

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 692**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**B01D 33/15** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

**B03C 1/30** (2006.01)

**B04B 3/00** (2006.01)

**C12Q 1/6806** (2008.01)

**C12Q 1/6886** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2012 E 17170672 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3231877**

54 Título: **Aislamiento de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**12.05.2011 US 201161485214 P**

**12.05.2011 US 201161485338 P**

**12.05.2011 US 201161485386 P**

**12.05.2011 US 201161485448 P**

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

**14.07.2020**

73 Titular/es:

**EXACT SCIENCES CORPORATION (100.0%)**  
**441 Charmany Drive**  
**Madison, Wisconsin 53719, US**

72 Inventor/es:

**BRUINSMA, JANELLE J.;**  
**DOMANICO, MICHAEL J.;**  
**LIDGARD, GRAHAM P.;**  
**ZOU, HONGZHI;**  
**WEISBURG, WILLIAM G.;**  
**SHENOI, HEMANTH D. y**  
**LIGHT, JAMES P. II**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 773 692 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

Aislamiento de ácidos nucleicos

**Campo de la invención**

5 En el presente documento se proporciona tecnología relacionada con el aislamiento de ácidos nucleicos. En particular, la tecnología se refiere a procedimientos y kits para extraer ácidos nucleicos de muestras problemáticas tales como heces.

**Antecedentes**

10 El aislamiento de ácidos nucleicos diana específicos de una muestra es una etapa importante en muchos procedimientos de diagnóstico médico. Por ejemplo, algunas mutaciones y estados de metilación en genes conocidos están correlacionados, asociados, y/o son predictivos de enfermedades. El ADN que contiene estos genes se puede recuperar de una muestra, y analizarse para determinar la presencia de mutaciones y estados de metilación particulares.

15 En la práctica, dichos ensayos requieren el aislamiento y el análisis de varias dianas genéticas de una muestra. Para muchos procedimientos de detección, la detección de mutaciones raras o eventos de metilación en un solo gen requiere el aislamiento y análisis de una gran cantidad de ADN. Este problema se complica cuando analiza un panel de genes, cada uno de los cuales debe estar presente en gran cantidad para obtener un ensayo diagnóstico sólido. Por lo tanto, para detectar mutaciones raras y eventos de metilación en múltiples genes, el ADN aislado debe estar muy concentrado y comprender una parte considerable del ensayo de detección.

20 Este requisito impone numerosos problemas, sin embargo. Por ejemplo, la preparación de dichas cantidades y concentraciones de ADN requiere una muestra grande como entrada (por ejemplo, que tenga una masa de varios gramos, por ejemplo, de aproximadamente 2-4 gramos) para proporcionar suficiente ácido nucleico para la detección y, por tanto, requiere un procedimiento que pueda preparar el ADN a partir de una muestra grande. Además, junto con la preparación del ADN, frecuentemente se aíslan y concentran inhibidores del ensayo. En consecuencia, las  
25 preparaciones de ADN concentradas producidas por procedimientos convencionales frecuentemente también retienen concentraciones inaceptables de inhibidores, que a continuación se introducen en un ensayo posterior. Por otra parte, si todas las dianas del panel se extrajeran simultáneamente en una preparación conjunta no selectiva del ADN, la sensibilidad del ensayo se ve negativamente afectada, como la preparación se divide en alícuotas para su ensayo, menos ADN extraído de un solo gen del panel está presente en el ensayo. Si, por otra parte, todos los miembros del  
30 panel se extraen y se analizan conjuntamente y por tanto están presentes en la misma mezcla de ensayo, la sensibilidad de detección de una diana individual concreta se ve negativamente afectada por la presencia de las moléculas de ADN no diana.

Además, si una diana diagnóstica particular está presente en una muestra compleja, estará presente en una pequeña  
35 cantidad con respecto al resto de materiales -tanto ácidos nucleicos como no ácidos nucleicos- de la muestra, resultando ser por tanto un desafío para los procedimientos analíticos diseñados para detectarlo. Por ejemplo, el análisis de ADN procedente de muestras de heces se complica por el hecho de que las bacterias suponen aproximadamente el 60% de la masa seca de las heces y el resto es, en gran medida, residuos de plantas y animales que el sujeto haya ingerido como alimento. Como tal, las células de un sujeto humano, que son las únicas que se  
40 desprenden del revestimiento del tracto digestivo, suponen una fracción muy pequeña de las heces, y están presentes cantidades importantes de ácidos nucleicos de otras fuentes. Por otro lado, en ensayos para detectar modificaciones genéticas indicativas del cáncer de colon, las células derivadas de un tumor que puede estar presente en el colon supondrían solamente una pequeña fracción de las células del intestino del sujeto humano que se han desprendido del revestimiento del tracto digestivo. Por consiguiente, las células cancerosas (y el ADN que contienen) constituye una cantidad mínima de la masa de las heces. Dichas muestras son también muy viscosas, lo que supone problemas  
45 de preparación de muestras y aislamiento de ácidos nucleicos.

