

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 545**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2011 PCT/EP2011/000920**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2011 WO11104027**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2011 E 11707340 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2539449**

54 Título: **Proceso de aislamiento y/o purificación paralela de ARN y ADN**

30 Prioridad:

**03.03.2010 EP 10002171**  
**26.02.2010 EP 10001995**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.09.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HOLLÄNDER, VERA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 680 545 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

Proceso de aislamiento y/o purificación paralela de ARN y ADN

La presente invención se refiere a un proceso para el aislamiento paralelo y/o purificación de ARN y ADN a partir de la misma muestra biológica fijada, la cuantificación y el análisis de los ácidos nucleicos aislados mediante el proceso según la invención, un kit para el aislamiento paralelo y/o purificación de ARN y ADN de una muestra fijada y el uso de este kit para el diagnóstico, pronóstico, decisiones con respecto a la terapia y/o el monitoreo de la terapia de una enfermedad.

Si el material biológico, tal como, por ejemplo, un fragmento de tejido o células aisladas, se remueve de un organismo vivo, las células mueren dentro de un corto período de tiempo. Muy rápidamente, las células muertas se descomponen primero por autólisis/fermentación y luego bacterianamente, por lo que las estructuras celulares y tisulares originales se destruyen. Si las células o fragmentos de tejido se deben extraer de un organismo para su examen histológico, se recomienda, por lo tanto, fijar la muestra biológica tomada para evitar la degradación. Idealmente, la fijación deja las estructuras de la muestra sustancialmente sin cambios para permitir su evaluación histológica. La fijación además permite la preservación a largo plazo y el archivo de las muestras. Por estas razones, muchos exámenes morfológicos solo son posibles en base a material fijado.

Habitualmente, la fijación se consigue usando compuestos precipitantes de proteínas o reticulantes de proteínas tales como, por ejemplo, ácidos, alcoholes, cetonas o aldehídos, en particular glutaraldehído o formaldehído. Aquí, la fijación con formaldehído (empleado en la forma de una solución acuosa denominada "formalina") seguida de la incorporación de la muestra fijada en parafina es de gran importancia especialmente en patología ya que las estructuras celulares y tisulares se conservan particularmente bien. A continuación, el material fijado de esta manera se denomina "material fijado en formalina, incluido en parafina" o "material FFPE".

Sin embargo, la fijación de una muestra, en particular con formalina, tiene la desventaja de que, debido al efecto de reticulación del formaldehído, no solo las proteínas, sino también varias otras biomoléculas, incluidos los ácidos nucleicos presentes en la muestra, se unen covalentemente entre sí, y como consecuencia, el aislamiento de los ácidos nucleicos (ADN o ARN) de tales muestras es muy difícil. Para numerosas investigaciones a nivel molecular, sin embargo, el aislamiento de los ácidos nucleicos es de gran importancia.

Una forma de aislar ácidos nucleicos a partir de tales muestras fijadas se describe en el documento WO 20071068764. El procedimiento descrito en este documento permite romper los enlaces cruzados formados por la fijación en la muestra biológica y aislar un tipo de ácido nucleico, que es ADN o ARN, que luego se puede seguir, por ejemplo, mediante análisis de PCR o RT-PCR.

En el campo de la patología molecular, por ejemplo para el diagnóstico o pronóstico de trastornos tumorales, se emplean análisis a base de ADN y a base de ARN. Para permitir análisis tanto a base de ADN como de ARN en las mismas muestras fijadas, por ejemplo muestras tumorales, se requiere un proceso que permita el aislamiento paralelo de ADN y ARN de una muestra, tal como, por ejemplo, una sección de tejido de una biopsia. Tal aislamiento paralelo de ADN y ARN de una única muestra es altamente deseable, ya que, en primer lugar, habitualmente solo está disponible una cantidad muy pequeña de material de muestra que es insuficiente para una pluralidad de purificaciones separadas. En segundo lugar, la composición del material de muestra es, en general, heterogénea; por ejemplo, solo muy pocas células tumorales están presentes en una matriz de células sanas. En este caso, no es deseable dividir la muestra, ya que es imposible asegurar que la relación de las diferentes células entre sí sea la misma en cada muestra parcial. Solo el aislamiento paralelo de ADN y ARN de una única muestra indivisa asegura que todos los analitos que se estudiarán estén presentes en la misma proporción y se originen a partir de una muestra de composición idéntica.

El proceso descrito en el documento WO 20071068764 libera ambos tipos de ácido nucleico, ADN y ARN, igualmente rompiendo los enlaces cruzados introducidos durante la fijación. Por lo tanto, este proceso solo permite el aislamiento de ADN o ARN o de una mezcla de ambos ácidos nucleicos; sin embargo, no permite el aislamiento paralelo de ADN y ARN en fracciones separadas. Para separar los dos tipos de ácido nucleico (ADN y ARN), el documento WO 2007/068764 sugiere, después del aislamiento, precipitación selectiva o adsorción selectiva de uno de los dos tipos de ácido nucleico liberados simultáneamente durante la purificación. Alternativamente, es posible degradar enzimáticamente el tipo de ácido nucleico no deseado respectivo.

Se conoce un procedimiento para la purificación paralela de ADN y ARN a partir de una muestra por adsorción selectiva y se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando el kit de ADN/ARN Allprep disponible comercialmente (Qiagen, Hilden, Alemania). Aquí, la muestra se lisa inicialmente en un tampón de lisis que contiene caótrofos sin ningún alcohol, y el ADN presente en el lisado se une a una matriz de sílice, mientras que el ARN también presente en el lisado permanece desacoplado en la solución. Después de la adición de un alcohol al lisado restante, el ARN se puede unir a una matriz de sílice adicional. Este proceso funciona bien para muestras no fijadas. Sin embargo, se ha encontrado que todavía no es óptimamente aplicable a muestras fijadas con formalina ya que aquí el ADN no se une cuantitativamente a la primera matriz de sílice, sino que quedan grandes cantidades en el lisado residual y se purifican junto con el ARN. Por lo tanto, este proceso no permite la purificación por separado de ARN y ADN.

5 El documento WO2005/075642 describe un procedimiento para la extracción simultánea de ADN y ARN de una muestra biológica, incluyendo las muestras FFPE. La muestra FFPE se somete a desparafinación y se digiere usando un tampón de lisis que comprende un agente caotrópico, un detergente iónico y una enzima proteolítica. La muestra se digiere durante al menos 5, preferentemente 10 horas, para liberar el ARN y el ADN, se agrega fenol-cloroformo y las fases se separan. La fase acuosa comprende principalmente ARN, la fase orgánica principalmente ADN. El ARN puede luego recuperarse de la fase acuosa usando precipitación con alcohol. El ADN se recupera de la fase orgánica. Este procedimiento tiene, entre otros, el inconveniente de que requiere la extracción de los ácidos nucleicos liberados usando fenol para poder separar el ARN del ADN antes de aislar dichos ácidos nucleicos por separado de la fase orgánica y la fase acuosa.

10 Un protocolo similar se describe en O'Shea et al, "Analysis of T cell receptor beta chain CDR3 size using RNA extracted from formalin fixed paraffin wax embedded tissue" J Clin Pathol 1997; 50: 811-814.

15 También se conocen kits disponibles comercialmente para aislar mezclas de ADN y ARN o ADN o ARN de muestras FFPE. El kit de purificación de ARN/ADN FFPE (Norgen, Biotek Corp., Thorold, Canadá) permite el aislamiento de una mezcla de ARN y ADN en un eluido. Aquí, para obtener solo ADN o solo ARN, se puede llevar a cabo una digestión de proteasa K particularmente larga y un tratamiento con RNasa para aislar el ADN o una digestión corta con proteasa K y se puede llevar a cabo un tratamiento con DNasa para aislar el ARN. Sin embargo, este kit no permite la purificación simultánea pero separada de ambos tipos de ácido nucleico de la misma muestra.

20 El kit Agencourt FormaPure (Beckman Coulter Genomics GmbH, Danvers, Massachusetts, EE.UU.) también permite el aislamiento de una mezcla de ARN y ADN en un eluido o el aislamiento de ARN después de la digestión con DNasa, pero no simultáneamente, sino el aislamiento separado del ARN y ADN.

25 La opción de obtener ADN o ARN mediante la correspondiente digestión de nucleasas o mediante una adecuada incubación térmica también es proporcionada por el kit Ambion Recover All FFPE (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, EE.UU.) y el Kit de extracción de ARN FFPE QuickExtract (Epicenter Biotechnologies, Madison, Wisconsin, EE.UU.). Sin embargo, ninguno de estos kits disponibles comercialmente permite la purificación por separado de ADN y ARN de la misma muestra fijada.

30 Además, el documento WO 2005/075642 describe un proceso para la extracción simultánea de ambos tipos de ácidos nucleicos (ARN y ADN) de la misma muestra, que también puede ser una muestra fijada, entre otros. Este proceso comprende, después de la lisis de la muestra y la desactivación enzimática usando alcoholes aromáticos, una separación de los dos tipos de ácido nucleico mediante un proceso de extracción adecuado. Sin embargo, a partir de las dos fases obtenidas en este proceso (una fase acuosa que comprende ARN y una fase orgánica que comprende ADN), los ácidos nucleicos deben precipitarse después mediante la adición de agentes precipitantes adecuados antes de la posterior purificación y/o aislamiento. En primer lugar, esto hace que el proceso lleve mucho tiempo, y en segundo lugar, debido a la precipitación, existe un riesgo de pérdidas de sustancias y/o ácidos nucleicos contaminados por el agente precipitante.

35 Por consiguiente, era un objeto de la presente invención proporcionar un proceso que permitiera la purificación separada tanto de ADN como de ARN de la misma muestra fijada por reticulación, la separación de ADN de ARN que no requiera disolventes orgánicos ni matrices sólidas para unir los ácidos nucleicos.

### **Compendio de la invención**

40 La presente invención se basa entre otros en el hallazgo de que la proteólisis parcial de los componentes que contienen proteína de una muestra biológica fijada mediante reticulación usando al menos un compuesto proteolíticamente activo permite liberar selectivamente el ARN en una fracción disuelta de la muestra, mientras que el ADN permanece predominantemente en el residuo no disuelto de dicha muestra. Dicha digestión parcial de la muestra permite obtener fracciones separadas, en donde la fracción disuelta comprende principalmente ARN y el residuo no disuelto comprende principalmente ADN. La fracción disuelta que contiene principalmente ARN puede separarse fácilmente del residuo no disuelto que contiene principalmente ADN, por ejemplo usando un proceso de centrifugación.

50 Después de la separación de la fracción disuelta de la no disuelta, las fracciones se pueden procesar por separado según se desee. Por ejemplo, el ARN se puede aislar de la fracción no disuelta y el ADN se puede aislar de la fracción no disuelta. La separación de la fracción disuelta que contiene principalmente ARN de la fracción no disuelta que contiene principalmente ADN antes de aislar los ácidos nucleicos de las fracciones individuales permite aislar eficazmente ARN y ADN de la misma muestra reticulada con buen rendimiento. También está dentro del alcance de la presente invención aislar el ácido nucleico solamente de una fracción y descartar la otra fracción. Por ejemplo, si el aislamiento del ARN está en foco, el ADN que contiene la fracción no disuelta puede descartarse después de la separación.

55 Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas. Sin embargo, debe entenderse que la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferentes de la solicitud, se dan a modo de ilustración solamente. Diversos cambios y modificaciones dentro del

espíritu y alcance de la invención divulgada resultarán evidentes para los expertos en la técnica al leer lo siguiente.

### Descripción detallada de la invención

5 Como se debatió anteriormente, un objeto de la presente invención era proporcionar un proceso que permitiera la purificación separada tanto del ADN como del ARN a partir de la misma muestra fijada por reticulación, la separación del ADN del ARN que no requiera disolventes orgánicos ni matrices sólidas para unir los ácidos nucleicos.

Este objeto se logra mediante un proceso de obtención de RNA en una fracción disuelta y ADN en una fracción no disuelta a partir de la misma muestra biológica fijada por reticulación, que comprende las siguientes etapas:

10 a) disolución parcial de la muestra en una solución tampón acuosa con proteólisis parcial simultánea de los componentes de la muestra que contienen proteína usando al menos un compuesto proteolíticamente activo para obtener una fracción disuelta (fracción A) y un residuo no disuelto (pélet, fracción B),

b) separación de la fracción disuelta del residuo no disuelto,

en el que la fracción disuelta comprende principalmente ARN, en base a la cantidad total de ácidos nucleicos en la fracción disuelta, y el residuo no disuelto comprende principalmente ADN, en base a la cantidad total de ácidos nucleicos en el residuo no disuelto,

15 y en el que la separación de la fracción que comprende predominantemente ARN de la fracción que comprende predominantemente ADN no requiere ni precipitación ni extracción de uno o ambos tipos de ácido nucleico con disolventes orgánicos ni unión selectiva de uno o ambos tipos de ácido nucleico a una matriz sólida.

20 En una realización preferente, dicho proceso se usa para el aislamiento paralelo y/o purificación de ácidos ribonucleicos (ARN) y ácidos desoxirribonucleicos (ADN) a partir de la misma muestra biológica fijada mediante reticulación.

25 Para el propósito del proceso de acuerdo con la invención, se entiende que el aislamiento paralelo y/o purificación significan un aislamiento y/o purificación donde el aislamiento y/o purificación de los dos tipos de ácido nucleico, ARN y ADN, tiene lugar espacialmente separados entre sí, donde el tratamiento de las dos fracciones A y B, una de las cuales comprende predominantemente ARN y la otra que comprende predominantemente ADN, puede ocurrir simultáneamente o de otra manera en diferentes momentos.

Para el propósito de la invención, se entiende que la misma muestra biológica fijada por reticulación significa la muestra completa sometida a la lisis parcial en la etapa a).

30 Para los fines de la invención, los términos "disolución parcial" y "proteólisis parcial" o "digestión parcial" se entienden como la disolución parcial de la muestra o componentes individuales de la muestra y la degradación parcial de los componentes de la muestra que contienen proteínas, respectivamente, como se ilustra con más detalle a continuación.

35 Para el propósito de la invención, si se hace referencia a una fracción que comprende predominantemente un tipo de ácido nucleico, comprende más del 50% en peso de este tipo de ácido nucleico, en base a la cantidad total de ácidos nucleicos (es decir, la suma de los dos tipos de ácido nucleico) en esta fracción. De acuerdo a una realización, dicha fracción que comprende predominantemente un tipo de ácido nucleico comprende al menos 60%, preferentemente al menos 70%, más preferente al menos 80% en peso de este tipo de ácido nucleico, en base a la cantidad total de ácidos nucleicos en esta fracción.

40 El proceso de acuerdo con la invención permite el aislamiento paralelo de ADN y ARN de la misma muestra fijada en fracciones separadas y su posterior análisis por procedimientos sensibles, cualitativos y/o cuantitativos, donde incluso pequeñas cantidades de muestra obtenidas, por ejemplo, de secciones analizables microscópicamente de biopsias clínicas con agujas huecas de un diámetro de unos pocos mm, son adecuadas como material de muestra. En el proceso de acuerdo con la invención, en contraste con el kit de ADN/ARN Allprep disponible comercialmente (Qiagen, Hilden, Alemania), la separación en una fracción que comprende ADN y una que comprende ARN tiene lugar antes de la purificación real de los ácidos nucleicos. A partir de la muestra biológica fijada, el proceso de acuerdo con la invención genera dos fracciones, la fracción disuelta que comprende predominantemente ARN y la fracción no disuelta que comprende predominantemente ADN. En una etapa adicional, estas fracciones se pueden utilizar para la posterior extracción y/o purificación del ácido nucleico respectivo. La digestión parcial y la posterior separación del ARN del ADN en una fracción disuelta que contiene principalmente ARN y una fracción no disuelta que contiene principalmente ADN también diferencian el procedimiento según la presente invención de los procedimientos de la técnica anterior que se basan en una extracción con fenol/cloroformo para separar el ADN del ARN. En procedimientos a base de fenol/cloroformo respectivos, tanto el ADN como el ARN se liberan en el lisado y, en consecuencia, ambos están presentes en la fracción disuelta. Después de la extracción con fenol-cloroformo y la separación de fases, el ARN se disuelve en la fase acuosa y el ADN está presente en una forma disuelta en la fase orgánica. Por lo tanto, el principio de separación de la técnica anterior difiere fundamentalmente del proceso de acuerdo con la presente invención en que no requiere una extracción con fenol/cloroformo para separar el ARN del

55

ADN, pero, entre otros, se basa en una digestión parcial de la muestra reticulada para mantener el ADN predominantemente en la fracción no disuelta mientras el ARN se libera en la fracción disuelta.

En una primera etapa, la muestra FFPE se somete preferentemente a un tratamiento de proteasa. Sorprendentemente, se ha encontrado que, mediante la optimización del ajuste de las condiciones de esta proteólisis (la "digestión" enzimática) de las proteínas mediante el uso de una proteasa en este primer tratamiento con proteasa, es posible liberar selectivamente solo el ARN, pero no el ADN, de la muestra. Utilizando un proceso de separación adecuado, por ejemplo centrifugación, es posible separar, después de la "digestión" incompleta de acuerdo con la invención de la muestra, una fracción aún no disuelta que comprende ADN del sobrenadante que comprende ARN.

