

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 631**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2004** **E 14183292 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019** **EP 2902490**

54 Título: **Método para aislar pequeñas moléculas de ARN**

30 Prioridad:

**25.07.2003 US 490325 P**  
**19.09.2003 US 667126**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.08.2019**

73 Titular/es:

**LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (100.0%)**  
**5823 Newton Drive**  
**Carlsbad, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

**CONRAD, RICHARD C.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 721 631 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para aislar pequeñas moléculas de ARN

**Antecedentes de la invención**

5 La presente solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Núm. de Serie 60/490,325, presentada el 25 de Julio de 2003, y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. de Serie 10/667.126 presentada el 19 de Septiembre de 2003.

**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere en general a los campos de la biología molecular y la biotecnología. Más concretamente, se refiere a métodos y composiciones para el aislamiento de pequeñas moléculas de ARN que tienen típicamente 100 nucleótidos o menos, tales como ARNip y miARN, en oposición a moléculas de ARN o ADN más grandes. Las pequeñas moléculas de ARN aisladas se pueden utilizar en posteriores estudios o ensayos.

**Descripción de la técnica relacionada**

15 El estudio de pequeñas moléculas de ARNs-ARN del orden de 100 nucleótidos o menos de diversos tejidos en muchos organismos, así como células cultivadas, es un área de extremo interés en la actualidad, y promete seguir siéndolo en el futuro. Estos pequeños ARN incluyen moléculas de microARN (miARN) y pequeñas moléculas de ARN de interferencia (ARNip), ambas las cuales pueden tener un potente efecto sobre la expresión de un gen en virtud de la hibridación a su ARNm diana. Adicionalmente, estos procedimientos serían aplicables al aislamiento de pequeños ARN nucleares y pequeños ARN nucleolares (ARNpn y ARNpno), implicados en el procesamiento del ARNm y el ARNr. Los procedimientos también se podrían utilizar para aislar ARNt junto con ARNr 5S y 5,8S, que están todos implicados en la traducción de proteínas.

20 Resulta clave para estos estudios la necesidad de aislar moléculas de ARN en el intervalo de tamaño entre 15 y 100 nucleótidos con una elevada eficacia. Los métodos que proporcionan una metodología directa para hacer esto son bastante valiosos.

25 La preparación de ARN a partir de fuentes naturales (muestras de tejido, organismos completos, cultivos celulares, fluidos corporales) requiere la eliminación de todas las demás biomoléculas. Una vez que se ha eliminado el agua, el componente principal de las células es normalmente la proteína, proporcionando a menudo tres cuartos de la masa. Del resto de las otras principales biomoléculas, los lípidos, carbohidratos, combinaciones de estos con cada uno de los otros y proteína, y ADN son los demás componentes principales. Un objetivo de la extracción de ARN es eliminar la proteína y el ADN, ya que estos proporcionan la mayor interferencia en el uso del ARN. Los radicales lipídicos y de carbohidratos se pueden disolver normalmente con la ayuda de un detergente. La proteína se puede desprender del ARN (y el ADN) con la ayuda de detergentes y desnaturalizantes, pero todavía debe ser retirada de la solución común.

35 Históricamente se han utilizado dos métodos principales para lograr este propósito. El primero es el uso de disolventes orgánicos que no son miscibles con agua para disolver (literalmente, para extraer químicamente) o precipitar las proteínas, después de lo cual la fase libre de proteína acuosa se puede separar por centrifugación antes de la eliminación. Normalmente, se utilizan fenol o mezclas de fenol-cloroformo para este fin. El segundo método inmoviliza selectivamente el ARN sobre una superficie sólida y enjuaga la proteína, después de lo cual se utilizan condiciones para liberar el ARN en una solución acuosa. Esto es literalmente una extracción en fase sólida. Ambos procedimientos pueden reducir la cantidad de contaminación o contaminación por arrastre de ADN, variando la eficacia con las condiciones precisas empleadas.

40 Las extracciones con fenol y fenol-cloroformo proporcionan una solución de ácido nucleico extremadamente libre de proteína y de lípido. La mayor parte, si no todo (dependiendo de la muestra) del carbohidrato también se pierde en este procedimiento. Se sabe que el fenol-cloroformo ácido extrae parte del ADN de la solución acuosa (Chomczynski y Sacchi, 1987). Sin embargo, la solución tiene un elevado contenido de agentes desnaturalizantes tales como hidrocloreuro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, o urea, todos los cuales son incompatibles con el análisis enzimático aguas abajo, y los dos primeros también con el análisis electroforético. El ARN normalmente se separa de estas mezclas mediante precipitación selectiva, normalmente con etanol o isopropanol. Este procedimiento no es tan eficaz para pequeñas moléculas de ácido nucleico, por lo que este procedimiento no es ideal para la preparación de pequeños ARN.

50 La extracción en fase sólida se basa en un elevado contenido de sal o sal y alcohol para disminuir la afinidad del ARN por el agua e incrementarla para el soporte sólido utilizado. Se ha demostrado que el uso de vidrio (sílice) como soporte sólido funciona para ARN grandes en presencia de elevadas concentraciones de sales desnaturalizantes (Patentes de Estados Unidos 5.155.018; 5.990.302, 6,043,354, 6.110.363, 5.234.809, Boom *et al.*, 1990) o concentraciones inferiores de sales desnaturalizantes más etanol (Patente de Estados Unidos 6.180.778).

55 Sin embargo, las condiciones normales para la unión a la fibra de vidrio para el ARN no funcionan para el microARN, y el uso de un producto lisado bruto es problemático debido a los requerimientos variables con diferentes tejidos.

Muchos de los protocolos conocidos implican el aislamiento de ADN o ARNm más grande, que no son ideales para el aislamiento de pequeñas moléculas de ARN debido a que éstas a menudo no son capturadas ni eluidas eficazmente. Por lo tanto, existe la necesidad de técnicas mejoradas para el aislamiento, la detección eficaz, y la cuantificación exacta de estas pequeñas moléculas de ARN recientemente descubiertas.

## 5 Compendio de la invención

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para aislar, extraer, purificar, caracterizar, cuantificar, y/o someter a ensayo pequeñas moléculas de ARN de una muestra, incluyendo una muestra celular. Tales composiciones y métodos permiten la manipulación de pequeñas moléculas de ARN, que a menudo se pierden o se agotan cuando se emplean los métodos para el aislamiento general de moléculas de ARN más grandes.

10 La presente invención proporciona un método para el aislamiento de pequeñas moléculas de ARN que tienen a lo sumo 100 nucleótidos o menos de una muestra que comprende:

a) lisar las células de una solución de lisado para producir un producto lisado; en donde la solución de lisado comprende un agente caotrópico

b) añadir al producto lisado una solución etanólica para formar una mezcla de producto lisado/etanol;

15 c) aplicar la mezcla de producto lisado/etanol a un primer soporte sólido y recoger la mezcla de producto lisado/etanol del flujo continuo;

d) añadir a la mezcla de producto lisado/etanol del flujo continuo de la etapa c) una solución de etanol;

e) aplicar la mezcla de producto lisado/etanol de la etapa d) a un segundo soporte sólido; y

20 f) eluir las pequeñas moléculas de ARN del soporte sólido, en donde la mezcla de producto lisado/etanol aplicada al primer soporte sólido tiene entre aproximadamente 20% y aproximadamente 35% de etanol y en donde la mezcla de producto lisado/etanol aplicada al segundo soporte sólido tiene entre aproximadamente 35% y aproximadamente 70% de etanol.

25 Por lo tanto, se contempla que la invención se refiera a pequeñas moléculas de ARN, que se entiende que, en la mayoría de las realizaciones, son moléculas de ARN de aproximadamente 100 nucleótidos o menos. Las pequeñas moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNip y miARN. En algunas realizaciones de la invención, las pequeñas moléculas de ARN tienen a lo sumo 100 nucleótidos o menos, tienen a lo sumo 70 nucleótidos o menos, o tienen a lo sumo 30 nucleótidos o menos, o tienen a lo sumo 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15 nucleótidos o menos.

30 En algunos casos, las pequeñas moléculas de ARN son de doble hebra. En algunos casos, las pequeñas moléculas de ARN son de hebra sencilla, aunque pueden tener regiones de auto-complementariedad. Puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de tales regiones, y estas regiones pueden implicar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más pares de bases (y por lo tanto, el doble de estas bases). Además, estas regiones de complementariedad pueden implicar una complementariedad de 100% o pueden implicar ciertos emparejamientos erróneos, tal como una identidad de al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% en la región entre bases, o una región puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10 o más emparejamientos erróneos entre bases en la región.

35 Específicamente se contempla que los métodos y composiciones de la invención se puedan utilizar para aislar pequeñas moléculas de ARN que tienen a lo sumo 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 10 o menos nucleótidos de longitud, y todos los intervalos obtenibles entre estos números enteros. Además, tales moléculas se pueden aislar de manera que se enriquezca la cantidad de moléculas de ARN presentes en una muestra.

40 Existen varias maneras de expresar el enriquecimiento y/o la purificación de pequeñas moléculas de ARN en el contexto de la invención. Cualquier incremento en la cantidad de pequeñas moléculas de ARN presente en una muestra está dentro del alcance de la invención.

45 El enriquecimiento y/o la purificación de los ARN pequeños se puede medir en términos de la masa de ARN pequeños con respecto a la masa de ARN total. Por ejemplo, una muestra se puede enriquecer en ARN pequeño aproximadamente o al menos aproximadamente 1x, 1,5x, 2x, 2,5x, 3x, 3,25x, 3,5x, 3,75x, 4x, 4,25x, 4,5x, 4,75x, 5x, 5,25x, 5,5x, 5,75x, 6x, 6,25x, 6,5x, 6,75x, 7x, 7,25x, 7,5x, 7,75x, 8x, 8,25x, 8,5x, 8,75x, 9x, 9,5x, 10x, 15x, 20x, 25x, 30x, 35x, 40x, 45x. 50x. 55x, 60x, 65x, 70x, 75x, 80x, 85x, 90x, 95x, 100x, 110x, 120x, 130x, 140x, 150x, 160x, 170x, 180x, 190x, 200x, 210x, 220x, 230x, 240x, 250x, 260x, 270x, 280x, 290x, 300x, 325x, 350x, 375x, 400x, 425x, 450x, 475x, 500x, 525x, 550x, 575x, 600x, 625x, 650x, 675x, 700x, 725x, 750x, 775x, 800x, 825x, 850x, 875x, 900x, 925x, 950x, 975x, 1000x, 1100x, 1200x, 1300x, 1400x, 1500x, 1600x, 1700x, 1800x, 1900x, 2000x (lo mismo que multiplicidad), y todos los intervalos obtenibles de ellos en pequeñas moléculas de ARN determinado por la masa de pequeñas moléculas de ARN con respecto a la masa de las moléculas de ARN totales antes de colocar el producto lisado sobre el soporte sólido en comparación con después de la elución del ARN del soporte sólido.

El enriquecimiento y/o la purificación de los ARN pequeños también se pueden medir alternativamente en términos del incremento de pequeñas moléculas de ARN con respecto al número de moléculas de ARN total. Las pequeñas moléculas de ARN se pueden aislar de manera que se enriquezca una muestra aproximadamente o al menos aproximadamente 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, 15x, 20x, 25x, 30x, 35x, 40x, 45x, 50x, 55x, 60x, 65x, 70x, 75x, 80x, 85x, 90x, 95x, 100x, 110x, 120x, 130x, 140x, 150x, 160x, 170x, 180x, 190x, 200x, 210x, 220x, 230x, 240x, 250x, 260x, 270x, 280x, 290x, 300x, 325x, 350x, 375x, 400x, 425x, 450x, 475x, 500x, 525x, 550x, 575x, 600x, 625x, 650x, 675x, 700x, 725x, 750x, 775x, 800x, 825x, 850x, 875x, 900x, 925x, 950x, 975x, 1000x, 1100x, 1200x, 1300x, 1400x, 1500x, 1600x, 1700x, 1800x, 1900x, 2000x (lo mismo que multiplicidad), y todos los intervalos obtenibles de ellos en pequeñas moléculas de ARN determinado por el número de pequeñas moléculas de ARN con respecto al número total de moléculas de ARN antes de colocar el producto lisado sobre el soporte sólido en comparación con después de la elución del ARN del soporte sólido.

El enriquecimiento y/o la purificación de los ARN pequeños también se pueden medir en términos del incremento de pequeñas moléculas de ARN con respecto al número de moléculas de ARN total. Las pequeñas moléculas de ARN se pueden aislar de manera que la cantidad de pequeñas moléculas de ARN se incremente aproximadamente o al menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más con respecto a la cantidad total de ARN en la muestra antes y después del aislamiento.

Alternativamente, en algunas realizaciones, el enriquecimiento y/o la purificación de pequeñas moléculas de ARN se pueden cuantificar en términos de ausencia de grandes moléculas de ARN presentes en la muestra después de la elución del ARN del soporte sólido. Las pequeñas moléculas de ARN se pueden enriquecer de manera que el número de moléculas de ARN mayores de 200 nucleótidos en masa que queden en la muestra después de la elución del ARN del soporte sólido no sea mayor de aproximadamente 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0%, o cualquier intervalo de los mismos del ARN eluido del soporte sólido.

En ciertas realizaciones, aproximadamente o al menos aproximadamente 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% de las pequeñas moléculas de ARN en una muestra se aísla después de implementar el método.

Los métodos incluyen métodos para el aislamiento eficaz de pequeñas moléculas de ARN de células que comprenden: a) lisar las células con una solución de lisado para producir un producto lisado; b) añadir una solución de alcohol al producto lisado; c) aplicar el producto lisado a un soporte sólido; y d) eluir las moléculas de ARN del soporte sólido.

Debido a que las pequeñas moléculas de ARN están siendo aisladas eficazmente, los métodos pueden incluir una etapa de e) utilización o caracterización de las pequeñas moléculas de ARN. La utilización o caracterización de las pequeñas moléculas de ARN se distingue del descarte de las pequeñas moléculas de ARN o de la obtención de las mismas como subproducto o contaminante en una reacción o ensayo que implican otros tipos de moléculas aisladas de la muestra, tal como moléculas de ARN más largas o moléculas de ADN.

Las muestras de las cuales se pueden aislar pequeñas moléculas de ARN incluyen cualquier muestra que contenga tales moléculas. La muestra puede ser o puede contener células, tejido, órganos, u otra muestra biológica. Alternativamente, la muestra puede ser una mezcla de reacción, tal como una en la que se produzcan, generen, o creen pequeñas moléculas de ARN mediante métodos enzimáticos, sintéticos, y/o recombinantes.

