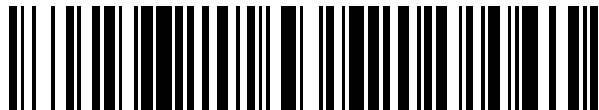


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 672**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2012 PCT/EP2012/068847**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13045432**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2012 E 12770443 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2761001**

54 Título: **Método rápido para aislar ácidos nucleicos extracelulares**

30 Prioridad:

26.09.2011 EP 11007824

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

13.12.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HORLITZ, MARTIN;
NOCON, ANNETTE;
SPRENGER-HAUSSELS, MARKUS;
GRÜNEFELD, PETER y
ERBACHER, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 693 672 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método rápido para aislar ácidos nucleicos extracelulares

El trabajo que condujo a esta invención ha recibido financiación del Séptimo programa marco de la Comunidad Europea (FP7/2007-2013) con el contrato de concesión n.º 222916.

5 **Campo de la invención**

La invención dada a conocer en el presente documento se refiere a métodos para aislar ácidos nucleicos extracelulares a partir de una muestra, en particular plasma o suero, y a las tecnologías asociadas.

Antecedentes

Se han identificado ácidos nucleicos extracelulares en plasma, suero y otros líquidos corporales. Los ácidos nucleicos extracelulares que se encuentran en muestras respectivas son hasta cierto punto resistentes a la degradación debido al hecho de que están protegidos frente a las nucleasas (por ejemplo debido a que se secretan en forma de un complejo de proteolípido, están asociados con proteínas o están contenidos en vesículas). La presencia de niveles elevados de ácidos nucleicos extracelulares tales como ADN y/o ARN en muchos estados médicos, tumores malignos y procesos infecciosos es de interés entre otros el examen, el diagnóstico, el pronóstico, la vigilancia del progreso de una enfermedad, para identificar posibles dianas terapéuticas y para monitorizar la respuesta al tratamiento. Adicionalmente, está usándose ADN/ARN fetal elevado en la sangre materna para determinar por ejemplo la identidad de género, evaluar anomalías cromosómicas y monitorizar complicaciones asociadas con el embarazo. Además de ácidos nucleicos extracelulares de mamífero que se derivan por ejemplo de células tumorales o del feto, las muestras que comprenden ácidos nucleicos extracelulares también pueden comprender otros ácidos nucleicos de interés que no están comprendidos en células. Un ejemplo importante, no limitativo son ácidos nucleicos patógenos tales como ácidos nucleicos virales. El aislamiento eficaz de ácidos nucleicos virales a partir de muestras tales como en particular muestras de sangre o muestras derivadas de la sangre es también importante para muchas aplicaciones de diagnóstico. Por tanto, los ácidos nucleicos extracelulares son en particular útiles en el pronóstico y diagnóstico no invasivos y pueden usarse, por ejemplo, como marcadores de diagnóstico en muchos campos de aplicación, tales como pruebas genéticas prenatales no invasivas, oncología, medicina de trasplantes o muchas otras enfermedades y, por tanto, son de relevancia para el diagnóstico (por ejemplo ácidos nucleicos derivados de feto o tumor). Sin embargo, también se encuentran ácidos nucleicos extracelulares en seres humanos sanos. Se describen por ejemplo métodos de análisis y aplicaciones comunes de ácidos nucleicos extracelulares en los documentos WO97/035589, WO97/34015, Swarup *et al*, FEBS Letters 581 (2007) 795-799, Fleischhacker Ann. N.Y. Acad. Sci. 1075: 40-49 (2006), Fleischhacker y Schmidt, Biochimica et Biophysica Acta 1775 (2007) 191-232, Hromadnikova *et al* (2006) ADN y Cell biology, volumen 25, número 11 págs. 635-640; Fan *et al* (2010) Clinical Chemistry 56:8.

Por tanto, el aislamiento eficaz de ácidos nucleicos extracelulares es de gran importancia con el fin de permitir un análisis fiable. Sin embargo, los ácidos nucleicos extracelulares están comprendidos a menudo sólo en una concentración baja en las muestras. Por ejemplo están presentes ácidos nucleicos circulantes libres en plasma en una concentración de 1-100 ng/ml de plasma. Además, los ácidos nucleicos extracelulares a menudo circulan como fragmentos de un tamaño de 500 nt, 300 nt (cuando se indica el tamaño y por tanto la longitud de cadena el término "nt" también incluye "pb" en el caso de ADN) o incluso menos (nucleosomas circulantes). Adicionalmente, el ácido nucleico extracelular diana real que se supone que va a identificarse para fines de diagnóstico normalmente también representa sólo una pequeña fracción entre los ácidos nucleicos extracelulares totales. Por ejemplo, fragmentos de ADN específicos de tumor son muy poco comunes y a menudo están comprendidos en una concentración que es 1000 veces menor que el fondo de ácido nucleico extracelular "normal". Por tanto, se desea procesar grandes volúmenes de muestra con el fin de obtener cantidades suficientes de ácidos nucleicos extracelulares y en particular cantidades suficientes de las moléculas diana poco comunes contenidas en la misma para los ensayos posteriores.

Se conocen varios métodos en la técnica anterior para aislar ácidos nucleicos extracelulares a partir de muestras, tales como en particular muestras de plasma. En este caso, también están disponibles comercialmente varios kits. Sin embargo, aun cuando estos kits proporcionan resultados útiles, tienen desventajas que necesitan mejora.

Por ejemplo, el kit de ácido nucleico circulante QIAamp permite procesar un tamaño de muestra de hasta 5 ml para aislar los ácidos nucleicos extracelulares. Sin embargo, requiere una extracción manual de los ácidos nucleicos. La automatización de una preparación de muestra de gran volumen respectiva es difícil de implementar porque el kit respectivo necesita manipular un volumen de proceso global de hasta 25 ml debido a la química usada (tampones de lisis y unión). Sin embargo, los sistemas robóticos convencionales pueden procesar sólo un volumen de hasta 3 ml. Además, el kit respectivo también requiere varias etapas de método. Por tanto, sería ventajoso un método que también permitiera el procesamiento de grandes volúmenes de muestra pero al mismo tiempo permitiera automatizar el proceso de aislamiento. Otros kits disponibles comercialmente que tienen como objetivo el aislamiento de por ejemplo ácidos nucleicos virales a partir de muestras libres de células tales como plasma, sólo pueden procesar volúmenes de muestra bastante pequeños (véase por ejemplo el kit viral ChargeSwitch® EasyPlex™). En este caso, el procesamiento de volúmenes de muestra más grandes sería ventajoso, porque esto permitiría aumentar el

rendimiento de ácido nucleico.

Por tanto, los métodos de la técnica anterior tienen varias desventajas. Para superar las desventajas de la técnica anterior, se desea proporcionar un método para aislar ácidos nucleicos extracelulares a partir de grandes volúmenes de muestra. Esto garantizaría que se aislan suficientes ácidos nucleicos extracelulares para las aplicaciones posteriores. Si no se cumple este requisito, existe el riesgo de que por ejemplo incluso métodos sensibles no puedan detectar las moléculas diana contenidas en la población de ácidos nucleicos extracelulares aislados. Además, los métodos de la técnica anterior a menudo requieren mucho tiempo y por tanto requieren varias etapas de manipulación y por tanto tiempo invertido. En este caso, se desea proporcionar un método sencillo y rápido que requiera sólo unas pocas etapas para aislar los ácidos nucleicos extracelulares. Esto reduciría también posibles errores debidos a fallos en la manipulación durante la preparación. Además, se desea proporcionar un método que sea adecuado para la automatización. Una vez que se ha establecido una diana de diagnóstico para pruebas de rutina, los clientes requieren automatización para gestionar rendimientos superiores por ejemplo en laboratorios. Un protocolo de aislamiento automatizado tendría ventajas significativas en el campo del diagnóstico porque reduciría los riesgos de resultados erróneos debido a errores que se producen durante el aislamiento manual de ácido nucleico. Sin embargo, los robots que están diseñados para realizar tales procesos de aislamiento de ácido nucleico automatizados están limitados por el volumen de muestra máximo que pueden manipular (véase anteriormente). El aumento del volumen mediante la adición de reactivos necesarios para realizar el proceso de aislamiento reduce por tanto directamente la cantidad de muestra que puede procesarse y por tanto la cantidad de ácido nucleico que puede obtenerse mediante una única ronda del proceso de aislamiento automatizado. Finalmente, los kits de la técnica anterior requieren habitualmente etapas para lisar la muestra. Las etapas de lisis respectivas, que se realizan comúnmente en la técnica anterior, no sólo se requieren para por ejemplo liberar los ácidos nucleicos de las células. Las etapas de lisis respectivas se realizan también habitualmente cuando se aíslan ácidos nucleicos a partir de las denominadas muestras libres de células tales como plasma con el fin de desnaturalizar y/o digerir contaminaciones proteicas u otras sustancias contaminantes que podrían interferir, por ejemplo, con la unión del ácido nucleico a la fase sólida y/o podrían conducir a una purificación inapropiada. Para realizar la etapa de lisis respectiva, a menudo se añaden grandes volúmenes de reactivos de lisis tales como por ejemplo agentes caotrópicos. La necesidad de realizar una etapa de lisis de volumen creciente respectiva es una desventaja, porque el volumen de la muestra real que puede procesarse por ejemplo en un sistema automatizado se reduce.

El documento US 2005/0106602 describe métodos de aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras de material celular. No se realiza lisis química. En su lugar, se usan grupos de unión a ácido nucleico, que sirven para un fin doble, concretamente unirse a los ácidos nucleicos y soportar la lisis de las células. El documento WO2006/036243 describe un método similar.

Melkonyan *et al.* Transrenal nucleic acids: "From proof of principle to clinical tests", 2008, describen el aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares a partir de orina. La muestra se pone en contacto con una matriz de intercambio aniónico de Q-Sepharose para unirse a los ácidos nucleicos que después de eso se lavan y se eluyen. Los detalles del protocolo de aislamiento usado se describen en Shekhtman *et al.* "Optimization of transrenal DNA analysis: Detection of fetal DNA in maternal urine" (Clinical Chemistry 55:4 páginas 723-729 (2009)). Shekhtman *et al.* enseñan la dilución masiva de la orina antes de unir los ácidos nucleicos a la fase sólida. Se diluyen 10 ml de orina con 10 ml de agua y la muestra diluida resultante se pone en contacto con la Q-Sepharose. Se describe un método similar en el documento WO2008/45505 que también describe un método basado en columna para aislar ácidos nucleicos libres de células a partir de orina o plasma sanguíneo.

El documento WO02/48164 describe un método de aislamiento de ácidos nucleicos usando una resina de intercambio aniónico y un procedimiento de carga-cambio. A un primer pH, la muestra se pone en contacto con un material que comprende un grupo ionizable, en el que el material tiene una carga positiva a su primer pH, de manera que los ácidos nucleicos se unen en el material. Los ácidos nucleicos se liberan a un segundo pH superior al que la carga del material es negativa, neutra o menos positiva. El aislamiento de ácidos nucleicos circulantes, tales como ácido nucleico extracelular derivado de tumor no se describe.

El documento DE 10 2008 063 003 describe un método para aislar ácidos nucleicos usando superficies de intercambio aniónico. El aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares usando un gran volumen de muestra no se describe. El documento WO2010/072821 es la solicitud PCT correspondiente y describe asimismo un método para aislar ácidos nucleicos usando superficies de intercambio aniónico. El documento DE 10 2008 063 001 también da a conocer un método para aislar ácidos nucleicos usando grupos de intercambio aniónico y fases sólidas diseñadas específicamente para unir ácidos nucleicos.

Kirsch *et al.*: An improved method for the isolation of free-circulating plasma DNA and cell-free DNA from other body fluids, 2008, describe un método para aislar ácidos nucleicos libres de células usando el kit NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel). No se usa una superficie de intercambio aniónico para unir los ácidos nucleicos.

Ivancic-Jelecki *et al.*, J Chromatography, 2009, vol. 1216(13): págs. 2717-2724 describen el aislamiento de ADN libre de células a partir de plasma mediante cromatografía sobre columnas monolíticas cortas.

El documento WO2009/102632 describe un método para aislar ácidos nucleicos libres de células uniéndolos a un

ligando tal como en particular un anticuerpo de unión a ADN.

El objeto de la presente invención es proporcionar un método para aislar ácidos nucleicos extracelulares a partir de una muestra que contiene ácidos nucleicos extracelulares, que evita al menos una de las desventajas de la técnica anterior comentadas anteriormente. En una realización específica un objeto de la presente invención es proporcionar un método sencillo y rápido para aislar ácidos nucleicos extracelulares que es adecuado para la automatización y permite procesar grandes volúmenes de muestra.

Sumario de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Según la reivindicación 1, se proporciona un método para aislar ácidos nucleicos extracelulares a partir de una muestra uniendo los ácidos nucleicos extracelulares a una fase sólida que porta grupos de intercambio aniónico, en el que dicho método comprende las siguientes etapas:

a. acidificar la muestra para establecer las condiciones de unión y unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida en una mezcla de unión que tiene un primer pH de $\leq 6,5$ que permite la unión de los ácidos nucleicos extracelulares a los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida, en el que la fase sólida está dotada de partículas magnéticas;

b. separar la fase sólida con los ácidos nucleicos extracelulares unidos;

c. opcionalmente lavar los ácidos nucleicos extracelulares;

d. eluir los ácidos nucleicos extracelulares de la fase sólida, en el que la elución se produce a un segundo pH que se encuentra en el intervalo de ≥ 8 a ≤ 14 ;

en el que la muestra es una muestra libre de células o reducida en células que se obtuvo a partir de un líquido corporal eliminando las células mediante separación y en el que los ácidos nucleicos extracelulares son ADN extracelular.

La presente invención se basa en el hallazgo de que pueden aislarse eficazmente ácidos nucleicos extracelulares a partir de diversas muestras diferentes usando un protocolo especial que implica el uso de un material de intercambio aniónico que se une a los ácidos nucleicos extracelulares.

El método de aislamiento según la presente invención tiene ventajas notables con respecto a los métodos usados en la técnica anterior porque es rápido, permite el procesamiento de grandes volúmenes de muestra, requiere etapas de manipulación mínimas, proporciona una alta tasa de recuperación de ácidos nucleicos extracelulares y puede automatizarse. Todo lo que se requiere para el aislamiento eficaz de los ácidos nucleicos extracelulares es la acidificación de la muestra para establecer las condiciones de unión, unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida y separar la fase sólida con los ácidos nucleicos extracelulares unidos de la muestra restante. Sorprendentemente, no son obligatorias etapas de lisis para preparar la muestra para el aislamiento de ácidos nucleicos. Además, tampoco hay necesidad de añadir grandes volúmenes de reactivos o agentes diluyentes para preparar la muestra para el aislamiento de ácidos nucleicos y por ejemplo para establecer las condiciones de unión. Por tanto, el método tiene la ventaja de que la mezcla de unión puede consistir predominantemente en el material de muestra. Esto es una ventaja importante con respecto a métodos de purificación convencionales, tales como por ejemplo métodos que se basan en el uso de una fase sólida de poli(ácido silícico) y poli(ácido silícico) y agentes caotrópicos, en la que casi el 50% de la mezcla de unión consiste en la química que tiene que añadirse para lisar y/o preparar la muestra para la unión. La acidificación que se realiza según la presente invención para establecer las condiciones de unión contribuye poco sólo al volumen de la mezcla de unión (habitualmente menos del 10% o incluso menos del 5%). Por tanto, ya que no hay necesidad de añadir grandes volúmenes de reactivos para establecer las condiciones de unión, la cantidad de muestra que puede procesarse por ejemplo en un sistema automatizado se aumenta hasta un máximo. Esto es una ventaja importante cuando se usan sistemas automatizados que están restringidos con respecto al volumen de muestra que pueden manipular. Al permitir el procesamiento de grandes volúmenes de muestra cuando se usan procesos automatizados, la cantidad de ácidos nucleicos extracelulares aislados puede aumentarse mediante el método según la presente invención. Esto, a su vez, permite la detección y/o el análisis sensible de moléculas diana de baja abundancia comprendidas en la población de ácidos nucleicos extracelulares.

También se da a conocer un método para aislar ácidos nucleicos extracelulares a partir de una muestra, en el que dicha muestra se estabiliza opcionalmente, uniendo los ácidos nucleicos extracelulares a una fase sólida que porta grupos de intercambio aniónico, en el que dicho método comprende las siguientes etapas:

a. unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida a un primer pH que permite la unión de los ácidos nucleicos extracelulares a los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida; en el que preferiblemente la muestra constituye al menos el 85% del volumen de la mezcla de unión;

b. separar la fase sólida con los ácidos nucleicos extracelulares unidos;

- c. opcionalmente lavar los ácidos nucleicos extracelulares;
- d. opcionalmente eluir los ácidos nucleicos extracelulares de la fase sólida.

5 También se da a conocer un método para aislar ácidos nucleicos extracelulares a partir de una muestra que es o se deriva de un líquido corporal, preferiblemente seleccionado de sangre, plasma, suero u orina, y en el que dicha muestra se estabiliza opcionalmente, en el que para el aislamiento los ácidos nucleicos extracelulares se unen a una fase sólida que porta grupos de intercambio aniónico, en el que dicho método comprende las siguientes etapas:

- a. unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida en una mezcla de unión a un primer pH ≤ 6 que permite la unión de los ácidos nucleicos extracelulares a los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida;
- b. separar la fase sólida con los ácidos nucleicos extracelulares unidos;
- 10 c. opcionalmente lavar los ácidos nucleicos extracelulares;
- d. eluir los ácidos nucleicos extracelulares de la fase sólida preferiblemente a un segundo pH que es mayor que el primer pH que se usó para unir el ácido nucleico extracelular a la fase sólida;
- e. aislar los ácidos nucleicos extracelulares del eluato.

15 El método respectivo permite concentrar ácidos nucleicos extracelulares desde un volumen de muestra grande hasta un volumen de muestra más pequeño que, por ejemplo, puede manipularse fácilmente mediante sistemas automatizados convencionales. Los ácidos nucleicos extracelulares aislados se purifican adicionalmente en la etapa e. usando métodos de aislamiento adecuados, por ejemplo métodos de aislamiento establecidos que se realizan sobre sistemas automatizados. Concentrar los ácidos nucleicos extracelulares desde un volumen de muestra grande hasta un volumen de muestra pequeño tiene la ventaja de que el rendimiento global de ácidos nucleicos extracelulares puede aumentarse ya que volúmenes de muestra considerablemente más grandes pueden procesarse más convenientemente que con sistemas convencionales.

20 Además, se da a conocer un método para mejorar la recuperación de ácidos nucleicos pequeños cuando se usa una fase sólida de unión a ácidos nucleicos. Cuando se aíslan ácidos nucleicos, en ácidos nucleicos más pequeños particulares tales como por ejemplo ácidos nucleicos extracelulares, a menudo no se recuperan eficazmente ácidos nucleicos más pequeños, aun cuando se unieron inicialmente a la fase sólida de ácidos nucleicos en la etapa de unión. El pretratamiento de la fase sólida de unión a ácidos nucleicos con un polímero, preferiblemente poli(ácido acrílico) antes de la unión de los ácidos nucleicos a la fase sólida mejora sorprendentemente la tasa de recuperación de ácidos nucleicos más pequeños. Por tanto, también se da a conocer una fase sólida de unión a ácidos nucleicos que se ha pretratado con un polímero, tal como por ejemplo poli(ácido acrílico). Además se da a conocer un método para producir una fase sólida de unión a ácidos nucleicos respectiva, que comprende poner en contacto la fase sólida de unión a ácidos nucleicos con un polímero, uniendo de ese modo el polímero a la fase sólida. También se da a conocer un método para aislar ácidos nucleicos, preferiblemente ácidos nucleicos extracelulares, en el que se usa una fase sólida de unión a ácidos nucleicos que se ha pretratado con un polímero. El pretratamiento de la fase sólida con un polímero tal como poli(ácido acrílico) da como resultado que las características de unión a ácidos nucleicos de la fase sólida de ácido nucleico mejoran porque la recuperación de ácidos nucleicos pequeños puede aumentarse.

Descripción de las figuras

- Figura 1: Rendimiento porcentual de fragmentos de ADN usando tres tipos de perlas diferentes.
- Figura 2: Enriquecimiento de ADNlcc (ensayo de PCR de dúplex de ADN 18S): Control del éxito de la unión analizando el sobrenadante tras la etapa de unión y el eluato.
- Figura 3: Comportamiento selectivo de tamaño de las perlas magnéticas (tipo II) usando dos etapas de elución con dos tampones de elución diferentes.
- Figura 4: Enriquecimiento de ARNIcc, medido usando un ensayo de GAPDH.
- Figura 5: Prueba de inhibición para analizar si el concentrado es compatible con PCR o si tiene que realizarse un protocolo de limpieza.
- Figura 6: Enriquecimiento de virus usando tres tipos diferentes de perlas magnéticas de intercambio aniónico.
- Figura 7: La mediana del rendimiento porcentual en comparación con la referencia de todos los donantes individuales (en este caso se muestran los resultados de tres ensayos de ADN diferentes).
- Figura 8: La mediana de la recuperación tras el uso del ensayo de ADN de fragmento (control interno).
- 50 Figura 9: La eficacia de aislamiento usando diferentes concentraciones de ácido nucleico.

Figura 10: Recuperación de ADNlcc (18S) - protocolo de enriquecimiento manual.

Figura 11: Recuperación de ADN con adiciones conocidas - protocolo de enriquecimiento manual.

Figura 12: Enriquecimiento de ADN fetal, medido usando un ensayo de detección de 18S, ensayo de Dys14 y ensayo de RhD.

5 Figura 13: Enriquecimiento selectivo de tamaño de fragmentos de ADN extracelular cortos, medidos mediante el ensayo de APP.

Figura 14: Detección de ADN diana en tampones con valor de pH básico, medido mediante el ensayo de ADN 18S dúplex.

10 Figura 15: Recuperación de bajo rendimiento de fragmentos de ADN más largo en tampones de elución de bajo contenido en sal.

Figura 16: Dependencia de la sal y selección por tamaño, recuperación de fragmentos de ADN más largos en tampones de elución de alto contenido en sal, medido mediante el ensayo de detección de 18S doble.

Figura 17: Compatibilidad con PCR, sin inhibición de la PCR del tampón de elución con adiciones conocidas con diferentes cantidades de ADN diana.

15 Figura 18: Elución selectiva de tamaño de fragmentos de ADN más cortos a pH básico sin sal adicional, medido mediante detección de ADN 18S doble.

Figura 19: Enriquecimiento selectivo de tamaño de ADNlcc usando tampones de elución con concentración de sal y pH variables.

20 Figura 20: Enriquecimiento dependiente de sal de fragmentos de ADN con un tamaño definido, medido usando el ensayo de APP.

Figura 21: Extracción completa de ADN fetal a partir de plasma materno, medido usando un ensayo de Dys14.

Figura 22: La adición de PAA mejora la recuperación de ADN, tal como se mide mediante el ensayo de ADN 18S dúplex.

Figura 23: Eficacia de aislamiento de ADN usando diferentes volúmenes de elución.

25 Figura 24: Unión y liberación de ADN altamente eficaces en tampón de elución, medido mediante el ensayo de detección de ADN 18S doble.

Figura 25: La detección por PCR de ADN aislado no se ve afectada por los componentes del tampón de elución.

Figura 26: Enriquecimiento de ADN dependiente del valor de pH y el volumen de perlas.

30 Figura 27: Enriquecimiento de ADN comparable usando perlas de tipo I o tipo II, medido usando el ensayo de detección de 18S.

Figura 28: Enriquecimiento de ADN a partir de suero.

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención proporciona un método para aislar ácidos nucleicos extracelulares a partir de una muestra, en el que dicha muestra se estabiliza opcionalmente, uniendo los ácidos nucleicos extracelulares a una fase sólida que porta grupos de intercambio aniónico, en el que dicho método comprende las siguientes etapas:

a. acidificar la muestra para establecer las condiciones de unión y unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida en una mezcla de unión que tiene un primer pH de $\leq 6,5$ que permite la unión de los ácidos nucleicos extracelulares a los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida, en el que la fase sólida está dotada de partículas magnéticas;

40 b. separar la fase sólida con los ácidos nucleicos extracelulares unidos;

c. opcionalmente lavar los ácidos nucleicos extracelulares;

45 d. eluir los ácidos nucleicos extracelulares de la fase sólida, en el que la elución se produce a un segundo pH que se encuentra en el intervalo de ≥ 8 a ≤ 14 ; en el que la muestra es una muestra libre de células o reducida en células que se obtuvo a partir de un líquido corporal eliminando las células mediante separación y en el que los ácidos nucleicos extracelulares son ADN extracelular.

Las ventajas clave asociadas con dicho método se describieron anteriormente en el sumario de la invención. Los presentes inventores han encontrado que pueden aislarse rápidamente ácidos nucleicos extracelulares a partir de diversas muestras con alto rendimiento usando una fase sólida que porta grupos de intercambio aniónico que se unen inespecíficamente (es decir, independientemente de la secuencia) a los ácidos nucleicos extracelulares. El método permite procesar altos volúmenes de muestra, porque básicamente todo lo que se requiere para establecer las condiciones de unión es la acidificación de la muestra. La acidificación añade poco sólo al volumen de muestra y por tanto al volumen de la mezcla de unión, permitiendo de ese modo procesar volúmenes de muestra más grandes en comparación con métodos convencionales que deben añadir grandes cantidades de reactivos de lisis y/o unión con el fin de permitir el aislamiento de los ácidos nucleicos. Tal como se muestra en los ejemplos, el método según la presente invención puede lograr, dependiendo de la fase sólida usada, tasas de recuperación de hasta el 100%. Por tanto, el procesamiento de volúmenes de muestra más grandes que es posible con el método según la presente invención da como resultado un aumento de rendimiento de ácidos nucleicos extracelulares, lo que es una ventaja importante porque los ácidos nucleicos extracelulares están comprendidos habitualmente en las muestras en bajas concentraciones tales como por ejemplo <100 ng/ml de muestra. La posibilidad de procesar grandes volúmenes de muestra usando un método sencillo de este tipo también permite realizar la presente invención en sistemas automatizados que están restringidos con respecto al volumen máximo de la disolución que pueden manipular. Puesto que sólo se añaden volúmenes muy bajos de reactivos a la muestra inicial para establecer las condiciones de unión de los ácidos nucleicos, el volumen de manipulación máximo de sistemas automatizados puede usarse eficazmente para tanto de la muestra inicial como sea posible. El método según la presente invención permite maximizar el rendimiento de ácido nucleico al permitir procesar volúmenes más grandes y al lograr una alta tasa de recuperación y por tanto, un alto rendimiento de ácidos nucleicos extracelulares extraídos. Por tanto, el método según la presente invención es especialmente adecuado para aislar ácidos nucleicos extracelulares a partir de muestras biológicas tales como líquidos corporales que comprenden ácidos nucleicos extracelulares en bajas cantidades tales como por ejemplo <100 ng/ml de muestra. El método según la presente invención puede usarse para aislar ácidos nucleicos extracelulares de modo que estén directamente disponibles para aplicaciones posteriores tales como por ejemplo métodos de análisis subsiguientes, por ejemplo con el fin de amplificar, identificar, cuantificar y/o detectar la presencia o ausencia de un determinado ácido nucleico diana dentro de la población de ácidos nucleicos diana extracelulares extraídos. Por tanto, a pesar del hecho de que el método según la presente invención es muy sencillo y rápido, los ácidos nucleicos aislados son lo suficientemente puros como para usarse en aplicaciones posteriores convencionales tales como por ejemplo ensayos de análisis y detección tal como se muestra en los ejemplos.

Además, el método de aislamiento según presente invención puede usarse también como protocolo de pretratamiento para aislar y por tanto concentrar ácidos nucleicos extracelulares a partir de grandes volúmenes de muestra. Los ácidos nucleicos extracelulares respectivamente concentrados pueden entonces opcionalmente purificarse adicionalmente usando un protocolo de aislamiento de ácidos nucleicos convencional. La realización del método según la presente invención como un protocolo de concentración para reducir el volumen de muestra para una etapa de purificación subsiguiente tiene la ventaja de que pueden ahorrarse tiempo y costes y el rendimiento de ácidos nucleicos extracelulares puede aumentarse porque pueden procesarse volúmenes de muestra iniciales más grandes. Por tanto, el presente método puede usarse también como protocolo de pretratamiento con el fin de concentrar ácidos nucleicos extracelulares desde un volumen de muestra grande hasta un volumen de muestra más pequeño que permite el uso de un aislamiento de ácidos nucleicos convencional, respectivamente protocolos de purificación que pueden realizarse por ejemplo sobre sistemas automatizados establecidos que tienen limitaciones con respecto al volumen de muestra que pueden manipular. La incorporación de una respectiva extracción previa, respectivamente etapa de concentración también permite establecer, respectivamente mejorar las pruebas de rutina para ácidos nucleicos extracelulares usando sistemas automatizados porque el resultado del aislamiento, en particular con respecto al rendimiento, se mejora.

El método según la presente invención puede realizarse manualmente, o usando sistemas automatizados. Los métodos manuales tienen la ventaja de que habitualmente pueden procesarse volúmenes de muestra más grandes (los sistemas automatizados tienen habitualmente, debido a su diseño, un determinado límite con respecto al volumen que pueden procesar). Los sistemas automatizados tienen la ventaja de que pueden procesarse muchas muestras al mismo tiempo y que los sistemas automatizados son menos propensos a errores, porque se evitan errores de manipulación. Las limitaciones con respecto al volumen de muestra pueden superarse en un determinado grado dividiendo la muestra original, procesando las porciones de muestra en paralelo y reunificando o bien los eluatos o bien el material de intercambio aniónico antes de la elución. Según una realización, los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en una primera muestra se unen a la fase sólida según el método definido en la reivindicación 1. Se usan partículas magnéticas como fase sólida. Dicha fase sólida con los ácidos nucleicos extracelulares unidos se pone en contacto entonces con la mezcla de unión de una segunda muestra, en la que dicha segunda muestra es preferiblemente una porción dividida de la misma muestra original, es decir la muestra original se dividió en la primera y la segunda muestra. De ese modo, la fase sólida de la primera muestra se unifica con la fase sólida de la segunda muestra y las fases sólidas unificadas se procesan entonces adicionalmente. Esta división de la muestra y reunificación de o bien los eluatos y/o bien las fases sólidas permite procesar fácilmente volúmenes de muestra más grandes usando un sistema automatizado que sólo puede procesar un volumen limitado de muestra.

Una ventaja adicional cuando se usa el presente método es que la tasa de recuperación sigue siendo sustancialmente la misma, independientemente de la dilución de los ácidos nucleicos extracelulares en la muestra. Por tanto, el presente método permite aislar los ácidos nucleicos extracelulares con básicamente el mismo rendimiento, respectivamente tasa de recuperación (véanse los ejemplos), independientemente de si se encuentra la misma cantidad de ácidos nucleicos en 1 ml, 5 ml, 10 ml o 25 ml de muestra. Esto es una ventaja particular cuando se aíslan ácidos nucleicos extracelulares en baja abundancia a partir de grandes volúmenes de muestra ya que una baja concentración no dificulta el aislamiento eficaz de ácidos nucleicos cuando se usa el método según la presente invención.

El término “ácidos nucleicos extracelulares” o “ácido nucleico extracelular” tal como se usa en el presente documento, en particular se refiere a ácidos nucleicos que no están contenidos en células. Los ácidos nucleicos extracelulares respectivos también se denominan a menudo ácidos nucleicos libres de células. Estos términos se usan como sinónimos en el presente documento. Por tanto, están presentes ácidos nucleicos extracelulares habitualmente en el exterior de una célula o en el exterior de una pluralidad de células dentro de una muestra. El término “ácidos nucleicos extracelulares” se refiere por ejemplo a ARN extracelular así como a ADN extracelular y mezclas de los mismos. Los ejemplos de ácidos nucleicos extracelulares típicos que se encuentran en la fracción libre de células (respectivamente porción) de una muestra biológica tal como un líquido corporal o una muestra derivada de un líquido corporal tal como por ejemplo plasma sanguíneo incluyen pero no se limitan a ácidos nucleicos extracelulares de mamífero tales como por ejemplo ADN y ARN extracelular asociado a tumor o derivado de tumor, otro ADN y/o ARN extracelular relacionado con una enfermedad, ADN modificado epigenéticamente, ADN y/o ARN fetal, ARN de interferencia pequeño tal como por ejemplo miARN y ARNip, y ácidos nucleicos extracelulares que no son de mamífero tales como por ejemplo ácidos nucleicos virales, ácidos nucleicos patógenos liberados en la población de ácidos nucleicos extracelulares, por ejemplo de procariotas (por ejemplo bacterias), virus u hongos. Pueden obtenerse ácidos nucleicos extracelulares a partir de un líquido corporal o una muestra derivada de un líquido corporal como muestra biológica tal como por ejemplo sangre, plasma, suero, saliva, orina, licor, líquido cefalorraquídeo, esputos, líquido lagrimal, sudor, líquido amniótico o linfático. El método según la reivindicación 1 aísla ADN extracelular a partir de una muestra libre de células o reducida en células que se obtuvo a partir de un líquido corporal eliminando las células mediante separación. Los ácidos nucleicos extracelulares se obtienen a partir de la porción libre de células o reducida en células de las muestras anteriores, que se obtuvo eliminando las células mediante separación. En el presente documento, se hace referencia a ácidos nucleicos extracelulares que se obtienen a partir de un líquido corporal circulante o una muestra derivada de un líquido corporal circulante, en particular a partir de la porción libre de células o reducida en células de un líquido corporal circulante como ácidos nucleicos extracelulares circulantes o libres de células circulantes (lcc). Según una realización, el término ácido nucleico extracelular se refiere en particular a ácidos nucleicos extracelulares de mamífero, preferiblemente ácidos nucleicos extracelulares asociados a enfermedad o derivados de enfermedad tales como ácidos nucleicos extracelulares asociados a tumor o derivados de tumor, ácidos nucleicos extracelulares liberados debido a inflamaciones o lesiones, en particular traumatismo, ácidos nucleicos extracelulares relacionados con y/o liberados debidos a otras enfermedades, o ácidos nucleicos extracelulares derivados de un feto. El término “ácidos nucleicos extracelulares” o “ácido nucleico extracelular” tal como se da a conocer en el presente documento también se refiere a ácidos nucleicos extracelulares obtenidos de otras muestras, en particular muestras biológicas distintas de líquidos corporales.

Tal como se comentó anteriormente, el método según la presente invención es también útil para aislar ácidos nucleicos virales como una realización de ácidos nucleicos extracelulares. La eficacia del presente método da como resultado una sensibilidad superior de los métodos de detección posteriores subsiguientes, de modo que pueden detectarse virus importantes en el diagnóstico tales como VIH o VHC de manera más fiable por ejemplo en donaciones de sangre. Además, la monitorización de la terapia antiviral puede mejorarse debido a un límite inferior de detección de virus. Cuando se tiene como objetivo el aislamiento de ácidos nucleicos virales, se prefiere usar el presente método como protocolo de pretratamiento para concentrar los ácidos nucleicos virales antes de realizar un protocolo de aislamiento de ácidos nucleicos adicional tal como por ejemplo un protocolo de aislamiento de ácidos nucleicos virales convencional.

El término “mezcla de unión” tal como se usa en el presente documento se refiere a la composición que se prepara para la etapa de unión y que permite unir los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en la muestra a los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida. Por tanto, la mezcla de unión proporciona condiciones apropiadas para unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida. La mezcla de unión comprende la muestra y los reactivos y/o compuestos que se añadieron a la muestra con el fin de preparar la muestra para la etapa de unión. Por ejemplo pueden añadirse reactivos y/o compuestos de acidificación a la muestra para establecer el primer valor de pH. Según la presente invención, preferiblemente al menos el 85% del volumen de la mezcla de unión lo proporciona la muestra, respectivamente la muestra estabilizada si se procesa una muestra estabilizada, por ejemplo una muestra de plasma sanguíneo o suero estabilizada. Preferiblemente, al menos el 90%, al menos el 92%, al menos el 94%, al menos el 95% y lo más preferiblemente al menos el 97% del volumen de la mezcla de unión lo proporciona la muestra, respectivamente la muestra opcionalmente estabilizada. Esto garantiza que la mezcla de unión consista predominantemente en la muestra que contiene ácido nucleico extracelular (que está opcionalmente estabilizada). Esto permite procesar grandes volúmenes de muestra (véase anteriormente). El término “mezcla de unión” tal como se usa en el presente documento no incluye la fase sólida. Por tanto, la

contribución de volumen potencial de la fase sólida no se considera en las especificaciones de volumen anteriores. Si una fase sólida contribuye en absoluto al volumen de una mezcla de unión también depende de la fase sólida que se usa para la unión de los ácidos nucleicos extracelulares. Más adelante se describen ejemplos adecuados de fases sólidas.