Aquí, la separación de las dos fracciones en una fracción disuelta (A) y una fracción no disuelta (B) se puede llevar a cabo usando cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica como adecuado para separar componentes líquidos y sólidos, tales como por ejemplo, filtración, sedimentación, decantación, centrifugación, etc. A continuación, el residuo no disuelto obtenido en esta etapa también se denomina pélet, donde, para los fines de la invención, este término no se limita explícitamente a un residuo no disuelto separado del componente líquido de la muestra por centrifugación, sino también incluye residuos no disueltos separados por otros medios, por ejemplo, el material sólido que permanece en el filtro después de una filtración.

La peletización de la fracción no disuelta es ventajosa porque permite la separación fácil y eficiente de las dos fracciones.

Para aislar el ARN, el sobrenadante que comprende ARN se puede tratar mediante un proceso habitual conocido del estado de la técnica, por ejemplo, mediante el proceso descrito en la solicitud WO 2007/068764, que comprende la incubación térmica en una solución que comprende nucleófilos para eliminar los enlaces cruzados restantes, donde el ARN puede aislarse, por ejemplo, uniéndose a una matriz de sílice utilizando, por ejemplo, el kit RNeasy FFPE (QIAGEN, Hilden, Alemania).

La fracción no disuelta, que comprende el ADN y otros componentes no disueltos de la muestra incompletamente digerida, se usa para aislar el ADN. Aquí, es posible usar cualquier procedimiento adecuado o de acuerdo con el estado de la técnica habitual para aislar ADN de muestras fijadas, ya que el pélet todavía tiene esencialmente las propiedades de una muestra fijada. En particular, la digestión de proteasas incompleta anterior no ha removido ninguna cantidad sustancial de ADN de la muestra y/o no ha removido reticulaciones de ADN en una cantidad significativa. Para este fin, se lleva a cabo ventajosamente otra digestión de proteasa enzimática adicional para lisar la muestra completamente, seguido de incubación térmica en una solución que contiene nucleófilos tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO 2007/068764. El ADN liberado de esta manera puede luego purificarse adicionalmente con la ayuda de cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo mediante la unión a una matriz de sílice usando, por ejemplo, el kit QIAamp FFPE (QIAGEN).

De esta manera, ambos tipos de ácido nucleico se fraccionan previamente a partir de una sola muestra en una etapa y luego se aíslan por separado el uno del otro y así se ponen a disposición para otros procedimientos de análisis.

Para el propósito de la invención, el término ácidos nucleicos incluye todos los ácidos nucleicos conocidos por las personas expertas en la técnica, por ejemplo ácidos nucleicos naturales o sintéticos, y también ácidos nucleicos introducidos artificialmente en la muestra, ácidos nucleicos mono y bicatenarios, ácidos nucleicos de cadena lineal, ramificada o circular, ARN, en particular ARNm, ARNsi, ARNmi, ARNsn, ARNt, ARNhn o ribozimas, ADN, en particular ADN o ADN genómico o plasmídico o ADN de organelos, y también ácidos nucleicos de origen infeccioso.

Las muestras biológicas adecuadas son todas muestras biológicas adecuadas para la fijación, tales como, por ejemplo, fluidos corporales que contienen células tales como sangre, esperma, fluido cerebroespinal, saliva, esputo u orina, fracciones de leucocitos, capas leucocitarias, heces, biopsias de superficie, aspirados, fragmentos de piel, organismos completos, órganos y tejidos de Metazoa, preferentemente de insectos y mamíferos, en particular de seres humanos, por ejemplo en forma de autopsias, biopsias, aspirados con aguja fina o secciones de tejido, células aisladas, por ejemplo en forma de cultivos de células adherentes o suspendidas, plantas, partes de plantas, tejidos de plantas o células vegetales, bacterias, virus, levaduras y hongos.

En una primera etapa a) del proceso de acuerdo con la invención, la muestra fijada se pone en contacto con una solución preferentemente acuosa que permite la actividad de un compuesto proteolíticamente activo, y también con uno o más compuestos proteolíticamente activos.

Para el propósito de la invención, los compuestos proteolíticamente activos son todos compuestos que escinden proteínas, preferentemente enzimas proteolíticamente activas tales como proteasas y proteasas termoestables, particularmente preferentemente proteinasa K, tripsina, quimotripsina, papaína, pepsina, pronasa y endoproteinasa Lys-C, en particular proteinasa K y también sustancias no enzimáticas adecuadas para escindir proteínas, tales como bromuro de cianógeno, o mezclas de estas sustancias.

La concentración del compuesto proteolíticamente activo en la solución acuosa generalmente depende de la naturaleza del compuesto proteolíticamente activo y de la naturaleza y la cantidad de la muestra biológica y puede

5 ser determinada por el experto en la técnica usando experimentos de rutina simples. La concentración de una enzima proteasa en la solución acuosa está preferentemente en un intervalo de 0,001 a 5% en peso, particularmente preferentemente 0,01-2,5% en peso y en particular 0,05-0,2% en peso, en cada caso en base al peso total de la solución acuosa. Aquí, la cantidad o la concentración del compuesto proteolíticamente activo que se usará para una muestra determinada dependen de la naturaleza del compuesto proteolíticamente activo y las condiciones de reacción elegidas, tales como pH, cofactores, temperatura de incubación y tiempo de incubación, algo con lo que la persona experta en la técnica está familiarizada. La cantidad o concentración adecuada del compuesto proteolíticamente activo se puede determinar de manera sencilla mediante experimentos de rutina. Además, se ha encontrado que en el proceso de acuerdo con la invención, en cualquier caso, no es crítico que la cantidad o concentración del compuesto proteolíticamente activo se ajuste específicamente, sino que se puede variar sobre un cierto ancho de banda sin afectar negativamente el rendimiento de ácido nucleico o su integridad (Ejemplo 2).

La solución acuosa contiene preferentemente otras sustancias que promueven la degradación del tejido biológico y/o la lisis de las células, tales como, por ejemplo, reactivos caotrópicos y/o, preferentemente, tensioactivos.

15 Los tensioactivos adecuados para su uso en el proceso de acuerdo con la invención son todos tensioactivos conocidos por los expertos en la técnica y adecuados para lisar células; aquí se da preferencia a tensioactivos aniónicos o no iónicos. Los tensioactivos preferentes son compuestos seleccionados del grupo que comprende dodecilsulfato sódico (SDS), desoxicolato sódico, 3-(3-colamidopropil)dimetilamonio-1-propanosulfonato (CHAPS), éteres fenílicos de polietilenglicol, tales como, por ejemplo, los tensioactivos disponibles bajo la nombres comerciales Triton X-100, Tween o NP-40 o mezclas de estos, los tensioactivos preferentes son SDS, NP-40 y Triton X-100 (éter (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenílico de polietilenglicol con un grado de etoxilación de 9 a 10). La cantidad de tensioactivo empleado para soportar la lisis de las células presentes en la muestra biológica depende de la naturaleza y la cantidad de la muestra biológica y el experto en la materia puede determinarla usando simples experimentos de rutina.

25 La solución acuosa es además preferentemente una solución tampón, cuyo pH es estabilizado por al menos una sustancia tampón presente en la solución en un intervalo de 6 a 9, preferentemente de 6,5 a 8,5 y particularmente preferentemente de 6,8 a 7,5. Por consiguiente, la solución tampón acuosa preferentemente comprende al menos una sustancia tampón, preferentemente seleccionada del grupo que comprende Iris, Hepes, Pipes, Mops, acetato de metal alcalino/ácido acético, etc. y/o preferentemente al menos un tensioactivo, preferentemente seleccionado del grupo que comprende dodecilsulfato de sodio (SDS), desoxicolato de sodio, 3-(3-cholamidopropil)dimetilamonio-1-propanosulfonato (CHAPS), éteres fenílico de polietilenglicol o mezclas de estos, particularmente preferentemente dodecilsulfato de sodio, éter nonilfenílico de polietilenglicol que tiene un grado de etoxilación de 40, obtenible bajo el nombre comercial de NP-40 tipo Tergitol, y/o éter (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenílico de polietilenglicol que tiene un grado de etoxilación de 9-10.

35 La solución acuosa puede comprender además componentes adicionales que soportan la lisis, protegen los ácidos nucleicos contra constituyentes de descomposición y/o estabilizan la solución acuosa, por ejemplo agentes complejantes, agentes reductores u otras sustancias tampón, cuando el experto en la técnica está familiarizado con la naturaleza y la cantidad de posibles aditivos para los tampones de lisis o es capaz de determinarlos mediante simples experimentos de rutina. En una realización preferente, la solución tampón acuosa comprende además al menos una sustancia seleccionada del grupo que comprende

40 - agentes complejantes, preferentemente ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético (EDTA), ácido etilenglicol bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) citrato sódico o mezclas de estos,

- agentes caotrópicos, preferentemente seleccionados del grupo que comprende hidrocloreuro de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina, perciratos, NaI, KI y urea, preferentemente en una concentración de 0,1 a 10 M,

45 - agentes reductores, preferentemente seleccionados del grupo que comprende ditiotreitrol (DTT), ditioneritrol (DTE), tiosulfato de sodio, β-mercaptoetanol o mezclas de estos, y

- sales inorgánicas, preferentemente haluros de metales alcalinos, tales como, por ejemplo, NaCl, KCl o LiCl, haluros de metales alcalinotérreos, tales como, por ejemplo, CaCl<sub>2</sub> o MgCl<sub>2</sub>, sales de amonio, tales como, por ejemplo, cloruro de amonio o sulfato de amonio, sulfato de litio o mezclas de estos.

50 De acuerdo con una realización, la solución tampón acuosa comprende un detergente, preferentemente un detergente no iónico tal como SDS, y preferentemente un agente tamponante, preferentemente TRIS. La solución tampón acuosa también puede comprender un agente quelante tal como EDTA.

55 En la etapa de proceso a) del procedimiento según la invención, la muestra biológica fijada por reticulación se pone en contacto con la solución acuosa que comprende al menos un compuesto proteolíticamente activo y se incuba a una temperatura adecuada. Aquí, la temperatura generalmente depende de la naturaleza del compuesto proteolíticamente activo empleado. En el caso de las enzimas, se debe elegir una temperatura que permita que la enzima esté activa. En general, las temperaturas que son demasiado bajas reducen la actividad de la enzima hasta el punto de inactividad, mientras que las temperaturas que son demasiado altas pueden desactivar la enzima por

desnaturalización. El rango de temperatura tolerado por la enzima en cuestión o la temperatura de reacción óptima varía dependiendo de la enzima respectiva y es conocido por los expertos en la técnica o puede determinarse mediante simples experimentos de rutina. Cuando se usa proteinasa K, por ejemplo, la reacción se puede llevar a cabo a temperaturas de hasta aproximadamente 95°C, preferentemente entre 18°C y 80°C, particularmente preferentemente entre 50 y 65°C.

Como ya se ha descrito, sorprendentemente se ha encontrado que, mediante la optimización del ajuste de las condiciones de la "digestión" proteolítica de las proteínas en una muestra fijada usando un compuesto proteolíticamente activo, preferentemente una proteasa, es posible remover selectivamente solo el ARN, pero no el ADN, de la muestra. Después de esta digestión incompleta (parcial) de acuerdo con la invención de la muestra, una fracción aún no disuelta que comprende el ADN se puede separar del sobrenadante disuelto que comprende ARN. Para un compuesto proteolítico activo dado, la calidad de la separación en ARN y ADN depende de su concentración y la temperatura de incubación y, en particular, del tiempo de incubación. Si se permite que el compuesto proteolíticamente activo reaccione solo durante un tiempo muy corto, no solo el ADN sino también el ARN se separan solo de manera insuficiente de la muestra y, por lo tanto, en total se obtiene solo un bajo rendimiento de ácido nucleico en la fracción soluble. Por el contrario, si se permite que el compuesto proteolíticamente activo reaccione durante demasiado tiempo, el resultado será una disolución (casi) completa del ARN, pero también más ADN separado del pélet. Sin embargo, ajustando adecuadamente el tiempo de reacción del compuesto proteolíticamente activo, es posible lograr una lisis parcial (incompleta) de la muestra con una separación sustancial entre el ARN en la fracción soluble y el ADN en la fracción no disuelta, que es un "prefraccionamiento" de los dos tipos de ácido nucleico antes de la purificación real.

Aquí, el tiempo de reacción óptimo depende, en primer lugar, del compuesto proteolíticamente activo, su concentración en la solución acuosa y la temperatura de incubación. En segundo lugar, la cantidad y el espesor de la muestra biológica y otros parámetros específicos de la muestra, por ejemplo el tipo y la duración de la fijación tienen un efecto sobre el tiempo de reacción óptimo del compuesto proteolíticamente activo

Se da preferencia al uso de muestras fijadas con formalina, en particular después de que la muestra haya sido incluida en parafina. Para bloques de tejido relativamente grandes, debido a la gran cantidad y espesor de la muestra, se usa un volumen mayor de la solución que comprende el compuesto proteolíticamente activo, y ventajosamente también concentraciones más altas del compuesto proteolíticamente activo y tiempos de reacción más largos en comparación con muestras más pequeñas. Utilizando instrumentos de corte adecuados, por ejemplo un micrótopo, se preparan secciones de tejido a partir de muestras fijadas, donde el espesor para los exámenes con un microscopio óptico es generalmente de aproximadamente 5 a 20 µm. Además, la muestra parafinada también se puede dividir en fragmentos de muestra más pequeños usando otros procedimientos, por ejemplo, perforando con una aguja hueca o mediante el procedimiento de captura por láser. Los fragmentos de tejido más pequeños requieren cantidades más pequeñas del compuesto proteolíticamente activo y tiempos de reacción más cortos. Aquí es decisivo en particular el espesor de la sección, ya que este es el factor limitante para el contacto completo del tejido con el compuesto proteolíticamente activo. Por lo tanto, se da preferencia al uso de secciones de tejido que tengan un espesor preferentemente de 5 µm a 50 µm o fragmentos de tejido más pequeños que, si es apropiado, se obtienen dividiendo u homogeneizando una muestra más grande.

El tiempo de fijación, es decir, el momento en que el agente de fijación actúa sobre la muestra biológica, afecta el grado de reticulación covalente de las biomoléculas en la muestra biológica, aumentando el grado de reticulación con tiempos de fijación más largos. En las muestras que se han fijado solo brevemente, existe solamente un pequeño grado de reticulación de las biomoléculas, que permite una disolución más fácil y más rápida de las biomoléculas individuales. Por el contrario, las muestras que se han fijado durante un largo período de tiempo tienen un alto grado de reticulación, lo que puede retrasar la disolución de biomoléculas más grandes en particular. Por consiguiente, para muestras fuertemente fijadas (sobrefijadas) puede ser ventajoso tener un tiempo de reacción más largo del compuesto proteolíticamente activo. Aquí, los términos "fijada brevemente" y "fijada durante un largo período de tiempo" deben entenderse de manera relativa, ya que el tiempo óptimo de fijación depende del tamaño de la pieza de tejido. La velocidad de difusión de formalina en el tejido es inicialmente de aproximadamente 1 mm/h, la velocidad disminuye con el aumento de la profundidad del tejido. Por lo tanto, para una pieza de tejido de un espesor de aproximadamente 5 mm, se requieren aproximadamente 8 horas para la penetración completa de la muestra con formalina (tiempo de fijación). En la práctica, un tiempo de fijación de aproximadamente 12-24 horas es habitual; las muestras muy pequeñas requieren un tiempo de fijación mucho más corto y ya se sobrefijarán en un tiempo de fijación de 12 horas.

Por lo tanto, el tiempo de reacción óptimo depende de los parámetros específicos de la muestra, tal como la fijación y el tiempo de fijación, la naturaleza, la cantidad y el espesor de la muestra biológica, y puede ajustarse de manera óptima para cada muestra individual. Sorprendentemente, sin embargo, también es posible ajustar las condiciones de modo que para muchos parámetros de muestra posibles, es decir, para muchas muestras individuales diferentes, permitan la separación de ADN y ARN en fracción disuelta y no disuelta. Aquí, el tiempo de reacción puede estar entre 30 segundos y un número de días, preferentemente entre un minuto y 5 horas y especialmente preferentemente entre 5 y 90 minutos y más preferentemente entre 10 y 30 minutos. Cuando se usan de 10 a 40 µl de una solución de proteinasa K de una actividad de > 600 mAU/ml a una temperatura de incubación de 56°C y un tiempo de reacción de aproximadamente 15 a 90 minutos para la sección de tejido FFPE de un espesor de 10 a 20

µm, se obtienen muy buenos resultados para la disolución parcial de la muestra para el propósito de la invención, es decir, el ARN se ha disuelto (casi) completamente de la fracción no disuelta y ha pasado a la fracción disuelta, mientras que el ADN está todavía (casi) completamente en la fracción no disuelta (Ejemplos 2 y 3).

5 De acuerdo con una realización, la etapa a) comprende la disolución parcial de la muestra en una solución tampón acuosa que comprende un detergente, preferentemente un detergente no iónico, con una proteólisis parcial simultánea de los componentes de la muestra que contienen proteína usando una enzima proteolíticamente activa, preferentemente una proteasa tal como proteinasa K, en donde la reacción se lleva a cabo a una temperatura entre 18°C y 80°C, preferentemente 50 y 65°C durante un tiempo de reacción entre 10 minutos y 5 horas, preferentemente entre 10 y 90 minutos, más preferente entre 10 y 30 minutos. Esta realización tiene la ventaja de que es rápida y eficaz en la liberación del ARN en la fracción disuelta.

