drug Resistance Workshop, Barbados (2007); Thomas, R. *et al.* "Sensitive Mutation Detection in Heterogeneous Cancer Specimens by Massively Parallel Picoliter Reactor Sequencing", *Nature Med.*, 12, 852-855 (2006); Mitsuya, Y. *et al.* "Minority Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants in Antiretroviral-Naive Persons with Reverse Transcriptase Codon 215 Revertant Mutations", *J. Vir.*, 82, 10747-10755 (2008); Binladen, J. *et al.* "The Use of Coded PCR Primers Enables High-Throughput Sequencing of Multiple Homolog Amplification Products by 454 Parallel Sequencing", *PLoS ONE*, 2, e197 (2007); y Hoffmann, C. *et al.* "DNA Bar Coding and Pyrosequencing to Identify Rare HIV Drug Resistance Mutations", *Nuc. Acids Res.*, 35, e91 (2007).

[0100] En comparación con la secuenciación de Sanger tradicional, la tecnología de secuenciación de nueva generación produce grandes cantidades de puntos de datos de secuenciación. Una serie típica puede generar fácilmente de decenas a cientos de megabases por serie, con un potencial de producción diaria que alcanza el intervalo de las gigabases. Esto se traduce en varios órdenes de magnitud más que una placa de 96 pocillos convencional, que puede generar varios cientos de puntos de datos en un ensayo multiplex normal. Los amplicones diana que se diferencian en al menos un nucleótido se pueden distinguir con facilidad, incluso cuando hay múltiples dianas de especies u organismos afines. Esto mejora enormemente la capacidad de hacer el genotipado exacto. Los programas informáticos de alineamiento de secuencias de nueva generación usados para producir secuencias de consenso pueden identificar fácilmente nuevas mutaciones puntuales, lo que podría dar lugar a nuevas cepas con resistencia a los fármacos asociados. El uso de códigos de barras con cebador también permite la multiplexación de diferentes muestras de pacientes en una sola serie de secuenciación.

[0101] Los métodos de secuenciación de nueva generación (NGS) comparten la característica común de las estrategias de alto rendimiento masivamente en paralelo, con el objetivo de reducir los costes de la comparación con los métodos de secuenciación antiguos. Los métodos de NGS se pueden dividir a grandes rasgos en los que requieren la amplificación de molde y los que no. Los métodos que requieren la amplificación incluyen la pirosecuenciación comercializada por Roche como las plataformas tecnológicas 454 (por ejemplo, GS 20 y GS FLX), la plataforma Solexa comercializada por Illumina, y la plataforma de enlace y detección de oligonucleótidos soportada (SOLiD) comercializada por Applied Biosystems. Los enfoques de no amplificación, también conocidos como la secuenciación de una sola molécula, se ilustran por la plataforma HeliScope comercializada por Helicos BioSciences, y las plataformas emergentes comercializadas por VisiGen y Pacific Biosciences, respectivamente.

[0102] En la pirosecuenciación (Voelkerding *et al.*, *Clinical Chem.*, 55: 641-658, 2009; MacLean *et al.*, *Nature Rev. Microbiol.*, 7: 287-296; patente de EE.UU. n.º 6.210.891; patente de EE.UU. n.º 6.258.568), el ADN de molde se fragmenta, se repara en los extremos, se liga a adaptadores y se amplifica clonalmente *in situ* mediante la captura de moléculas de molde individuales con perlas que portan oligonucleótidos complementarios a los adaptadores. Cada perla portadora de un solo tipo de molde está compartimentada en una microvesícula de agua en aceite, y el molde se amplifica clonalmente usando una técnica conocida como PCR en emulsión. La emulsión se rompe después de la amplificación y las perlas se depositan en pocillos individuales de una placa de picotitulación que funciona como una celda de flujo durante las reacciones de secuenciación. Se produce la introducción iterativa, ordenada, de cada uno de los cuatro dNTP reactivos en la celda de flujo en presencia de enzimas de secuenciación e indicador luminiscente tal como luciferasa. En el caso de añadirse un dNTP apropiado en el extremo 3' del cebador de secuenciación, la producción resultante de ATP provoca una explosión de la luminiscencia dentro del pocillo, que se registra usando una cámara CCD. Es posible lograr longitudes de lectura superiores o iguales a 400 bases, y 1 x 10⁶ lecturas de secuencia, lo que resulta en hasta 500 millones de pares de bases (Mb) de secuencia.

[0103] En la plataforma de Solexa/Illumina (Voelkerding *et al.*, *Clinical Chem.*, 55: 641-658, 2009; MacLean *et al.*, *Nature Rev. Microbiol.*, 7: 287-296; patente de EE.UU. n.º 6.833.246; patente de EE.UU. n.º 7.115.400; patente de EE.UU. n.º 6.969.488), los datos de secuenciación se producen en forma de lecturas de menor longitud. En este método, el ADN fragmentado de una sola cadena se repara en sus extremos para generar extremos romos fosforilados 5', seguido de la adición mediada por Klenow de una sola base A al extremo 3' de los fragmentos. La

adición de A facilita la adición de oligonucleótidos adaptadores salientes T, que se usan posteriormente para capturar las moléculas molde-adaptador en la superficie de una celda de flujo que está salpicada de anclajes de oligonucleótidos. El anclaje se usa como un cebador de PCR, pero debido a la longitud del molde y a su proximidad a otros oligonucleótidos de anclaje cercanos, la extensión por PCR genera el “arqueado sobre” la molécula para hibridarse con un oligonucleótido de anclaje adyacente para formar una estructura puente en la superficie de la celda de flujo. Estos bucles de ADN se desnaturalizan y se escinden. A continuación, las cadenas directas se secuencian con terminadores de colorante reversibles. La secuencia de nucleótidos incorporados se determina mediante la detección de la fluorescencia después de la incorporación, con cada compuesto fluorescente y bloque retirado antes del siguiente ciclo de adición de dNTP. La longitud de la lectura de secuencia varía de 36 nucleótidos a más de 50 nucleótidos, con una producción total superior a mil millones de pares de nucleótidos en cada serie analítica.

[0104] La secuenciación de moléculas de ácido nucleico usando la tecnología SOLiD (Voelkerding *et al.*, *Clinical Chem.*, 55: 641-658, 2009; MacLean *et al.*, *Nature Rev. Microbiol.*, 7: 287-296; patente de EE.UU. n.º 5.912.148; patente de EE.UU. n.º 6.130.073) también implica la fragmentación del molde, el enlace a los adaptadores de oligonucleótidos, la unión a perlas y la amplificación clonal por PCR en emulsión. Tras ello, las perlas que portan molde se inmovilizan sobre una superficie derivatizada de una celda de flujo de vidrio, y se aparean un cebador complementario al oligonucleótido adaptador. Sin embargo, en lugar de utilizar este cebador para la extensión de 3', se usa para proporcionar un grupo fosfato 5' para el enlace a sondas de interrogación que contienen dos bases específicas de la sonda seguidas de 6 bases degeneradas y uno de los cuatro marcadores fluorescentes. En el sistema SOLiD, las sondas de interrogación tienen 16 posibles combinaciones de las dos bases en el extremo 3' de cada sonda, y uno de los cuatro compuestos fluorescentes en el extremo 5'. El color del compuesto fluorescente y, por lo tanto, la identidad de cada sonda se corresponden con los esquemas de codificación de color-espacio especificados. Múltiples series (normalmente 7) de apareamiento de la sonda, enlace y detección del compuesto fluorescente son seguidas de la desnaturalización, y luego una segunda serie de secuenciación usando un cebador que se compensa con una base con respecto al cebador inicial. De esta manera, la secuencia del molde se puede reconstruir computacionalmente, y las bases del molde son interrogadas dos veces, generando una mayor exactitud. La longitud de la lectura de la secuencia es de una media de 35 nucleótidos, y la producción global supera los 4 mil millones de bases por serie de secuenciación.

[0105] En ciertas realizaciones, se emplea la secuenciación por nanoporo (véase, por ejemplo, Astier *et al.*, *J Am Chem Soc.* 8 de febrero de 2006; 128(5):1705-10). La teoría que hay tras la secuenciación por nanoporo tiene que ver con lo que ocurre cuando el nanoporo se sumerge en un fluido conductor y se aplica un potencial (tensión) a través: en estas condiciones, se puede observar una ligera corriente eléctrica debida a la conducción de los iones a través del nanoporo, y la cantidad de corriente es muy sensible al tamaño del nanoporo. Si pasan moléculas de ADN (o pasa parte de la molécula de ADN) a través del nanoporo, esto puede crear un cambio en la magnitud de la corriente a través del nanoporo, permitiendo de ese modo la determinación de las secuencias de la molécula de ADN.

[0106] HeliScope de Helicos BioSciences (Voelkerding *et al.*, *Clinical Chem.*, 55: 641-658, 2009; MacLean *et al.*, *Nature Rev. Microbiol.*, 7: 287-296; patente de EE.UU. n.º 7.169.560; patente de EE.UU. n.º 7.282.337; patente de EE.UU. n.º 7.482.120; patente de EE.UU. n.º 7.501.245; patente de EE.UU. n.º 6.818.395; patente de EE.UU. n.º 6.911.345; patente de EE.UU. n.º 7.501.245) es la primera plataforma de secuenciación de una sola molécula comercializada. Este método no requiere la amplificación clonal. El ADN de molde se fragmenta y se poliadenila en el extremo 3', portando la adenosina final un marcador fluorescente. Los fragmentos de molde poliadenilados y desnaturalizados se enlazan a oligonucleótidos poli(dT) en la superficie de una celda de flujo. Las ubicaciones físicas iniciales de las moléculas de molde capturadas se registran con una cámara CCD, y luego se escinde y se retira por lavado el marcador. La secuenciación se logra mediante la adición de la polimerasa y la adición en serie de reactivos de dNTP marcados por fluorescencia. Las incorporaciones dan lugar a la señal fluorescente correspondiente al dNTP, y la señal es capturada por una cámara CCD antes de cada serie de adición de dNTP. La longitud de la lectura de la secuencia varía de 25-50 nucleótidos, con una producción total superior a mil millones de pares de nucleótidos en cada serie analítica. Otros métodos emergentes de secuenciación de una sola molécula es la secuenciación en tiempo real mediante la síntesis usando una plataforma VisiGen (Voelkerding *et al.*, *Clinical Chem.*, 55: 641-658, 2009; patente de EE.UU. n.º 7.329.492; solicitud de patente de EE.UU. n.º de serie 11/671956; solicitud de patente de EE.UU. n.º de serie 11/781166) en la que ADN cebado, inmovilizado, se somete a la extensión de la cadena usando una polimerasa modificada fluorescentemente y moléculasceptoras fluorescentes, generando la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia detectable (FRET) tras la adición de nucleótidos. Otro sistema de secuenciación de una sola molécula en tiempo real desarrollado por Pacific Biosciences (Voelkerding *et al.*, *Clinical Chem.*, 55: 641-658, 2009; MacLean *et al.*, *Nature Rev. Microbiol.*, 7: 287-296; patente de EE.UU. n.º 7.170.050; patente de EE.UU. n.º 7.302.146; patente de EE.UU. n.º 7.313.308; patente de EE.UU. n.º 7.476.503) utiliza pocillos de reacción de 50 a 100 nm de diámetro y que abarcan un volumen de reacción de aproximadamente 20 zeptolitros (10×10^{-21} l). Las reacciones de secuenciación se realizan usando el molde inmovilizado, ADN polimerasa phi29 modificada y altas concentraciones locales de dNTP marcados por fluorescencia. Las altas concentraciones locales y las condiciones de reacción continua permiten la captura de incorporaciones en tiempo real mediante la detección de la señal fluorescente usando excitación láser, una guía de ondas óptica y una cámara CCD.

Soporte sólidos de matriz de unión

[0107] La matriz de unión empleada en la presente invención puede ser cualquier superficie o soporte sólido al que la molécula de unión al marcador de afinidad se pueda unir y que no presente unión inespecífica sustancial de las moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad. La presente invención no se limita a un soporte sólido. En algunas realizaciones, se emplean placas de poliestireno que contienen o bien 96 o 384 pocillos. En algunas realizaciones, se usan placas de microtitulación de 96 pocillos o 384 pocillos recubiertas con estreptavidina (SA) (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianápolis, IN) como soportes sólidos. En algunas realizaciones, se emplean partículas o perlas. Las partículas se pueden fabricar de cualquier material adecuado, incluyendo, pero sin limitación, el látex. En algunas realizaciones, se emplean minicolumnas. Las columnas pueden contener moléculas de unión al marcador de afinidad. En otras realizaciones, se emplea una BEADARRAY (Illumina, San Diego, CA). Se contempla una variedad de otros soportes sólidos incluyendo, pero sin limitación, portaobjetos de vidrio, obleas de vidrio, oro, silicio, microchips, y otras superficies de plástico, metal, cerámica o biológicas.

15 Ejemplos

[0108] Se entiende que los ejemplos y las realizaciones que se describen en el presente documento solo son a efectos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención reivindicada.

20 Ejemplo 1**Síntesis de moléculas de ARNr antisentido biotilado que representan las secuencias de longitud completa de moléculas de ARN ribosomal (ARNr) de procariontes y eucariotas**

[0109] Para sintetizar ARNr antisentido correspondiente a la secuencia completa de cada molécula de ARNr, se crearon moldes de PCR que contenían una secuencia promotora de fago en todos menos en un caso de la siguiente manera.

Moldes de PCR de ARNr 18S, 5,8S y 5S humano para la síntesis *in vitro* de ARNr antisentido

[0110] Se sintetizaron amplicones de PCR que representan las secuencias de ARNr de longitud completa 18S (n.º de acceso NR_003286), 5,8S (n.º de acceso U13369 REGIÓN: 6623-6779) y 5S (n.º de acceso NR_023363). Cada reacción de PCR de 100 µl comprendía 20 pmol de un cebador directo, 20 pmol de un cebador inverso que contenía la secuencia promotora de fago de ARN polimerasa de T7 (mostrada en cursiva) y 5 ng ADNc de primera cadena cebado aleatoriamente creado a partir de ARN total de referencia humano universal (Stratagene) en condiciones de reacción de PCR FailSafe optimizadas según lo descrito por el fabricante (EPICENTRE Biotechnologies). Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron durante 25 ciclos a 30 ciclos en función del par de cebadores y los amplicones de PCR correspondientes a las secuencias de ARNr de longitud completa 18S, 5,8S y 5S, y los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación de PCR Qiaquick según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). A continuación, se presenta una lista de los respectivos cebadores directos e inversos:

ARNr 18S

cebador directo (SEQ ID NO: 1: 5'-CCTACCTACCTGGTTGATCC) y
 45 cebador inverso (SEQ ID NO: 2: 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGATC CTTCCGCAGGTTAC-CTAC).

ARNr 5,8S

50 cebador directo (SEQ ID NO: 3: 5'-CGACTCTTAGCGGTGGATCACTC) y
 cebador inverso (SEQ ID NO: 4: 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGATC CTTCCGCAGGTTAC-CTAC)

ARNr SS

55 cebador directo (SEQ ID NO: 5: 5'-GTCTACGGCCATACCACCCTGAA) y
 cebador inverso (SEQ ID NO: 6: 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAAAG
 CCTACAGCACCCGGTAT-TC)

Moldes de PCR de ARNr 23S, 16S y 5S de *Escherichia coli* para la síntesis *in vitro* de ARNr antisentido

[0111] Se sintetizaron amplicones de PCR que representaban las secuencias de ARNr de longitud completa 23S (n.º de acceso EG30077), 16S (n.º de acceso EG30084) y 5S (n.º de acceso EG30070). Cada reacción de PCR de 100 µl comprendía 20 pmol de un cebador directo, 20 pmol de un cebador inverso que contenía la secuencia promotora de fago de ARN polimerasa de T7 (mostrada en cursiva) y 5 ng ADNc de primera cadena cebado

aleatoriamente creado a partir de ARN total K-12 de *E. coli* en condiciones de reacción de PCR FailSafe optimizadas según lo descrito por el fabricante (EPICENTRE Biotechnologies). Las reacciones de amplificación por PCR se realizaron durante 25 ciclos a 30 ciclos en función del par de cebadores y los amplicones de PCR correspondientes a las secuencias de ARNr de longitud completa 23S, 16S y 5S, y los productos de PCR se purificaron usando el kit de purificación de PCR Qiaquick según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). A continuación, se presenta una lista de los respectivos cebadores directos e inversos:

ARNr 23S

10 **[0112]** Para amplificar eficazmente la secuencia de ARNr 23S completa, se usaron dos pares de cebadores mediante lo que se dividió la secuencia de ARNr 23S de longitud completa en aproximadamente dos segmentos iguales. El segmento de ARNr 23S 5' comprendía cebador directo (SEQ ID NO: 7: 5'-AAGCGACTAAGCGTACCGGTGGA) y cebador inverso (SEQ ID NO: 8: 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGATTCCTGGAAGCAGG GCATITGTTG) y el segmento de ARNr 23S 3'
15 comprendía cebador directo (SEQ ID NO: 9: 5'-CAACAAATGCCCTGCTTCCAGGAA) y cebador inverso (SEQ ID NO: 10: 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGACACGGTTCATTAGTACCGGTTAGCT).

ARNr 16S

20 cebador directo (SEQ ID NO: 11: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y cebador inverso (SEQ ID NO: 12: 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGGAG GTGATCCAACCGCAGGTT).

ARNr 5S

25 cebador directo (SEQ ID NO: 13: 5'-TGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGT) y
cebador inverso (SEQ ID NO: 14: 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGATGC CTGGCAGTTC-
CCTACTCTC).

30 **[0113]** Cada amplicón de PCR (300 ng) que representa la respectiva secuencia de ARNr humano o de *E. coli* se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 1A.

Clon de ARN ribosomal 28S

35 **[0114]** La amplificación por PCR de la secuencia completa de ARNr 28S (n.º de acceso NR_003287) resultó no ser muy eficaz, especialmente para la secuencia de extremo 5' de aproximadamente 1.200 nt, incluso tras la división de la secuencia de longitud completa en segmentos de 1 Kb a 2 Kb. Así pues, para generar el molde necesario para la síntesis *in vitro* del ARNr antisentido 28S, se clonó la secuencia de ARNr 28S tanto en un plásmido que contenía el promotor del fago T7 (pSP73; Promega Corporation) y como en un plásmido que contenía el promotor del fago SP6 (pSP64; Promega Corporation) usando métodos y estrategias de clonación convencionales (Maniatis *et. al.* (1982)
40 "Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory", Cold Spring Harbor, Nueva York, y la información descrita por Maden *et al.* (1987) *Biochem. J.* 246: 519-527.

Síntesis *in vitro* de moléculas de ARNr antisentido biotiniladas desde los respectivos moldes de PCR para secuencias de ARNr 18S, 5,8S y 5S humanas y 23S, 16S y 5S de *E. coli*

45 **[0115]** Se usó bien un kit de transcripción de alto rendimiento para T7 AmpliScribe™ o un kit de transcripción FLASH para T7 AmpliScribe™ (EPICENTRE, Madison, WI) para reacciones de transcripción *in vitro* (IVT) que comprendían de 500 ng a 1.000 ng de los respectivos moldes (18S, 5,8S y 5S humanos, y 23S, 16S y 5S de *E. coli*) realizadas según lo descrito por el fabricante (EPICENTRE Biotechnologies) con la siguiente modificación - se reemplazó el trifosfato de uridina (UTP) por mezclas de biotina-16-UTP y UTP que comprendían 10 %, 20 %, 35 %, 50 % o 60 % de biotina-16-UTP. Se incubaron las reacciones de IVT a 37 °C durante 4 a 6 horas, y a continuación, el molde de ADN usado en cada reacción se digirió con DNasa I según las recomendaciones del fabricante. Cada ARNr antisentido biotinilado se purificó posteriormente usando mini-columnas RNAspin ilustra según las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare) y se eluyeron en agua exenta de RNasa. Se trató cada ARNr antisentido purificado con DNasa I Baseline-Zero™ según las recomendaciones del fabricante (EPICENTRE Biotechnologies) para retirar todas las trazas del molde de ADN usado para la transcripción. Se volvió a purificar el ARNr antisentido biotinilado usando mini-columnas RNAspin ilustra, se eluyó en agua exenta de RNasa y se determinó la concentración de ARN mediante la medición de la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro. (Nota: los experimentos posteriores mostraron que se obtuvieron mejores resultados para la generación de muestras empobrecidas en ARNr con respecto al ARNr 5,8S y 5S eucariota o ARNr 5S procarionta usando al menos
60 aproximadamente el 75 % de biotina-16-UTP en la reacción de transcripción *in vitro*).

[0116] Cada ARN antisentido purificado (300 ng), que representa toda la secuencia de ARNr humana o de *E. coli*, analizado mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, se muestra en Figure 1B.