- 5 La mezcla de unión se prepara ajustando el pH de la muestra al primer pH. Esto puede lograrse añadiendo compuestos y/o reactivos de acidificación. Los ejemplos adecuados de reactivos de acidificación incluyen pero no se limitan a ácidos, agentes tamponantes ácidos tales como ácidos carboxílicos, por ejemplo ácido acético, tampones de acetato de sodio/ácido acético, tampones de ácido cítrico/citrato, ácido maleico, ácido malónico, ácido tartárico, HCl, HClO₄, HClO₃, ácido fórmico, ácido bórico, H₂SO₄, H₂SO₃, sistemas de tampón de ácido fosfórico/fosfato
- 10 ácidos, MES u otros ácidos orgánicos o inorgánicos solubles en agua. En una realización preferida, se añade una disolución de acidificación, preferiblemente un tampón de acidificación a la muestra como compuesto y/o reactivo de acidificación para establecer las condiciones de unión en la mezcla de unión. La disolución de acidificación puede contener una sustancia tamponante que puede ajustar el pH de la mezcla de unión resultante al primer pH. Puede comprender adicionalmente una sal, preferiblemente en disolución, en particular en una disolución acuosa.
- 15 Preferiblemente, la disolución de acidificación comprende una sustancia tamponante o una combinación de diferentes sustancias tamponantes, preferiblemente disueltas en agua. Un ejemplo particularmente preferido de una disolución de acidificación es una disolución acuosa de un tampón de acetato de sodio/ácido acético, preferiblemente en una concentración de desde 0,5 hasta 5 M, más preferiblemente de 0,5 a 4 M, de 0,5 a 3 M y más preferiblemente de aproximadamente 1 a 2 M, preferiblemente que tiene un valor de pH en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 5, más preferiblemente de aproximadamente 4. La disolución de acidificación se añade preferiblemente a la muestra en una razón (volumen (disolución de acidificación):volumen (muestra, respectivamente muestra estabilizada opcionalmente)) de desde aproximadamente 1:10 hasta aproximadamente 1:1000 en volumen, preferiblemente en una razón de desde aproximadamente 1:100 hasta 1:20 en volumen, más preferiblemente en una razón de aproximadamente 1:30, lo más preferiblemente en una razón de aproximadamente 1:40 en volumen. Otros sistemas de tampones adecuados incluyen por ejemplo acetato de potasio/ácido acético, citrato de sodio (o potasio)/ácido cítrico y fosfato de sodio (o potasio)/ácido fosfórico. Las razones respectivas son en particular útiles cuando se procesan líquidos corporales (o muestras derivadas de líquidos corporales) como muestras, tales como por ejemplo sangre, plasma o suero.

- Según una realización, el primer pH está por debajo del valor de pKa de un grupo protonable de los grupos de intercambio aniónico que se proporcionan sobre la superficie de la fase sólida. El primer pH usado para la unión de los ácidos nucleicos a la fase sólida está preferiblemente por debajo del valor de pKa del grupo protonable del grupo de intercambio aniónico. Si el grupo de intercambio aniónico comprende más de un grupo protonable, el primer pH está preferiblemente por debajo del pKa de al menos un grupo protonable. Preferiblemente, el primer pH está al menos 0,5 unidades por debajo del valor de pKa, más preferiblemente al menos 1 unidad, al menos 1,5 unidades, al menos 2 unidades, al menos 2,5 unidades y lo más preferiblemente al menos 3 unidades por debajo de dicho valor de pKa. Preferiblemente, el pH está por encima de 4.

- El primer valor de pH que se usa respectivamente que es adecuado para unir los ácidos nucleicos extracelulares a los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida también depende de la naturaleza de los grupos de intercambio aniónico y/o su densidad de los grupos de intercambio aniónico sobre la superficie de la fase sólida. También la concentración de sal usada puede influir en la unión. El experto puede determinar valores de pH adecuados para el primer valor de pH. Según una realización, el primer pH se encuentra en un intervalo seleccionado de desde 4 hasta 6,5; de 4,5 a 6,5; de 5 a 6,5 y de 5 a 6. Los valores de pH respectivos están en particular optimizados para la unión a ADN cuando se usan las partículas de intercambio aniónico descritas en los ejemplos. El pH de la mezcla de unión es $\leq 6,5$ y preferiblemente ≤ 6 . Cuando se tiene como objetivo el aislamiento de ARN extracelular, puede usarse un primer valor de pH ácido más fuerte de $\leq 5,5$ o ≤ 5 ya que esto podría aumentar el rendimiento de ARN. La acidificación de la muestra establece el primer pH para unir los ácidos nucleicos extracelulares a los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida. La acidificación además procesa la muestra y por tanto puede mejorar la unión, por ejemplo liberando ADN nucleico extracelular que puede quedar atrapado por ejemplo en complejos de histonas.

- 50 La unión se produce durante un tiempo suficiente como para permitir una unión sustancial de los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida. El tiempo de incubación adecuado, respectivamente necesario depende del tipo y la cantidad de fase sólida y grupos de intercambio aniónico usados, el volumen de muestra y la concentración de ácidos nucleicos extracelulares en la muestra. Por ejemplo pueden ser suficientes tiempo de incubación más cortos, si se usa una fase sólida que tiene una alta densidad de grupos de intercambio aniónico y, por tanto, se une fuertemente a los ácidos nucleicos extracelulares. Tiempos de incubación más prolongados garantizan que los ácidos nucleicos se unan de manera altamente eficaz a la fase sólida, permitiendo de ese modo maximizar la recuperación de ácidos nucleicos extracelulares a partir de la muestra. Según algunas realizaciones, el tiempo de incubación se selecciona de al menos 1 min, al menos 2 min, al menos 5 min, al menos 10 min, al menos 15 min y más preferiblemente al menos aproximadamente 20 min.

- 60 En la etapa (b) del método según la presente invención los ácidos nucleicos extracelulares que se unen a la fase sólida se separan de la muestra restante. Para este fin, puede usarse cualquier medio conocido en la técnica. Los medios adecuados también dependen del tipo de la fase sólida que se usa para la unión e incluyen pero no se

limitan a separación magnética si se usa una fase sólida magnética, centrifugación por ejemplo si se usan partículas no magnéticas o una membrana, sedimentación, la aplicación de un vacío, filtración o cromatografía. Más adelante se describen fases sólidas adecuadas y el experto está familiarizado con la manipulación de las respectivas fases sólidas.

- 5 En realizaciones preferidas, todo el método para aislar ácidos nucleicos se realiza a temperatura ambiente.

La muestra, la fase sólida y el/los compuesto(s) y/o reactivo(s) de acidificación pueden ponerse en contacto en cualquier orden. Se añade al menos un compuesto y/o reactivo de acidificación a la muestra con el fin de establecer el primer pH y por tanto las condiciones de unión. La mezcla de unión resultante se pone entonces en contacto con la fase sólida para unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida. Opcionalmente, pueden hacerse ajustes de pH adicionales tras el contacto para optimizar las condiciones de unión o para establecer el primer pH deseado. Sin embargo, también está dentro del alcance de la presente invención, también dependiendo del tipo de fase sólida usada, proporcionar la fase sólida en primer lugar y luego añadir la muestra y al menos un compuesto y/o reactivo de acidificación en cualquier orden. Puede usarse cualquier orden de contacto adecuado que permita unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida. Tras la etapa (b), pueden realizarse opcionalmente una o más etapas de lavado como etapa (c). Según una realización, al menos una disolución de lavado se pone en contacto con la fase sólida que porta los ácidos nucleicos extracelulares unidos. Con el fin de garantizar una recuperación máxima de los ácidos nucleicos unidos, las condiciones de lavado se eligen preferiblemente de manera que no se retire una cantidad significativa de ácido nucleico unido a la matriz de unión a ácido nucleico de la misma durante el lavado. El tampón de lavado es preferiblemente una disolución acuosa y puede contener un tensioactivo. Los tensioactivos adecuados incluyen pero no se limitan a tensioactivos no iónicos a base de polioxietileno, preferiblemente seleccionados del grupo que consiste en éteres de alcohol graso de polioxietileno, alquilfenil éteres de polioxietileno y copolímeros de bloque de polioxietileno-polioxipropileno. Ejemplos preferidos son TritonX-100 o Brij58, por ejemplo a una concentración de aproximadamente el 0,01% - 1%. También se conocen en la técnica anterior disoluciones de lavado adecuadas y, por tanto, no es necesaria ninguna descripción adicional en el presente documento. Se recomienda particularmente el lavado si se supone que los ácidos nucleicos extracelulares aislados por ejemplo van a analizarse y/o detectarse directamente por ejemplo en un ensayo de diagnóstico sin purificación adicional. Si se supone que los ácidos nucleicos extracelulares aislados van a analizarse directamente usando métodos que son por ejemplo sensibles a posibles impurezas (tales como por ejemplo métodos de PCR), se recomienda realizar al menos dos etapas de lavado. Según una realización, se usan preferiblemente dos volúmenes diferentes de disoluciones de lavado. En el presente documento, el volumen de la primera disolución de lavado es preferiblemente mayor que el volumen de la segunda disolución de lavado. Sin embargo, no es necesario un lavado si se usa posteriormente un método de detección y/o análisis que es bastante insensible a las impurezas. Además, si el método de aislamiento según la presente invención se usa para enriquecer y por tanto concentrar los ácidos nucleicos extracelulares en un volumen de muestra pequeño como preparación para un método de aislamiento de ácidos nucleicos subsiguiente, respectivamente un protocolo de purificación, el lavado tampoco es obligatorio. La realización de un protocolo de aislamiento subsiguiente respectivo se recomienda particularmente si, por ejemplo, ácidos nucleicos virales son la diana principal dentro de la población de ácidos nucleicos extracelulares.

El método para aislar ácidos nucleicos extracelulares comprende además una etapa (d) de eluir los ácidos nucleicos extracelulares de la fase sólida.

40 Generalmente, puede usarse cualquier método de elución adecuado. Preferiblemente, la elución se logra cambiando el valor de pH. Por tanto, según una realización, la elución se produce a un segundo pH que es mayor que el primer pH que se usó para unir el ácido nucleico extracelular a la fase sólida. La elección del segundo valor de pH que es adecuado para eluir los ácidos nucleicos extracelulares de los grupos de intercambio aniónico depende entre otros de la naturaleza de los grupos de intercambio aniónico presentes sobre la fase sólida, la densidad de los grupos de intercambio aniónico sobre la superficie de la fase sólida y la fuerza iónica de la disolución de elución. El experto puede determinar valores de pH adecuados para el segundo pH. El segundo pH es preferiblemente al menos 0,5 unidades mayor que el primer pH, al menos 1 unidad mayor que el primer pH, más preferiblemente al menos 1,5 unidades mayor o al menos 2 unidades mayor que el primer pH. El segundo pH puede estar por debajo, a o por encima del pKa de un grupo protonable del grupo de intercambio aniónico. Sin embargo, preferiblemente, está al menos 1 unidad por debajo del pKa, más preferiblemente al menos 1,5 unidades por debajo del pKa o al menos 2 unidades por debajo de dicho pKa. Preferiblemente, la elución se realiza a un segundo $\text{pH} \geq 8$. Preferiblemente, la elución se produce a un intervalo de pH seleccionado del grupo que consiste en $\text{pH} \geq 8 \text{ y } \leq 14$; $\text{pH} \geq 8 \text{ y } \leq 12,6$; $\text{pH} \geq 8 \text{ y } \leq 12$; $\geq 8 \text{ y } \leq 11$; $\text{pH} \geq 8 \text{ y } \leq 10 \text{ y } \geq 8 \text{ y } \leq 9$. El valor de pH que se usa para la elución también puede depender de la aplicación adicional prevista del eluato. Valores de pH de elución inferiores pueden ser ventajosos porque un respectivo valor de pH inferior es más compatible con muchas reacciones posteriores comunes (por ejemplo PCR). Por ejemplo pueden usarse valores de pH alcalino más fuertes, tales como un valor de pH de al menos 12, y son ventajosos, por ejemplo si es necesario ADN monocatenario o tienen que reducirse las contaminaciones de ARN. Según una realización, la elución se logra usando una disolución de hidróxido de sodio $\leq 1 \text{ mol/l}$. Para determinadas aplicaciones, por ejemplo, el tratamiento posterior del ADN eluido con reactivos de bisulfito con el fin de analizar los patrones de metilación del ADN, puede ser también beneficioso para eluir los ácidos nucleicos a $\text{pH} \geq 12 \text{ y } \leq 14$ con el fin de desnaturalizar el ADN eluido. Si la elución se produce a un valor de pH superior (por ejemplo 10 o superior), el eluato que comprende los ácidos nucleicos puede neutralizarse por ejemplo si un respectivo valor de pH neutro es

beneficioso para las aplicaciones posteriores previstas. El ARN puede eluirse a valores de pH inferiores. Por ejemplo, cuando se usa una fase sólida que porta grupos polietilenimina (véanse los ejemplos), el ARN podría eluirse eficazmente a un valor de pH de 8, en el que para ADN un valor de pH superior de más de 12 era más adecuado. Si se pretende también recuperar ARN en la etapa de elución se prefiere no usar valores de pH altos porque el ARN podría dañarse. Valores de pH altos por encima de pH 9 pueden evitarse por ejemplo aumentando la concentración de sal en la disolución de elución si la fuerza de elución proporcionada por el segundo pH no es suficiente para lograr una elución eficaz.

La elución se logra preferiblemente poniendo en contacto los ácidos nucleicos extracelulares que se unen a la fase sólida con una disolución de elución. La disolución de elución comprende preferiblemente una sustancia tamponante que puede ajustar el segundo pH. En particular, pueden usarse tampones biológicos. Un ejemplo adecuado es tris(hidroximetil)aminometano (Tris) en una concentración de aproximadamente 1 mM a 1 M, preferiblemente de 10 mM a 500 mM, más preferido de 50 mM a aproximadamente 250 mM, lo más preferido de 75 mM a aproximadamente 150 mM, ajustado al pH deseado usando por ejemplo HCl. Sin embargo, según una realización, se usa la base libre de la sustancia tamponante, por ejemplo Tris como base libre. Puede usarse en los intervalos de concentración mencionados anteriormente. Según una realización, se usa una disolución de elución que comprende Tris como base libre. El valor de pH de dicha disolución de elución que contiene la base libre puede estar, por ejemplo, en un intervalo de 10 a 10,5. Según una realización, dicha disolución de elución no comprende sales, en particular no comprende sales alcalinas o sales alcalinotérricas. Tal como se muestra mediante los ejemplos, usar una disolución de elución respectiva que comprende Tris como base libre sin sales adicionales permite eluir selectivamente ácidos nucleicos predominantemente pequeños que tienen una longitud de 300 nt o menos, preferiblemente 250 nt o menos, más preferido 200 nt o menos, 150 nt o menos o incluso 100 nt o menos tal como se explicará posteriormente y tal como se muestra en los ejemplos. Por tanto, estas condiciones de elución pueden usarse para enriquecer ácidos nucleicos cortos respectivos en el eluato frente a ácidos nucleicos más largos. Añadiendo sal a la disolución de elución que comprende Tris como base libre también es posible eluir ácidos nucleicos más largos. La concentración de sal puede ajustarse si ácidos nucleicos más largos son de interés, la concentración dependería del valor de corte deseado. La disolución de elución es preferiblemente una disolución acuosa que comprende la sustancia tamponante y además opcionalmente componentes tales como una sal, en particular una sal alcalina tal como cloruro de sodio o cloruro de potasio, por ejemplo en una concentración de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,5 M, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,2 M, más preferiblemente de aproximadamente 0,16 M. La concentración de sal usada tiene una influencia sobre la eficacia de elución, en particular la eficacia de elución de ácidos nucleicos más largos. Cuanto más alta sea la concentración de sal, más eficaz es la elución de ácidos nucleicos más largos. Por tanto, aumentar la concentración de sal aumenta la eficacia de elución para ácidos nucleicos más largos. Por tanto, controlando la concentración de sal en el tampón de disolución es posible controlar el tamaño de los ácidos nucleicos que van a eluirse. Por ejemplo, aumentar la concentración de la sal, en particular de una sal alcalina tal como cloruro de sodio o cloruro de potasio, en la disolución de elución hasta 75 mM o por encima, da como resultado que ácidos nucleicos que tienen un tamaño de al menos 500 nt se eluyan con una tasa de recuperación por encima del 40%. Otros tampones posibles incluyen pero no se limitan a HEPES, Tris-borato y MOPS. Por tanto, la elución tiene lugar preferiblemente a una condición de bajo contenido en sal. Usar una baja concentración de sal tiene la ventaja de que el eluato puede usarse directamente en un ensayo posterior tal como por ejemplo una reacción PCR. Según una realización, se usa una disolución de elución que comprende Tris-HCl 100 mM (que contiene el 0,5-1,5%, preferiblemente el 0,9% de cloruro de sodio, pH 9). Sin embargo, también está dentro del alcance de la presente invención usar concentraciones de sal mayores, en particular con el fin de aumentar la fuerza iónica para evitar valores de pH altos, por ejemplo, por encima de 10 o por encima 12 (véase anteriormente), por ejemplo, si tal valor alto de pH no es compatible con las reacciones posteriores previstas. Según una realización, se usa una disolución de elución que comprende un hidróxido alcalino tal como hidróxido de sodio o hidróxido de potasio. Tal como se muestra mediante los ejemplos, variando la concentración de hidróxido alcalino en la disolución de elución también es posible influir en el tamaño de los ácidos nucleicos que se eluyen predominantemente. Aumentar la concentración de hidróxido alcalino en la disolución de elución aumenta el tamaño de los ácidos nucleicos que se eluyen. Preferiblemente, al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 98% del ácido nucleico extracelular unido a la fase sólida o de los ácidos nucleicos extracelulares que tienen un intervalo de tamaño deseado se eluye de la misma en la etapa (d). La elución también puede ayudarse mediante calentamiento y/o agitación.

Además, la eficacia de elución puede aumentarse en particular para eluir ácidos nucleicos más largos incluyendo en la disolución de elución un compuesto aniónico que comprende al menos dos grupos aniónicos. Un compuesto aniónico respectivo soporta la rotura del complejo de intercambio aniónico/ácido nucleico y, por tanto, soporta la elución. Como compuesto aniónico que comprende al menos dos grupos aniónicos, por ejemplo, pueden usarse ácidos carboxílicos tales como ácido oxálico, ácido melítico, ácido piromelítico y ácido cítrico. Además, también pueden usarse compuestos aniónicos poliméricos tales como por ejemplo poli(ácido acrílico) (PAA), poli(ácido metacrílico) (PMA), poli(ácido glutámico) (PGA) y sulfato de dextrano. También se describen compuestos aniónicos respectivos en el documento WO 2011/037692. Tal como se muestra mediante los ejemplos, la eficacia de elución puede potenciarse cuando se añade un compuesto aniónico respectivo.

Se encontró que cuando se usa una resina de intercambio aniónico para la unión a ácidos nucleicos, los ácidos

nucleicos unidos pueden eluirse de la matriz dependiendo de su tamaño simplemente ajustando y variando respectivamente el pH de elución. A un pH de elución menor, sólo eluirán moléculas de ácido nucleico pequeñas de la resina de intercambio aniónico. Cuando se eleva el pH de elución, también pueden eluirse ácidos nucleicos mayores. Esto permite separar los ácidos nucleicos extracelulares unidos por tamaño. En particular, se encontró que sólo son necesarios pequeños cambios en el pH de elución para obtener este efecto de fraccionamiento por tamaño.

Según una realización, sólo una parte, respectivamente porción de los ácidos nucleicos extracelulares se eluye de la fase sólida a un segundo pH que es mayor que el primer pH, en la que la longitud promedio de los ácidos nucleicos extracelulares eluidos de la fase sólida es más corta que la longitud promedio de los ácidos nucleicos extracelulares que permanecen unidos a la fase sólida. Según una realización, el segundo pH está en el intervalo de desde aproximadamente 7,5 hasta 10,5, preferiblemente desde aproximadamente 8 hasta 10, de 8,2 a 9,5, preferiblemente de aproximadamente 8,5 a 9. Tal como se muestra mediante los ejemplos, usar una disolución de elución que tiene un valor de pH respectivo permite lograr una elución selectiva de tamaño, en la que la longitud promedio de los ácidos nucleicos extracelulares eluidos de la fase sólida es más corta que la longitud promedio de los ácidos nucleicos extracelulares que permanecen unidos a la fase sólida. El valor de corte puede ajustarse ajustando las condiciones de elución. En particular, el valor de pH y la concentración de sal de la disolución de elución son características decisivas que tienen una influencia sobre el valor de corte y, por tanto, sobre la longitud de los ácidos nucleicos que se eluyen predominantemente.

Dependiendo de la distribución de tamaño de ácidos nucleicos en una población de ácidos nucleicos, tal como por ejemplo los ácidos nucleicos unidos o eluidos, la longitud promedio de los ácidos nucleicos en una población de moléculas de ácido nucleico puede referirse a la longitud de ácidos nucleicos a la que la mitad de las moléculas de ácido nucleico en la población tienen una longitud más corta y la otra mitad de las moléculas de ácido nucleico tienen una longitud mayor que la longitud promedio de los ácidos nucleicos. Sin embargo, la longitud promedio de los ácidos nucleicos en una población de moléculas de ácido nucleico también puede referirse a la longitud de ácidos nucleicos que se produce lo más frecuentemente en la respectiva población de ácidos nucleicos. Esta última opción para determinar la longitud promedio de los ácidos nucleicos será habitualmente más apropiada y, por tanto, preferida para poblaciones de ácidos nucleicos sesgadas en las que prevalece un determinado tamaño de ácido nucleico o un determinado intervalo por tamaño de ácido nucleico. La longitud de los ácidos nucleicos que se eluyen y la longitud de los ácidos nucleicos que permanecen unidos a la matriz de intercambio aniónico puede controlarse y, por tanto, variarse ajustando las condiciones de elución. Por tanto, es posible ajustar el tamaño, respectivamente el intervalo de tamaño de los ácidos nucleicos eluidos y unidos permitiendo de ese modo obtener ácidos nucleicos de un tamaño diana preseleccionado, respectivamente intervalo de tamaño diana preseleccionado. Preferiblemente, la diferencia entre la longitud promedio de los ácidos nucleicos eluidos de la fase sólida con dicho segundo pH y la longitud promedio de los ácidos nucleicos que permanecen unidos a la fase sólida es de al menos aproximadamente 50 nt, al menos aproximadamente 75 nt, al menos aproximadamente 100 nt, al menos aproximadamente 150 nt, al menos aproximadamente 200 nt, al menos aproximadamente 250 nt, al menos aproximadamente 300 nt, al menos aproximadamente 350 nt o al menos aproximadamente 400 nt. Según una realización, la longitud promedio de los ácidos nucleicos extracelulares eluidos de la fase sólida en la primera etapa de elución en el segundo valor de pH está en el intervalo de desde hasta aproximadamente 700 nt, hasta aproximadamente 600 nt, desde aproximadamente 10 nt hasta aproximadamente 500 nt, de 10 nt a aproximadamente 400 nt, de 15 nt a aproximadamente 300 nt, preferiblemente desde aproximadamente 20 nt hasta aproximadamente 250 nt, desde 20 nt hasta 200 nt o desde aproximadamente 50 nt hasta aproximadamente 150 nt. Además, la longitud promedio de los ácidos nucleicos que permanecen unidos a la fase sólida en esta primera etapa de elución es de al menos aproximadamente 200 nt, preferiblemente de al menos aproximadamente 250 nt, de al menos aproximadamente 300 nt, de al menos aproximadamente 400 nt, de al menos aproximadamente 500 nt, de al menos aproximadamente 600 nt, de al menos aproximadamente 700 nt, de al menos aproximadamente 1000 nt o de al menos aproximadamente 1500 nt. En realizaciones preferidas, ácidos nucleicos extracelulares que tienen una longitud de hasta aproximadamente 1000 nt, hasta aproximadamente 700 nt, hasta aproximadamente 600 nt, hasta aproximadamente 500 nt, preferiblemente hasta aproximadamente 400 nt, hasta aproximadamente 300 nt, hasta aproximadamente 250 nt o hasta aproximadamente 200 nt se eluyen preferiblemente de la fase sólida en la primera etapa de elución al segundo pH y/o ácidos nucleicos que tienen una longitud de aproximadamente 200 nt o más, 300 nt o más, 350 nt o más, 400 nt o más, 500 nt o más, preferiblemente de aproximadamente 700 nt o más, aproximadamente 800 nt o más o aproximadamente 1000 nt o más predominantemente permanecen unidos a la fase sólida en dicha primera etapa de elución. Tal como se describió anteriormente, se indica la longitud de los ácidos nucleicos. Por tanto, si el ácido nucleico extracelular es una molécula bicatenaria (por ejemplo, ADN) las indicaciones anteriores con respecto a la longitud de nt se refiere a pb. El término "eluido predominantemente" a este respecto en particular se refiere a una elución de al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95% del grupo designado de moléculas de ácido nucleico de la matriz de unión a ácido nucleico. Asimismo, el término "permanece unido predominantemente" a este respecto en particular se refiere a una elución de menos del 50%, preferiblemente menos del 40%, menos del 30%, menos del 20%, menos del 10% o menos del 5% del grupo designado de moléculas de ácido nucleico de la matriz de unión a ácido nucleico.

La elución selectiva de los ácidos nucleicos cortos puede lograrse en la etapa (d) ajustando la concentración de cargas positivas sobre la superficie de la fase sólida de modo que sólo las moléculas de ácido nucleico más largas

permanecen unidas a la matriz durante la etapa (d) mientras que los ácidos nucleicos más pequeños se eluyen. El valor de corte puede controlarse mediante la elección del valor de pH que se usa durante la elución. El ajuste de las cargas positivas puede controlarse mediante el pH usado durante la etapa de elución. En particular, se realiza la elución mediante la adición de una disolución de elución que comprende una sustancia tamponante que puede proporcionar el segundo pH durante la etapa de elución. En realizaciones preferidas, se realiza la elución en condiciones de bajo contenido en sal. En particular, la disolución de elución no comprende más de 0,5 M de sal, no más de 0,3 M de sal, preferiblemente no más de 0,27 M de sal, más preferiblemente no más de 0,25 M de sal.

En realizaciones específicamente preferidas, se usa una fase sólida que comprende grupos de intercambio aniónico que comprenden grupos dietilamino, preferiblemente grupos dietilaminopropilo. Tal como se muestra en los ejemplos, una fase sólida que comprende grupos de intercambio aniónico respectivos tiene ventajas significativas. En primer lugar, se logran tasas de recuperación excelentes que también son superiores a otras superficies de intercambio aniónico. En segundo lugar, pueden usarse condiciones de elución suaves en particular para eluir ácidos nucleicos pequeños, lo que es ventajoso para muchas aplicaciones posteriores de los ácidos nucleicos extracelulares aislados. En tercer lugar, fases sólidas respectivamente funcionalizadas son particularmente muy adecuadas para enriquecer ácidos nucleicos extracelulares cortos realizando una elución selectiva de tamaño. Una fase sólida que comprende grupos de intercambio aniónico que comprenden grupos dietilamino, preferiblemente grupos dietilaminopropilo, permite ventajosamente regular el tamaño de los ácidos nucleicos eluidos variando el valor de pH y/o la concentración de sal. Tal como se muestra mediante los ejemplos, los valores de corte pueden ajustarse en un intervalo estrecho, lo que da como resultado una elución selectiva de tamaño y fiable. Según una realización, el segundo pH en la realización en la que se usa una fase sólida que comprende grupos de intercambio aniónico que comprenden grupos dietilamino, preferiblemente grupos dietilaminopropilo, está en el intervalo de desde aproximadamente 7,5 hasta 10,5, preferiblemente desde aproximadamente 7,5 hasta 9,5, desde aproximadamente 7,5 hasta aproximadamente 9,0, preferiblemente de aproximadamente 8,0 - 8,5. En particular, puede usarse una disolución de elución que comprende una sustancia tamponante para ajustar dicho valor de pH y opcionalmente una sal tal como cloruro de sodio, preferiblemente en una concentración de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,2 M, más preferiblemente de aproximadamente 0,16 M. Además, tal como se muestra mediante los ejemplos, el tamaño de los ácidos nucleicos eluidos también puede variarse y, por tanto, controlarse mediante la cantidad de sal comprendida en la disolución de elución. Una mayor cantidad de sal da como resultado una elución de ácidos nucleicos mayores.

Realizar una elución selectiva de tamaño tiene varias ventajas. En primer lugar, es posible eluir selectivamente ácidos nucleicos extracelulares, ya que los ácidos nucleicos extracelulares tienen predominantemente un tamaño pequeño tal como se describe en la introducción. Por tanto, pueden usarse condiciones de elución, en las que no se recuperan ácidos nucleicos de alto peso molecular tales como, por ejemplo, ADN genómico u otros ácidos nucleicos intracelulares más largos, mediante un procedimiento de elución selectiva de tamaño respectivo. Esta es una ventaja importante, ya que reduce o incluso evita una contaminación de los ácidos nucleicos extracelulares aislados por cantidades residuales de ácidos nucleicos intracelulares tales como ADN genómico que pueden estar presentes incluso en muestras reducidas en células o libres de células, porque los ácidos nucleicos intracelulares pueden liberarse, por ejemplo, mediante desintegración o células rotas, lo que puede suceder durante el almacenamiento y/o durante el proceso de reducción de células. El método según la presente invención permite eliminar contaminaciones de ácido nucleico intracelular respectivas tales como, por ejemplo, ADN genómico en los ácidos nucleicos aislados cuando se ajusta la condición de elución tal como se describe en el presente documento de modo que, predominantemente, ácidos nucleicos que tienen un tamaño de 1.500 nt o menos, preferiblemente 1.000 nt o menos, se eluyen y, por tanto, se recuperan. La posibilidad de eliminar ADN genómico ajustando las condiciones de elución es una ventaja importante puesto que esto permite saltar la etapa de ultracentrifugación que se realiza habitualmente a 16.000 g para limpiar adicionalmente el plasma con el fin de retirar contaminaciones de ADN genómico respectivas que podrían estar aún asociadas con residuos celulares comprendidos. Esto ahorra tiempo y equipo. Además, tal como se muestra mediante los ejemplos, ajustando el valor de pH y/o la concentración de sal del tampón de elución es incluso posible fraccionar ácidos nucleicos extracelulares que tienen un tamaño de 1.000 nt o menos por tamaño. De ese modo, puede determinarse qué población de ácidos nucleicos extracelulares pequeños que tienen un tamaño de 1000 nt o menos se eluye y, por ejemplo, es posible eluir predominantemente y, por tanto, recuperar ácidos nucleicos que tienen un tamaño de 500 nt o menos, 400 nt o menos, 300 nt o menos, 200 nt o menos o incluso 150 nt o menos. Además, tal como se describe en el presente documento, también puede realizarse una segunda etapa de elución, si, por ejemplo, también ácidos nucleicos más largos deben ser de interés pero se supone que se eluyen y, por tanto, se recuperan como una fracción separada. En esta segunda etapa de elución, se usan condiciones que permiten eluir ácidos nucleicos más largos. En el presente documento se describen condiciones adecuadas. Por tanto, puesto que el método según la presente invención proporciona la posibilidad de controlar el tamaño de los ácidos nucleicos eluidos variando las condiciones de elución, es muy flexible. En los ejemplos también se describen condiciones de elución particularmente adecuadas para aislar ácidos nucleicos pequeños que tienen un tamaño de 1.000 nt o menos, 700 nt o menos, 600 nt o menos, 500 nt o menos, 400 nt o menos, 300 nt o menos, 200 nt o menos o incluso 100 nt o menos. En particular, usar una disolución de elución que comprende una sustancia tamponante tal como Tris a un valor de pH que se encuentra en un intervalo de 8 a 10,5 permite eluir selectivamente ácidos nucleicos que tienen un tamaño de 1.000 nt o menos, preferiblemente 700 nt o menos o incluso 500 nt o menos. Por ejemplo, usar una disolución de elución que comprende Tris como base libre y un pH de aproximadamente 10 a 10,5 permite eluir selectivamente ácidos

nucleicos que tienen un tamaño de menos de 500 nt, e incluso menos de 300 nt. Además, usar una disolución de elución que comprende hidróxido alcalino, por ejemplo hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, permite eluir selectivamente ácidos nucleicos pequeños que tienen un tamaño de menos de 500 nt, preferiblemente menos de 300 nt. Tal como se muestra mediante los ejemplos, el valor de corte que se logra depende de la cantidad de hidróxido alcalino usado. Cuanto mayor sea la concentración de hidróxido alcalino en la disolución de elución, mayor es el tamaño de los ácidos nucleicos extracelulares eluidos. Por tanto, ajustando la concentración de hidróxido es posible ajustar el tamaño de los ácidos nucleicos eluidos. Cuando se usa Tris en forma de un tampón, se prefiere usar un valor de pH que se encuentra en un intervalo de 8 a 9,5, preferiblemente de 8,5 a 9. Tal como se muestra mediante los ejemplos, usar una disolución de elución respectiva permite eluir selectivamente ácidos nucleicos pequeños. También puede influirse en el valor de corte incorporando una sal en la disolución de elución, preferiblemente una sal de metal alcalino tal como cloruro de sodio o cloruro de potasio. Tal como se muestra mediante los ejemplos, ajustar la concentración de la sal en el tampón de elución tiene una fuerte influencia sobre el tamaño de los ácidos nucleicos que se eluyen. Cuanto mayor sea la concentración de sal, más largos son los ácidos nucleicos extracelulares que se eluyen de la fase sólida. Por tanto, tal como se describe en el presente documento, una elución selectiva de tamaño es posible ajustando el valor de pH, la concentración de sal y/o la incorporación de aditivos adicionales que influyen en la eficacia de elución. En este caso, el experto puede proporcionar una disolución de elución que tiene un valor de corte deseado siguiendo las enseñanzas y orientación proporcionadas en la presente solicitud y en particular los ejemplos.

Cuando se realiza una elución selectiva de tamaño, se prefiere que la fase sólida porte grupos de intercambio aniónico, que comprenden grupo protonables, y el valor de pKa de los grupos protonables está en el intervalo de desde 8 hasta 12, más preferiblemente desde 9 hasta 11. Los grupos de intercambio aniónico pueden comprender átomos de nitrógeno, preferiblemente los grupos de intercambio aniónico se derivan de aminas. En particular, los grupos de intercambio aniónico son grupos amino terciario, preferiblemente grupos dialquilamino, más preferiblemente grupos dietilamino y de manera especialmente preferible grupos dietilaminopropilo. Tal como se muestra en los ejemplos, las respectivas aminas terciarias muestran buenas tasas de recuperación particulares y, además, permiten una elución selectiva de tamaño fiable con valores de corte bien definidos. Por tanto, se prefiere usar grupos amino terciario, preferiblemente grupos dialquilamino, más preferiblemente grupos dietilamino y de manera especialmente preferible grupos dietilaminopropilo cuando se pretende realizar una selección por tamaño, respectivamente fraccionamiento por tamaño, durante la elución. En determinadas realizaciones, el material de fase sólida tiene una superficie que contiene silicio tal como una superficie de poli(ácido silícico) y los grupos de intercambio aniónico se acoplan a dicha superficie usando un grupo silano, es decir por medio de silanización. Por ejemplo, la fase sólida puede comprender una superficie que contiene silicio, preferiblemente una superficie de poli(ácido silícico) y puede derivatizarse con un compuesto de silano que comprende los grupos de intercambio aniónico, preferiblemente con dietilaminopropiltrimetoxisilano. Preferiblemente, la superficie de la fase sólida no se derivatiza con otro compuesto de silano. Según la reivindicación 1, se usan partículas magnéticas como fase sólida.