10 Aquí, la fijación de la muestra biológica puede efectuarse con cualquier fijador conocido por los expertos en la técnica, en particular con ácidos, alcoholes, cetonas u otras sustancias orgánicas, tales como, en particular, glutaraldehído o formaldehído, en el que las muestras biológicas se fijan con el formaldehído son particularmente preferentes. De acuerdo con una realización particularmente preferente del proceso de acuerdo con la invención, se usa una muestra biológica incluida en parafina, fijada con formaldehído (muestra FFPE).

15 Si se usa una muestra biológica incluida en parafina, la parafina se remueve preferentemente al menos parcialmente, preferentemente completamente, de la muestra. La desparafinación sirve para eliminar selectivamente la parafina utilizada para embeber la muestra biológica para hacer que la muestra sea accesible para la lisis eficiente en un medio acuoso. En general, la parafina puede interferir tanto durante la disolución como en el fraccionamiento de los ácidos nucleicos y durante la posterior purificación y análisis de los ácidos nucleicos. La desparafinación que se lleva a cabo preferentemente de antemano puede tener un marcado efecto sobre la calidad, en particular la solidez, del pélet obtenido en el proceso de acuerdo con la invención después del tratamiento con proteasa y, por lo tanto, sobre la separación de los ácidos nucleicos y los rendimientos obtenibles.

20 La eliminación de la parafina de la muestra biológica puede tener lugar, en principio, mediante cualquier proceso para la desparafinación de muestras biológicas conocido por el experto en la técnica. Preferentemente, la desparafinación se lleva a cabo poniendo inicialmente la muestra en contacto con un disolvente orgánico hidrófobo. Aquí, también puede ser ventajoso mezclar la mezcla de la muestra biológica y el disolvente orgánico con agitación, por ejemplo agitando en un agitador de laboratorio, empleando un agitador magnético, etc. para asegurar la disolución efectiva de la parafina de la muestra. Ventajosamente, la muestra se centrifuga posteriormente para separar la parafina disuelta en el disolvente orgánico del pélet, es decir, la muestra biológica. Si es necesario, la etapa de disolver la parafina de la muestra biológica puede repetirse una, dos, tres o hasta diez veces. La desparafinación puede llevarse a cabo preferentemente mediante incubación en disolventes orgánicos hidrófobos, con preferencia en un hidrocarburo aromático, en particular en xileno, seguido de rehidratación de la muestra en etanol, como se describe, por ejemplo, en la solicitud WO 2007/068764. También pueden usarse para la desparafinación otros disolventes orgánicos, tales como, por ejemplo, alcanos, preferentemente alcanos que son líquidos a temperatura ambiente de la fórmula general  $C_nH_{2n+2}$  donde  $6 < n < 17$  o mezclas de estos, particularmente preferentemente heptano, si es apropiado con adición de alcoholes C1-C5, es decir, metanol, etanol, propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, n-pentanol, preferentemente metanol. Si es de cadena recta, i.d. sin ramificar, se usan alcanos, n es preferentemente más de 6 y menos de 17, ya que algunos de los alcanos de una longitud de cadena de seis o menos átomos de carbono, algunos de ellos deben clasificarse como tóxicos, son gaseosos a temperatura ambiente y/o son demasiado volátiles, y los alcanos de una longitud de cadena de 17 y más átomos de carbono son sólidos a temperatura ambiente. Además, también es posible usar mezclas de alcanos, en caso apropiado también con otros compuestos tales como alquenos, compuestos aromáticos, etc., siempre que estos sean líquidos a temperatura ambiente y disuelven parafina, tal como, por ejemplo, aceite mineral. Se ha encontrado que la desparafinación por incubación en alcanos que tienen una longitud de cadena de más de 6 y menos de 17 átomos de carbono, particularmente preferentemente en heptano, es particularmente ventajosa para la posterior separación de las fracciones A y B solubles e insolubles mediante el proceso de acuerdo con la invención. La adición de un alcohol C1-C5, preferentemente metanol, en una cantidad de 1-25% en volumen, preferentemente 5-10% en volumen, al disolvente orgánico hidrofóbico puede promover la precipitación del residuo insoluble, haciendo así la separación de la fracción soluble e insoluble más fácil y más eficiente. En una realización preferente, el proceso por lo tanto comprende, antes de la disolución parcial de acuerdo a la etapa (a), una etapa (i) para la eliminación selectiva de la parafina, preferentemente poniendo la muestra en contacto con un disolvente orgánico hidrófobo, de forma particularmente preferente utilizando un hidrocarburo alifático o aromático apolar de una longitud de cadena de más de 6 y menos de 17 átomos de carbono; en particular un hidrocarburo seleccionado del grupo que comprende xileno, heptano y aceite mineral, en caso apropiado con la adición de un alcohol C1-C5, preferentemente metanol, en una cantidad de 1-25% en volumen, preferentemente 5-10% en volumen. De acuerdo con una realización, la desparafinación se logra por incubación con un alcano, preferentemente heptano, y un alcohol, preferentemente metanol. Además de la disolución de la parafina con un disolvente orgánico adecuado, también son adecuados otros procesos tal como procesos para la desparafinación, tales como, por ejemplo, la fusión de parafina, según lo descrito por Banerjee et al. en *Biotechniques*, 18 (1995) páginas 768-773.

Después de la eliminación de la parafina, puede preferirse rehidratar la muestra biológica, preferentemente esta rehidratación se realiza por lavado en etapas con soluciones acuosas de alcohol de concentraciones decrecientes de



alcohol (serie descendentes de alcoholes), siendo preferentes alcoholes C1 a C5 y metanol, siendo particularmente preferente etanol e isopropanol. Si el reactivo de desparafinación utilizado es xileno, la muestra generalmente se rehidrata de esta manera antes del procesamiento posterior, la necesidad de esta rehidratación para un subsiguiente aislamiento de ácido nucleico se debate en la bibliografía pertinente. Si el reactivo de desparafinación utilizado es un alcano alifático de cadena lineal, no se requiere la rehidratación de la muestra. Sin embargo, también es posible llevar a cabo la desparafinación y la rehidratación con un único reactivo adecuado, por ejemplo con el producto EZ-DEWAX® comercialmente disponible de BloGenex, California, EE.UU.

Preferentemente, la muestra, después de la desparafinación y rehidratación, se seca inicialmente, por ejemplo, por exposición al aire o incubación en un horno de secado. Además, la muestra biológica opcionalmente sometida a desparafinación y rehidratada se puede homogeneizar antes de la lisis parcial, lo que es ventajoso en particular en el caso de las muestras de tejido relativamente grandes. Por el contrario, las secciones de tejido de hasta 20 µm de espesor generalmente no requieren la homogeneización de las muestras. Esta homogeneización se puede llevar a cabo utilizando cualquier aparato conocido por los expertos en la técnica para triturar una muestra biológica, en particular una digestión de células a alta presión con la ayuda de un aparato triturador mecánico, por ejemplo, un molino, un homogeneizador de rotor-estator, un homogenizador Ultra-Turrax o una cánula fina, o por homogeneizadores de ultrasonidos.

En una realización preferente, el proceso comprende por lo tanto, después de la eliminación de la parafina de acuerdo con la etapa (i) y antes de la disolución parcial de la muestra en la solución tampón acuosa de acuerdo con la etapa (a), preferentemente al menos una de las siguientes etapas:

(ii) rehidratación de la muestra, preferentemente mediante lavado repetido de la muestra con soluciones acuosas de alcohol C1 a C5 de contenido de agua sucesivamente creciente,

(iii) secado de la muestra y/o

(iv) homogeneización de la muestra.

Las respectivas etapas del procedimiento para desparafinar y procesar la muestra desparafinada también son bien conocidas en la técnica anterior y, por lo tanto, no necesitan más descripción aquí.

De acuerdo con una realización, la muestra fijada por reticulación se obtiene en forma de un pélet después de la desparafinación. Preferentemente, la solución tampón acuosa se agrega a dicho pélet para realizar la etapa de disolución parcial a). De acuerdo con una realización adicional, la muestra desparafinada que comprende la química de desparafinación, respectivamente la solución de desparafinación, se mezcla con la solución tampón acuosa para su uso en la etapa a), formando así una fase acuosa que se somete en la etapa a) a proteólisis parcial de los componentes que contienen proteína de la muestra utilizando al menos un compuesto proteolíticamente activo para liberar selectivamente el ARN comprendido en una fracción disuelta, mientras que el ADN comprendido permanece predominantemente en la fracción no disuelta. Aquí, el compuesto proteolíticamente activo, preferentemente la enzima proteolítica, se puede agregar a la fase acuosa mientras que la solución utilizada para la desparafinación todavía está en la parte superior de la fase acuosa que se formó debido a la adición de la solución tampón acuosa. Si se realiza la etapa de separación b) en esta alternativa, por ejemplo por centrifugación de la muestra reticulada parcialmente digerida (véase, por ejemplo, arriba y abajo), la fracción no disuelta que contiene principalmente ADN formará un pélet dentro de la fase acuosa. Para separar la fracción disuelta de la no disuelta, la fase acuosa por ejemplo se recoge a través de la solución de desparafinación, por ejemplo mediante el uso de una pipeta, mientras se deja atrás el pélet que contiene ADN principalmente sin disolver. Alternativamente, la solución de desparafinación puede separarse de la fase acuosa que se obtiene después de la adición de la solución tampón acuosa antes de añadir el compuesto proteolíticamente activo y separar la fracción no disuelta de la fracción disuelta.

En la etapa b) del proceso de acuerdo a la invención, los diferentes tipos de ácido nucleico presentes en el material de partida, es decir, ARN y ADN, se separan en una fracción disuelta (A), que contiene predominantemente el ARN, y una fracción no disuelta (B), que contiene predominantemente el ADN. También es posible separar la muestra completa incluyendo los componentes disueltos y no disueltos en al menos dos fracciones a partir de las cuales se aíslan o purifican varias biomoléculas o en las que pueden detectarse o analizarse varias biomoléculas; sin embargo, la muestra es, después de la etapa a) del proceso de acuerdo a la invención, preferentemente separada en al menos una fracción disuelta (A) y al menos una fracción no disuelta (B). La ventaja de separar las dos fracciones es que a partir de estas dos fracciones en cada caso se puede aislar separadamente un tipo de ácido nucleico sin necesidad de separar la muestra biológica original, lo que reduciría el rendimiento respectivo o daría como resultado una distribución desigual de los diversos tipos de células de una muestra.

Las fracciones obtenidas de esta manera se pueden someter luego por separado a la purificación de ácidos nucleicos. También está dentro del alcance de la presente invención aislar el ácido nucleico solo de una fracción y descartar la otra fracción (véanse, por ejemplo, los ejemplos 6 y 7). Durante el procesamiento adicional de la/s muestra/s para el aislamiento de los ácidos nucleicos, la/s muestra/s se calienta/n preferentemente en presencia de un compuesto proteolíticamente activo a una temperatura en el intervalo de 50-100°C, preferentemente de 55 a 95°C, particularmente preferente de 60 a 90°C y en particular de 65 a 85°C.

La separación de los componentes no disueltos de la solución acuosa preferentemente se soporta enfriando la mezcla después del tiempo de reacción del compuesto proteolíticamente activo, en particular si el compuesto proteolíticamente activo es activo a temperaturas elevadas, es decir, temperaturas por encima de la temperatura ambiente. El enfriamiento se lleva a cabo preferentemente incubando la muestra a una temperatura inferior a la temperatura de la digestión con proteasa, preferentemente a temperatura ambiente, en particular a 4°C o incluso a temperaturas más bajas tales como, por ejemplo, -20°C o -80 °. C, donde el enfriamiento a estas temperaturas es breve para evitar la congelación de toda la solución acuosa. De este modo, el enfriamiento se lleva a cabo preferentemente a una temperatura de 15°C o menos, 10°C o menos, 4°C o menos o incluso a temperaturas más bajas tales como, por ejemplo, -20°C o -80°C. El enfriamiento puede realizarse antes y/o durante la etapa de separación. El enfriamiento tiene la ventaja de que la separación de la fracción no disuelta, en particular la peletización, es más eficiente. Esto es particularmente ventajoso porque las muestras FFPE normalmente comprenden componentes no disueltos, en particular ADN que se reticula con proteínas, en lugar de grandes cantidades de componentes sólidos. Dichos componentes no disueltos son generalmente difíciles de peletizar. El enfriamiento ayuda a la peletización de los componentes no disueltos y, por lo tanto, hace que la separación sea más eficiente. Por lo tanto, el enfriamiento da como resultado que la fracción no disuelta que contiene principalmente ADN comprenda más ADN y, por consiguiente, la fracción disuelta que contiene ARN comprende menos contaminación de ADN debido a la separación mejorada de las fracciones individuales. Esto es particularmente ventajoso cuando se procesan muestras reticuladas que comprenden poco material celular

De acuerdo con una realización, la separación da como resultado que la fracción no disuelta que contiene principalmente ADN se obtiene en forma de un pélet a compacto. Esto permite separar fácilmente el pélet que contiene principalmente ADN de la fracción disuelta que contiene principalmente ARN.

En una tercera etapa, la fracción disuelta (A) y la fracción no disuelta (B) obtenidas de esta manera se pueden usar separadamente una de otra para una purificación de las biomoléculas presentes, preferentemente el/los ácido/s nucleico/s. Aquí, la fracción disuelta (A) se usa preferentemente para aislar el ARN, y la fracción no disuelta (B) se usa preferentemente para aislar el ADN. También está dentro del alcance de la presente invención aislar el ácido nucleico solo de una fracción y descartar la otra fracción (véanse, por ejemplo, los ejemplos 6 y 7).

Aquí, la fracción disuelta (A) se puede usar directamente, sin lisis adicional, en un proceso adecuado para el aislamiento de ácidos nucleicos. Sin embargo, se puede llevar a cabo opcionalmente una lisis adicional, por ejemplo con compuestos proteolíticamente activos, preferentemente proteasas, en la solución acuosa. Los procesos adecuados son todos los procesos y procedimientos para aislar ácidos nucleicos, en particular ARN, conocidos por las personas expertas en la técnica. Son adecuados los procesos para aislar ácidos nucleicos a partir de material de muestra fijada, como se describe en las solicitudes WO 2007/068764, WO 2008/021419, WO 2005/012523 o WO 2005/054466, o también procesos llevados a cabo con la ayuda de los kits comerciales RNeasy FFPE y miRNeasy FFPE (ambos de QIAGEN). En el último caso, la fracción A se somete a al menos una etapa de calentamiento antes de que los ácidos nucleicos se purifiquen mediante unión mediada por caótopo a una membrana de sílice. La extracción adicional y la purificación del ARN se pueden llevar a cabo preferentemente con la ayuda del proceso descrito en la solicitud WO 2007/068764. Si se usa un proceso como se describe en la solicitud WO 2007/068764 para el aislamiento de ácidos nucleicos de la fracción disuelta, la muestra se calienta en presencia de un reactivo nucleofílico. Esto puede llevarse a cabo en la solución acuosa que comprende al menos un compuesto proteolíticamente activo y los ácidos nucleicos ahora disueltos, donde el reactivo nucleofílico requerido para el proceso descrito en la solicitud WO 2007/068764 se puede añadir después de la etapa a) del proceso de acuerdo a la invención (acción del compuesto proteolíticamente activo) a la solución acuosa o incluso estar presente en la solución acuosa antes de la adición a la muestra de acuerdo con la etapa a). La separación de las fracciones puede llevarse a cabo después del calentamiento de las muestras como se describe en la solicitud WO 2007/068764 o, preferentemente, directamente después de la acción del compuesto proteolíticamente activo, antes del calentamiento adicional.

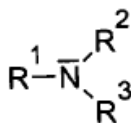
Los reactivos nucleofílicos adecuados son todas las bases de Lewis capaces de transferir electrones en un orbital vacío o en orbitales vacíos de un ácido de Lewis. Entre estas bases de Lewis, se da particular preferencia a los reactivos que tienen al menos un grupo funcional que lleva una carga negativa, está polarizado negativamente o tiene al menos un par de electrones libre.

Los compuestos que comprenden un grupo funcional que tiene una carga negativa son, por ejemplo, alcóxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos, hidróxidos de metales alcalinos o alcalinotérreos, haluros de metales alcalinos o alcalinotérreos, cianuros de metales alcalinos o alcalinotérreos y similares, sin estar limitados a los mismos.

Los reactivos que tienen al menos un grupo funcional que está negativamente polarizado son en particular los reactivos que tienen al menos un grupo funcional que contiene dos átomos que están unidos covalentemente entre sí y cuya electronegatividad según Alfred y Rochow difiere en al menos 0,25, preferentemente al menos 0,5 y más preferentemente al menos 1,0.

Sin embargo, se da preferencia particular de acuerdo con la invención a reactivos nucleófilos que tienen al menos un grupo funcional que tiene uno o dos, particularmente preferentemente uno, par/es de electrones libres, y de entre estos compuestos se da mucha más preferencia a los que tienen a al menos un grupo amino primario, secundario o

terciario de la estructura I



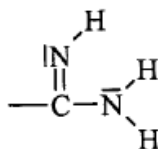
I

en la que R<sup>1</sup> es un grupo hidrocarburo C1 a C20, particularmente preferentemente un grupo hidrocarburo C2 a C15 y más preferentemente un grupo hidrocarburo C2 a C10, un grupo hidrocarburo C1 a C20 que tiene al menos heteroátomo, un grupo hidrocarburo C2 a C15 que tiene al menos un heteroátomo y más preferentemente un grupo hidrocarburo C2 a C10 que tiene al menos un heteroátomo o un sistema anular aromático opcionalmente sustituido con heteroátomo.