En ciertas realizaciones, los métodos de la invención implican la lisis de una muestra que contenga células. Un "producto lisado" se produce cuando una célula es lisada o su integridad resulta deteriorada. En realizaciones específicas de la invención, una solución de lisado se implementa para lisar una muestra de células, y la solución incluye un agente caotrópico o detergente. Un "agente caotrópico" se refiere a un agente que despliega macromoléculas ordenadas, haciendo que pierdan su función (provocando de ese modo que las proteínas de unión liberen su diana). Un "detergente" se refiere a una sustancia que puede dispersar una sustancia hidrófoba (normalmente lípidos) en agua mediante emulsificación. La concentración de un agente caotrópico en las soluciones de la invención, particularmente las soluciones de lisado, es aproximadamente, es a lo sumo aproximadamente, o es al menos aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5 M o más, y los intervalos de los mismos. En realizaciones específicas, la concentración de guanidinio en la solución de lisado es de entre aproximadamente 2,0 M y 4,0 M. En ciertas realizaciones, el agente caotrópico es cloruro de guanidinio o isotiocianato de guanidinio. En otras realizaciones adicionales, la solución de lisado también contiene un detergente y/o un tampón. La concentración del detergente está entre 0,1% y aproximadamente 2% en algunas realizaciones. El detergente, concretamente uno suave que no sea desnaturante, puede actuar para solubilizar la muestra. Los detergentes pueden ser iónicos o no iónicos. Se contempla específicamente el detergente iónico N-lauroil sarcosina para su uso en las soluciones de la invención. La concentración del detergente en el tampón puede ser aproximadamente, al menos aproximadamente, o a lo sumo aproximadamente 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5%, 10,0% o cualquier intervalo de los mismos. Se contempla que la concentración del detergente pueda ser de hasta una cantidad en la que el detergente sigue siendo soluble en la solución.

En otras realizaciones de la invención, hay un tampón en las soluciones de la invención, incluyendo una solución de lisado. En realizaciones específicas, el tampón está a una concentración de aproximadamente, al menos aproximadamente, o a lo sumo aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500 mM o cualquier intervalo de los mismos en la solución o en la solución con la muestra. En ciertos casos, la concentración de tampón en la solución de lisado está entre aproximadamente 10 mM y 300 mM. Por otra parte, en otras realizaciones, el tampón es TrisCl, aunque se contempla que también se puedan emplear otros tampones.

Una solución de alcohol se añade, se mezcla con, o se incuba con el producto lisado en las realizaciones de la invención. Se contempla que una solución de alcohol contenga al menos un alcohol. La solución de alcohol puede tener aproximadamente, al menos aproximadamente, o a lo sumo aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100% de alcohol, o cualquier intervalo de los mismos. En realizaciones específicas, se añade a un producto lisado para hacer que el producto lisado tenga una concentración de alcohol aproximadamente, al menos aproximadamente, o a lo sumo aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90 mM o cualquier intervalo de los mismos. En realizaciones específicas, la cantidad de alcohol añadido a un producto lisado se traduce en una concentración de alcohol de aproximadamente 35% a aproximadamente 70%, o de aproximadamente 50% a aproximadamente 60%. En realizaciones específicas, la cantidad de solución de alcohol añadida al producto lisado proporciona una concentración de alcohol de 55%. Los alcoholes incluyen, pero no se limitan a, etanol, propanol, isopropanol, y metanol. Se contempla específicamente el etanol para su uso en aspectos de la invención. Adicionalmente se contempla que se pueda utilizar una solución de alcohol en otras etapas de los métodos de la invención para precipitar el ARN.

Se contempla que el pH de cualquier solución, o del componente tampón de cualquier solución, o de cualquier solución con la muestra se encuentre entre aproximadamente 4,5 y 10,5, aunque puede ser de aproximadamente, aproximadamente al menos, o aproximadamente a lo sumo de 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5 o cualquier intervalo de los mismos.

Otros métodos de la invención también incluyen la extracción de pequeñas moléculas de ARN del producto lisado con una solución de extracción que comprende un disolvente orgánico no alcohólico antes de la aplicación del producto lisado al soporte sólido. En realizaciones específicas, la solución de extracción contiene un disolvente orgánico no alcohólico tal como fenol y/o cloroformo. Se entiende que la solución de disolvente orgánico no alcohólico contiene al menos un disolvente orgánico no alcohólico, aunque también puede contener un alcohol. Las concentraciones descritas anteriormente con respecto a las soluciones de alcohol son aplicables a concentraciones de soluciones que tienen disolventes orgánicos no alcohólicos. En realizaciones específicas, se mezclan cantidades iguales de 1) el producto lisado y 2) fenol y/o cloroformo. En realizaciones específicas, la solución alcohólica se añade al producto lisado antes de la extracción con un disolvente orgánico no alcohólico.

En otras realizaciones, antes de aplicar el producto lisado a un soporte sólido, se añade una sal al producto lisado además de un alcohol. La sal puede ser cualquier sal, aunque en ciertas realizaciones, la sal es guanidinio o sodio, o una combinación de ambos. La cantidad de sal añadida a la mezcla de producto lisado (antes de la adición de un alcohol) puede hacer que la concentración de una o más sales en la mezcla sea de aproximadamente, al menos aproximadamente, o a lo sumo aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5 M o más o cualquier intervalo de los mismos. En ciertas realizaciones, se añade guanidinio al producto lisado para proporcionar una concentración de guanidinio entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 3 M. Por consiguiente, la cantidad de guanidinio añadida al producto lisado después de la homogeneización proporciona una concentración de guanidinio que es aproximadamente, al menos aproximadamente, o a lo sumo aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0 M, o cualquier intervalo obtenible de los mismos. En otras realizaciones, también se añade una sal de sodio tal como acetato de sodio o cloruro de sodio al producto lisado después de la homogeneización para proporcionar una concentración de esa sal que es de aproximadamente, al menos aproximadamente, o a lo sumo aproximadamente 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5 M o cualquier intervalo obtenible de los mismos.

La extracción de ARN del producto lisado incluye un soporte sólido, tal como un soporte mineral o polimérico. Un "soporte sólido" se refiere a una estructura física que contiene un material que se pone en contacto con el producto lisado y que no reacciona de manera irreversible con macromoléculas del producto lisado, concretamente con pequeñas moléculas de ARN. En realizaciones particulares, el soporte sólido se une a pequeñas moléculas de ARN; en casos adicionales, se une a pequeñas moléculas de ARN, pero no se une a uno o más tipos de macromoléculas en la muestra. El material del soporte sólido puede incluir un mineral o polímero, en cuyo caso el soporte es referido como "soporte mineral o polimérico". Los soportes minerales o poliméricos incluyen soportes que implican sílice. En

ciertas realizaciones, la sílice es vidrio. Los soportes incluyen, pero no se limitan a, esferas, columnas y filtros. En realizaciones adicionales, el soporte mineral o polimérico es un filtro o una columna de fibra de vidrio.

5 Alternativamente, en algunas realizaciones, el soporte mineral o polimérico puede incluir polímeros o no polímeros con grupos electronegativos. En ciertas realizaciones, el material es o tiene poliacrilato, poliestireno, látex, poliacrilonitrilo, poli(cloruro de vinilo), metacrilato, y/o metacrilato de metilo. Tales soportes se contemplan específicamente para su uso en la presente invención.

En algunos métodos de la invención, se aplica un producto lisado que puede haberse mezclado o no con una solución disolvente orgánica alcohólica o no alcohólica a un soporte sólido y el ARN se hace eluir del soporte.

10 Una vez que un producto lisado se aplica o se mezcla con un soporte sólido, el material se puede lavar con una solución. En ciertas realizaciones, un soporte mineral o polimérico se lava con una primera solución de lavado después de aplicar el producto lisado al soporte mineral o polimérico. En realizaciones adicionales, la solución de lavado comprende un agente caotrópico o reductor. El agente caotrópico es guanidinio en algunas soluciones de lavado. Una solución de lavado incluye alcohol en algunas realizaciones de la invención, y en algunos casos, tiene tanto alcohol como guanidinio. Adicionalmente se contempla que los métodos de la invención impliquen 1, 2, 3, 4, 5 o más lavados con una solución de lavado. La solución de lavado utilizada cuando está implicado más de un lavado puede ser igual o diferente. En ciertas realizaciones, las soluciones de lavado tienen los mismos componentes pero a diferentes concentraciones unas de otras. Generalmente se entiende que las moléculas que atraviesan el material en un ciclo de lavado se descartan.

20 En otros métodos de la invención, las moléculas de ARN deseadas se hacen eluir del soporte sólido. En ciertas realizaciones, las pequeñas moléculas de ARN se hacen eluir de un soporte sólido tal como un soporte mineral o polimérico a una temperatura de aproximadamente 60°C a aproximadamente 100°C. Se contempla que la temperatura a la cual las moléculas de ARN se hacen eluir es de aproximadamente o al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100°C o más, o cualquier intervalo de las mismas. Las moléculas se pueden hacer eluir con cualquier solución de elución. En ciertas realizaciones, la solución de elución es una solución iónica, esto es, incluye iones. En realizaciones particulares, la solución de elución incluye sal hasta 10 mM. Se contempla que puede ser sal de aproximadamente, al menos aproximadamente, o a lo sumo aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mM o más. En ciertas realizaciones, la sal consiste en una combinación de Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como catión y Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, etilendiaminotetraacetato, o citrato como anión.

30 Otras etapas del método incluyen hacer pasar las pequeñas moléculas de ARN a través de un GFF mientras se unen solamente los ARN más grandes. En ciertas realizaciones, las pequeñas moléculas de ARN que han pasado se capturan sobre un segundo GFF y a continuación se hacen eluir. El material que no es capturado sobre el segundo filtro GFF se descarta o no se utiliza en métodos adicionales de la invención.

35 Los métodos específicos se refieren al aislamiento de miARN o ARNip de una muestra mediante al menos las siguientes etapas: a) obtención de una muestra que tiene miARN o ARNip; b) adición de una solución de extracción a la muestra; c) adición de una solución alcohólica a la muestra extraída; d) aplicación de la muestra a un soporte mineral o polimérico; y, e) elución del ARN que contiene ARNip o miARN del soporte mineral o polimérico con una solución iónica. En realizaciones particulares, la muestra es un producto lisado celular. El producto lisado celular, en algunos casos, se produce añadiendo una solución de lisado que comprende un agente caotrópico o detergente a células que tienen miARN o ARNip. En ciertas realizaciones, se enriquece la muestra eluida con al menos aproximadamente 10 veces de miARN y/o ARNip en masa.

Los métodos adicionales para aislar moléculas de miARN de una muestra implican: a) añadir una solución alcohólica a la muestra; b) aplicar la muestra a un soporte sólido mineral o polimérico; c) hacer eluir moléculas de miARN del soporte con una solución iónica; y, d) utilizar o caracterizar las moléculas de miARN.

45 Otros métodos para aislar pequeñas moléculas de ARN de una muestra incluyen: a) lisar las células de la muestra con una solución de lisado que comprende guanidinio, en donde se produce un producto lisado con una concentración de guanidinio al menos aproximadamente 1 M; b) extraer pequeñas moléculas de ARN del producto lisado con una solución de extracción que comprende fenol; c) añadir al producto lisado una solución alcohólica para formar una mezcla de producto lisado/alcohol, en donde la concentración de alcohol de la mezcla está entre aproximadamente 35% y aproximadamente 70%; d) aplicar la mezcla de producto lisado/alcohol a un soporte sólido; 50 e) hacer eluir las pequeñas moléculas de ARN del soporte sólido con una solución iónica; f) capturar las pequeñas moléculas de ARN; y, g) utilizar las pequeñas moléculas de ARN aisladas.

Después de extraer el ARN, las moléculas de ARN individuales o específicas y/o las reservas de moléculas de ARN (así como la totalidad de la población de ARN aislado) se pueden someter a reacciones y/o ensayos adicionales. En algunos casos, estas reacciones y/o ensayos implican la amplificación del ARN o de una molécula de ADN generada a partir del ARN. Por ejemplo, se puede emplear la RT-PCR para generar moléculas que puedan ser caracterizadas.

55 En ciertas realizaciones, se puede cuantificar o caracterizar una molécula de ARN particular o una población de ARN. La cuantificación incluye cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica tales como los que implican una o más reacciones de amplificación o ensayos de protección frente a nucleasas, tales como los que

- utilizan ribonucleasa para discriminar entre las sondas que hibridan o no se hibridan a una diana de miARN específica, como la incorporada en el Kit de Detección de miARN mirVana de Ambion. Estos procedimientos incluyen PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (qRT-PCR). En ciertas realizaciones, se lleva a cabo la caracterización del ARN aislado. Las moléculas de ADnc se generan a partir del ARN extraído. Se contemplan otros ensayos de caracterización y cuantificación como parte de la invención. Los métodos y composiciones de la invención permiten cuantificar y caracterizar pequeñas moléculas de ARN. Las pequeñas moléculas de ARN también se pueden utilizar con matrices; para generar ADnc para su uso en matrices o como dianas a detectar por las matrices, después de haber sido marcadas por medio de etiquetas radiactivas, fluorescentes, o luminiscentes. Otros ensayos incluyen el uso de espectrofotometría, electroforesis, y secuenciación.
- 5 La presente invención también describe kits para el aislamiento de pequeñas moléculas de ARN, tales como miARN y/o ARNip de una muestra, concretamente una muestra celular. Por lo tanto, cualquiera de las composiciones comentadas anteriormente puede estar incluida en cualquier otra composición comentada anteriormente para su inclusión en un kit. En ciertas realizaciones, existen kits para el aislamiento de pequeñas moléculas de ARN que comprenden: a) fenol-cloroformo ácido; b) un tampón de lisis/unión, c) un aditivo de producto homogeneizado de ARN pequeño, d) una o más soluciones de lavado de ARN pequeño, y e) una solución de elución.
- 10 Un kit puede comprender a) un fenol-cloroformo ácido; b) un tampón de lisis/unión que comprende GuSCN 4 M, beta-mercaptoetanol 0,1 M, N-lauroil sarcosina al 0,5%, citrato de Na 25 mM, pH 7,2; c) un aditivo de producto homogeneizado de ARN pequeño que comprende acetato de sodio 2M, pH 4, para añadirlo en 0,1 volúmenes antes de la extracción con PC; d) una solución de lavado núm. 1 que comprende GuSCN 1,6 M en etanol al 70%; e) una solución de lavado núm. 2/3 que comprende etanol al 80%, NaCl 0,1 M, EDTA 4,5 mM, TrisHCl 10 mM, pH 7,5; f) una solución de elución que comprende EDTA 0,1 mM, pH 8; g) un tampón de carga de gel II; h) tubos de recogida; e i) cartuchos de filtro.
- 20 Los kits pueden incluir uno o más de los siguientes en un contenedor adecuado (compatible con las composiciones comentadas anteriormente): un tampón de lisis con un agente caotrópico; un filtro o columna de fibra de vidrio; tampón de elución; tampón de lavado; una solución alcohólica; y un inhibidor de ARNasa.
- 25 Los componentes de los kits se pueden envasar en un medio acuoso o en forma liofilizada. El medio contenedor de los kits incluirá generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa u otro medio contenedor, en el cual se puede colocar un componente, y preferiblemente, adecuadamente dividido en alícuotas. Cuando hay más de un componente en el kit (se pueden envasar juntos), el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro contenedor adicional en el que se pueden colocar por separado los componentes adicionales. Sin embargo, pueden estar comprendidas en un vial varias combinaciones de componentes. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener el ARN, y cualquier otro contenedor de reactivo en confinamiento cerrado para su comercialización. Tales contenedores pueden incluir contenedores de plástico moldeados por inyección o por soplado en los que se conservan los viales deseados. Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, siendo particularmente preferida una solución acuosa estéril.
- 30 Sin embargo, los componentes del kit se pueden proporcionar en forma de polvo seco. Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan en forma de polvo seco, el polvo puede ser reconstituido mediante la adición de un disolvente adecuado. Se contempla que el disolvente también pueda ser proporcionado en otro contenedor. El contenedor incluirá generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa y/u otro contenedor, en el que se colocan las formulaciones de ácido nucleico, preferiblemente, distribuidas apropiadamente. Los kits también pueden comprender un segundo medio contenedor para contener un tampón farmacéuticamente aceptable, estéril y/u otro diluyente.
- 35 Tales kits también pueden incluir componentes que conservan o mantienen el ARN o que lo protegen frente a su degradación. Tales componentes pueden estar libres de ARNasa o proteger frente a las ARNasas. Tales kits generalmente comprenderán, en medios adecuados, distintos contenedores para cada reactivo o solución individual.
- 40 Se contempla que cualquier realización comentada en la presente memoria pueda ser implementada con respecto a cualquier método o composición de la invención, y viceversa. Además, se pueden utilizar composiciones y kits para llevar a cabo los métodos de la invención.
- 45 El uso del término "o" en las reivindicaciones se emplea para representar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere a alternativas solamente o las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la descripción respalda una definición que se refiere solamente a alternativas e "y/o".
- 50 A lo largo de toda esta solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye una desviación típica de error para el dispositivo o método que se está empleando para determinar el valor.
- 55 Siguiendo la legislación sobre patentes vigente, las palabras "un", "una" y "uno", cuando se utilizan junto con la palabra "que comprende" en las reivindicaciones o la memoria descriptiva indican uno o más, a menos que se indique específicamente.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se debe entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican realizaciones específicas de la invención, se proporcionan a modo de ilustración solamente, ya que serán evidentes para los expertos en la técnica varios cambios y modificaciones dentro del espíritu y el alcance de la invención a partir de esta descripción detallada.

### Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar aún más ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede comprender mejor mediante la referencia a uno o más de estos dibujos combinada con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en la presente memoria.

FIG. 1. Comportamiento de unión de miARN de *let-7* en extractos brutos de cerebro, corazón, e hígado de ratón a diferentes concentraciones de etanol. Se añadió etanol absoluto a producto lisado bruto para crear las concentraciones finales de etanol indicadas.

FIG. 2. Comportamiento de unión de miARN de *let-7* en extractos de fenol-cloroformo de cerebro, corazón, e hígado de ratón a diferentes concentraciones de etanol. Se añadió etanol absoluto a productos lisados después de la extracción por medio de fenol-cloroformo (como en el procedimiento convencional) para crear las concentraciones finales de etanol indicadas.

FIG. 3. Comportamiento de unión de  $\beta$ -actina, GAPDH, PPI, U2, y *let-7* a concentraciones variables de etanol en presencia de GuSCN 2 M, con la concentración de etanol ajustada mediante la adición de un volumen igual de 2X una solución de etanol en agua.

FIG. 4. Comportamiento de unión de  $\beta$ -actina, GAPDH, PPI, U2, y *let-7* a concentraciones variables de etanol en presencia de GuSCN 2 M, con la concentración de etanol ajustada mediante la adición de etanol absoluto.

FIG. 5. Comportamiento de unión de  $\beta$ -actina, GAPDH, PPI, U2, y *let-7* a concentraciones variables de etanol en presencia de GuSCN 3 M, con la concentración de etanol ajustada mediante la adición de un volumen igual de 2X una solución de etanol en agua.

FIG. 6. Comportamiento de unión de  $\beta$ -actina, GAPDH, PPI, U2, y *let-7* a concentraciones variables de etanol en presencia de GuSCN 3 M, con la concentración de etanol ajustada mediante la adición de etanol absoluto.

FIG. 7. Enriquecimiento relativo de ARN de  $\beta$ -actina, GAPDH, U2, y *let-7*.

FIG. 8. Enriquecimiento relativo de ARN de U2 y *let-7*.

FIG. 9. Rendimiento del procedimiento actual comparado con la extracción con fenol-cloroformo y la precipitación con etanol convencionales.

FIG. 10. Comparación del rendimiento absoluto de tres ARN pequeños, *let-7* (22 nt), U43 (62 nt), y U2 (187 nt), utilizando el procedimiento actual (Ambion microRNA Isolation Kit = AMIK) frente a un sistema de fibra de vidrio disponible en la actualidad (RNeasy).

FIG. 11. Comparación del rendimiento de células cultivadas, con y sin pre-extracción. Se determinó el rendimiento tanto de U2 como de *let-7*.

FIG. 12. Efectos de diferentes concentraciones de NaOOCCH<sub>3</sub> a dos pH para la extracción con fenol-cloroformo antes de la inmovilización en vidrio sobre el rendimiento de U2, U43, y *let-7*.

### Descripción de realizaciones ilustrativas

#### I. Pequeñas moléculas de ARN

Las poblaciones naturales de ARN se aíslan rutinariamente a partir de tejido animal y vegetal así como de células desarrolladas en cultivo. No obstante, la mayor parte de estos procedimientos no se preocupan de la retención de pequeños ARN, en el intervalo de menos de 100 nucleótidos de longitud. De hecho, se sabe que los procedimientos de precipitación convencionales con alcohol son poco eficaces en la captura de ácidos nucleicos más pequeños de alrededor de 100 nucleótidos.

La presencia de pequeñas moléculas de ARN nucleótidos libres ha sido observada durante mucho tiempo en ARN extraído de muestras biológicas y se asume que reflejan los productos de rotura de ARN codificantes de proteínas y funcionales más grandes, incluyendo aquellos implicados en los complejos de la traducción y el procesamiento del ARN. En los últimos años, se ha descubierto que pequeños ARN implicados en la regulación de la expresión génica están presentes en virtualmente todos los organismos eucarióticos. En 1993, el laboratorio Ambrose publicó un informe sobre el descubrimiento del gen *let-7*, que da como resultado la des-sincronización en el desarrollo, o

heterocromía, en el nematodo *Caenorhabditis elegans* codificado por un ARN de 22 nt (Lee *et al.*, 1993.). Este pequeño ARN de hebra sencilla (denominado ahora microARN o miARN) afecta a la expresión de un conjunto de genes del desarrollo al inhibir su capacidad para funcionar en la traducción basada en la complementariedad de la secuencia parcial con el gen elegido como diana. Se encontró que la presencia de este pequeño ARN se conservaba en muchas especies evolutivamente divergentes (Pasquinelli *et al.*, 2000), incluyendo vertebrados, ascidias, hemicordados, moluscos, anélidos y artrópodos.

En 2001, varios grupos utilizaron un método de clonación novedoso para aislar e identificar una gran variedad de estos "micro ARN" (miARN) de *C. elegans*, *Drosophila*, y seres humanos (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lee y Ambros, 2001). Se han identificado varios cientos de miARN en plantas y animales.

Los miARN observados hasta la fecha tenían aproximadamente 21-22 nucleótidos de longitud y surgían de precursores más largos, que se transcribían a partir de genes que no codificaban proteínas. Véase la revisión de Carrington *et al.* (2003). Los precursores forman estructuras que se pliegan unas sobre otras en regiones de auto-complementariedad; a continuación son procesadas por la nucleasa Dicer en animales o DCL1 en plantas. Las moléculas de miARN interrumpen la traducción a través del emparejamiento de bases impreciso con sus dianas.

Los micro ARN no son los únicos ARN de ese tamaño encontrados en células eucarióticas. Se encontró que una ruta para la degradación de ARNm en la célula crea pequeños ARN de doble hebra (Fire *et al.*, 1998; Zamore *et al.*, 2000; muchos otros, revisados en Timmons, 2002). Este procedimiento, denominado interferencia de ARN, utiliza estos "ARN de interferencia pequeños" (ARNip) para elegir como diana sus sitios de degradación, normalmente a partir de un intermedio de doble hebra mucho más grande. Aunque la función natural de este sistema no es conocida, se piensa que está implicado en la respuesta a agentes infecciosos. Se ha encontrado que las plantas tienen un sistema similar, que también utiliza microARN en el silenciamiento génico post-transcripcional (Hamilton y Baulcombe, 1999; Tang *et al.*, 2003).

## II. Aislamiento de Moléculas cortas de ARN

Los métodos de la invención implican una o más etapas para aislar eficazmente y/o enriquecer moléculas cortas de ARN. Estas etapas incluyen o implican lo siguiente: lisado de células y/o creación de un producto lisado celular;

### A. Creación de productos lisados celulares

Se contempla que la presente invención pueda ser utilizada para facilitar la preparación de pequeñas moléculas de ARN a partir de muestras biológicas para la evaluación y posterior uso. En algunas realizaciones de la invención, la preparación de muestras implica la homogeneización de la muestra o la preparación de un producto lisado celular a partir de la muestra. En realizaciones de la invención, la homogeneización o el lisado de una célula se completa utilizando una solución que contiene una sal de guanidinio, detergente, tensioactivo, u otro desnaturizante. Los términos homogeneización y lisado se utilizan indistintamente.

Las sales de guanidinio son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen hidrocloreuro de guanidinio e isotiocianato de guanidinio. En ciertas realizaciones, pueden estar presentes a una concentración de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 M. Adicionalmente, una solución de homogeneización puede contener urea u otros desnaturizantes tales como NaI.

En realizaciones de la invención, se incluye un tampón en la solución de lisis u homogeneización. En ciertos casos, el tampón es TrisCl.

Una muestra biológica se puede homogeneizar o fraccionar en presencia de un detergente o tensioactivo. El detergente puede actuar solubilizando la muestra. Los detergentes pueden ser iónicos o no iónicos. Los ejemplos de detergentes no iónicos incluyen tritón, tal como la serie Tritón X (Tritón X-100, Tritón X-100R, Tritón X-114, Tritón X-450, Tritón X-450R), octil glucósido, polioxietileno(9)dodecil éter, digitonina, IGEPAL CA630, n-octil-beta-D-glucopiranosido (betaOG), n-dodecil-beta, C12EO7, Tween 20, Tween 80, polidocanol, n-dodecil beta-D-maltósido (DDM), NP-40, C12E8 (n-dodecil monoéter de octaetilen glicol), mono-n-tetradecil éter de hexaetilenglicol (C14EO6), octil-beta-tioglucopiranosido (octil tioglucoósido, OTG), Emulgen, y polioxietileno 10 lauril éter (C12E10). Los ejemplos de detergentes iónicos (aniónicos o catiónicos) incluyen desoxicolato, dodecilsulfato de sodio (SDS), N-lauroilsarcosina, y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). También se puede utilizar un reactivo zwitteriónico en los esquemas de purificación de la presente invención, tal como Chaps, zwitterión 3-14, y 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato. También se contempla que se pueda añadir urea con o sin otro detergente o tensioactivo.

Las soluciones de lisis u homogeneización pueden contener adicionalmente otros agentes tales como agentes reductores. Los ejemplos de tales agentes reductores incluyen ditiotreitól (DTT),  $\beta$ -mercaptoetanol, DTE, GSH, cisteína, cisteamina, tricarbóxiel fosfina (TCEP), o sales de ácido sulfuroso.

En algunas realizaciones de la invención, una solución de lisis incluye: tiocianato de guanidinio, N-lauroil sarcosina, y TrisHCl. Una vez que la muestra ha sido homogeneizada en esta solución, se puede extraer el ARN, a menudo con soluciones de fenol o mediante el uso de una fase sólida adsorptiva. Los métodos alternativos utilizan una

combinación de desnaturizante/soluciones de fenol para realizar la homogenización inicial, evitando la necesidad de una extracción secundaria. Los ejemplos de estos reactivos serían Trizol™ (Invitrogen) o RNAwiz™ (Ambion, Inc.).

5 Después de la exposición a una solución de homogeneización, las muestras se pueden homogeneizar adicionalmente mediante medios químicos. Se pueden emplear mezcladores mecánicos, homogeneizadores de rotor y estator, u homogeneizadores de tipo cizalla.

Alternativamente, el tejido se podría homogeneizar en la solución de lisis, y el tejido permanecería separado por sedimentación, centrifugación, o filtración. Estos remanentes se podrían tratar a continuación con una solución de homogeneización y condiciones de extracción como las descritas anteriormente.

10 Los métodos pueden incluir adicionalmente etapas que impliquen la eliminación de lípidos o composiciones de los mismos con detergentes o tensioactivos. Un lípido puede ser de origen natural o sintético (es decir, diseñado o producido por el hombre). Sin embargo, el lípido es normalmente una sustancia biológica. Los lípidos biológicos son bien conocidos en la técnica, e incluyen por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glicoesfingolípidos, glucolípidos, sulfátidos, lípidos con éter y ácidos grasos unidos a ésteres y  
15 lípidos polimerizables, y combinaciones de los mismos. La eliminación de un lípido tal como un fosfolípido se describe en la presente memoria.

Se pueden utilizar detergentes para facilitar la homogeneización o la creación de un producto lisado celular. Estos detergentes incluyen específicamente Tritón X-100 y CHAPS. CHAPS es el detergente zwitteriónico 3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amonio]-1-propanosulfonato.

20 Otros protocolos relevantes, incluyendo las realizaciones de extracción, se pueden encontrar en la Solicitud de Patente de Estados Unidos titulada, "METHODS AND COMPOSITIONS FOR PREPARING RNA FROM A FIXED SAMPLE," presentada a nombre de Richard Cnrad y Emily Zeringer el mismo día que la presente solicitud. Se contempla específicamente que la presente invención se pueda utilizar para preparar pequeñas moléculas de ARN a partir de una muestra fijada.

25 B. Extracción de pequeñas moléculas de ARN

Después de lisar u homogeneizar una muestra de células, se pueden implementar otros procedimientos para extraer específicamente moléculas de ARN. Se contempla que si la muestra implica células, la etapa de lisado u homogeneización se puede considerar parte de un procedimiento de extracción global, sin embargo, la extracción de ARN específicamente puede ser referida, y se entenderá como la separación de moléculas de ARN de otras  
30 biomoléculas tales como lípidos y proteínas. La extracción de moléculas de ARN de estas otras estructuras puede implicar soluciones de extracción que contienen uno o más disolventes orgánicos. En algunos casos, el disolvente orgánico es un disolvente orgánico no alcohólico tal como fenol y/o cloroformo. En otros, una solución contiene un alcohol, que puede ser cualquier alcohol utilizado para la extracción de ácidos nucleicos, pero en ciertas realizaciones, el alcohol es etanol.