Según una realización, la etapa de elución de fraccionamiento por tamaño comprende las siguientes etapas:

aa) al menos una porción de los ácidos nucleicos extracelulares unidos a la fase sólida se eluye de la fase sólida a un segundo pH que es mayor que el primer pH, en la que la longitud promedio de los ácidos nucleicos eluidos de la fase sólida en esta etapa es más corta que la longitud promedio de los ácidos nucleicos que permanecen unidos a la fase sólida;

bb) opcionalmente eluir los ácidos nucleicos que permanecen unidos a la fase sólida en la etapa aa) de la fase sólida. En este caso, puede usarse cualquier método de elución.

Preferiblemente, la elución se logra en la etapa bb) usando un tercer pH que es mayor que el segundo pH. El tercer pH puede elegirse preferiblemente de modo que esencialmente todos los ácidos nucleicos que permanecieron unidos a la fase sólida en la etapa aa) se eluyen de la misma en la etapa bb). El término "esencialmente todos" a este respecto en particular se refiere a al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 97% o al menos el 98% de los ácidos nucleicos unidos. El tercer pH es preferiblemente de al menos 0,1 unidades, al menos 0,2 unidades, al menos 0,3 unidades, al menos 0,5 unidades, al menos 0,75 unidades, al menos 1 unidad, al menos 1,25 unidades, al menos 1,5 unidades, al menos 1,75 unidades o al menos 2 unidades mayor que el segundo pH. Además, la diferencia entre el segundo pH y el tercer pH es preferiblemente de 3 unidades o menos, más preferiblemente 2 unidades o menos, 1,5 unidades o menos, 1 unidad o menos, 0,7 unidades o menos o 0,5 unidades o menos. Se encontró que pequeñas diferencias tales como, por ejemplo, una diferencia en 0,5 unidades de pH ya es suficiente para una elución selectiva de tamaño.

Según una realización, la concentración de sal y/o la temperatura durante la etapa de elución (bb) según una realización no difiere significativamente y en particular no es significativamente mayor que durante la elución de la etapa (aa). Preferiblemente, la concentración de sal no difiere en más de 100 mM, más preferiblemente no más de 50 mM y lo más preferiblemente no más de 25 mM. Además, la temperatura usada para la elución según una realización no difiere en más de 10°C, más preferiblemente no más de 5°C o no más de 2,5°C. Además, preferiblemente también las otras condiciones de elución excepto el valor de pH son preferiblemente similares en la primera y segunda etapa de elución.

Pueden realizarse etapas de procesamiento adicionales en el método según la presente invención antes de la etapa (a) y/o entre las etapas (a) y (b) y cualesquiera etapas posteriores (c) y (d), (si se realiza la respectiva etapa opcional (c)). Según una realización, no se realiza etapa de digestión de la muestra antes de la etapa (a), en la que se usan reactivos que aumentan el volumen de la muestra (que es opcionalmente una muestra estabilizada) en más del 15%. Preferiblemente, no se realiza etapa de digestión de la muestra antes de la etapa (a), en la que se usan reactivos que aumentan el volumen de la muestra en más del 10%, más preferido en más del 5%, lo más preferido no se usan reactivos para digerir la muestra que aumentan el volumen en más del 2,5%. De ese modo se garantiza que la mezcla de unión consiste predominantemente en el material de muestra que comprende los ácidos nucleicos extracelulares (que se estabiliza opcionalmente) garantizando de ese modo un rendimiento máximo de los ácidos nucleicos extracelulares tal como se explicó anteriormente.

Dependiendo del tipo de muestra que va a procesarse, se encontró que los resultados de aislamiento pueden variar debido a variaciones en la composición de la muestra. La homogeneidad de los resultados de aislamiento puede mejorarse pretratando la muestra (que es opcionalmente una muestra estabilizada) con medios apropiados. Por tanto, está dentro del alcance de la presente invención realizar una etapa de pretratamiento de la muestra antes de la etapa (a). Sin embargo, dicha etapa de pretratamiento no debe suponer una adición considerable al volumen de la muestra y, por tanto, al volumen de la mezcla de unión. Preferiblemente, la contribución de los reactivos usados durante una respectiva etapa de pretratamiento de la muestra al volumen de la mezcla de unión es menor del 5%, preferiblemente menor del 2,5%, más preferiblemente menor del 2%, menor del 1,5% o menor del 1%, si se usan en cualquier caso reactivos que aumentan el volumen (véase anteriormente). Las etapas de pretratamiento adecuadas incluyen pero no se limitan a acciones mecánicas, químicas, físicas o enzimáticas sobre la muestra. Los ejemplos de etapas de pretratamiento incluyen pero no se limitan a moler la muestra en un molino de perlas, la aplicación de ultrasonidos, calentamiento, congelación y descongelación, la adición de detergentes y/o la adición de compuestos de degradación de proteínas tales como, por ejemplo, enzimas de degradación de proteínas, por ejemplo, hidrolasas o proteasas. Según una realización, se realiza una etapa de pretratamiento antes de la etapa a), en la que al menos un compuesto de degradación de proteínas, preferiblemente una enzima proteolítica, preferiblemente una proteasa tal como a proteinasa, y/o un detergente se añaden a la muestra antes de la etapa a).

Según una realización, hasta la etapa c) no se usan sales caotrópicas para procesar la muestra.

Una muestra biológica que comprende ácidos nucleicos extracelulares tal como se da a conocer en el presente documento puede seleccionarse por ejemplo de sangre completa, plasma, suero, esputos, líquido lagrimal, líquido linfático, orina, sudor, licor, líquido cefalorraquídeo, ascitis, leche, deposiciones, lavado bronquial, saliva, líquido amniótico, secreciones nasales, secreciones vaginales, semen/líquido seminal, excreciones y secreciones de heridas, y sobrenadantes de cultivos celulares y sobrenadantes obtenidos de otras muestras de hisopo. Un líquido corporal o una muestra que se deriva de un líquido corporal que comprende ácidos nucleicos extracelulares, lo más preferiblemente es sangre completa, plasma o suero. La muestra procesada según la reivindicación 1 es una muestra libre de células o reducida en células que se obtuvo de un líquido corporal retirando células mediante separación. La muestra comprende ácidos nucleicos extracelulares y el método según la reivindicación 1 aísla ADN extracelular.

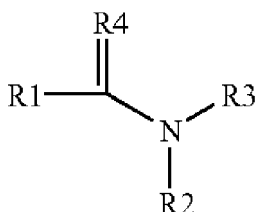
Según la reivindicación 1, la muestra que comprende los ácidos nucleicos extracelulares es una muestra libre de células o reducida en células que se obtuvo de un líquido corporal eliminando las células mediante separación. Puede obtenerse una muestra libre de células o reducida en células respectiva usando tecnologías apropiadas para eliminar células. Un ejemplo típico es plasma sanguíneo o suero sanguíneo que puede obtenerse de sangre completa. Las células se separan de la muestra restante con el fin de obtener una fracción libre de células, respectivamente reducida en células de la muestra que comprende los ácidos nucleicos extracelulares. Por tanto, las células se eliminan de la muestra que contiene células, que es un líquido corporal, para proporcionar la muestra libre de células o reducida en células que comprende los ácidos nucleicos extracelulares y a partir de la cual los ácidos nucleicos extracelulares se aíslan usando el método según la reivindicación 1. Muestras que pueden comprender meramente cantidades minoritarias de células residuales son por ejemplo plasma o suero. Con el fin de mejorar los resultados se prefiere que también se retiren las respectivas células restantes (o células potencialmente restantes) ya que podrían contaminar la población de ácidos nucleicos extracelulares durante el aislamiento. Dependiendo del tipo de muestra, las células, incluyendo células residuales, pueden separarse y retirarse, por ejemplo, mediante centrifugación, preferiblemente centrifugación a alta velocidad, o usando medios distintos de centrifugación, tales como por ejemplo filtración, sedimentación o unión a superficie sobre partículas (opcionalmente magnéticas) si ha de evitarse una etapa de centrifugación. También pueden incluirse fácilmente respectivas etapas de eliminación de células en un protocolo de preparación de muestras automatizado. También pueden procesarse adicionalmente las respectivas células eliminadas por ejemplo con el fin de analizar los ácidos nucleicos intracelulares. Las células pueden, por ejemplo, almacenarse y/o biomoléculas tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas pueden aislarse de las células eliminadas.

Según una realización, la muestra a partir de la cual se aíslan los ácidos nucleicos extracelulares tal como se define en reivindicación 1 es una muestra estabilizada. Muchas muestras tales como muestras de sangre o muestras derivadas de sangre tales como plasma o suero se estabilizan tras la recogida usando estabilizadores apropiados. Por ejemplo, sangre o muestras derivadas de sangre tales como plasma o suero, se estabilizan habitualmente añadiendo al menos un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante tal como EDTA o citrato de sodio. La

estabilización usada puede ayudar a conservar la población de ácidos nucleicos extracelulares en la muestra. Se conocen varios métodos en la técnica anterior que logran una estabilización de la muestra incluyendo una estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en la muestra. La estabilización evita la degradación de los ácidos nucleicos extracelulares y/o evita la contaminación de los ácidos nucleicos extracelulares por ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico que se libera de células que están contenidas en la muestra. Un método de estabilización común emplea el uso de formaldehído para estabilizar las membranas celulares, reduciendo de ese modo la lisis celular y, además, el formaldehído inhibe las nucleasas. Se describen métodos respectivos, por ejemplo, en los documentos US 7.332.277 y US 7.442.506. Se describen métodos alternativos para estabilizar muestras de sangre, por ejemplo, en los documentos US 2010/0184069 y US 2010/0209930. Un método preferido para estabilizar una muestra se da a conocer en la solicitud de patente europea EP11182819.0, presentada el 26 de septiembre de 2011 y la solicitud de patente estadounidense 61/539.245 presentada el 26 de septiembre de 2011, y en la correspondiente solicitud PCT que reivindica las prioridades de las solicitudes EP y US mencionadas anteriormente.

Según una realización, la muestra es una muestra estabilizada que se estabilizó poniendo en contacto la muestra con

- a) al menos un inhibidor de la apoptosis,
- b) al menos un agente hipertónico, que estabiliza las células comprendidas en la muestra, y/o
- c) al menos un compuesto según la fórmula 1



fórmula 1

en la que R1 es un residuo de hidrógeno o un residuo de alquilo, preferiblemente un residuo de alquilo C1-C5, más preferido un residuo de metilo, R2 y R3 son residuos de hidrocarburo idénticos o diferentes con una longitud de la cadena de carbono de 1 - 20 átomos dispuestos de manera lineal o ramificada, y R4 es un residuo de oxígeno, azufre o selenio.

El término "inhibidor de la apoptosis" tal como se usa en el presente documento en particular se refiere a un compuesto cuya presencia en una muestra biológica que contiene células proporciona una reducción, prevención y/o inhibición de procesos apoptóticos en las células y/o hace que las células sean más resistentes a estímulos apoptóticos. Preferiblemente, el al menos un inhibidor de la apoptosis que se usa para estabilizar la muestra se selecciona del grupo que consiste en inhibidores metabólicos, inhibidores de caspasa e inhibidores de calpaína. Preferiblemente, el inhibidor de apoptosis es permeable a las células. Preferiblemente, el inhibidor de apoptosis es un inhibidor de caspasa que tiene una o más de las siguientes características: a) es un inhibidor de pancaspasa y, por tanto, es un inhibidor de caspasa de amplio espectro; b) comprende un péptido específico de caspasa modificado, en el que, preferiblemente, dicho péptido específico de caspasa se modifica mediante un compuesto de aldehído, nitrilo o cetona; c) comprende un péptido específico de caspasa modificado que se modifica preferiblemente en el extremo carboxilo terminal con un grupo O-fenoxilo o una fluorometil cetona (FMK); y/o d) se selecciona del grupo que consiste en Q-VD-OPh y Z-VAD(OMe)-FMK. Los intervalos de concentración adecuados para el/los inhibidor(es) de la apoptosis en la muestra estabilizada incluyen pero no se limitan a de 0,01 μM a 100 μM , de 0,05 μM a 100 μM , de 0,1 μM a 50 μM , de 0,5 μM a 50 μM , de 1 μM a 40 μM , más preferiblemente de 1 μM a 30 μM o de 2,5 μM a 25 μM . Según una realización, se usa un inhibidor de caspasa en combinación con un anticoagulante con el fin de estabilizar una muestra de sangre.

El al menos un agente hipertónico que puede estar comprendido en la muestra estabilizada se usa preferiblemente en combinación con el inhibidor de la apoptosis, que es preferiblemente un inhibidor de caspasa. El agente hipertónico induce contracción celular mediante efectos hipertónicos leves (ósmosis), aumentando de ese modo la estabilidad celular. El agente hipertónico presente en la muestra estabilizada en particular estabiliza células contenidas en la muestra, reduciendo de ese modo la cantidad de ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico que puede liberarse de células dañadas. De ese modo, la población de ácidos nucleicos extracelulares se conserva sustancialmente y el riesgo de contaminar diluyendo respectivamente los ácidos nucleicos extracelulares con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico, se reduce. Preferiblemente, el agente hipertónico tiene una o más de las siguientes características:

- a) no está cargado;

b) es un compuesto orgánico hidroxilado y, por consiguiente, porta al menos uno, preferiblemente al menos dos grupos hidroxilo;

c) es un poliol, que comprende preferiblemente de 2 a 10 grupos hidroxilo, preferiblemente de 3 a 8 grupos hidroxilo;

5 d) es un compuesto de hidrocarbonilo y, por tanto, un compuesto que presenta uno o más grupos hidroxilo (OH) y uno o más grupos carbonilo;

e) se selecciona del grupo de compuestos de cetona hidroxilados, hidratos de carbono o compuestos derivados de los mismos;

10 f) se selecciona del grupo que consiste en polialcoholes, alcoholes de azúcar, hidratos de carbono, glucosa, rafinosa, sacarosa, fructosa, alfa-d-lactosa monohidratada, dihidroxiacetona, alcoholes, glicerol, eritritol, manitol, sorbitol, volenitol;

g) es soluble en agua y no tóxico para las células; y/o

h) no induce ni soporta la lisis de las células contenidas en la muestra biológica y, por consiguiente, preferiblemente no actúa como detergente o como agente de disolución de membranas celulares.

15 La muestra estabilizada puede comprender el al menos un agente hipertónico o mezcla de agentes hipertónicos en un intervalo de concentración seleccionado de 0,05 M a 2 M, de 0,1 M a 1,5 M, de 0,15 M a 0,8 M, de 0,2 M a 0,7 M o de 0,1 M a 0,6 M. Las respectivas concentraciones son particularmente adecuadas cuando se usa un compuesto orgánico hidroxilado, por ejemplo un hidrato de carbono tal como dihidroxiacetona como agente hipertónico para la estabilización.

20 Tal como se comentó anteriormente, la muestra estabilizada puede comprender un compuesto según la fórmula 1 que es eficaz para lograr un efecto de estabilización notable y para conservar sustancialmente la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares en la muestra estabilizada. Además, puede usarse una mezcla de uno o más compuestos según la fórmula 1 para la estabilización. Dicho compuesto también puede usarse en combinación con el inhibidor de la apoptosis y/o el agente hipertónico descrito anteriormente. Los residuos de hidrocarburo R2 y/o R3 pueden seleccionarse independientemente entre sí del grupo que comprende alquilo, incluyendo alquilo de cadena corta y alquilo de cadena larga, alqueno, alcoxilo, alcoxilo de cadena larga, cicloalquilo, arilo, haloalquilo, alquilsililo, alquilsililoxilo, alquileno, alquendiilo, arileno, carboxilatos y carbonilo. La longitud de cadena n de R2 y/o R3 puede tener en particular los valores 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20. Preferiblemente R2 y R3 tienen una longitud de la cadena de carbono de 1-10. Preferiblemente, R2 y R3 tienen una longitud de la cadena de carbono de 1-5. Particularmente preferida es una longitud de cadena de 1 ó 2 para R2 y R3. La longitud de cadena n de R1 tiene preferiblemente el valor 1, 2, 3, 4 ó 5. Particularmente preferida es una longitud de cadena de 1 ó 2 para R1. R4 es preferiblemente oxígeno. Según una realización preferida, el compuesto según la fórmula 1 es una amida de ácido N,N-dialquilcarboxílico. Según una realización, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en N,N-dimetilacetamida; N,N-dietilacetamida; N,N-dimetilformamida y N,N-dietilformamida. Preferiblemente, la sustancia según la fórmula 1 es N,N-dimetilacetamida (DMAA). La muestra estabilizada puede comprender dicho compuesto según la fórmula 1 o mezcla de compuestos respectivos en un intervalo de concentración del 0,1% hasta el 50%. Los intervalos de concentración preferidos pueden seleccionarse del grupo que consiste en del 0,1% al 30%, del 1% al 20%, del 1,25% al 15%, del 1,5% al 10%, del 1,5% al 7,5% y del 1,5% al 5%. Las concentraciones respectivas son particularmente adecuadas cuando se usa una amida de ácido N,N-dialquil-carboxílico, por ejemplo N,N-dimetilacetamida, N,N-dietilacetamida, N,N-dietilformamida o N,N-dimetilformamida como agente estabilizante. Además, puede usarse N,N-dimetilformamida.

También puede usarse un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante además de los estabilizadores mencionados anteriormente.

45 El término "muestra" tal como se da a conocer en el presente documento se refiere preferiblemente a una muestra natural, por ejemplo tal como se obtiene de un ser humano o animal, que, sin embargo, puede haberse estabilizado opcionalmente mediante agentes apropiados. También se abarcan muestras estabilizadas mediante el término "muestra" y también mediante el término "muestra natural" tal como se da a conocer en el presente documento. Además, las células pueden haberse eliminado de la muestra original. También están abarcadas las respectivas muestras células reducidas en células o libres de células mediante el término "muestra" y también mediante el término "muestra natural" tal como se da a conocer en el presente documento. Ejemplos típicos de muestras naturales respectivas son líquidos corporales tales como sangre y muestras derivadas de un líquido corporal, en particular muestras que se derivan de un líquido corporal eliminando células del líquido corporal. La muestra procesada según la reivindicación 1 es una muestra libre de células o reducida en células que se obtuvo de un líquido corporal eliminando células mediante separación. Se obtiene sangre del ser humano o animal y habitualmente se estabiliza inmediatamente, por ejemplo, en EDTA u otras composiciones de estabilización adecuadas (véase anteriormente). Además, se eliminan células de la muestra de sangre para obtener plasma sanguíneo y/o suero sanguíneo. Muestras respectivas que se han estabilizado opcionalmente y de las que se han eliminado células también están abarcadas por el término "muestra" así como por el término "muestra natural" tal

como se da a conocer en el presente documento. También se describen anteriormente muestras adecuadas. El término "muestra natural" tal como se da a conocer en el presente documento preferiblemente no se refiere a y, por tanto, no incluye muestras procesadas a las que se han añadido reactivos de unión, reactivos de lisis o sales caotrópicas que aumentan el volumen de la muestra natural en más del 10%, más del 5%, más del 2,5%, más del 2% o más del 1%. Según una realización, no se añadieron reactivos respectivos. Tal como se comentó anteriormente, la muestra natural tal como se da a conocer en el presente documento puede comprender agentes estabilizantes. Para evitar dudas, los respectivos agentes estabilizantes y/o composiciones estabilizantes que se añadieron cuando se obtiene el líquido corporal no están abarcados en la determinación de la contribución de volumen de reactivos que se añadieron para procesar la muestra. Esto en particular se aplica si dichos agentes estabilizantes no inducen y/o promueven lisis celular. Si se usan agentes estabilizantes que inducen y/o promueven lisis, según una realización, están abarcados en la determinación de la contribución de volumen de reactivos que se añadieron para procesar la muestra. Sin embargo, habitualmente no se usan los respectivos agentes como estabilizadores para estabilizar ácidos nucleicos libres de células, porque si inducen lisis de las células, no estabilizan la población de ácidos nucleicos extracelulares sino que promueven su contaminación con ácidos nucleicos intracelulares.

La fase sólida que se usa en el método según la presente invención porta grupos de intercambio aniónico. Los grupos de intercambio aniónico comprenden preferiblemente al menos un grupo protonable. Puede usarse cualquier fase sólida adecuada para cromatografía de intercambio aniónico, incluyendo pero sin limitarse a materiales que contienen silicio tales como materiales de sílice y poli(ácido silícico), borosilicatos, silicatos, vidrios anorgánicos, polímeros orgánicos tales como poli(met)acrilatos, poliuretanos, poliestireno, agarosa, polisacáridos tales como celulosa, óxidos de metal tales como óxido de aluminio, óxido de magnesio, óxido de titanio y óxido de zirconio, metales tales como oro o platino, sephadex, sepharose, poli(acrilamida), polímeros de divinilbenceno, polímeros de estireno-divinilbenceno, dextranos, y derivados de los mismos; superficies de vidrio o sílice. La fase sólida está hecha preferiblemente de o contiene material mineral o polimérico tal como sílice, vidrio, cuarzo, polietileno, polipropileno, poli(fluoruro de vinileno), poli(acrilonitrilo), poli(cloruro de vinilo), poli(acrilato), metacrilato o metacrilato de metilo. Preferiblemente, al menos la superficie que porta los grupos de intercambio aniónico está compuesta por uno de estos materiales o una mezcla de los mismos, preferiblemente materiales de sílice y/o vidrio.

Como fase sólida, se usan partículas magnéticas que comprenden material magnético. Los ejemplos incluyen pero no se limitan a partículas magnéticas (por ejemplo, paramagnéticas, superparamagnéticas, ferromagnéticas o ferrimagnéticas), incluyendo pero sin limitarse a poliestireno, agarosa, poli(acrilamida), dextrano, y/o materiales de sílice y poli(ácido silícico) que tienen un material magnético incorporado en los mismos o asociado con los mismos. El material magnético puede ser ferrimagnético, ferromagnético, paramagnético o superparamagnético y preferiblemente es superparamagnético o ferromagnético. Preferiblemente el material magnético está completamente encapsulado, por ejemplo, por el material de sílice, poli(ácido silícico), vidrio o polimérico. En determinadas realizaciones preferidas, la matriz de unión a ácido nucleico es una partícula que contiene silicio, preferiblemente una partícula de poli(ácido silícico), preferiblemente una partícula magnética de poli(ácido silícico) que porta grupos de intercambio aniónico. Como se usan partículas magnéticas, la separación puede lograrse mediante la ayuda de un imán. Según una realización, la matriz de unión a ácido nucleico que porta el ácido nucleico se une magnéticamente a la parte inferior o a una pared del recipiente de reacción que contiene la mezcla de reacción y entonces se retira la mezcla de reacción restante del recipiente de reacción, por ejemplo mediante succión o decantación, o las partículas magnéticas se retiran del recipiente de reacción metiendo un imán en el recipiente de reacción y retirando las partículas magnéticas de la muestra restante.

Para funcionalizar una superficie con grupos de intercambio aniónico, son factibles varios métodos. Los grupos de intercambio aniónico pueden unirse directamente a la superficie, o bien de manera covalente o bien no covalente, electrostáticamente y/o pueden formar parte de un polímero u otra composición que forma un recubrimiento de superficie o que se proporciona en la superficie de la fase sólida. Los grupos de intercambio aniónico también pueden precipitarse en la fase sólida. Según una realización, los grupos de intercambio aniónico se aplican en forma de un recubrimiento sobre la fase sólida.

Los grupos de intercambio aniónico se unen preferiblemente a la superficie de un material de fase sólida tal como se describió anteriormente, en particular mediante acoplamiento covalente. Por tanto, la fase sólida puede funcionalizarse para la unión de los grupos de intercambio aniónico, por ejemplo con funcionalidades tales como Si-O-Si, Si-OH, alcohol, diol o polioliol, carboxilato, amina, fosfato o fosfonato. Los grupos de intercambio aniónico pueden unirse a la fase sólida, por ejemplo, usando epóxidos, ácidos carboxílicos (activados), silanos, anhídridos de ácido, cloruros de ácido, grupos formilo, grupos tresilo o grupos pentafluorofenilo. Los grupos funcionales pueden unirse directamente a la fase sólida o por medio de grupos espaciadores (lineales o ramificados), por ejemplo hidrocarburos tales como grupos $-(CH_2)_n-$, hidratos de carbono, polietilenglicoles y polipropilenglicoles. Alternativamente, también puede usarse un polímero compuesto por monómeros que comprenden el grupo de intercambio aniónico tal como un grupo amino funcional como material de intercambio aniónico. En determinadas realizaciones, el material de fase sólida tiene una superficie que contiene silicio tal como una superficie de poli(ácido silícico) y los grupos de intercambio aniónico se acoplan a dicha superficie usando un grupo silano.

Los materiales de intercambio aniónico que pueden usarse en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, materiales modificados con grupos de intercambio aniónico. Ejemplos de tales grupos de intercambio

aniónico son monoaminas, diaminas, poliaminas y grupos heterocíclicos alifáticos o aromáticos que contienen nitrógeno. Preferiblemente, el grupo de intercambio aniónico comprende al menos un grupo amino primario, secundario o terciario. En realizaciones preferidas, el grupo de intercambio aniónico comprende un grupo seleccionado del grupo que consiste en aminas primarias, secundarias y terciarias de fórmula

5 R_3N, R_2NH, RNH_2 y/o $X-(CH_2)_n-Y$

en la que

X es R_2N, RNH o NH_2 ,

Y es R_2N, RNH o NH_2 ,

10 R es independientemente entre sí un sustituyente alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo lineal, ramificado o cíclico que puede comprender uno o más heteroátomos, preferiblemente seleccionados de O, N, S y P, y

n es un número entero en el intervalo de desde 0 hasta 20, preferiblemente de 0 a 18.

15 Por tanto, los grupos de intercambio aniónico pueden tener un grupo protonable y opcionalmente pueden tener más de un grupo protonable que puede ser el mismo o diferente entre sí. Un grupo protonable es preferiblemente un grupo químico que es neutro o no está cargado a un valor de pH alto y está protonado a un valor de pH bajo, teniendo de ese modo una carga positiva. En particular, el grupo protonable está cargado positivamente al primer pH en los métodos según la presente invención en los que se produce la unión del ácido nucleico a la fase sólida. Preferiblemente, el valor de pKa del grupo protonable (protonado) está en el intervalo de desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 13, más preferiblemente desde aproximadamente 8,5 hasta aproximadamente 12 o desde aproximadamente 9 hasta aproximadamente 11.

20 Por tanto, ejemplos de grupos de intercambio aniónico adecuados son en particular grupos amino tales como grupos amino primario, secundario y terciario así como aminas cíclicas, aminas aromáticas y aminas heterocíclicas, preferiblemente grupos amino terciario. Los grupos amino portan preferiblemente sustituyentes alquilo, alquenilo, alquinilo y/o aromáticos, incluyendo sustituyentes cíclicos y sustituyentes que junto con el átomo de nitrógeno forman un anillo heterocíclico o heteroaromático. Los sustituyentes comprenden preferiblemente de 1 a 20 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 12, de 1 a 8, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3 ó 1 ó 2 átomos de carbono. Pueden ser lineales o ramificados y pueden comprender heteroátomos tales como átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre, silicio y halógeno (por ejemplo flúor, cloro, bromo). Preferiblemente, los sustituyentes comprenden no más de 4, más preferiblemente no más de 3, no más de 2 o no más de 1 heteroátomo.

30 En una realización el grupo de intercambio aniónico porta preferiblemente de 1 a 10 grupos amino. Más preferiblemente los grupos de intercambio aniónico portan de 2 a 8, y particularmente el grupo de intercambio aniónico porta de 2 a 6 grupos amino.

35 Ejemplos particulares de funciones amina son aminas primarias tales como aminometilo (AM), aminoetilo (AE), aminoalquilo, alquilaminoalquilo, dialquilaminoalquilo tal como dietilaminoetilo (DEAE), etilendiamina, dietilentriamina, trietilentetraamina, tetraetilenpentaamina, pentaetilenhexaamina, trimetilamino (TMA), trietilaminoetilo (TEAE), polietilenimina lineal o ramificada (PEI), polietilenimina carboxilada o hidroxialquilada, jeffamine, espermina, espermidina, 3-(propilamino)propilamina, dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM), polialilamina, polivinilamina, N-morfolinoetilo, polilisina y tetraazacicicloalcanos. Grupos protonables preferidos unidos a los ligandos de unión a ácido nucleico son grupos dialquilamino, especialmente grupos dietilamino. Tal como se muestra mediante los ejemplos, estos grupos son favorables con respecto a su eficacia de unión y sus ventajas cuando se realiza una elución selectiva de tamaño.

40 El grupo de intercambio aniónico se une preferiblemente a la fase sólida por medio de un grupo de unión. Por tanto, el grupo de intercambio aniónico en particular comprende un grupo protonable unido a un grupo de unión. El grupo de unión es preferiblemente un grupo alquileno, alquenileno o alquinileno lineal, ramificado o cíclico que comprende preferiblemente de 1 a 20 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 12, de 1 a 8, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3 ó 1 ó 2 átomos de carbono. Puede comprender además heteroátomos tales como átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre, silicio y halógeno (por ejemplo flúor, cloro, bromo), preferiblemente no más de 4, más preferiblemente no más de 3, no más de 2 o no más de 1 heteroátomo. En realizaciones preferidas, el grupo de unión es un grupo alquileno, en particular un grupo propileno.

50 En determinadas realizaciones, la fase sólida comprende además ligandos inertes. Preferiblemente, los ligandos inertes no están implicados significativamente en la unión a ácido nucleico y/o no se unen fuertemente a ácidos nucleicos. En particular, los ligandos inertes son neutros o no están cargados y preferiblemente son hidrófilos. Los ligandos inertes pueden unirse a la matriz de unión a ácido nucleico tal como se describe en el presente documento para los ligandos de unión a ácido nucleico. Preferiblemente, los ligandos inertes son restos orgánicos, en particular restos alquilo, alquenilo, alquinilo o aromáticos que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos y que comprenden preferiblemente al menos un heteroátomo tal como átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre, silicio y halógeno (por ejemplo flúor, cloro, bromo). El ligando inerte comprende preferiblemente de 1 a 20 átomos de carbono, más

preferiblemente de 1 a 12, de 1 a 8, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3 ó 1 ó 2 átomos de carbono, y hasta 4, más preferiblemente hasta 3, hasta 2 o hasta 1 heteroátomo. Se prefieren particularmente ligandos inertes que comprenden al menos un grupo hidroxilo, en particular al menos 2 grupos hidroxilo, tales como ligandos que comprenden un grupo 2,3-dihidroxipropilo. Un ejemplo específico de los ligandos inertes es un grupo (2,3-dihidroxipropil)oxipropilo.

Los ligandos inertes pueden usarse para reducir la cantidad de grupos de intercambio aniónico de unión a ácido nucleico que se unirán a la fase sólida durante el acoplamiento de los grupos de intercambio aniónico. Por tanto, la densidad de los grupos de intercambio aniónico sobre la superficie de la fase sólida puede controlarse y ajustarse a la posterior aplicación de la fase sólida. En particular, la fase sólida puede comprender grupos de intercambio aniónico y ligandos inertes en una razón en el intervalo de desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 1:10, preferiblemente desde aproximadamente 1:2 hasta aproximadamente 1:5, más preferiblemente de aproximadamente 1:3. Usar una fase sólida tal como partículas magnéticas que comprenden adicionalmente ligandos inertes tal como se describió, tiene la ventaja de que pueden usarse condiciones de elución muy suaves, lo que es ventajoso para muchas aplicaciones posteriores.

En otra realización, la fase sólida no comprende tales ligandos inertes. Preferiblemente, la fase sólida sólo comprende los grupos de intercambio aniónico y no comprende ningún otro ligando. Según una realización, la fase sólida comprende una superficie que contiene silicio, preferiblemente una superficie de poli(ácido silícico) y se derivatiza con un compuesto de silano que comprende los grupos de intercambio aniónico y no se derivatiza con otro compuesto de silano.

Se describen ejemplos de fases sólidas de unión a ácidos nucleicos, grupos de intercambio aniónico, grupo protonables y ligandos inertes adecuados en los documentos WO 2010/072834 A1, DE10 2008 063 001A1, WO002010072821 A1 y DE 10 2008 063 003.

Pueden aislarse ácidos nucleicos totales de la muestra y los ácidos nucleicos extracelulares están comprendidos como una porción en la misma. Puesto que la muestra es una muestra libre de células o reducida en células que se obtuvo de un líquido corporal eliminado células mediante separación, los ácidos nucleicos totales aislados de la misma comprenderán predominantemente o incluso consistirán en ácidos nucleicos extracelulares.

También es posible aislar al menos predominantemente un ácido nucleico diana específico. Un ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un determinado tipo de ácido nucleico, por ejemplo ARN o ADN, incluyendo ARNm, microARN, otros ácidos nucleicos no codificantes, ácidos nucleicos modificados epigenéticamente, y otros ácidos nucleicos que están contenidos en la población de ácidos nucleicos extracelulares. Según la reivindicación 1, se aísla ADN extracelular. También está dentro del alcance de la presente invención, por ejemplo, digerir el ácido nucleico no diana usando nucleasas tras el aislamiento. El término ácido nucleico diana también puede referirse a un tipo específico de ácido nucleico, por ejemplo un ácido nucleico extracelular que se sabe que es un marcador de enfermedad determinado o un ácido nucleico viral. Tal como se comentó anteriormente, el aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares también puede comprender el aislamiento específico de un respectivo ácido nucleico diana por ejemplo usando sondas de captura apropiadas. El término "un ácido nucleico diana" también se refiere a un ácido nucleico que tiene una determinada longitud, por ejemplo un ácido nucleico que tiene una longitud de 2000 nt o menos, 1000 nt o menos o 500 nt o menos (tal como se comentó anteriormente, la longitud de cadena indicada por "nt" se refiere a pb en caso de ADN bicatenario). Aislar respectivos ácidos nucleicos diana más pequeños puede ser ventajoso porque se sabe que los ácidos nucleicos extracelulares habitualmente tienen un tamaño más pequeño de menos de 2000 nt, habitualmente menos de 1000 nt y a menudo incluso menos de 500 nt. Centrándose en el aislamiento, respectivamente la purificación, en los respectivos ácidos nucleicos pequeños puede aumentar la porción de ácidos nucleicos extracelulares obtenida en los ácidos nucleicos aislados. Medios adecuados tales como una elución selectiva se dieron a conocer anteriormente.

Los ácidos nucleicos aislados pueden analizarse directamente y/o procesarse adicionalmente usando métodos de ensayo y/o analíticos adecuados. Si se pretende un respectivo uso directo, se prefiere que una o más de las etapas de lavado descritas anteriormente se realice en el método según la presente invención en particular si se usan ensayos posteriores que son sensibles a impurezas.