Los procedimientos y kits convencionales para aislar el ADN de muestras preparan, de forma típica, el ADN total (por  
ejemplo, según un procedimiento de precipitación no específico) a partir de una muestra. Para muestras complejas, tales como muestras de heces, esto resulta ser un inconveniente importante de los procedimientos convencionales,  
50 ya que el ADN total aislada de una muestra de heces comprende ADN de las bacterias residentes en el intestino (y de cualquier virus, eucariota y archaea presente) junto con el ADN del sujeto. Por otra parte, los procedimientos y kits convencionales están diseñados principalmente para preparar ADN a partir de muestras pequeñas, por ejemplo, muestras que tengan masas de menos de 1 gramo, por ejemplo, de 50 a 200 miligramos, limitando el rendimiento del ácido nucleico diana de muestras complejas a cantidades muy pequeñas. Inconvenientes adicionales son que la  
55 mayoría de tecnologías convencionales no eliminan los inhibidores de forma eficaz, y frecuentemente requieren etapas prolongadas, por ejemplo, incubaciones. Por consiguiente, los procedimientos convencionales no son adecuados para un panel de análisis multigénico de elevada sensibilidad y elevada especificidad de ADN fuertemente concentrado exento de inhibidores procedente de muestras grandes, tales como muestras de heces de varios gramos. Los ensayos que utilizan ADN preparado por procedimientos convencionales no proporcionarán una muestra que se pueda analizar con el umbral de sensibilidad necesario para detectar eventos de mutaciones raras o de metilación. El uso de un

procedimiento o kit convencional para alcanzar las cantidades de partida necesarias para conseguir dicha sensibilidad requiere múltiples extracciones de ADN (por ejemplo, el uso de múltiples kits) de múltiples muestras además de etapas de purificación adicionales para eliminar los inhibidores. Por lo tanto, lo que se necesita es un procedimiento para preparar ADN concentrado exento de inhibidores a partir de una muestra para cada miembro de un gen génico para su uso en ensayos diagnósticos.

Da Silva y col., "Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens", *Molecular Diagnosis*, 4 (1), 1999, 57-64, se refieren a un procedimiento para la extracción de ADN de especímenes que contienen esporas de *Enteocytosoon bieneusi* y *Cryptosporidium parvum*, respectivamente.

Stone y col., "Detection of rRNA from four respiratory pathogens using an automated Q $\beta$  replicase assay", *Molecular and cellular probes*, 10 (5), 1996, 359-370, divulgan la detección del complejo de *Mycobacterium avium* (23S), *Mycoplasma pneumonia* (16S), *Pneumocystis carinii* (18S) y *Legionella pneumophila* (16S) en cuatro ensayos separados en un instrumento de amplificación automatizado Q-beta modelo.

Morgan y col., "Comparison of PCR and Microscopy for Detection of *Cryptosporidium parvum* in Human Fecal Specimens: Clinical Trial", *Journal of Clinical Microbiology*, 36(5), 1998, 995-998 divulgan que mediante la adición de polivinilpirrolidona insoluble pueden eliminarse los inhibidores de los extractos celulares.

Arnal y col., "Comparison of seven RNA extraction methods on stool and shellfish samples prior to hepatitis A virus amplification", *Journal of Virological Methods* 77, 1999, 17-26, divulgan un procedimiento de aislamiento de un ácido nucleico del virus de la hepatitis A en muestra de heces humanas. El procedimiento de la presente invención como se define en las reivindicaciones difiere de dicha técnica anterior en que el ácido nucleico diana es un ácido nucleico humano y en que la adición de polivinilpirrolidona es antes de la unión del ácido nucleico.

## **Sumario**

La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no caen dentro del ámbito de dichas reivindicaciones se proporcionan solo para fines de ilustración y no forman parte de la presente invención.