R<sup>2</sup> es un grupo alquilo C1 a C20, particularmente preferentemente un grupo alquilo C1 a C10 y más preferentemente un grupo alquilo C1 a C2, en particular un grupo metilo o un grupo etilo, un grupo hidroxialquilo C1 a C20 grupo, particularmente preferentemente un grupo hidroxialquilo C1 a C10 y más preferentemente un grupo hidroxialquilo C1 a C2 o un átomo de hidrógeno, siendo el más preferente un átomo de hidrógeno, y

R<sup>3</sup> es un grupo alquilo C1 a C20, particularmente preferentemente un grupo alquilo C1 a C10 y más preferentemente un grupo alquilo C1 a C2, en particular un grupo metilo o un grupo etilo, un grupo hidroxialquilo C1 a C20, particularmente preferentemente un grupo hidroxialquilo C1 a C10 y más preferentemente un grupo hidroxialquilo C1 a C2 o un átomo de hidrógeno, siendo el más preferente un átomo de hidrógeno.

De acuerdo con la invención, se da preferencia particular a reactivos nucleófilos que tienen un grupo funcional de la estructura I mostrada anteriormente que tiene en particular al menos un grupo funcional de la estructura I en la que al menos uno de los radicales R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>, más preferentemente ambos los radicales R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>, es un átomo de hidrógeno/son átomos de hidrógeno. Además, se da particular preferencia a aquellos reactivos nucleofílicos que tienen al menos un grupo funcional de la estructura I en la que el átomo de nitrógeno está unido covalentemente solamente a átomos hibridados con sp<sup>3</sup> en los radicales R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>. En particular, ninguno de los radicales R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> debería ser capaz de deslocalizar el par de electrones libres en el átomo de nitrógeno sobre los radicales R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>, respectivamente. Por lo tanto, de manera particularmente preferente, ninguno de los radicales R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> debería tener, por ejemplo, la estructura II.



II

Se da preferencia particular de acuerdo con la invención a reactivos nucleofílicos que tienen al menos un grupo funcional de la estructura I seleccionada del grupo que comprende metilamina, etilamina, etanolamina, n-propilamina, n-butilamina, isobutilamina, terc-butilamina, dimetilamina, dietilamina, dietanolamina, di-n-propilamina, diisopropilamina, dibutilamina, trimetilamina, trietilamina, trietanolamina, hexametilentetramina, 2-etilhexilamina, 2-amino-1,3-propanodiol, hexilamina, ciclohexilamina, 1,2-dimetoxipropanamina, 1-aminopentano, 2-metiloxipropilamina, tri(hidroximetil)aminometano, ácidos aminocarboxílicos, en particular glicina o histidina, o aminoguanidina, donde el último mencionado es posible, sin embargo, no se prefiere. Entre estos, se prefieren la etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, amino-1,3-propanodiol y tri(hidroximetil)aminometano. Los reactivos nucleofílicos preferentes que tienen al menos un grupo funcional de la estructura I son además aminas aromáticas seleccionadas del grupo que comprende anilina, toluidina, naftilamina, bencilamina, xilidina, xilendiaminas, naftalendiaminas, toluendiaminas, 3,3'-dimetil-4,4'-difenildiamina, fenilendiaminas, 2,4'-metilendianilina, 4,4'-metilendianilina, sulfonildianilina y dimetilbencilamina.

De acuerdo con una realización particular del proceso de acuerdo con la invención, donde el reactivo nucleofílico tiene al menos un grupo amino primario de la estructura I, el reactivo nucleofílico es una alquilamina C1 a C6, una alquildiamina C1 a C6, una alquiltriamina C1 a C6, un aminoalcohol C1 a C15, un aminodiol C1 a C15 o un ácido aminocarboxílico C1 a C15.

De acuerdo con otra realización particular del proceso de acuerdo con la invención, el reactivo nucleofílico es un compuesto heterocíclico que comprende un átomo de nitrógeno y se selecciona del grupo que comprende pirrol, piridina, quinolina, indol, azaciclopentano, azaciclohexano, morfolina, piperidina, imidazol o un derivado de estos compuestos, donde un derivado de estos compuestos se entiende preferentemente que significa un compuesto que

tiene, en lugar de un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo C1 a C3, particularmente preferentemente un grupo metilo o etilo, unido a uno o más carbonos átomos o en el átomo de nitrógeno en los compuestos mencionados anteriormente.

5 Entre los reactivos nucleófilos mencionados anteriormente, se prefieren aquellos que son solubles en agua, en particular los que tienen una solubilidad de al menos 1 g/l, de forma particularmente preferente al menos 10 g/l y más preferentemente al menos 100 g/l en agua a una temperatura de 25°C y a un pH de 7.

10 La concentración del reactivo nucleofílico en la solución acuosa utilizada está preferentemente en un intervalo de 0,1 a 10000 mmol/l, más preferentemente de 1 a 5000 mmol/l, incluso más preferentemente de 5 a 2500 mmol/l y lo más preferentemente de 20 a 1000 mmol/l. De acuerdo con una realización particularmente ventajosa del proceso de acuerdo a la invención, la concentración del reactivo nucleófilo en la solución acuosa es más de 20 mmol/l, particularmente preferentemente más de 50 mmol/l y más preferentemente más de 100 mmol/l.

15 De acuerdo a una realización, después de realizar la digestión con el compuesto proteolíticamente activo, que preferentemente es una enzima proteolítica, los enlaces cruzados en la muestra se invierten al menos parcialmente mediante calentamiento, preferentemente a una temperatura de al menos 70°C, más preferente al menos 75°C, mucho más preferente al menos 80°C o al menos 90°C durante un período de tiempo de al menos 5 minutos, preferentemente al menos 10 minutos, mucho más preferente al menos 15 minutos. El calentamiento hasta 80°C durante al menos 15 minutos es particularmente preferente para invertir los enlaces cruzados en el ARN que contiene la fracción disuelta de la muestra degradada. Se prefiere calentar hasta al menos 85°C, preferentemente al menos 90°C durante al menos 30 minutos hasta varias horas, preferentemente al menos 1,5 o al menos 2 horas, para revertir los enlaces cruzados en el ADN. Como se describió anteriormente, el calentamiento se lleva a cabo en presencia de un reactivo nucleofílico. Los tiempos de incubación adecuados también se describen en la técnica anterior citada. Esta etapa de calentamiento adicional para invertir los enlaces cruzados se puede realizar antes o después de separar la fracción disuelta que contiene principalmente ARN de la fracción no disuelta que contiene principalmente ADN. Se prefiere, en particular si también se pretende aislar el ADN posteriormente de la fracción no disuelta, realizar dicha etapa de calentamiento después de separar las fracciones porque esta etapa de calentamiento podría dar como resultado que se libere ADN adicional de la fracción no disuelta. Si solo se pretende aislar el ARN, dicha etapa de calentamiento también puede realizarse antes de separar las fracciones, porque el ADN liberado adicionalmente puede degradarse, por ejemplo realizando una digestión con DNasa. Se describe en detalle a continuación una realización preferente para realizar la digestión con DNasa que también conserva pequeñas moléculas de ARN.

20 De acuerdo con una realización, se realiza una digestión con DNasa en la fracción disuelta separada, que contiene principalmente ARN. La separación de la fracción no disuelta que comprende la cantidad principal del ADN comprendido en la muestra reticulada ya elimina la parte principal del ADN comprendido en dicha muestra. Por lo tanto, la fracción disuelta que contiene principalmente ARN que se obtiene después de la digestión parcial y la separación de las fracciones ya está agotada en ADN. Las cantidades restantes de ADN que podrían haberse liberado durante la digestión parcial en la etapa a) pueden degradarse de manera eficiente realizando una digestión con DNasa en la fracción disuelta que contiene ARN. Aislar el ARN de la muestra digerida con DNasa proporciona ARN puro que comprende poca o ninguna contaminación de ADN.

25 Por lo tanto, de acuerdo con una realización, se agrega DNasa a la fracción disuelta separada que contiene principalmente ARN. Fue muy sorprendente que la digestión con DNasa se pueda realizar de manera eficiente antes de aislar el ARN. Esto, ya que se suponía que la DNasa no podía funcionar de manera eficiente ya que los procedimientos de la técnica anterior común aíslan el ARN antes de realizar la digestión con DNasa cuando se purifica el ARN. Además, la realización de una digestión con DNasa antes de aislar el ARN también tiene ventajas considerables porque por ejemplo en comparación con el tratamiento con DNasa en columna común, la cantidad de ARN particularmente pequeño aumenta cuando se usa el procedimiento de acuerdo con la presente invención. Se realiza una digestión con DNasa respectiva en los ejemplos 6 y 7. Preferentemente, la digestión con DNasa se realiza después de que los enlaces cruzados se invirtieron calentando como se describió anteriormente.

30 El término "DNasa" se refiere a cualquier enzima que cataliza la escisión hidrolítica de los enlaces fosfodiéster en el ADN. Se conoce una amplia variedad de desoxirribonucleasas, que difieren en sus especificidades de sustrato, mecanismos químicos y funciones biológicas. El término "DNasa" se refiere a exodeoxirribonucleasas así como a endodeoxirribonucleasas. En particular, se pueden usar DNasa I y DNasa II. DNasa I es preferente.

35 La digestión con DNasa se realiza en condiciones en las que la DNasa está activa para permitir una degradación eficiente del ADN. La eficacia de la digestión con DNasa puede ser, por ejemplo controlada por la cantidad de DNasa añadida a la muestra degradada y además, mediante la adición de aditivos que promueven la actividad de la DNasa, tales como, en particular, los iones Mg y Ca. Además, dependiendo de las condiciones usadas para lograr la digestión parcial en la etapa a), las etapas de procesamiento intermedio pueden ser ventajosas para asegurar que la digestión con DNasa funcione con alta eficiencia en la fracción disuelta separada, que contiene principalmente ARN. Por ejemplo, los componentes que podrían interferir con la digestión con DNasa se pueden eliminar o diluir a una concentración que no inhibe la digestión con DNasa. La digestión con DNasa se realiza en presencia de iones Mg y Ca en concentraciones a las que la DNasa está activa. Por ejemplo, para realizar la digestión con DNasa, se pueden

añadir iones Mg y Ca a la muestra degradada, por ejemplo en forma de  $MgCl_2$  y  $CaCl_2$  para establecer concentraciones adecuadas en la mezcla de digestión con DNasa. Las concentraciones adecuadas de iones Mg y Ca dependen de la muestra y, en particular, de las condiciones de lisis usadas en la etapa de degradación a). Por ejemplo, si los iones Ca y Mg ya se proporcionan durante la digestión en la etapa a) y, por lo tanto, están presentes en la muestra degradada, se deben agregar menos cantidades de iones Mg y Ca para la digestión con DNasa o la adición de Mg y Ca no es necesaria. El uso de mayores concentraciones de iones Mg y Ca durante la digestión con DNasa es aconsejable, si los agentes quelantes tales como por ejemplo EDTA se usaron durante la etapa a). De acuerdo con una realización, los iones Mg y los iones Ca se proporcionan en la composición de reacción, preferentemente en forma de  $MgCl_2$  y  $CaCl_2$ , en una concentración seleccionada del grupo que consiste en al menos 0,2 mM cada uno, al menos 2 mM cada uno, al menos 5 mM cada uno, al menos 7,5 mM cada uno y preferentemente al menos 10 mM cada uno. Además, los iones Ca y Mg pueden proporcionarse en un intervalo de concentración para cada ion que se selecciona del grupo que consiste en 0,2 mM a 1M, 2 mM a 100 mM, 10 mM a 50 mM y 10 mM a 25 mM. La composición de reacción de digestión con DNasa que comprende la DNasa, la muestra degradada y opcionalmente, aditivos adicionales que promueven la digestión con DNasa se incuban durante un tiempo adecuado para permitir que el ADN se degrade. Preferentemente, la incubación se produce durante al menos 5 minutos, al menos preferentemente 10 minutos o al menos 15 minutos. Los intervalos adecuados incluyen 1 minuto a 6 horas, 5 a 120 minutos, 10 a 60 minutos y 15 a 30 minutos. Después de realizar la digestión con DNasa opcional, el ARN se puede aislar de la muestra. Como se debate en el presente documento, básicamente se puede usar cualquier procedimiento de aislamiento de ARN.

De acuerdo con una realización, el ARN se aísla de la fracción disuelta, opcionalmente tratada con DNasa, estableciendo condiciones de unión adecuadas añadiendo aditivos apropiados y uniendo el ARN a una fase sólida de unión a ácido nucleico. De acuerdo con una realización, el aislamiento del ARN comprende al menos las siguientes etapas:

i) añadir al menos un alcohol y/o al menos un agente caotrópico y opcionalmente otros aditivos para formar una mezcla de unión y poner en contacto la mezcla de unión con una fase sólida de unión a ácido nucleico para unir el ARN a dicha fase sólida;

ii) opcionalmente lavar el ARN mientras está unido a la fase sólida; y

iii) eluir opcionalmente el ARN de la fase sólida.

Como fase sólida de unión a ácido nucleico, puede usarse cualquier material que sea capaz de unirse a ácidos nucleicos y, por lo tanto, incluye una variedad de materiales que son capaces de unirse a ácidos nucleicos en condiciones adecuadas. Los ejemplos de fases sólidas que se pueden usar junto con la presente invención incluyen, pero sin limitación, compuestos que comprenden sílice y fases sólidas silíceas, que incluyen, pero no se limitan a, partículas de sílice, dióxido de silicio, tierra de diatomeas, vidrio, alquilsilica, silicato de aluminio y borosilicato; nitrocelulosa; papel diazotado; hidroxapatita (también denominada hidroxilapatita); nylon; óxidos metálicos; zirconia; alúmina; soportes poliméricos, soportes derivatizados con dietilaminoetilo y trietilaminoetilo, resinas de cromatografía hidrófoba (tales como fenil u octil Sepharose) y similares. El término fase sólida no pretende implicar ninguna limitación con respecto a su forma o diseño. Por lo tanto, el término fase sólida abarca materiales apropiados que son porosos o no porosos; permeables o impermeables; incluyendo, pero sin limitación, membranas, filtros, láminas, partículas, partículas magnéticas, perlas, geles, polvos, fibras y similares. De acuerdo con una realización, la superficie de la fase sólida no se modifica y, por ejemplo, no está modificada con grupos funcionales. De acuerdo con una realización preferida, la fase sólida de unión a ácido nucleico está comprendida en una columna. El término "columna" como se usa en el presente documento en particular describe un recipiente que tiene al menos dos aberturas. De ese modo, una solución y/o muestra puede pasar a través de dicha columna. El término "columna" en particular no implica ninguna restricción con respecto a la forma del recipiente que puede ser, por ejemplo redondo o angular y preferentemente es cilíndrico. Sin embargo, también se pueden usar otras formas, en particular cuando se usan columnas múltiples. La columna comprende la fase sólida de unión a ácido nucleico. Dicha fase sólida que está comprendida en dicha columna debe permitir el paso de una solución, respectivamente, de la muestra cuando se aplica a la columna. Esto significa que si, por ejemplo, se aplica una fuerza centrífuga a la columna, se permite que una solución y/o la muestra pasen a través de la columna en la dirección de la fuerza centrífuga. Como se debatió anteriormente, cuando se usa un procedimiento de aislamiento de ácido nucleico a base de una columna respectiva, la muestra se pasa habitualmente a través de la columna, por ejemplo asistida por centrifugación o vacío, y los ácidos nucleicos se unen a la fase sólida de ácido nucleico comprendida durante dicho paso. La columna se puede usar en un formato único o en formato múltiple. Dichas múltiples columnas que tienen un formato similar a las placas de múltiples pocillos y que comprenden una fase sólida de unión a ácido nucleico tal como una membrana, son bien conocidas en la técnica anterior. Preferentemente, la columna es una columna giratoria. Como fase sólida de unión a ácido nucleico comprendida en la columna, puede usarse cualquier fase sólida que se utilice habitualmente en procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos a base de columnas. Preferentemente, se usa una membrana de unión a ácido nucleico, y por lo tanto una membrana que es capaz de unirse a ácidos nucleicos. Las membranas adecuadas incluyen, pero sin limitación, membranas hidrófilas, membranas hidrófobas y membranas que se unen a ácidos nucleicos mediante intercambio iónico. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, membranas de sílice, membranas de fibra de vidrio, membranas de nylon, membranas de celulosa tales como membranas de nitrocelulosa, membranas de celulosa modificada (por ejemplo, acetilo o hidroxilo), membranas de papel, en particular papeles

modificados. Preferentemente, la membrana es porosa. Además, se prefiere usar una membrana que comprende o que consiste en sílice. Una fase sólida de unión a ácido nucleico común adicional comprendida en una columna es un relleno de partículas de unión a ácido nucleico, tales como partículas de sílice, o una capa de un material de unión a ácido nucleico (por ejemplo, gel de sílice). Por ejemplo, las partículas de sílice pueden disponerse como una capa sobre un filtro o membrana inerte, formando así una fase sólida de unión a ácido nucleico.