65

Síntesis *in vitro* de ARNr antisentido biotinilado a partir de los moldes de plásmido para la secuencia de ARNr 28S humana

- [0117]** Inicialmente, se usó 1 µg del clon de plásmido de ARNr 28S de T7 linealizado en un kit de transcripción de alto rendimiento para T7 AmpliScribe™ para la transcripción *in vitro* (IVT) según lo descrito por el fabricante (EPICENTRE Biotechnologies) con la siguiente modificación - una mezcla 1:1 de bio-UTP:ITP en lugar de UTP al 100 %. Se realizó la incubación a 37 °C durante 4 horas y luego se retiró el molde de ADN mediante la digestión con DNasa I según las recomendaciones del fabricante (EPICENTRE Biotechnologies). Se analizó una parte alícuota (300 ng) del producto de la reacción de transcripción purificado mediante electroforesis en gel. A raíz de los resultados, resultó evidente que (Figura 1C, Carril 1) se produjo muy poco, si es que se produjo algo del ARNr 28S antisentido de longitud completa esperado en la reacción de IVT. En cambio, se observaron moléculas de ARN de tamaño variable de peso molecular bajo a alto. Así pues, resultó que la ARN polimerasa de T7 no pudo transcribir eficazmente el molde de ADN 28S.
- [0118]** A continuación, se ensayó 1 µg del clon del plásmido de ARNr 28S de SP6 linealizado en un kit de transcripción de alto rendimiento para SP6 AmpliScribe™ convencional para la transcripción *in vitro* (IVT) según lo descrito por el fabricante (EPICENTRE Biotechnologies) usando una mezcla 1:1 similar de bio-UTP y UTP. Se realizó la incubación a 37 °C durante 4 horas y luego se retiró el molde de ADN mediante digestión con DNasa I según las recomendaciones del fabricante (EPICENTRE Biotechnologies). El ARNr antisentido biotinilado producido se purificó seguidamente usando mini-columnas RNAspin ilustra según las recomendaciones del fabricante (GE Healthcare) y se eluyó en agua exenta de RNasa. Tras ello, se trató el ARNr 28S antisentido purificado con DNasa I Baseline-Zero™ según las recomendaciones del fabricante (EPICENTRE Biotechnologies) para retirar todas las trazas del molde de ADN usado para la transcripción. El ARNr antisentido biotinilado se volvió a purificar usando mini-columnas RNAspin ilustra, se eluyó en agua exenta de RNasa y se determinó la concentración de ARN midiendo la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro. Se analizó una parte alícuota (300 ng) de la reacción de transcripción mediante electroforesis en gel y, a raíz de los resultados, se hizo evidente que el ARNr 28S antisentido esperado se produjo en la reacción IVT de SP6 (Figura 1C, Carril 2).

Ejemplo 2

- Extracción de ARNr antisentido biotinilado e híbridos de ARNr bicatenarios resultantes formados usando ARN total de *E. coli* usando microesferas recubiertas de estreptavidina**

- [0119]** Se usó ARNr de *E. coli* como modelo para analizar la cantidad de Microesferas Recubiertas de Estreptavidina ProActive® (Bangs Laboratories) necesarias para retirar una cantidad fija de ARNr antisentido biotinilado de la solución. Se lavaron las microesferas recubiertas de estreptavidina y se volvieron a suspender en el tampón de unión/lavado según las recomendaciones del fabricante (Bangs Laboratories). Se usaron materiales de ARNr antisentido biotinilado de *E. coli* sintetizados usando biotina-UTP al 35 % según lo descrito en el Ejemplo 1 para preparar una mezcla que comprendía un microgramo de cada uno del segmento 5' de ARNr 23S, el segmento 3' de ARNr 23S y el ARNr 16S de longitud completa en un volumen de 4 µl de agua exenta de RNasa. Cada 4 µl de mezcla de ARNr antisentido biotinilado representaría un exceso molar de al menos más del doble al mezclarse con un microgramo de ARN total nativo de *E. coli*, concentración que se seleccionó para conducir a la finalización o casi la finalización de la hibridación del ARNr sentido y antisentido al mezclarse todo junto.
- [0120]** Se determina la cantidad de microesferas recubiertas de estreptavidina necesaria para retirar eficazmente el ARNr antisentido biotinilado añadido a una reacción de hibridación. Se prepararon tres partes alícuotas de 4 µl de la mezcla de ARNr antisentido biotinilado de *E. coli* en tubos de microcentrifugación de 0,2 ml hasta un volumen de reacción final de 20 µl que comprendía 1 x tampón de hibridación (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 y NaCl 100 mM). Se incubaron las reacciones a 68 °C durante 5 minutos y luego a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se añadieron cada una de las reacciones n.º 1 y n.º 2 a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml recién preparado que contenía 20 µl de las suspender microesferas recubiertas de estreptavidina lavadas y resuspendidas. Se añadió la reacción de control n.º 3 a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml recién preparado con solo 20 µl de tampón de unión/lavado. Se incubaron además todas las reacciones a temperatura ambiente durante 15 minutos con mezclado suave ocasional (3-4 minutos) para permitir la formación del complejo de biotina-estreptavidina. Entonces, se purificó el ARNr antisentido biotinilado que quedó en la solución tras la captura mediante las microesferas usando columnas de ARN Clean-up Kit™-5 según las recomendaciones del fabricante (ZYMO Research). Se añadieron las reacciones n.º 1 y n.º 3 directamente en el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO mientras que la reacción n.º 2 se centrifugó primero a 12.000 rpm durante 5 minutos usando una centrifugadora de sobremesa para sedimentar las microesferas, y el sobrenadante retirado, y luego se añadieron al procedimiento de limpieza de ARN ZYMO. Se eluyó cada muestra de ARN en 10 µl agua exenta de RNasa y se analizó una parte alícuota de 5 µl mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 2A.

- [0121]** En la Figura 2A, los Carriles 1 y 2 muestran el ARNr antisentido biotinilado residual tras la unión a las microesferas recubiertas de estreptavidina en comparación con el control (Carril 3). La cantidad de ARN antisentido

restante era más pronunciada en el Carril 2, donde las microesferas se retiraron antes del procedimiento de limpieza de ARN ZYMO. Aunque no está claro, es posible que la adición de la mezcla de reacción de hibridación con las microesferas directamente a la columna de purificación de ARN reduzca la capacidad de unión de la columna dando lugar a la pérdida adicional del ARN antisentido biotinilado. No obstante, a raíz de este experimento, fue evidente
5 que 20 µl de las microesferas recubiertas de estreptavidina fueron insuficientes para retirar toda la cantidad de ARNr antisentido biotinilado usada.

[0122] Así pues, se analizaron otros 20 µl adicionales de microesferas lavadas para determinar si serían suficientes para retirar los 4 µl de ARNr antisentido biotinilado. Se prepararon cuatro reacciones, comprendiendo
10 cada una 4 µl del ARNr antisentido biotinilado de *E. coli* en 1 x tampón de hibridación hasta un volumen final de 20 µl. Las reacciones se incubaron a 68 °C durante 5 minutos y después a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió cada una de las reacciones n.º 2 y n.º 3 a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml recién preparado que contenía 20 µl de las microesferas recubiertas con estreptavidina lavadas y resuspendidas. Se añadió la reacción n.º
15 4 a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml nuevo que contenía 40 µl de las microesferas recubiertas con estreptavidina lavadas y resuspendidas. Se añadió la reacción de control n.º 1 a un nuevo tubo de microcentrifugación de 1,5 ml solo con tampón de unión/lavado. Las reacciones se incubaron además a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación suave ocasional (3-4 minutos) con el fin de permitir la formación del complejo de biotina-estreptavidina. Las reacciones se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos usando una centrifugadora de sobremesa para sedimentar las microesferas, y se transfirió cada sobrenadante a nuevos tubos de
20 microcentrifugación de 1,5 ml. Al sobrenadante de la reacción n.º 3, se añadieron 20 µl más de las microesferas recubiertas con estreptavidina lavadas y se incubaron de nuevo a temperatura ambiente con agitación suave ocasional (3-4 minutos). Se centrifugó la reacción n.º 3 a 12.000 rpm durante 5 minutos una vez más y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifugación de 1,5 ml. El ARN antisentido biotinilado contenido en cada una de las cuatro reacciones se purificó usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO y se eluyó en 10 µl de
25 agua exenta de RNasa. Se analizó todo el material eluido para cada una por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, como se muestra en la Figura 2B.

[0123] En la Figura 2B, el Carril 2 muestra de nuevo que el ARNr antisentido biotinilado no se elimina por completo cuando se usan solo 20 µl de microesferas. Sin embargo, cuando se usaron bien 20 µl de microesferas seguidos de
30 otros 20 µl de microesferas o 40 µl de microesferas, parece que hay una extracción completa del ARNr antisentido biotinilado añadido (Carril 3 y Carril 4, respectivamente). Por lo tanto, en general, se prefirió el tratamiento con 40 µl de microesferas, ya que necesitó menos etapas.

[0124] A continuación, se analizó la cantidad de microesferas usadas como se describe en la Figura 2B para
35 determinar si también era suficiente para retirar eficazmente los híbridos de ARN ribosomal ARN bicatenario (ARNr bicatenario) formados tras el apareamiento del ARNr antisentido biotinilado y el ARNr nativo contenido en el ARN total. En primer lugar, para demostrar la formación del híbrido del ARNr bicatenario, se mezclaron 500 ng de ARN total de *E. coli* con 4 µl del ARNr antisentido biotinilado de *E. coli* en una reacción que comprendía 1 x tampón de hibridación en un volumen final de 20 µl. La reacción se incubó a 68 °C durante 5 minutos y después a temperatura
40 ambiente durante 15 minutos, se purificó usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO y se eluyó en 10 µl de agua exenta de RNasa. Se analizó una parte alícuota de 5 µl mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio junto con cantidades equivalentes del ARN total de *E. coli* individual y ARNr antisentido biotinilado como se muestra en la Figura 2C. La Figura 2C, carril 3 muestra la formación eficaz de los híbridos de ARNr bicatenarios en comparación con las muestras de ARN sentido y antisentido individuales (Carriles 1 y 2,
45 respectivamente).

[0125] A continuación, se analizó la extracción de los híbridos de ARNr bicatenarios usando las cantidades de las microesferas lavadas descritas en la Figura 2B. Se prepararon tres reacciones (n.º 1, n.º 2 y n.º 3), comprendiendo
50 cada una 500 ng de ARN total de *E. coli* y 4 µl del ARNr antisentido biotinilado de *E. coli* en 1 x tampón de hibridación hasta un volumen final de 20 µl, junto con dos reacciones de control - una que contenía solo el ARNr antisentido biotinilado de *E. coli* (n.º 4) y la otra, solo el ARN total de *E. coli* (n.º 5). Las reacciones se incubaron a 68 °C durante 5 minutos y después a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió cada una de las reacciones n.º 1 y n.º 3 a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml recién preparado que contenía 20 µl de las microesferas recubiertas con estreptavidina lavadas y resuspendidas. Se añadió cada una de las reacciones n.º 2 y
55 n.º 4 a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml recién preparado que contenía 40 µl de las microesferas recubiertas con estreptavidina lavadas y resuspendidas. Se añadió la reacción de control n.º 5 a un nuevo tubo de microcentrifugación de 1,5 ml que solo contenía tampón de unión/lavado. Las reacciones se incubaron además a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación suave ocasional (3-4 minutos) con el fin de permitir la formación del complejo de biotina-estreptavidina. Las reacciones se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos
60 usando una centrifugadora de sobremesa para sedimentar las microesferas, y se transfirió cada sobrenadante a nuevos tubos de microcentrifugación de 1,5 ml. Al sobrenadante de la reacción n.º 3, se añadieron 20 µl más de las microesferas recubiertas con estreptavidina lavadas y se incubó a temperatura ambiente con agitación suave ocasional (3-4 minutos). Se volvió a centrifugar la reacción n.º 3 a 12.000 rpm durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifugación de 1,5 ml. El ARN contenido en cada una de las cinco
65 reacciones se purificó usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO y se eluyó en 10 µl de agua exenta de

RNasa. Se analizó una parte alícuota de 5 µl de cada una por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, como se muestra en la Figura 2D. Además, se procesaron 250 ng de ARN total de *E. coli* sin tratar como control.

- 5 **[0126]** En la Figura 2D, el Carril 1 muestra el ARNr bicatenario residual cuando se usan solo 20 µl de microesferas. Sin embargo, con bien 2 x 20 µl (Carril 2) o 1 x 40 µl de microesferas (Carril 3), los híbridos de ARNr bicatenarios ya no eran visibles, lo que indicaba que el ARNr antisentido biotinilado era capaz de aparearse a sus secuencias de ARNr sentido complementarias y facilitar su extracción mediante las microesferas de estreptavidina. La cantidad de ARN total de *E. coli* no pareció verse afectada por la adición de 40 µl de microesferas (Carril 5) en comparación con una cantidad similar de ARN total de *E. coli* sin tratar (Carril 6). Así pues, se hizo evidente que bastaban 40 µl de microesferas para retirar bien el ARNr antisentido biotinilado añadido o los híbridos de ARNr bicatenarios resultantes formados tras la hibridación del ARNr antisentido biotinilado al ARNr.

Ejemplo 3

15

Efecto del uso de diferentes niveles de biotina-UTP para la síntesis de ARNr antisentido biotinilado y su extracción con las microesferas recubiertas de estreptavidina

- 20 **[0127]** En los experimentos descritos en el Ejemplo 2 anterior, se usó ARNr antisentido biotinilado sintetizado usando una mezcla de UTP:biotina-UTP que comprendía biotina-UTP al 35 %. Para la cantidad de ARNr antisentido usada en la reacción de hibridación, se necesitaron 40 µl de las microesferas de estreptavidina para su eliminación eficaz. Por lo tanto, se pensó que el ARNr antisentido preparado con menores cantidades de biotina-UTP debería requerir menos microesferas de estreptavidina para su extracción cuantitativa, lo que resultaría en una reducción global del coste asociado con la cantidad de tanto la biotina-UTP como de las microesferas necesarias. Se prepararon ARNr 16S y 23S antisentido biotinilados se prepararon usando soluciones de biotina-UTP bien al 10 % o al 20 % como se describe anteriormente en el Ejemplo 1 y luego se prepararon mezclas de 4 µl convencionales de los respectivos ARNr antisentido biotinilados. Se usó el porcentaje de biotina-UTP usado en la reacción de transcripción *in vitro* para su síntesis para referirse al producto de ARNr antisentido biotinilado; por ejemplo, si el porcentaje de biotina-UTP usado en la reacción de transcripción *in vitro* era del 10 %, con el 90 % restante siendo UTP, el producto se denomina en el presente documento ARNr antisentido biotinilado al 10 %, a pesar de que el porcentaje de biotina-nucleótidos UTP incorporado en el producto puede ser inferior al 10 % en comparación con los nucleótidos UTP incorporados en el producto.

- 35 **[0128]** Se prepararon dos conjuntos de tres reacciones, comprendiendo cada una 4 µl del ARNr antisentido biotinilado bien al 10 % (reacción n.º 1, n.º 2 y n.º 3) o al 20 % (reacciones n.º 4, n.º 5 y n.º 6) hasta un volumen final de 20 µl en 1 x tampón de hibridación. Las reacciones se incubaron a 68 °C durante 5 minutos y después a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se transfirió cada una de las reacciones n.º 2 y n.º 5 a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml recién preparado que contenía 20 µl de las microesferas de estreptavidina lavadas, y cada una de las reacciones n.º 3 y n.º 6 se transfirió a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml recién preparado que contenía 40 µl de las microesferas de estreptavidina lavadas. Se transfirió cada una de las reacciones n.º 1 y n.º 4 a un nuevo tubo de microcentrifugación de 1,5 ml que contenía 40 µl tampón de unión/lavado. Las reacciones se incubaron además a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación suave ocasional (3-4 minutos) con el fin de permitir la formación del complejo de biotina-estreptavidina. Las reacciones se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos en una centrifugadora de sobremesa y el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos de microcentrifugación de 1,5 ml. Cualquier ARNr antisentido biotinilado que quedó en los sobrenadantes se purificó usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO y se eluyó en 10 µl de agua exenta de RNasa. Se analizó toda la cantidad de cada muestra purificada mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, como se muestra en la Figura 3A.

- 50 **[0129]** En la Figura 3A, los Carriles 1 y 4 muestran el ARNr antisentido biotinilado al 10 % y al 20 % no tratado con microesferas, respectivamente. Los Carriles 2 y 3 muestran el ARNr antisentido biotinilado al 10 % tratado con 20 µl y 40 µl de microesferas, respectivamente. Los Carriles 5 y 6 muestran el ARNr antisentido biotinilado al 20 % tratado con 20 µl y 40 µl de microesferas, respectivamente. Claramente, hubo una cantidad importante de ARNr antisentido biotinilado tanto al 10 % como al 20 % restante independiente de bien 20 µl o 40 µl de microesferas usadas (Carriles 2, 3, 5 y 6). Sin embargo, la condición del 20 % (Carriles 5 y 6) fue claramente mejor que la condición del 10 % (Carriles 2 y 3). Así pues, pareció que al usar estos niveles inferiores de biotina-UTP para sintetizar el ARNr biotinilado, al menos parte del producto de ARNr antisentido sintetizado puede no contener suficientes moléculas de biotina para facilitar su extracción mediante las microesferas de estreptavidina.

- 60 **[0130]** Así pues, surgió la cuestión de si la biotina-UTP al 35 % usada en Ejemplo 2 era la concentración óptima para garantizar que todo el ARNr antisentido sintetizado contuviera suficientes moléculas de biotina para su posterior extracción con perlas de estreptavidina. Para responder a esta pregunta, se realizó el siguiente experimento para analizar los ARNr antisentido biotinilados creados según lo descrito en el Ejemplo 1 usando soluciones de biotina-UTP bien al 50 % o al 60 %. A continuación, se preparó la mezcla de 4 µl convencional de los respectivos ARNr 16S y 23S antisentido biotinilados sintetizados usando los niveles del 50 % y del 60 % de biotina-UTP. La mezcla de 4 µl

convencional del ARNr antisentido biotinilado al 35 % se incluyó como control.

[0131] Se prepararon tres conjuntos de dos reacciones, comprendiendo cada una 4 µl de mezcla de ARNr antisentido biotinilado bien al 35 % (reacción n.º 1 y n.º 2) o al 50 % (reacciones n.º 3 y n.º 4) o al 60 % (reacciones n.º 5 y n.º 6) en un volumen final de 20 µl en 1 x tampón de hibridación. Las reacciones se incubaron a 68 °C durante 5 minutos y después a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se transfirió cada una de las reacciones n.º 2, n.º 4 y n.º 6 a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml recién preparado que contenía 40 µl de las microesferas de estreptavidina lavadas, y cada una de las reacciones n.º 1, n.º 3 y n.º 5 se transfirió a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml recién preparado que contenía 40 µl de tampón de unión/lavado. Todas las reacciones se incubaron además a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación suave ocasional (3-4 minutos) con el fin de permitir la formación del complejo de biotina-estreptavidina. Las reacciones se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos en una centrifugadora de sobremesa y el sobrenadante se transfirió a nuevos tubos de microcentrifugación de 1,5 ml. Cualquier ARNr antisentido biotinilado que quedó en los sobrenadantes se purificó usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO y se eluyó en 13,5 µl de agua exenta de RNasa. Se analizó el 50 % de cada muestra purificada mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, como se muestra en la Figura 3B.

[0132] En la Figura 3B, los Carriles 1, 3 y 5 muestran el ARNr antisentido biotinilado que queda en ausencia de microesferas para las muestras de biotina-UTP al 35 %, 50 % y 60 %, respectivamente. Con la adición de 40 µl de microesferas de estreptavidina, no quedó ARNr antisentido biotinilado visible en ninguna de las reacciones correspondientes (Carriles 2, 4 y 6). No se pudo observar ninguna diferencia en el rendimiento de las muestras de ARNr antisentido biotinilado al 35 %, 50 % y 60 % tras el tratamiento con 40 µl de las microesferas de estreptavidina mediante el análisis en gel de agarosa.

[0133] Para determinar además si había una diferencia entre el uso del ARNr antisentido biotinilado al 35 %, 50 % y 60 %, la mitad restante de cada reacción se convirtió en ADNc de primera cadena en una reacción de la transcriptasa inversa convencional que contenía hexámeros aleatorios, y se purificó usando el kit de purificación de PCR Qiaquick según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). Después se usó una parte alícuota de 5 µl de cada una en reacciones de amplificación de PCR separadas que contenían cebadores específicos para las regiones 5' y 3' terminales de ARNr 23S (SEQ ID NO: 15: 5'-GACGTGCTAATCTGCGATAAGC, SEQ ID NO: 16: 5'-ATGGATTCAAGTTAATGATAGTGTGTCG, SEQ ID NO: 17: 5'-CTGAAAGCATCTAAGCACGAAACTTGC y SEQ ID NO: 18: 5'-CCTATCAACGTCGTCGCTTCAAC) y 16S (SEQ ID NO: 19: 5'-GCCTAACACATGCAAGTCGAAC, SEQ ID NO: 20: 5'-AGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCC, SEQ ID NO: 21: 5'-CGGAATCGCTAGTAATCGTGGAT y SEQ ID NO: 22: 5'-TCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTT) durante 20 ciclos de PCR. La amplificación por PCR es notablemente más sensible que el análisis en gel de agarosa con bromuro de etidio y, por lo tanto, debería demostrar mejor las diferencias entre las eficacias de eliminación del ARNr antisentido biotinilado al 35 %, 50 % y 60 % por la microesferas. Los resultados se muestran en la Figura 3C.