Se proporciona en el presente documento la tecnología relacionada con el aislamiento de ácidos nucleicos. En particular, la tecnología se refiere a procedimientos, sistemas y kits para extraer y purificar ácidos nucleicos a partir de células intestinales exfoliadas en especímenes de heces para su uso en ensayos cuantitativos y sensibles. La tecnología se lleva a cabo según un procedimiento novedoso para purificar ADN específico a partir de heces que utiliza etapas de eliminación de inhibidores y captura directa de ADN a partir de sobrenadante de heces, o una combinación de estas etapas. La tecnología proporciona además dispositivos de filtración adecuados para su uso con muestras complejas y viscosas, tales como muestras de heces. Por consiguiente, se proporciona en el presente documento un procedimiento para aislar un ácido nucleico diana de una muestra, comprendiendo el procedimiento eliminar un inhibidor del ensayo, si está presente, de la muestra para producir una muestra clarificada; capturar el ácido nucleico diana, si está presente, de la muestra clarificada con un reactivo de captura para formar un complejo de captura; aislar el complejo de captura de la muestra clarificada; y recuperar el ácido nucleico diana, si está presente, del complejo de captura en una solución de ácido nucleico. En algunos ejemplos, el procedimiento comprende además retener la muestra clarificada después de la etapa de captura; y repetir las etapas de aislamiento y recuperación usando la muestra clarificada retenida y un segundo reactivo de captura.

En algunos ejemplos, la eliminación del inhibidor comprende homogeneizar la muestra para producir un homogenado; centrifugar el homogenado para producir un sobrenadante; tratar el sobrenadante con una composición adsorbente del inhibidor para enlazar el inhibidor, si está presente, en un complejo de inhibidor; y aislar el complejo de inhibidor del sobrenadante para producir una muestra clarificada. La composición de absorción del inhibidor en algunos ejemplos es una polivinilpirrolidona. En algunos ejemplos, la polivinilpirrolidona es insoluble y, en algunos ejemplos, la polivinilpirrolidona es una polivinilpolipirrolidona. Es útil en algunos ejemplos proporcionar la polivinilpirrolidona en una forma premedida, por ejemplo, la polivinilpirrolidona puede proporcionarse en forma de comprimido. Se usan varias técnicas para separar el complejo de inhibidor de la muestra. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el aislamiento del complejo de inhibidor puede comprender centrifugación para separar el complejo de inhibidor del sobrenadante.

En algunos ejemplos, la centrifugación comprende centrifugar mediante una columna de centrifugación. Por lo tanto, en algunos ejemplos, se proporciona en el presente documento una tecnología relacionada con la filtración y, especialmente, pero no de forma exclusiva, a los filtros y procedimientos para filtrar mediante centrifugación. Específicamente, algunos ejemplos de la tecnología proporcionada en el presente documento resuelven el problema de la colmatación del filtro de centrifugación mediante provisión de una tecnología en la que tanto el extremo inferior como el cuerpo de un filtro de centrifugación estén hechos de un material poroso o permeable. Es decir, las paredes del filtro de centrifugación están hechos del mismo material o de un material similar al utilizado para el medio filtrante en el extremo inferior en los diseños convencionales. Como tal, cuando la parte inferior del filtro se obstruye durante la filtración, las paredes proporcionan superficie adicional a través de la cual la muestra puede filtrarse.

Esta tecnología se proporciona en el presente documento como un filtro de centrifugación que comprende un cuerpo

huevo, un extremo inferior y un extremo superior abierto opuesto al extremo inferior, en el que el cuerpo hueco del filtro de centrifugación está hecho de un material filtrante poroso, . En algunos ejemplos el extremo inferior está opcionalmente hecho de un material filtrante poroso. El cuerpo hueco y el extremo inferior del filtro de centrifugación pueden tener cualquier forma apropiada para la filtración a la cual se aplica el filtro. Por ejemplo, el cuerpo hueco puede ser un tubo y, en algunos ejemplos, el extremo inferior es hemisférico. En otros ejemplos, el extremo inferior es un disco, un cono, o una parte de un elipsoide. Por otro lado, el filtro de centrifugación está hecho de cualquier material que sea apropiado para filtrar una muestra. Por lo tanto, en algunos ejemplos, el material filtrante poroso es polietileno. Las muestras comprenden diferentes tamaños de partículas, materiales, precipitados, etc. que se deben eliminar mediante filtración. Por consiguiente, se puede seleccionar el material filtrante para que tenga propiedades físicas que proporcionen la separación deseada. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el material poroso filtrante puede tener un tamaño de poro nominal de 20 micrómetros. En algunos ejemplos, el uso del filtro produce un filtrado que el usuario guarda para procesamiento adicional. Como tal, algunos ejemplos proporcionan un conjunto de filtro de centrifugación que comprende un filtro de centrifugación como se ha descrito y un recipiente de recogida adaptado para alojar el filtro de centrifugación y recoger el filtrado.