Para digerir los componentes no disueltos de la muestra y romper los enlaces cruzados restantes de las biomoléculas, si es apropiado, la fracción (B), que comprende los componentes no disueltos, se somete preferentemente a un tratamiento adicional. Los ácidos nucleicos solubles, predominantemente ADN, que están sustancialmente todavía en la fracción no disuelta (B), se pueden aislar mediante esta etapa de tratamiento adicional. Es adecuado cualquier proceso conocido para disolver ácidos nucleicos a partir de tejido fijado, por ejemplo, los procesos descritos en WO2007/068764 WO 2008/021419. WO 2005/012523 o WO 2005/054466 o los procesos que pueden llevarse a cabo con la ayuda de kits disponibles en el mercado, por ejemplo, los Kits de tejido FFPE de ADN QIAamp (QIAGEN), son adecuados para aislar los ácidos nucleicos, en particular el ADN, de la fracción no disuelta (B). En el último caso, los componentes no disueltos de la fracción B se someten a al menos un tratamiento adicional con un agente proteolítico, por ejemplo una proteasa, y una etapa de calentamiento. El tratamiento con proteasa produce una lisis eficaz y, por lo tanto, una liberación de los ácidos nucleicos solubles. Dado que la fracción B no disuelta en comparación con la muestra fijada completa comprende en particular solo los componentes menos fácilmente disolubles, una optimización adicional, por ejemplo una extensión de la etapa adicional de proteasa y de la etapa de calentamiento, puede ser ventajosa y conducir a rendimientos y resultados marcadamente mejorados en análisis subsecuentes (corriente abajo).

Por lo tanto, de acuerdo con una realización, el ADN se obtiene a partir de la fracción no disuelta, que contiene principalmente ADN, después de la separación de las fracciones. La obtención del ADN de la fracción no disuelta comprende de acuerdo con una realización las siguientes etapas:

i) liberar el ADN de la fracción no disuelta, que contiene principalmente ADN, sometiendo dicha fracción no disuelta a lisis con digestión enzimática de proteasas simultánea, donde preferentemente, al menos un detergente se usa durante la lisis y opcionalmente, aditivos adicionales y donde la digestión enzimática es preferentemente soportada por calentamiento (más arriba se describen condiciones adecuadas);

ii) calentar la fracción que contiene principalmente ADN para invertir al menos parcialmente los enlaces cruzados preferentemente calentando la muestra preferentemente después de la etapa i) hasta una temperatura de al menos 70°C, más preferentemente al menos 80°C, mucho más preferente al menos 85°C, más preferente al menos 90°C en presencia de un reactivo nucleofílico y

iii) aislar el ADN después de invertir los enlaces cruzados, preferentemente estableciendo condiciones de unión añadiendo aditivos apropiados y uniendo el ADN a una fase sólida de unión a ácido nucleico. Preferentemente, se añaden un agente caotrópico y un detergente, preferentemente un detergente no iónico, y alcohol para establecer las condiciones de unión. Los procedimientos adecuados de aislamiento de ADN también son bien conocidos en la técnica anterior.

De este modo, preferentemente, el proceso de acuerdo con la invención comprende, después de la etapa b), etapas adicionales para la purificación separada del ARN obtenido de la fracción A y/o el ADN obtenido del pélet B, preferentemente por precipitación, unión de los ácidos nucleicos a materiales de unión adecuados, electroforesis y/o cromatografía o combinaciones de los mismos.

Además, el proceso comprende preferentemente una etapa para el análisis/detección de los ácidos nucleicos aislados y/o purificados.

Todos los procedimientos de análisis conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, técnicas de amplificación tales como PCR, qPCR, RT-PCR, qRT-PCR y amplificación del ADN genómico completo (amplificación del genoma completo), electroforesis en gel, técnicas de transferencia, en particular transferencia Southern y transferencia Northern, análisis de microarreglos, análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (análisis RFLP), SAGE (análisis seriado de expresión génica), secuenciación que incluye secuenciación NextGeneration y secuenciación de ARN, análisis de polimorfismo de nucleótido único (análisis SNP), análisis de mutaciones, análisis epigenéticos, en particular, se pueden usar análisis de patrones de metilación o combinaciones de los mismos para analizar los ácidos nucleicos aislados mediante el procedimiento de acuerdo con la invención.

Como resulta evidente a partir de la descripción anterior, la presente invención proporciona un proceso para obtener ARN en una fracción disuelta y ADN en una fracción no disuelta de la misma muestra biológica fijada mediante reticulación, que comprende las siguientes etapas:

a) disolución parcial de la muestra en una solución tampón acuosa con proteólisis parcial simultánea de los componentes de la muestra que contienen proteína usando al menos un compuesto proteolíticamente activo para obtener una fracción disuelta (fracción A) y un residuo no disuelto (pélet, fracción B),

b) separación de la fracción disuelta del residuo no disuelto,

5 en el que la fracción disuelta comprende principalmente ARN, en base a la cantidad total de ácidos nucleicos en la fracción disuelta, y el residuo no disuelto comprende principalmente ADN, en base a la cantidad total de ácidos nucleicos en el residuo no disuelto, y en el que la separación de la fracción que comprende predominantemente ARN de la fracción que comprende predominantemente ADN no requiere ni precipitación ni extracción de uno o ambos tipos de ácido nucleico con disolventes orgánicos ni unión selectiva de uno o ambos tipos de ácido nucleico a una matriz sólida.

10 Según una realización, la separación de la fracción que comprende predominantemente ARN de la fracción que comprende predominantemente ADN no requiere ni precipitación ni extracción de uno o ambos tipos de ácido nucleico con disolventes orgánicos ni unión selectiva de uno o ambos tipos de ácido nucleico a una matriz sólida . De acuerdo con una realización, después de la separación de las fracciones, se aísla el ARN de la fracción disuelta que contiene principalmente ARN y/o se aísla el ADN de la fracción no disuelta que contiene principalmente ADN. La fracción no disuelta que contiene principalmente ADN puede descartarse después de la separación, si por ejemplo, solo el aislamiento del ARN está previsto.

15 Las realizaciones adecuadas y preferidas así como las ventajas asociadas con las etapas de digestión parcial y separación según la presente invención así como las realizaciones adecuadas y preferidas para el posterior aislamiento de ácidos nucleicos se debatieron en detalle anteriormente con respecto al proceso para el aislamiento paralelo y/o purificación de ARN y ADN de la misma muestra reticulada. Se remite a la descripción anterior que también se aplica aquí.

20 La invención se refiere además al uso de un kit para llevar a cabo el proceso de acuerdo a la invención, que comprende al menos (1) un compuesto proteolíticamente activo, preferentemente uno de los compuestos proteolíticamente activos mencionados anteriormente, (2) al menos una sustancia tampón, preferentemente una de las sustancias tampón mencionadas anteriormente y (3) al menos un tensioactivo, preferentemente uno de los tensioactivos mencionados anteriormente, y también preferentemente (4) instrucciones para llevar a cabo la proteólisis incompleta de acuerdo con la etapa (a).

25 En una realización particularmente preferida, el kit según la invención comprende además (5) al menos un material de unión a ácido nucleico y también opcionalmente (6) tampones para el aislamiento de ácidos nucleicos, preferentemente tampones de unión y/o de elución.

30 Adecuados para su uso como material de unión a ácidos nucleicos (5) son todos los materiales conocidos por los expertos en la técnica para la adsorción de ADN o ARN, dando preferencia particular a materiales a base de celulosa, en particular materiales de celulosa con funcionalidad carboxi o dietilaminoetilcelulosa , agarosa, vehículos minerales tales como sílice, vidrio, cuarzo, zeolitas u óxidos metálicos o vehículos recubiertos con material intercambiador de iones. Los materiales mencionados pueden estar presentes, por ejemplo, en forma de membranas o partículas magnéticas o no magnéticas. El material de unión a ácido nucleico está preferentemente contenido en el kit como material de columna en columnas prefabricadas o también como una suspensión. El tipo de material depende crucialmente de la estructura química del ácido nucleico a analizar, la persona experta en la técnica está familiarizada con los materiales de adsorción adecuados en cada caso para la aplicación deseada respectiva, es decir, el análisis de ARN o ADN.

35 Como tampón de elución (6), el kit de acuerdo con la invención puede comprender cualquier tampón conocido por la persona experta en la técnica y utilizado habitualmente para la elución de ácidos nucleicos a partir de materiales de unión a ácidos nucleicos. El tampón de elución es preferentemente una solución salina acuosa, en particular una solución acuosa que comprende haluros de metales alcalinos, tales como, por ejemplo, NaCl, KCl o LiCl, haluros de metales alcalinotérreos, tales como, por ejemplo, CaCl<sub>2</sub> o MgCl<sub>2</sub>, sales de amonio , tal como, por ejemplo, cloruro de amonio o sulfato de amonio, o mezclas de al menos dos de estas sales, donde el tampón de elución también puede comprender opcionalmente un sistema tampón a base de, por ejemplo, acetato de metal alcalino/ácido acético o sistemas tampón a base de tris (hidroximetil) aminometano. Si el kit se va a usar para aislar ARN de un tejido fijado y la matriz utilizada es una membrana de sílice, se prefiere particularmente usar agua, en particular agua libre de RNasa, como tampón de elución.

40 Como tampón de unión (6), el kit de acuerdo a la invención puede comprender cualquier tampón conocido por la persona experta en la técnica y utilizado habitualmente para unir ácidos nucleicos a materiales de unión a ácidos nucleicos, donde el tampón de unión tiene que corresponderse con el respectivo material de unión a ácido nucleico utilizado. Si el material de unión a ácido nucleico usado es una matriz de sílice, el tampón de unión preferentemente comprende agentes caotrópicos y opcionalmente adicionalmente un alcohol C1-C5.

### Descripción de las figuras

55 La Figura 1 muestra la separación de muestras de ARN y ADN aisladas mediante el proceso de acuerdo a la invención del sobrenadante y del pélet, respectivamente, en geles de TAE-agarosa (ADN) y geles de formaldehído-agarosa (ARN), respectivamente, después de la tinción con bromuro de etidio (Ejemplo 1). Para la comparación de tamaño, se aplicó el marcador de tamaño Lambda/HindIII (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) en el carril M.

La Figura 2 muestra el rendimiento total de los ácidos nucleicos aislados de la fracción A (sobrenadante) y la fracción B (pélet) como una función del tiempo de reacción del compuesto proteolíticamente activo (Ejemplo 3).

La Figura 3 muestra el resultado de un análisis del contenido de ARN en la fracción B en un gel de TAE-agarosa como una función del tiempo de reacción del compuesto proteolíticamente activo (Ejemplo 3).

- 5 La Figura 4 muestra el efecto del tiempo de reacción del compuesto proteolíticamente activo sobre la amplificación del ADN obtenido de la fracción B mediante PCR cuantitativa en tiempo real como el cambio del valor ct (Ejemplo 3).

10 La Figura 5 muestra el rendimiento de ADN, determinado por espectroscopía UV, que podría aislarse utilizando el proceso de acuerdo a la invención a partir de diversos tipos de tejido almacenados durante el tiempo indicado en cada caso, en comparación con el rendimiento en un proceso llevado a cabo utilizando un kit disponible comercialmente (Ejemplo 5).

La Figura 6 muestra el análisis del ADN obtenido de acuerdo con el Ejemplo 5 en un gel de TAE-agarosa. Para la comparación de tamaño, se aplicó el marcador de tamaño Lambda/HindIII (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) en el carril M.

15 La Figura 7 muestra el análisis del ADN obtenido de acuerdo con el Ejemplo 5 mediante análisis de PCR en tiempo real.

La Figura 8 muestra un análisis de bioanálizador Agilent de ARN aislado. 1-5: muestras con pretratamiento con DNasa usando el tampón de pretratamiento 1 - 5 descrito en el ejemplo 1. oc: muestras sin pretratamiento con DNasa, pero con el tratamiento con DNasa en columna como es común en la técnica anterior.

#### Ejemplos:

- 20 Ejemplo 1: Separación de ARN y ADN por el proceso de acuerdo con la invención

25 Las muestras utilizadas fueron muestras de tejido fijadas en formalina e incluidas en parafina (muestras de FFPE) de hígado de rata que se habían almacenado a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 meses después de la inclusión. Con la ayuda de un micrótopo, se prepararon secciones de un espesor de aproximadamente 20 µm a partir de estas muestras. En cada caso, se usó una sección por reacción. Los componentes del kit RNeasy FFPE y el kit QIAamp FFPE de QIAGEN se emplearon para el aislamiento posterior de ADN y ARN de las muestras procesadas.

30 Para la desparafinación, los tejidos se incubaron inicialmente en 1 ml de xileno durante 10 minutos. Después de la pelotización por centrifugación de la muestra y remoción del sobrenadante, este tratamiento con xileno se repitió dos veces más. Las muestras se trataron posteriormente en cada caso dos veces con etanol anhidro seguido de soluciones acuosas de etanol (primero 96% de etanol y luego 70% de etanol) y se secaron a 37°C durante 10 minutos.

35 Los pélets de muestra desparafinada obtenidos de esta manera se trataron con 150 µl de una solución acuosa que comprendía Tris 20 mM, EDTA 2 mM y SDS al 0,2% (p/v) (pH 7) y se mezclaron con 10 µl de una solución de proteinasa K (> 600 mAU/ml) como compuesto proteolíticamente activo. La mezcla obtenida se incubó a 56°C con agitación a 1400 rpm durante 15 min. Para separar la fracción disuelta (A) de la fracción no disuelta (B), las muestras se centrifugaron y el sobrenadante (fracción A) se eliminó del pélet que contenía los componentes no disueltos (fracción B).

40 Para determinar la distribución de los tipos de ácido nucleico, ARN y ADN, en las dos fracciones, se aisló el ARN del sobrenadante y del pélet, en cada caso, de 4 muestras (muestras 1 a 4) y de 4 muestras más (muestras 5 -8) se aisló el ADN de sobrenadante y pélet.

45 Para aislar el ARN del sobrenadante (fracción A) de las muestras 1-4 (muestras 1a a 4a), el sobrenadante se incubó a 80°C durante 15 minutos. Para ajustarse a las condiciones de unión al ADN, se añadieron 320 µl de un tampón caotrópico, por ejemplo, el tampón RBC de QIAGEN. La mezcla se aplicó a una membrana de sílice, por ejemplo, presente en la columna de eliminador de ADNg de QIAGEN, y se pasó a través de la membrana por centrifugación a 14000 rpm durante 1 minuto. Dado que la composición de la mezcla conduce a la unión selectiva del ADN a la membrana de sílice, el ARN está en el eluido de la columna. Para ajustarse a las condiciones de unión para ARN, este eluido se mezcló con etanol y luego se aplicó una vez más a una membrana de sílice, presente en la columna RNeasy MinElute de QIAGEN, y se pasó a través de la membrana por centrifugación a 14000 rpm durante 1 minuto. La membrana de sílice se lavó dos veces con 500 µl del tampón de lavado que contenía alcohol RW2 (QIAGEN). La membrana se secó mediante 5 minutos de centrifugación a 14000 rpm, y el ARN, después de una incubación de 1 minuto, se eluyó con 30 µl de agua.

50 Para aislar el ARN del pélet (fracción B) de las muestras 1-4 (muestras 1b a 4b), el gránulo se mezcló con 150 µl del tampón PKD de QIAGEN, que comprende un tensioactivo y un reactivo nucleofílico, y 10 µl de proteinasa K de QIAGEN. Después de 15 minutos de incubación a 56°C y luego 15 minutos de incubación a 80°C, el lisado se trató



con un tampón de unión que contenía caótropro, por ejemplo, el tampón RBC de QIAGEN, y la mezcla se aplicó a una membrana de sílice. por ejemplo, presente en la columna RNeasy MinElute de QIAGEN, y se pasó a través de la membrana por centrifugación a 10000 rpm durante 1 minuto. Como se describió anteriormente, la membrana de sílice se lavó dos veces con el tampón de lavado RW2, y el ARN se eluyó.

5 Para aislar el ADN del sobrenadante (fracción A) de las muestras 5-8 (muestras 5a a 8a), el sobrenadante se completó hasta un volumen total de 180 µl con el tampón de lisis ATL que contenía tensioactivo (QIAGEN) y se agregaron 20 µl de proteinasa K de QIAGEN. Las muestras se incubaron a 56°C con agitación a 1400 rpm durante 1 hora y luego se calentaron a 90°C durante 1 hora. Para degradar cualquier ARN presente, después de la incubación se mezclaron 4 µl de una solución de RNasa A (100 mg/ml) en la muestra. Para una purificación adicional del ADN, 10 las muestras se mezclaron con, en cada caso, 200 µl de un tampón caotrópico, por ejemplo, el tampón AL de QIAGEN y etanol. La mezcla se aplicó a una membrana de sílice, por ejemplo presente en la columna QIAamp MinElute de QIAGEN, y se pasó a través de la membrana por centrifugación a 10000 rpm durante 1 min. La membrana de sílice se lavó entonces con 500 µl del tampón de lavado que comprendía sal de guanidina AW1 y luego con 500 µl del tampón de lavado que contenía alcohol AW2 de QIAGEN. La membrana se secó mediante una 15 centrifugación de dos minutos a 14000 rpm, y el ADN, después de una incubación de un minuto, se eluyó mediante centrifugación con 30 µl de un tampón de elución de ADN, por ejemplo, el tampón ATE de QIAGEN.