[0134] En la Figura 3C, los Carriles 1, 3 y 5 muestran los amplicones de PCR esperados para ARNr 23S 5' (Panel 1), ARNr 23S 3' (Panel 2), ARNr 16S 5' (Panel 3) y ARNr 16S 3' (Panel 4) con las mezclas de ARNr antisentido biotinilado al 35 %, 50 % y 60 %, respectivamente. Los Carriles 2, 4 y 6 muestran los productos de reacción de PCR correspondientes tras el uso de las microesferas de estreptavidina. Como se observa en el Carril 2 (Paneles 2 y 4), el arrastre residual de ARNr antisentido biotinilado al 35 % generó todavía algunos productos amplificados por PCR específicos que no fueron observados con los materiales de ARNr antisentido biotinilado al 50 % y 60 %. Los materiales de ARNr antisentido biotinilados tanto al 50 % como al 60 % se comportaron de manera similar y, por lo tanto, se seleccionó la condición del 50 %.

Ejemplo 4

50 Extracción del ARNr 23S y 16S de otra especie procariota (*Lactobacillus plantarum*) usando la mezcla de ARNr 23S y 16S antisentido biotinilado de *E. coli*

[0135] Para ensayar si la mezcla de ARNr antisentido biotinilado de *E. coli* era capaz de retirar las secuencias de ARNr 23S y 16S presentadas por un especie procariota relativamente diversa, se usó ARN total de *Lactobacillus plantarum*, que comparte aproximadamente el 80 % de homología con ARNr 16S y 23S de *E. coli*. En una reacción, se mezclaron 500 ng de ARN total de *L. plantarum* con 4 µl de la mezcla de ARNr antisentido biotinilado de *E. coli* descrita en el Ejemplo 2 anterior en 1 x tampón de hibridación en un volumen final de 20 µl. Una segunda reacción para servir como control contenía todo como la primera reacción menos la mezcla de ARNr antisentido biotinilado de *E. coli*. Las reacciones se incubaron a 68 °C durante 10 minutos y después a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se añadió cada reacción a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml nuevo que contenía 50 µl de microesferas recubiertas con estreptavidina lavadas y resuspendidas. Las reacciones se incubaron además a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación suave ocasional (3-4 minutos) con el fin de permitir la formación del complejo de biotina-estreptavidina. A continuación, se centrifugaron las reacciones a 12.000 rpm durante 5 minutos usando una centrifugadora de sobremesa para sedimentar las microesferas, se retiró el sobrenadante y se purificó el ARN usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO. Cada muestra de ARN se eluyó en 13,5 µl de agua exenta de RNasa y se analizó el 50 % de cada una por electroforesis en gel de agarosa

teñido con bromuro de etidio, como se muestra la Figura 4.

[0136] La Figura 4, Carril 1 en comparación con el Carril 2 muestra que las bandas de ARNr tanto 16S como 23S para *L. plantarum* ya no eran visibles tras la sustracción con la mezcla de ARNr antisentido biotinilado de *E. coli*, lo que indica que también se sustrajeron de manera eficaz a pesar de que las secuencias de ARNr solo eran un 80 % homólogas.

Ejemplo 5

10 Extracción de ARNr 23S, 16S y 5S de un intervalo de entradas de ARN total de *E. coli* usando la mezcla de ARNr antisentido biotinilado de *E. coli*

[0137] Se preparó una mezcla de ARNr antisentido biotinilado de *E. coli*, que, en este caso, contenía ARNr antisentido 23S, 16S y 5S, y se prepararon las siguientes reacciones de generación de muestras empobrecidas en ARNr y reacciones de control como se muestra en la Tabla 1, y se realizaron por duplicado en un volumen final de 20 µl en 1 x tampón de hibridación:

Tabla 1:

Reacción n.º	Entradas de ARN total de <i>E. coli</i>	Mezcla de ARNr antisentido biotinilado de <i>E. coli</i> (23S, 16S, 5S)	Microesferas recubiertas de estreptavidina
1,2	50 ng	2 µl	25 µl
3,4	100 ng	2 µl	25 µl
5,6	500 ng	4 µl	50 µl
7,8	1.000 ng	4 µl	50 µl
9,10	2.500 ng	8 µl	100 µl
11,12	5.000 ng	10 µl	125 µl
13,14	500 ng	-	50 µl

20 Las reacciones se incubaron a 68 °C durante 10 minutos y después a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió después cada reacción a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml recién preparado que contenía la cantidad apropiada de microesferas recubiertas de estreptavidina lavadas y resuspendidas. Las reacciones se incubaron además a temperatura ambiente durante 15 minutos con agitación suave ocasional (3-4 minutos) con el fin de permitir la formación del complejo de biotina-estreptavidina. A continuación, las reacciones se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos en una centrifugadora de sobremesa para sedimentar las microesferas y el sobrenadante se retiró y el ARN se purificó usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO. Se eluyó cada muestra de ARN en 13,5 µl de agua exenta de RNasa. A continuación, se convirtió toda la muestra de ARN de cada una en ADNc de primera cadena en una reacción de transcriptasa inversa convencional que contenía hexámeros aleatorios y se purificó usando el kit de purificación de PCR Qiaquick según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). Después se usó una parte alícuota de 5 µl de cada una muestra de ADNc de primera cadena en reacciones de amplificación de PCR separadas que contenían cebadores específicos para las regiones 5' terminales de ARNr 23S (SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16) y 16S (SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20), el ARNr 5S completo (SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23: 5'-TGCCCTGGCAGTTCCTACTCTC) y el ARNm de *ompA* (SEQ ID NO: 24: 5'-ACCAGGTTAACCGTATGTTGGCT y SEQ ID NO: 25: 5'-ACCGATGTTGTTGGTCCACTGGTA) durante 20 ciclos.

25 También se realizó una reacción de control menos el molde para cada par de cebadores. Se analizó una parte alícuota de 5 µl de cada reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 5.

[0138] En la Figura 5, los Carriles 1-12 muestran la excelente reducción de la cantidad de las secuencias de ARNr 23S (Panel A), 16S (Panel B) y 5S (Panel C) contenidas en las diferentes entradas de ARN total de *E. coli* por duplicado. Sin embargo, las transcripciones de ARNm de *ompA* (Panel D) todavía se podían detectar en todas las muestras y parecían estar intactas en comparación con las muestras no sustraídas correspondientes (Carriles 7 y 8 frente a los Carriles 13 y 14). Claramente, dicho método para la sustracción de ARNr parece ser aplicable en un amplio intervalo de entradas de ARN total con al menos un intervalo dinámico de 100 veces en este ejemplo.

Ejemplo 6

Sustracción de secuencias de ARNr 23S, 16S y 5S de *E. coli* fragmentado usando la mezcla de ARNr antisentido biotinilado de *E. coli*

[0139] Se fragmentaron diez microgramos de ARN total de *E. coli* en 1 x tampón de fragmentación (Ambion) a 65 °C durante 3 minutos. El ARN fragmentado se purificó usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO, se eluyó en 20 µl de agua exenta de RNasa, y se determinó la concentración midiendo la absorbancia a 260 nm con un espectrofotómetro. Se analizó una parte alícuota de 300 ng del ARN fragmentado comparado con el ARN intacto mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 6A.

[0140] En la Figura 6A, el Carril 1 muestra el ARN total de *E. coli* intacto, y el Carril 2 muestra el correspondiente ARN total fragmentado. Las bandas de ARNr 23S y 16S ARNr intacto ya no eran visibles en la muestra fragmentada contenida en el Carril 2.

10

[0141] A continuación, se aplicó sustracción de ARN ribosomal a una muestra de 2,5 µg de la muestra de ARN total de *E. coli* fragmentado en comparación con una cantidad similar de ARN total de *E. coli* intacto. Se agruparon las cuatro siguientes reacciones - las reacciones n.º 1 y n.º 2 contenían 2,5 µg de ARN total de *E. coli* intacto cada una y las reacciones n.º 3 y n.º 4 contenían 2,5 µg del ARN total de *E. coli* fragmentado cada una. A continuación, a cada una de las reacciones n.º 2 y n.º 4, se añadieron 8 µl de la mezcla de ARNr antisentido biotinilado de *E. coli*, y se ajustó el volumen final hasta 40 µl en 1 x tampón de hibridación. Se incubaron las reacciones a 68 °C durante 10 minutos y luego a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se transfirió cada reacción a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml que contenía 50 µl de microesferas de estreptavidina lavadas. Se incubaron además las reacciones a temperatura ambiente durante 15 minutos con mezclado suave ocasional (3-4 minutos) para permitir la formación del complejo de biotina-estreptavidina. Se centrifugaron las reacciones a 12.000 rpm durante 5 minutos sobre una centrifugadora de sobremesa y se transfirió cada sobrenadante a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml. Se purificó el ARN contenido en los sobrenadantes usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO y se eluyó en 13,5 µl de agua exenta de RNasa. Se analizó el cincuenta por ciento de cada muestra purificada mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y análisis de transferencia Northern como se muestra en la Figura 6B.

[0142] La Figura 6B, Panel 1 (Carriles 2 y 4) muestran el ARN restante tras la sustracción del ARNr. En el caso del ARN total intacto, es muy evidente que las bandas de ARNr 23S y 16S se han retirado (Carril 2 frente al Carril 1). Sin embargo, para el ARN total fragmentado, se produce una reducción global de la cantidad de ARN tras la sustracción como sería de esperar si también se sustrajeran los fragmentos de ARNr (Carril 4 frente a Carril 3). Los análisis de transferencia Northern para el ARNm de *ompA* (Panel 2) y ARNr 23S (Panel 3), 16S (Panel 4) y 5S (Panel 5) muestran claramente una sustracción similar y excelente de las diferentes secuencias de ARNr tanto en el ARN total intacto (Panel 3, 4, y 5 - Carril 2) como en el ARN total fragmentado (Panel 3, 4, y 5 - Carril 4) en comparación con las respectivas muestras no sustraídas (Panel 3, 4, y 5 - Carril 1 y 3). Al mismo tiempo, la cantidad de secuencia de ARNm de *ompA* parece permanecer invariable mediante el proceso de sustracción tanto para el ARN total intacto (Panel 2 - Carril 2 frente a Carril 1) como para el ARN total fragmentado (Panel 2 - Carril 4 frente a Carril 3).

[0143] Además, se convirtió el 50 % restante de cada muestra de ARN purificada en ADNc de primera cadena en una reacción de transcriptasa inversa convencional que contenía hexámeros aleatorios y se purificó usando el kit de purificación de PCR Qiaquick según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). Después se usó una parte alícuota de 5 µl de cada en reacciones de amplificación separadas por PCR que contenían cebadores específicos a las regiones 5' terminales de ARNr 23S (SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16) y 16S (SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20), el ARNr 5S completo (SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23) y el ARNm de *ompA* (SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25) durante 20 ciclos. Se analizó una parte alícuota de 5 µl de cada reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 6C.

[0144] La Figura 6C muestra que mediante análisis de RT-PCR, se produjo una excelente sustracción de ARNr 23S (Panel 2), 16S (Panel 3) y 5S (Panel 4) para el ARN total de *E. coli* tanto intacto (Carril 2 frente a Carril 1) como fragmentado (Carril 4 frente a Carril 3). Sin embargo, el ARNm de *ompA* se mantuvo igualmente en ambos casos antes y después de la sustracción (Panel 1).

Ejemplo 7

Hibridación específica de ARNr 28S y 18S humano, de ratón y de rata con ARNr 28S y 18S antisentido biotinilado humano, y su extracción con microesferas de estreptavidina

[0145] Se mezclaron muestras de ARN total intacto (500 ng) para ser humano (reacciones n.º 4 y n.º 5), ratón (reacciones n.º 7 y n.º 8) y rata (reacciones n.º 10 y n.º 11) bien con 2,1 µg de ARNr 28S antisentido biotinilado o con 1,0 µg de ARNr 18S antisentido biotinilado en 1 x tampón de hibridación en un volumen final de 20 µl. Se incluyeron muestras de ARN total intacto correspondientes (reacciones n.º 3, n.º 6 y n.º 9) y ARNr antisentido biotinilado solo (n.º 1 y n.º 2) como controles. Se incubaron todas las reacciones a 68 °C durante 10 minutos y después a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se purificó el ARN contenido en cada muestra usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO y se eluyó en 13,5 µl de agua exenta de RNasa. Se analizó toda la muestra para cada uno mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 7A.

[0146] La Figura 7A, Carriles 1 y 2 muestran el ARNr 23S y 18S antisentido biotinilado individual, respectivamente. Los Carriles 3, 6 y 9 muestran el ARN total intacto individual correspondiente al ser humano, ratón y rata, respectivamente. Los Carriles 4, 7 y 10 muestran las muestras de ARN total de ser humano, ratón y rata, respectivamente tras la hibridación con el ARNr 28S antisentido biotinilado. Claramente, la banda de ARNr 28S de las diferentes muestras de ARN total se ha hibridado a su ARNr antisentido complementario, pues ahora migra con un alto peso molecular superior, mientras que el ARNr 18S permanece invariables. Cuando luego se hibridaron muestras de ARN total diferentes al ARNr 18S antisentido biotinilado, claramente, la banda de ARNr 18S migró con un peso molecular superior (Carril 5, 8 y 11) y entonces, la banda de 28S permaneció invariable. A partir de estos resultados, es evidente que cada ARNr antisentido biotinilado se estaba hibridando específicamente a su diana complementaria, e igualmente bien para el ser humano, el ratón y la rata, que comparten al menos un 99 % de homología de secuencia.

[0147] Seguidamente, se preparó una mezcla de ARNr antisentido biotinilado para ser humano que comprendía aproximadamente 1,2 pmol de cada ARNr antisentido 28S y 18S en un volumen final de 4 µl de agua exenta de RNasa usando el ARN sintetizado *in vitro* preparado según lo descrito en el Ejemplo 1. Se mezcló cada ARN total intacto (2,5 µg) de ser humano (HeLa), ratón (3T3) y rata (NRK) con 8 µl de la solución de ARNr antisentido biotinilado en 1 x tampón de hibridación en un volumen final de 40 µl. También se incluyó una reacción de control que solo contenía 2,5 µg del correspondiente ARN total intacto. Se incubaron las reacciones a 68 °C durante 10 minutos, y después a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se transfirió cada reacción a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml que contenía 100 µl de microesferas de estreptavidina lavadas, respectivamente. Las reacciones se incubaron además a temperatura ambiente durante 15 minutos con mezclado suave ocasional (3-4 minutos) para permitir la formación del complejo de biotina-estreptavidina y luego a 37 °C durante 5 minutos. Se centrifugaron las reacciones a 14.000 rpm durante 5 minutos sobre una centrifugadora de sobremesa y se transfirió cada sobrenadante a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml. Se purificó el ARN contenido en los sobrenadantes usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO y se eluyó en 13,5 µl agua exenta de RNasa. Se analizó el cincuenta por ciento de cada muestra de ARN purificada mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 7B.

[0148] En la Figura 7B, los Carriles 1, 3 y 5 muestran el ARN total individual sin ninguna sustracción de ARNr 28S y 18S, mientras que los Carriles 2, 4, y 6 muestran el ARN restante correspondiente tras la sustracción del ARNr 28S y 18S. A raíz de estos resultados, es evidente que una mayoría de las bandas de ARNr 28S y 18S se retiró tras el procedimiento de sustracción descrito.

Ejemplo 8

Sustracción de ARNr 28S, 18S, 5,8S y 5S de diversas cantidades de ARN total humano intacto usando una mezcla de ARNr antisentido biotinilado humano

[0149] Se preparó una mezcla de ARNr antisentido biotinilado para ser humano que comprendía aproximadamente 1,2 pmol de cada o ARNr antisentido 28S, 18S, 5,8S y 5S en un volumen final de 4 µl de agua exenta de RNasa usando el ARN sintetizado *in vitro* preparado según lo descrito en el Ejemplo 1. Se prepararon reacciones de sustracción de ARN ribosomal que comprendían 100 ng (reacción n.º 1), 500 ng (reacción n.º 2) y 5,0 µg (reacción n.º 3) de ARN total de HeLa intacto con 2 µl, 4 µl y 8 µl de la mezcla de ARNr antisentido humano biotinilado, respectivamente en 1 x tampón de hibridación en un volumen final de 20 µl. También se incluyó una reacción de control (reacción n.º 4) con solo 500 ng del ARN total de HeLa intacto. Se incubaron las reacciones a 68 °C durante 10 minutos y después a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se transfirió cada reacción a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml que contenía 25 µl, 50 µl, 125 µl y 50 µl de microesferas de estreptavidina lavadas, respectivamente. Se incubaron además las reacciones a temperatura ambiente durante 15 minutos con mezclado suave ocasional (3-4 minutos) para permitir la formación del complejo de biotina-estreptavidina y luego a 37 °C durante 5 minutos. Se centrifugaron las reacciones a 14.000 rpm durante 5 minutos en una centrifugadora de sobremesa y se transfirió cada sobrenadante a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml. Se purificó el ARN contenido en los sobrenadantes usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO y se eluyó en 13,5 µl de agua exenta de RNasa. Seguidamente, se convirtió cada muestra de ARN purificada en ADNc de primera cadena en una reacción de transcriptasa inversa convencional que contenía hexámeros aleatorios, y se purificó usando el kit de purificación de PCR Qiaquick según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). Después, se usó una parte alícuota de 5 µl de cada en reacciones de amplificación separadas por PCR que contenían cebadores específicos de las regiones 5' y 3' terminales de ARNr 28S (SEQ ID NO: 26: 5'-CTCAGTAACGGCGAGTGAAC, SEQ ID NO: 27: 5'-GCCTCGATCAGAAGGACTTG, SEQ ID NO: 28: 5'-TACCACAGGGA TAACTGGCT y SEQ ID NO: 29: 5'-TAGGAAGAGCCGACATCGAA) y 18S (SEQ ID NO: 30: 5'- CCTACCTGGTTGATCCTGCC, SEQ ID NO: 31: 5'-CCAAGTAGGAGAGGAGCGAG, SEQ. ID. NO. 32: 5'-CCCAGTAAGTGC GGGTCATA y SEQ ID NO: 33: 5'-TCACTAAACCATCCAATCGGTAGTA), el ARNr 5,8S completo (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 34: 5'-GATCCTTCCGCAGGT TCACCTAC), el ARNr 5S completo (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 35: 5'-AAGCCTACAGCACCCGGTATTC) y el ARNm de GAPDH 5' (SEQ ID NO: 36: 5'-TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT y SEQ ID NO: 37: 5'-ACCAAATCCGTTG ACTCCGACCTT) durante 20 ciclos. Se incluyó una reacción de control para cada par de cebadores menos el molde. Se analizó una parte alícuota de 5

µl de cada reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 8.

[0150] En la Figura 8, los Carriles 1, 2 y 3 muestran los resultados de RT-PCR para ARNr 28S (Panel A), ARNr 18S (Panel B), ARNr 5,8S (Panel C), ARNr 5S (Panel D) y ARNm de GAPDH (Panel E) para las entradas de 100 ng, 500 ng y 5,0 µg de ARN total sustraído con la mezcla de ARNr antisentido humano biotinilado, respectivamente. El Carril 4 muestra la PCR para la entrada de 500 ng de ARN total no sustraído. A raíz de los resultados, es evidente que hay una sustracción excelente en un amplio intervalo de entradas de ARN total para las diferentes secuencias de ARN ribosomal usando la mezcla de ARNr antisentido biotinilado (Carriles 1, 2 y 3 frente al Carril 4).

10

Ejemplo 9

Sustracción de secuencias de ARNr humano presentadas por varios niveles de ARN total humano fragmentado

15

[0151] Se fragmentó ARN total intacto de HeLa en 1 x tampón de fragmentación (Ambion) durante 1, 2 y 3 minutos. Se purificaron las muestras de ARN usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO, se eluyeron agua exenta de RNasa y se determinó la concentración a una absorbancia de 260 nm usando un espectrofotómetro.

[0152] Se prepararon reacciones por duplicado que comprendían bien 2,5 µg de muestras de ARN total intacto (reacciones n.º y n.º 2) o fragmentado (reacciones n.º 3, n.º 4, n.º 5, n.º 6, n.º 7 y n.º 8) en 1 x tampón de hibridación. A una de cada reacción duplicada (n.º 2, n.º 4, n.º 6 y n.º 8), se añadieron 8 µl de la mezcla de ARNr antisentido humano biotinilado, y se ajustó el volumen final para cada reacción hasta 40 µl. Se incubaron las reacciones a 68 °C durante 10 minutos y después a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se transfirió cada reacción a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml que contenía 100 µl de microesferas de estreptavidina lavadas. Se incubaron además las reacciones a temperatura ambiente durante 15 minutos con mezclado suave ocasional (3-4 minutos) para permitir la formación del complejo de biotina-estreptavidina y luego a 37 °C durante 5 minutos. Se centrifugaron las reacciones a 14.000 rpm durante 5 minutos en una centrifugadora de sobremesa y se transfirió cada sobrenadante a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml. Se purificó el ARN contenido en los sobrenadantes usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO y se eluyó en 13,5 µl de agua exenta de RNasa. Se analizó el cincuenta por ciento de cada muestra de ARN purificada mediante electroforesis en gel teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 9A.

[0153] La Figura 9A, Carriles 4, 6 y 8, que contenía el ARN total fragmentado y el ARNr antisentido biotinilado muestran una reducción significativa de la cantidad de ARN como resultado de la sustracción en comparación con los respectivos controles (Carriles 3, 5 y 7). En el Carril 2 en comparación con el Carril 1 con el ARN total intacto, las bandas de ARNr de longitud completa ya no eran visibles.