35 Se pueden extraer moléculas de ARN de una variedad de muestras de células. Tales muestras de células pueden comprender células del cerebro, la cabeza, el cuello, el tracto gastrointestinal, el pulmón, el hígado, el páncreas, la mama, el testículo, el útero, la vejiga, el riñón, la próstata, el colon, el riñón, la piel, el ovario, y el corazón, pero no se limitan a tales células.

40 El término "ácido nucleico" es bien conocido en la técnica. Un "ácido nucleico" según se emplea en la presente memoria se referirá generalmente a una molécula (es decir, una hebra) de ADN, ARN o un derivado o análogo de los mismos, que comprende una nucleobase. Una nucleobase incluye, por ejemplo, una base de purina o pirimidina de origen natural encontrada en el ADN (p. ej., una adenina "A," una guanina "G," una timina "T" o una citosina "C") o ARN (p. ej., una A, una G, un uracilo "U" o una C). El término "ácido nucleico" o "molécula de ARN" incluye los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido," cada uno como un subgénero del término "ácido nucleico".

45 Un "complemento" de ácido nucleico es "complementario" a otro ácido nucleico cuando es capaz de emparejar sus bases con otro ácido nucleico de acuerdo con las normas de complementariedad de la unión de Watson-Crick convencionales, Hoogsteen o Hoogsteen inversa. Como se emplea en la presente memoria "otro ácido nucleico" puede hacer referencia a una molécula separada o una secuencia separada espacialmente de la misma molécula.

50 Como se emplea en la presente memoria, el término "complementariedad" o "complemento" también se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleobases consecutivas o nucleobases semi-consecutivas (p. ej., una o más radicales de nucleobases no están presentes en la molécula) capaz de hibridar con otra hebra o dúplex de ácido nucleico incluso si no todas las nucleobases no se emparejan por bases con una nucleobase contraparte. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico "complementario" comprende una secuencia en la que aproximadamente  
55 70%, aproximadamente 71%, aproximadamente 72%, aproximadamente 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente

87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, a aproximadamente 100%, y cualquier intervalo derivable de los mismos, de la secuencia de nucleobases es susceptible del emparejamiento de bases con una molécula de ácido nucleico de hebra sencilla o de doble hebra durante la hibridación. En ciertas realizaciones, el término "complementario" se refiere a un ácido nucleico que puede hibridar con otra hebra o dúplex de ácido nucleico en condiciones rigurosas, como entenderá un experto en la técnica.

En ciertas realizaciones, un ácido nucleico "parcialmente complementario" comprende una secuencia que puede hibridar en condiciones de baja rigurosidad con un ácido nucleico de hebra sencilla o de doble hebra, o contiene una secuencia en la que menos de aproximadamente 70% de la secuencia de nucleobases es susceptible de emparejamiento de bases con una molécula de ácido nucleico de hebra sencilla o de doble hebra durante la hibridación.

Estas definiciones se refieren en general a una molécula de hebra sencilla, pero en realizaciones específicas también abarcarán una hebra adicional que sea parcialmente, sustancialmente, o totalmente complementaria a la molécula de hebra sencilla. Por lo tanto, un ácido nucleico puede abarcar una molécula de doble hebra o una molécula de triple hebra que comprenda una o más hebras complementarias o "complementos" de una secuencia concreta que comprenda una molécula. Como se emplea en la presente memoria, un ácido nucleico de hebra sencilla puede ser indicado por el prefijo "hs", un ácido nucleico de doble hebra por el prefijo "dh," y un ácido nucleico de triple hebra por el prefijo "th".

#### C. Soporte sólido y dispositivos

Un soporte sólido es una estructura que contiene material que se unirá de manera reversible con los ácidos nucleicos, concretamente pequeñas moléculas de ARN, y en algunas realizaciones, no se unirá a uno o más tipos distintos de macromoléculas en la muestra. El material puede comprender plástico, vidrio, sílice, un imán, un metal tal como oro, carbono, celulosa, látex, poliestireno, y otros polímeros sintéticos, nailon, celulosa, nitrocelulosa, poliacrilato, poliacrilonitrilo, metacrilato, y/o metacrilato de metilo, poli(metacrilato), poli(cloruro de vinilo), estireno-divinilbenceno, o cualquier plástico químicamente modificado. También pueden ser materiales porosos o no porosos. La estructura también puede ser una partícula de cualquier forma que permita que las pequeñas moléculas de ARN sean aisladas, agotadas, o separadas. En ciertas realizaciones, es una columna que incluye cualquiera de los materiales descritos más arriba a través de la cual puede pasar un producto lisado.

Otros componentes incluyen aparatos de aislamiento tales como dispositivos de filtración, incluyendo filtros giratorios o columnas giratorias. Puede ser una esfera, tal como una cuenta, o una varilla, o estructura de forma plana, tal como una placa con pocillos. La estructura y la muestra que contiene las moléculas de ARN deseadas se pueden centrifugar, filtrar, someter a diálisis, y/o aislar de otro modo. Cuando la estructura se centrifuga se puede sedimentar o hacer pasar a través de un aparato de filtro centrifugable.

La estructura también se puede someter a una etapa de captura adicional. En ciertas realizaciones, la muestra se filtra con posterioridad tras el paso por una estructura de captura. La etapa de captura puede incluir filtración utilizando un sistema accionado por presión o un sistema accionado por gravedad (por ejemplo, centrifugación). Muchas de tales estructuras se encuentran disponibles en el mercado y se pueden utilizar en la presente. Se pueden encontrar otros ejemplos en los documentos WO 86/05815, WO90/06045, Patente de Estados Unidos 5.945.525.

#### II. Caracterización y cuantificación de pequeñas moléculas de ARN aisladas

Las pequeñas moléculas de ARN obtenidas de las muestras se pueden analizar o cuantificar mediante diversos métodos para caracterizarlas, cuantificarlas, o utilizarlas para el análisis de otras muestras biológicas. Se proporcionan en la presente memoria métodos de cuantificación o análisis de ARN, o manipulación del ARN para su uso en ensayos que implican otro material biológico. Los métodos generales para cuantificar o analizar ARN se pueden encontrar en Sambrook *et al.* (2001) o Maniatis *et al.* (1990). Más abajo se proporcionan ejemplos de utilización de las pequeñas moléculas de ARN de las muestras, sin embargo, no se pretende que estos ejemplos sean limitantes.

##### A. Ensayos de protección de nucleasa

Los ensayos de protección de nucleasa (NPA), incluyendo tanto ensayos de protección de ribonucleasa (RPA) como ensayos de nucleasa S1, son un método extremadamente sensible para la detección, cuantificación o mapeo de ARN específicos en una mezcla compleja de ARN celular total. La base de los NPA es una hibridación en solución de una o varias sondas antisentido de tamaño discreto, de hebra sencilla a una muestra de ARN. La hibridación en solución de pequeño volumen es bastante más eficaz que la hibridación basada en membranas más común, y puede acomodar hasta 100 µg de ARN total o poli(A). Después de la hibridación, cualquier sonda no hibridada y muestra de ARN restantes se eliminan por digestión con una mezcla de nucleasas. A continuación, en una reacción de una sola etapa, las nucleasas se inactivan y los híbridos de sonda:diana restantes se precipitan. Estos productos se separan sobre un gel de poliacrilamida desnaturalizante y se visualizan mediante autorradiografía. Si se utilizan

sondas no isotópicas, las muestras se visualizan transfiriendo el gel a una membrana y llevando a cabo una detección secundaria.

5 Tales mecanismos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los kits comerciales para tales ensayos son fácilmente obtenibles, tales como Direct Protect™ Lysate RPA Kit, HybSpeed™ RPA Kit, y RPA II y RPA III™ Ribonuclease Protection Assay Kits de Ambion.

#### B. Electroforesis en gel de agarosa desnaturalizante

10 Las pequeñas moléculas de ARN aisladas de una muestra se pueden cuantificar mediante electroforesis en gel utilizando un sistema de gel desnaturalizante. Los geles de acrilamida son la matriz preferida para las separaciones de este tamaño, aunque también se pueden utilizar concentraciones elevadas (~4%+) de agarosa modificada tal como NuSieve (FMC, 191 Thomaston St., Rockland, ME 04841). Se debe incluir un control positivo sobre el gel de manera que cualquier resultado inusual se pueda atribuir a un problema con el gel o un problema con el ARN bajo análisis. Para este propósito se pueden utilizar marcadores de peso molecular de ARN, una muestra de ARN que se sabe que está intacta, o ambas. También es una buena idea incluir una muestra del ARN de partida que se utilizó en el procedimiento de enriquecimiento. La presencia de pequeños ARN específicos se puede determinar transfiriendo los contenidos de estos geles a membranas de hibridación y sondeando con sondas oligonucleotídicas radiactivas (basadas en ARN o ADN).

#### C. Evaluación del rendimiento de ARN mediante absorbancia de UV

20 La concentración y la pureza del ARN se pueden determinar diluyendo una alícuota de la preparación (normalmente una dilución 1:50 a 1:100) en TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) o agua, y leyendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 260 nm y 280 nm.

Una  $A_{260}$  de 1 es equivalente a 40  $\mu\text{g}$  de ARN/ml. La concentración ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de ARN se calcula por lo tanto multiplicando la  $A_{260}$  X un factor de dilución X 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . El siguiente es un ejemplo típico:

25 El rendimiento típico de 10  $\mu\text{g}$  de ARN total es de 3 - 5  $\mu\text{g}$ . Si la muestra se resuspende en 25  $\mu\text{l}$ , esto significa que la concentración variará entre 120  $\text{ng}/\mu\text{l}$  y 200  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Un  $\mu\text{l}$  de la preparación se diluye 1:50 en 49  $\mu\text{l}$  de TE. La  $A_{260} = 0,1$ . La concentración de ARN =  $0,1 \times 50 \times 40 \mu\text{g}/\text{ml} = 200 \mu\text{g}/\text{ml}$  o 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Puesto que quedan 24  $\mu\text{l}$  de la preparación después de utilizar 1  $\mu\text{l}$  para medir la concentración, la cantidad total de ARN restante es de 24  $\mu\text{l}$  X 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l} = 4,8 \mu\text{g}$ .

#### D. Otros usos de las pequeñas moléculas de ARN de las muestras

30 Las pequeñas moléculas de ARN obtenidas de una muestra se pueden analizar mediante o utilizar en la tecnología de micromatrices. Por ejemplo las matrices tales como las matrices de genes son soportes sólidos sobre los que se ha aplicado una colección de sondas específicas de genes en localizaciones definidas. Las sondas localizan dianas marcadas complementarias de una muestra de ácido nucleico, tal como una muestra de ARN, población vía hibridación. Uno de los usos más comunes para las matrices de genes es la comparación de los patrones de expresión global de una población de ARN. Típicamente, se puede utilizar el ARN aislado de dos o más muestras de tejido. Los ARN se someten a transcripción inversa utilizando nucleótidos marcados y cebadores específicos de la diana, oligodT, o de secuencia al azar para crear poblaciones de ADNc marcadas. Los ADNc se desnaturalizan a partir del ARN molde e hibridan con matrices idénticas. La señal hibridada en cada matriz se detecta y se cuantifica. La señal que se emite desde cada aplicación específica del gen se compara entre las poblaciones. Los genes expresados a diferentes niveles en las muestras generan diferentes cantidades de ADNc marcado y esto da como resultado aplicaciones sobre la matriz con diferentes cantidades de señal.

40 La conversión directa de poblaciones de ARN en ADNc marcados es ampliamente utilizada porque es simple y en gran medida no resulta afectada por la preferencia enzimática. No obstante, el marcaje directo requiere grandes cantidades de ARN para crear suficiente producto marcado para la detección de dianas moderadamente raras por medio de análisis de matrices. La mayor parte de los protocolos de matrices recomiendan utilizar 2,5 g de poliA o 50 g de ARN total para la transcripción inversa (Duggan, 1999). Para los profesionales incapaces de aislar tanto ARN de sus muestras, se han utilizado procedimientos de amplificación global.

50 El más frecuentemente citado de estos esquemas de amplificación global es la amplificación de ARN antisentido (aARN) (Patentes de Estados Unidos 5.514.545 y 5.545.522). La amplificación de ARN antisentido implica la transcripción inversa de muestras de ARN con un cebador oligo-dT que tiene un promotor de la transcripción tal como la secuencia promotora consenso de la ARN polimerasa de T7 en su extremo 5'. La transcripción inversa de la primera hebra crea ADNc de hebra sencilla. Después de la síntesis de ADNc de la primera hebra, el ARN molde que ha hibridado con el ADNc es parcialmente degradado creando cebadores de ARN. A continuación los cebadores de ARN se extienden para crear ADN de doble hebra que poseen promotores de transcripción. La población se transcribe con una ARN polimerasa apropiada para crear una población de ARN que posee la secuencia del ADNc. Debido a que la transcripción produce de decenas a miles de ARN que se crean a partir de cada molde de ADN, se puede lograr una amplificación sustancial. Los ARN pueden ser marcados durante la transcripción y utilizados directamente para el análisis de matrices, o el aARN no marcado puede ser sometido a transcripción inversa con

dNTP marcados para crear una población de ADNc para la hibridación de la matriz. En cualquier caso, la detección y el análisis de las dianas marcadas son bien conocidos en la técnica. Otros métodos de amplificación que se pueden emplear incluyen, pero no se limitan a, la reacción en cadena de la polimerasa (referida como PCR™; véanse las Patentes de Estados Unidos 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159, e Innis *et al.*, 1988); y la reacción en cadena de la ligasa ("LCR"), descrita en la Solicitud Europea Núm. 320 308, Patente de Estados Unidos 4.883.750, 5.912.148. La replicasa Qbeta, descrita en la Solicitud PCT Núm. PCT/US87/00880, también puede ser utilizada como método de amplificación. Los métodos alternativos para la amplificación de un ácido nucleico tal como ARN se describen en las Patentes de Estados Unidos 5.843.650, 5.846.709, 5.846.783, 5.849.546, 5.849.497, 5.849.547, 5.858.652, 5.866.366, 5.916.776, 5.922.574, 5.928.905, 5.928.906, 5.932.451, 5.935.825, 5.939.291, 5.916.779 y 5.942.391, la Solicitud GB Núm. 2 202 328, y en la Solicitud PCT Núm. PCT/US89/01025, Solicitud PCT WO 89/06700, Solicitud PCT WO 88/10315, Solicitud Europea Núm. 329 822, Kwoh *et al.*, 1989; Frohman, 1994; Ohara *et al.*, 1989; y Walker *et al.*, 1992.

También se pueden construir bibliotecas de ADNc y utilizarlas para analizar el ARN extraído de una muestra. La construcción de tales bibliotecas y el análisis de ARN utilizando tales bibliotecas se pueden encontrar en Sambrook *et al.* (2001); Maniatis *et al.*, 1990; Efstratiadis *et al.*, 1976; Efstratiadis *et al.*, 1976; Maniatis *et al.*, (1976); Land *et al.*, (1981); Okayama *et al.*, (1982); Gubler *et al.*, (1983); Ko (1990); Patanjali *et al.*, (1991); Solicitud de Patente de Estados Unidos 20030104468.