Para aislar el ADN del pélet (fracción B) de las muestras 5-8 (muestras 5b a 8b), el pélet se trató con un tampón de lisis de ADN habitual, tal como, por ejemplo, 180 µl del tampón ATL que comprendía tensioactivo de QIAGEN. Dado que el pélet solo contenía componentes que aún no se habían disuelto por el tratamiento previo, se llevó a cabo una 20 lisis adicional con 20 µl de proteinasa K de QIAGEN para disolver también estos componentes no disueltos. Después de una incubación de una hora a 56°C y una posterior incubación de una hora a 90°C, el lisado se trató con un tampón de unión que contenía caótropro, por ejemplo el tampón AL de QIAGEN, y también etanol. La mezcla se aplicó a una membrana de sílice, por ejemplo presente en la columna QIAamp MinElute de QIAGEN, y se pasó a través de la membrana por centrifugación a 10000 rpm durante 1 minuto. Como se describió anteriormente, la 25 membrana de sílice se lavó con los tampones de lavado AW1 y AW2, la membrana se secó y el ADN se eluyó.

Para determinar la distribución de los ácidos nucleicos aislados de esta manera a partir de las dos fracciones sobrenadante (A) y pélet (B), se cuantificaron los ácidos nucleicos de ambas fracciones usando procedimientos adecuados. La determinación del rendimiento y la pureza del ADN y ARN se llevó a cabo a través de la densidad óptica (OD) midiendo la absorción de la muestra a 260/280 nm. El rendimiento se indica en cada caso en porcentaje del rendimiento total. Aquí, el rendimiento total es la suma del rendimiento de un tipo de ácido nucleico en sobrenadante y pélet. La Tabla 1 muestra los valores medios de cuatro determinaciones.

Tabla 1:

	ARN (muestras 1-4)		ADN (muestras 5-8)	
	% de rendimiento	OD (260/280)	% de rendimiento	OD (260/280)
Sobrenadante (fracción A)	91,9%	1,96	20,5	1,96
Pélet (fracción B)	8,1%	1,69	79,5	1,79

35 Para un análisis adicional, en cada caso 10 µl de los ácidos nucleicos aislados de las fracciones respectivas se separaron por procedimientos habituales en un gel de TAE-agarosa (acetato de Tris/EDTA) en el caso de ADN o en un gel de formaldehído/agarosa en el caso de ARN y se tiñeron con bromuro de etidio. El resultado se muestra en la Figura 1.

Los resultados muestran que, cuando se aplica el proceso de acuerdo con la invención, hay una clara separación/fraccionamiento de los ácidos nucleicos antes de la purificación posterior. El ARN se encuentra predominantemente en el sobrenadante, mientras que el ADN se encuentra predominantemente en la fracción de pélets. 40

Ejemplo 2: Efecto de la cantidad de compuesto proteolíticamente activo usado

Las muestras usadas para este experimento fueron muestras de tejido fijadas en formalina e incluidas en parafina (muestras FFPE) de hígado de rata que se habían almacenado a temperatura ambiente durante aproximadamente 7 45 meses después de la inclusión. Con la ayuda de un micrótopo, se prepararon secciones de un espesor de aproximadamente 10 µm a partir de estas muestras. En cada caso, se usaron dos secciones por reacción. Los componentes del kit RNeasy FFPE y el kit QIAamp FFPE de QIAGEN se emplearon para el aislamiento posterior de ADN y ARN de las muestras procesadas.

50 Para la desparafinación, los tejidos se incubaron inicialmente en 1 ml de heptano cada uno durante 10 minutos. Después de la adición de 50 µl de metanol y el mezclado, la muestra se centrifugó, el sobrenadante se eliminó y el

residuo se secó al aire a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Los pélets de muestra desparafinada obtenidos de esta manera se trataron con 150 µl de una solución acuosa que comprendía Tris 20 mM, EDTA 2 mM y SDS al 0,2% (pH 7) y se mezclaron con 10 µl, 20 µl o 40 µl de una solución de proteinasa K (> 600 mAU/ml) como compuesto proteolíticamente activo. Esta mezcla se incubó a 56°C con agitación a 1400 rpm durante 15 minutos. Para separar la fracción disuelta (A) de la fracción no disuelta (B), las muestras se enfriaron inicialmente en hielo durante 5 minutos y luego se centrifugaron a 4°C. Para un mayor aislamiento del ARN, se eliminó el sobrenadante y se descartó el pélet.

El sobrenadante se incubó posteriormente a 80°C durante 15 minutos. Para ajustarse a las condiciones de unión, se añadieron entonces 320 µl de un tampón caotrópico, por ejemplo el tampón RBC de QIAGEN, y la mezcla obtenida se mezcló con etanol, se aplicó a una membrana de sílice, por ejemplo presente en la columna RNeasy MinElute de QIAGEN y se pasó a través de la membrana por centrifugación a 14000 rpm durante 1 minuto. La membrana de sílice se lavó dos veces pasando a través de 500 µl del tampón de lavado que contenía alcohol RW2. La membrana se secó por 5 minutos de centrifugación a 14000 rpm. El ARN fue entonces, después de una incubación de 1 minuto, eluido por centrifugación aplicando 30 µl de agua.

Para analizar el ARN aislado de esta manera, el rendimiento se determinó midiendo la absorción a 260 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

La integridad del ARN se determinó usando un Bioanalizador Agilent y se estableció en forma del valor RIN, donde un valor RIN de 10 representa ARN completamente intacto y un valor RIN de 0 representa ARN completamente degradado. Los resultados también se muestran en la Tabla 2.

Para examinar el efecto de diferentes cantidades del compuesto proteolíticamente activo no solo sobre el aislamiento de los ácidos nucleicos en el proceso de acuerdo a la invención, sino también sobre el análisis posterior por amplificación, el ARN se analizó mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Para este fin, el ARN aislado se utilizó, en cada caso en dos determinaciones, para detectar un amplicón del transcrito madH7. Los eluidos se diluyeron cada uno en una proporción de 1:10 con agua. En cada caso, se usaron 5 µl de estas soluciones diluidas para la PCR en tiempo real. La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl con una mezcla maestra adecuada para RTPCR en tiempo real, tal como, por ejemplo, el kit QuantiTect SYBRGreen RT-PCR de QIAGEN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La amplificación se llevó a cabo en un instrumento de amplificación en tiempo real adecuado tal como, por ejemplo, el sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7900HT de Applied Biosystems (Carlsbad, California, EE.UU.). Los valores ct medidos se usaron para determinar los valores medios, que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2:

Cantidad de proteinasa K [µl]	Rendimiento de ARN [µg]	Valor RIN	Valor ct
10	14,77	7,2	25,7
20	14,09	7,6	25,2
40	13,42	7,3	25,1

Los resultados muestran que todas las cantidades de proteinasa K utilizadas conducen a rendimientos comparables, integridad de ARN comparable y resultados comparables en RT-PCR en tiempo real. La cantidad del compuesto proteolíticamente activo en el proceso de acuerdo con la invención puede variarse así dentro de un amplio intervalo.

Ejemplo 3: tiempo de reacción del compuesto proteolíticamente activo

Las muestras utilizadas para este experimento fueron muestras de tejido fijadas en formalina y incluidas en parafina (muestras FFPE) de hígado de rata que se habían almacenado a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 meses después de la inclusión. Con la ayuda de un micrótopo, se prepararon secciones de un espesor de aproximadamente 20 µm a partir de estas muestras. En cada caso, se usó una sección por reacción. Los componentes del kit RNeasy FFPE y el kit QIAamp FFPE de QIAGEN se emplearon para el aislamiento posterior de ADN y ARN de las muestras procesadas.

La desparafinación, rehidratación y secado de las secciones se realizaron como se describe en el Ejemplo 1. Los pélets de muestra desparafinada obtenidos de esta manera se trataron con 150 µl de una solución acuosa que comprendía Tris 20 mM, EDTA 2 mM y SDS al 0,2% (pH 7). y se mezclaron con 10 µl de una solución de proteinasa K (> 600 mAU/ml) como compuesto proteolíticamente activo. Esta mezcla se incubó a 56°C con agitación a 1400 rpm durante hasta 3 horas. Para separar la fracción disuelta (A) de la fracción no disuelta (B), las muestras se centrifugaron y el sobrenadante (fracción A) se eliminó del sedimento que contenía los componentes no disueltos (fracción B). Como se describe en el Ejemplo 1, el ARN se aisló del sobrenadante (fracción A) y el ADN se aisló del

pélet (fracción B).

Para analizar los ácidos nucleicos aislados de esta manera, se determinó el rendimiento midiendo la absorción a 260 nm. Los resultados se muestran en la Figura 2. Al aumentar el tiempo de reacción de la proteinasa, el rendimiento de ácidos nucleicos disminuye en el pélet y aumenta correspondientemente en el sobrenadante, ya que se disuelven más ácidos nucleicos del pélet por la acción proteínica más prolongada.

Sin embargo, esta distribución total de ácidos nucleicos no proporciona ninguna información sobre el contenido de ADN y ARN en las fracciones. Por lo tanto, en cada caso, se analizaron 10 µl de eluido de las fracciones que contienen ADN (B) en un gel de TAE-agarosa. El resultado se muestra en la Figura 3.

Es claramente evidente que después de un tiempo de reacción de proteinasa K de solo 5 minutos, una gran parte del ARN todavía permanece en la fracción no disuelta, es decir, el pélet. Al aumentar el tiempo de reacción de la proteinasa, esta cantidad se reduce, y a partir de un tiempo de reacción de 15 minutos en adelante, la fracción no disuelta comprende solo pequeñas cantidades de ARN, o el ARN ya no es sustancialmente detectable. Por el contrario, el ADN permanece considerablemente más tiempo (durante al menos 90 minutos) en la fracción B no disuelta. Al optimizar el tiempo de reacción del compuesto proteolíticamente activo, es posible ajustar la distribución de los tipos de ácido nucleico en las dos fracciones.

Para examinar el efecto de la duración del tiempo de reacción del compuesto proteolíticamente activo en el procedimiento de acuerdo con la invención, no solo en el aislamiento de los ácidos nucleicos, sino también en el análisis por amplificación, el ADN se analizó por PCR cuantitativa en tiempo real. Con este fin, en cada caso se usaron volúmenes idénticos de los eluidos de ADN aislados, en cada caso en dos determinaciones, para detectar un amplicón del gen pmp. La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl con una mezcla maestra adecuada para RT-PCR en tiempo real, tal como, por ejemplo, el kit QuantiTect SYBRGreen PCR de QIAGEN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La amplificación se llevó a cabo en un instrumento de amplificación adecuado en tiempo real tal como, por ejemplo, el sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7900HT de Applied Biosystems (Carlsbad, California, EE.UU.). Los valores medios determinados a partir de los valores ct se muestran en la Figura 4.

Los resultados muestran que al aumentar el tiempo de reacción aumenta el valor ct, que se debe a la cantidad reducida de ADN en el eluido. Con el aumento del tiempo de reacción, no solo el ARN sino también el ADN pasa cada vez más al sobrenadante, donde, sin embargo, el ARN se disuelve y se encuentra en el sobrenadante marcadamente más rápidamente que el ADN. Mientras que el gel muestra que incluso después de un tiempo de reacción de 15 minutos, el ARN ya se disuelve virtualmente completamente del pélet y se encuentra en el sobrenadante, la cantidad de ADN en la fracción B no disuelta, según el gel y la PCR en tiempo real, se reduce significativamente solo después de más de 90 minutos.

Ejemplo 4: Uso de diferentes soluciones acuosas en el proceso de acuerdo con la invención

Las muestras usadas para este experimento fueron muestras de tejido fijadas en formalina y incluidas en parafina (muestras FFPE) de hígado de rata que se habían almacenado a temperatura ambiente durante aproximadamente 7 meses después de la inclusión. Con la ayuda de un micrótopo, se prepararon secciones de un espesor de aproximadamente 20 µm a partir de estas muestras. En cada caso, se usó una sección por reacción. Los componentes del kit RNeasy FFPE y el kit QIAamp FFPE de QIAGEN se emplearon para el aislamiento posterior de ADN y ARN de las muestras procesadas.

La desparafinación, rehidratación y secado de las secciones se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2. Los pélets de muestra desparafinada obtenidos de esta manera se trataron con 150 µl de una solución acuosa 1 que comprendía Tris 20 mM, EDTA 2 mM y SDS al 0,2% (pH 7), una solución acuosa 2 que comprendía Tris 50 mM, EDTA 25 mM, SDS al 1%, Nonidet NP40 al 0,1% y NaCl 500 mM (pH 7,4) o una solución acuosa 3 que comprendía Tris 50 mM, EDTA 100 mM, SDS al 3% y NaCl 10 mM (pH 8,2) y se mezclaron con 10 µl de una solución de proteinasa K (> 600 mAU/ml) como compuesto proteolíticamente activo. La mezcla se incubó a 56°C con agitación a 1400 rpm durante 15 min. Para separar la fracción disuelta (A) de la fracción no disuelta (B), las muestras se enfriaron inicialmente en hielo durante 5 min. y luego se centrifugaron a 4°C. El ADN se aisló del pélet (fracción B) como se describe en el Ejemplo 1, recogiendo el pélet en un tampón que comprendía Tris 50 mM, EDTA 25 mM, SDS al 1%, Nonidet P-40 al 0,1% y NaCl 500 mM (pH 7.4). El rendimiento se determinó midiendo la absorción a 260 nm. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3:

Solución acuosa	Redimiendo de ADN [µg]
1	3.0
2	3.7
3	2.3

Las tres soluciones acuosas utilizadas dan un buen rendimiento de ADN, ciertas variaciones son causadas por la heterogeneidad de las muestras. El ejemplo muestra que se puede usar una gran cantidad de soluciones acuosas diferentes para el proceso de acuerdo con la invención, siendo posible variar tanto los ingredientes como su concentración. De este modo, es posible adaptar la solución acuosa que se va a usar al compuesto proteolíticamente activo empleado.

Ejemplo 5: Aislamiento de ADN de diferentes tipos de tejido con la ayuda del proceso de acuerdo con la invención

Las muestras utilizadas fueron muestras de FFPE de rata que se almacenaron a temperatura ambiente durante diferentes períodos de tiempo: riñón (tiempo de almacenamiento de aproximadamente 13 meses), hígado (tiempo de almacenamiento de aproximadamente 6 meses), bazo (tiempo de almacenamiento de aproximadamente 19 meses), corazón ( tiempo de almacenamiento de aproximadamente 13 meses) y pulmón (tiempo de almacenamiento de aproximadamente 6 meses). Con la ayuda de un micrótopo, se prepararon secciones de un espesor de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  a partir de cada una de estas muestras. En cada caso, se usó una sección por reacción. Los componentes del kit RNeasy FFPE y el kit QIAamp FFPE de QIAGEN se emplearon para el posterior aislamiento de ácidos nucleicos a partir de las muestras procesadas con la ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención.

Para comparar el aislamiento de ADN con la ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención con un proceso establecido específicamente para la purificación de ADN a partir de muestras FFPE, se usaron secciones de las mismas muestras en cada caso para el aislamiento de ADN con el kit QIAamp FFPE de acuerdo a las instrucciones del fabricante (QIAGEN) y se usaron como muestras de control.

La desparafinación, rehidratación y secado de las secciones se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2. Los pélets de muestra desparafinada obtenidos de esta manera se trataron con 150  $\mu\text{l}$  de una solución acuosa que comprendía Tris 20 mM, EDTA 2 mM y SDS al 0,2% (pH 7) y se mezclaron con 10  $\mu\text{l}$  de una solución de proteinasa K (> 600 mAU/ml) como compuesto proteolíticamente activo. Esta mezcla se incubó a 56°C con agitación a 1400 rpm durante 15 min. Para separar la fracción disuelta (A) de la fracción no disuelta (B), las muestras se enfriaron inicialmente en hielo durante 5 minutos y luego se centrifugaron. El ADN se aisló del pélet (fracción B) como se describe en el Ejemplo 1, con una incubación de dos horas a 90°C.

Para el análisis del ADN obtenido, el rendimiento se determinó midiendo la absorción a 260 nm. Los valores medios y las desviaciones estándar de las determinaciones duplicadas se muestran en la Figura 5. Con la ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención, el ADN podría aislarse de todas las muestras, siendo el rendimiento en todos los casos superior al rendimiento obtenido en el proceso de control.

Además, en cada caso, se separaron 10  $\mu\text{l}$  del eluido de ADN en un gel de TAE-agarosa y se tñieron con bromuro de etidio. El resultado se muestra en la Figura 6. En todos los casos, el ADN aislado con la ayuda del procedimiento de acuerdo con la invención mostró aproximadamente la misma distribución de tamaño molecular que el ADN aislado en el proceso de control.

Para examinar la idoneidad del ADN aislado mediante el proceso de acuerdo con la invención para análisis de amplificación, el ADN obtenido de esta manera se usó en un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real. Volúmenes idénticos de los eluidos de ADN aislados se usaron en determinaciones por duplicado para detectar un amplicón de 465 pares de bases del gen pmp.

En muestras de FFPE, el ADN está presente en principio en forma fragmentada, donde el grado de fragmentación y, por lo tanto, el espectro de los fragmentos de ADN que pueden aislarse dependen, entre otros, de la naturaleza de la fijación e inclusión, pero también del tipo de muestra y el almacenamiento de la muestra. Además, el grado de reticulación en el ADN que permanece después del aislamiento del ácido nucleico limita la amplificación y, en particular, el tamaño posible del amplicón. Para asegurar una amplificación eficiente a pesar de esto, en principio se da preferencia a los amplicones pequeños. El tamaño de amplicón de 465 pb usado aquí es muy grande para las muestras FFPE y se eligió para probar la calidad y la idoneidad del ADN aislado mediante el proceso de acuerdo con la invención.