Los ácidos nucleicos extracelulares aislados y/o un ácido nucleico extracelular diana específico comprendidos o que se sospecha que están comprendidos en los mismos pueden identificarse, cuantificarse, modificarse, ponerse en contacto con al menos una enzima, amplificarse, transcribirse de manera inversa, clonarse, secuenciarse, ponerse en contacto con una sonda y/o detectarse. En la técnica anterior se conocen bien métodos respectivos y se aplican comúnmente en el campo médico, de diagnóstico y/o pronóstico con el fin de analizar ácidos nucleicos extracelulares (véase también la descripción detallada en los antecedentes de la presente invención). Por tanto, después de que se aislaran ácidos nucleicos extracelulares, opcionalmente como parte de ADN total y/o de ácido nucleico total (véase anteriormente), pueden analizarse para identificar la presencia, ausencia o gravedad de un estado patológico incluyendo pero sin limitarse a una multitud de enfermedades neoplásicas, en particular tumores premalignos y tumores malignos tales como diferentes formas de cánceres. Por ejemplo los ácidos nucleicos extracelulares aislados pueden analizarse con el fin de detectar marcadores de diagnóstico y/o pronóstico (por ejemplo, ácidos nucleicos extracelulares derivados de feto o tumor) en muchos campos de aplicación, incluyendo

pero sin limitarse a pruebas genéticas prenatales no invasivas respectivamente cribado, cribado de enfermedades, oncología, cribado de cáncer, cribado de cáncer en estadio temprano, monitorización de terapia contra el cáncer, pruebas genéticas (genotipado), pruebas de enfermedades infecciosas, pruebas de patógenos, diagnóstico de lesión, diagnóstico de traumatismo, medicina de trasplantes o muchas otras enfermedades y, por tanto, son de relevancia para el diagnóstico y/o pronóstico. Los ácidos nucleicos extracelulares aislados pueden aislarse para identificar y/o caracterizar una infección patológica o una característica fetal. Por tanto, tal como se comentó anteriormente, el método de aislamiento descrito en el presente documento puede comprender además una etapa de análisis y/o procesamiento de ácidos nucleicos. El análisis/procesamiento adicional de los ácidos nucleicos puede realizarse usando cualquier método de análisis/procesamiento de ácidos nucleicos incluyendo, pero sin limitarse a tecnologías de amplificación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (Q-PCR), PCR digital, electroforesis en gel, electroforesis capilar, espectrometría de masas, detección de fluorescencia, espectrometría ultravioleta, ensayos de hibridación, secuenciación de ADN, análisis de restricción, transcripción inversa, NASBA, reacción en cadena de la polimerasa específica de alelos, ensamblaje de ciclado de la polimerasa (PCA), reacción en cadena de la polimerasa asimétrica, lineal después de la reacción en cadena de la polimerasa exponencial (LATE-PCR), amplificación dependiente de helicasa (HDA), reacción en cadena de la polimerasa de inicio en caliente, reacción en cadena de la polimerasa específica de secuencias internas (ISSR), reacción en cadena de la polimerasa inversa, reacción en cadena de la polimerasa mediada por ligasa, reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación (MSP), reacción en cadena de la polimerasa múltiplex, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la polimerasa en fase sólida, o cualquier combinación de las mismas. El experto conoce bien las respectivas tecnologías y, por tanto, no se requiere descripción adicional en este caso.

Los ácidos nucleicos extracelulares aislados pueden analizarse para identificar, detectar, cribar, monitorizar o excluir una enfermedad, una infección y/o al menos una característica fetal.

Además, tal como se comentó anteriormente, el método de aislamiento según la presente invención también puede usarse como protocolo de pretratamiento con el fin de concentrar los ácidos nucleicos extracelulares de una muestra para un posterior protocolo de purificación de ácidos nucleicos. Esta realización tiene la ventaja de que los ácidos nucleicos extracelulares pueden concentrarse a partir de un volumen de muestra grande hasta un volumen de muestra pequeño. Básicamente, puede usarse cualquier protocolo de purificación de ácidos nucleicos convencional posterior al método según la presente invención para purificar adicionalmente los ácidos nucleicos extracelulares que se concentraron usando el método según la presente invención. Los ejemplos para los respectivos métodos de purificación incluyen pero no se limitan a extracción, extracción en fase sólida, purificación basada en poli(ácido silícico), purificación basada en partículas magnéticas, extracción con fenol-cloroformo, cromatografía de intercambio aniónico (usando superficies de intercambio aniónico), electroforesis, precipitación y combinaciones de los mismos. También está dentro del alcance de la presente invención aislar específicamente ácidos nucleicos extracelulares diana específicos de la población de ácidos nucleicos extracelulares enriquecidos, por ejemplo usando sondas apropiadas que permiten una unión específica de secuencia y se acoplan a un soporte sólido. Además, puede usarse cualquier otra técnica de aislamiento de ácidos nucleicos conocida por el experto. Según una realización, los ácidos nucleicos se aíslan y por tanto se purifican adicionalmente de los ácidos nucleicos extracelulares enriquecidos usando al menos un agente caotrópico y/o al menos un alcohol. Preferiblemente, los ácidos nucleicos se aíslan uniéndolos a una fase sólida, preferiblemente una fase sólida que comprende silicio, preferiblemente poli(ácido silícico). Métodos y kits adecuados también están disponibles comercialmente tal como el kit de ácido nucleico circulante QIAamp® (QIAGEN), el kit de vacío o centrifugación de virus QIAamp MinElute (QIAGEN), el kit de NA circulante Chemagic (Chemagen), el kit NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel), el kit de purificación de ADN circulante en plasma/suero (Norgen Biotek), el kit de purificación de ARN circulante en plasma/suero (Norgen Biotek), el kit de gran volumen de ácidos nucleicos virales de alta pureza (Roche) y otros kits comercialmente disponibles adecuados para purificar ácidos nucleicos circulantes. En este caso, también están disponibles protocolos automatizados tales como aquellos que se ejecutan en el sistema QIASymphony, los instrumentos EZ1, el sistema QIAcube (QIAGEN) o MagNApure (Roche), sistemas de prep. de muestra m2000 (Abbott), sistemas EasyMag (bioMérieux). Además, puede usarse cualquier otro sistema de prep. de muestra de manipulación de líquidos automatizado disponible comercialmente adecuado para aislar ácidos nucleicos a partir de muestra biológicas libres de células. Si se realiza una respectiva etapa de purificación adicional posterior al método de aislamiento según la presente invención, no es necesario realizar las etapas de lavado descritas anteriormente.

El enriquecimiento de los ácidos nucleicos extracelulares a partir de un gran volumen (por ejemplo 5 ml o más) de material de partida permite la posterior purificación de ácidos nucleicos usando métodos de extracción de ácidos nucleicos comercialmente disponibles convencionales. En particular, realizar una etapa de enriquecimiento inicial mediante unión reversible de los ácidos nucleicos extracelulares a una fase sólida que porta grupos de intercambio aniónico permite purificar estos ácidos nucleicos usando sistemas automatizados actualmente disponibles, que normalmente limitan el volumen de entrada de muestra original a 1 ml o menos debido al aumento del volumen que se produce mediante la adición de reactivos adicionales que se añaden para lisar la muestra y/o para establecer las condiciones de unión.

El protocolo de aislamiento según la presente invención, tal como se ilustra en la sección de ejemplos más adelante, puede realizarse manualmente pero también se sometió a prueba en sistemas robóticos tales como QIASymphony SP, un robot de extracción de ácidos nucleicos comercialmente disponible que puede realizar una ejecución

completamente automatizada de protocolos de enriquecimiento y purificación de ácidos nucleicos. Dado que sólo pequeños volúmenes de una química simple han de añadirse según la presente invención, casi 3 ml de muestra pueden procesarse automáticamente y los ácidos nucleicos pueden extraerse de aproximadamente 3 ml de muestra (el volumen que pueden manejar dichos sistemas robóticos está limitado a 3 ml). Cuando se realiza el método según la presente invención manualmente (o cuando se adapta, por consiguiente, el sistema automatizado), pueden procesarse incluso volúmenes de muestra más grandes de 5 ml, 10 ml, 15 ml o más. Debido a la simplicidad del método según la presente invención, el riesgo de errores de manipulación es bajo. Además, el método es muy rápido y, por tanto, puede integrarse fácilmente como procedimiento de pretratamiento en operaciones existentes con el fin de concentrar los ácidos nucleicos extracelulares a partir de grandes volúmenes de muestra antes de realizar un protocolo de aislamiento de ácidos nucleicos convencional. De ese modo, se garantiza un rendimiento y pureza máximos de los ácidos nucleicos extracelulares aislados.

El método según la presente invención es particularmente adecuado para procesar muestras que comprenden bajas cantidades de ácidos nucleicos extracelulares. Los inventores pudieron demostrar sorprendentemente que el método según la presente invención proporciona buenos rendimientos de ácido nucleico incluso si la concentración de ácido nucleico en la muestra es muy baja. Tal como se comentó en la introducción, los ácidos nucleicos extracelulares están comprendidos habitualmente en las muestras (tales como por ejemplo una muestra de plasma o suero) en cantidades bastante bajas de 1 a 100 ng/ml de muestra. Por tanto, según una realización, la muestra que contiene el ácido nucleico comprende sólo bajas cantidades de ácido nucleico en una concentración seleccionada de menos de 1 µg/ml de muestra, menos de 500 ng/ml de muestra, menos de 300 ng/ml de muestra, menos de 200 ng/ml de muestra, menos de 150 ng/ml de muestra, menos de 100 ng/ml de muestra, menos de 50 ng/ml de muestra o menos de 30 ng/ml de muestra.

La ventaja de que sea posible procesar grandes volúmenes de muestra con el método según la presente invención y concentrar los ácidos nucleicos aislados en un bajo volumen de elución compensa la baja concentración de los ácidos nucleicos extracelulares en el material de partida. Además, tal como se muestra en los ejemplos, el rendimiento del método según la presente invención no se ve dificultado por una baja concentración de los ácidos nucleicos extracelulares en la muestra. Por tanto, las tasas de recuperación son sustancialmente las mismas, independientemente de si los ácidos nucleicos están comprendidos en altas o en bajas diluciones de concentración en la muestra.

Según una realización definida en la reivindicación dependiente 15, el método comprende las siguientes etapas:

- a. acidificar la muestra para establecer las condiciones de unión y unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida en una mezcla de unión que tiene un primer pH ≤ 6 que permite la unión de los ácidos nucleicos extracelulares a los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida, en el que la fase sólida está dotada de partículas magnéticas;
- b. separar la fase sólida con los ácidos nucleicos extracelulares unidos;
- c. opcionalmente lavar los ácidos nucleicos extracelulares;
- d. eluir los ácidos nucleicos extracelulares de la fase sólida a un segundo pH que es mayor que el primer pH que se usó para unir el ácido nucleico extracelular a la fase sólida;
- e. aislar los ácidos nucleicos extracelulares a partir del eluato.

Tal como se define en la reivindicación 1, la muestra es una muestra libre de células o reducida en células que se obtuvo de un líquido corporal retirando las células mediante separación y los ácidos nucleicos extracelulares son ADN extracelular.

Este método describe una realización, en el que las etapas a. a d. se usan para concentrar los ácidos nucleicos extracelulares preferiblemente a partir de un volumen de muestra grande en un volumen de muestra pequeño que luego puede procesarse adicionalmente en la etapa e. para aislar los ácidos nucleicos extracelulares a partir de la misma por ejemplo usando un método de aislamiento de ácidos nucleicos convencional. Las ventajas se explicaron anteriormente. Los detalles con respecto a las etapas individuales a. a e. también se describieron anteriormente y también se aplican en este caso. Se remite a la divulgación anterior.

También se da a conocer un método para mejorar la recuperación de ácidos nucleicos pequeños cuando se usa una fase sólida de unión a ácidos nucleicos. Cuando se aíslan ácidos nucleicos, en particular ácidos nucleicos más pequeños tales como por ejemplo ácidos nucleicos extracelulares, los ácidos nucleicos más pequeños no se recuperan eficazmente, aun cuando se unieron inicialmente a la fase sólida de ácido nucleico en la etapa de unión. Se supone que esta pérdida de recuperación resulta de la unión fuerte, potencialmente irreversible de los ácidos nucleicos más pequeños a la fase sólida de unión a ácidos nucleicos. Por tanto, estos ácidos nucleicos permanecen unidos principalmente a la fase sólida de unión a ácidos nucleicos en condiciones de elución comunes. De ese modo, el rendimiento de ácidos nucleicos más pequeños se reduce, lo que supone un problema si los ácidos nucleicos pequeños están sólo representados en la población de ácidos nucleicos en una baja cantidad de por ejemplo menos de 100 ng/ml de muestra como es el caso con los ácidos nucleicos extracelulares. Además, dentro

de la población de ácidos nucleicos extracelulares, un posible ácido nucleico diana tal como por ejemplo un determinado marcador de diagnóstico está comprendido habitualmente en una cantidad incluso inferior. Por tanto, existía la necesidad de mejorar la tasa de recuperación de ácidos nucleicos más pequeños cuando se usa una fase sólida de unión a ácidos nucleicos. Se da a conocer que el pretratamiento de la fase sólida de unión a ácidos nucleicos con un polímero, preferiblemente poli(ácido acrílico) antes de la unión de los ácidos nucleicos a la fase sólida mejora sorprendentemente la tasa de recuperación de ácidos nucleicos más pequeños. Por tanto, también se da a conocer una fase sólida de unión a ácidos nucleicos que se ha pretratado con un polímero. Además se da a conocer un método para producir una fase sólida de unión a ácidos nucleicos respectiva, que comprende poner en contacto la fase sólida de unión a ácidos nucleicos con un polímero, uniendo de ese modo el polímero a la fase sólida. También se da a conocer un método para aislar ácidos nucleicos, preferiblemente ácidos nucleicos extracelulares, en el que se usa una fase sólida de unión a ácidos nucleicos que se ha pretratado con un polímero. Tal como se dio a conocer anteriormente, el pretratamiento de la fase sólida con un polímero, preferiblemente un polímero sintético tal como poli(ácido acrílico), da como resultado que las características de unión a ácido nucleico de la fase sólida de ácido nucleico mejoran porque la recuperación de pequeños ácidos nucleicos puede aumentarse.

El polímero puede ser cualquier polímero o compuesto polimérico siempre que pueda unirse a la fase sólida de unión a ácidos nucleicos y proporcione el efecto descrito en el presente documento, concretamente mejorar la recuperación de pequeños ácidos nucleicos. La unión del polímero a la fase sólida de unión a ácidos nucleicos es preferiblemente no covalente y preferiblemente implica interacción iónica. El polímero es preferiblemente un poliácido que comprende múltiples grupos ácidos y/o un polianión que comprende múltiples grupos cargados negativamente. Según una realización, el polímero presenta al menos una función oxígeno desprotonable y, preferiblemente, la carga negativa de la forma desprotonada puede deslocalizarse entre átomos de oxígeno geminales. Los ejemplos de polímeros respectivos incluyen polímeros que contienen funciones carboxilo, por ejemplo copolímeros de poli(ácido acrílico) o ácido maleico, así como tales que contienen fósforo o azufre incluyendo funciones ácido orgánico, por ejemplo polifosfato, poli-dT resp. polisulfonato. Los polímeros respectivos son particularmente adecuados cuando se usa una fase sólida de unión a ácidos nucleicos que comprende grupos de intercambio aniónico tal como se describió anteriormente. El polímero puede unirse a la fase sólida de unión a ácidos nucleicos por medio de interacciones iónicas. El polímero puede ser un polipéptido (este término incluye proteínas) tal como por ejemplo una proteína láctea o BSA. En realizaciones preferidas, el polímero no es un ácido nucleico y/o un polipéptido y/o un polisacárido. El polímero puede estar al menos parcialmente desprotonado cuando se une a la matriz de unión a ácido nucleico.

Puede usarse poli(ácido acrílico) con el fin de pretratar la fase sólida de unión a ácidos nucleicos. Puede usarse un poli(ácido acrílico) corto que tiene un peso molecular por debajo de 2500, preferiblemente por debajo de 2000. El peso molecular del poli(ácido acrílico) puede encontrarse en un intervalo entre 1500 y 1950. Tal como se muestra en la sección de ejemplos, el pretratamiento de fase sólida de unión a ácidos nucleicos con un poli(ácido acrílico) respectivo da como resultado que la recuperación de ácidos nucleicos más pequeños, por ejemplo que tienen una longitud de menos de 500 nt, 300 nt, 250 nt, 200 nt, 150 nt, 100 nt o 75 nt (tal como se comentó anteriormente la longitud de cadena indicada por "nt" se refiere a "pb" en el caso ADN bicatenario) se aumenta significativamente.

Los ejemplos de fases sólida de unión a ácidos nucleicos incluyen pero no se limitan a materiales que contienen silicio tales como materiales de sílice y poli(ácido silícico), borosilicatos, silicatos, vidrios anorgánicos, polímeros orgánicos tales como poli(met)acrilatos, poliuretanos, poliestireno, agarosa, polisacáridos tales como celulosa, óxidos de metal tales como óxido de aluminio, óxido de magnesio, dióxido de silicio, óxido de titanio y óxido de zirconio, metales tales como oro o platino, sephadex, sepharose, poli(acrilamida), polímeros de divinilbenceno, polímeros de estireno-divinilbenceno, dextranos, y derivados de los mismos; superficies de vidrio o sílice. Los formatos de la fase sólida incluyen pero no se limitan a partículas, perlas, membranas, filtros, placas y tubos capilares. La fase sólida de unión a ácidos nucleicos puede ser una fase sólida tal como se describió anteriormente que comprende grupos de intercambio aniónico. La fase sólida puede comprender grupos silano sobre su superficie y por ejemplo se ha silanizado. Partículas magnéticas que comprenden preferiblemente un material de sílice tal como poli(ácido silícico) pueden usarse como fase sólida. La fase sólida puede ser un material poroso.

También se da a conocer que para producir la fase sólida de unión a ácidos nucleicos pretratada, la fase sólida puede sumergirse en el polímero. De ese modo, al menos una porción de los sitios de unión de la fase sólida que se unen fuertemente a ácidos nucleicos pequeños reducidos se bloquean. El bloqueo puede ser reversible o irreversible. La fase sólida de unión a ácidos nucleicos puede incubarse durante varias horas con el polímero. Durante el proceso de incubación, el polímero puede usarse en una concentración de al menos 1 mg/ml, preferiblemente al menos 5 mg/ml, al menos 7,5 mg/ml, más preferido al menos 10 mg/ml. Los intervalos adecuados incluyen pero no se limitan a de 2,5 mg/ml a 25 mg/ml, preferiblemente de 5 mg/ml a 20 mg/ml. Estas cantidades son particularmente adecuadas cuando se usa poli(ácido acrílico).

También se da a conocer un kit que comprende una fase sólida de unión a ácidos nucleicos que se ha pretratado con un polímero tal como se describió anteriormente. El kit dado a conocer puede comprender además reactivos tales como por ejemplo una disolución de unión, lavado y/o elución. El kit dado a conocer puede estar diseñado para su uso en el método según la presente invención. Se da a conocer además que la fase sólida de unión a ácidos nucleicos dada a conocer que se ha pretratado con el polímero tal como se describió anteriormente puede usarse en

los métodos dados a conocer en el presente documento.

También se da a conocer un método para producir una fase sólida de unión a ácidos nucleicos que tiene características mejoradas, comprendiendo el método dado a conocer poner en contacto una fase sólida de unión a ácidos nucleicos con un polímero tal como se describió anteriormente, preferiblemente seleccionado de poli(ácido acrílico), copolímeros de ácido maleico, polisulfonatos, polifosfatos y poli (dT) y unir el polímero a la fase sólida de unión a ácidos nucleicos, en el que la fase sólida de unión a ácidos nucleicos que se ha tratado con el polímero proporciona un mayor rendimiento de ácidos nucleicos que tienen una longitud de menos de 500 nt, por ejemplo menos de 400 nt, menos de 350 nt, menos de 300 nt, menos de 250 nt, menos de 200 nt, menos de 150 nt o menos de 100 nt (tal como se comentó anteriormente la longitud de cadena indicada por "nt" se refiere a "pb" en el caso de ADN bicatenario), en comparación con la fase sólida de unión a ácidos nucleicos sin tratar cuando se usa en el método de aislamiento de ácidos nucleicos según la presente invención. La fase sólida de unión a ácidos nucleicos pretratada dada a conocer puede usarse también en un procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos diferente. Los detalles con respecto al polímero, la fase sólida de unión a ácidos nucleicos y el proceso de pretratamiento se describieron anteriormente. Se remite a la divulgación anterior que también se aplica en este caso.

También se da a conocer un método para aumentar la recuperación de ácidos nucleicos pequeños (por ejemplo que tienen una longitud de menos de 500 nt, 350 nt, 250 nt, 200 nt, 150 nt o 100 nt) en un método para aislar ácidos nucleicos usando una fase sólida de unión a ácidos nucleicos, que comprende la etapa de poner en contacto la fase sólida de unión a ácidos nucleicos con un polímero. Dicho contacto puede producirse sumergiendo la fase sólida de unión a ácidos nucleicos en el polímero, que puede ser un poliácido, durante el proceso de producción de la fase sólida. Se describieron detalles anteriormente.

El método dado a conocer puede comprender además una etapa de lavado tras la etapa de poner en contacto la matriz de unión a ácido nucleico con un polímero y antes de poner en contacto la matriz de unión a ácido nucleico con un ácido nucleico. Las condiciones de lavado se eligen preferiblemente de modo que compuestos de polímero unidos dentro de y/o a la abertura de superficie de los poros pequeños de la matriz de unión a ácido nucleico permanezcan predominantemente unidos mientras que los compuestos de polímero restantes se eliminan predominantemente de la matriz de unión a ácido nucleico. "Predominantemente" a este respecto en particular se refiere a al menos el 50% de los compuestos de polímero de la población de compuestos de polímero designada, preferiblemente a al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 95%.

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Esta invención no está limitada por los métodos y materiales a modo de ejemplo dados a conocer en el presente documento, y cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento puede usarse en la práctica o las pruebas de realizaciones de esta invención. Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el intervalo. Los intervalos numéricos incluyen un intervalo de tolerancia de +/-10%, +/-5%, preferiblemente +/-3% y lo más preferido +/-1%. Según una realización, los intervalos numéricos indicados no incluyen un intervalo de tolerancia.

El término "disolución" tal como se usa en el presente documento, por ejemplo en forma de una disolución de acidificación, disolución de lavado o disolución de elución, en particular se refiere a una composición líquida, preferiblemente una composición acuosa. Puede ser una mezcla homogénea de sólo una fase pero también está dentro del alcance de la presente invención que una disolución que se usa según la presente invención comprenda componentes sólidos tales como por ejemplo precipitados.

Ejemplos

Los ejemplos que no están cubiertos por las reivindicaciones son para comparación.

Como fase sólida de unión a ácidos nucleicos, se usaron las siguientes tres partículas magnéticas de intercambio iónico en los ejemplos. Estas partículas magnéticas ("perlas") permiten la unión directa y específica de ácidos nucleicos presentes a bajas concentraciones en un material de muestra complejo:

1. Perlas magnéticas (tipo I)
2. Perlas magnéticas (tipo II)
3. Perlas magnéticas (tipo III)

Los tres tipos de perlas tienen un núcleo magnético y una superficie de intercambio aniónico.

Las perlas magnéticas (tipo I) y perlas magnéticas (tipo II) tienen un núcleo magnético de magnetita (Fe_3O_4). Estas partículas magnéticas se cubren con poli(ácido silícico) y juntos forman la denominada perla. Ambos tipos de partículas magnéticas se almacenan en agua pero pueden almacenarse también en otras disoluciones tales como por ejemplo disolución de SN-C (MES 0,5 M y Triton X-100, pH 6,1). Las perlas magnéticas (tipo I) tienen una superficie mixta de aminas cargadas positivamente y alcoholes neutros (los detalles de la respectiva tecnología de

perlas se describen también en el documento WO 2010/072834). Por tanto, la carga eléctrica positiva se “diluye” sobre la superficie de la perla mediante grupos neutros. Esta carga positiva baja conduce a una unión más débil de los ácidos nucleicos diana, permitiendo de ese modo la elución a un valor de pH bajo (por ejemplo 8,5). En cambio, las perlas magnéticas (tipo II) tienen una carga positiva constante e intensa, conteniendo sólo aminas terciarias cargadas positivamente sobre su superficie. De modo que la unión de ácidos nucleicos cargados negativos sucede de manera rápida y fácil. Para lograr una elución eficaz, se usan preferiblemente valores de pH superiores.

Las perlas magnéticas (tipo III) portan grupos polietilenimina sobre la superficie del núcleo magnético. Estas perlas se almacenan en una suspensión de SN-C. Para perlas magnéticas (tipo I) y (tipo II), están presentes aminas terciarias sobre la superficie. Para lograr una reacción alcalina de la amina, se une un par de electrones libres sobre el átomo de nitrógeno. La protonación del resto de nitrógeno puede inducirse mediante adición de ácido. El grupo amina terciaria provoca que la carga positiva se una a polianiones (ácidos nucleicos). Los grupos polietilenimina, que están acoplados sobre la superficie de las perlas magnéticas (tipo III), funcionan de un modo similar. El par de electrones libres, unidos al átomo de nitrógeno, se protonan tras la adición del ácido.

En los ejemplos subsiguientes, se usó el kit de ácido nucleico circulante QIAamp como protocolo de limpieza tras la concentración/enriquecimiento inicial de los ácidos nucleicos extracelulares usando el método según la presente invención. De ese modo, se logró una pureza muy alta. Sin embargo, tal como se demuestra más adelante, el método según la presente invención también permite usar directamente los ácidos nucleicos extracelulares aislados por ejemplo en ensayos de detección por PCR.

También se usó el kit de ácido nucleico circulante QIAamp en los ejemplos mostrados más adelante, como método de referencia para determinar la cantidad total de ácidos nucleicos virales y circulantes en una muestra dada y, por tanto, para poder monitorizar el éxito de la concentración obtenida con un protocolo de enriquecimiento basados en perlas de intercambio aniónico diferente según la presente invención.

Se identificó el kit de ácido nucleico circulante QIAamp como método de referencia adecuado, porque permite extraer ácidos nucleicos circulantes, libres de células y virales de hasta 5 ml de plasma, suero y otros líquidos corporales. Este kit manual funciona basándose en una tecnología de caótopo de sílice, que conduce, en comparación con otros métodos, a una alta recuperación de todos los tamaños de fragmento entre el ADNicc.

Para la cuantificación del ácido nucleico aislado, se usaron diferentes ensayos:

Los ensayos de ADN se prepararon según el manual de PCR múltiple QuantiTect con las siguientes excepciones:

- Para el ensayo de dúplex de 18S, se usa otra concentración de cebadores (16 μ M en lugar de 8 μ M).
- Para el ensayo de ADN 18S, el tiempo para el apareamiento/extensión se cambia desde 1 hasta 2 minutos.

El ensayo de ARN de GAPDH se llevó a cabo según el manual de RT-PCR múltiple QuantiTect con estas modificaciones:

- Las condiciones de ciclado se cambiaron: La desnaturalización tiene lugar durante 1 min a 95°C y el apareamiento/extensión durante 1:30 min a 60°C.

Los ensayos de CMV y VIH están disponibles comercialmente como kits de PCR Artus de QIAGEN. El ensayo de PhHV se desarrolló internamente.

Ejemplo 1: Rendimientos de la extracción de ácidos nucleicos dependiendo de las perlas usadas

Para el aislamiento de ácidos nucleicos, se realizó el siguiente protocolo.

- Se centrifugan 4 ml de plasma agrupado a 16.000 g a 4°C durante 10 min para eliminar células residuales y el plasma reducido en células se transfiere a un tubo falcon de 15 ml
- Se añaden 100 μ l de tampón acetato de sodio/ácido acético 1 M (pH 4) para ajustar el pH a un valor de entre 5 y 6 (NaOAc/HOAc ~25 mM en 4 ml de muestra)
- Se usan entonces 8 mg de cada uno de ambos tipos perlas magnéticas (tipo I), 4 mg de las perlas magnéticas (tipo II) o 4 mg de perlas magnéticas (tipo III) para la unión
- Se realiza la unión durante 20 min. a temperatura ambiente sobre un agitador rotatorio superior (20 rpm)
- Entonces se separan las perlas durante 10 min en una gradilla de tubos falcon magnética y se desecha el sobrenadante
- Se añade 1 ml de Tris-HCl 100 mM (con cloruro de sodio al 0,9% y a pH 8,5)
- Se transfiere la disolución a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se eluyen los ácidos nucleicos de las perlas durante 20

min en una termomezcladora

- Se separan las perlas durante 10 min en una gradilla de tubos magnética
- Se purifica el eluato usando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp según el manual, pero sin añadir ARN portador

- 5 • Se eluyen los ácidos nucleicos en 100 µl de AVE, que se usa como molde para PCR en tiempo real cuantitativa (volumen de molde del 10% en la mezcla de reacción de qPCR)

10 La figura 1 muestra el rendimiento en porcentaje de fragmentos de ADN, al tiempo que se comparan los resultados usando tres tipos de perlas diferentes. Se realizaron adiciones conocidas de los fragmentos de tres tamaños diferentes (75, 200 y 1000 pb) en la muestra de plasma como control interno y se detectaron tras la extracción. Se añadieron 200.000 copias de cada uno de los tres fragmentos a 4 ml de muestra. Para determinar el rendimiento de referencia del ADN añadido, se procesó el plasma con el kit de ácido nucleico circulante QIAamp y se usó el rendimiento de ADN medido como referencia para poder determinar el rendimiento logrado con los protocolos de enriquecimiento basados en perlas de intercambio aniónico (véase la figura 1).

15 El uso de perlas magnéticas (tipo II) condujo a una recuperación de ~100%. Para garantizar una recuperación máxima de los ácidos nucleicos, se encontró ventajoso modificar las perlas magnéticas (tipo I) para mejorar especialmente la recuperación de los fragmentos de ADN más pequeños (en este caso se sometieron a prueba los fragmentos de 75 pb del control interno). Por tanto, según una realización, se incubaron las perlas magnéticas (tipo I) con poli(ácido acrílico) antes del proceso de concentración para evitar la difusión de los fragmentos de ADN pequeños al interior de los poros de las perlas, donde podrían unirse, respectivamente quedando atrapados irreversiblemente. Los polianiones de poli(ácido acrílico) cortos saturaron los sitios de unión y, por tanto, mejoraron su recuperación (recuperación de ~100% de todos los tamaños de fragmento). Las perlas magnéticas (tipo III) también condujeron a una recuperación de ADN de entre el 70 y el 90%. Debido a los grupos de intercambio aniónico usados, era ventajoso usar un tampón de elución (hidróxido de sodio 40 mM) a un valor de pH de aproximadamente 12,6. Para los otros tipos de perlas, podrían usarse condiciones de elución más moderadas, y se eluyeron los ácidos nucleicos extracelulares con Tris-HCl 100 mM, pH 8,5 que contenía cloruro de sodio al 0,9%.

Ejemplo 2: Enriquecimiento de ADNlcc

Entonces se usaron las perlas magnéticas (tipo II) para el enriquecimiento de ADNlcc. Por tanto, se usó el mismo protocolo que se describió en el ejemplo 1 con los siguientes cambios:

- 30 • El ácido nucleico no sólo se extrajo del eluato, sino también del sobrenadante de plasma tras la etapa de unión. Esto permite evaluar la eficacia de unión y elución.
- Tras purificar el eluato usando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp, los ácidos nucleicos se eluyeron entonces en un volumen más pequeño (60 µl de AVE).

35 Con este experimento, se confirmaron los resultados del control interno (fragmentos de 75, 200 y 1000 pb) mediante el análisis de ADNlcc. De ese modo, no sólo se afirmó una recuperación de ADN de ~100%, también se mostró que no había pérdida de perlas durante la etapa de unión. En la figura 2, se usó un ensayo de ADN para detectar ADN libre de células circulante. Se cuantificaron dos amplicones de ADN diferentes (66 y 500 pb) de la secuencia codificante de ARNr 18S. Se usó la referencia para determinar la cantidad total de ADNlcc.

40 Aunque sólo pudo encontrarse menos del 2 o incluso el 1% de ADN no unido entre el sobrenadante tras la etapa de unión, se logró una recuperación de casi el 100% para ambas dianas de ARNr 18S. Esto indica que los fragmentos de ADN podían unirse y recuperarse eficazmente a partir de 4 ml de plasma usando las perlas magnéticas (tipo II).

Ejemplo 3: Elución selectiva de tamaño de ADN

45 Se descubrió un comportamiento selectivo de tamaño inesperado de las perlas magnéticas (tipo II) usando casi el mismo protocolo que para el enriquecimiento de ADNlcc. La única diferencia era que los ácidos nucleicos se eluyeron en dos etapas de las perlas usando dos tampones de elución diferentes. La figura 3 muestra los resultados del ensayo de fragmentos de ADN.

50 En una primera etapa, fue posible lograr una elución preferida de fragmentos de ADN más cortos usando el tampón de elución ya mencionado (Tris-HCl 100 mM, que contiene cloruro de sodio al 0,9%), pero a pH 8. Los fragmentos de ADN restantes y especialmente más largos se eluyeron finalmente a un pH alcalino (12,6) usando hidróxido de sodio 40 mM. Sin embargo, tal como se muestra en los otros ejemplos, también pueden usarse valores de pH inferiores de por ejemplo 8,5 para lograr una elución eficaz. El uso de valores de pH inferiores por debajo de 10 y preferiblemente por debajo de 9 es favorable para las reacciones posteriores.

Se añadieron 400 µl de tampón de neutralización de perlas magnéticas (tipo III) (pH 8,5) a los 600 µl de eluato que contenían el hidróxido de sodio 40 mM antes de limpiar la muestra usando el kit de ácido nucleico circulante

QIAamp. Para la neutralización del eluato, se usó un tampón que contenía hidróxido de sodio 30 mM, Tris 170 mM, HCl al 0,31% y azida de sodio 6 mM.

Ejemplo 4: Enriquecimiento de ARNIcc

5 Las condiciones de unión y elución se optimizaron especialmente para ADNlcc. Pero, tal como muestra la figura 4, también puede enriquecerse ARNIcc a partir de plasma usando el método descrito en el presente documento.

La figura 4 muestra la media de Ct. El valor de Ct de 29,6, obtenido con la extracción de referencia, representa la cantidad total de ARNm de GAPDH circulante dentro de la muestra de 4 ml de plasma, mientras que el valor de ct de 30,5 indica que puede recuperarse ARNm de GAPDH al final tras un enriquecimiento directo a partir de plasma usando las perlas magnéticas (tipo III).

10 Protocolo que condujo a la mejor recuperación de ARN en las realizaciones sometidas a prueba:

- Se centrifugan 4 ml de plasma agrupado a 16.000 g a 4°C durante 10 min y se ponen en un tubo falcon
- Se añaden 1000 µl de tampón acetato de sodio/ácido acético 0,12 M (pH 4) para ajustar a un valor de pH ≤ 5 (~25 mM en 4 ml de muestra)
- Se usan entonces 400 µl de perlas magnéticas (tipo III) para la unión

15 • Se realiza la unión durante 20 min a temperatura ambiente sobre un agitador rotatorio superior (20 rpm)

• Entonces se separan las perlas durante 10 min en una gradilla de tubos falcon magnética y se desecha el sobrenadante

• Se añade 1 ml de Tris-HCl 100 mM (cloruro de sodio al 0,9% y a pH 8)

20 • Se transfiere la disolución a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se eluyen los ácidos nucleicos de las perlas durante 20 min en una termomezcladora

• Se separan las perlas durante 10 min sobre una gradilla de tubos eppendorf magnética

• Se purifica el eluato usando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp según el protocolo del manual para la purificación de ADN circulante a partir de 4 ó 5 ml de plasma o suero, pero sin usar ARN portador

25 • Se eluyen los ácidos nucleicos en 60 µl de AVE, que se usa como molde para la PCR en tiempo real cuantitativa (volumen de molde del 10%)

Ejemplo 5: Uso directo del eluato como molde de PCR

La figura 2 mostró ya que podría lograrse una recuperación de ADN de casi el 100% usando las perlas magnéticas (tipo II). Pero para estos experimentos, se usó la versión del protocolo con limpieza adicional. Por tanto, se sometió a prueba si el eluato podría usarse directamente como molde en métodos que son sensibles a impurezas tales como PCR en tiempo real cuantitativa. El protocolo está diseñado tal como sigue:

30

Protocolo de aislamiento “directo” sin limpieza adicional para demostrar la compatibilidad con PCR

- Se centrifugan 4 ml de plasma agrupado a 16.000 g a 4°C durante 10 min y se ponen en un tubo falcon
- Se añaden 100 µl de tampón acetato de sodio/ácido acético 1 M (pH 4) para ajustar a un pH de entre 5 y 6 (~25 mM en 4 ml de muestra)

35 • Se usan entonces 4 mg de las perlas magnéticas (tipo II) para la unión

• Se realiza la unión durante 20 min a temperatura ambiente sobre un agitador rotatorio superior (20 rpm)

• Entonces se separan las perlas durante 10 min en una gradilla de tubos falcon magnética y se desecha el sobrenadante

40 • Se lavan las perlas dos veces usando H₂O+ TritonX-100 al 0,05% (en primer lugar con 1000, luego con 300 µl); durante la primera etapa de lavado la disolución de perlas se transfiere a un tubo falcon de 1,5 ml

• Tras la adición del tampón de lavado, se incuban las perlas durante 5 min usando la termomezcladora y se separan durante 10 min

• Tras la segunda etapa de lavado, se añaden 150 µl de Tris-HCl 100 mM (cloruro de sodio al 0,9% y a pH 8,5)

• Se eluyen los ácidos nucleicos de las perlas durante 20 min en una termomezcladora

- Entonces se separan durante 10 min sobre una gradilla de tubos eppendorf magnética
- Se usa el eluato/concentrado como molde para la PCR en tiempo real cuantitativa directamente (volumen de molde del 10%)

5 Para el protocolo de aislamiento con limpieza adicional, el eluato se procesa usando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp según el protocolo disponible para la purificación de ADN circulante a partir de 4 ó 5 ml de plasma o suero, pero sin ARN portador. Los ácidos nucleicos se eluyen en 100 µl de AVE, que se usa como molde para la PCR en tiempo real cuantitativa.