Los presentes métodos y kits se pueden emplear para el escrutinio de volumen elevado. Se puede crear una biblioteca de ARN o ADN utilizando los métodos y composiciones de la invención. Esta biblioteca se puede utilizar a continuación en ensayos de alto rendimiento, incluyendo micromatrices. Los autores de la presente invención contemplan específicamente tecnologías de ácidos nucleicos basadas en chips tales como las descritas por Hacia *et al.* (1996) y Shoemaker *et al.* (1996). Brevemente, estas técnicas implican métodos cuantitativos para analizar un gran número de genes de manera rápida y exacta. Al utilizar matrices de sondas fijadas, se puede emplear la tecnología de chips para segregar moléculas diana como matrices de alta densidad y escribir estas moléculas basándose en la hibridación (véanse también, Pease *et al.*, 1994; y Fodor *et al.*, 1991. El término "matriz" como se emplea en la presente memoria hace referencia a una disposición sistemática de ácido nucleico. Por ejemplo, una población de ácido nucleico que es representativa de una fuente deseada (p. ej., cerebro adulto humano) se divide en el número mínimo de reservas en las cuales se puede utilizar un procedimiento de escrutinio deseado para detectar o agotar un gen diana y que pueden ser distribuidas en una única placa de múltiples pocillos. Las matrices pueden ser de una suspensión acuosa de una población de ácido nucleico obtenible de una fuente de ARNm deseada, que comprende: una placa de múltiples pocillos que contiene una pluralidad de pocillos individuales, conteniendo cada pocillo individual una suspensión acuosa de un contenido diferente de una población de ácido nucleico. Los ejemplos de las matrices, sus usos, y la implementación de los mismos se pueden encontrar en las Patentes de Estados Unidos Núm. 6.329.209, 6.329.140, 6.324.479, 6.322.971, 6.316.193, 6.309.823, 5.412.087, 5.445.934, y 5.744.305.

Las micromatrices son conocidas en la técnica y consisten en una superficie a la cual se pueden hibridar o unir específicamente sondas cuya secuencia corresponde a productos génicos (p. ej., ADNc, ARNm, ARNc, polipéptidos, y fragmentos de los mismos en una posición conocida. En una realización, la micromatriz es una matriz (es decir, una matriz bidimensional) en la que cada posición representa un sitio de unión discreto para un producto codificado por un gen (p. ej., una proteína o ARN), y en la que se encuentran presentes sitios de unión para productos de la mayor parte o casi todos los genes del genoma del organismo. En una realización preferida, el "sitio de unión" (en adelante, el "sitio") es un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico con el cual puede hibridar específicamente una ADNc cognado concreto. El ácido nucleico o análogo del sitio de unión puede ser, p. ej., un oligómero sintético, un ADNc completo, un ADNc menos que completo, o un fragmento génico.

El ácido nucleico o análogo están anclados a un soporte sólido, que puede estar fabricado de vidrio, plástico (p. ej., polipropileno, nailon), poliacrilamida, nitrocelulosa, u otros materiales. Un método preferido para el anclaje de ácidos nucleicos a una superficie es mediante impresión sobre placas de vidrio, como se describen en general Schena *et al.*, 1995a. Véase también DeRisi *et al.*, 1996; Shalon *et al.*, 1996. También se pueden utilizar otros métodos para elaborar micromatrices, p. ej., mediante enmascaramiento (Maskos *et al.*, 1992). Principalmente, se podría utilizar cualquier tipo de matriz, por ejemplo, transferencias puntuales sobre una membrana de hibridación de nailon (véase Sambrook *et al.*, 2001, que se incorpora en su totalidad a todos los fines), aunque, como reconocerán los expertos en la técnica, se preferirán matrices muy pequeñas debido a que los volúmenes de hibridación serán más pequeños.

Asimismo se contempla el uso de un biochip, que implica la hibridación de una molécula marcada o reserva de moléculas con las dianas inmovilizadas sobre el biochip.

### III. Kits

Adicionalmente se proporciona un kit para el aislamiento de pequeñas moléculas de ARN, tales como miARN y ARNip de una muestra, concretamente una muestra de células. Cualquiera de las composiciones descritas en la presente memoria puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitante, se pueden incluir en un kit reactivos para lisar las células, extraer el ARN del producto lisado, y/o analizar o cuantificar el ARN obtenido. Por lo tanto, los kits comprenderán, en un medio contenedor adecuado, cualquiera de los reactivos descritos en la presente

memoria. También se pueden incluir uno o más tampones o soluciones, tales como tampón de lisis, tampón de extracción, soluciones para añadir un alcohol, solución de elución, solución de lavado y otros componentes para el aislamiento del ARN deseado, tal como una estructura de captura. En ciertas realizaciones, existen kits para el aislamiento de pequeñas moléculas de ARN que comprenden: a) Fenol-cloroformo ácido; b) Tampón de lisis/unión (basado en GuSCN); c) Aditivo de producto homogeneizado de miARN (Acetato de sodio 2M, pH 4, para añadirlo en 0,1 volúmenes antes de la extracción con PC); d) Solución de lavado de miARN núm. 1 (GuSCN 1,6 M en etanol al 70%); e) Solución de lavado núm. 2/3 (etanol al 80%, NaCl 0,1 M, EDTA 4,5 mM, TrisHCl 10 mM, pH 7,5); f) Solución de elución (EDTA 0,1 mM, pH 8); g) Tampón de carga de gel II; h) Tubos de recogida; i) Cartuchos de filtro.

Los componentes de los kits se pueden envasar en un medio acuoso o en forma liofilizada. El contenedor de los kits generalmente incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa, u otros contenedores, en los que se puede colocar un componente, y preferiblemente, adecuadamente dividido en alícuotas. Cuando hay más de un componente en el kit (se pueden envasar juntos), el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro contenedor adicional en el que se pueden colocar por separado los componentes adicionales. Sin embargo, pueden estar comprendidas en un vial varias combinaciones de componentes. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener el ARN, y cualquier otro contenedor de reactivo en confinamiento cerrado para su comercialización. Tales contenedores pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o por soplado en los que se conservan los viales deseados. Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, siendo particularmente preferida una solución acuosa estéril.

Sin embargo, los componentes del kit se pueden proporcionar en forma de uno o varios polvos secos. Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan en forma de polvo seco, el polvo puede ser reconstituido mediante la adición de un disolvente adecuado. Se contempla que el disolvente también pueda ser proporcionado en otro contenedor. El contenedor incluirá generalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa y/u otro contenedor, en el que se colocan las formulaciones de ácido nucleico, preferiblemente, distribuidas apropiadamente. Los kits también pueden comprender un segundo contenedor para que contenga un tampón farmacéuticamente aceptable estéril y/u otro diluyente.

Tales kits también pueden incluir componentes que conservan o mantienen el ARN o que lo protegen frente a su degradación. Tales componentes pueden estar libres de ARNasa o proteger frente a las ARNasas. Tales kits generalmente comprenderán, en medios adecuados, distintos contenedores para cada reactivo o solución individual.

Un kit también incluirá instrucciones para emplear los componentes del kit así como el uso de cualquier otro reactivo no incluido en el kit. Las instrucciones pueden incluir variaciones que se pueden implementar.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que los mecanismos descritos en los siguientes ejemplos representan los mecanismos descubiertos por el autor de la presente invención que funcionan bien en la práctica de la invención, y por lo tanto se puede considerar que constituyen los métodos preferidos para su puesta en práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deben apreciar, a la luz de la presente descripción, que se pueden llevar a cabo muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y todavía obtener un resultado parecido o similar.

Ejemplo 1:

Preparación de producto lisado celular y aislamiento de ARN

El siguiente procedimiento proporciona la base para la invención y es referido en los Ejemplos como Procedimiento con Kit de Aislamiento de miARN de Ambion (AMIK).

Se trituró tejido congelado en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se añadió tampón de lisis (GuSCN 4 M; beta-mercaptoetanol 0,1 M; N-lauroil sarcosina al 0,5%; citrato de sodio 25 mM, pH 7,2) a este polvo en un recipiente adecuado a una proporción de 1 ml por cada gramo de polvo de tejido. Esto se homogeneizó utilizando medios mecánicos para crear un producto lisado de tejido finamente disperso. Se añadió una décima parte del volumen de una solución de acetato de Na 2 M (pH 4,0) y se mezcló cuidadosamente, añadiendo 0,1 ml por cada ml. El producto lisado se procesó a continuación inmediatamente (sin extracción orgánica) o se colocó sobre hielo para procesarlo en 15 minutos.

El procesamiento implicó la adición de un volumen igual de Fenol-cloroformo ácido (5:1, equilibrado con solución acuosa a pH 4,5) a la suspensión, seguido de agitación vigorosa (sometiendo a agitación vorticial o movimiento de vaivén) durante 30-60 seg. Las fases de fenol-cloroformo y acuosas se separaron a continuación mediante centrifugación a 16.000 xG durante 5 min, o hasta que se obtuvo una interfase clara. La fase acuosa se eliminó mediante aspiración, evitando la retirada de cualquiera de las interfases entre fases. Esta fase acuosa, que contenía el ARN de la muestra, se llevó a una concentración de etanol al 55% mediante la adición de 1,22 volúmenes de etanol.

Inmediatamente después del mezclado, la muestra se aplicó directamente a una columna de fibra de vidrio, como la utilizada en el kit RNAqueous kit® (Ambion). La muestra se hizo pasar a través del filtro mediante centrifugación a ~12.000 xG durante 1 min, a continuación el filtro se lavó mediante el paso sucesivo de tres soluciones de lavado a través de él. El tubo de recogida se vació entre cada lavado, y cada lavado se hizo pasar completamente a través del filtro a ~12.000 xG durante 1 min o más, si fuera necesario para que pasara todo el fluido. El primer lavado fue con 0,5 ml de isotiocianato de guanidinio 1,6 M (GuSCN) / etanol al 70%, los dos últimos con alcohol al 80% / NaCl 0,1 M / EDTA 4,5 mM / TrisHCl 10 mM, pH 7,5. Después de haber hecho pasar el último lavado a través del filtro, el filtro se volvió a centrifugar sobre un tubo de recogida vacío para eliminar todos los rastros de etanol.

A continuación la muestra se hizo eluir del filtro con 100  $\mu$ l de EDTA 0,1 mM, pH 8,0, que se aplicó directamente al filtro a temperatura ambiente y se centrifugó pasando a un tubo de recogida nuevo. Las FIG. 1 y FIG. 2 muestran las diferencias entre preparaciones de tres tejidos diferentes, corazón, cerebro, e hígado, sin y con la etapa de extracción previa. Se puede observar que, en ciertas circunstancias, se captura una porción sustancial del miARN de let-7 con etanol al 55%.

Ejemplo 2:

#### 15 Detección de miARN a través de Transferencia Northern

Para cada muestra de ARN, se combinaron 5  $\mu$ l con 5  $\mu$ l de Gel Loading Dye II (Ambion). Antes de cargar sobre el gel de acrilamida desnaturante, estas muestras se calentaron a 95°C durante 2-5 minutos. El gel convencional fue acrilamida al 15% (razón de monómero:bis de 19:1), urea 7 M, tamponada con TBE (Tris-Borato-EDTA, Peacock y Dingman, 1967). El gel se hizo correr previamente de manera rutinaria a 300-450 V durante 30 minutos antes de cargar las muestras en tampón de muestra, que también contenía colorantes de seguimiento azul de bromofenol y xileno-cianol. La electroforesis se llevó a cabo a 300-450 V durante 45-60 min, o hasta que el colorante de rastreo azul de bromofenol estuvo en el cuadrante inferior del gel.

Después de la electroforesis, se desensambló el aparato del gel y el gel se sometió a electrotransferencia a una membrana de Nailon BrightStar-Plus (Ambion). Este procedimiento se puede llevar a cabo en un aparato semi-seco utilizando una pila de tres hojas de papel de filtro Whatman (3MM) empapado con 0,25 x TBE por encima y por debajo del sándwich de gel a 200-400 mA durante al menos 0,2 A-hr. La prolongación de este tiempo no echa a perder la muestra. Después de la transferencia, la membrana se mantuvo húmeda y se sometió a entrecruzamiento con UV utilizando un dispositivo de entrecruzamiento comercial (Stratalinker™, Stratagene, Inc.)

La membrana se sondeó para determinar el miARN específico, *let-7* (Pasquinelli *et al.*, 2000) utilizando una sonda antisentido que se había marcado en el extremo 5' con Polinucleótido quinasa de T4.

En algunos casos también se sondearon otros ARN pequeños ubicuos con oligodesoxirribonucleótidos antisentido al mismo tiempo. Estos incluyeron el ARN<sub>n</sub> de U2 (Núm. de Acceso X07913, complementario a las posiciones 28-42 del ARN<sub>n</sub> de U2 de 187 nt), ARN<sub>n</sub> de U6 (Núm. de Acceso V00853 o J00648, complementario de las posiciones 83-103 del ARN de ratón de 106 nt), y ARN<sub>po</sub> de U43 (Núm. de Acceso AJ238853, complementario a las posiciones 20-37 del ARN de U43 humano de 62 nt). Todos estos hibridan de manera cruzada fácilmente entre ratón y ser humano. Se siguió el procedimiento de Patterson y Guthrie (1987) para la prehibridación, la hibridación, y el lavado (Patterson y Guthrie, 1987). Las transferencias se prehibridaron en {6 x SSC, 10 x solución de Denhardt, SDS al 0,2%} a 65°C durante al menos una hora, a continuación se añadieron 10 ml de solución de hibridación {6XSSC, 5X Denhardt, SDS al 0,2%} que contenía sondas oligodesoxinucleotídicas antisentido de *let-7*, U43, U6, y/o U2 marcadas en el extremo 5' (U43, U6, *let-7* mínimo=400.000 cpm; U2 mínimo=200.000 cpm) y que se habían filtrado (poro de 0,45  $\mu$ m) antes de su uso. La hibridación fue durante 8-24 hr con agitación a la temperatura ambiente. Después de la hibridación, las soluciones se eliminaron, y la transferencia se lavó 3 veces durante 5 minutos a RT con solución de lavado: {6 x SSC, SDS al 0,2%}, después una vez con la misma solución de lavado a 42°C. Después del lavado final, las transferencias se envolvieron en envoltura de plástico y se expusieron a una pantalla Phosphorimager (Molecular Dynamics) siguiendo las instrucciones del fabricante para cuantificar la cantidad de señal presente en cada banda. La cantidad de *let-7* en la fracción eluida se comparó a menudo con la del flujo continuo, proporcionado una figura de "% de unido", como la proporcionada en FIG. 1, FIG. 2, FIG. 3, FIG. 4, FIG. 5, y FIG. 6. Para otras figuras, la cantidad de *let-7* se comparó con otras muestras o se proporcionó como absoluta. Véanse los ejemplos específicos.