La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 25  $\mu\text{l}$  con una mezcla maestra adecuada para RT-PCR en tiempo real, tal como, por ejemplo, el kit QuantiTect SYBRGreen PCR de QIAGEN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La amplificación se llevó a cabo en un instrumento de amplificación en tiempo real adecuado, tal como, por ejemplo, el sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7900HT de Applied Biosystems (Carlsbad, California, EE.UU.). Los valores ct medidos se usaron para determinar los valores medios y las desviaciones estándar del ADN aislado de acuerdo con la invención, que se muestran en la Figura 7.

En todos los casos, el valor ct es comparable al del ADN de control o incluso inferior, lo que confirma una mejor capacidad de amplificación y/o un mayor rendimiento.

En total, los resultados muestran que el proceso de acuerdo con la invención permite el aislamiento de ADN de muestras FFPE que, con respecto al rendimiento, calidad, tamaño de fragmento e idoneidad para análisis de amplificación, es al menos tan bueno o mejor que el ADN aislado por un proceso conocido de la técnica anterior para

el aislamiento específico de ADN a partir de muestras FFPE.

Ejemplo 6: Aislamiento de ARN de diferentes tipos de tejido mediante el proceso de acuerdo con la invención

Las muestras utilizadas para este experimento fueron muestras FFPE de rata que se almacenaron a temperatura ambiente durante diferentes períodos de tiempo: riñón (tiempo de almacenamiento de aproximadamente 5 meses), hígado (tiempo de almacenamiento de aproximadamente 24 meses), corazón (tiempo de almacenamiento de aproximadamente 24 meses) y pulmón (tiempo de almacenamiento de aproximadamente 24 meses). Con la ayuda de un micrótopo, se prepararon secciones de un espesor de aproximadamente 20 µm a partir de estas muestras. En cada caso, se usó una sección por reacción. Los componentes del kit RNeasy FFPE y el kit QIAamp FFPE de QIAGEN se emplearon para el posterior aislamiento de ácidos nucleicos a partir de las secciones FFPE con la ayuda del proceso de la invención.

Para comparar el aislamiento de ARN con la ayuda del proceso de acuerdo con la invención con un proceso establecido específicamente para la purificación de ARN a partir de muestras FFPE, se usaron secciones de las mismas muestras para el aislamiento de ARN con el kit RNeasy FFPE de acuerdo con la instrucciones del fabricante (QIAGEN) y se utilizaron como muestras de control.

La desparafinación, rehidratación y secado de las secciones se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 2. Los pélets de muestra desparafinada obtenidos de esta manera se trataron con 150 µl de una solución acuosa que comprendía Tris 20 mM, EDTA 2 mM y SDS al 0,2% (pH 7) y se mezclaron con 10 µl de una solución de proteinasa K (> 600 mAU/ml) como compuesto proteolíticamente activo. Esta mezcla se incubó a 56°C con agitación a 1400 rpm durante 15 min. Para separar la fracción disuelta (A) de la fracción no disuelta (B), las muestras se enfriaron inicialmente en hielo durante 5 minutos y luego se centrifugaron. Para un mayor aislamiento del ARN, se eliminó el sobrenadante (fracción A) y se descartó el pélet.

El sobrenadante se incubó posteriormente a 80°C durante 15 min. La muestra se enfrió a temperatura ambiente durante cinco minutos, después de lo cual se añadieron 20 µl de un tampón DNasa convencional (que comprendía, por ejemplo, Tris-HCl 0,46 M (pH 7,5), NaCl 114 mM, MgCl<sub>2</sub> 114 mM, CaCl<sub>2</sub> 114 mM), 15 µl de agua desionizada y 5 µl de solución de DNasa I de QIAGEN, y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se añadieron 400 µl de un tampón caotrópico, por ejemplo tampón RLT de QIAGEN, la mezcla se mezcló con etanol, se aplicó a una membrana de sílice, por ejemplo presente en la columna RNeasy MinElute de QIAGEN, y se pasó a través de la membrana por centrifugación a 14000 rpm durante 1 min. La membrana de sílice se lavó dos veces con 500 µl de tampón de lavado que contenía alcohol RW2 (QIAGEN). La membrana se secó mediante 5 minutos de centrifugación a 14000 rpm, y el ARN, después de una incubación de 1 minuto, se eluyó por centrifugación aplicándolo con 30 µl de agua.

Para analizar el ARN aislado de esta manera, el rendimiento se determinó midiendo la absorción a 260 nm. Los valores medios de las determinaciones duplicadas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4:

Tejido	Rendimiento [µg]	
	Muestra	Control
Pulmón	9,1	8,2
Hígado	2,7	2,6
Riñón	2,3	2,2
Corazón	7,6	5,3

Con la ayuda del proceso de acuerdo con la invención, fue posible aislar ARN de todas las muestras, donde en todos los casos los rendimientos obtenidos con el proceso de acuerdo con la invención fueron comparables o superiores a los de los controles.

Para examinar la idoneidad del ARN aislado mediante el proceso de acuerdo con la invención para análisis de amplificación, el ARN se usó en ensayos de RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se usaron volúmenes idénticos de los eluidos de ARN aislados en cada caso en determinaciones por duplicado para detectar un amplicón del transcripto madH7 y el transcripto c-jun. La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 25 µl con una mezcla maestra adecuada para RT-PCR en tiempo real, tal como, por ejemplo, el kit QuantiTect SYBRGreen RT-PCR de QIAGEN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La amplificación se llevó a cabo en un instrumento de amplificación adecuado en tiempo real tal como, por ejemplo, el sistema de detección de secuencia ABI PRISM @ 7900HT de Applied Biosystems (Carlsbad, California, EE.UU.). Además, se detectó microRNA16

(miR16) en los eluidos de ARN utilizando el sistema miScript PCR, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (QIAGEN) mediante RT-PCR en tiempo real. Los valores medios obtenidos a partir de los valores ct medidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5:

		Pulmón (24 meses)	Hígado (24 meses)	Riñón (6 meses)	Corazón (24 meses)
madH7	muestra	24,9	26,1	22,8	28,2
	control	27,6	26,8	23,6	29,2
c-jun	muestra	26,1	26,9	26,6	28,7
	control	28,2	27,2	26,7	29,7
miR16	muestra	17,4	19,0	20,8	19,9
	control	20,44	21,1	19,4	21,2

5

En todos los casos, el valor ct medido de la muestra procesada de acuerdo con la invención es comparable al de la muestra de control o incluso inferior, lo que se debe a una mejor capacidad de amplificación o a una cantidad mayor de ARN.

Ejemplo 7: tratamiento con DNasa para la purificación eficaz de ARNmi

10 Para este experimento, se usaron muestras FFPE de rata que se habían almacenado a temperatura ambiente durante diferentes periodos de tiempo: cerebro (tiempo de almacenamiento de aproximadamente 5 meses) y corazón (tiempo de almacenamiento de aproximadamente 18 meses). Con la ayuda de un micrótopo, se prepararon secciones de un espesor de aproximadamente 20 µm a partir de estas muestras. En cada caso, se usó una sección por reacción. Los componentes del kit RNeasy FFPE y el kit QIAamp FFPE de QIAGEN se emplearon para el posterior aislamiento de ácidos nucleicos a partir de las secciones FFPE con la ayuda del proceso de la invención.

15

Para comparar el aislamiento de ARNmi con la ayuda del proceso de acuerdo con la invención con un proceso establecido específicamente para la purificación de ARNmi de muestras FFPE, se usaron secciones de las mismas muestras para el aislamiento de ARNmi con el kit miRNeasy FFPE de acuerdo con las instrucciones del fabricante (QIAGEN) y se utilizaron como muestras de control.

20

Los pélets de muestra desparafinada obtenidos de esta manera se trataron con 150 µl de una solución acuosa que comprendía Tris 20 mM, EDTA 2 mM y SDS al 0,2% (pH 7) y se mezclaron con 10 µl de una solución de proteinasa K (> 600 mAU/ml) como compuesto proteolíticamente activo. Esta mezcla se incubó a 56°C con agitación a 1400 rpm durante 15 min. Para separar la fracción disuelta (A) que contenía principalmente ARN de la fracción no disuelta (B) que contenía principalmente ADN, las muestras se enfriaron inicialmente en hielo durante 3 minutos y luego se centrifugaron. Para un aislamiento adicional del ARN que incluía ARNmi, se eliminó el sobrenadante (fracción A) y se descartó el sedimento que contenía ADN.

25

El sobrenadante se incubó posteriormente a 80°C durante 15 minutos para invertir los enlaces cruzados. La muestra se enfrió a temperatura ambiente durante cinco minutos, después de lo cual se añadieron 20 µl de tampones diferentes para facilitar la actividad de DNasa (tampones de pretratamiento 1 - 5, véase a continuación), 15 µl de agua y 5 µl de solución de DNasa I de QIAGEN. Se usaron los siguientes tampones intermedios para este experimento:

30

tampón de pretratamiento 1: Tris-HCl 0,46 M (pH 7,5), NaCl 114 mM, MgCl<sub>2</sub> 114 mM, CaCl<sub>2</sub> 114 mM

tampón de pretratamiento 2: Tris-HCl 0,46 M (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 114 mM, CaCl<sub>2</sub> 114 mM

tampón de pretratamiento 3: Tris-NCl 46 mM (pH 7,5), NaCl 11,4 mM, MgCl<sub>2</sub> 11,4 mM, CaCl<sub>2</sub> 11,4 mM

35

tampón de pretratamiento 4: Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM

tampón de pretratamiento 5: Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM

La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Para aislar el ARN incluidos ARN pequeños como micro ARN de la muestra digerida con DNasa después se añadieron 400 µl de un tampón caotrópico, por ejemplo tampón RLT de QIAGEN, la mezcla se mezcló con 1400 µl de etanol al 96-100%, se aplicó a una membrana de sílice, por ejemplo presente en la columna RNeasy MinElute de QIAGEN, y se pasó a través de la membrana por centrifugación a 14000 rpm durante 1 min. La membrana de sílice se lavó dos veces con 500 µl del tampón de lavado que contenía alcohol RPE (QIAGEN). La membrana se secó por 5 minutos de centrifugación a 14000 rpm, y

40

el ARN, después de una incubación de 1 minuto, se eluyó mediante centrifugación aplicándolo con 30 µl de agua.

Para comparación, las mismas muestras se usaron para la purificación de ARN incluidos ARN pequeños sin pretratamiento con DNasa, pero con un tratamiento común con DNasa en columna después de unir el ARN a la membrana. La desparafinación y la digestión con proteinasa K se realizaron como se describió anteriormente.

5 Después de eso, se añadieron 320 µl de un tampón caotrópico, por ejemplo tampón RLT de QIAGEN, la mezcla se mezcló con 1120 µl de etanol al 96-100%, se aplicó a una membrana de sílice, por ejemplo presente en la columna RNeasy MinElute de QIAGEN, y se pasó a través de la membrana por centrifugación a 14000 rpm durante 1 min. La membrana de sílice se lavó con 350 µl de un tampón de lavado que contenía reactivos caotrópicos y etanol, como  
10 tampón RWT (QIAGEN). Luego se aplicaron 80 µl de una mezcla que comprendía 10 µl de DNasa 1 y un tampón DNasa apropiado (por ejemplo, tampón RDD (QIAGEN)) sobre la membrana y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Después de eso, la membrana se lavó de nuevo con tampón RWT y se lavó dos veces con 500 µl del tampón de lavado que contenía alcohol RPE (QIAGEN). La membrana se secó por 5 minutos de centrifugación a 14000 rpm, y el ARN, después de una incubación de 1 minuto, se eluyó por centrifugación aplicándolo con 30 µl de agua.

15 Para analizar el ARN aislado de esta manera, se analizó a modo de ejemplo el ARN del cerebro usando un Bioanalizador Agilent, que separa las moléculas de ARN en función del tamaño. La Fig. 8 muestra los resultados de la medición del Bioanalizador. El ARN de las muestras FFPE siempre está parcialmente degradado y el grado de degradación depende de múltiples factores como la fijación, inclusión y almacenamiento de la muestra y el procedimiento de extracción de ARN. Por lo tanto, la visualización en forma de gel del ARN muestra en todos los  
20 casos ARN parcialmente degradado (véase la Fig. 8). El ARNr 28S no lo es y el ARNr 18S solo es visible semanalmente. Además, se producen muchos fragmentos de ARN desde el tamaño de la banda de 28srRNA hasta pesos moleculares bajos. El tratamiento con DNasa común en columna da como resultado rendimientos muy bajos de la población de ARN más pequeña, incluido. ARNmi (ver flecha). Por el contrario, el pretratamiento con DNasa antes de la carga de la columna de acuerdo con la presente invención permite el aislamiento de altas cantidades de  
25 ARN de muy bajo peso molecular.

Para determinar la eficacia de la purificación de ARNmi en particular, se analizó el ARN purificado para la detección y cuantificación de ARNmi 16 usando el sistema miScript PCR, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (QIAGEN) mediante RT-PCR en tiempo real. Los valores medios obtenidos a partir de los valores ct medidos se muestran en la Tabla 1.

30 Tabla 6:

Tratamiento con DNasa	Cerebro	Corazón
tampón de pretratamiento 1	18,30	20,03
tampón de pretratamiento 2	18,17	19,39
tampón de pretratamiento 3	18,17	20,43
tampón de pretratamiento 4	18,25	20,06
tampón de pretratamiento 5	18,63	19,91
Tratamiento con DNasa en columna	20,33	21,49

En todos los casos, los valores ct medidos son menores en las muestras con pretratamiento con DNasa, mientras que el tratamiento con DNasa en columna da valores ct significativamente mayores. Los valores ct más bajos representan mayores cantidades de ARNmi con una diferencia de valor ct de uno que indica aproximadamente la  
35 cantidad doble de ARNmi detectado. Por lo tanto, el pretratamiento con DNasa antes de aislar el ARN aumenta significativamente la eficacia de purificación de ARNmi sobre la digestión con DNasa en columna de acuerdo con el estado de la técnica.

En general, los resultados muestran que el proceso de acuerdo a la invención permite el aislamiento de ARN de  
40 muestras FFPE que, con respecto al rendimiento, calidad, tamaño del fragmento e idoneidad para análisis de amplificación, es al menos tan bueno como el ARN aislado mediante un proceso de aislamiento conocido de la técnica anterior y específico para el aislamiento de ARN de muestras FFPE.

## REIVINDICACIONES

1. Proceso para obtener ARN en una fracción disuelta y ADN en una fracción no disuelta de la misma muestra biológica fijada mediante reticulación, que comprende las siguientes etapas:

5 a) disolución parcial de la muestra en una solución tampón acuosa con proteólisis parcial simultánea de los componentes de la muestra que contienen proteína usando al menos un compuesto proteolíticamente activo para obtener una fracción disuelta (fracción A) y un residuo no disuelto (pélet, fracción B),

b) separación de la fracción disuelta del residuo no disuelto,

10 en el que la fracción disuelta comprende principalmente ARN, en base a la cantidad total de ácidos nucleicos en la fracción disuelta, y el residuo no disuelto comprende principalmente ADN, en base a la cantidad total de ácidos nucleicos en el residuo no disuelto,

en el que la separación de la fracción que comprende predominantemente ARN de la fracción que comprende predominantemente ADN no requiere ni precipitación ni extracción de uno o ambos tipos de ácido nucleico con disolventes orgánicos ni unión selectiva de uno o ambos tipos de ácido nucleico a una matriz sólida.

15 2. Proceso de acuerdo a la reivindicación 1 para el aislamiento paralelo y/o purificación de ácidos ribonucleicos (ARN) y ácidos desoxirribonucleicos (ADN) o para la separación de ARN de ADN.

3. Proceso de acuerdo a la reivindicación 2, donde la solución tampón acuosa comprende al menos una sustancia tampón, preferentemente seleccionada del grupo que comprende Tris, Hepes, Pipes, Mops y acetato de metal alcalino/ácido acético y/o preferentemente al menos un tensoactivo, preferentemente seleccionado de el grupo que comprende dodecilsulfato de sodio (SDS), desoxicolato de sodio, 3-(3-colamidopropil) dimetilamonio-1-propanosulfonato (CHAPS), fenil éteres fenílicos de polietilenglicol o mezclas de los mismos, particularmente preferentemente dodecilsulfato de sodio, éter nonilfenílico de polietilenglicol que tiene un grado de etoxilación de 40 y/o éter(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenílico de polietilenglicol que tiene un grado de etoxilación de 9-10 y opcionalmente comprende además al menos una sustancia seleccionada del grupo que comprende

25 - agentes complejantes, preferentemente ácido etilendiamina-N,N,N',N'-tetraacético (EDTA), ácido etilenglicol bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) citrato sódico o mezclas de estos,

- agentes caotrópicos, preferentemente seleccionados del grupo que comprende hidrocloreuro de guanidina, tiocianato de guanidina, isotiocianato de guanidina, perciratos, NaI, KI y urea, preferentemente en una concentración de 0,1 a 10 M,

30 - agentes reductores, preferentemente seleccionados del grupo que comprende ditiotreitól (DTT), ditioueritrol (DTE), tiosulfato de sodio, β-mercaptoetanol o mezclas de estos, y

- sales inorgánicas, preferentemente haluros de metales alcalinos, tales como, por ejemplo, NaCl, KCl o LiCl, haluros de metales alcalinotérreos, particularmente preferentemente CaCl<sub>2</sub> o MgCl<sub>2</sub>, sales de amonio, particularmente preferentemente, cloruro de amonio o sulfato de amonio, sulfato de litio o mezclas de estos.

35 y además preferentemente tiene un pH en el intervalo de 6 a 9, con preferencia de 6,5 a 8,5 y particularmente preferentemente de 6,8 a 7,5.

4. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 o 3, donde el compuesto proteolíticamente activo se selecciona del grupo que comprende proteasas y compuestos proteolíticamente activos no enzimáticos, preferentemente proteinasa K, tripsina, quimotripsina, papaína, pepsina, pronasa, endoproteinasa Lys-C y bromuro de cianógeno, o mezclas de estos, en particular proteinasa K, y la concentración total de los compuestos proteolíticamente activos en la solución acuosa está preferentemente en un intervalo de 0,001 a 5% en peso, particularmente preferentemente de 0,01 a 2,5% en peso y en particular de 0,05 a 0,2% en peso, en base al peso total de la solución acuosa y/o donde la disolución parcial de la muestra en la solución tampón acuosa preferentemente tiene lugar mediante la incubación de la muestra en la solución tampón acuosa a una temperatura de 18 a 80°C, en particular de 50 a 65°C, y preferentemente durante un período de 30 segundos a 5 días, particularmente preferentemente de 1 minuto a 5 horas, más preferentemente de 5 a 90 minutos y en particular de 10 a 30 minutos.

5. Proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que la muestra biológica fijada mediante reticulación es una muestra incluida en parafina, preferentemente una muestra incluida en parafina fijada en formalina (muestra FFPE).

50 6. Proceso de acuerdo a la reivindicación 5, en el que el proceso comprende, antes de la disolución parcial de acuerdo con la etapa (a), una etapa (i) para la remoción selectiva de la parafina, preferentemente poniendo en contacto la muestra con un disolvente orgánico hidrófobo, particularmente preferentemente usando un hidrocarburo apolar alifático o aromático de una longitud de cadena de más de 6 y menos de 17 átomos de carbono o mezclas de estos, opcionalmente con la adición de un alcohol C1-C5, en particular hidrocarburo o una mezcla de hidrocarburo



seleccionada del grupo que comprende xileno, heptano y aceite mineral, opcionalmente con adición de 1-25% en volumen de metanol

- 5 7. Proceso de acuerdo a la reivindicación 6, donde el proceso comprende, después de la remoción de la parafina de acuerdo con la etapa (i) y antes de la disolución parcial de la muestra en la solución tampón acuosa de acuerdo con la etapa (a), al menos una de las siguientes etapas:
- (ii) rehidratación de la muestra, preferentemente mediante lavado repetido de la muestra con soluciones acuosas de alcohol C1 a C5 de contenido de agua sucesivamente creciente,
  - (iii) secado de la muestra y/o
  - (iv) homogeneización de la muestra.
- 10 8. Proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde para la posterior liberación del ADN del residuo no disuelto obtenido, el residuo no disuelto se somete a lisis con digestión enzimática de proteasa simultánea.
- 15 9. Proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, que comprende además etapas posteriores a la etapa (b) según la reivindicación 1 para la purificación separada del ARN obtenido de la fracción A disuelta y/o el ADN obtenido del pélet B, preferentemente por precipitación, unión a materiales de unión a ácidos nucleicos, electroforesis y/o cromatografía.
10. El proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que la fracción no disuelta que contiene principalmente ADN se descarta después de la separación y/o se realiza una digestión con DNasa en la fracción disuelta que contiene ARN principalmente antes de aislar el ARN de dicha fracción.
- 20 11. Proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, donde el proceso comprende además una etapa para detectar los ácidos nucleicos aislados y/o purificados, preferentemente seleccionados del grupo que comprende técnicas de amplificación, en particular PCR, qPCR, RT-PCR, qRT-PCR. y amplificación del ADN genómico completo (amplificación del genoma completo), electroforesis en gel, técnicas de transferencia, en particular transferencia Southern y transferencia Northern, análisis de microarreglos, análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (análisis RFLP), SAGE (análisis seriado de expresión génica), secuenciación incluida la secuenciación NextGeneration y la secuenciación de ARN, análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (análisis SNP), análisis de mutaciones, análisis epigenéticos, en particular análisis de patrones de metilación o combinaciones de los mismos.
- 25 12. Uso de un Kit que comprenda al menos
- 30 (1) un compuesto proteolíticamente activo, preferentemente un compuesto proteolíticamente activo de acuerdo con la reivindicación 4,
- (2) al menos una sustancia tampón, preferentemente una sustancia tampón según la reivindicación 3 y
- (3) al menos un tensioactivo, preferentemente un agente tensioactivo según la reivindicación 3, y
- (4) opcionalmente instrucciones para llevar a cabo la proteólisis incompleta de acuerdo con la etapa (a)
- 35 (5) opcionalmente al menos un material de unión a ácido nucleico y también opcionalmente (6) tampones para la purificación de ácidos nucleicos, preferentemente tampones de unión y/o elución para llevar a cabo un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11.
13. Uso del kit de acuerdo a la reivindicación 12 para el diagnóstico, pronóstico, decisiones con respecto a la terapia y/o la monitoreo de la terapia de una enfermedad usando muestras fuera de un cuerpo humano o animal.
- 40 14. El proceso de acuerdo a la reivindicación 1, que comprende al menos una de las siguientes características:
- 1) después de la separación de las fracciones, el ARN se aísla de la fracción disuelta que contiene principalmente ARN y/o se aísla el ADN de la fracción no disuelta que contiene principalmente ADN
  - 2) la fracción no disuelta que contiene principalmente ADN se descarta después de la separación.

Fig. 1

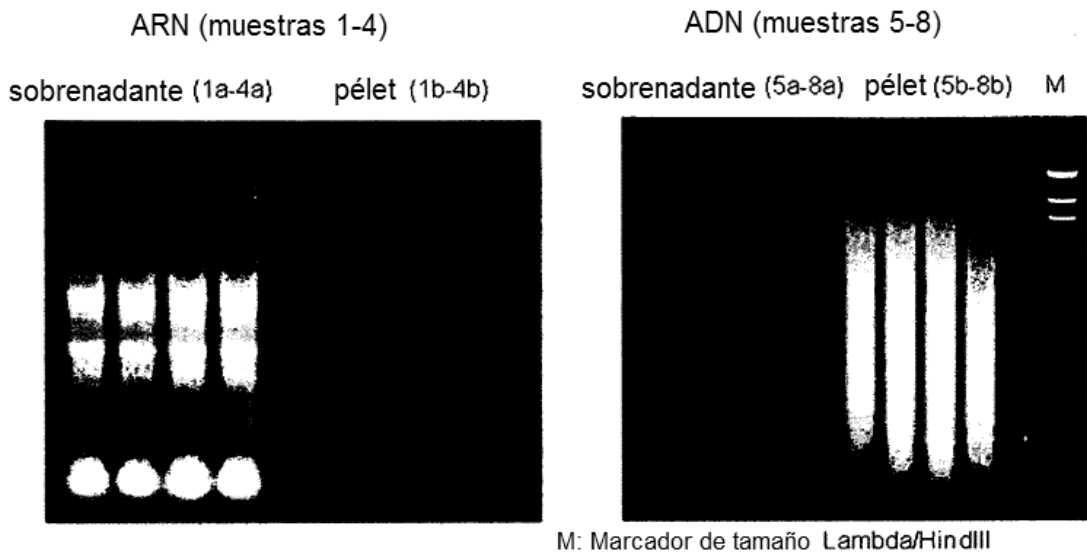


Fig. 2

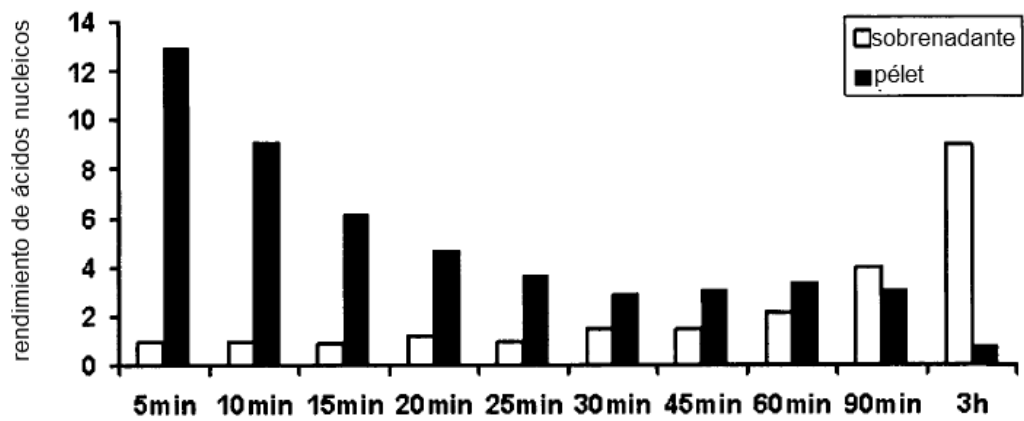


Fig. 3

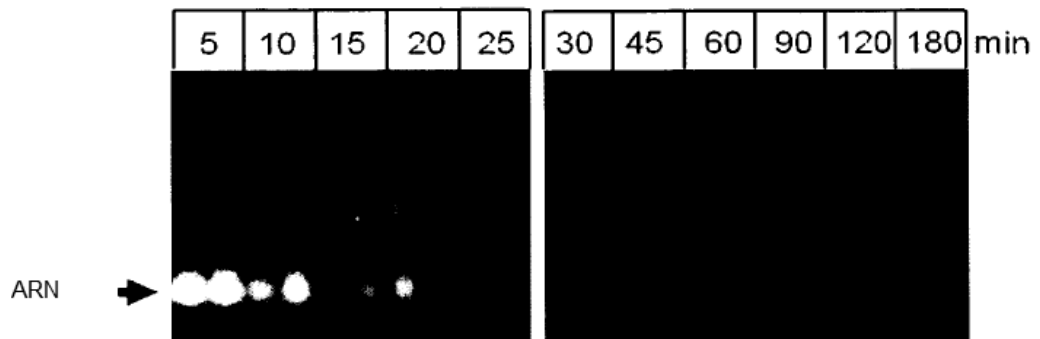


Fig. 4

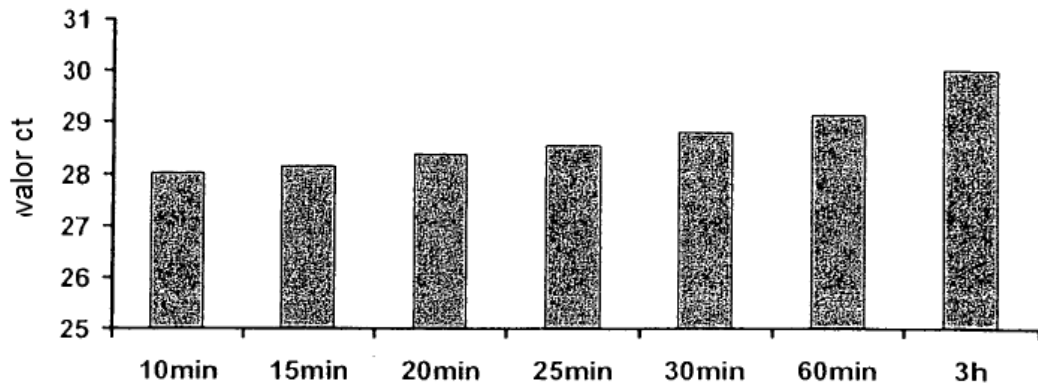


Fig. 5

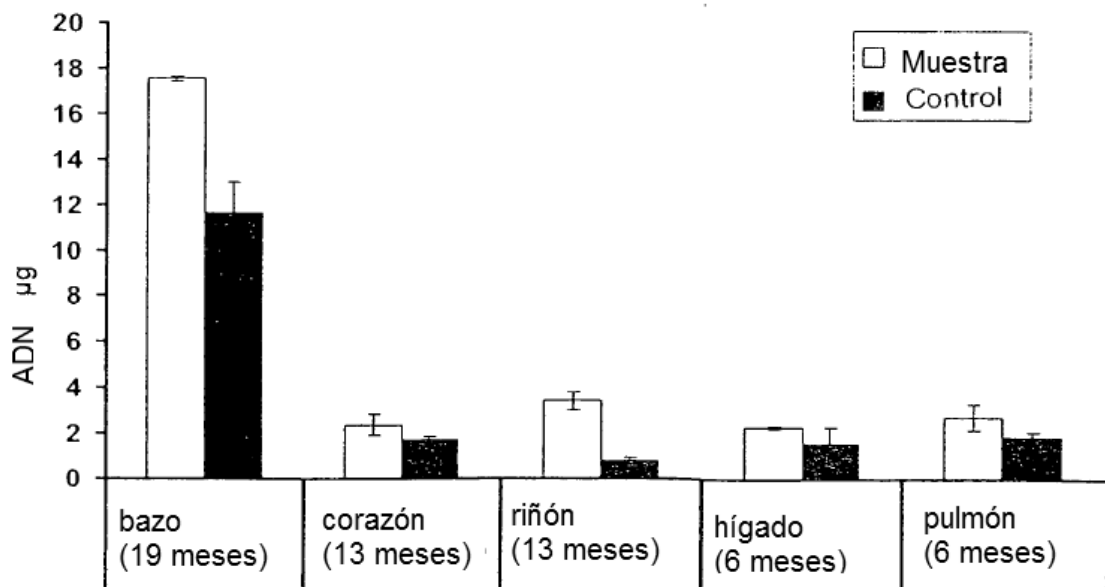
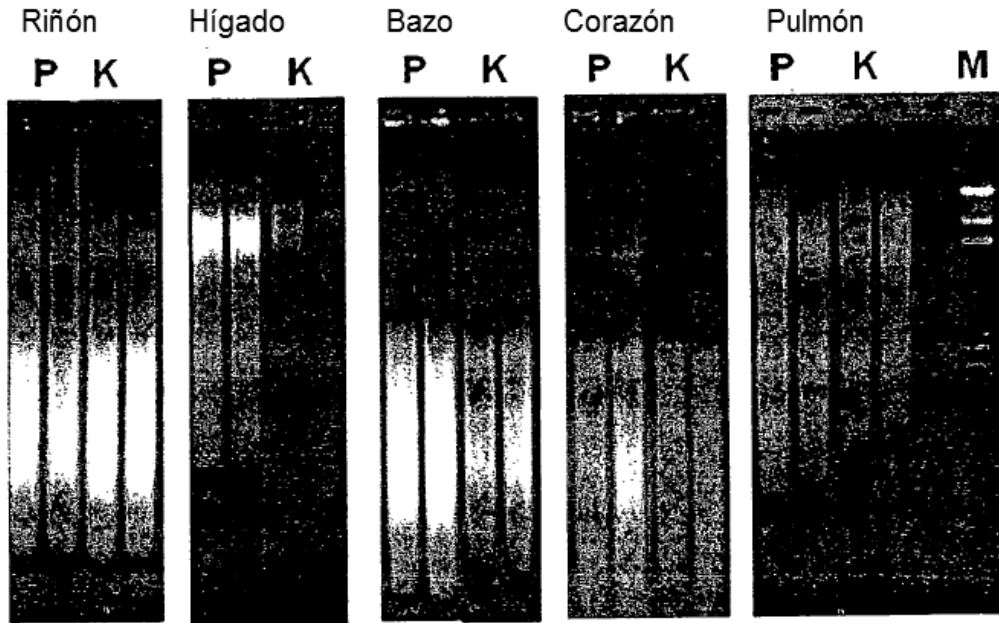


Fig. 6



P: muestra, K: control, M: marcador Lambda/HindIII

Fig. 7

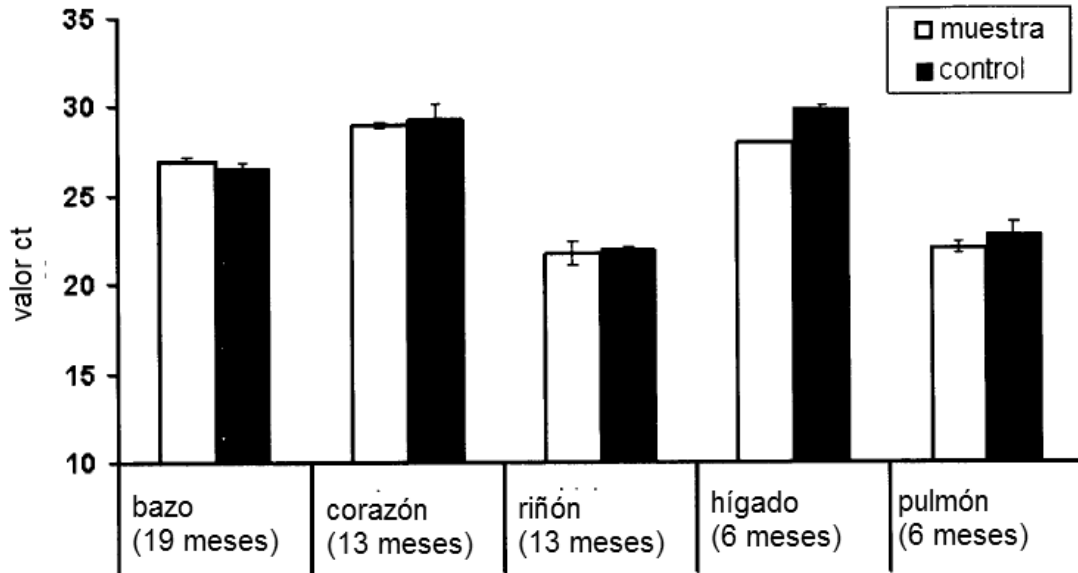


Fig. 8