10 Para someter a prueba si podría usarse el eluato (en este caso de muestras de plasma agrupadas) como molde para la qPCR directamente, se realizó una prueba de inhibición de PCR: se comparó la recuperación de ADNlcc con o sin realizar un protocolo de limpieza antes de la qPCR. Se compararon tres volúmenes de molde diferentes por PCR. Si había un problema de inhibición de PCR, la recuperación tras la realización de un protocolo de limpieza debería ser mayor que usando el eluato directamente como molde para la qPCR directamente. Además, la recuperación disminuiría usando un volumen de molde superior debido al aumento de la concentración de sustancias que inhiben la PCR en la mezcla de reacción.

15 La figura 5 muestra que la recuperación de ADN con o sin la realización de un protocolo de limpieza es casi la misma y los resultados son similares entre los tres volúmenes de molde diferentes. De ese modo, sorprendentemente, el eluato que se obtiene cuando se usa el método sencillo, rápido según la presente invención es compatible con PCR sin ninguna purificación adicional.

20 Para la cuantificación de ADN libre de células circulante, se usó el ensayo de 18S ya descrito (amplificación de 66 pb). Como método de referencia, se usó el kit de ácido nucleico circulante QIAamp.

Los ejemplos 1-5 demuestran que pueden enriquecerse satisfactoriamente ácidos nucleicos extracelulares tales como ADN y ARN libre de células circulante usando perlas magnéticas de intercambio aniónico tras acidificar la muestra añadiendo acetato de sodio/ácido acético. La elución de ADN/ARN se logra aplicando un tampón de elución de neutro a alcalino.

25 Ejemplo 6: Enriquecimiento de virus a partir de plasma

Protocolo

- Se centrifugan 4 ml de plasma agrupado a 16.000 g a 4°C durante 10 min y se ponen en un tubo falcon
- Se hacen adiciones conocidas de los virus CMV, VIH y PhHV (en forma de partículas)
- Se añaden 100 µl de tampón acetato de sodio/ácido acético 1 M (pH 4) para ajustar a un pH de entre 5 y 6 (~25 mM en 4 ml de muestra)
- Se usan entonces 8 mg de ambos tipos de perlas magnéticas (tipo I) (con y sin poli(ácido acrílico)) o 4 mg de las perlas magnéticas (tipo II) para la unión
- Se realiza la unión durante 20 min a temperatura ambiente sobre un agitador rotatorio superior (20 rpm)
- Se separan las perlas durante 10 min en una gradilla de tubos falcon magnética y se desecha el sobrenadante
- Se añade 1 ml de Tris-HCl 100 mM (cloruro de sodio al 0,9%, pH 8,5)
- Se transfiere la disolución a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se eluyen los ácidos nucleicos de las perlas durante 20 min en una termomezcladora
- Se separan las perlas durante 10 min sobre una gradilla de tubos eppendorf magnética
- Se limpia el eluato usando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp según el protocolo disponible para la purificación de ADN circulante a partir de 4 ó 5 ml de plasma o suero, pero sin ARN portador
- Se eluyen los ácidos nucleicos en 100 µl de AVE, que se usa como molde para la PCR en tiempo real cuantitativa

45 Se sometieron a prueba diversos virus y se compararon tres tipos de perlas diferentes (perlas magnéticas (tipo I), perlas magnéticas (tipo I) tras la incubación con poli(ácido acrílico), así como perlas magnéticas (tipo II)). Para CMV, VIH y PhHV, se lograron recuperaciones que corresponden al 70-100% de las recuperaciones respectivas logradas con el protocolo de referencia (véase la figura 6).

Ejemplo 7: Enriquecimiento de ácido nucleico automatizado

El protocolo basado en perlas de intercambio aniónico par el aislamiento de ácidos nucleicos y virus circulantes libres de células se automatizó en el instrumento QIASymphony SP (QIAGEN) y se comparó con la ejecución manual

del mismo protocolo. En contraposición a experimentos previos, se usaron muestras de plasma de donantes individuales.

Protocolo

5 Muestras de plasma de 2,9 ml de doce donantes individuales (a) se procesaron con el kit de ácido nucleico circulante QIAamp como referencia, (b) se aislaron manualmente usando perlas magnéticas (tipo II) (versión de protocolo directo) o (c) se aislaron en el instrumento QIASymphony. Se realizó el kit de ácido nucleico circulante QIAamp según el protocolo del manual para la purificación de ADN circulante a partir de 1 ml, 2 ml o 3 ml de plasma o suero, pero sin ARN portador (elución en 150 µl de AVE).

Versión manual del protocolo "directo" según la presente invención

- 10
- Se centrifugan 2,9 ml de plasma a 16.000 g a 4°C durante 10 min y se ponen en un tubo
 - Se hacen adiciones conocidas de los virus CMV, VIH y PhHV (en forma de partículas)
 - Se añaden 75 µl de tampón acetato de sodio/ácido acético 1 M (pH 4) para ajustar a un pH de entre 5 y 6
 - Se usan entonces 4 mg de las perlas magnéticas (tipo II) para la unión
 - Se realiza la unión durante 20 min a temperatura ambiente sobre un agitador rotatorio superior (20 rpm)
- 15
- Entonces se separan las perlas durante 10 min en una gradilla de tubos falcon magnética y se desecha el sobrenadante
 - Se lavan las perlas dos veces usando H₂O + TritonX-100 al 0,01% (en primer lugar con 1000 µl, luego con 300 µl) y ya durante la primera etapa de lavado la disolución de perlas se transfiere a un tubo falcon de 1,5 ml
- 20
- Tras la adición del tampón de lavado se incuban las perlas durante 5 min usando la termomezcladora y se separan durante 10 min
 - Tras la segunda etapa de lavado, se añaden 150 µl de Tris-HCl 100 mM (cloruro de sodio al 0,9%, pH 8,5)
 - Se eluyen los ácidos nucleicos de las perlas durante 20 min en una termomezcladora
 - Entonces se separan las perlas durante 10 min sobre una gradilla de tubos eppendorf magnética
 - Se usa el eluato como molde para la PCR en tiempo real cuantitativa directamente (volumen de molde del 10%)

25 Versión automatizada del protocolo directo según la presente invención

- Se centrifugan 2,9 ml de plasma a 16.000 g a 4°C durante 10 min y se ponen, por ejemplo, en un tubo de ensayo de fondo redondo de poliestireno de 14 ml (17* 100 mm, BD)
 - Se hacen adiciones conocidas de los virus CMV, VIH y PhHV (en forma de partículas)
- 30
- Se insertan los tubos en el portador de tubos y luego se cargan en el instrumento QIASymphony SP para el procesamiento automatizado
 - Se usan los mismos tiempos de incubación y reactivos que para la versión de concentración manual
 - El volumen de elución es también el mismo (150 µl)

35 La cantidad total de ácidos nucleicos circulantes libres de células varió entre las muestras de plasma individuales. En la mayoría de los casos, las versiones del protocolo manual y automatizado eran comparables. Se midió la recuperación de ADN circulante mediante ensayos de qPCR que seleccionan como diana ADN_r 18S (amplión de 66 pb), DYS14 y RhD (exón n.º 5). La mediana de las recuperaciones mostrada en la figura 7 muestra que no hay realmente una diferencia significativa entre la versión del protocolo manual y automatizado y que la recuperación de ADN_{icc} lograda con el protocolo basado en perlas de intercambio aniónico corresponde al 60-80% de la cantidad total de ADN libre de células circulante (tal como se determina tras la extracción usando el método de referencia de kit de ácido nucleico circulante QIAamp). La tasa de recuperación puede mejorarse adicionalmente optimizando las condiciones de unión y elución.

40

45 La figura 8 muestra la mediana de la recuperación de los tres tamaños de fragmento diferentes del control interno (75, 200 y 1000 pb). Pero mientras que se detectaron del 70 al 80% de los fragmentos de ADN de 75 y 200 pb dentro del concentrado, la recuperación de los fragmentos de ADN de 1000 pb largos fue < 50%. Este resultado sorprendente apunta a una propiedad selectiva de tamaño del protocolo basado en perlas de intercambio aniónico: en este caso, se recuperan preferentemente fragmentos de ADN más cortos (75-200 pb) en comparación con ADN más largo (1000 pb). Este comportamiento es útil para, por ejemplo, el enriquecimiento de ácidos nucleicos

extracelulares tales como ADN circulante fetal en plasma materno y también fragmentos de ADN circulantes derivados de tumores. La unión preferente de los ácidos nucleicos más pequeños con respecto a los ácidos nucleicos más largos reduce la cantidad de ácidos nucleicos más largos en la población de ácidos nucleicos aislados población. Esto es, con respecto al aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares, una ventaja porque en muestras que comprenden ácidos nucleicos extracelulares tales como por ejemplo orina, sangre o productos sanguíneos tales como plasma o suero, los ácidos nucleicos más largos comprendidos representan habitualmente ácidos nucleicos intracelulares, que se liberaron de células (por ejemplo de células dañadas). Tales ácidos nucleicos intracelulares representan una contaminación de la población de ácidos nucleicos extracelulares. El método de aislamiento de ácidos nucleicos descrito reduce ventajosamente los ácidos nucleicos más largos contaminantes respectivos en los ácidos nucleicos extracelulares aislados.

Ejemplo 8: Unión de ácidos nucleicos muy poco concentrados

Para analizar la capacidad de unión de las perlas magnéticas (tipo I) y su rendimiento de unión con muestras que contienen sólo bajas concentraciones de ácido nucleico, se realizó el siguiente ensayo:

- Pipetear 50 mg de perlas en un recipiente de reacción de 2 ml, separación magnética (3 min), desechar el sobrenadante de la suspensión de perlas
- Añadir el volumen indicado de tampón de unión (MOPS 50 mM, pH 7,0) que contiene los 40 µg de ADN de plásmido (pCMVb, 7164 pb)
- Incubar 10 min sobre un agitador rotatorio de extremo a extremo
- Separación magnética (3 min), desechar el sobrenadante, lavar dos veces con 500 µl de tampón de unión (5 min de extremo a extremo)
- Eluir dos veces con 500 µl (cada una) de Tris 50 mM, KCl 20 mM, pH 8,5

En los ensayos, se unió todo el ADN añadido a las perlas magnéticas (tipo I) y se eluyó de las mismas, independientemente del volumen de muestra usado (véase la figura 9). Por tanto, la dilución de la muestra no disminuye la realización y el rendimiento del método. Los resultados de estos ensayos demuestran que las perlas magnéticas (tipo I) pueden unirse eficazmente a todos los ácidos nucleicos incluso en muestras que contienen el ácido nucleico sólo en baja concentración.

De ese modo, pueden extraerse las siguientes conclusiones de los experimentos descritos anteriormente:

1. Las condiciones de unión óptimas de ácidos nucleicos extracelulares a partir de muestras de sangre (plasma y suero) u otros líquidos corporales pueden ajustarse usando 1/40 de volumen de muestra de tampón de acetato de sodio/ácido acético para establecer el valor de pH de la muestra entre 5 y 6, en particular cuando se pretende aislar ADN extracelular.
2. La unión completa y directa de ácidos nucleicos extracelulares a partir del líquido biológico se logra tras la adición de, por ejemplo, partículas magnéticas con una química superficial de intercambio aniónico (por ejemplo, aminas terciarias o polietileniminas de perlas magnéticas (tipo I) o perlas magnéticas (tipo III)). Preferiblemente, se incuban perlas magnéticas (tipo I) con poli(ácido acrílico) antes de su uso para mejorar la recuperación de ADN de, especialmente, fragmentos más cortos.
3. El sobrenadante restante tras la etapa de unión puede eliminarse y los ácidos nucleicos extracelulares unidos pueden eluirse de las partículas magnéticas añadiendo un tampón alcalino (por ejemplo MOPS o Tris 100 mM) a un pH de 8 o superior (opcional: adición de sal tal como cloruro de sodio para la mejora de la recuperación).
4. Tras la eliminación de las partículas magnéticas, el eluato puede purificarse adicionalmente o usarse directamente como molde para métodos de análisis/detección tales como PCR en tiempo real cuantitativa (en el último caso, se recomiendan dos etapas de lavado adicionales antes de que se eluyan los ácidos nucleicos).
5. Pueden aislarse cuantitativamente ácidos nucleicos a partir de muestras que comprenden sólo bajas concentraciones de ácido nucleico y la dilución de la muestra no disminuye el rendimiento del método según la presente invención.

Ejemplo 9: Recuperación de ADNlcc (18S) usando un protocolo de enriquecimiento manual según la invención

Se usó plasma con EDTA de donantes sanos para el enriquecimiento de ADNlcc usando un protocolo manual según las enseñanzas de la presente invención. Se purificó ADN libre de células circulante a partir de 3 ml de plasma de 8 donantes individuales usando la versión manual del protocolo de enriquecimiento según la presente invención. Se cuantificó el rendimiento de ADN mediante PCR en tiempo real que selecciona como diana un amplicón de 66 pb dentro de la secuencia codificante de ARN ribosómico 18S usando el kit de PCR múltiple QIAGEN QuantiTect®. El kit de ácido nucleico circulante QIAamp® (QIAGEN) sirvió como referencia (=100%). Los resultados se muestran en la figura 10. A la derecha, se muestra la mediana de la recuperación porcentual de todos los donadores. Para indicar

la desviación superior e inferior, se indican los percentiles 10^o y 90^o mediante barras de error.

Ejemplo 10: Recuperación de ADN con adiciones conocidas-protocolo de enriquecimiento manual

Con el fin de rastrear una posible selectividad de tamaño del procedimiento y como control interno, se añadieron fragmentos de ADN (75 pb, 200 pb, 1000 pb) a muestras de plasma estabilizadas con EDTA a 200.000 copias/muestra. Se purificó ADN libre de células circulante a partir de 3 ml de plasma de 8 donantes individuales usando una versión manual del protocolo según la presente invención. Se cuantificó el rendimiento de ADN mediante PCR en tiempo real triple que selecciona como diana regiones dentro del fragmento de 75 pb, 200 pb y 1000 pb usando el kit de PCR múltiplex QuantiTect® de QIAGEN. El kit de ácido nucleico circulante QIAamp® (QIAGEN) sirvió como referencia (=100%). Los resultados se muestran en la figura 11.

Ejemplo 11: Diagnóstico prenatal

Se aisló ácido nucleico libre de células circulante a partir de muestras de sangre materna usando el método de la invención y se detectó ADNlcc usando un ensayo de qPCR triple. Se procesaron 5,8 ml de plasma a partir de doce donantes individuales. Se procesaron las muestras en el instrumento QIASymphony SP que, sin embargo, sólo puede procesar un volumen máximo de 3 ml. Por tanto, se dividieron las muestras en dos porciones (2,9 ml de plasma cada una) y se cargaron en el instrumento QIASymphony SP para el procesamiento automatizado siguiendo el protocolo de enriquecimiento automatizado para el instrumento QIASymphony SP (véase el ejemplo 7). Por tanto, se procesaron las dos porciones de la muestra original en paralelo acidificando las porciones de muestra y añadiendo una alícuota de perlas a cada porción de muestra. Se usaron perlas de tipo II en este y todos los ejemplos subsiguientes si no se establece lo contrario. Tras la unión, se retiraron las perlas con los ácidos nucleicos unidos de la mezcla de unión creada a partir de la primera porción de muestra y se transfirieron a la mezcla de unión resultante de la segunda porción de muestra que también comprendía una alícuota de perlas. De ese modo, se combinaron los ácidos nucleicos de la primera y segunda porción de muestra. Por tanto, para la incubación de unión restante de la mezcla de unión de la segunda porción de muestra, está presente la cantidad doble de perlas. Esta división y reunificación de la muestra permite procesar un volumen de muestra que es dos veces tan grande como el volumen de muestra del sistema automático. Cuando se procesan muestras incluso más grandes, pueden crearse más porciones. Se recogieron todas las perlas con ácidos nucleicos unidos y se lavaron dos veces con Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 7,2) + TritonX-100 al 0,1%, y se eluyeron los ácidos nucleicos en 150 µl de Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 9). Ácidos nucleicos aislados con el kit de ácido nucleico circulante QIAamp sirvieron como referencia para determinar la tasa de recuperación. Además, se aislaron ácidos nucleicos del sobrenadante obtenido tras retirarse las perlas con los ácidos nucleicos unidos, usando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp. De ese modo, el ADNlcc no unido que queda en el sobrenadante puede detectarse y cuantificarse. Se usó un volumen de molde del 10% de eluato en el ensayo de qPCR triple para la detección de ADNr 18S (véase la figura 12a), DYS14 (véase la figura 12b) y RhD (véase la figura 12c). Se muestra el % de recuperación en comparación con el kit de ácido nucleico circulante QIAamp.

La figura 12a muestra que el ADNlcc se une casi completamente a partículas magnéticas y se eluye al final (excepción: donante 10). Sólo pueden detectarse cantidades residuales de ADNlcc en la fracción de sobrenadante. La figura 12b muestra el resultado del ensayo de Dys14. Dys14 es una proteína específica de testículos. Por tanto, la detección de ADNlcc de DYS14 en plasma derivado del feto puede usarse para la determinación del sexo y es predictiva de un feto masculino. De 12 muestras sometidas a prueba, sólo se detectan 2 donantes masculinos. La recuperación de ADNlcc era comparable al resultado de ADNr 18S.

La figura 12c muestra el resultado del ensayo de RhD como parte del ensayo de qPCR de ADN triple. En este caso, se determina el grupo sanguíneo y factor Rh sometiendo a prueba el antígeno D. Los donantes 7 y 8 son negativos para RhD. La recuperación de ADNlcc de todos los donantes positivos para RhD era comparable a los resultados del ensayo de ADNr 18S y DYS14.

El experimento muestra que el método de la invención puede usarse para la detección específica de ADNlcc en plasma sanguíneo materno. El método de la invención puede aplicarse fácilmente en diagnóstico prenatal, por ejemplo para la determinación del sexo prenatal y la determinación del factor Rh.

Ejemplo 12: Recuperación y enriquecimiento eficaces de fragmentos de ADN extracelular cortos a partir de plasma sanguíneo

Se detectó ADNlcc usando tamaños de amplicón diferentes para proteína precursora de amiloide beta (APP). Se aisló ADNlcc tal como se describió en el ejemplo 11. Se realizó detección por PCR en tiempo real de fragmentos de ADNlcc con los tamaños de 67, 180 y 476 pb tal como se describe en Pinzani *et al.* 2011, Clin. Chim. Acta. 412: 2141. Se calcularon las razones de número de copias 67/476 y 180/476. Se calcularon las mismas razones para ADNlcc aislado con el kit de ácido nucleico circulante QIAamp (kit de CNA QIAamp). Un enriquecimiento de fragmentos de ADN más cortos conduce a un aumento de la razón de número de copias.

Tal como puede observarse en la figura 13a, el protocolo de enriquecimiento automatizado de la invención procesado con el instrumento QIASymphony SP (QSSP) muestra valores de razón similares o superiores en comparación con el protocolo de referencia del kit CNA QIAamp (QIAamp). Por tanto, el método de la invención

5 puede usarse para aislar eficazmente fragmentos de ADNlcc de diversos tamaños, en particular de fragmentos de ADNlcc cortos que pueden incluso enriquecerse. La figura 13b representa las razones de % de recuperación de ADN obtenido con el método de invención (protocolo de QIASymphony SP) en comparación con fragmentos de ADNlcc de APP aislados con el kit CNA QIAamp. Un enriquecimiento de fragmentos de ADN más cortos conduce a razones > 1,0. Los resultados muestran que fragmentos de ADN más cortos se extraen completamente del plasma usando el protocolo de QIASymphony SP. Para algunos donantes, incluso podría lograrse un enriquecimiento de fragmentos de ADN más cortos usando el método de la invención en comparación con el protocolo de referencia.

Ejemplo 13: Compatibilidad con PCR de las condiciones de elución

10 Para determinar si un alto valor de pH durante la elución podría interferir con la subsiguiente detección basada en PCR, se hicieron adiciones conocidas de cantidades variables de ADN genómico humano masculino (31 - 8.000 copias) en diferentes tampones de elución (tampón Tris 10-50 mM a pH 9 y ~pH 10,2). Se detectó ADNlcc usando el ensayo de dúplex de 18S. Agua libre de ARNasa sirvió como referencia. Se compararon los valores de Ct para un volumen de molde del 40% en reacción PCR en tiempo real.

15 Los resultados para el amplicón de 66 pb corto se muestran en la figura 14a, los resultados para el amplicón de 500 pb se muestran en la figura 14b. Valores de Ct comparables entre tampones de elución sometidos a prueba y agua pura indican que no hay inhibición de PCR significativa, ni para diferentes concentraciones de ADN ni para los tampones de elución sometidos a prueba. Tal como puede observarse, todos los tampones sometidos a prueba pueden usarse fácilmente para la elución de ADN y no inhiben la reacción PCR posterior.

Ejemplo 14: Elución selectiva de fragmentos de ADN cortos a valores de pH altamente básicos

20 Se sometieron a prueba diferentes tampones de elución para determinar la elución de ADN con diversos tamaños. Se procesaron 4 réplicas de 5,8 ml de plasma agrupado tal como se describió en el ejemplo 11 para el protocolo de QIASymphony SP. Tras unir el ADN a las perlas, se realizaron dos etapas de lavado con Agua libre de ARNasa + TritonX-100 al 0,1%, seguido por elución con 150 µl usando 5 tampones Tris diferentes tal como se muestra en la figura 15a. Se analizó el ADN eluido usando el ensayo de dúplex de ADNr 18S para el amplicón de 66 pb. Para el amplicón de 500 pb sólo se muestran datos para Tris 20 mM (base libre, ~pH 10,2) y el kit de CNA QIAamp como referencia.

25 La figura 15a representa el resultado para el amplicón de 66 pb obtenido a partir de muestras de plasma agrupado, el resultado para el amplicón de 500 pb se muestra en la figura 15b. Para el amplicón de 66 pb, los resultados son comparables entre todas las réplicas y también los rendimientos de ADN obtenidos con diferentes tampones de elución son comparables con la referencia del kit de CNA QIAamp. Para el amplicón de 500 pb, sin embargo, el rendimiento de ADN era muy bajo en comparación con la referencia. Por tanto, cuando se usa el método de la invención, es posible la elución selectiva de fragmentos de ADN más cortos (66 pb frente a 500 pb) usando Tris 20 mM (base libre ~pH 10,2) para la elución.

Ejemplo 15: Elución dependiente de sal de fragmentos de ADN más largos frente a más cortos

35 Se detectó ADNlcc usando el ensayo de dúplex de 18S. Se procesaron muestras de plasma de 5,8 ml tal como se describió en el ejemplo 11. Tras la unión del ADN a las perlas, se realizaron dos etapas de lavado con agua libre de ARNasa + TritonX-100 al 0,1%, seguido por elución con 150 µl usando 5 tampones Tris diferentes. ADNlcc aislado con el kit de CNA QIAamp sirvió como referencia. El % de recuperación usando el protocolo de QIASymphony SP (en comparación con el kit de CNA QIAamp) se muestra en la figura 16. La molaridad de Tris y la concentración de sal parecen no tener influencia sobre la recuperación de fragmentos de ADN pequeños (amplicón de 66 pb de ADNr 18S). Sin embargo, para fragmentos de ADN más largos (amplicón de 500 pb de ADNr 18S), la recuperación de ADN aumenta usando concentraciones de sal superiores. Por tanto, variando la concentración de sal en el tampón de elución, es posible influir y ajustar el tamaño de los ácidos nucleicos eluidos.

Ejemplo 16: Compatibilidad con PCR de diferentes tampones de elución

45 Se detectó ADNlcc usando el ensayo de dúplex de 18S. Se hicieron adiciones conocidas de cantidades variables de ADN genómico humano masculino (de 0 a 5.000 copias) en agua libre de ARNasa (referencia) y Tris 100 mM + NaCl 154 mM, pH 9. Se usó un 20% del ADNlcc de volumen de molde en la reacción PCR en tiempo real. Los resultados para el amplicón de 66 pb se muestran en la figura 17. Valores de Ct comparables entre el tampón de elución sometido a prueba y agua pura indican que no hay inhibición de la PCR para diferentes concentraciones de ADN, al menos no en el intervalo de hasta 5.000 copias.

Ejemplo 17: Elución preferida de fragmentos de ADN más cortos con tampones de elución de molaridad variable, en ausencia de sal y a pH altamente básico

55 Se detectó ADNlcc usando el ensayo de dúplex de 18S. Se procesaron 4 réplicas de 5,8 ml de muestras de plasma agrupado tal como se describió en el ejemplo 11. Tras la unión del ADN a las perlas, se realizaron dos etapas de lavado con agua libre de ARNasa + TritonX-100 al 0,1%, seguido por elución con 150 µl usando 5 tampones Tris diferentes (base de Tris 10 - 50 mM y Tris 100 mM + NaCl 154 mM, pH 9). ADNlcc aislado con el kit de CNA

QIAamp sirvió como referencia. Se usó un volumen de molde del 10% en la reacción PCR en tiempo real. Los resultados se muestran en las figuras 18a y 18b. Todos los resultados son comparables entre las réplicas sometidas a prueba 1 - 4. Para los fragmentos de ADN más cortos (amplicón de 66 pb) los rendimientos de ADN obtenidos tras usar tampones de elución con diferentes molaridades son comparables a los rendimientos de ADN obtenidos con un tampón que contiene sal y con la referencia. Sin embargo, el rendimiento de ADN de fragmentos de ADN más largos (amplicón de 500 pb) es muy bajo para los tampones sometidos a prueba sin NaCl, en comparación con el tampón que contiene sal y la referencia. Por tanto, una elución preferida de fragmentos de ADN más cortos (amplicón de 66 pb) es posible usando por ejemplo un tampón Tris a molaridades variables sin sal adicional a ~pH 10,2.

Ejemplo 18: Selección por tamaño ajuntando las condiciones de elución, en particular valor de pH y contenido en sal del tampón de elución

Se detectó ADNlcc usando el ensayo de dúplex de 18S. Se procesaron muestras de plasma de 5,8 ml tal como se describió en el ejemplo 11. Tras la unión del ADN a las perlas, se realizaron dos etapas de lavado con agua libre de ARNasa + TritonX-100 al 0,1%, seguido por elución con 150 µl usando diferentes tampones Tris o NaOH. Se usó el 10% del ADN eluido como molde en la reacción PCR en tiempo real. Se analizó el % de recuperación en comparación con el ADNlcc aislado con el kit de CNA QIAamp. Los resultados se representan en la figura 19. La adición de sal o el uso de NaOH para la elución aumenta la recuperación de fragmentos de ADN más largos (véase el amplicón de 500 pb). Por tanto, es posible la selección por tamaño ajustando condiciones de elución específicas referentes a la concentración de sal y el valor de pH.

Ejemplo 19: Selección por tamaño ajustando las condiciones de elución, en particular el valor de pH y el contenido en sal del tampón de elución

En este experimento se sometieron a prueba diferentes tampones de elución para eluir fragmentos de ADN con diferentes longitudes. Se aisló ADNlcc a partir de plasma sanguíneo y se detectó usando el ensayo de APP para cuatro longitudes de amplicón diferentes. El aislamiento y la detección se realizaron esencialmente tal como se describió en el ejemplo 18. Se realizó el ensayo de APP para las longitudes de amplicón de APP de 67 pb, 180 pb, 306 pb y 476 pb, y se amplificaron todos los fragmentos de ADN del mismo modo. Se comparó la recuperación de ADN con el ADNlcc aislado con el kit de CNA QIAamp.

Los resultados se muestran en la figura 20. La adición de sal al tampón de elución aumenta la recuperación de fragmentos de ADN más largos. Por tanto, puede lograrse una elución selectiva de tamaño ajustando las concentraciones de sal. Esto significa, en esencia, que cuanto más sal se use, mayor es la tasa de recuperación de ADN de fragmentos de ADN más largos.

Ejemplo 20: Recuperación de ADN fetal con el método automatizado de la invención

Se comparó el protocolo de aislamiento de ADNlcc automatizado de la invención con el método de referencia de kit de CNA QIAamp para el aislamiento de ADN fetal a partir de plasma materno. Tras el aislamiento, se detectó ADN fetal usando el ensayo de Dys14/18S. Se usaron 4 ml de plasma materno como volumen de entrada de muestra para el protocolo de QIASymphony SP, mientras que se usaron 0,4 - 1 ml para el kit de CNA QIAamp. Se realizó el protocolo de QIASymphony SP esencialmente tal como se describió en el ejemplo 11. Se realizaron dos etapas de lavado usando Tris 35 mM a pH 7,2 + TritonX-100 al 0,1%. Se eluyó el ADN unido con Tris 35 mM + NaCl 80 mM (pH 10,2) en 100 µl de volumen de elución. Se realizó la detección de ADN fetal usando el ensayo de Dys14/18S tal como se describió en el ejemplo 11. Se usó un 10% del volumen de molde en una reacción PCR en tiempo real. Finalmente, se calculó la razón entre las copias de ADN del ensayo de Dys14/18S para determinar la fracción de ADN fetal en %. Los resultados se representan en la figura 21. El porcentaje de ADN fetal detectado dentro del ADNlcc es comparable para el protocolo de QIASymphony SP (QSSP) y el kit de CNA QIAamp (QIAamp). El ADN fetal puede extraerse completamente usando el método automatizado de la invención.

Ejemplo 21: Enriquecimiento de ADNlcc a partir de muestras de orina, y poli(ácido acrílico) aumenta la eficacia de elución

Se detectó ADNlcc usando el ensayo de dúplex de 18S. Se procesaron manualmente muestras de plasma de 3 ml. Adicionalmente, se procesó orina (3 ml). Se realizaron dos etapas de lavado usando Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 7,2) + TritonX-100 al 0,1%. Se eluyó el ADN unido con Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 9,0) (también se usó para la orina), Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 9,0) + PAA al 0,02% o con Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 9,0) + PAA al 0,04%. El volumen de elución fue de 150 µl. Se cuantificó el ADNlcc eluido usando el ensayo de dúplex de 18S doble. Se comparó la recuperación de ADN con el ADNlcc procesado con el kit de CNA QIAamp. Los resultados se muestran en la figura 22. La adición de PAA da como resultado una mayor recuperación de ADN de tanto el fragmento de 66 pb como el de 500 pb. También es posible el enriquecimiento de ADNlcc a partir de orina.

Ejemplo 22: Se eluye fácilmente ADNlcc a partir de perlas usando diferentes volúmenes de elución

Se detectó ADNlcc usando el ensayo de dúplex de 18S (amplicón de 66 y 500 pb). Se procesaron manualmente muestras de plasma de 3 ml derivadas de 3 donantes diferentes tal como se describió anteriormente. Se realizaron dos etapas de lavado usando Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 7,2) + TritonX-100 al 0,1%.

Se eluyó el ADN unido con Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 9), usando un volumen de elución de 60, 80, 100 ó 150 µl. Se cuantificó el ADNlcc eluido con el ensayo de ADNr 18S doble. Los resultados para la detección del amplicón de 66 pb se muestran en la figura 23a, y los del amplicón de 500 pb en la figura 23b. La reducción del volumen de elución no tiene un efecto significativo sobre la recuperación de ADN. Sin embargo, un volumen de elución tan bajo como sea posible es ventajoso con el fin de obtener un alto factor de enriquecimiento. Puede lograrse un alto factor de enriquecimiento usando un alto volumen de entrada de muestra y un bajo volumen de elución.

Ejemplo 23: Unión y liberación altamente eficaces de ADNlcc a partir de plasma

Se procesaron manualmente muestras de plasma de 3 ml derivadas de 3 donantes diferentes tal como se describió anteriormente. Tras la unión del ADNlcc a las perlas, se guardó la fracción de sobrenadante. Se realizaron dos etapas de lavado usando Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 7,2) + TritonX-100 al 0,1%. Se eluyó el ADN unido con un protocolo de 2 etapas: En primer lugar, se realizó la elución con Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 9) en un volumen de elución de 150 µl. Luego, se liberó el ADN residual de las perlas con 150 µl de NaOH 40 mM. Antes de la detección por qPCR, se neutralizó la fracción de NaOH. Se realizó la detección de ADNlcc usando el ensayo de ADNr 18S doble para el amplicón de 66 pb y el de 500 pb tal como se describió en el ejemplo 2.

Los resultados se muestran en la figura 24. Básicamente, no puede detectarse ADNlcc no unido en el sobrenadante. Además, no puede detectarse ADNlcc residual en las fracciones de elución de NaOH. Por tanto, el ADNlcc puede unirse completamente a partir de plasma a perlas magnéticas y liberarse de nuevo en un tampón de elución. Esto da como resultado buenas tasas de recuperación.

Ejemplo 24: La limpieza de eluatos antes de la detección por PCR está obsoleta - ausencia de efecto inhibitor de PCR en eluatos

En este experimento se sometió a prueba si los eluatos pueden comprender inhibidores de PCR. Para ese fin, se procesaron manualmente muestras de plasma de 3 ml derivadas de 2 donantes diferentes tal como se describió anteriormente. Se realizaron dos etapas de lavado usando agua libre de ARNasa + TritonX-100 al 0,1%. Se eluyó el ADN unido con un protocolo de 2 etapas: La primera elución se realizó con Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 7,2) en un volumen de elución de 150 µl. La segunda elución se realizó con Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 9,0), de nuevo en un volumen de elución de 150 µl. Se usaron 100 µl del primero y segundo eluato como entrada de muestra para una limpieza usando el kit de CNA QIAamp. Se usaron entonces un volumen de molde del 5% de la fracción de 50 µl restante y de la fracción de 100 µl limpiada para la detección por PCR en tiempo real según el ensayo ADNr 18S doble (amplicón de 66 pb y 500 pb). ADNlcc aislado con el kit de CNA QIAamp sirvió como referencia.

Los resultados para el amplicón de 66 pb se muestran en la figura 25a, los resultados para el amplicón de 500 pb en la figura 25b. Los amplicones de 66 pb y 500 pb del ADNr 18S solo pueden detectarse en eluatos a pH 9,0, pero no en eluatos a pH 7,2. Esto significa que la elución es altamente dependiente del pH y, por tanto, puede controlarse mediante el valor de pH. La detección de los fragmentos de 66 pb y 500 pb es igualmente eficaz en eluatos directos y limpiados. Por tanto, no puede observarse un efecto inhibitor de PCR en los eluatos.