Para algunos ejemplos, se realizó una segunda transferencia Northern a partir de un sistema en gel de agarosa para buscar la presencia de especies de ARN más grandes. Estos fueron ARNm para los genes expresados de manera ubicua ciclofilina (=Peptidilprolina Isomerasa o PPI), GAPDH y/o  $\beta$ -actina. Los geles de agarosa se hicieron correr y se transfirieron utilizando el kit NorthernMax Gly como describe Ambion. Para sondear la transferencia, se transcribieron sondas de ARN antisentido a partir de moldes suministrados por Ambion (núm. cat. 7675, 7431, 7423) y se hibridaron en Ultrahyb (Ambion), utilizando todos los protocolos como se especifica en la bibliografía de Ambion.

## Ejemplo 3:

## Enriquecimiento de pequeñas moléculas de ARN

Se procesaron por separado cerebro, corazón, hígado, y riñón de ratón congelados, de acuerdo con el siguiente protocolo para el enriquecimiento de ARN pequeños.

- 5 Se aplastó aproximadamente medio gramo de tejido de ratón congelado (cepa Swiss-Webster, 6-12 semanas de edad) hasta un polvo fino en nitrógeno líquido en un mortero. Este polvo se dispersó adicionalmente en tampón de lisis convencional (GuSCN 4 M; beta-mercaptoetanol 0,1 M; N-lauroil sarcosina al 0,5%; citrato de Na 25 mM, pH 7,2) mediante el uso de un homogeneizador de rotor y estator con un generador de 7 mm a alta velocidad durante ~30 seg.
- 10 Después de la homogeneización, se retiraron 0,6 ml del producto lisado para este estudio. Se añadieron 60  $\mu$ l de acetato de Na 2 M, pH 4,0, al producto lisado, seguido inmediatamente de 0,6 ml de fenol-cloroformo ácido. Después de 30 seg de agitación vigorosa, la fase acuosa se separó mediante centrifugación a 16.000 xG durante 5 min. Se utilizaron cuatro alícuotas de 100  $\mu$ l de esta fase acuosa en cuatro separaciones separadas. Las cuatro alícuotas tenían 100  $\mu$ l de etanol al 40%, 50%, 60%, y 70% añadidos a cada una, a continuación se hicieron pasar a través de los filtros de fibra de vidrio como en el procedimiento RNAqueous (Ambion). Las soluciones de etanol al 20%, 25%, 30%, y 35% que pasaron a través de estos filtros (el flujo continuo) se ajustaron después a una concentración final de etanol al 55% mediante la adición de 156, 133, 111, y 88,9  $\mu$ l de etanol, respectivamente. Las cuatro muestras se hicieron pasar sobre columnas de filtro de fibra de vidrio separadas. Los filtros se lavaron a continuación con 0,7 ml de isocianato de guanidinio 4 M (GuSCN) / etanol al 70%, seguido de dos lavados con 0,5 ml de alcohol al 80% / NaCl 0,1 M / EDTA 4,5 mM / TrisHCl 10 mM, pH 7,5. Después de que cada lavado pasara a través del filtro, el tubo de recogida se vació y se reemplazó. Cada lavado se hizo pasar a través del filtro mediante centrifugación como en el protocolo de RNAqueous (Ambion). El filtro se volvió a centrifugar sobre un tubo de recogida vacío para separar todos los rastros de etanol. La muestra se hizo eluir a continuación del filtro con 100  $\mu$ l de EDTA 0,1 mM, pH 8,0, que se aplicó directamente al filtro a temperatura ambiente y se centrifugó en un tubo de recogida nuevo. Las muestras se examinaron mediante transferencia Northern, como se ha descrito, y se compararon sobre el mismo gel con otra muestra que se había preparado a partir de un volumen igual del mismo producto lisado utilizando el kit Totally RNA™ de Ambion.

- 30 Utilizando transferencias Northern tanto de agarosa como de acrilamida, se analizaron los niveles de las especies de ARN de  $\beta$ -actina, GAPDH, U2, y let-7 presentes en cerebro, corazón, hígado, y riñón de ratón congelados en el material eluido de la primera y segunda columnas para determinar la fracción recuperada en la última. Estos se muestran en la FIG. 7. El ARNm más grande se elimina completamente de la fracción enriquecida con ARN pequeño.

- La FIG. 8 muestra el enriquecimiento relativo de los pequeños ARN utilizando el método descrito en el Ejemplo 3 en comparación con el método de aislamiento de ARN convencional. Aquí, se homogeneizaron las muestras de cuatro tejidos de ratón comunes: cerebro, corazón, riñón, e hígado, en tampón de lisis convencional como se describe en el Ejemplo 1. Después de la homogeneización, se tomaron dos alícuotas iguales de cada producto lisado. Una se sometió a un procedimiento preparativo de ARN convencional utilizando la extracción orgánica y la precipitación con etanol, utilizando 4 volúmenes de etanol para la precipitación para garantizar una recuperación completa de las especies de ARN pequeño. La otra alícuota se sometió al procedimiento de enriquecimiento descrito en el Ejemplo 3. La concentración de ARN en cada muestra final se cuantificó utilizando la absorbancia a 260 nm. Se separó un microgramo de cada muestra sobre un gel de poli-acrilamida desnaturante al 15%. Este gel se sometió a electrotransferencia y la transferencia Northern resultante se sondeó para determinar let-7 y U2 como se describe en el Ejemplo 2. La cantidad de cada sonda hibridada con el área apropiada de la transferencia se utilizó para determinar las cantidades relativas de cada ARN en las muestras de 1  $\mu$ g. La señal para las muestras enriquecidas se dividió por la señal para las muestras patrón para proporcionar los factores de enriquecimiento dados en la FIG. 8. El enriquecimiento en este caso fue de ~3,5-8 veces en masa.

## Ejemplo 4:

## Comparación con la extracción orgánica y la precipitación con etanol convencionales

- 50 Las muestras de dos hígados de ratón que se habían congelado a -80°C se trituraron hasta un polvo fino en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en 10 volúmenes (ml/g) de tampón de lisis convencional (GuSCN 4 M;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 M; N-lauroil sarcosina al 0,5%; citrato de Na 25 mM, pH 7,2) y a continuación se dividieron en cuatro alícuotas. Una de las alícuotas se extrajo dos veces con dos soluciones de fenol-cloroformo diferentes como se describe en el protocolo Totally RNA™ (Ambion), y las otras tres se sometieron individualmente al procedimiento AMIK convencional. El ARN sedimentado del procedimiento Totally RNA™ se volvió a disolver en 100  $\mu$ l de EDTA 0,1 mM, pH 8. La elución final para las muestras de AMIK fue en el mismo volumen y en la misma solución. Las muestras se sometieron a electroforesis y se transfirieron como se ha descrito sobre geles de acrilamida al 15% y de agarosa al 1%. Las transferencias apropiadas se sondearon para determinar  $\beta$ -actina, GAPDH, U2, U43, y let-7 como se ha descrito. Las recuperaciones de cada ARN con respecto al procedimiento de extracción se resumen en

el gráfico de la FIG. 9. El rendimiento de la invención generó cantidades de ARN pequeños iguales o mayores que las del procedimiento de extracción orgánica.

Ejemplo 5:

Comparación con la purificación con filtro de fibra de vidrio convencional

5 Se homogeneizaron muestras de hígado de ratón congelado y de cerebro de ratón congelado almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en tampón de lisis convencional a una razón de 1 g de tejido con respecto a 10 ml de tampón. Después de la homogeneización, todos los productos lisados se almacenaron sobre hielo hasta que se aplicó uno de los dos procedimientos de procesamiento.

10 Partiendo de seis alícuotas de  $100\ \mu\text{l}$  de cada producto lisado de origen, se procesaron 2 muestras mediante el método RNeasy de Qiagen, siguiendo su mini procedimiento de manera precisa después de la adición de  $250\ \mu\text{l}$  del Tissue Lysis Buffer (TLB) suministrado con el kit. Las cuatro alícuotas finales de cada tejido se prepararon mediante el método AMIK previamente descrito. Las muestras se hicieron eluir todas en  $100\ \mu\text{l}$  de agua. Para el análisis, se analizaron  $5\ \mu\text{l}$  de cada una de las muestras mediante electroforesis sobre geles de acrilamida al 15% y transferencia, y las transferencias se sondearon para determinar let-7, U43, y U2. Después de utilizar la lectura del dispositivo Phosphorimager para cuantificar las bandas, se compararon los niveles de señal entre los métodos para cada pequeño ARN. Estos resultados se muestran en la FIG. 10. Esta invención fue mucho más eficaz en la captura de todos los pequeños ARN que el procedimiento de extracción de filtro de fibra de vidrio convencional. Esta incapacidad para capturar pequeñas moléculas con un procedimiento convencional se ve afectada en cierta medida también por el tipo de tejido, ya que la captura de producto lisado de hígado parece ser más eficaz. Esta observación es compatible con la observación de los autores de la presente invención utilizando producto lisado bruto (FIG. 1).

Ejemplo 6:

Eficacia de recuperación de pequeño ARN de un producto lisado bruto en tres tejidos diferentes

25 Se pulverizaron muestras de corazón, hígado, y cerebro congelados de ratones (cepa Swiss-Webster, 6-12 semanas de edad) en nitrógeno líquido hasta un polvo. Este polvo se pesó congelado y se añadieron 10 ml de tampón de lisis por gramo de tejido (los pesos oscilaban entre 200 y 500 mg). Las muestras se homogeneizaron con un homogeneizador de rotor y estator inmediatamente después de la adición, a continuación se dividieron en alícuotas  $8 \times 100\ \mu\text{l}$  sobre hielo. A estas se les añadieron 53,9, 66,7, 81,8, 100, 122,2, 150, 185,7, y  $233,3\ \mu\text{l}$  de etanol absoluto para alcanzar concentraciones finales de etanol al 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, y 70%. Cada una de estas se hizo pasar sobre una columna de filtro de fibra de vidrio como la que se encuentra en el kit RNAqueous® (Ambion), y se recogió el flujo continuo de esta. El ARN del flujo continuo se extrajo con fenol-cloroformo y se hizo precipitar con etanol con cuatro volúmenes de etanol para garantizar la precipitación de los pequeños ARN. Después de sedimentar el ARN durante 30 min de centrifugación a  $16.000\ \text{xG}$ , el sedimento se lavó una vez con etanol al 80% y a continuación se disolvió de nuevo en  $60\ \mu\text{l}$  de EDTA 0,5 mM, pH 8,0. Los filtros se lavaron tres veces, una vez con  $0,7\ \text{ml}$  de isocianato de guanidinio 4 M (GuSCN) / etanol al 70%, seguido de dos lavados con  $0,5\ \text{ml}$  de alcohol al 80% / NaCl 0,1 M / EDTA 4,5 mM / TrisHCl 10 mM, pH 7,5. Cada lavado se realizó como antes, mediante centrifugación a  $12.000\ \text{xG}$  durante 1 min o durante suficiente tiempo como para aclarar todo el líquido a través del filtro, vaciando los tubos de recogida después de cada uno. Las muestras se hicieron eluir utilizando 2 adiciones separadas de  $30\ \mu\text{l}$  de EDTA 0,1 mM, pH 8,0 que se aplicaron directamente al filtro después de un precalentamiento a  $95^{\circ}\text{C}$ , centrifugando cada una a través el mismo tubo de recogida nuevo. Se analizaron cantidades iguales ( $5\ \mu\text{l}$ ) tanto de la porción unida al filtro y eluida como del flujo continuo mediante transferencia Northern como se ha descrito anteriormente. Puesto que la porción unida y el flujo continuo se encontraban en la misma transferencia, se pudo calcular la cantidad de ARN de let-7 unido para cada concentración de etanol con cada tejido. Estos datos se trazan en la FIG. 1 y la FIG. 2. Resulta evidente que el comportamiento de unión para cada tejido fue diferente, en términos de la concentración de etanol requerida para inmovilizar todo el ARN de let-7 sobre el filtro de fibra de vidrio. No obstante, el máximo parecía alcanzarse para todos los tejidos con etanol al 55%.

Ejemplo 7:

Purificación de células cultivadas

50 Se recogieron células de dos líneas, células HEK-293 (derivada de riñón embrionario humano) o HeLa (cuello uterino humano), de matraces de cultivo mediante tripsinización. Después del recuento, estas células se añadieron a un nivel de aproximadamente un millón cada una a 2 tubos de microcentrífuga de 2 ml y se sedimentaron por centrifugación. El sobrenadante se eliminó y el contenido sedimentado de cada tubo se resuspendió en  $700\ \mu\text{l}$  de tampón de lisis como se describe en el procedimiento convencional (Ejemplo 1). Las células se lisaron agitando el tubo vigorosamente durante 30 seg en lugar de utilizar un aparato de homogeneización. Para cada conjunto, un conjunto se llevó inmediatamente a etanol a aproximadamente 55% mediante la adición de  $860\ \mu\text{l}$  de etanol absoluto. La otra alícuota se procesó como se ha establecido en el procedimiento convencional: se aciduló mediante la adición de  $70\ \mu\text{l}$  de acetato de Na 2 M tamponado a pH 4, seguido de la extracción con  $700\ \mu\text{l}$  de fenol-cloroformo ácido, a continuación adición de  $860\ \mu\text{l}$  de etanol a la fase superior recuperada. Ambas muestras se hicieron pasar a

través de filtros de fibra de vidrio, se lavaron tres veces, y se hicieron eluir con 100  $\mu$ l de EDTA 0,1 mM, pH 8 como se ha descrito anteriormente. Se sometieron a electroforesis cinco  $\mu$ l de cada producto eluido sobre un gel de acrilamida al 15% y se sometieron a transferencia Northern para U2 y let-7. Los niveles de cada una, determinados mediante la lectura del dispositivo Phosphorimager de la transferencia, se muestran en la FIG. 11. La recuperación de los pequeños ARN a partir de todos los métodos parece buena, pero la recuperación a partir de las células HeLa se potenció mediante el procedimiento de pre-extracción.

Ejemplo 8:

Pre-extracción utilizando diferentes condiciones salinas

Se homogeneizó hígado de ratón congelado en Tampón de Lisis a 1,1X concentración normal menos citrato de Na (GuSCN 4,4 M;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,11 M; N-lauroil sarcosina al 0,55%). Inmediatamente después de la homogeneización, se retiraron dos alícuotas de 1,8 ml de este producto lisado y se añadieron a cada una 200  $\mu$ l de citrato de Na 0,25 M a pH 7,2 o 4,5. Se retiraron cuatro alícuotas de 400  $\mu$ l de estas porciones de 2 ml, y se añadieron 40  $\mu$ l de agua, NaOOCCH<sub>3</sub> (acetato de sodio, pH 4,5) 1M, 2M, o 3M a cada una de estas, para proporcionar una [NaOOCCH<sub>3</sub>] final de cero y aproximadamente 0,1, 0,2, y 0,3 M. Las muestras se extrajeron cada una con 440  $\mu$ l de fenol-cloroformo ácido y se recuperaron 300  $\mu$ l de la fase superior. Esto se realizó en etanol al 55% mediante la adición de etanol absoluto y se purificó sobre una columna de filtro de fibra de vidrio como se describe en el procedimiento convencional. Cada muestra se aplicó a un gel de poli(acrilamida) al 15%, se transfirió y se sondeó como se ha descrito anteriormente. Los niveles de U2, U43, y let-7 determinados para cada uno se muestran en el gráfico de la FIG. 12. El rendimiento parece ser más o menos equivalente a ambos pH (aunque U43 era variable), pero el mejor rendimiento aparece en presencia de NaOOCCH<sub>3</sub> 0,2 M a ambos pH.