[0154] Seguidamente, se convirtió el 50 % restante de cada muestra de ARN purificada en ADNc de primera cadena en una reacción de transcriptasa inversa convencional que contenía hexámeros aleatorios, y se purificó usando el kit de purificación de PCR Qiaquick según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). Después, se usó una parte alícuota de 5 µl de cada reacción de amplificación separadas por PCR que contenían cebadores específicos de las regiones 5' terminales de ARNr 28S (SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27) y 18S (SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31), el ARNr 5,8S completo (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 34), el ARNr 5S completo (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 35) y ARNm de GAPDH 5' (SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 37) durante 20 ciclos. También se realizó una reacción de control menos el molde para cada par de cebadores. Se analizó una parte alícuota de 5 µl de cada reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en Figura 9B.

[0155] En la Figura 9B, los Carriles 2, 4, 6 y 8 muestran los resultados de la PCR para ARNr 28S (Panel 1), ARNr 18S (Panel 2), ARNr 5,8S (Panel 3), ARNr 5S (Panel 4) y ARNm de GAPDH (Panel 5) para el ARN total intacto y fragmentado (1, 2 y 3 minutos), respectivamente tras la sustracción. Las reacciones de control sin sustracción correspondientes se muestran en los Carriles 1, 3, 5 y 7. A raíz de los resultados, es evidente que hay una excelente sustracción en un amplio intervalo de entradas de ARN total fragmentado similar al ARN total intacto para las diferentes secuencias de ARN ribosomal usando la mezcla de ARNr antisentido biotinilado.

55

Ejemplo 10

Comparación de la sustracción de ARNr de *E. coli* usando el método de la presente invención y el método MICROBExpress™

60

[0156] Se adquirió un kit que usa secuencias de oligonucleótidos ARNr conservadas (23S y 16S) para sustraer el ARNr correspondiente de las entradas de 2 µg-10 µg de ARN total procarionta en Ambion para la comparación con los procedimientos ilustrativos en estos ejemplos. Primero se fragmentó una parte alícuota de 15 µg del ARN total de *E. coli* de control intacto suministrado en el kit MICROBExpress™ en 1 x tampón de fragmentación (Ambion) a 65 °C

65

durante 2 minutos, se purificó mediante el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO, se eluyó con agua exenta de RNasa, y se determinó la concentración a una absorbancia de 260 nm usando un espectrofotómetro. A continuación, se usó una parte alícuota igual (2,5 µg) del ARN total de *E. coli* intacto o fragmentado en las reacciones de sustracción siguiendo bien el método ilustrativo descrito en el Ejemplo 9 ("Método ilustrativo") para las muestras de ARN apropiadas o el método MICROBExpress™ exactamente según lo descrito por el fabricante (Ambion). Las reacciones de control que representan ausencia de sustracción del ARNr se incluyeron para ambos métodos. Luego, se purificó cada muestra de ARN por precipitación en EtOH como se describe para el procedimiento MICROBExpress™ y se volvió a suspender en 12 µl de agua exenta de RNasa. Se analizó el cincuenta por ciento de cada muestra de ARN purificada mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y transferencia Northern como se muestra en la Figura 10A.

[0157] En la Figura 10A, los Carriles 1, 2 y 3, 4 muestran la sustracción de ARNr relativa del ARN total intacto y fragmentado usando el método ilustrativo y el método MICROBExpress™ para el ARNr 23S (Panel 2), ARNr 16S (Panel 3) y ARNr 5S (Panel 4). Claramente, para las muestras de ARN total tanto intacto como fragmentado, las diferentes secuencias de ARNr se sustrajeron significativamente mejor usando el Método ilustrativo de la invención (Método ilustrativo - Carriles 2 y 4) en comparación con el método MICROBExpress (Panel de MICROBExpress™ - Carriles 2 y 4). Parece que incluso el ARN intacto de control suministrado con el MICROBExpress™ contiene un nivel de secuencias de ARNr fragmentado que claramente no se retiraron mediante el método MicroBExpress (Panel de MICROBExpress™ - Carril 2) pero que claramente sí se retiraron usando el Método ilustrativo descrito en el presente documento (Método ilustrativo, Panel - Carril 2). Además, el Panel 1 muestra que la secuencia de ARNm de *ompA* permanece invariable antes y después de la sustracción para ambos métodos.

[0158] Seguidamente, se convirtió el 50 % restante de cada muestra de ARN purificada en ADNc de primera cadena en una reacción de transcriptasa inversa convencional que contenía hexámeros aleatorios, y se purificó usando el kit de purificación de PCR Qiaquick según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). Después, se usó una parte alícuota de 5 µl de cada en reacciones de amplificación separadas por PCR que contenían cebadores específicos de la región 5' terminal de ARNr 23S (SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16) y 16S (SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20), el ARNr 5S completo (SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 23) y ARNm de *ompA* (SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25) durante 20 ciclos. Se analizó una parte alícuota de 5 µl de cada reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio mostrada en Figura 10B.

[0159] En la Figura 10B, los Carriles 2 y 4 muestran los resultados de la PCR para el ARNr 23S (Panel 2), ARNr 16S (Panel 3), ARNr 5S (Panel 4) y ARNm de *ompA* (Panel 1) para el ARN total de *E. coli* intacto y fragmentado, respectivamente tras la sustracción usando el Método ilustrativo y el método MICROBExpress™. Las reacciones de control sin sustracción correspondientes se muestran en los Carriles 1 y 3. A raíz de los resultados, es evidente que hay una excelente sustracción de las diferentes secuencias de ARNr presentadas por las muestras de ARN total tanto intacto como fragmentado usando el Método ilustrativo (Panel del Método ilustrativo) en comparación con el método MICROBExpress™ (Panel de MicroExpress). Sin embargo, en ambos casos el ARNm de *ompA* se mantuvo de manera similar.

Ejemplo 11

Comparación de la sustracción de ARNr humano usando un Método ilustrativo frente al método de purificación de ARNm OLIGOTEX poly A+

[0160] Se adquirió un kit que usa oligonucleótido dT para aislar ARNm de ARN total eucariota en Qiagen para compararlo con el Método ilustrativo descrito en Ejemplo 9 anterior. Cuando se usó ARN fragmentado, primero se fragmentó el ARN en 1 x tampón de fragmentación (Ambion) a 65 °C durante 2 minutos. Se purificó el ARN intacto o purificado usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO, se eluyó con agua exenta de RNasa y se determinó la concentración a una absorbancia de 260 nm usando un espectrofotómetro. Entonces, se usó una parte alícuota (2,5 µg) de ARN total de *E. coli* bien intacto o fragmentado en reacciones de sustracción del ARNr usando el Método ilustrativo para las muestras de ARN apropiadas o el método de purificación de ARNm Oligotex poly A+ exactamente según lo descrito por el fabricante (Qiagen). Las reacciones de control que representan ausencia de sustracción del ARNr se incluyeron para ambos métodos. Entonces, se purificó cada muestra de ARN mediante precipitación en etanol y se volvió a suspender en 12 µl de agua exenta de RNasa. Se analizó el cincuenta por ciento de cada muestra de ARN purificada mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 11A.

[0161] En la Figura 11A, los Carriles 1, 2 y 3, 4 muestran la extracción relativa de ARNr para el ARN total tanto intacto como fragmentado usando el Método ilustrativo y el método de purificación de ARNm OLIGOTEX poly A+. Claramente, para las muestras de ARN total tanto intacto como fragmentado, las diferentes secuencias de ARNr se retiraron visiblemente usando el Método ilustrativo (Panel 1 - Carriles 2 y 4) y el método OLIGOTEX (Panel 2 - Carriles 2 y 4) en comparación con los respectivos controles (Panel 1 - Carriles 1 y 3 y Panel 2 - Carriles 1 y 3). Además, parece que quedó muy poco ARNm visible tras el método OLIGOTEX y todos los tipos de moléculas de ARN pequeñas (ARNt, ARNm etc.) también parecen haberse eliminado (Panel 2 - Carriles 2 y 4).

[0162] Seguidamente, se convirtió el 50 % restante de cada muestra de ARN purificada en ADNc de primera cadena en una reacción de transcriptasa inversa convencional que contenía hexámeros aleatorios, y se purificó usando el kit de purificación de PCR Qiaquick según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). Después, se usó una parte alícuota de 5 µl de cada en reacciones de amplificación separadas por PCR que contenían cebadores

5 específicos de las regiones 5' y 3' terminales de ARNr 28S (SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29) y 18S (SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33), el ARNr 5,8S completo (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 34) y el ARNr 5S completo (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 35) durante 20 ciclos. Se analizó una parte alícuota de 5 µl de cada reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en Figura 11B.

10 **[0163]** En la Figura 11B, los Carriles 2 y 4 muestran los resultados de PCR para el ARNr 28S (Paneles 1 y 2), ARNr 18S (Panel 3 y 4), ARNr 5,8S (Panel 5) y ARNr 5S (Panel 6) para el ARN total de HeLa intacto y fragmentado, respectivamente permitiendo la sustracción del ARNr usando el Método ilustrativo y el método OLIGOTEX. Las reacciones de control sin sustracción correspondientes se muestran en los Carriles 1 y 3. A raíz de los resultados, es

15 evidente que hay una excelente sustracción global de las diferentes secuencias de ARNr presentadas por las muestras de ARN total tanto intacto como fragmentado usando el Método ilustrativo (Panel del Método ilustrativo) y el método OLIGOTEX (Panel de OLIGOTEX). De hecho, el Método ilustrativo parece ser algo mejor que el método OLIGOTEX para las secuencias de ARNr tanto 28S como 18S (Paneles 1-4), mientras que para las secuencias de ARNr 5,8S y 5S, el método OLIGOTEX parece ser ligeramente mejor (Panel E y F, respectivamente).

20 **[0164]** Además, se usaron cebadores de PCR específicos de las regiones 5' y 3' terminales de ARNm de GAPDH (SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38: 5'-CACAAAGAGGAAGAGAGAGA CCCTCA y SEQ ID NO: 39: 5'-TTGATGGTACATGACAAGGTGCGG) y de PGK1 (SEQ ID NO: 40: 5'-GAATCACCGACCTCTCTCCC, SEQ. ID. NO. 41: 5'-CGACTCTCATAAC-GACCCGC, SEQ ID NO: 42: 5'-CCAGAGGTGACCACTTTCAA y SEQ ID NO: 43: 5'-ATGTGGAACAGAGCCTTCCTC) en la PCR (GAPDH: 22 ciclos y PGK1: 26 ciclos) con los moldes de ADNc

25 cebados aleatorios, y se analizó una parte alícuota de 5 µl de cada reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en Figura 11C. A partir de los resultados de PCR es muy evidente que hay una reducción de la cantidad de ARNm tanto de GAPDH (Paneles 1 y 2) como de PGK 1 (Paneles 3 y 4) en el método OLIGOTEX para el ARN total tanto intacto como fragmentado (Panel de OLIGOTEX, Carriles 2 y 4, respectivamente) en comparación con las muestras sin sustracción de ARNr (Panel de OLIGOTEX, Carriles 1 y 3, respectivamente), usando el Método ilustrativo (Panel del Método ilustrativo, Carriles 2 y 4). Además, el Método ilustrativo no mostró ninguna pérdida significativa en las mismas secuencias de ARNm para el ARN total tanto intacto como fragmentado (Panel del Método ilustrativo, Carriles 2 y 4, respectivamente) en comparación con las

30 muestras sin sustracción de ARNr (Panel del Método ilustrativo, Carriles 1 y 3, respectivamente). Además, las regiones 5' tanto de GAPDH (Panel 1, Carril 4) como de PGK1 (Panel 3, Carril 4) para la muestra de ARN total fragmentado se perdieron con el método OLIGOTEX (Panel de OLIGOTEX), ya que la cola poly A ya no estaba presente, pero no para el Método ilustrativo (Panel del Método ilustrativo, Carril 4 (Panel 1 y 3), respectivamente). En conjunto, estos resultados demuestran un claro beneficio del Método ilustrativo en comparación con el método OLIGOTEX.

40 **[0165]** Seguidamente, los cebadores de PCR específicos de las transcripciones de Poly A- y bimórficas (SEQ ID NO:44:

45 5'-CACGTTTTCTCAGCTGCTTG y SEQ ID NO: 45: 5'-TTCACCTTTTCATC CAAGGC para la transcripción n.º 1, SEQ ID NO: 46: 5'-GTGTGGTGGTGTGTGCCTAT y SEQ ID NO: 47: 5'-GAGACATGGTCTTGCTCCGT para la transcripción n.º 3, SEQ ID NO: 48: 5'-TAGCTCAGTGGTAGAGCGCA y SEQ ID NO: 49: 5'-GATTTGCTCAGCA GCACGTA para la transcripción n.º 15 y SEQ ID NO: 50: 5'-CACTTGGGGACACTTTCCAG y SEQ ID NO: 51: 5'-TCAGGGAAAATGAGCCAATC para la transcripción bimórfica n.º 5 (transcripciones Poly A- expresadas en células de HeLa, Qingfa Wu *et. al.* (julio de 2008). Se usaron PLoS One (www seguido de "plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0002803")) en PCR con los moldes de ADNc cebados

50 aleatorios (36, 22, 28 y 38 ciclos, respectivamente), y se analizó una parte alícuota de 5 µl de cada reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 11D. A raíz de los resultados de la PCR, es muy evidente que las transcripciones poly A- y biomórficas ya no estaban presentes tras el método de purificación de ARNm OLIGOTEX para el ARN total intacto y fragmentado (Panel de OLIGOTEX, Carriles 2 y 4, respectivamente) mientras que estas secuencias se mantuvieron tras la sustracción de ARNr usando el Método ilustrativo para el ARN total tanto intacto como fragmentado (Panel del Método

55 ilustrativo, Carril 2 y 4, respectivamente). Estos resultados señalan otro beneficio claro de los métodos de sustracción del ARNr descritos en la presente solicitud para mantener un espectro más amplio de transcripciones que permitan una mejor representación del contenido celular.

60 Ejemplo 12

Comparación de la sustracción del ARNr humano usando un Método ilustrativo de la presente invención frente al kit eucariota RiboMinus™ para ARN-Seq

65

[0166] Se adquirió un kit (kit eucariota RiboMinus™ para ARN-Seq) que usa dos secuencias de oligonucleótido conservadas para cada ARNr 28S, 18S, 5,8S y 5S para sustraer el correspondiente ARNr de las entradas de 2 µg - 10 µg de ARN total eucariota en InVitrogen (Burlington, ON) para compararlo con un método ilustrativo de la presente invención. Al usar ARN total fragmentado, primero se fragmentó el ARN total inicial en 1 x tampón de fragmentación (Ambion, Austin, TX) a 65 °C durante 2 minutos. Se purificó el ARN total intacto o fragmentado usando el procedimiento de limpieza de ARN ZYMO, se eluyó CON agua exenta de RNasa y se determinó la concentración a una absorbancia de 260 nm usando un espectrofotómetro. A continuación, se usó una parte alícuota igual (2,5 µg) de ARN total de HeLa bien intacto o fragmentado en reacciones de sustracción del ARNr usando el Método ilustrativo para las muestras de ARN apropiadas o el kit eucariota RiboMinus™ para el método de ARN-Seq exactamente según lo descrito por el fabricante (InVitrogen). Para ambos métodos, se incluyeron reacciones de control que representaban la ausencia de sustracción del ARNr. Luego, se purificó cada muestra de ARN mediante precipitación en etanol y se volvió a suspender en 12 µl de agua exenta de RNasa. Se analizó el cincuenta por ciento de cada muestra de ARN purificada mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 12A.

[0167] En la Figura 12A, los Carriles 1,2 y 3, 4 muestran la extracción relativa de ARNr para el ARN total tanto intacto como fragmentado usando el Método ilustrativo y el kit eucariota RiboMinus™ para el método de ARN-Seq. Claramente, para las muestras de ARN total tanto intacto como fragmentado, las diferentes secuencias de ARNr se retiraron visiblemente usando el Método ilustrativo (Método ilustrativo-Carriles 2 y 4), mientras que para el kit eucariota RiboMinus™ para el método de ARN-Seq, solo el ARN total intacto mostró la reducción de las secuencias de ARNr (método RiboMinus™ - Carriles 2) en comparación con las respectivas muestras sin sustracción del ARNr (Método ilustrativo - Carriles 1 y 3 y método RiboMinus™ - Carril 1). Parecía que solo hubo una reducción mínima de la muestra de ARN total fragmentado con sustracción de ARNr usando el kit eucariota RiboMinus™ para ARN-Seq a juzgar por la intensidad de la tinción de bromuro de etidio (método RiboMinus™ - Carril 4) en comparación con la muestra sin sustracción de ARNr (método RiboMinus™ - Carril 3), probablemente debido al hecho de que esos fragmentos ribosomales que no están representados por las secuencias de oligonucleótidos de consenso del kit no serían, por tanto, retirados.

[0168] Seguidamente, se convirtió el 50 % restante de cada muestra de ARN purificada en ADNc de primera cadena en una reacción de transcriptasa inversa convencional que contenía hexámeros aleatorios, y se purificó usando el kit de purificación de PCR Qiaquick según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). Después, se usó una parte alícuota de 5 µl de cada en reacciones de amplificación por PCR separadas que contenían cebadores específicos de las regiones 5' y 3' terminales de ARNr 28S (SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29) y 18S (SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 33), el ARNr 5,8S completo (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 34) y el ARNr 5S completo (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 35) durante 20 ciclos. Se analizó una parte alícuota de 5 µl de cada reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en la Figura 12B.

[0169] En la Figura 12B, los Carriles 2 y 4 muestran los resultados de la PCR para el ARNr 28S (Paneles 1 y 2), ARNr 18S (Panel 3 y 4), ARNr 5,8S (Panel 5) y ARNr 5S (Panel 6) para el ARN total de HeLa intacto y fragmentado, respectivamente tras la sustracción del ARNr usando el Método ilustrativo y el kit eucariota RiboMinus™ para el método ARN-Seq. Las reacciones de control sin sustracción correspondientes se muestran en los Carriles 1 y 3. A raíz de los resultados, es evidente que hay una excelente sustracción global de las secuencias de ARNr 28S (Paneles 1 y 2) y ARNr 18S (Panel 3 y 4) contenidas en las muestras de ARN total tanto intacto como fragmentado usando el Método ilustrativo (Panel del Método ilustrativo), pero no el kit eucariota RiboMinus™ para el método de ARN-Seq (Panel de RiboMinus™). Sin embargo, ambos métodos mostraron una extracción similar de las secuencias de ARNr 5,8S (Panel 5) y 5S (Panel 6).

[0170] Además, se usaron los cebadores de PCR específicos de las regiones 5' y 3' terminales de ARNm de GAPDH (SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38: 5'-CACAAGAGGAAGAGAGAGA CCCTCA y SEQ ID NO: 39: 5'-TTGATGGTACATGACAAG- GTGCGG) en la PCR (GAPDH: 24 ciclos) con los moldes de ADNc cebados aleatorios, y se analizó una parte alícuota de 5 µl de cada reacción de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio como se muestra en Figura 12C. A partir de los resultados de PCR, es muy evidente que hay una reducción obvia de la cantidad de ARNm para GAPDH (Paneles 1 y 2) para ambos métodos con el ARN total de HeLa bien intacto o fragmentado (Carriles 2 y 4) en comparación con las muestras sin sustracción de ARNr (Carriles 1 y 3), respectivamente. En conjunto, estos resultados demuestran un claro beneficio del Método ilustrativo en la extracción de las secuencias de ARNr 18S y 28S independientemente del estado (intacto o fragmentado) de la muestra de ARN total en comparación con el kit eucariota RiboMinus™ para el método de ARN-Seq. De hecho, incluso para la muestra de ARN total intacto, el Método ilustrativo parecía ser más eficaz para retirar las secuencias de ARNr 8S y 28S, probablemente debido, al menos en parte, al hecho de que hay invariablemente cierto grado de ARNr fragmentado en incluso la muestra de ARN total más intacto que no se retiraría mediante el método RiboMinus™. De hecho, el kit eucariota RiboMinus™ para el método de ARN-Seq establece claramente que este método requiere el uso de solo muestras de ARN total de alta calidad.