Ejemplo 25: Comparación entre el volumen de perlas, el tipo y la influencia de PAA

Se procesaron manualmente muestras de plasma de 3 ml derivadas de 3 donantes diferentes tal como se describió anteriormente. Se usaron 3 mg o 7,5 mg de perlas de tipo II. Adicionalmente, se sometieron a prueba perlas de tipo I, tratadas con PAA. Se incubaron las perlas durante la noche en una disolución de PAA acuosa, se desechó el sobrenadante. Tras la unión, se realizaron dos etapas de lavado usando agua libre de ARNasa + TritonX-100 al 0,1%. Se eluyó el ADN unido de las perlas de tipo II usando un protocolo de elución de 2 etapas tal como se describió en el ejemplo 24 adicional. Se eluyó el ADN unido de las perlas de tipo I o bien con 150 µl de Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 9,0) + PAA 15 mg/ml o bien con 150 µl de Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 9,0) + PAA 20 mg/ml. ADNlcc aislado con el kit de CNA QIAamp sirvió como referencia. Se usó un 5% del volumen eluido en la PCR en tiempo real. Tal como se muestra en la figura 26, un aumento del volumen de perlas conduce a una mejor recuperación de ADN. Perlas de tipo I y tipo II conducen a resultados comparables, si se añade PAA a las perlas de tipo I. Además puede observarse que no se eluye ADN de las perlas de tipo II durante la 1ª etapa de elución.

Ejemplo 26: Comparación entre diferentes tipos y volúmenes de perlas

Se procesaron manualmente muestras de plasma de 3 ml derivadas de 8 donantes diferentes tal como se describió en el ejemplo 25. Sin embargo, para la unión, se añadieron 3 mg de perlas de tipo I tratadas con PAA y 3 mg o 7,5 mg de perlas de tipo II para la unión de ADNlcc. Tras las dos etapas de lavado, se eluyó el ADN unido de las perlas de tipo I con 150 µl de Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 9,0), mientras que se eluyó el ADN unido de las perlas de tipo II usando un protocolo de elución de 2 etapas tal como se describió en el ejemplo 24. Se usó el 5% del volumen eluido para la detección por PCR en tiempo real según el ensayo de ADNr 18S doble (amplicón de 66 pb y 500 pb). ADNlcc aislado con el kit de CNA QIAamp sirvió como control.

Ejemplo 27: Enriquecimiento de ADNlcc a partir de suero

5 En este experimento se comparó la recuperación de ADNlcc tras la unión a partir de muestras de suero y de plasma. Se procesaron manualmente muestras de plasma o suero de 4 ml tal como se describió anteriormente. Tras la unión, no se realizaron etapas de lavado. Se guardó el sobrenadante obtenido a partir de plasma para análisis adicional. Se eluyó el ADN unido a las perlas usando Tris 100 mM + NaCl 154 mM (pH 8,5) en un volumen de elución de 1 ml. Se procesaron los eluatos y el sobrenadante usando el kit de CNA QIAamp, y se eluyó el ADN en un volumen de elución de 60 µl. Se usó un 10% del volumen eluido en el ensayo de ADN 18S doble. ADNlcc aislado con el kit de CNA QIAamp sirvió como referencia.

10 La figura 28 muestra que puede unirse completamente ADNlcc a partir de plasma y también puede eluirse y por tanto recuperarse de las perlas. Además, también puede recuperarse ADNlcc a partir de muestras de suero.

REIVINDICACIONES

1. Método para aislar ácidos nucleicos extracelulares a partir de una muestra uniendo los ácidos nucleicos extracelulares a una fase sólida que porta grupos de intercambio aniónico, en el que dicho método comprende las siguientes etapas:
- 5 a. acidificar la muestra para establecer las condiciones de unión y unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida en una mezcla de unión que tiene un primer pH de $\leq 6,5$ que permite la unión de los ácidos nucleicos extracelulares a los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida, en el que la fase sólida está dotada de partículas magnéticas;
- b. separar la fase sólida con los ácidos nucleicos extracelulares unidos;
- 10 c. opcionalmente lavar los ácidos nucleicos extracelulares;
- d. eluir los ácidos nucleicos extracelulares de la fase sólida, en el que la elución se produce a un segundo pH que se encuentra en el intervalo de ≥ 8 a ≤ 14 ;
- en el que la muestra es una muestra libre de células o reducida en células que se obtuvo a partir de un líquido corporal eliminando las células mediante separación y en el que los ácidos nucleicos extracelulares son ADN extracelular.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
- a. acidificar la muestra para establecer las condiciones de unión y unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida en una mezcla de unión que tiene un primer pH de $\leq 6,5$ que permite la unión de los ácidos nucleicos extracelulares a los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida, en el que la fase sólida está dotada de partículas magnéticas y en el que la muestra constituye al menos el 85% del volumen de la mezcla de unión;
- 20 b. separar la fase sólida con los ácidos nucleicos extracelulares unidos;
- c. opcionalmente lavar los ácidos nucleicos extracelulares;
- d. eluir los ácidos nucleicos extracelulares de la fase sólida, en el que la elución se produce a un segundo pH que se encuentra en el intervalo de ≥ 8 a ≤ 14 .
- 25 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, que comprende las siguientes etapas:
- a. acidificar la muestra para establecer las condiciones de unión y unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida en una mezcla de unión que tiene un primer pH ≤ 6 que permite la unión de los ácidos nucleicos extracelulares a los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida, en el que la fase sólida está dotada de partículas magnéticas, en el que la muestra constituye al menos el 85% del volumen de la mezcla de unión y en el que la fase sólida está dotada de partículas magnéticas que portan grupos amino terciarios, preferiblemente grupos dialquilamino, más preferido grupos dietilaminopropilo;
- 30 b. separar la fase sólida con los ácidos nucleicos extracelulares unidos;
- c. opcionalmente lavar los ácidos nucleicos extracelulares;
- 35 d. eluir los ácidos nucleicos extracelulares de la fase sólida, en el que la longitud de los ácidos nucleicos que se eluyen y la longitud de los ácidos nucleicos que permanecen unidos a la resina de intercambio aniónico se controla ajustando las condiciones de elución, en el que ácidos nucleicos que tienen una longitud de aproximadamente 1000 nt o más, preferiblemente 700 nt o más, más preferido 500 nt o más permanecen unidos predominantemente a la fase sólida en dicha etapa de elución.
- 40 4. Método según la reivindicación 3, en el que se logra una elución selectiva de ácidos nucleicos cortos en la etapa d. ajustando la concentración de cargas positivas sobre la superficie de la fase sólida de modo que sólo las moléculas de ácido nucleico más largas permanecen unidas a la fase sólida durante la etapa d. mientras que los ácidos nucleicos más pequeños se eluyen, en el que el valor de corte se controla mediante la elección del valor de pH que se usa durante la elución.
- 45 5. Método según una o más de las reivindicaciones 1, 3 ó 4, en el que en la etapa d., se eluyen selectivamente ácidos nucleicos extracelulares según su tamaño y en el que dicha etapa de elución de fraccionamiento por tamaño comprende eluir una porción de los ácidos nucleicos extracelulares unidos a la fase sólida a un segundo pH que es mayor que el primer pH, en el que la longitud promedio de los ácidos nucleicos eluidos de la fase sólida en esta etapa es más corta que la longitud promedio de los ácidos nucleicos que permanecen unidos a la fase sólida.
- 50

6. Método según la reivindicación 2, para aislar ácidos nucleicos extracelulares a partir de la muestra libre de células o reducida en células, preferiblemente plasma o suero, uniendo los ácidos nucleicos extracelulares a una fase sólida que porta grupos de intercambio aniónico, en el que la fase sólida está dotada de partículas magnéticas que portan preferiblemente aminas terciarias, que comprende las siguientes etapas
- 5 a. acidificar la muestra para establecer las condiciones de unión y unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida en una mezcla de unión que tiene un primer pH ≤ 6 que permite la unión de los ácidos nucleicos extracelulares a los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida, en el que la fase sólida está dotada de partículas magnéticas y en el que la muestra constituye al menos el 85% del volumen de la mezcla de unión;
- b. separar la fase sólida con los ácidos nucleicos extracelulares unidos;
- 10 c. opcionalmente lavar los ácidos nucleicos extracelulares;
- d. eluir los ácidos nucleicos extracelulares de la fase sólida, en el que en la etapa d., se eluyen selectivamente ácidos nucleicos extracelulares según su tamaño y en el que dicha etapa de elución de fraccionamiento por tamaño comprende eluir una porción de los ácidos nucleicos extracelulares unidos a la fase sólida a un segundo pH que es mayor que el primer pH y ≥ 8 , en el que la longitud promedio de los ácidos nucleicos eluidos de la fase sólida en esta etapa es más corta que la longitud promedio de los ácidos nucleicos que permanecen unidos a la fase sólida y en el que ácidos nucleicos que tienen una longitud de aproximadamente 1000 nt o más, preferiblemente 700 nt o más, más preferido 500 nt o más permanecen unidos predominantemente a la fase sólida en dicha etapa de elución.
- 15 7. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 6, en el que en la etapa d) los ácidos nucleicos se eluyen selectivamente según su tamaño, en el que el valor de corte se controla mediante el valor de pH y/o la concentración de sal usados durante la elución.
8. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la muestra se divide y las porciones de muestra se procesan en paralelo y se reunifican o bien los eluatos o bien el material de intercambio aniónico antes de la elución.
- 25 9. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la etapa a) tiene una o más de las siguientes características:
- i) el primer pH está por debajo del valor de pKa de un grupo protonable de los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida;
- ii) al menos un reactivo y/o compuesto acidificante, preferiblemente una disolución ácida, se añade a la muestra para ajustar el primer pH;
- 30 iii) el primer pH es ≤ 6 ;
- iv) el primer pH se encuentra en un intervalo seleccionado desde 4 hasta 6,5, de 4,5 a 6,5, de 5 a 6,5 y de 5 a 6;
- v) la muestra constituye al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 97% del volumen de la mezcla de unión; y/o
- 35 vi) la mezcla de unión se prepara ajustando el pH de la muestra al primer pH.
10. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la muestra tiene una o más de las siguientes características:
- a) es una muestra libre de células o reducida en células derivada eliminando células mediante separación de una muestra seleccionada del grupo que consiste en sangre completa, plasma, suero, líquido linfático, orina, licor, líquido cefalorraquídeo, ascitis, leche, lavado bronquial, saliva, líquido amniótico y semen/líquido seminal;
- b) se selecciona de plasma y/o suero;
- c) es plasma;
- d) es una muestra estabilizada; y/o
- 45 e) es una muestra de plasma estabilizada.
11. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 10, en el que los ácidos nucleicos extracelulares aislados tienen una o más de las siguientes características:
- a) se aíslan como una porción del ácido nucleico total aislado a partir de la muestra;

- b) comprenden ácidos nucleicos circulantes extracelulares;
- c) comprenden ácidos nucleicos relacionados con una enfermedad;
- d) comprenden ácidos nucleicos asociados a tumor o derivados de tumor;
- e) comprenden ácidos nucleicos relacionados con inflamación;
- 5 f) comprenden ácidos nucleicos fetales;
- g) comprenden ácidos nucleicos virales;
- h) comprenden ácidos nucleicos patógenos y/o
- i) comprenden ácidos nucleicos extracelulares de mamífero.
12. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 11, en el que en la etapa d) se eluyen ácidos nucleicos extracelulares de la fase sólida a un segundo pH que es mayor que el primer pH que se usó para unir el ácido nucleico extracelular a la fase sólida y en el que el método tiene una o más de las siguientes características:
- 10 i) se usa una disolución de elución en la etapa d;
- ii) en la etapa d, se eluyen selectivamente ácidos nucleicos extracelulares según su tamaño y en el que dicha etapa de elución de fraccionamiento por tamaño comprende las siguientes etapas:
- 15 aa) una porción de los ácidos nucleicos extracelulares unidos a la fase sólida se eluye de la misma a un segundo pH que es mayor que el primer pH, en el que la longitud promedio de los ácidos nucleicos eluidos de la fase sólida en esta etapa es más corta que la longitud promedio de los ácidos nucleicos que permanecen unidos a la fase sólida;
- 20 bb) opcionalmente eluir los ácidos nucleicos extracelulares que permanecen unidos a la fase sólida en la etapa aa) de la fase sólida preferiblemente a un tercer pH que es mayor que el segundo pH.
13. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la fase sólida que se usa para unir los ácidos nucleicos extracelulares tiene una o más de las siguientes características:
- (i) la fase sólida porta un tipo de grupo de intercambio aniónico que está cargado positivamente al primer pH;
- (ii) la fase sólida porta un tipo de grupo de intercambio aniónico que comprende un grupo protonable, y el valor de pKa del grupo protonable está preferiblemente en el intervalo de desde 8 hasta 12, preferiblemente desde 9 hasta 11;
- 25 (iii) la fase sólida porta un tipo de grupo de intercambio aniónico que comprende un átomo de nitrógeno, preferiblemente el grupo de intercambio aniónico es un grupo amino, en particular un grupo amino terciario tal como un grupo dialquilamino, preferiblemente un grupo dietilamino;
- (iv) la fase sólida porta ligandos inertes que no se unen fuertemente a ácidos nucleicos al primer pH, preferiblemente el ligando inerte es un ligando no cargado, en particular un ligando que comprende al menos un grupo hidroxilo, preferiblemente un ligando que comprende un grupo 2,3-dihidroxipropilo;
- 30 (v) la fase sólida porta los grupos de intercambio aniónico y ligandos inertes en una razón en el intervalo de desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 1:10, preferiblemente desde aproximadamente 1:2 hasta aproximadamente 1:5, más preferiblemente de aproximadamente 1:3; y/o
- 35 (vi) la superficie de la fase sólida se derivatiza con un compuesto de silano que comprende el grupo de intercambio aniónico y preferiblemente no se derivatiza con otro compuesto de silano.
14. Método según una o más de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el método comprende eliminar mediante separación células del líquido corporal antes de la etapa a) proporcionando de ese modo la muestra reducida en células o libre de células que comprende ácidos nucleicos extracelulares.
- 40 15. Método según la reivindicación 1, que comprende las siguientes etapas:
- a. acidificar la muestra para establecer las condiciones de unión y unir los ácidos nucleicos extracelulares a la fase sólida en una mezcla de unión que tiene un primer pH ≤ 6 que permite la unión de los ácidos nucleicos extracelulares a los grupos de intercambio aniónico de la fase sólida, en el que la fase sólida está dotada de partículas magnéticas;
- 45 b. separar la fase sólida con los ácidos nucleicos extracelulares unidos;

c. opcionalmente lavar los ácidos nucleicos extracelulares;

d. eluir los ácidos nucleicos extracelulares de la fase sólida a un segundo pH que es mayor que el primer pH que se usó para unir el ácido nucleico extracelular a la fase sólida y que se encuentra en el intervalo de ≥ 8 a ≤ 14 ;

5 e. aislar los ácidos nucleicos extracelulares del eluato.