Ejemplo 9:

Unión de pequeñas moléculas de ARN a diferentes concentraciones de etanol y guanidinio

Se homogeneizó hígado de ratón en tampón de lisis convencional y se extrajo con fenol-cloroformo ácido. El producto lisado extraído se dividió en dos porciones. Se añadió un volumen igual a cada una que consistía en Tampón de Lisis sin guanidinio ( $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 M; N-lauroil sarcosina al 0,5%; citrato de Na 25 mM, pH 7,2) o Tampón de Lisis con GuSCN 2 M (GuSCN 2 M;  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 M; N-lauroil sarcosina al 0,5%; citrato de Na 25 mM, pH 7,2), creando soluciones con una [GuSCN] final de 2 M y 3 M, respectivamente. Éstas se dividieron después adicionalmente en 18 alícuotas de 200  $\mu$ l cada una, y las adiciones de etanol se llevaron a cabo de dos maneras. El primer método fue la adición de 22,2, 35,3, 50, 66,7, 85,7, 107,7, 133,3, y 200  $\mu$ l de etanol absoluto. Esto proporcionó una concentración final de etanol de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, y 50%, con las correspondientes concentraciones finales de guanidinio que disminuyeron al aumentar el etanol. (2,7, 2,55, 2,4, 2,25, 2,1, 1,95, 1,8, 1,65, y 1,5 M para una concentración inicial 3 M; 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1, y 1,0 M para una concentración inicial 2 M; El segundo método añadió volúmenes iguales de soluciones de etanol en agua de 20-100% para proporcionar las mismas concentraciones finales de etanol, pero con concentraciones de guanidinio uniformes de 1,5 o 1 M dentro de cada serie. Después de la adición de etanol, cada una de estas muestras se unió al filtro de fibra de vidrio y se siguió el procedimiento convencional. Las muestras se hicieron correr sobre geles de acrilamida y agarosa para analizar la presencia de  $\beta$ -actina, GAPDH, PPI (ciclofilina), U2, y let-7. El comportamiento de unión de cada especie a medida que aumentaba la concentración de etanol se trazó para las cuatro series en las FIG. 3, FIG. 4, FIG. 5, y FIG. 6. A partir de estas series, se demuestra que existen diferencias en el comportamiento de las especies de ARN de diferentes tamaños, de manera que manipulando tanto la concentración de sal como la de etanol se puede lograr la unión de intervalos de tamaño bastante restringido de moléculas de ARN, indicando que se pueden realizar procedimientos de fraccionamiento por tamaño más refinados.

Ejemplo 10:

Utilización de pequeños ARN para sondear micromatrices

Se pueden utilizar los pequeños ARN enriquecidos utilizando los procedimientos descritos en los Ejemplos 3 o 9 en las tecnologías de micromatrices descritas en la memoria descriptiva. En un ejemplo, las sondas fijadas a la micromatriz pueden contener secuencias diseñadas específicamente para capturar miARN o ARNip conocidos. Alternativamente, las sondas fijadas a la micromatriz podrían ser secuencias de ARNm para la búsqueda de potenciales dianas biológicas *in vivo* para los miARN o ARNip. La población de pequeñas moléculas de ARN se podría marcar radiactivamente o con etiquetas que sean reactivas a la luz o sean capaces de unirse a moléculas secundarias capaces de reaccionar con la luz. Estas marcas directas e indirectas se podrían anclar a través de métodos enzimáticos bien conocidos por los expertos en la técnica tales como: eliminación del fosfato 5' con fosfatasa seguido de adición de fosfato modificado con polinucleótido quinasa; o adición al extremo 3' de uno o varios nucleótidos etiquetados con ARN ligasa o polimerasas tales como poli-A polimerasa.

Todas las composiciones y métodos descritos y reivindicados en la presente memoria se pueden realizar y ejecutar sin experimentación indebida a la luz de la presente descripción. Si bien las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de las realizaciones preferidas, resultará evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y métodos y en las etapas o en la secuencia de

etapas del método descrito en la presente memoria. Más específicamente, resultará evidente que ciertos agentes que están químicamente y fisiológicamente relacionados pueden ser sustituidos por los agentes descritos en la presente memoria, a la vez que se lograrán los mismos resultados o resultados similares.

**Referencias**

- 5 Patente de Estados Unidos 4.683.195
- Patente de Estados Unidos 4.683.202
- Patente de Estados Unidos 4.800.159
- Patente de Estados Unidos 4.883.750
- Patente de Estados Unidos 5.155.018
- 10 Patente de Estados Unidos 5.234.809
- Patente de Estados Unidos 5.412.087
- Patente de Estados Unidos 5.445.934
- Patente de Estados Unidos 5.514.545
- Patente de Estados Unidos 5.545.522
- 15 Patente de Estados Unidos 5.744.305
- Patente de Estados Unidos 5.843.650
- Patente de Estados Unidos 5.846.709
- Patente de Estados Unidos 5.846.783
- Patente de Estados Unidos 5.849.497
- 20 Patente de Estados Unidos 5.849.546
- Patente de Estados Unidos 5.849.547
- Patente de Estados Unidos 5.858.652
- Patente de Estados Unidos 5.866.366
- Patente de Estados Unidos 5.912.148
- 25 Patente de Estados Unidos 5.916.776
- Patente de Estados Unidos 5.916.779
- Patente de Estados Unidos 5.922.574
- Patente de Estados Unidos 5.928.905
- Patente de Estados Unidos 5.928.906
- 30 Patente de Estados Unidos 5.932.451
- Patente de Estados Unidos 5.935.825
- Patente de Estados Unidos 5.939.291
- Patente de Estados Unidos 5.942.391
- Patente de Estados Unidos 5.945.525
- 35 Patente de Estados Unidos 5.990.302
- Patente de Estados Unidos 6.043.354
- Patente de Estados Unidos 6.110.363

- Patente de Estados Unidos 6.180.778
- Patente de Estados Unidos 6.309.823
- Patente de Estados Unidos 6.316.193
- Patente de Estados Unidos 6.322.971
- 5 Patente de Estados Unidos 6.324.479
- Patente de Estados Unidos 6.329.140
- Patente de Estados Unidos 6.329.209
- Solicitud de Patente de Estados Unidos 2003/0104468.
- Boom et al., *J. Clin. Microbiol.*, 28(3):495-503, 1990.
- 10 Carrington et al., *Science* 301:336-338, 2003.
- Chomczynski y Sacchi, *Anal. Biochem.*, 162(1):156-159, 1987.
- DeRisi et al., *Nature Genetics*, 14:457-460, 1996.
- Duggan et al., *Nat. Genet.*, 21(1):10-14, 1999.
- Efstratiadis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73(7):2289-2293, 1976.
- 15 Solicitud Europea 329 822
- Solicitud Europea Núm.320 308
- Fire et al., *Nature*, 391 (6669):806-811, 1998.
- Fodor et al., *Biochemistry*, 30 (33):8102-8108, 1991.
- Frohman, En: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, N.Y., 1994.
- 20 Solicitud GB Núm. 2 202 328
- Gubler y Hoffmann, *Gene*, 25:263-269, 1983.
- Hacia et al., *Nature Genet.*, 14:441-449, 1996.
- Hamilton y Baulcombe, *Science*, 286(5441):950-952, 1999.
- Higuchi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73(9):3146-3150, 1976.
- 25 Innis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(24):9436-9440, 1988.
- Ko et al., *Plant Mol. Biol.*, 14(2):217-227, 1990.
- Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173, 1989.
- Lagos-Quintana et al., *Science*, 294(5543):853-858, 2001.
- Land et al., *Nucleic Acids Res.*, 9(10):2251-2266, 1981.
- 30 Lau et al., *Science*, 294 (5543):858-862, 2001.
- Lee y Ambros, *Science*, 294(5543):862-864, 2001.
- Lee et al., *Cell*, 75 (5):843-854, 1993.
- Maniatis et al., *Cell*, 8:163, 1976.
- 35 Maniatis et al., En: *Molecular cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1990.
- Maskos et al., *Nucleic Acids Res.*, 20(7):1679-1684, 1992.
- Ohara et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:56775673, 1989.

- Okayama y Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 2(2):161-170, 1982.
- Pasquinelli et al., *Nature*, 408 (6808):86-89, 2000.
- Pasquinelli et al., *Nature*, 408 (6808):86-89, 2000.
- Patanjali et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(5):1943-1947, 1991.
- 5 Patterson y Guthrie, *Cell*, 49(5):613-624, 1987.
- Solicitud PCT PCT/US87/00880
- Solicitud PCT PCT/US87/01025
- Solicitud PCT WO 86/05815
- Solicitud PCT WO 88/10315
- 10 Solicitud PCT WO 89/06700
- Solicitud PCT WO90/06045
- Peacock y Dingman, *Biochemistry*, 6(6):1818-1827, 1967.
- Pease et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:5022-5026, 1994.
- Sambrook et al., En: *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.
- 15 Schena et al., *Science* 270:467-470, 1995.
- Shalon et al., *Genome Res.*, 6(7):639-645, 1996.
- Shoemaker et al., *Nature Genetics*, 14:450-456, 1996.
- Tang et al., *Genome Dev.*, 17(1):49-63, 2003.
- Timmons, *Mol. Cell.*, 10(3):435-437, 2002.
- 20 Walker et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:392-396 1992.
- Zamore et al., *Cell*, 101 (1):25-33, 2000.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para el aislamiento de pequeñas moléculas de ARN que tienen a lo sumo 100 nucleótidos o menos de una muestra que comprende:
- 5 a) lisar las células de una solución de lisado para producir un producto lisado; en donde la solución de lisado comprende un agente caotrópico
- b) añadir al producto lisado una solución de etanol para formar una mezcla de producto lisado/etanol;
- c) aplicar la mezcla de producto lisado/etanol a un primer soporte sólido y recoger la mezcla de producto lisado/etanol del flujo continuo;
- d) añadir a la mezcla de producto lisado/etanol del flujo continuo de la etapa c) una solución de etanol;
- 10 e) aplicar la mezcla de producto lisado/etanol de la etapa d) a un segundo soporte sólido; y
- f) eluir las pequeñas moléculas de ARN del soporte sólido, en donde la mezcla de producto lisado/etanol aplicada al primer soporte sólido tiene entre aproximadamente 20% y aproximadamente 35% de etanol y en donde la mezcla de producto lisado/etanol aplicada al segundo soporte sólido tiene entre aproximadamente 35% y aproximadamente 70% de etanol.
- 15 2. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución de lisado comprende un detergente.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la concentración del detergente en la solución de lisado es de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 2%.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente caotrópico es una sal de guanidinio y/o en donde el detergente es N-lauroil sarcosina.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el producto lisado se extrae con fenol y/o cloroformo.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la solución de lisado comprende un tampón, preferiblemente a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 300 mM.
- 25 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente el lavado del soporte sólido con una primera solución de lavado después de aplicar el producto lisado al soporte sólido y opcionalmente el lavado del soporte sólido con una segunda solución de lavado después de lavar con la primera solución de lavado.
8. El método de la reivindicación 7, en donde la primera solución de lavado comprende un agente caotrópico, preferiblemente en donde el agente caotrópico es una sal de guanidinio y la primera solución de lavado comprende adicionalmente alcohol.
- 30 9. El método de la reivindicación 8, en donde la segunda solución de lavado comprende alcohol.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las pequeñas moléculas de ARN se hacen eluir del soporte sólido a una temperatura de aproximadamente 60°C a aproximadamente 100°C.
- 35 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde las pequeñas moléculas de ARN se hacen eluir del soporte sólido con una solución de baja fuerza iónica.
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el soporte sólido comprende sílice, en particular se prefiere fibra de vidrio.
- 40 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el primer y el segundo soportes sólidos están fabricados del mismo material.