[0171] Seguidamente, se analizaron las muestras de ADNc cebadas aleatorias mediante QPCR de la siguiente

manera: se diluyeron las muestras de ADNc con factor de dilución de 2 a 10 en función de la cantidad inicial. A continuación, se añadió 1 µl de cada dilución a 25 µl de reacción qPCR que comprendía 1 x FS PreMix E (GREEN), 12,5 pmol de cebadores de PCR directo e inverso y 1 unidad de mezcla enzimática FS. Las condiciones de ciclado fueron de 98 °C durante 2 minutos, seguido de 40-45 ciclos a 98 °C durante 5 segundos, 60 °C durante 15 segundos y 72 °C durante 30 segundos usando el iGyler Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA). Se usaron los siguientes pares de cebadores de QPCR para las secuencias de ARNr 18S (SEQ. ID. NO. 30: SEQ. ID. NO. 31, SEQ. ID. NO. 52: 5'-CTTAGAGGGACAAGTGGCG, SEQ. ID. NO. 53: 5'-GTAGGGTAGGCACACGCTGA, SEQ. ID. NO. 54: 5'-GAAACTTAAAGGAATTGACGGAAG, SEQ. ID. NO. 55: 5'-GAATCGAGAAAGAGCTATCAATC, SEQ. ID. NO. 56: 5'-CGATTGGATGGTTTAGTGAGG y SEQ. ID. NO. 57: 5'-CCTTGTTACGACTTTTACTTCCTCTAG), 28S (SEQ. ID. NO. 58: 5'-GCCGAAACGATCTCAACCTA, SEQ. ID. NO. 59: 5'-CGCCAGTTCTGCTTACCAAA, SEQ. ID. NO. 60: 5'-CGGACCAAGGAGTCTAACA, SEQ. ID. NO. 61: 5'-CAGGCATAGTTCACCATCTTTTCG, SEQ. ID. NO. 62: 5'-GGAGAGGGTGTAATCTCGC, SEQ. ID. NO. 63: 5'-GCCGACTTCCCTTACCTACA, SEQ. ID. NO. 64: 5'-GTGTCAGAAAAGTTACCACAGG, SEQ. ID. NO. 65: 5'-GGCGAATTCTGCTTCACAATGATAG, SEQ. ID. NO. 66: 5'-GGAGTAACCTACTCTCTTAAGGT, SEQ. ID. NO. 67: 5'-TTGGTGTTGCTTCGCTGGAT, SEQ. ID. NO. 68: 5'-GTGAACAGCAGTTGAACATGG y SEQ. ID. NO. 69: 5'-CTTCACAAAAGAAAAGAGAACTCTCCC), 5,8S (SEQ. ID. NO. 70: 5'-CGACTCTTAGCGGTGGATCA y SEQ. ID. NO. 71: 5'-AAGCGACGCTCAGACAG) y 5S (SEQ. ID. NO. 5 y SEQ. ID. NO. 72: 5'-AAAGCCTACAGCACCCGGTATTC).

[0172] Los resultados de QPCR se muestran en la siguiente Tabla 2:

20

TABLA 2

Conjuntos de cebadores de QPCR	Porcentaje de reducción del ARN ribosomal			
	Método ilustrativo		Método RiboMinus™	
	ARN total de HeLa intacto (2,5 µg)	ARN total de HeLa fragmentado (2,5 µg)	ARN total de HeLa intacto (2,5 µg)	ARN total de HeLa fragmentado (2,5 µg)
1BS.5' (nt 100 - nt 247)	> 99,9 %	> 99,9 %	93,30 %	50 %
18S.3' (nt 1.544 - nt 1.663)	> 99,9 %	> 99,9 %	97,10 %	81,10 %
18S.F3/R3 (nt 1.288 - nt 1.417)	> 99,9 %	> 99,9 %	96,40 %	34 %
18S.F4/R4 (nt 1.818 - nt 1.937)	> 99,9 %	> 99,9 %	97,40 %	88,30 %
28S 3,5K (nt 1.748 - nt 1.867)	> 99,9 %	> 99,9 %	85,60 %	0 %
28S n.º 2 (nt 1.324 - nt 1.530)	> 99,9 %	99,60 %	92,80 %	90,50 %
28S.F5/R5 (nt 4.341 - nt 4.456)	> 99,9 %	> 99,9 %	93,80 %	78,20 %
28S.5' n.º 2 (nt 2.740 - nt 2.843)	> 99,9 %	> 99,9 %	92,80 %	29,30 %
28S.F3/R3 (nt 2.401 - nt 2.630)	> 99,9 %	> 99,9 %	83,50 %	0 %
28S.F41R4 (nt 3.732 - nt 3.851)	> 99,9 %	> 99,9 %	82,30 %	0 %
5,8S (nt 1 - nt 157)	> 99,9 %	> 99,9 %	99,40 %	99,60 %
5S (nt 1- nt 121)	96,80 %	97,80 %	91,80 %	88,90 %

[0173] Claramente, a partir de los resultados de la Tabla 2, el método ilustrativo fue significativamente más eficaz en la extracción de todas las secuencias de ARN ribosomal independientemente de los conjuntos de cebadores usados para las secuencias de ARNr tanto 28S como 18S con ARN total bien intacto o fragmentado. Sin embargo, para el método RiboMinus™ con el ARN fragmentado, hubo poca o ninguna sustracción ribosomal en función de la ubicación de los diferentes juegos de cebadores para las secuencias de ARNr tanto 28S como 18S.

Ejemplo 13**Reducción significativa del fondo de ARNr y mejora de las lecturas cartografiadas de manera única usando el método de extracción del ARNr desvelado en el presente documento en comparación con el método RiboMinus™**

[0174] Se trataron ARN de referencia humanos universales (UHRR) intactos y parcialmente fragmentados (2 x 2,5 µg de cada) bien con el método que se describe en el Ejemplo 9 anterior o con el kit eucariota RiboMinus™ para el método de extracción de ARNr ARN-Seq. Se agruparon las respectivas muestras empobrecidas en ARNr y, para cada una, se prepararon bibliotecas de ARN-Seq Illumina por triplicado usando ARN empobrecido en ARNr del equivalente de 1 µg de ARN total. Se agruparon las réplicas de las respectivas bibliotecas de ARN-Seq y se realizó la secuenciación usando el secuenciador de nueva generación de GAIIx Illumina® con lecturas de 36 nt. Los datos se analizaron usando el módulo de ARN Pipeline Eland de Illumina y el software Casava, así como el software TopHat para cartografiar las uniones de corte y empalme (véase <http://tophat.cbcb.umd.edu/index.html>). Los resultados de la cartografía mostraron que el fondo de ARNr se redujo significativamente mediante los métodos descritos en el Ejemplo 9 en comparación con el método RiboMinus™ (véase la siguiente Tabla 3). Además, las secuencias cartografiadas de forma única que no incluían secuencias de ARNr se aumentaron significativamente (Tabla 3) en la muestra tratada con los métodos como se describe en el Ejemplo 9 en comparación con RiboMinus™. Además, para las muestras fragmentadas, los métodos del Ejemplo 9 superaron considerablemente el kit competitivo, tanto en términos de reducción del fondo de ARNr como en la mejora de las secuencias cartografiadas de forma única (Tabla 3).

TABLA 3

Muestra de ARN total	Método de extracción de ARNr	% de fondo de ARNr	% de secuencias cartografiadas de forma única
UHRR intacto	Ejemplo 9	1,4 %	58,1 %
UHRR intacto	RiboMinus™	18,4 %	51,4 %
UHRR fragmentado	Ejemplo 9	2,1 %	59,6 %
UHRR fragmentado	RiboMinus™	63,3 %	24,6 %

La Tabla 3 muestra que los métodos de extracción de ARNr descritos en Ejemplo 9 reducen significativamente el fondo de ARNr y mejoran los resultados de ARN-Seq. Se trató ARN de referencia humano universal (UHRR) intacto y parcialmente fragmentado bien con el método del Ejemplo 9 o con el kit comercial (método RiboMinus™). A continuación se usaron los ARN empobrecidos en ARNr para preparar librerías de ARN-Seq que se secuenciaron en un secuenciador de GAIIx Illumina®.

Ejemplo 14**Ejemplo profético de extracción de ARNr vegetal**

[0175] Las plantas, en general, comprenden secuencias de ARNr correspondientes a orígenes cloroplástico, mitocondrial y nuclear. Para el origen cloroplástico, el ARNr comprende secuencias 23S, 16S, 5S y 4,5S (por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*; n.º de acceso AP000423.1); para el origen mitocondrial, el ARNr comprende secuencias 18S y 5S (por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*; n.º de acceso Y08501.2) y para el origen nuclear, el ARNr comprende secuencias 25/26S, 17/18S y 5,8S (por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*; AC006837.16). Se podrían sintetizar moldes de PCR correspondientes a cada secuencia de ARNr vegetal (en su totalidad o en parte), así como las respectivas secuencias de ARNr biotinilado como se describe en el Ejemplo 1 para *E. coli*.

[0176] A continuación, se podría mezclar el respectivo antisentido biotinilado ya sea en una sola proporción o en varias proporciones diferentes con el fin de retirar de manera eficaz todas las secuencias de ARNr de los diferentes tejidos vegetales (por ejemplo, hoja, raíz, tallo etc.) donde se sabe que las representaciones de los diferentes ARNr están presentes en cantidades variables que dependen sobre todo del contenido del cloroplasto. Se contempla que las diversas secuencias de ARNr vegetal se retirarán eficazmente de manera similar a la descrita para secuencias de ARNr humanas y de *E. coli* como en los Ejemplos 5-12 del presente documento.

[0177] Diversas modificaciones de la invención, además de las descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior. Dichas modificaciones también están destinadas a pertenecer al alcance de las reivindicaciones adjuntas.

En los siguientes párrafos, se destacan las realizaciones preferidas.

Realizaciones

[0178]

1. Un método de generación de una muestra empobrecida en ARNr de una muestra inicial que comprende:

5 a) proporcionar:

i) una muestra inicial que comprende moléculas de ARN derivadas de al menos un organismo o una especie eucariota, en la que dichas moléculas de ARN comprenden moléculas de ARNr y moléculas de ARN distinto del ARNr;

10 ii) una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido complementarias a esencialmente la totalidad de la secuencia de al menos una molécula de ARNr seleccionada del grupo que consiste en: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, y moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, en la que dichas moléculas de ARNr antisentido comprenden marcadores de afinidad en una proporción de al menos un marcador de afinidad por cada 10 nucleobases de dichas moléculas de ARNr antisentido; y

15 iii) una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad;

b) poner en contacto dicha muestra inicial con dicha composición que comprende las moléculas de ARNr antisentido en condiciones que permitan que al menos parte de dichas moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad y al menos parte de dichas moléculas de ARNr formen híbridos de ARNr bicatenarios, generando así una muestra tratada;

20 c) poner en contacto dicha muestra tratada con dicha matriz de unión en condiciones que permitan que la proporción de dichas moléculas de unión a marcadores de afinidad con respecto a dichos marcadores de afinidad presentes en las moléculas de ARNr antisentido usadas en la etapa b) sea de al menos de 8 con respecto a 1, de modo que al menos una parte de dichos híbridos de ARNr bicatenarios se una a dicha matriz de unión y se retire de dicha muestra tratada, generando así una muestra empobrecida en ARNr, en la que dicha muestra empobrecida en ARNr comprende al menos una parte de dichas moléculas de ARN distinto del ARNr presentes en dicha muestra inicial y está esencialmente empobrecida o exenta de moléculas de ARNr que presentan las secuencias mostradas por dicha al menos una molécula de ARNr.

30 2. El método del Párrafo 1, en el que dicho al menos un organismo o especie eucariota se selecciona del grupo que consiste en un organismo o especie humana, animal, vegetal o fúngica.

35 3. El método del Párrafo 2, en el que dichas moléculas de ARN de dicha muestra inicial y dicha al menos una molécula de ARNr se obtienen del mismo organismo o especie eucariota.

4. El método del Párrafo 1, en el que dichas moléculas de ARN proceden de un primer organismo o especie eucariota, y en el que dicha al menos una molécula de ARNr procede de un segundo organismo o especie eucariota.

40 5. El método del Párrafo 4, en el que uno de dicho primer o segundo organismo o especie es *Homo sapiens*, y en el que el otro de dicho primer o segundo organismo o especie es un mamífero no humano.

45 6. El método de cualquiera de los Párrafos 1-5, en el que dichos marcadores de afinidad se asocian con al menos una nucleobase seleccionada del grupo que consiste en: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y uracilo (U); y en el que dichos marcadores de afinidad están presentes en dichas moléculas de ARNr antisentido en una proporción de al menos un marcador de afinidad por cada 8 nucleobases de dichas moléculas de ARNr antisentido; y/o en el que la proporción de dichas moléculas de unión a marcadores de afinidad con respecto a dichos marcadores de afinidad durante dicho contacto de la etapa b) es de al menos 10 con respecto a 1.

50 7. El método de cualquiera de los Párrafos 1-6, en el que el número de las moléculas que presentan la secuencia de dicha al menos una molécula de ARNr de dicha muestra empobrecida en ARNr está empobrecido en un 99,0 % en comparación con el número de moléculas que presentan la secuencia de dicha al menos una molécula de ARNr de dicha muestra inicial.

55 8. El método de cualquiera de los Párrafos 1-7, en el que dicha al menos una molécula de ARNr incluye bien tanto dichas moléculas de ARNr 28S como dichas moléculas de ARNr 18S, o tanto dichas moléculas de ARNr 25S o 26S y dichas moléculas de ARNr 16S.

60 9. El método de cualquiera de los Párrafos 1-8, en el que dicha al menos una molécula de ARNr incluye además tanto dichas moléculas de ARNr 5,8S como dichas moléculas de ARNr 5S, y/o en el que dicha al menos una molécula de ARNr incluye además dichas moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S como 16S, y/o en el que dicha al menos una molécula de ARNr se selecciona además del grupo que consiste en moléculas de ARNr cloroplástico eucariota 16S, 23S, 4,5S y 5S.

65 10. El método de cualquiera de los Párrafos 1-9, en el que dicha muestra inicial que comprende moléculas de ARN

derivadas de un organismo o especie eucariota comprende además moléculas de ARN derivadas de al menos una especie procariota, en el que dichas moléculas de ARN procariota comprenden moléculas de ARNr y moléculas de ARN distinto del ARNr, y en el que dicho método comprende:

- 5 proporcionar una composición que comprende además moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad complementarias a esencialmente la totalidad de la secuencia de al menos una molécula de ARNr seleccionada del grupo que consiste en las moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S; y
 poner en contacto dicha muestra inicial con dicha composición que comprende además moléculas de ARNr antisentido procariota marcadas por afinidad en condiciones que permitan que al menos parte de las moléculas
 10 de ARNr antisentido marcadas por afinidad y al menos parte de dichas moléculas de ARNr procariota formen híbridos de ARNr bicatenarios, generando así una muestra tratada; y
 poner en contacto dicha muestra tratada con dicha matriz de unión de la etapa c) en condiciones en las que dicha muestra empobrecida en ARNr también comprende al menos una parte de dichas moléculas de ARN procariota distinto de ARNr presentes en dicha muestra inicial y está esencialmente empobrecida o exenta de
 15 moléculas de ARNr procariota que presentan secuencias presentadas por dicha al menos una molécula de ARNr procariota.
11. El método de cualquiera de los Párrafos 1-10, en el que al menos una parte de dichas moléculas de ARN de dicha muestra inicial están fragmentadas.
 20
12. El método de cualquiera de los Párrafos 1-11, en el que dichas moléculas de ARN de dicha muestra inicial comprenden ARN extraído, aislado o purificado de una fuente seleccionada del grupo que consiste en: una muestra de tejido, una muestra celular, una muestra embebida en parafina, una muestra fijada con formalina y embebida en parafina (FFPE), y una muestra medioambiental que consiste en suelo, agua, medio de crecimiento, o un fluido
 25 biológico o una muestra biológica.
13. El método de cualquiera de los Párrafos 1-12, en el que dichas condiciones de la etapa b) comprenden incubar en presencia de un tampón de hibridación a una temperatura de aproximadamente 60-75 °C durante un primer período de tiempo e incubar a aproximadamente la temperatura ambiente durante un segundo período de tiempo, y
 30 en el que dicha matriz de unión de la etapa c) comprende una pluralidad de partículas individuales o una columna de unión, y en el que dichas condiciones de la etapa c) incluyen al menos el mezclado ocasional a temperatura ambiente y/o a 35-60 °C.
14. El método de cualquiera de los Párrafos 1-13, en el que el marcador de afinidad comprende biotina.
 35
15. Una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido complementarias a esencialmente la totalidad de la secuencia presentada por al menos una molécula de ARNr seleccionada del grupo que consiste en moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, moléculas de ARNr cloroplástico eucariota 16S, 23S, 4,5S y 5S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y
 40 5S, en la que dichas moléculas de ARNr antisentido comprenden marcadores de afinidad en una proporción de al menos un marcador de afinidad por cada 10 nucleobases de dichas moléculas de ARNr antisentido, o en la que dichas moléculas de ARNr antisentido comprenden marcadores de afinidad en una proporción de al menos un marcador de afinidad por cada 8 nucleobases de dichas moléculas de ARNr antisentido.
- 45 16. La composición del Párrafo 15, en la que dichas moléculas de ARNr antisentido comprenden múltiples moléculas de ARNr antisentido diferentes complementarias a moléculas de ARNr seleccionadas de los grupos que consisten en: al menos cuatro moléculas de ARNr seleccionadas entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S; dos moléculas de ARNr que consisten en moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S; cuatro moléculas de ARNr que consisten en moléculas de ARNr cloroplástico eucariota 16S, 23S, 4,5S y 5S; y
 50 tres moléculas de ARNr que consisten en moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S.
17. La composición de cualquiera de los Párrafos 15 o 16 que comprende además moléculas de ARN derivadas de al menos un organismo o una especie, en la que dichas moléculas de ARN comprenden moléculas de ARNr y moléculas de ARN distinto del ARNr, en la que al menos parte de dichas moléculas de ARNr antisentido marcadas
 55 por afinidad de dicha composición están presentes como híbridos bicatenarios con al menos parte de dichas moléculas de ARNr.
18. La composición del Párrafo 17, en el que dichas moléculas de ARN comprenden moléculas de ARN derivadas de múltiples organismos o especies.
 60
19. La composición del Párrafo 17 o 18, que comprende además una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad, en la que la proporción de dichas moléculas de unión a marcadores de afinidad con respecto a dichos marcadores de afinidad presentes en las moléculas de ARNr antisentido usadas en la etapa b) es de al menos 8 con respecto a 1, o en la que la proporción de dichas moléculas de unión a marcadores de afinidad
 65 con respecto a dichos marcadores de afinidad presentes en las moléculas de ARNr antisentido usadas en la etapa

b) es de al menos 10 con respecto a 1.

20. Una composición que comprende una muestra empobrecida en ARNr que comprende moléculas de ARN distinto del ARNr, en la que, en comparación con una muestra que no está empobrecida en ARNr, dicha composición está sustancialmente exenta de moléculas de ARNr que presentan la secuencia de al menos una molécula de ARNr seleccionada del grupo que consiste en: moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S, moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S, moléculas de ARNr cloroplástico eucariota 16S, 23S, 4,5S y 5S, y moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

[0179]

15 <110> Epicentre Technologies Corporation Sooknanan, Roy R.
 <120> Métodos, composiciones y kits de generación de muestras empobrecidas en ARNr o de aislamiento del ARNr de las muestras
 <130> EPICE-30968/WO-1/ORD
 20 <150> US 61/234.044
 <151> 14-08-2009
 <160> 72
 25 <170> Patent In versión 3.5
 <210> 1
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 35 <400> 1
 cctacctacc tgggtgatcc 20
 <210> 2
 40 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Sintética
 <400> 2
 aattctaata cgactcacta tagggagaga tcctccgca gggtcaccta c 51
 50 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Sintética
 <400> 3
 60 cgactcttag cgggtgatca ctc 23
 <210> 4
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

ES 2 573 277 T3

<220>
 <223> Sintética

5 <400> 4
 aattctaata cgactcacta tagggagaga tcctccgca gggtcaccta c 51

10 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintética

20 <400> 5
 gtctacggcc ataccacct gaa 23

25 <210> 6
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 6
 aattctaata cgactcacta tagggagaaa gcctacagca cccggattc 50

40 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética

50 <400> 7
 aagcgactaa gcgtacacgg tgga 24

55 <210> 8
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sintética

65 <400> 8
 aattctaata cgactcacta tagggagatt cctggaagca gggcattgtg 52

70 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> Sintética

80 <400> 9
 caacaaatgc cctgctcca ggaa 24

85 <210> 10
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 573 277 T3

<220>
 <223> Sintética

5 <400> 10
 aattctaata cgactcacta tagggagaca cggttcatta gtaccggta gct 53

10 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintética

20 <400> 11
 agagtttgat cctggctcag 20

25 <210> 12
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 12
 aattctaata cgactcacta tagggagagg aggtgatcca accgcaggtt 50

40 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética

50 <400> 13
 tgcctggcgg cagtagcgg gt 22

55 <210> 14
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sintética

65 <400> 14
 aattctaata cgactcacta tagggagatg cctggcagtt ccctactctc 50

70 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> Sintética

80 <400> 15
 gacgtgctaa tctgcgataa gc 22

85 <210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Sintética		
5	<400> 16	atggattcag ttaatgatag tgtgtcg	27
	<210> 17		
	<211> 27		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
15	<400> 17	ctgaaagcat ctaagcacga aactgc	27
	<210> 18		
	<211> 24		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
25	<400> 18	cctatcaacg tcgtcgtctt caac	24
	<210> 19		
30	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Sintética		
	<400> 19	gcctaacaca tgcaagtcca ac	22
40	<210> 20		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 20	agctaccggt tccagtagtt atcc	24
50	<210> 21		
	<211> 23		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
60	<400> 21	cggaatcgct agtaatcgtg gat	23
	<210> 22		
	<211> 24		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

ES 2 573 277 T3

	<220> <223> Sintética	
5	<400> 22 tcccgaaggt taagctacct actt	24
	<210> 23 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10		
	<220> <223> Sintética	
15	<400> 23 tgctggcag ttcctactc tc	22
	<210> 24 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20		
	<220> <223> Sintética	
25	<400> 24 accaggtaa cccgatggt ggct	24
	<210> 25 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30		
	<220> <223> Sintética	
35	<400> 25 accgatgtg ttgtccact ggta	24
	<210> 26 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40		
	<220> <223> Sintética	
45	<400> 26 ctcagtaacg gcgagtgaac	20
	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50		
	<220> <223> Sintética	
55	<400> 27 gcctcgatca gaaggacttg	20
	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60		
	<220> <223> Sintética	
65	<400> 27 gcctcgatca gaaggacttg	20
	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