16. Método según la reivindicación 1, en el que el método se realiza usando un sistema automatizado.

FIGURA 1

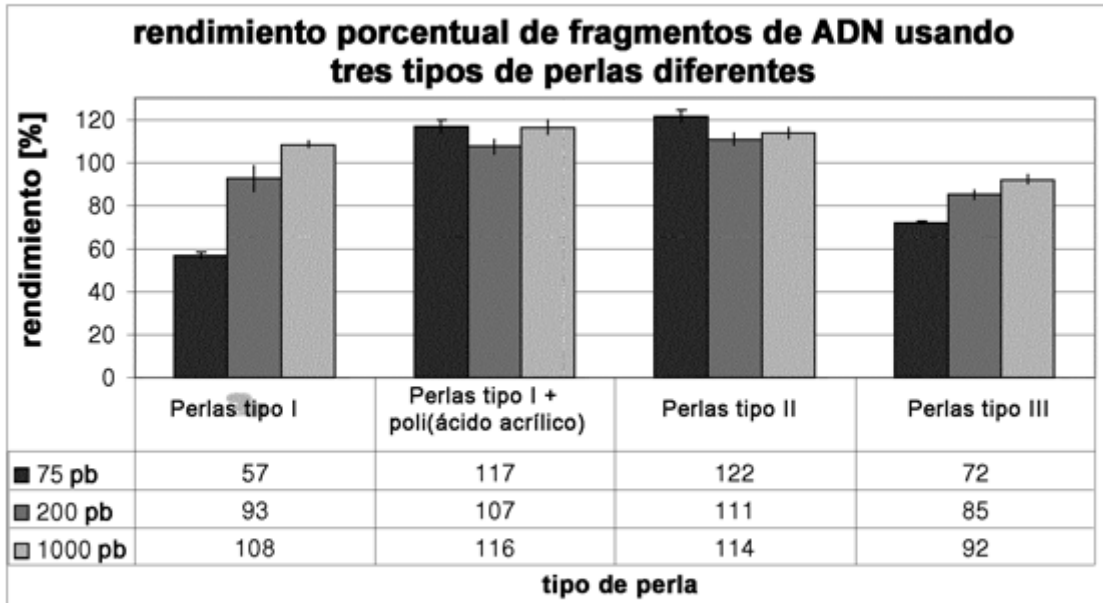


FIGURA 2

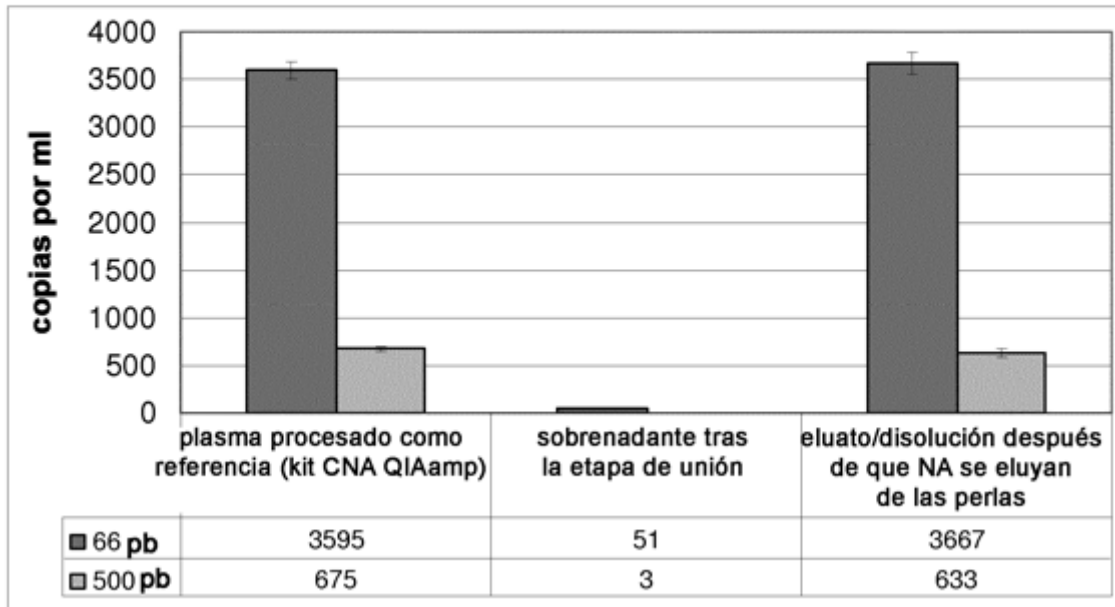


FIGURA 3

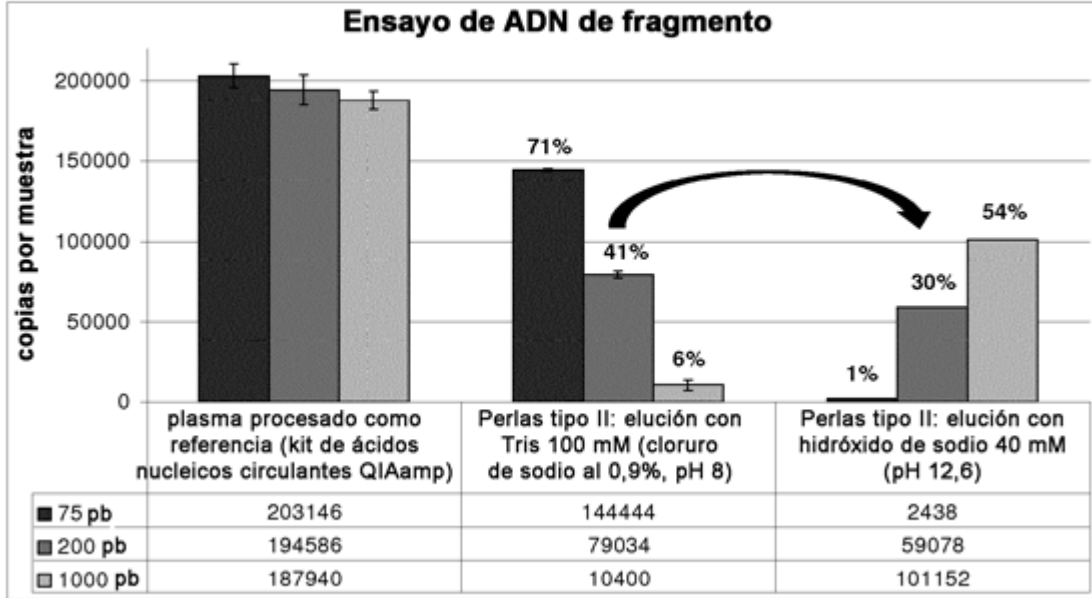


FIGURA 4

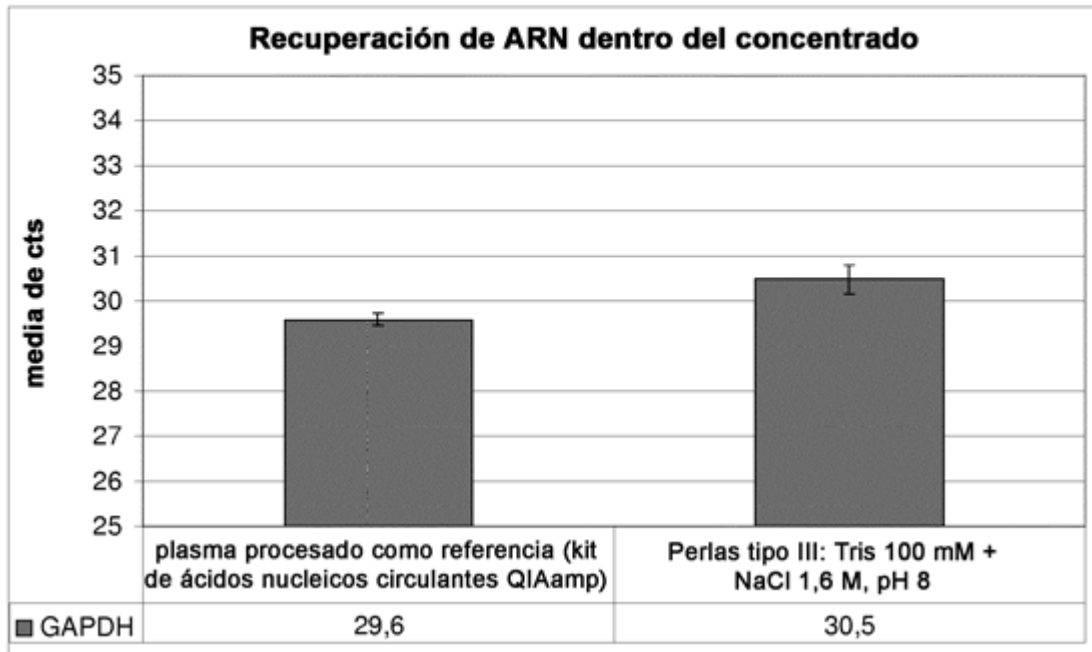


FIGURA 5

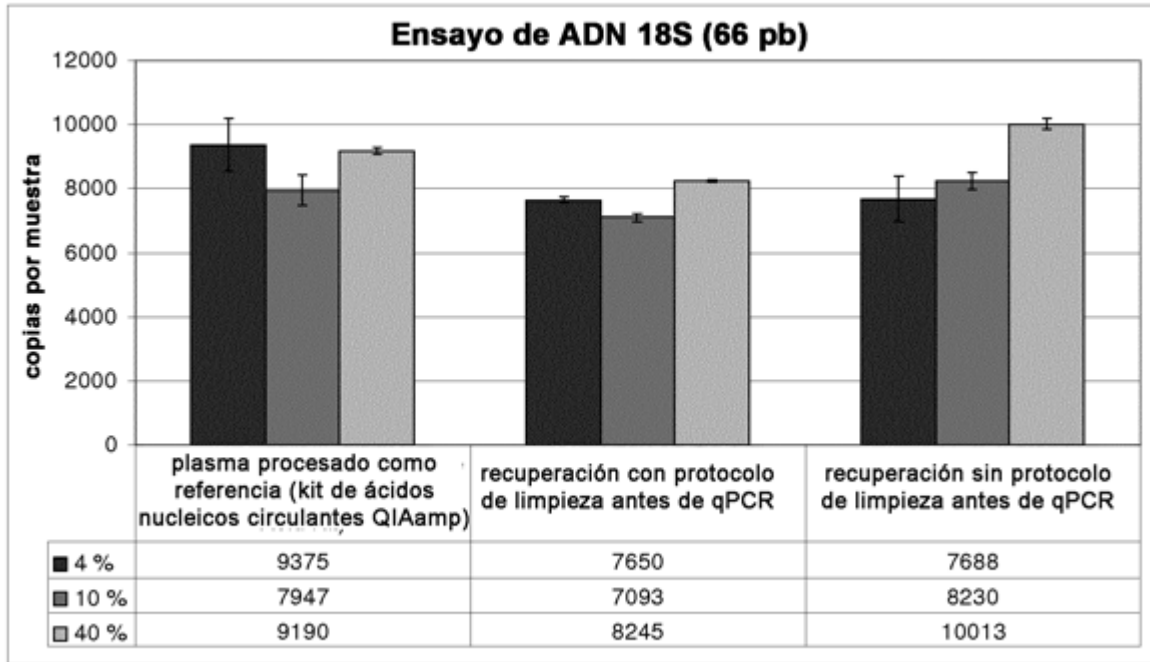


FIGURA 6

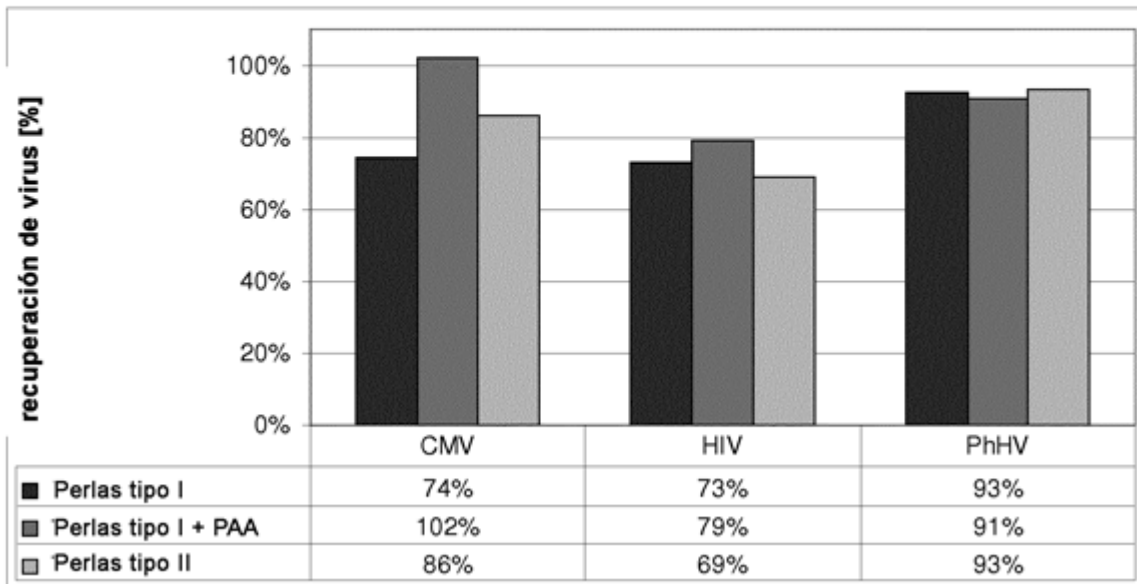


FIGURA 7

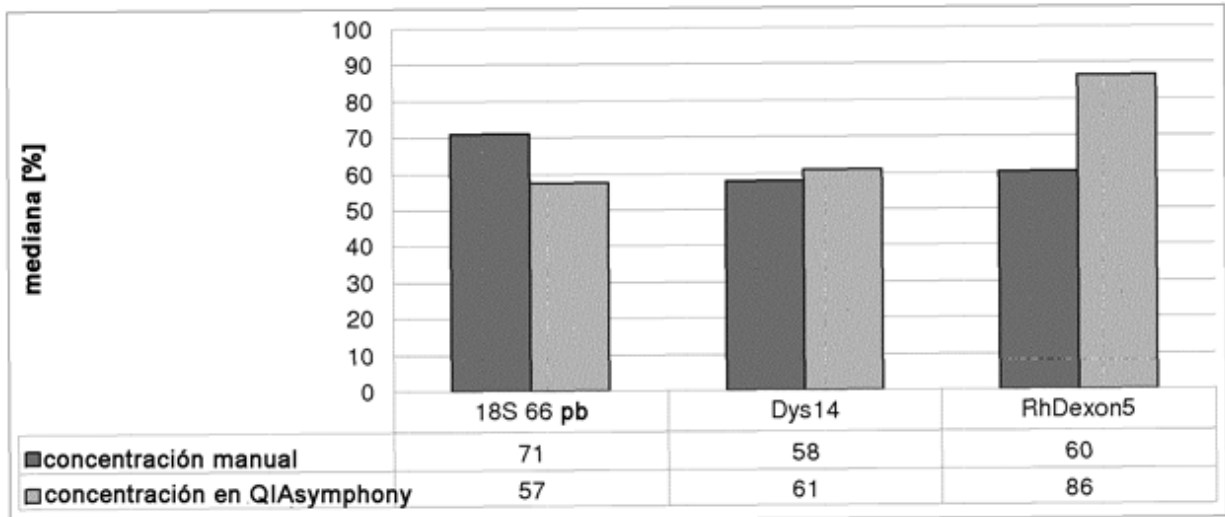


FIGURA 8

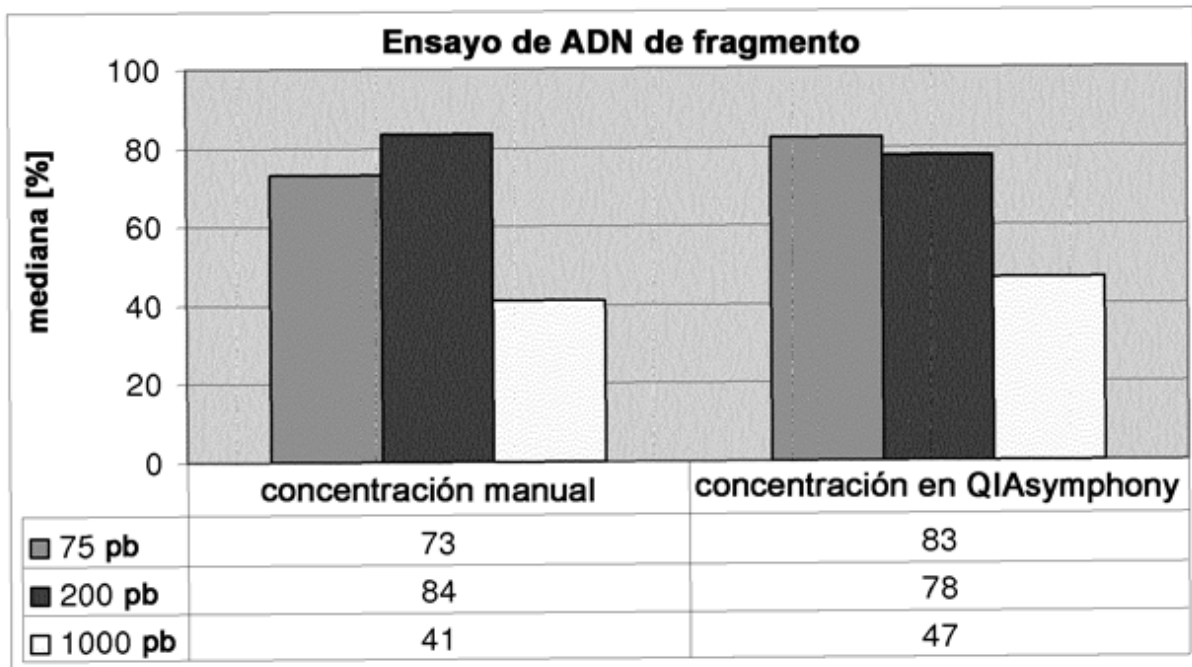


FIGURA 9

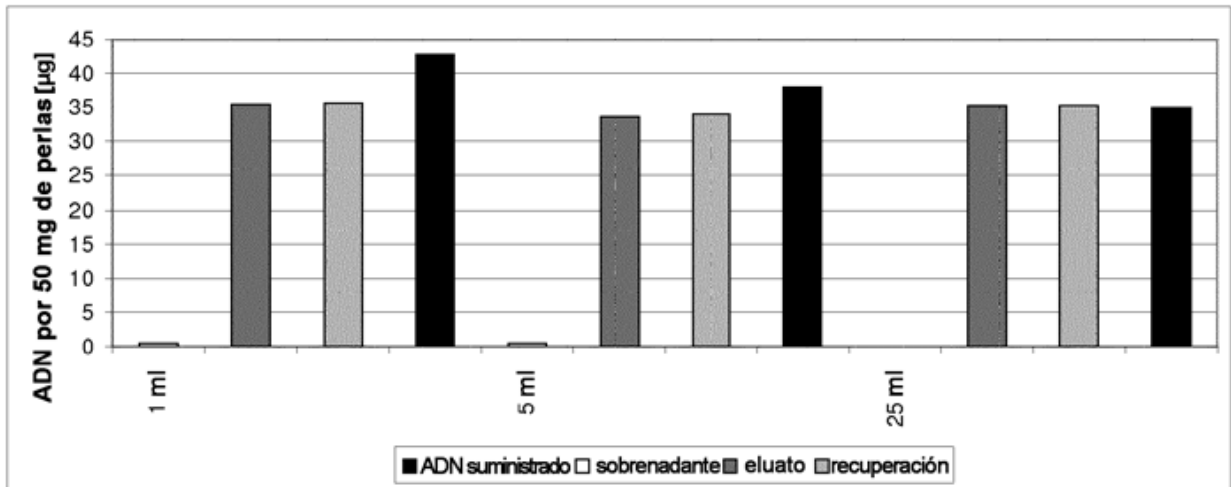


FIGURA 10

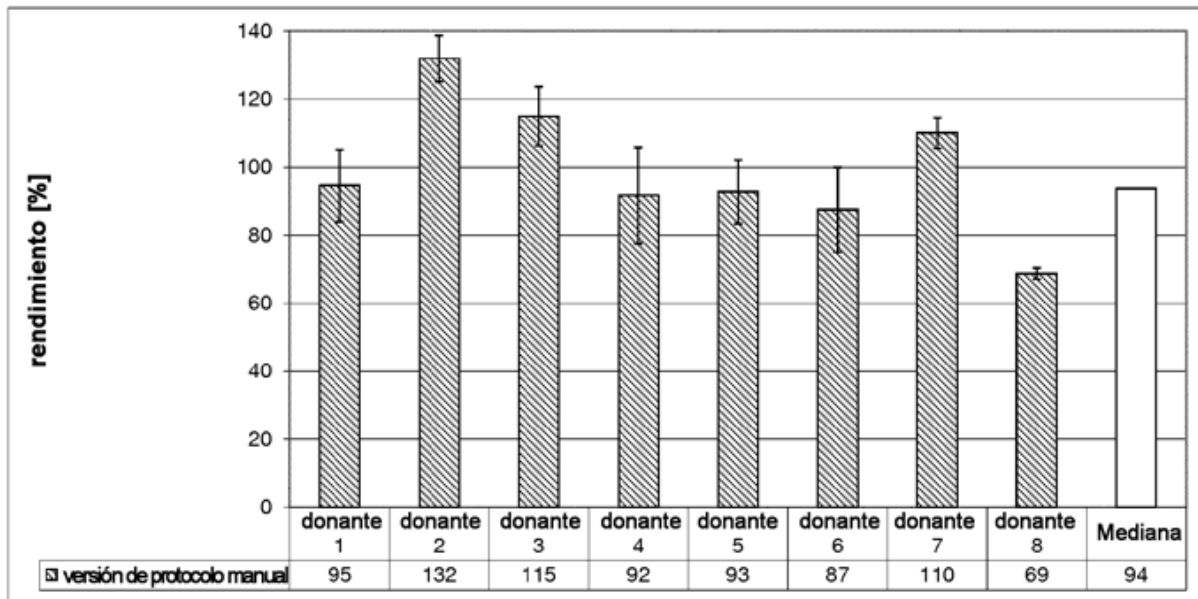


FIGURA 11

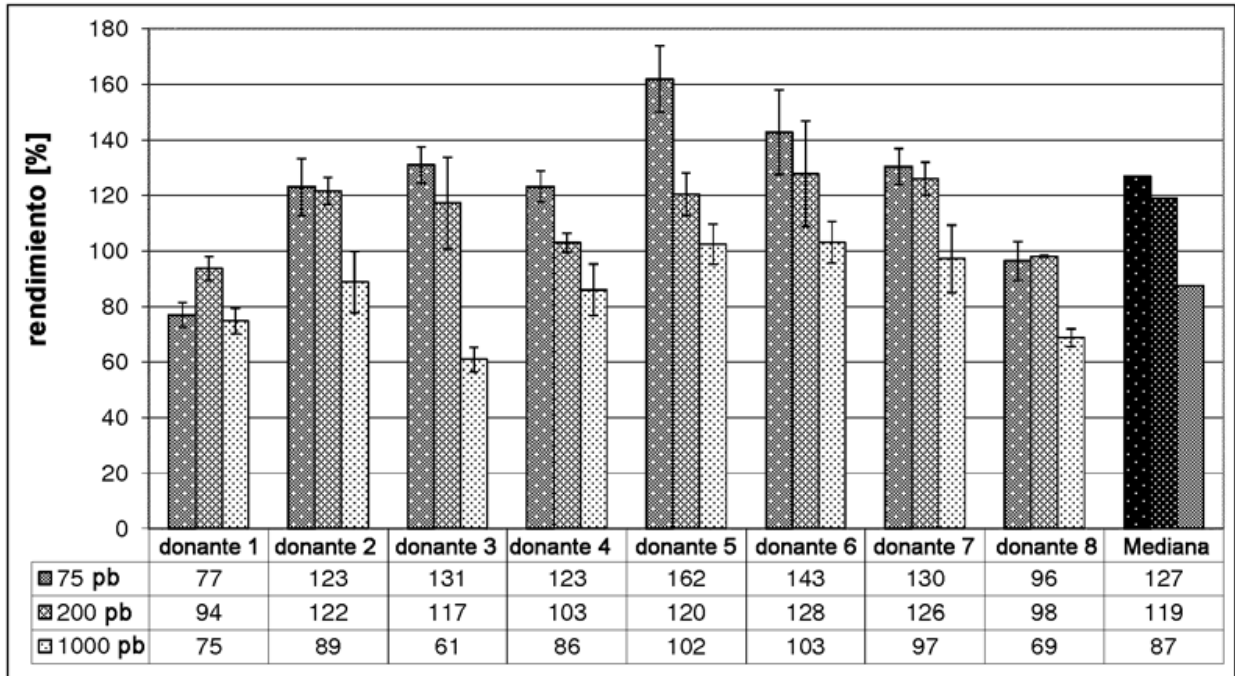


FIGURA 12a

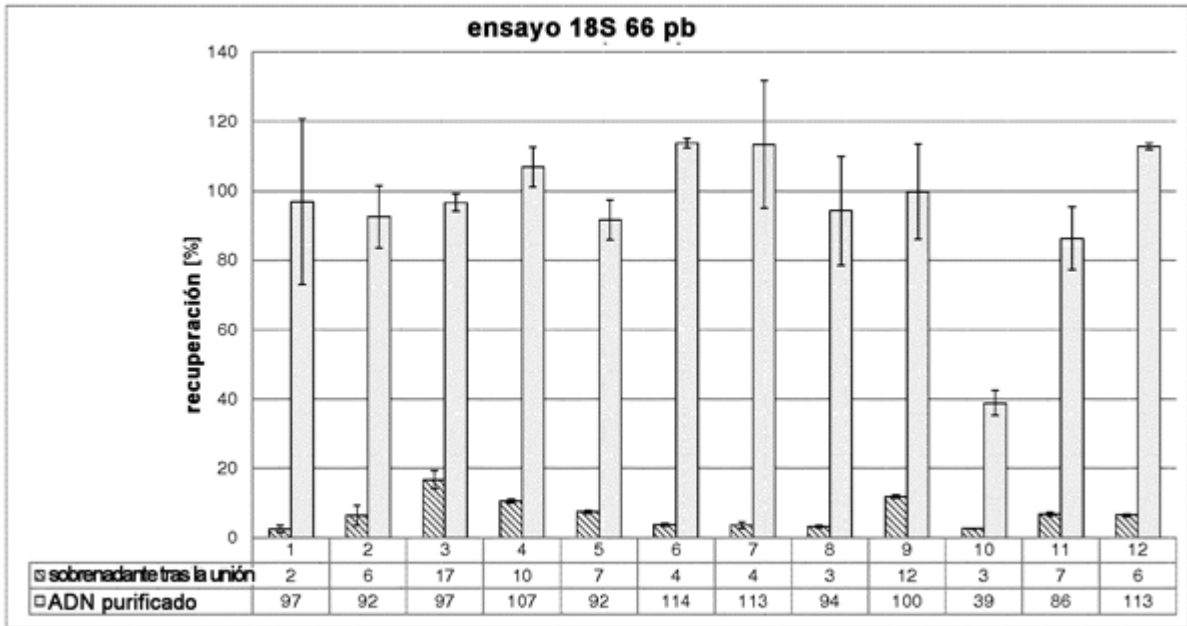


FIGURA 12b

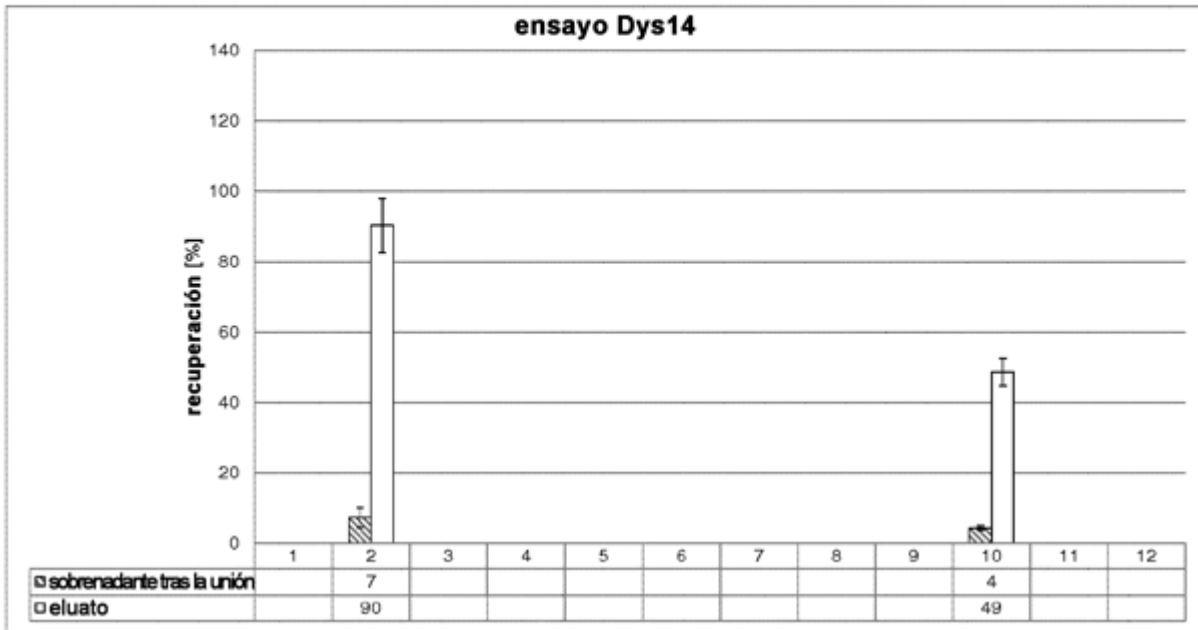


FIGURA 12c

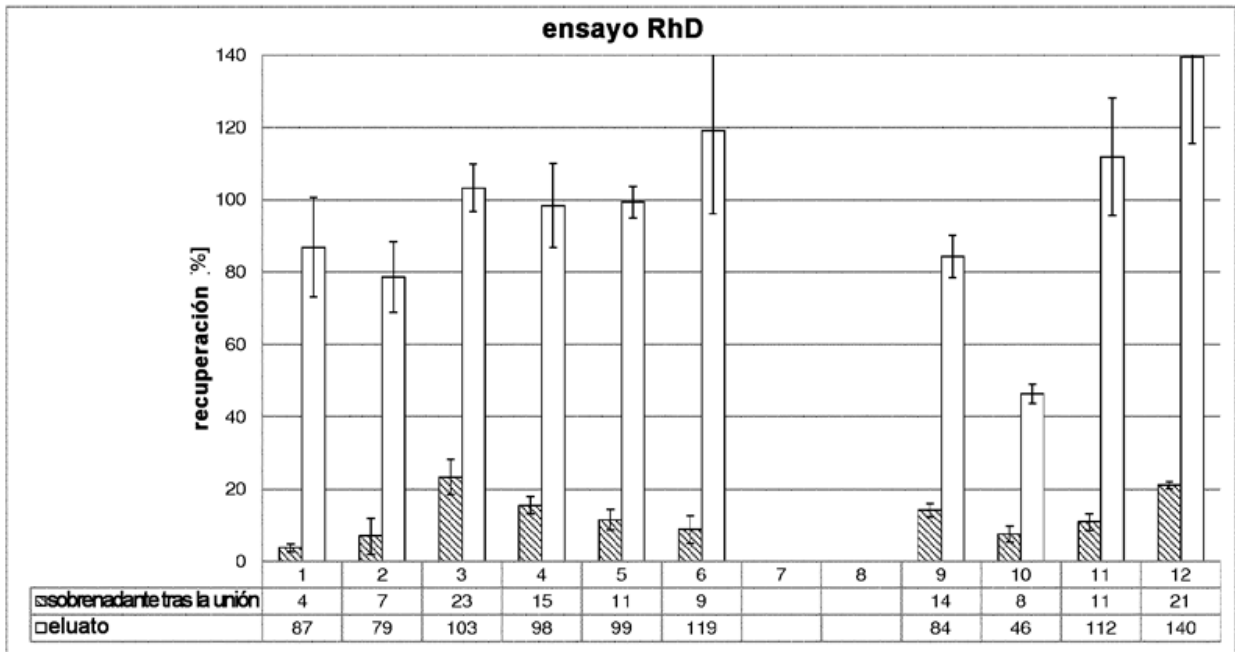


FIGURA 13a

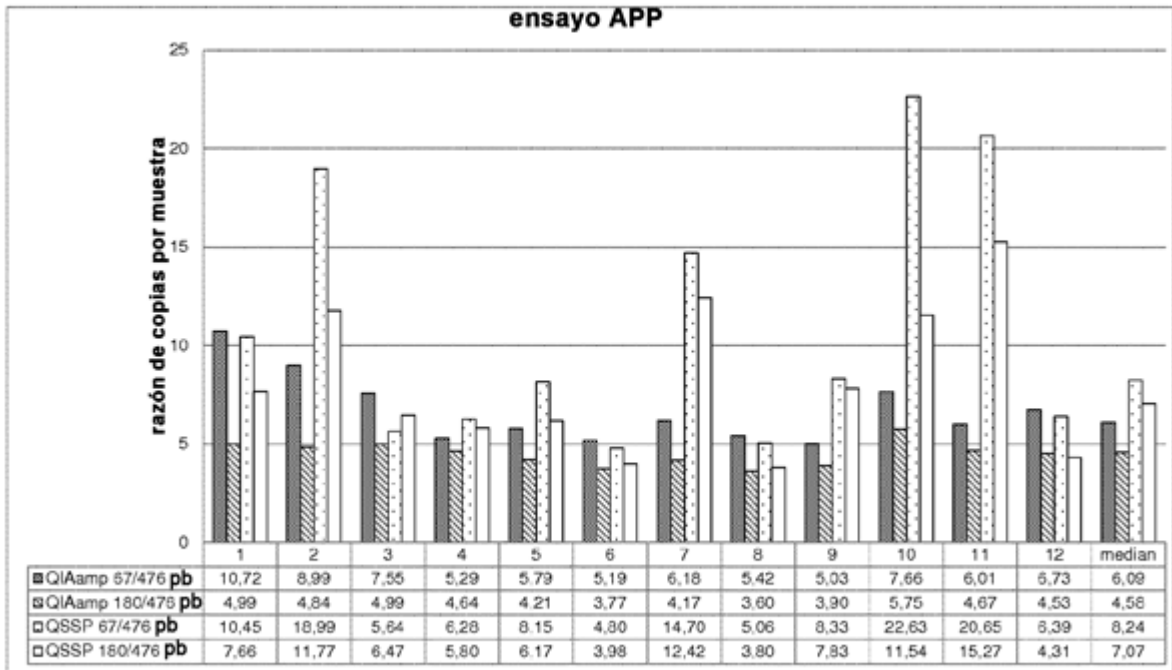


FIGURA 13b

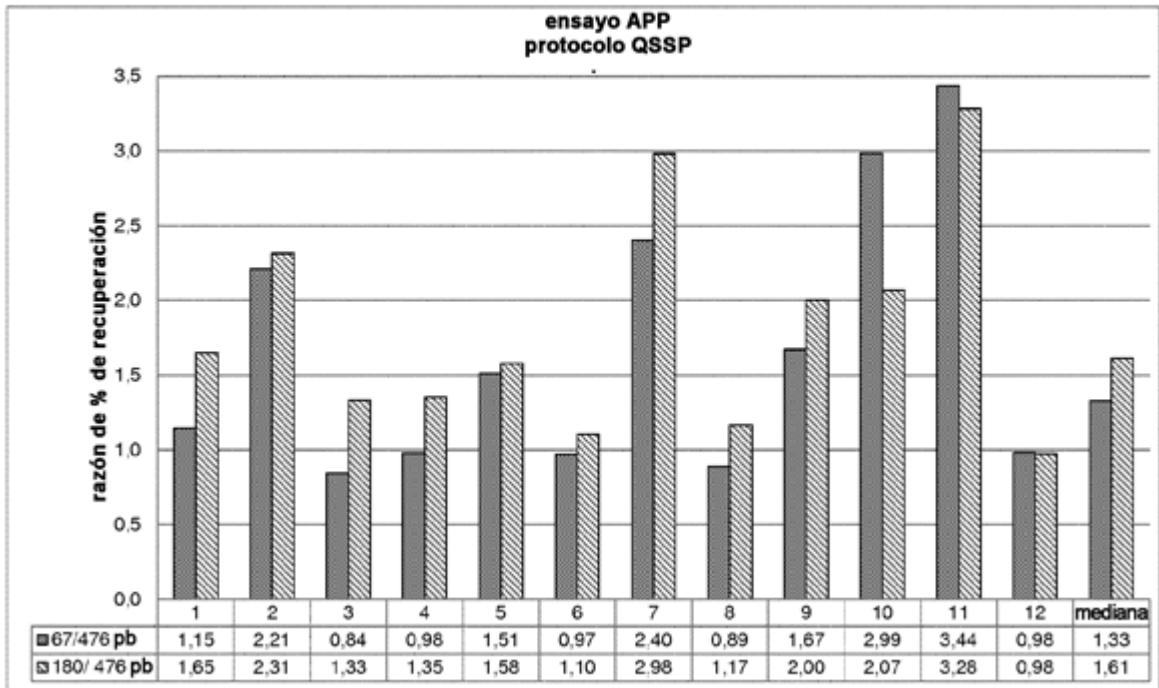


FIGURA 14a

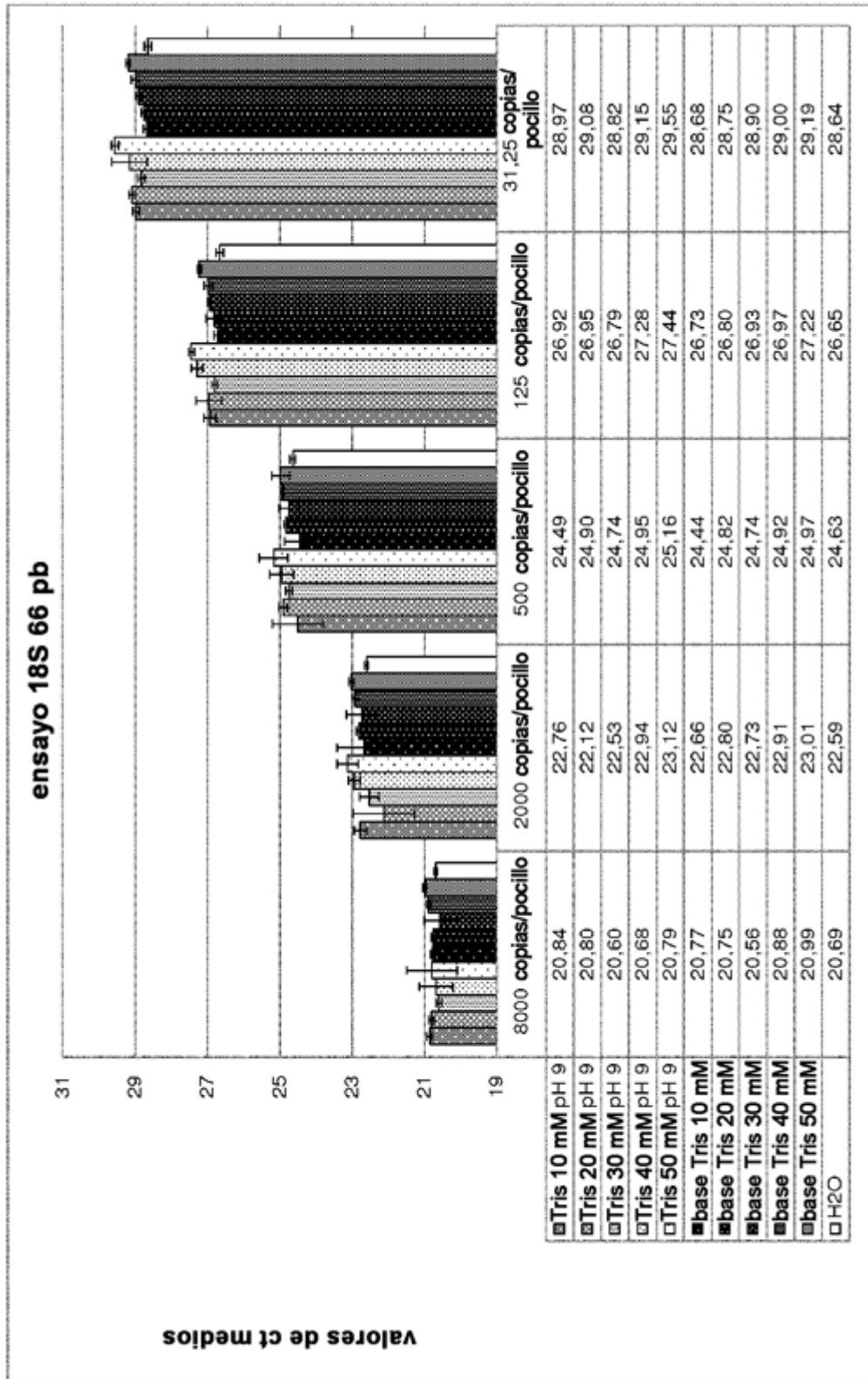


FIGURA 14b