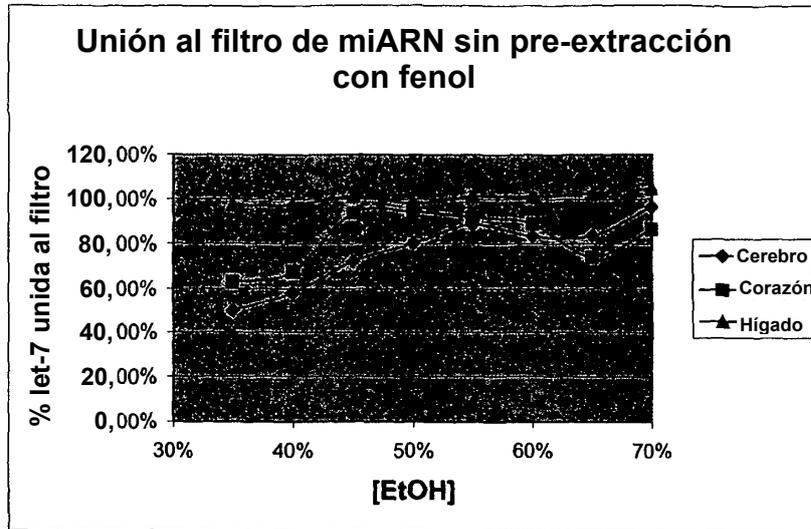


FIG. 1

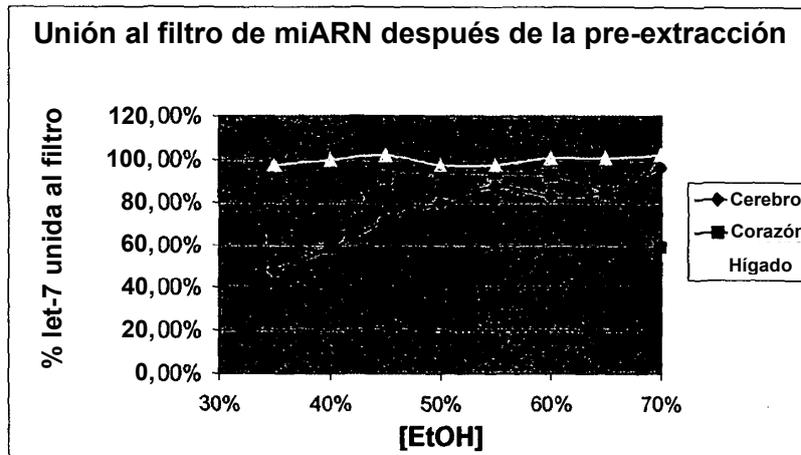
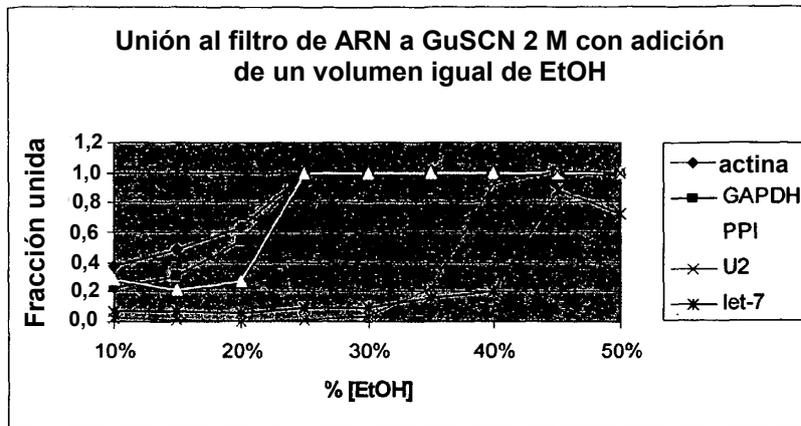
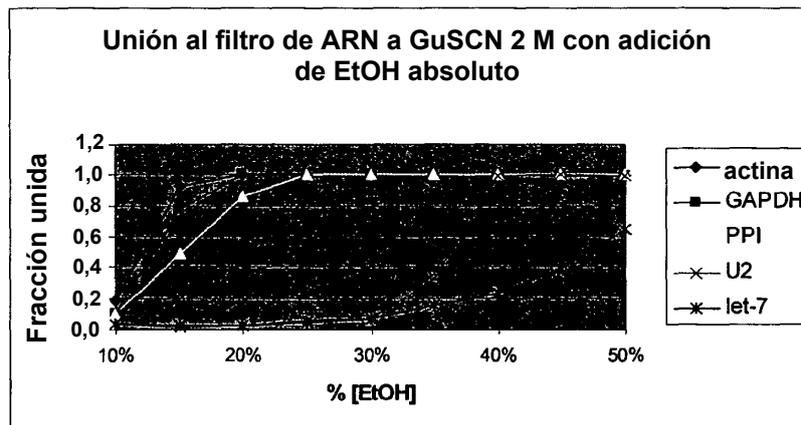


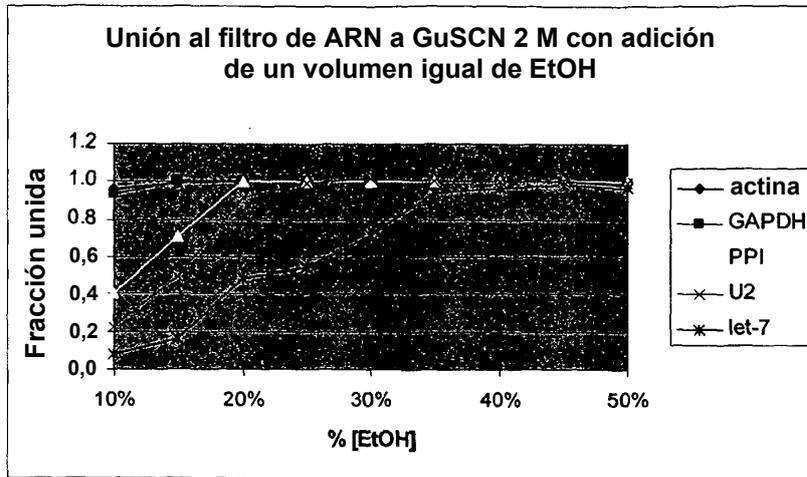
FIG. 2



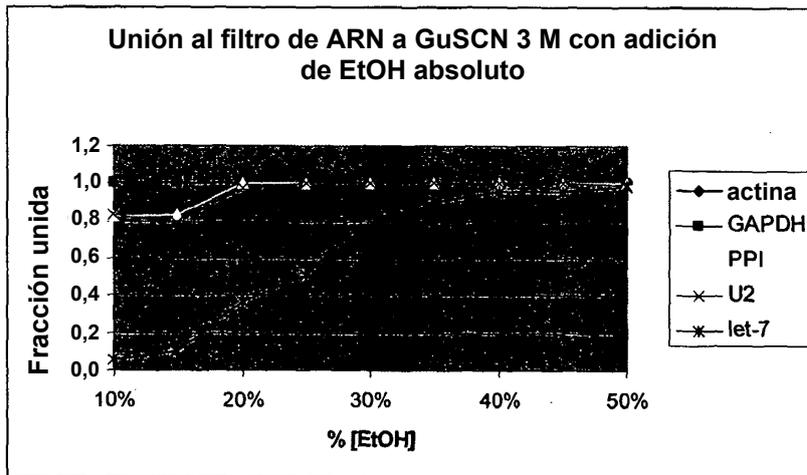
**FIG. 3**



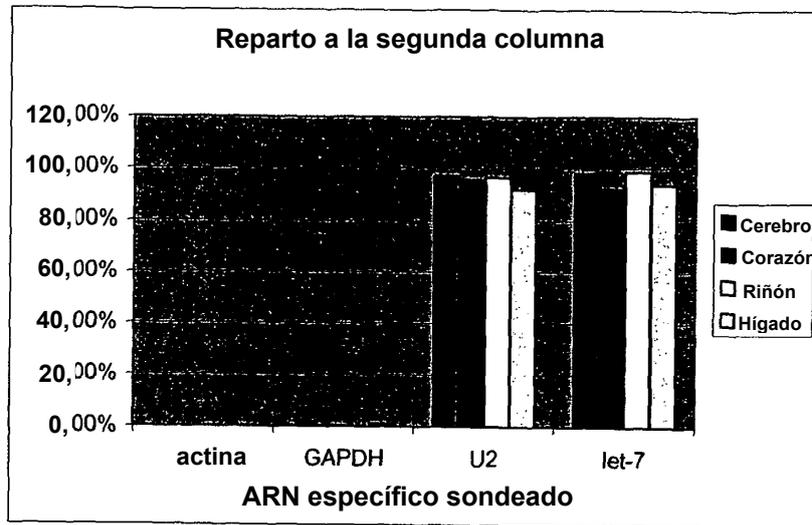
**FIG. 4**



**FIG. 5**



**FIG. 6**



**FIG. 7**

### Factor de enriquecimiento

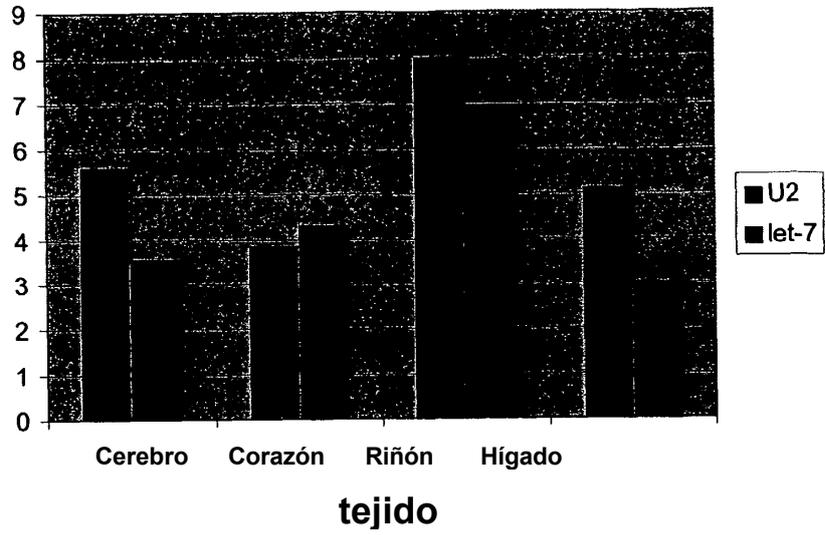
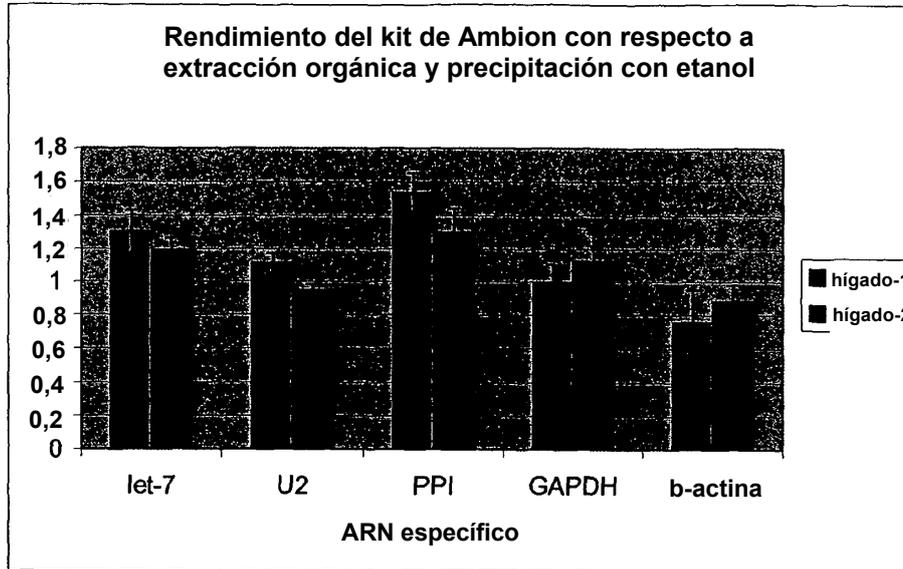
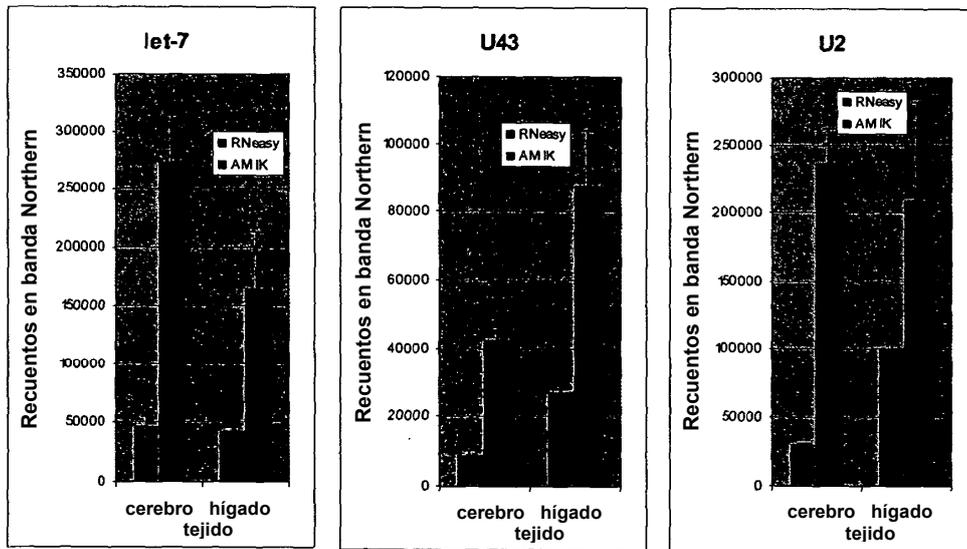


FIG. 8



**FIG. 9**



**FIG. 10**

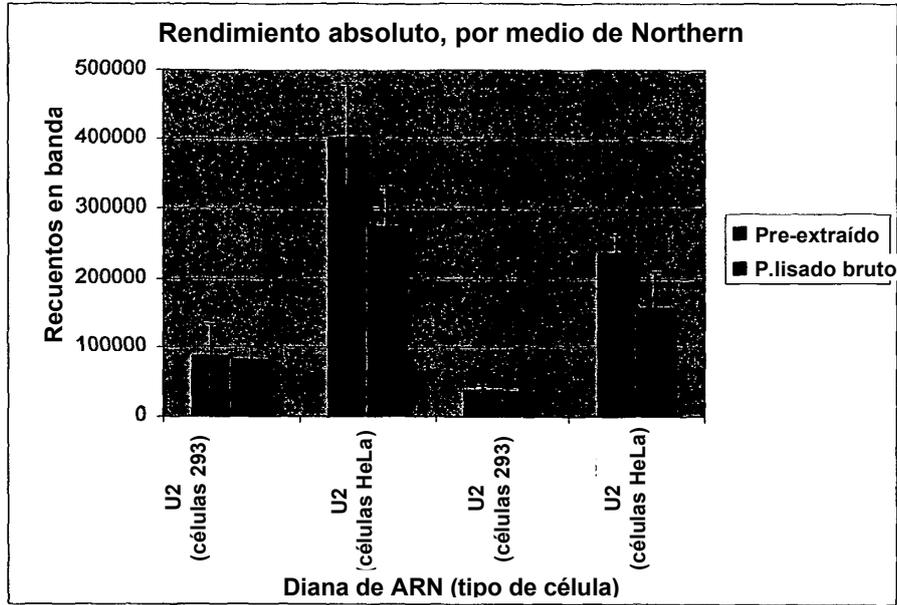


FIG. 11

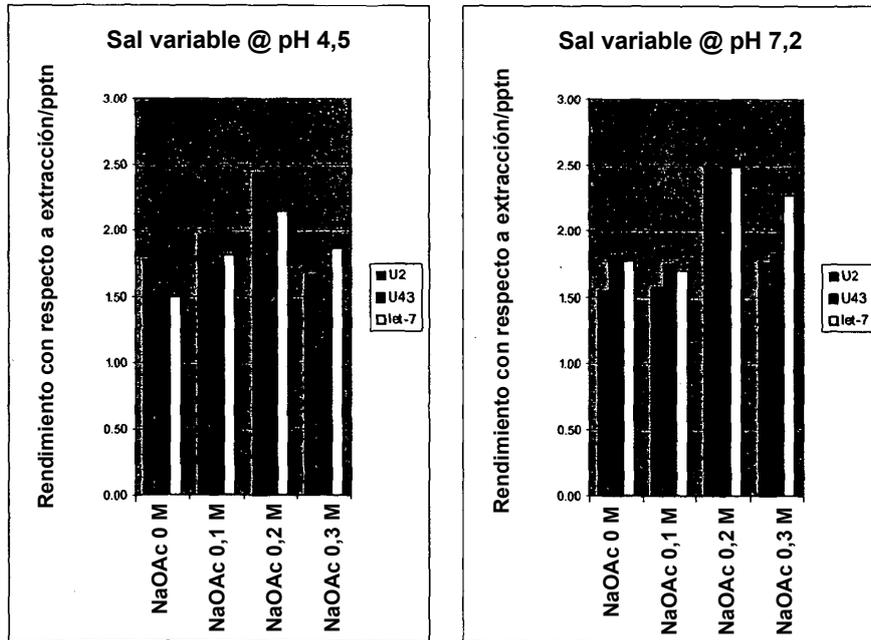


FIG. 12