	<220>		
	<223> Sintética		
5	<400> 28 taccacaggg ataactggct	20	
	<210> 29		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
15	<400> 29 taggaagagd cgacatcgaa	20	
	<210> 30		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
25	<400> 30 cctacctggt tgatcctgcc	20	
	<210> 31		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Sintética		
	<400> 31 ccaagtagga gaggagcgag	20	
40	<210> 32		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 32 cccagtaagt gcgggtcata	20	
50	<210> 33		
	<211> 25		
	<212> ADN		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
60	<400> 33 tcactaaacc atccaatcgg tagta	25	
	<210> 34		
	<211> 23		
65	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

	<220> <223> Sintética	
5	<400> 34 gatccttccg caggttcacc tac	23
10	<210> 35 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sintética	
20	<400> 35 aagcctacag caccggtat tc	22
25	<210> 36 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
35	<400> 36 tcgacagtca gccgcatctt ctt	24
40	<210> 37 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintética	
50	<400> 37 accaaatccg ttgactccga cctt 24	
55	<210> 38 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Sintética	
65	<400> 38 cacaagagga agagagagac cctca	25
70	<210> 39 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
75	<220> <223> Sintética	
80	<400> 39 ttgatgttac atgacaaggt gcgg	24
85	<210> 40 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

<220>
 <223> Sintética

 <400> 40
 5 gaatcaccga cctctctccc 20

 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética

 <400> 41
 15 cgactctcat aacgaccgcg 20

 <210> 42
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética

 <400> 42
 25 ccagaggtga ccacttcaa 20

 <210> 43
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética

 <400> 43
 35 atgtggaaca gagccttct c 21

 <210> 44
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética

 <400> 44
 45 cacgtttct cagctgcttg 20

 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética

 <400> 45
 55 ttcaccttt catccaaggc 20

 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Sintética		
5	<400> 46	gtgtggtggt gtgtgcctat	20
	<210> 47		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
15	<400> 47	gagacatggt cttgctccgt	20
	<210> 48		
	<211> 20		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sintética		
25	<400> 48	tagctcagtg gtagagcgca	20
	<210> 49		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> Sintética		
	<400> 49	gatttgctca gcagcacgta	20
40	<210> 50		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 50	cacttgggga cactttccag	20
50	<210> 51		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
55	<220>		
	<223> Sintética		
	<400> 51	tcagggaaaa tgagccaatc	20
60	<210> 52		
	<211> 19		
	<212> ADN		
65	<213> Secuencia artificial		

ES 2 573 277 T3

	<220> <223> Sintética	
5	<400> 52 cttagaggga caagtggcg	19
10	<210> 53 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sintética <400> 53 gtaggtagg cacacgctga	20
20	<210> 54 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Sintética <400> 54 gaaactaaa ggaattgacg gag	24
30	<210> 55 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética <400> 55 gaatcgagaa agagctatca atc	23
40	<210> 56 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintética <400> 56 cgattgatg gtttagtgag g	21
50	<210> 57 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sintética <400> 57 cctgttagc actttactt cctctag	27
60	<210> 58 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65		

<220>
 <223> Sintética

5 <400> 58
 gccgaaacga tctcaaccta 20

10 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintética

20 <400> 59
 cgccagttct gcttaccaaa 20

25 <210> 60
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

35 <400> 60
 cggaccaagg agtctaaca 19

40 <210> 61
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética

50 <400> 61
 caggcatagt tcaccatctt tcg 23

55 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Sintética

65 <400> 62
 ggagagggtg taaatctcgc 20

70 <210> 63
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> Sintética

80 <400> 63
 gccgactcc cttacctaca 20

85 <210> 64
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

	<220> <223> Sintética	
5	<400> 64 gtgtcagaaa agttaccaca gg	22
10	<210> 65 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sintética	
20	<400> 65 ggcgaattct gctcacaat gatag	25
25	<210> 66 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
35	<400> 66 gggagtaact atgactctct taaggt	26
40	<210> 67 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintética	
50	<400> 67 ttggctgtgg ttcgctgga t 21	
55	<210> 68 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Sintética	
65	<400> 68 gtgaacagca gttgaacatg g	21
70	<210> 69 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
75	<220> <223> Sintética	
80	<400> 69 cttcacaaag aaaagagaac tctccc	26
85	<210> 70 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	

ES 2 573 277 T3

<220>
<223> Sintética

5 <400> 70
cgactcttag cggatgatca 20

<210> 71
<211> 17
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

15 <400> 71
aagcgagct cagacag 17

<210> 72
<211> 23
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

25 <400> 72
aaagcctaca gcaccggta ttc 23

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende moléculas de ARNr antisentido, en la que dichas moléculas de ARNr antisentido comprenden múltiples moléculas de ARNr antisentido diferentes complementarias a sustancialmente la totalidad de las secuencias presentadas por moléculas de ARNr seleccionadas de los grupos que consisten en: al menos cuatro moléculas de ARNr seleccionadas entre moléculas de ARNr citoplasmático eucariota 25S, 26S, 28S, 18S, 5,8S y 5S; dos moléculas de ARNr que consisten en moléculas de ARNr mitocondrial eucariota 12S y 16S; cuatro moléculas de ARNr que consisten en moléculas de ARNr cloroplástico eucariota 16S, 23S, 4,5S y 5S; y tres moléculas de ARNr que consisten en moléculas de ARNr procariota 23S, 16S y 5S; donde dichas moléculas de ARNr antisentido comprenden marcadores de afinidad en una proporción de al menos un marcador de afinidad por cada 10 nucleobases de dichas moléculas de ARNr antisentido, o donde dichas moléculas de ARNr antisentido comprenden marcadores de afinidad en una proporción de al menos un marcador de afinidad por cada 8 nucleobases de dichas moléculas de ARNr antisentido.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde el marcador de afinidad comprende biotina.
3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende además moléculas de ARN derivadas de al menos un organismo o una especie, donde dichas moléculas de ARN comprenden moléculas de ARNr y moléculas de ARN distinto del ARNr, donde al menos parte de dichas moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad de dicha composición están presentes como híbridos bicatenarios con al menos parte de dichas moléculas de ARNr.
4. La composición de la reivindicación 3, que comprende además una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad, en la que la proporción de dichas moléculas de unión a marcadores de afinidad con respecto a dichos marcadores de afinidad presentes en las moléculas de ARNr antisentido es de al menos 8 a 1, o donde la proporción de dichas moléculas de unión a marcadores de afinidad con respecto a dichos marcadores de afinidad presentes en las moléculas de ARNr antisentido es de al menos 10 a 1.
5. Un método de generación de una muestra empobrecida en ARNr a partir de una muestra inicial que comprende:
- a) proporcionar:
 - i) una muestra inicial que comprende moléculas de ARN derivadas de al menos un organismo o una especie eucariota, donde dichas moléculas de ARN comprenden moléculas de ARNr y moléculas de ARN distinto del ARNr;
 - ii) una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y
 - iii) una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad;
 - b) poner en contacto dicha muestra inicial con dicha composición que comprende las moléculas de ARNr antisentido en condiciones que permiten que al menos parte de dichas moléculas de ARNr antisentido marcadas por afinidad y al menos parte de dichas moléculas de ARNr forman híbridos de ARNr bicatenarios, generando así una muestra tratada;
 - c) poner en contacto dicha muestra tratada con dicha matriz de unión en condiciones en las que la proporción de dichas moléculas de unión a marcadores de afinidad con respecto a dichos marcadores de afinidad presentes en las moléculas de ARNr antisentido usadas en la etapa b) es de al menos 8 a 1, de modo que al menos una parte de dichos híbridos de ARNr bicatenarios se une a dicha matriz de unión y se retiran de dicha muestra tratada, generando así una muestra empobrecida en ARNr, donde dicha muestra empobrecida en ARNr comprende al menos una parte de dichas moléculas de ARN distinto del ARNr presentes en dicha muestra inicial y está sustancialmente empobrecida o libre de moléculas de ARNr que presentan las secuencias mostradas por dicha al menos una molécula de ARNr.
6. El método de la reivindicación 5, donde dicho al menos un organismo o especie eucariota se selecciona del grupo que consiste en un organismo o especie humana, animal, vegetal o fúngica.
7. El método de la reivindicación 6, donde dichas moléculas de ARN de dicha muestra inicial y dicha al menos una molécula de ARNr se obtienen del mismo organismo o especie eucariota, o en el que dichas moléculas de ARN proceden de un primer organismo o especie eucariota, y en el que dicha al menos una molécula de ARNr procede de un segundo organismo o especie eucariota.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde dichos marcadores de afinidad se asocian con al menos una nucleobase seleccionada del grupo que consiste en: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y uracilo (U); y donde dichos marcadores de afinidad están presentes en dichas moléculas de ARNr antisentido en una proporción de al menos un marcador de afinidad por cada 8 nucleobases de dichas moléculas de ARNr antisentido; y/o en el que la proporción de dichas moléculas de unión a marcadores de afinidad con respecto a dichos marcadores

de afinidad durante dicho contacto de la etapa b) es de al menos 10 a 1.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-8, donde el número de moléculas que presentan la secuencia de dicha al menos una molécula de ARNr en dicha muestra empobrecida en ARNr está empobrecido en un 99,0 %
5 en comparación con el número de moléculas que presentan la secuencia de dicha al menos una molécula de ARNr de dicha muestra inicial.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-9, donde dichas moléculas de ARN en dicha muestra inicial comprenden ARN extraído, aislado o purificado de una fuente seleccionada del grupo que consiste en: una muestra
10 de tejido, una muestra celular, una muestra embebida en parafina, una muestra fijada con formalina y embebida en parafina (FFPE), y una muestra medioambiental que consiste en suelo, agua, medio de crecimiento, o un fluido biológico o una muestra biológica.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5-10, donde dichas condiciones de la etapa b) comprenden
15 incubar en presencia de un tampón de hibridación a una temperatura de aproximadamente 60-75 °C durante un primer período de tiempo e incubar a aproximadamente la temperatura ambiente durante un segundo período de tiempo, y donde dicha matriz de unión de la etapa c) comprende una pluralidad de partículas individuales o una columna de unión, y en el que dichas condiciones de la etapa c) incluyen al menos el mezclado ocasional a temperatura ambiente y/o a 35-60 °C.

20 12. Kit que comprende:

a) la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3; y
b) una matriz de unión que comprende moléculas de unión a marcadores de afinidad, donde la proporción de
25 dichas moléculas de unión a marcadores de afinidad con respecto a dichos marcadores de afinidad presentes en las moléculas de ARNr antisentido es de al menos 8 a 1, o donde la proporción de dichas moléculas de unión a marcadores de afinidad con respecto a dichos marcadores de afinidad presentes en las moléculas de ARNr antisentido es de al menos 10 a 1, y donde la matriz de unión comprende una pluralidad de partículas individuales seleccionadas entre nanopartículas, partículas magnéticas o una pluralidad de perlas tales como
30 perlas macroporosas;

donde el kit opcionalmente comprende además:

c) un tampón de hibridación;
35 d) una solución de lavado;
e) glucógeno;
f) acetato de sodio;
g) agua libre de RNAsa;
h) inhibidor de RNAsa;
40 i) una solución de resuspensión de la matriz de unión;
j) una muestra control que comprende ARN total de una muestra celular o tisular; y/o
k) un reactivo de purificación de ARN total.