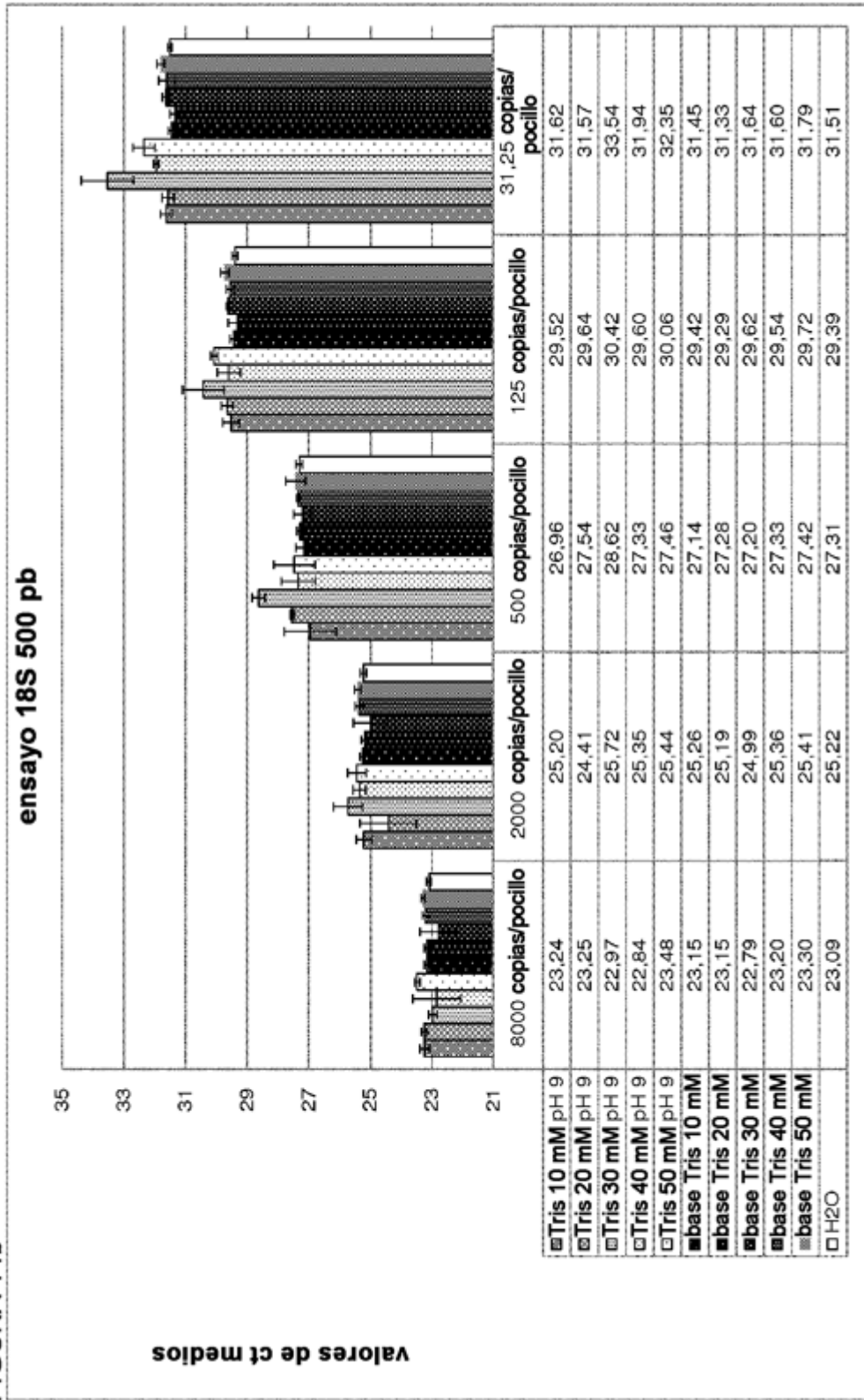


FIGURA 15a

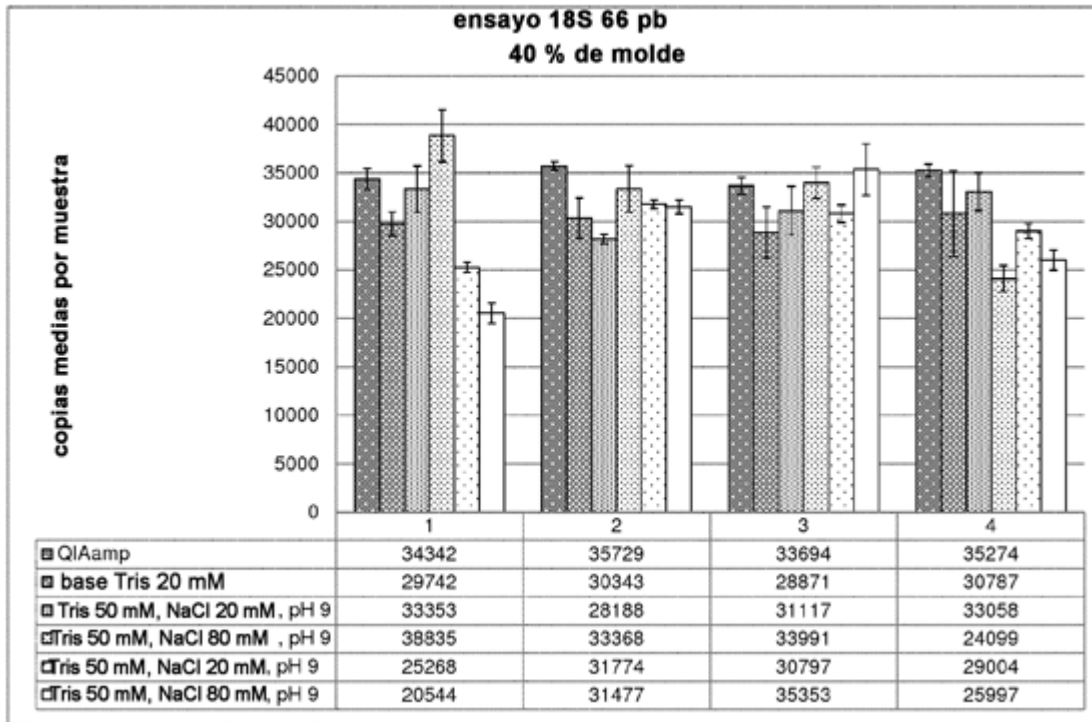


FIGURA 15b

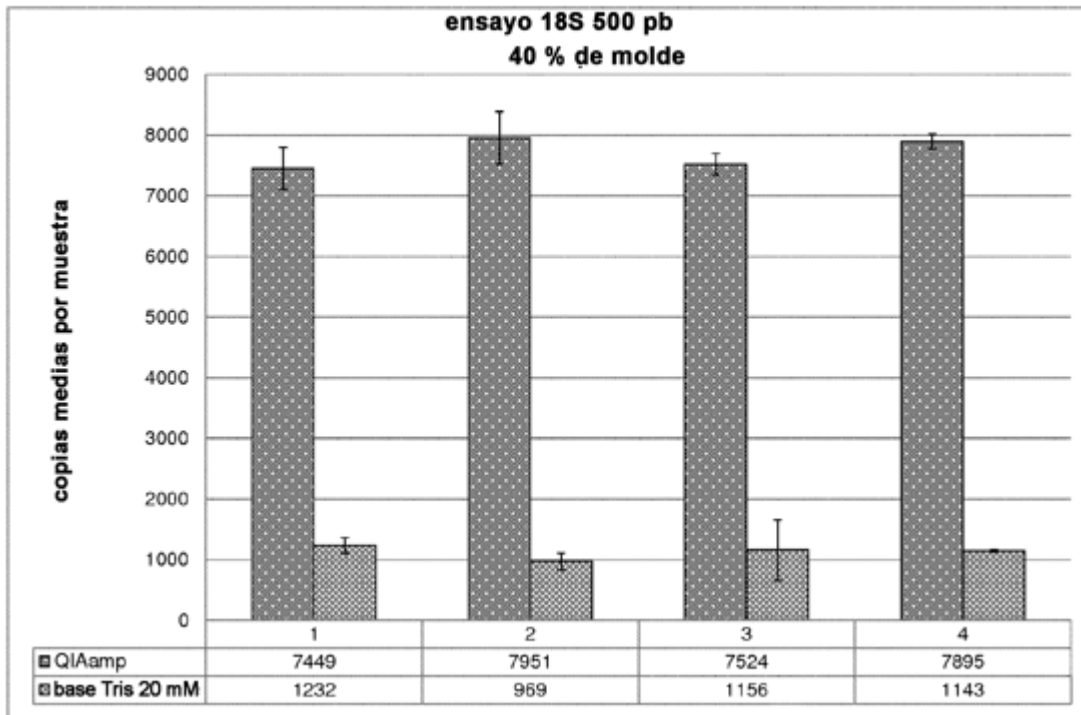


FIGURA 16

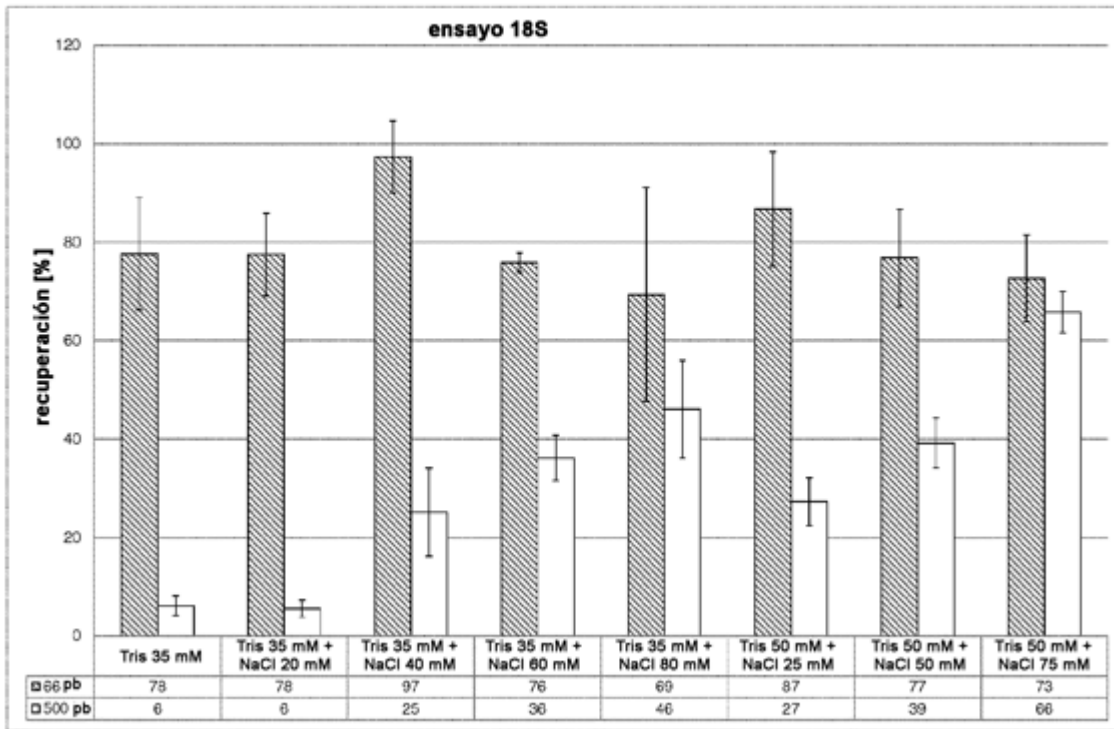


FIGURA 17

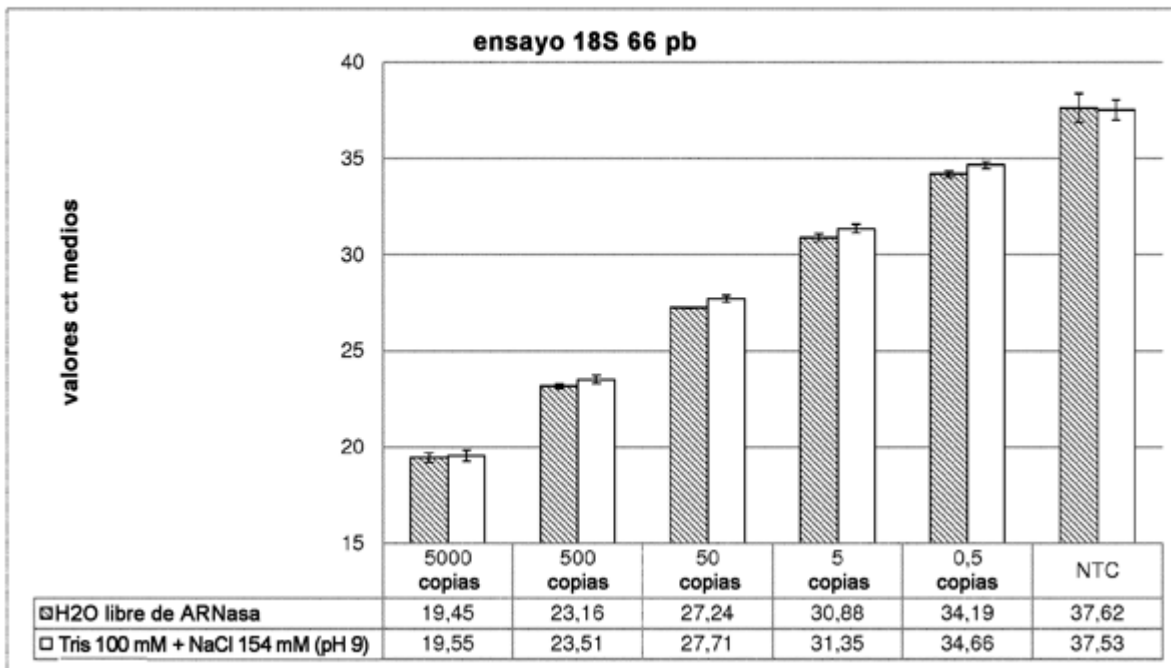


FIGURA 18a

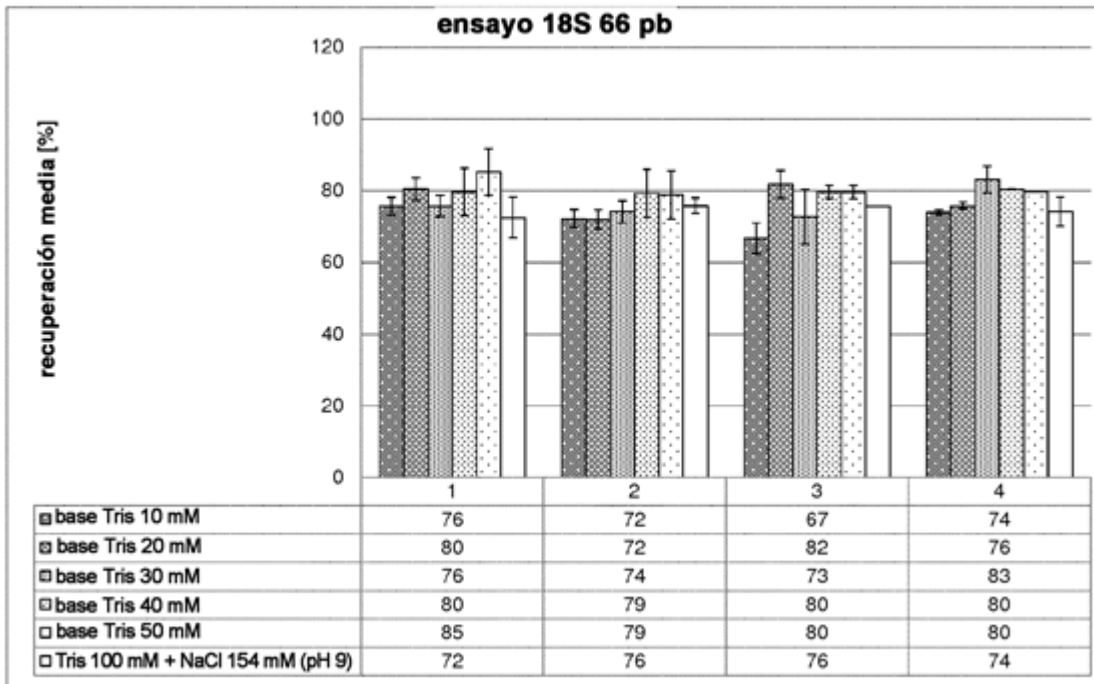


FIGURA 18b

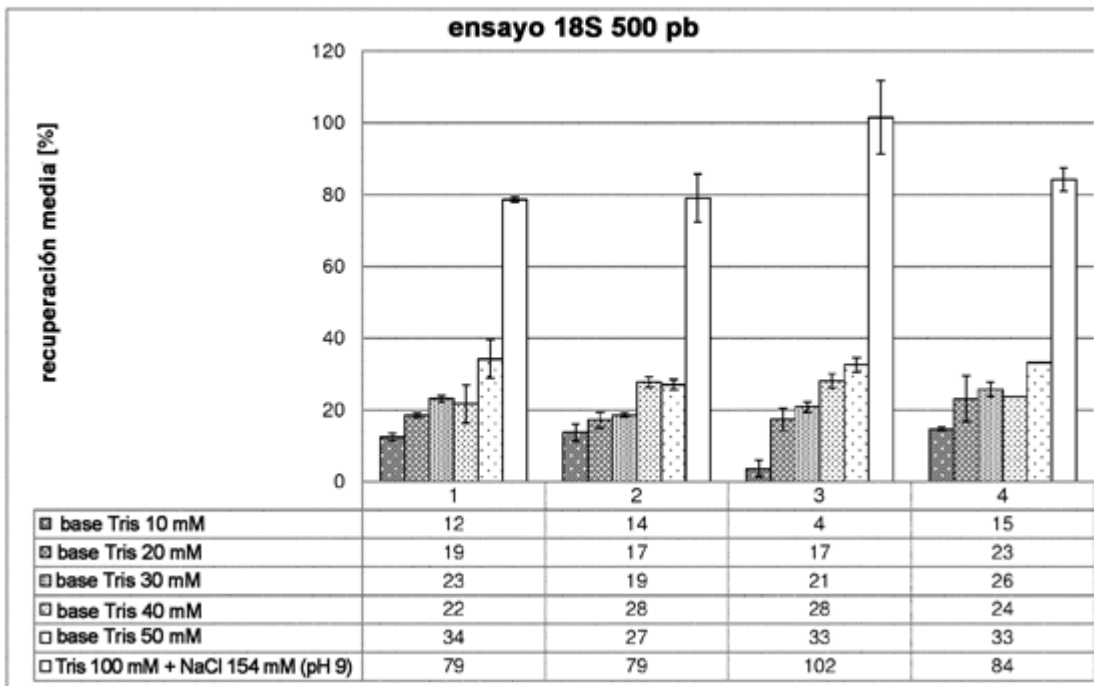


FIGURA 19

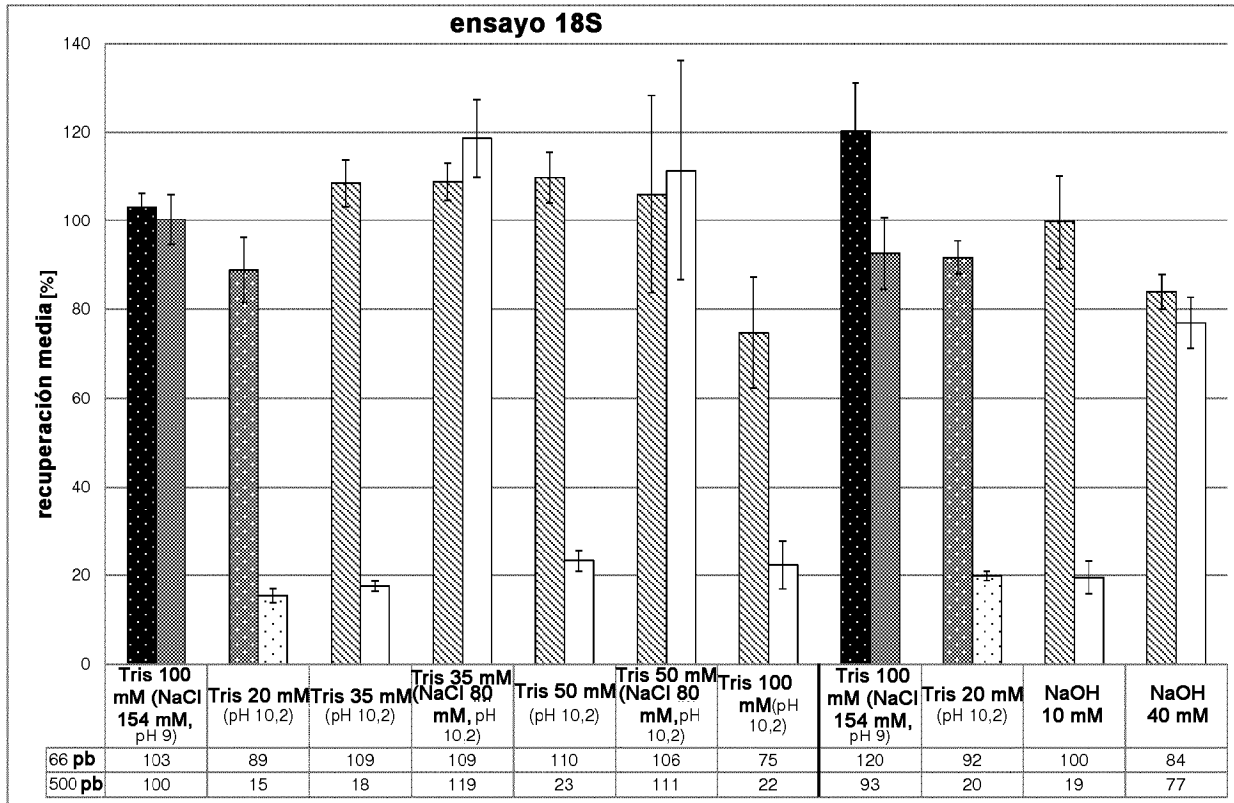


FIGURA 20

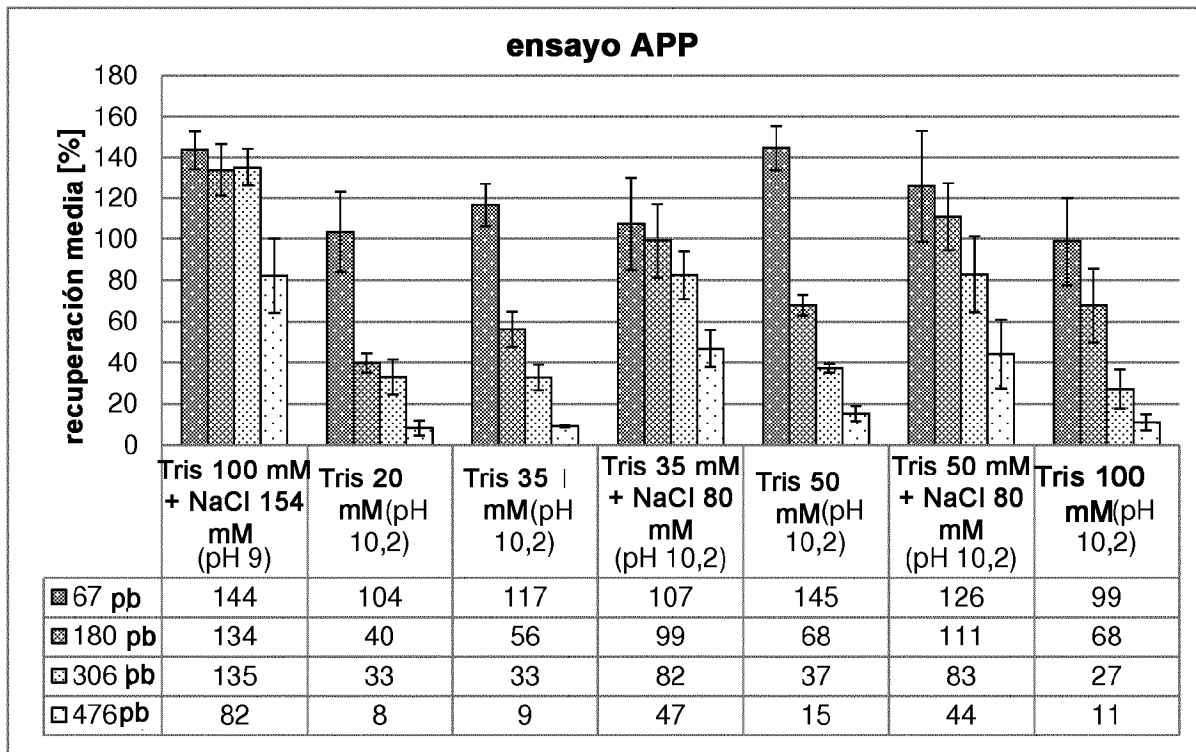


FIGURA 21

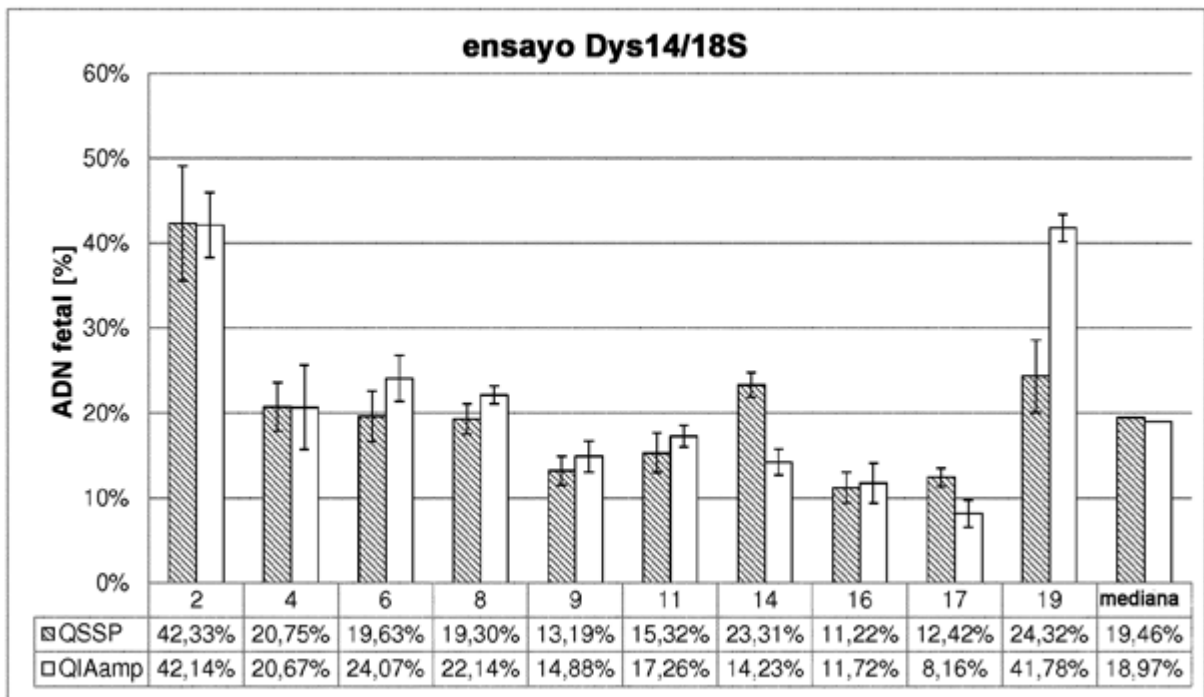


FIGURA 22

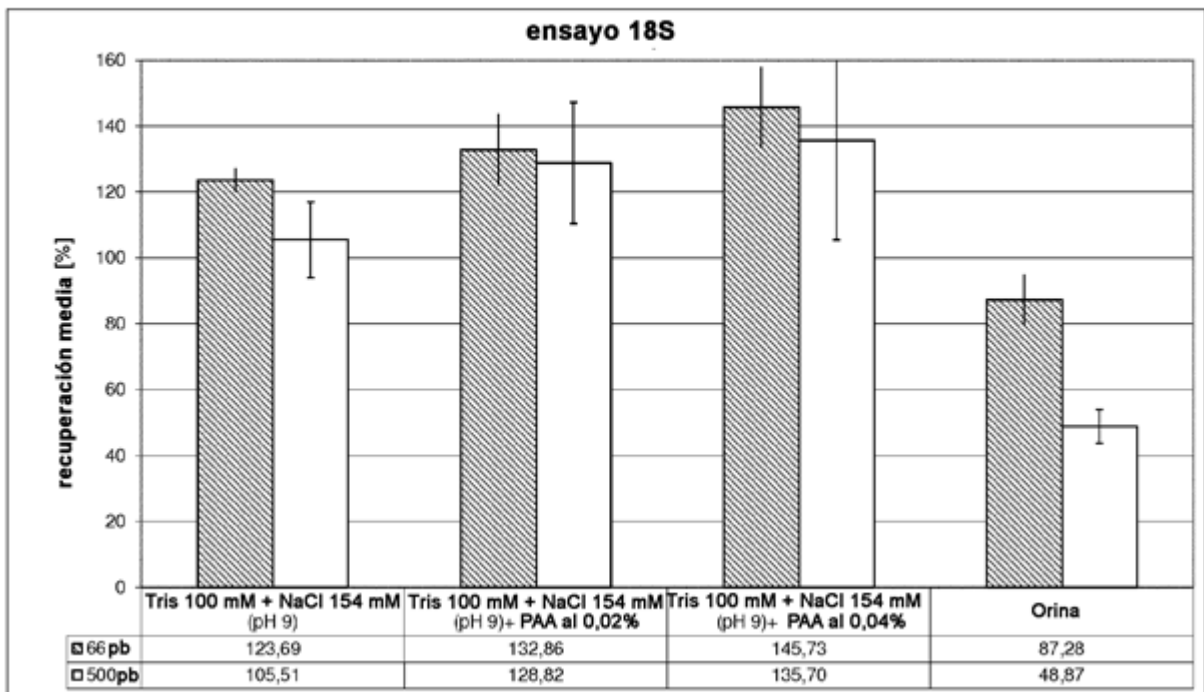


FIGURA 23a

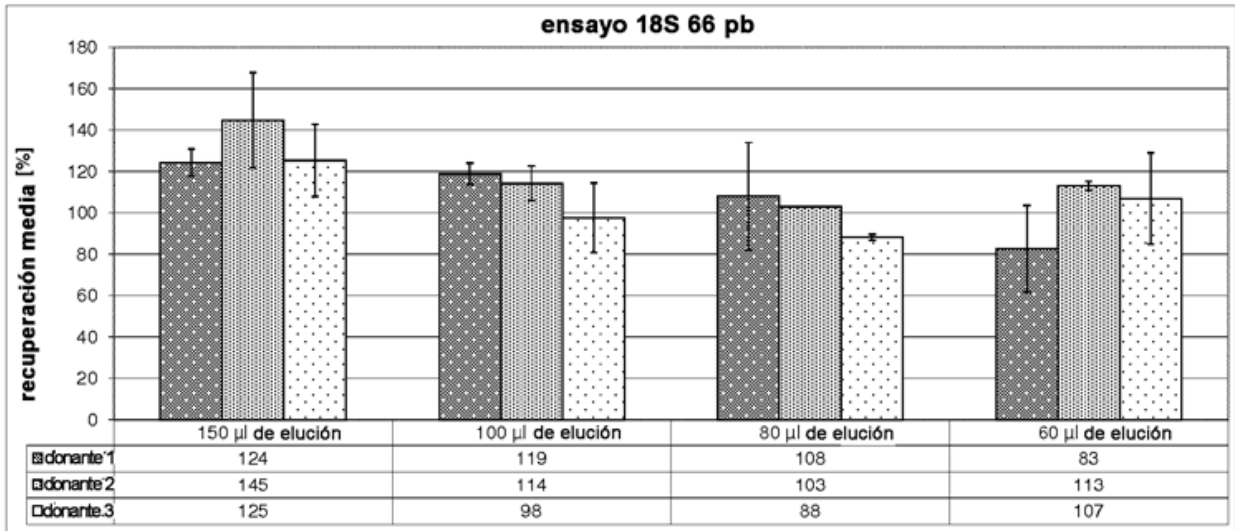


FIGURA 23b

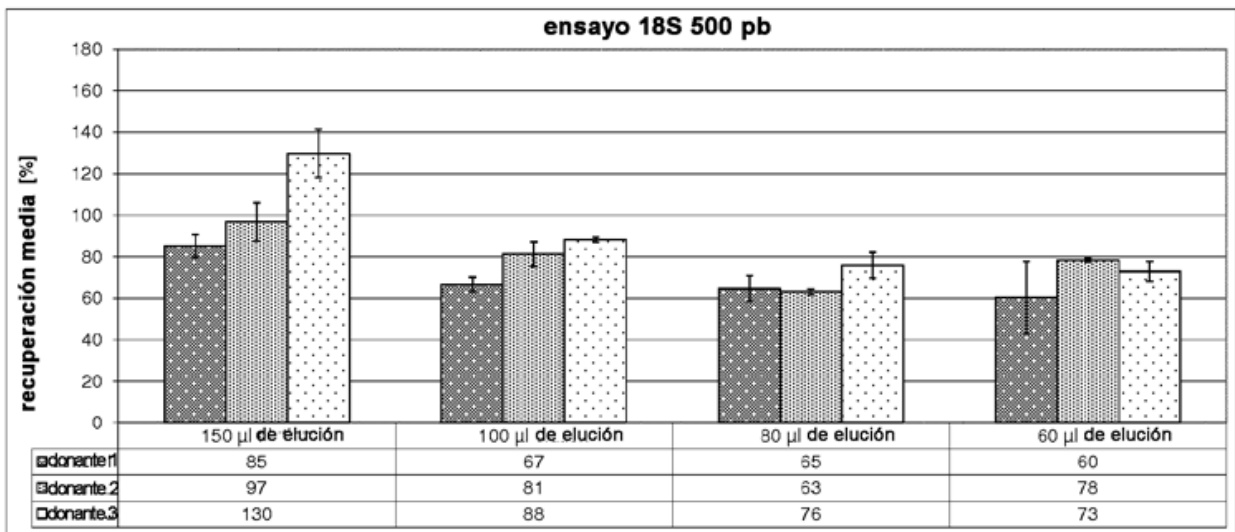


FIGURA 24

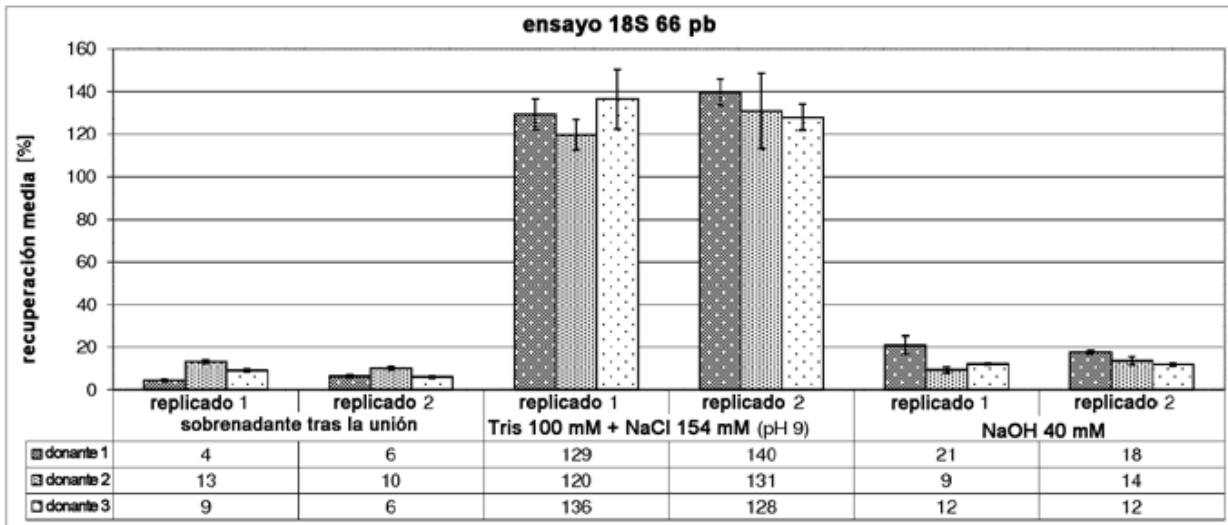


FIGURA 25a

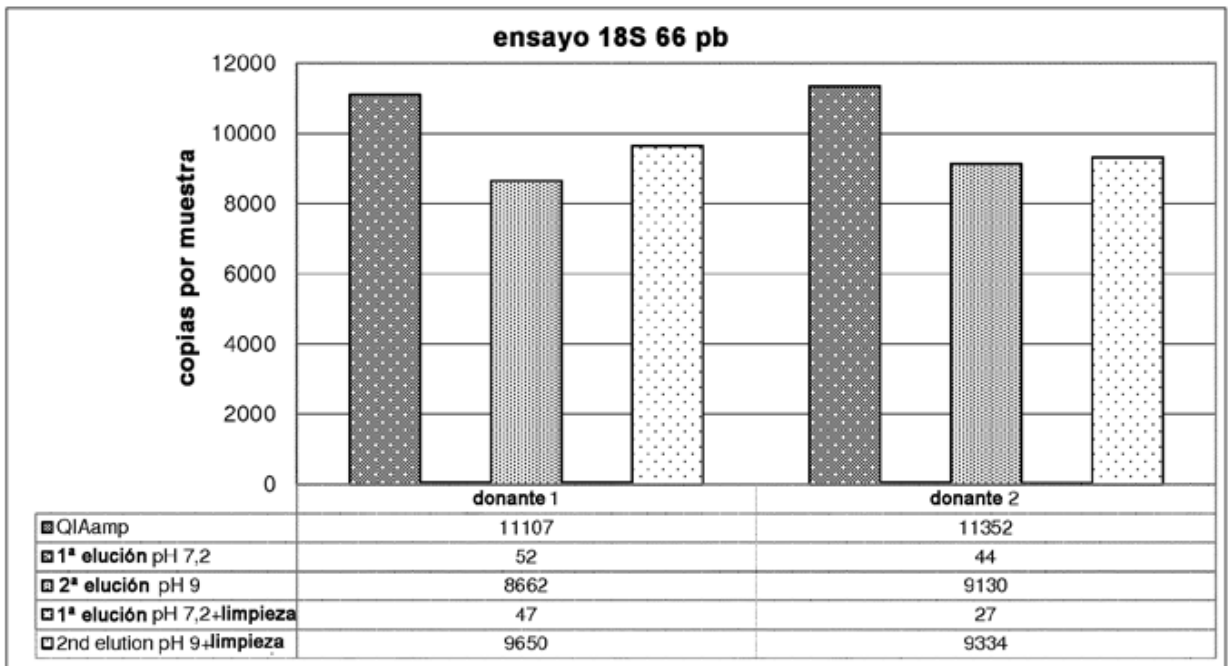


FIGURA 25b

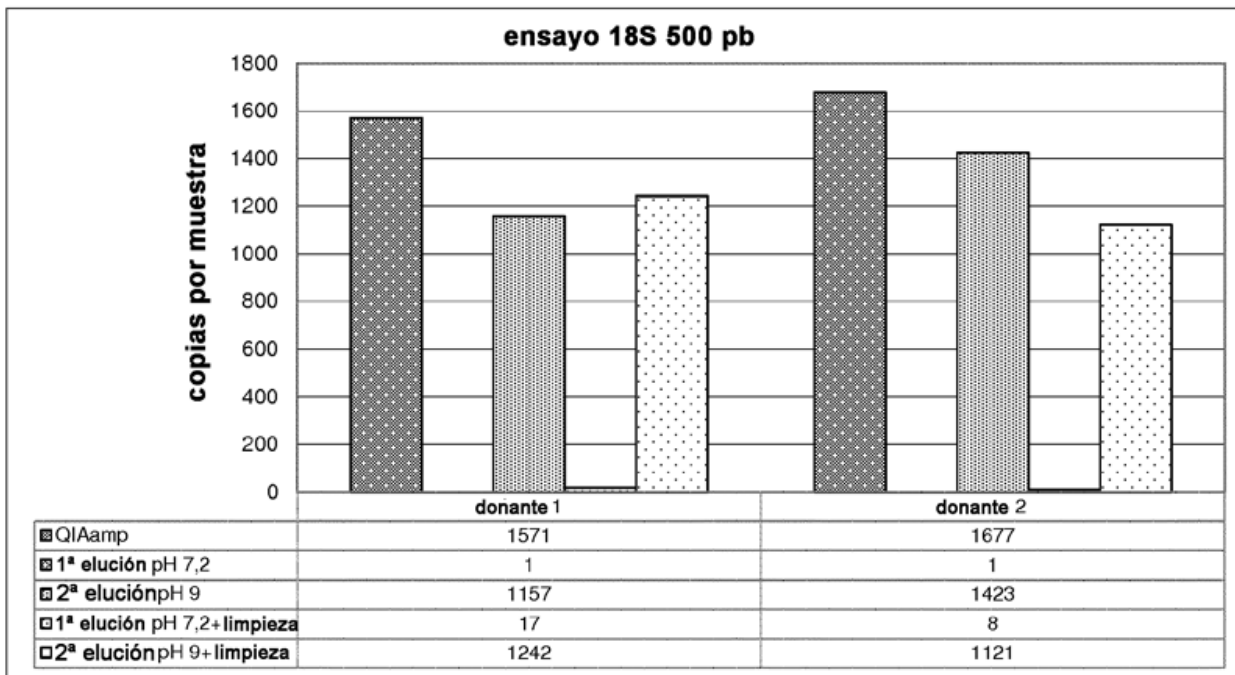


FIGURA 26

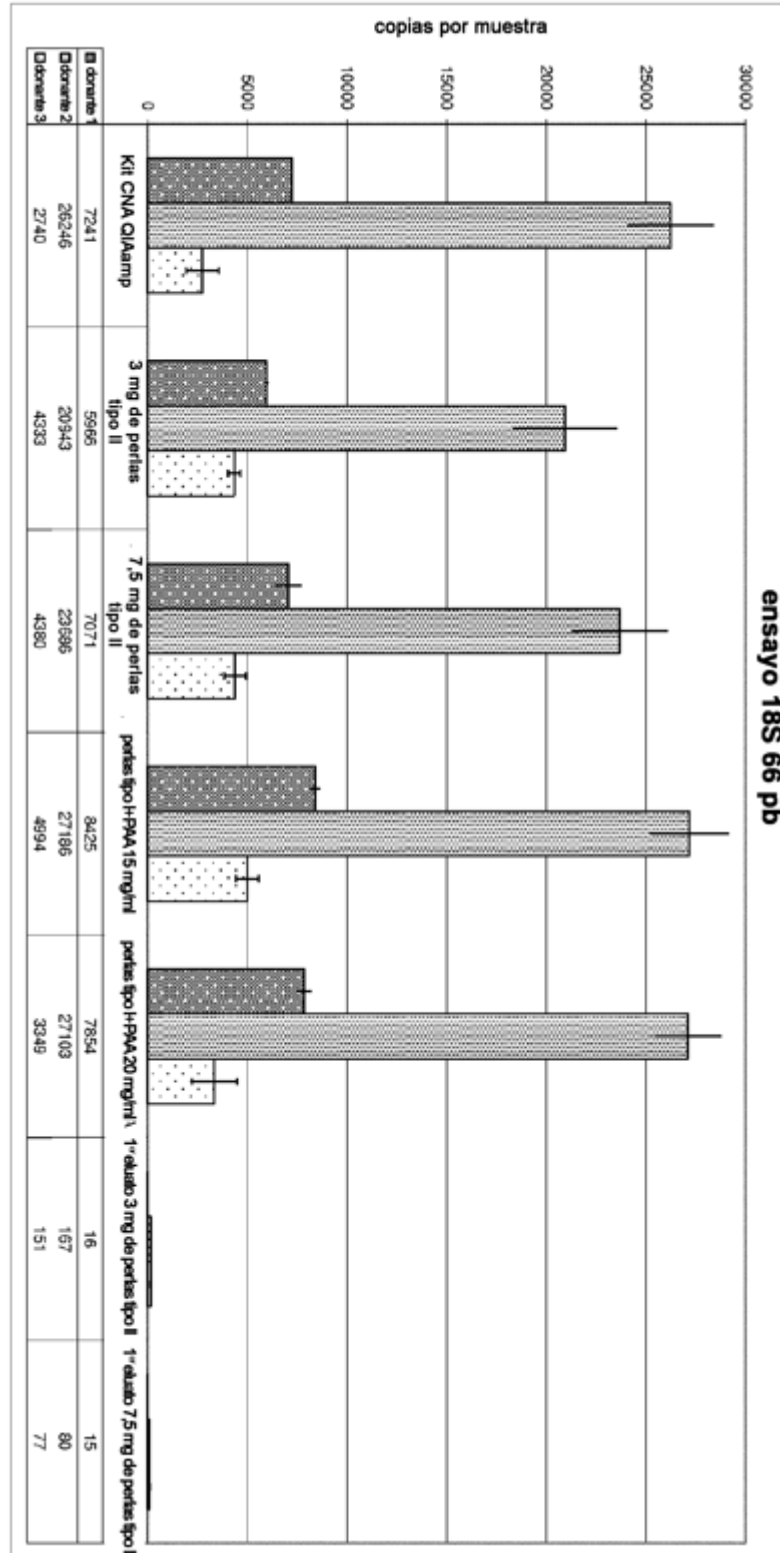


FIGURA 27a

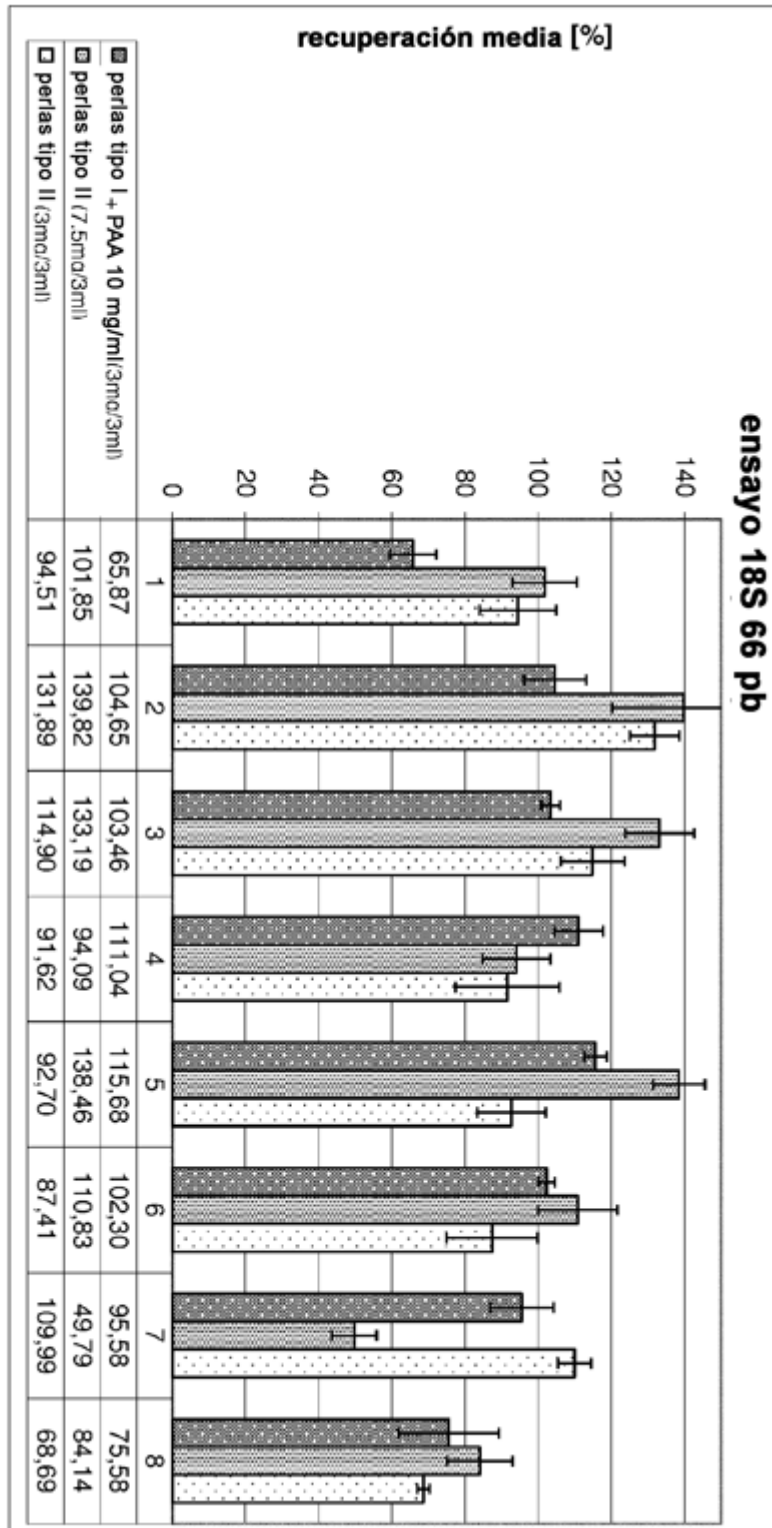


FIGURA 27b

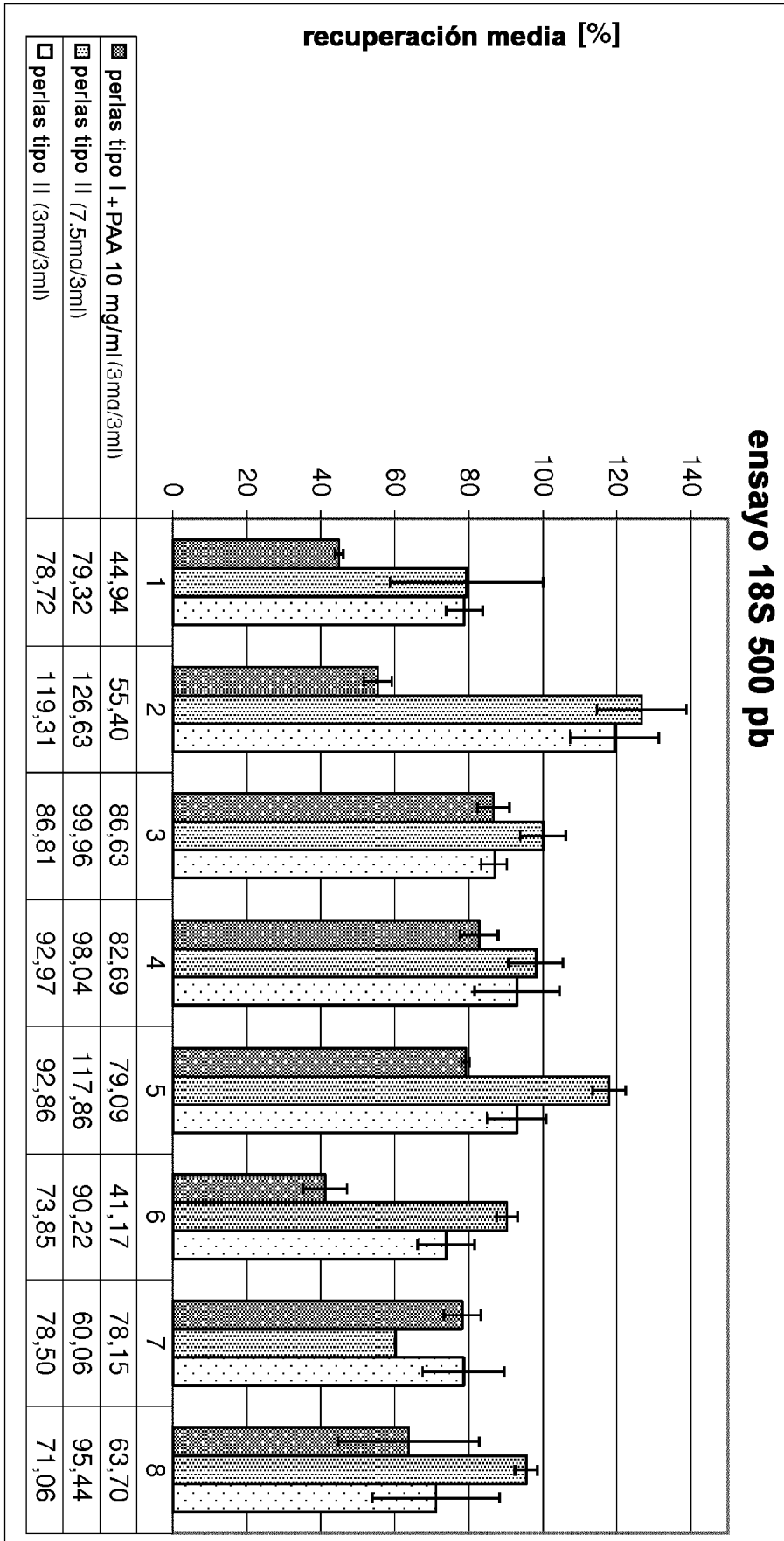


FIGURA 28