FIGURA 1A

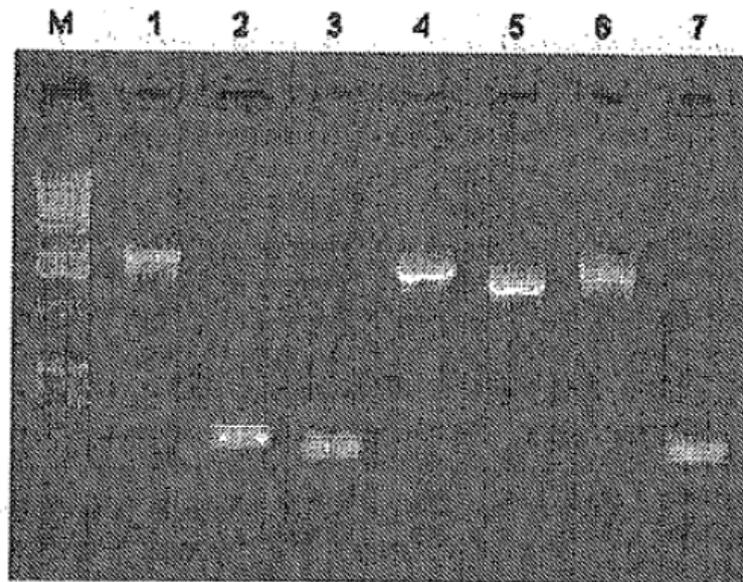


FIGURA 1B

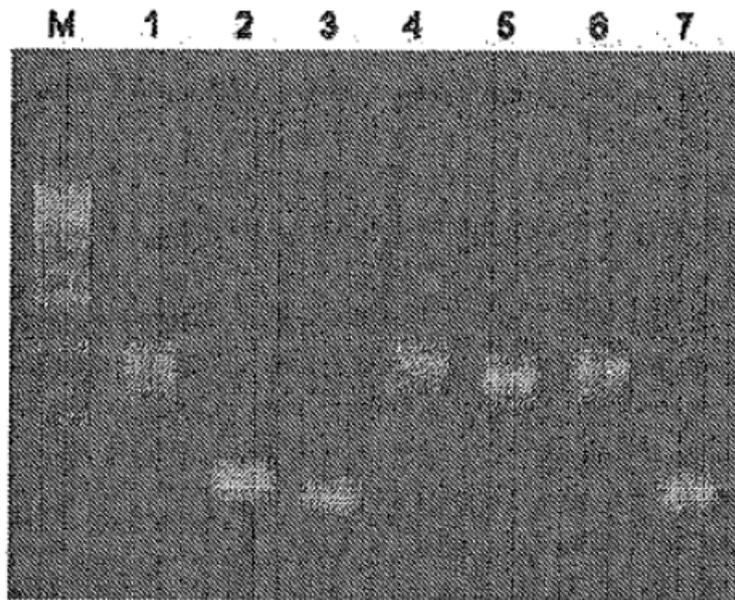


FIGURA 1C

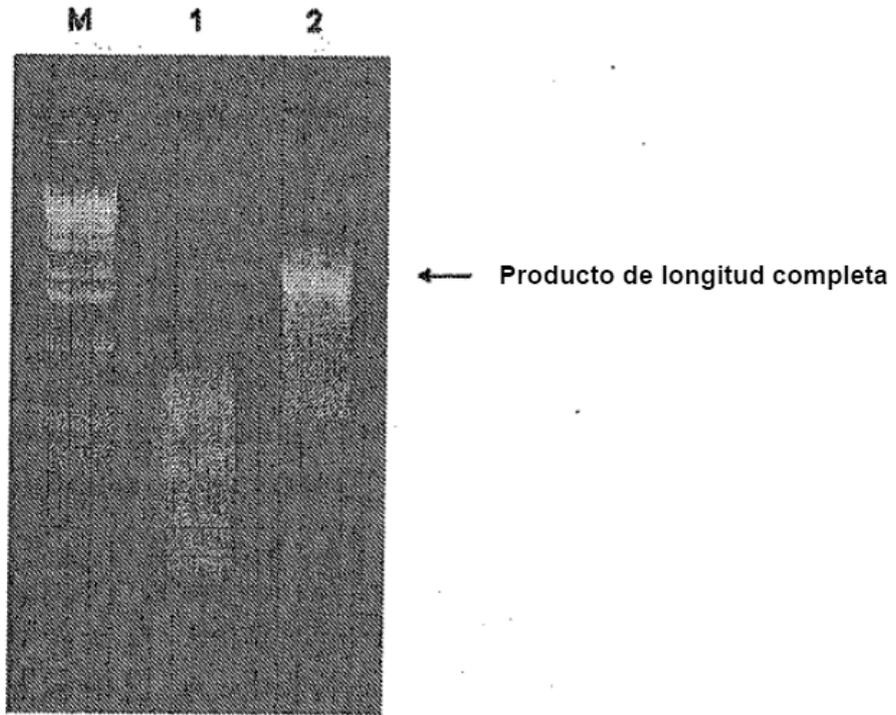


FIGURA 2A

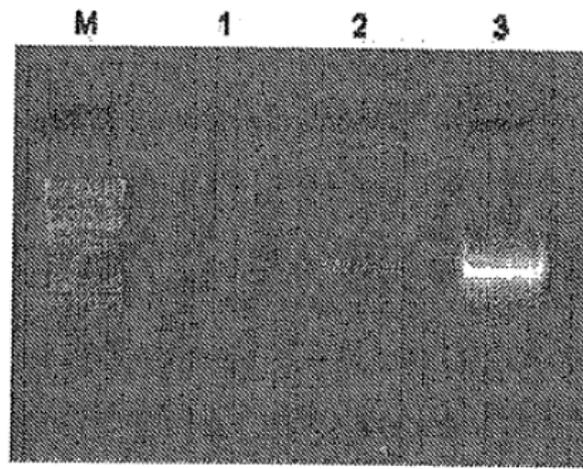


FIGURA 2B

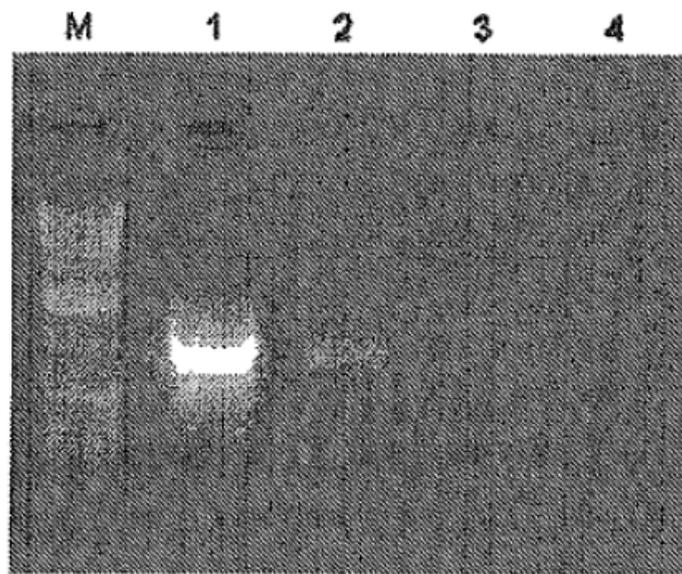


FIGURA 3A

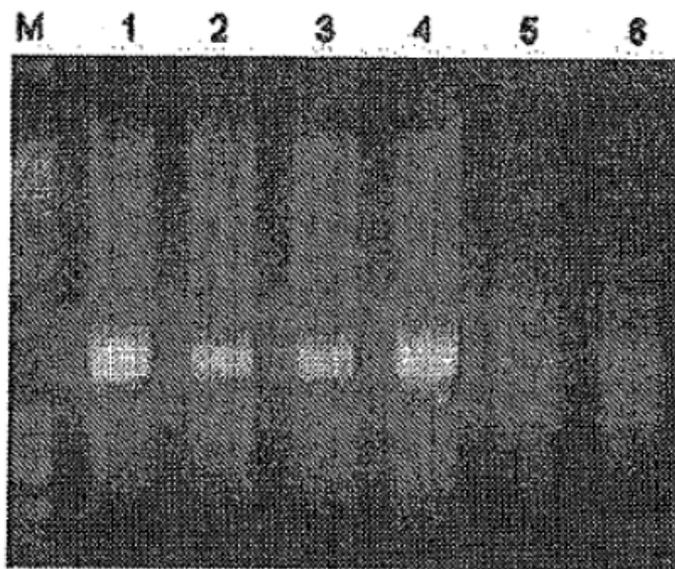


FIGURA 3B

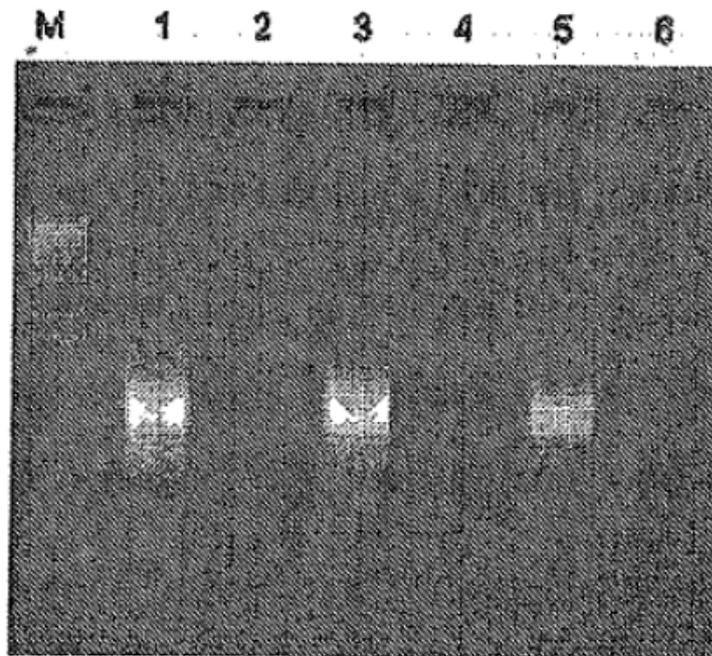


FIGURA 3C

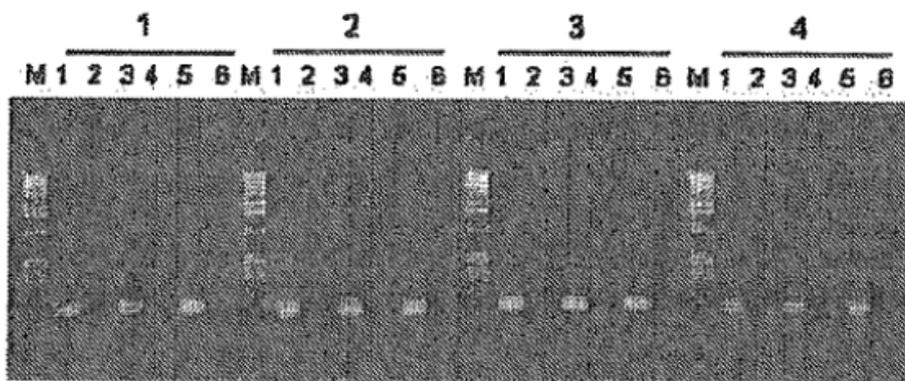


FIGURA 4

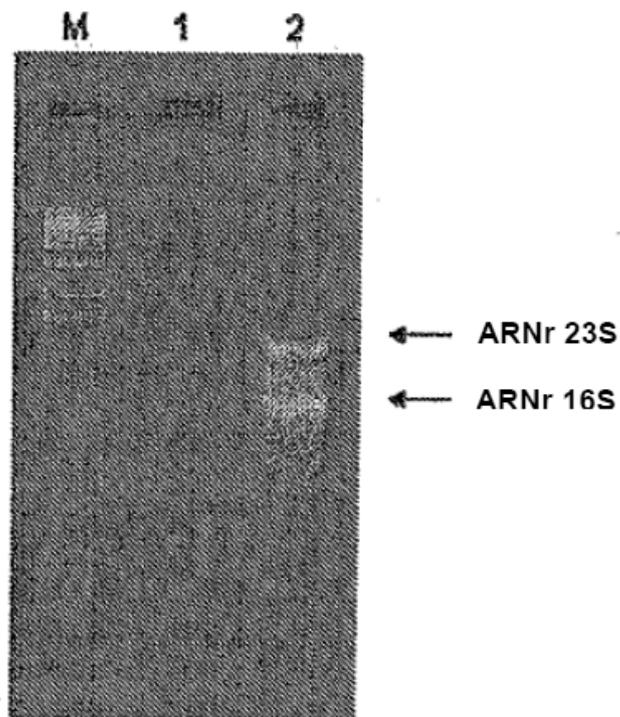


FIGURA 5

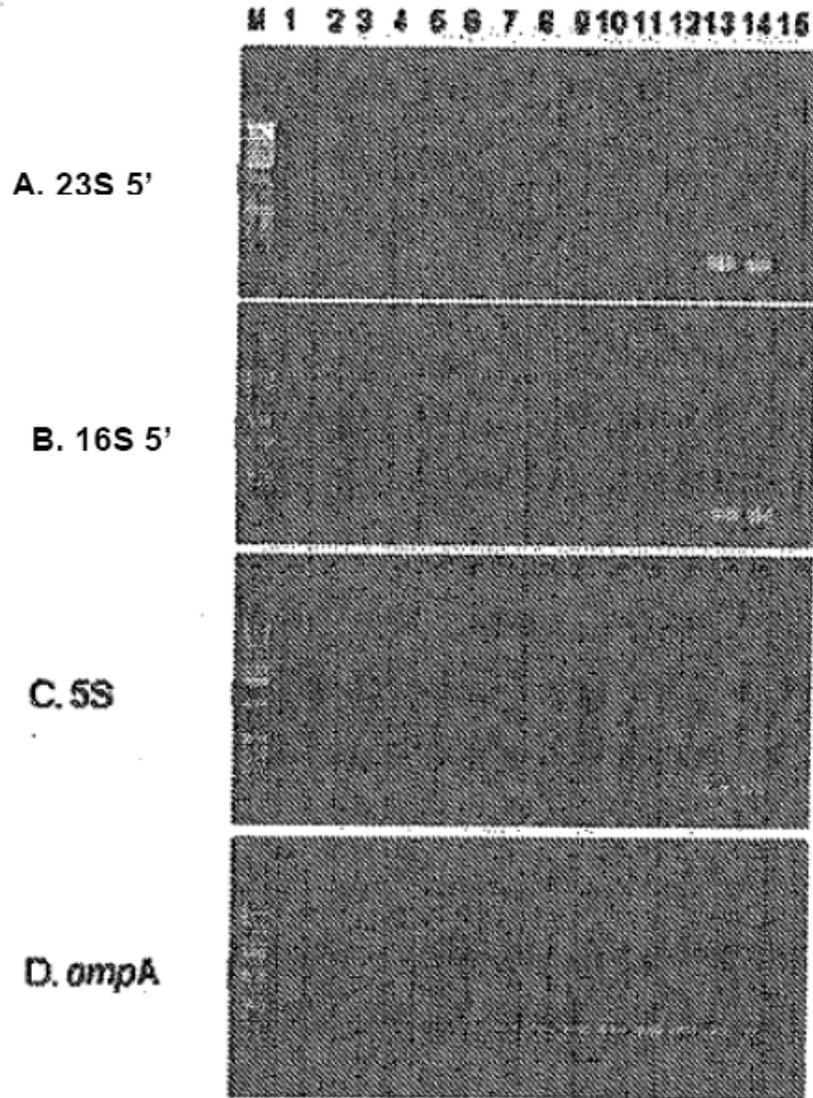


FIGURA 6A



FIGURA 6B

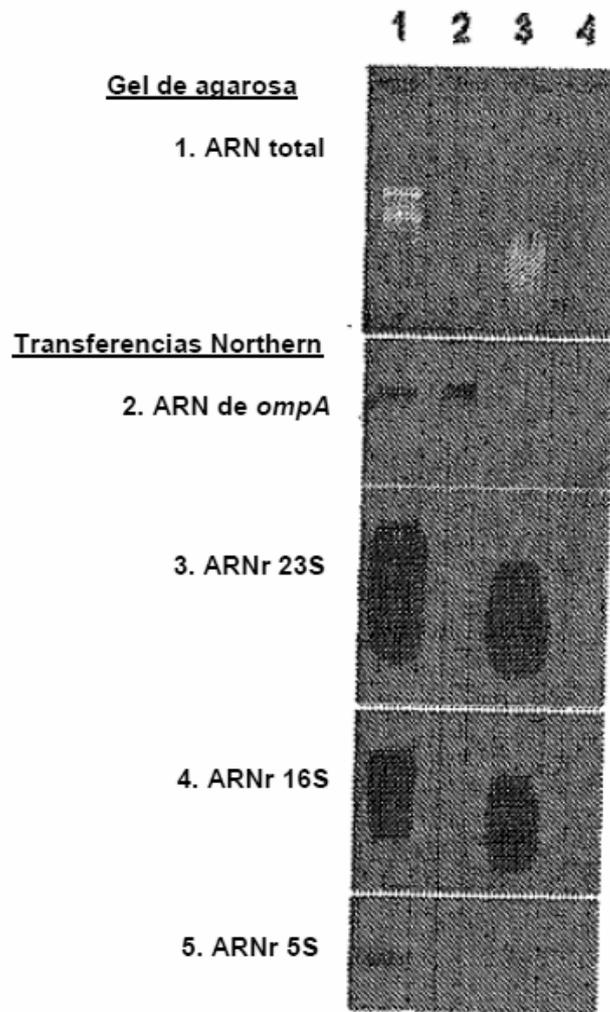


FIGURA 6C

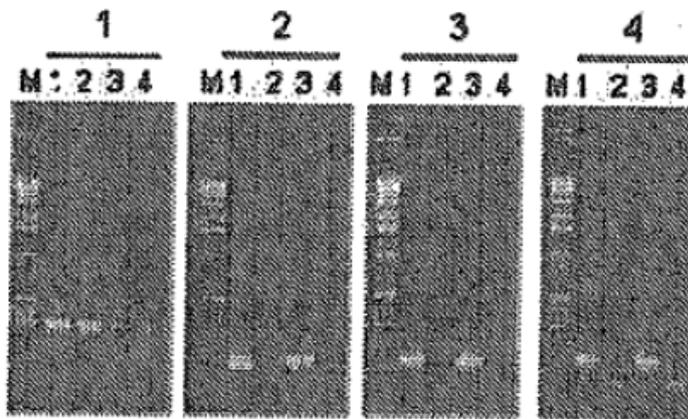


FIGURA 7A

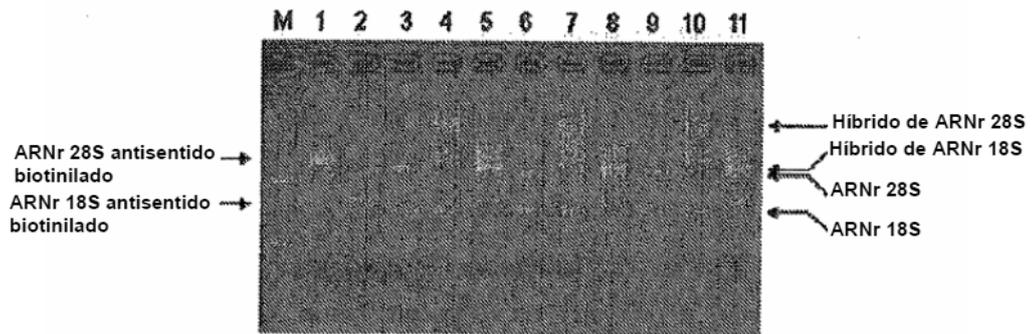


FIGURA 7B

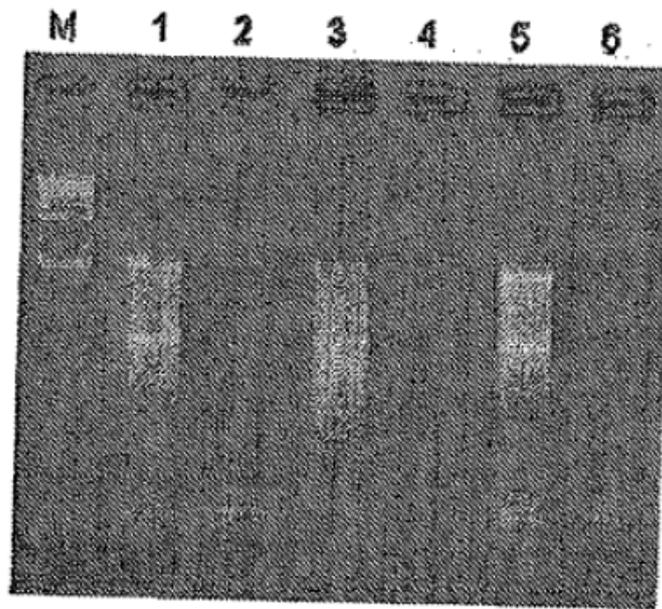


FIGURA 8

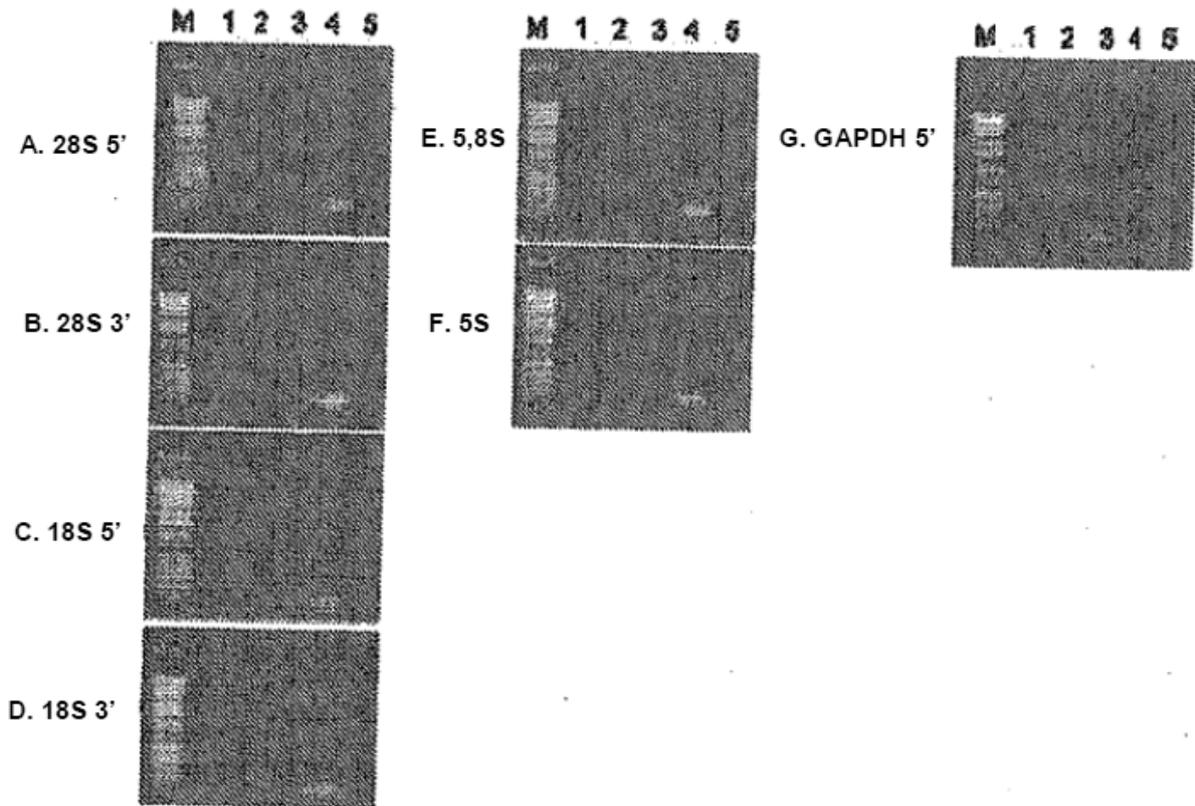


FIGURA 9A

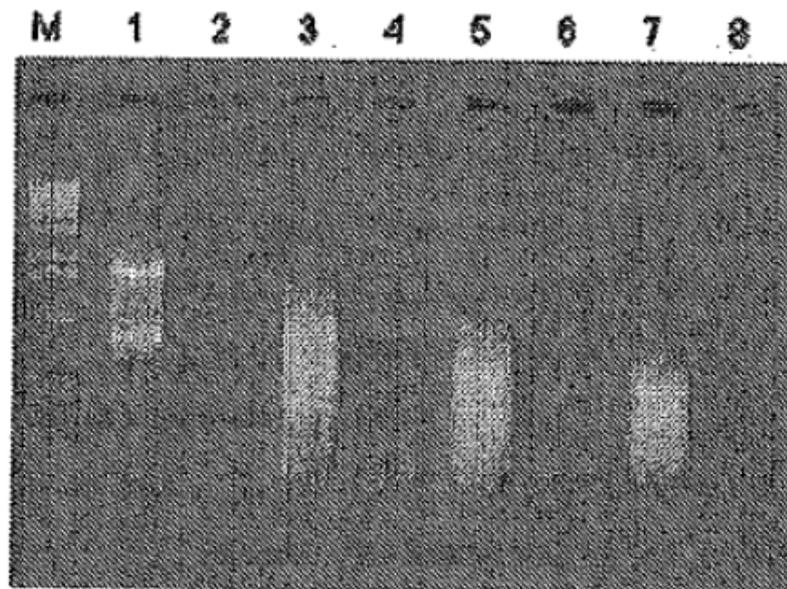


FIGURA 9B

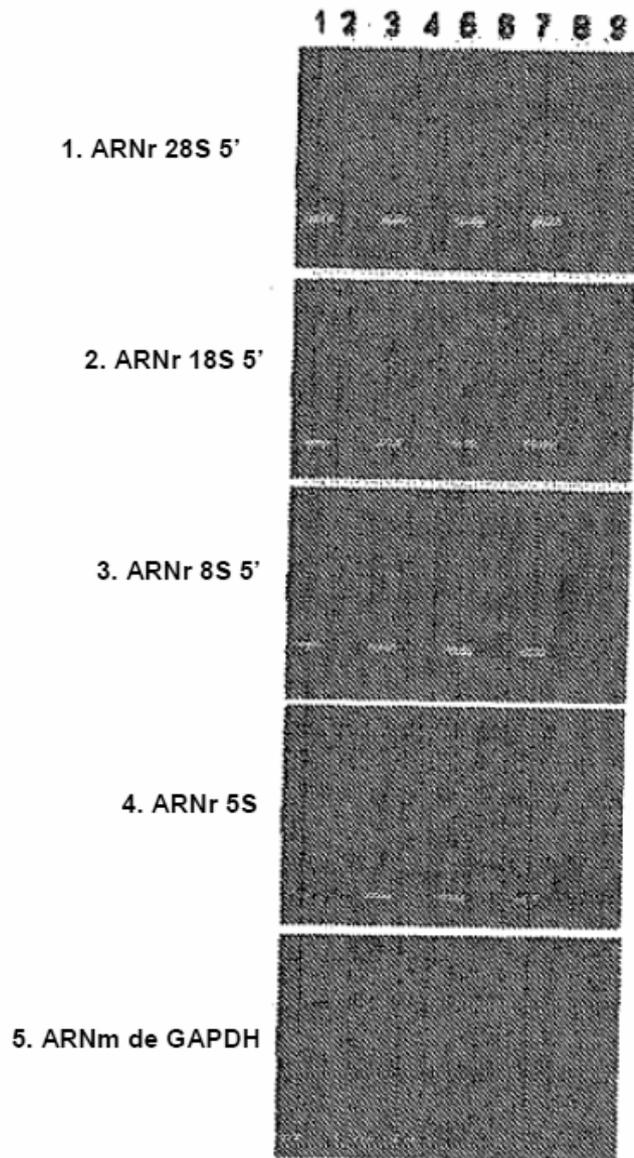


FIGURA 10A

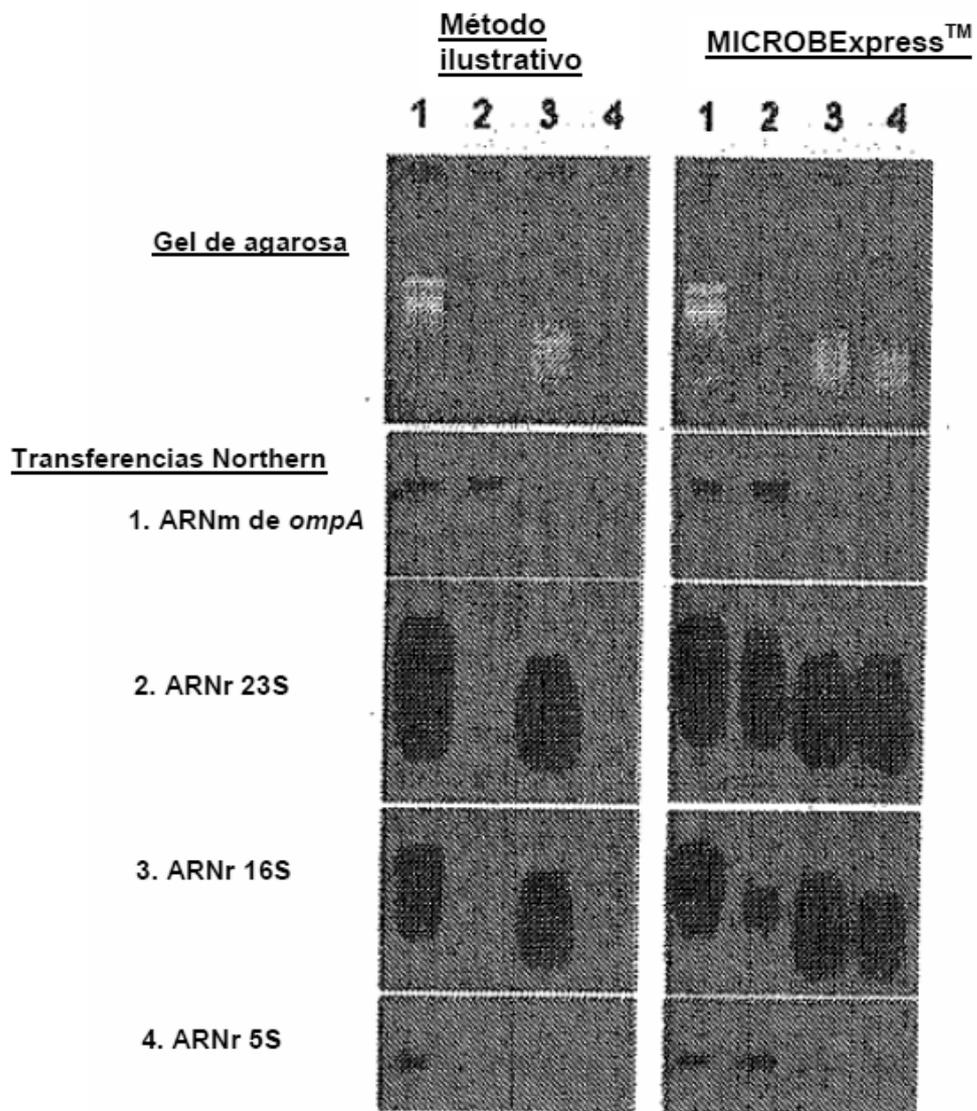


FIGURA 10B

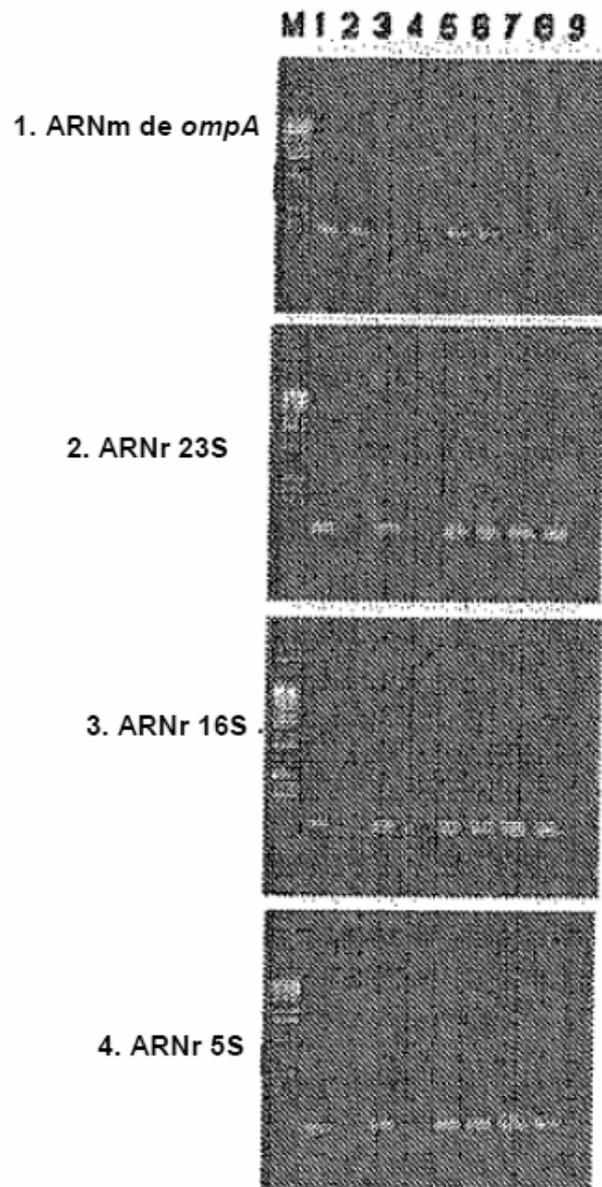


FIGURA 11A

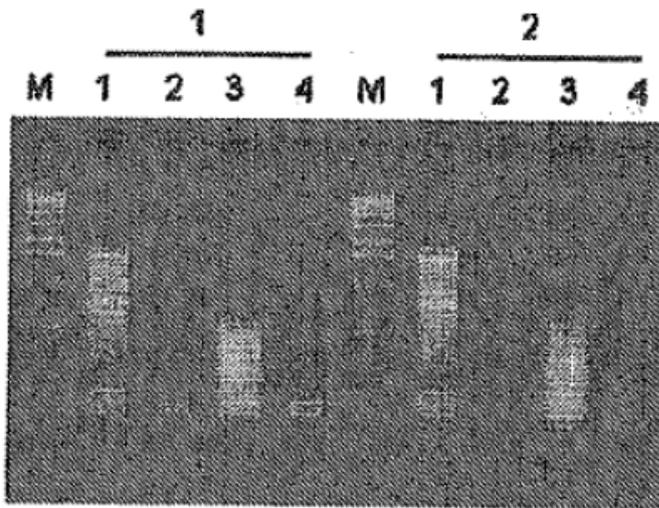


FIGURA 11B

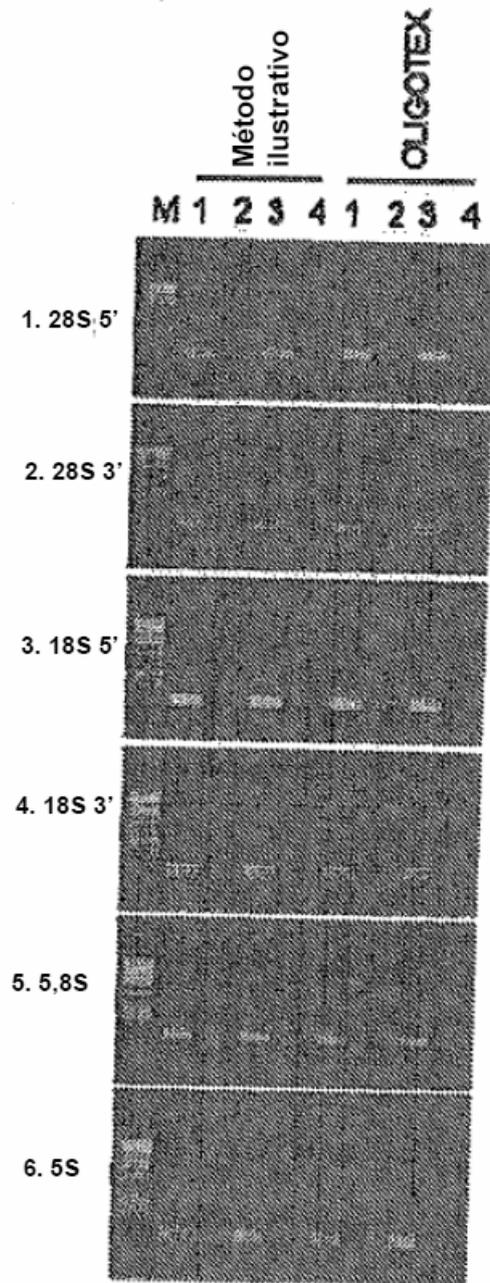


FIGURA 11C

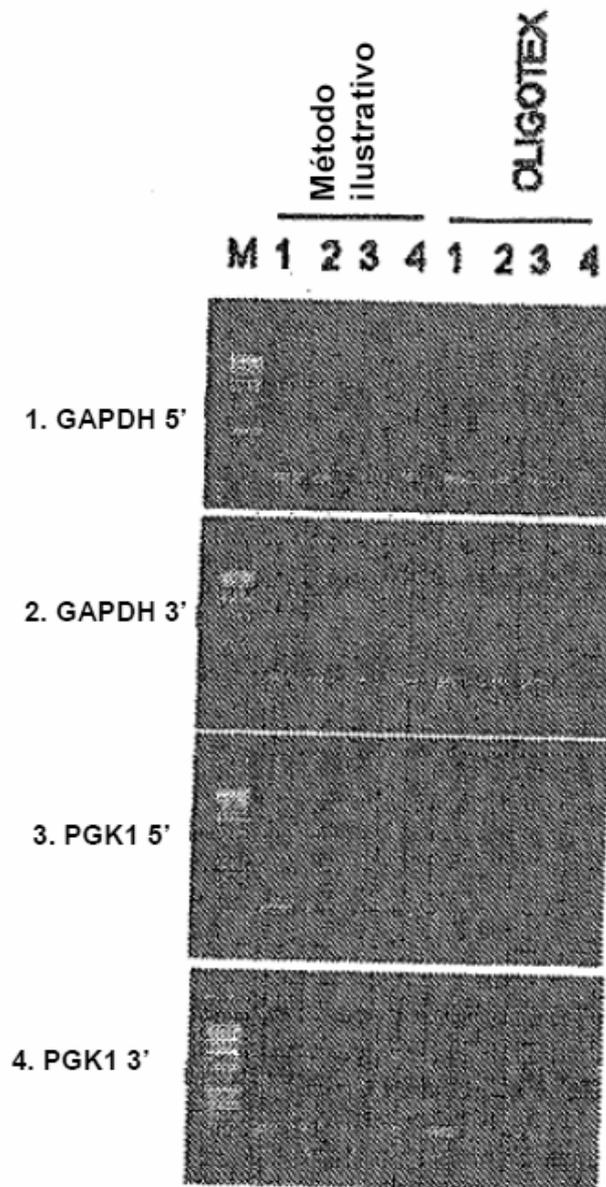


FIGURA 11D

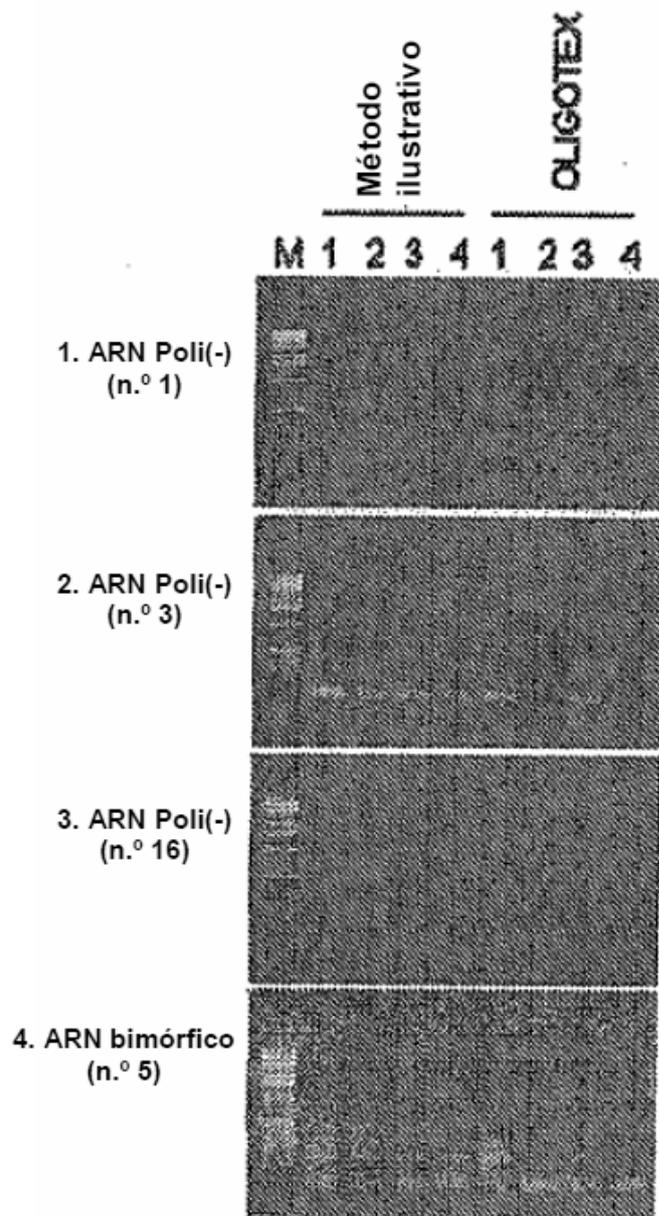


FIGURA 12A

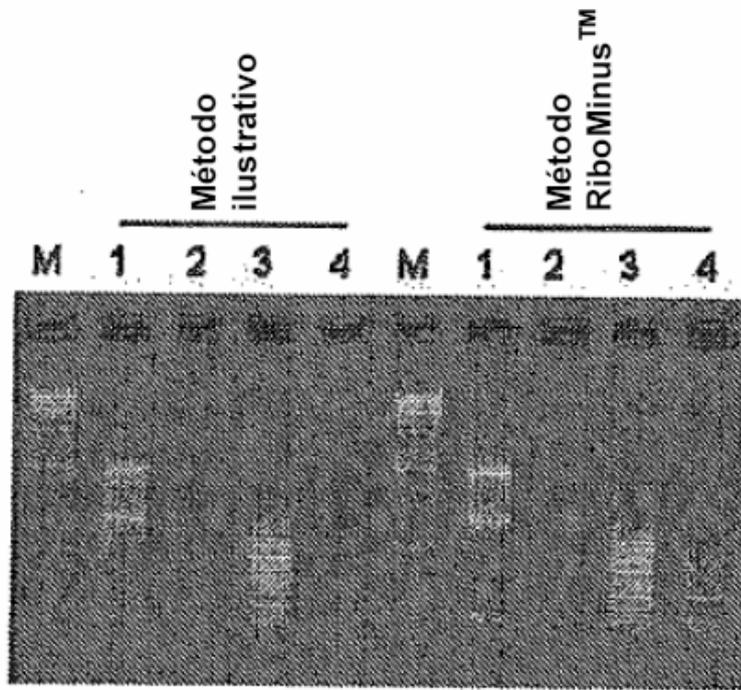


FIGURA 12B

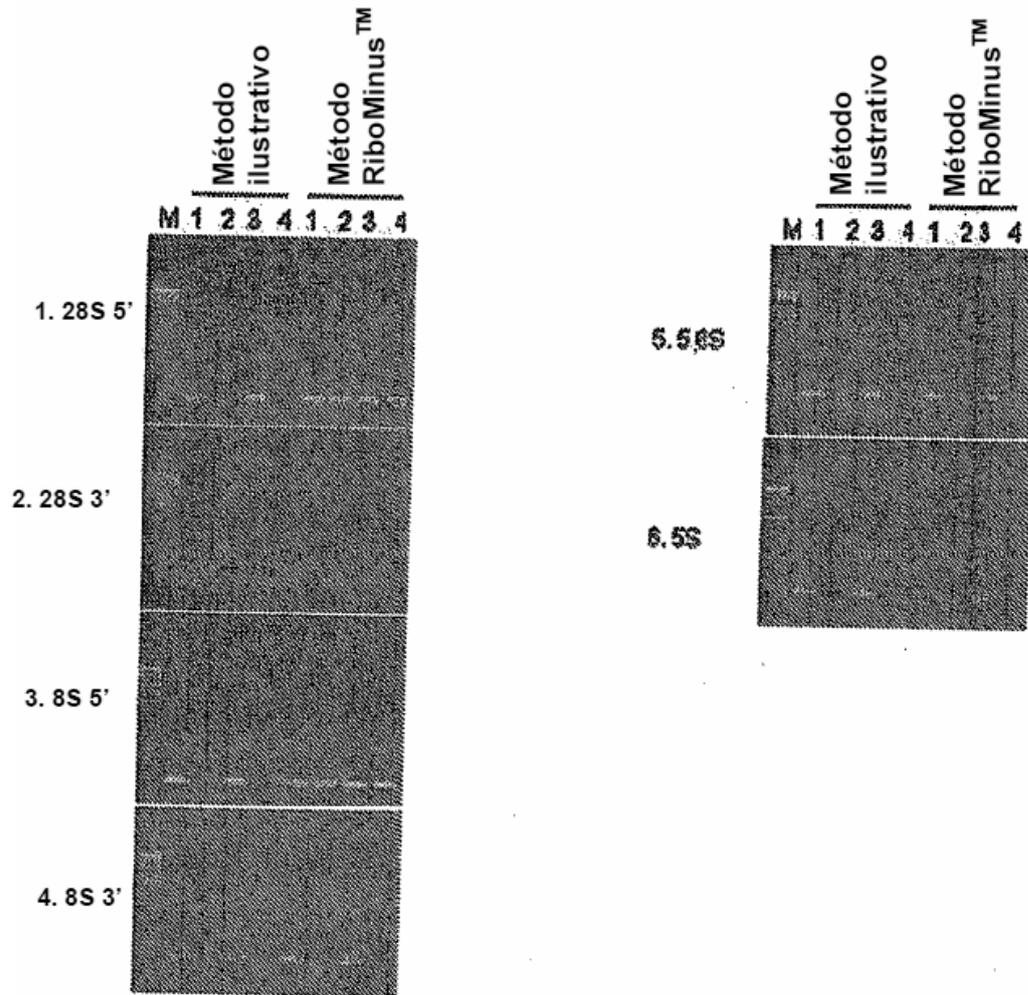
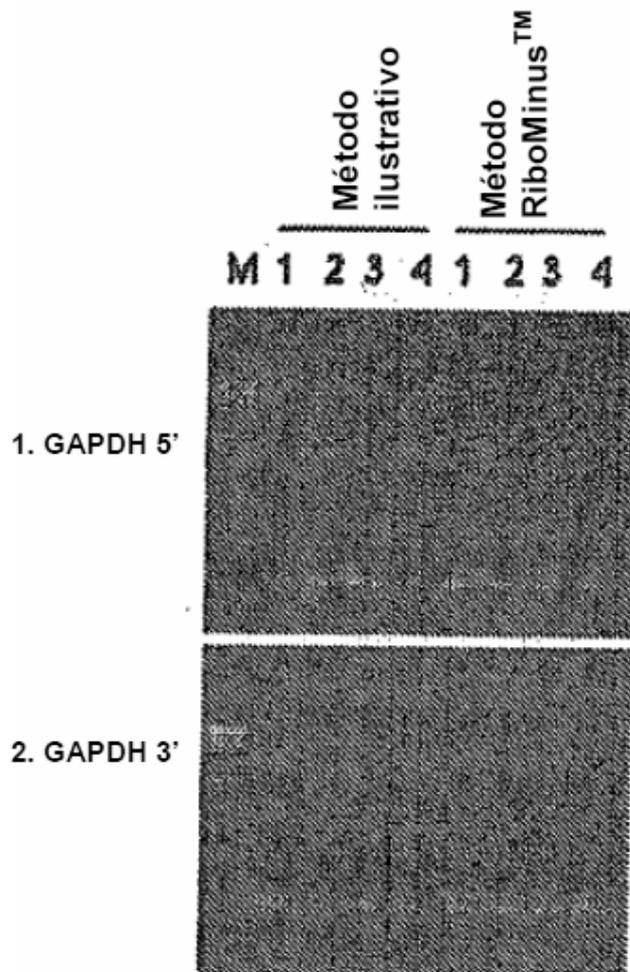


FIGURA 12C



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

5

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 61234044 A [0001]
- 10 • WO 2007019444 A2 [0004]
- US 6562575 B [0079]
- US 6210891 B [0102]
- 15 • US 6258568 B [0102]
- US 6833246 B [0103]
- US 7115400 B [0103]
- US 6969488 B [0103]
- 20 • US 5912148 A [0104]
- US 6130073 A [0104]
- US 7169560 B [0106]
- 25 • US 7282337 B [0106]
- US 7482120 B [0106]
- US 7501245 B [0106]
- US 6818395 B [0106]
- US 6911345 B [0106]
- US 7329492 B [0106]
- US 671956 A [0106]
- US 781166 A [0106]
- US 7170050 B [0106]
- US 7302146 B [0106]
- US 7313308 B [0106]
- US 7476503 B [0106]
- US 61234044 B [0179]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 30 • INGOLIA et al. *Science*, 2009, vol. 324, 218-23 [0003]
- SU ; SORDILLO. *Molecular Biotechnology*, August 1998, vol. 10 (1), 83-85 [0006]
- 35 • CHAKRAVORTY, S et al. *J. Microbiol. Methods*, 2007, vol. 69, 330-339 [0040]
- MILLAR, BC et al. *Current Issues Mol. Biol.*, 2007, vol. 9, 21-40 [0040]
- INGOLIA et al. *Science*, 2009, vol. 324, 218-223 [0044]
- 40 • Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays. TIJSEN. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes*. Elsevier, 1993 [0083]
- 45 • VOELKERDING et al. *Clinical Chem.*, 2009, vol. 55, 641-658 [0099] [0102] [0103] [0104] [0106]
- MACLEAN et al. *Nature Rev. Microbiol.*, vol. 7, 287-296 [0099] [0102] [0103] [0104] [0106]
- 50 • MARGULIES, M. et al. Genome Sequencing in Microfabricated High-Density Picolitre Reactors. *Nature*, 2005, vol. 437, 376-80 [0099]
- MIKKELSEN, T. et al. Genome-Wide Maps of Chromatin State in Pluripotent and Lineage-Committed Cells. *Nature*, 2007, vol. 448, 553-60 [0099]
- 55 • MCLAUGHLIN, S. et al. Whole-Genome Resequencing with Short Reads: Accurate Mutation Discovery with Mate Pairs and Quality Values. *ASHG Annual Meeting*, 2007 [0099]
- 60 • SHENDURE J. et al. Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome. *Science*, 2005, vol. 309, 1728-32 [0099]
- HARRIS, T. et al. Single-Molecule DNA Sequencing of a Viral Genome. *Science*, 2008, vol. 320, 106-9 [0099]
- SIMEN, B. et al. Prevalence of Low Abundance Drug Resistant Variants by Ultra Deep Sequencing in Chronically HIV-infected Antiretroviral (ARV) Naive Patients and the Impact on Virologic Outcomes. *16th International HIV Drug Resistance Workshop*, 2007 [0099]
- THOMAS, R. et al. Sensitive Mutation Detection in Heterogeneous Cancer Specimens by Massively Parallel Picoliter Reactor Sequencing. *Nature Med.*, 2006, vol. 12, 852-855 [0099]
- MITSUYA, Y. et al. Minority Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variants in Antiretroviral-Naive Persons with Reverse Transcriptase Codon 215 Revertant Mutations. *J. Vir.*, 2008, vol. 82, 10747-10755 [0099]
- BINLADEN, J. et al. The Use of Coded PCR Primers Enables High-Throughput Sequencing of Multiple Homolog Amplification Products by 454 Parallel Sequencing. *PLoS ONE*, 2007, vol. 2, e197 [0099]
- HOFFMANN, C. et al. DNA Bar Coding and Pyrosequencing to Identify Rare HIV Drug Resistance Mutations. *Nuc. Acids Res.*, 2007, vol. 35, e91 [0099]
- ASTIER et al. *J Am Chem Soc.*, 08 February 2006, vol. 128 (5), 1705-10 [0105]
- MANIATIS. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982 [0114]
- MADEN. *Biochem. J.*, 1987, vol. 246, 519-527 [0114]
- WU. *PLoS One*, July 2008, plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0002803 [0165]