También se proporcionan en el presente documento procedimientos para producir un filtrado a partir de una muestra que comprende introducir una muestra a filtrar dentro del filtro de centrifugación y centrifugar el filtro de centrifugación, en el que, durante la centrifugación, una fracción de la muestra atraviesa el material filtrante poroso de dicho filtro de centrifugación para producir un filtrado.

La tecnología se puede proporcionar en forma de un kit para su uso en la separación de una muestra. Los ejemplos de dicho kit comprenden un filtro de centrifugación como se describe e instrucciones de uso. En algunos ejemplos, el kit comprende además un recipiente de recogida. En algunos ejemplos, un kit que comprende un filtro de centrifugación comprende además reactivos y materiales adicionales para preparar la muestra, por ejemplo, para la eliminación de inhibidores y/o el aislamiento de ácidos nucleicos.

En algunos ejemplos, los procedimientos y sistemas de la tecnología comprenden capturar un ácido nucleico diana. Capturar el ácido nucleico diana, en algunos ejemplos, comprende exponer una muestra, tal como una preparación de muestra clarificada, a condiciones de desnaturalización para producir una muestra desnaturalizada; y unir el ácido nucleico diana a la muestra desnaturalizada para capturar el reactivo para formar un complejo de captura. Muchos tratamientos y condiciones son de utilidad en la desnaturalización de macromoléculas tales como el ADN. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la condición de desnaturalización puede comprender calentamiento, por ejemplo, en algunos ejemplos, la condición de desnaturalización comprende calentar a 90°C. Suplementar la muestra a desnaturalizar facilita la desnaturalización; por consiguiente, en algunos ejemplos, la muestra clarificada comprende además un desnaturalizante. En algunos ejemplos preferidos, el desnaturalizante comprende tiocianato de guanidina. Por otro lado, en algunos ejemplos, el reactivo de captura comprende un oligonucleótido complementario de al menos una parte del ácido nucleico diana. En algunos ejemplos preferidos, el reactivo de captura comprende partículas, por ejemplo, una partícula magnética. El oligonucleótido, en algunos ejemplos de la tecnología, se hibrida con al menos una parte del ácido nucleico diana y, de esta forma, en algunos ejemplos, la etapa de unión comprende hibridar el oligonucleótido y el ácido nucleico diana. El aislamiento del reactivo de captura (por ejemplo, el complejo reactivo de captura/ácido nucleico diana) se lleva a cabo en algunos ejemplos exponiendo el reactivo de captura a un campo magnético; es decir, en algunos ejemplos proporcionados en el presente documento, la etapa de aislamiento comprende exponer el reactivo de captura a un campo magnético y, en algunos ejemplos, exponer el complejo de captura al campo magnético localiza el ácido nucleico diana. El campo magnético se produce mediante cualquier imán o dispositivo magnético adecuado para el procedimiento. Por ejemplo, la etapa de aislamiento puede comprender introducir la muestra en un campo magnético producido por un primer imán orientado con su polo norte muy cerca de la muestra y un segundo imán orientado con su polo sur muy cerca de la muestra; y esperar un tiempo suficiente para permitir que el campo magnético desplace las partículas magnéticas hasta la ubicación deseada. Un dispositivo para producir un campo magnético intenso se describe, por ejemplo, en el documento US 2012/0262260 A1.

Las tecnologías proporcionan la recuperación del ácido nucleico diana a partir del reactivo de captura. En algunos ejemplos, la recuperación del ácido nucleico diana comprende eluir el ácido nucleico diana a partir del complejo de captura, por ejemplo, en algunos ejemplos, mediante calentamiento. En algunos ejemplos, la elución del ácido nucleico diana desde el complejo de captura comprende exponer el complejo de captura a un pH elevado, por ejemplo, en algunos ejemplos, añadiendo una solución de hidróxido de sodio.

En algunos ejemplos, la tecnología proporciona procedimientos, sistemas y kits para capturar múltiples ácidos nucleicos de una sola muestra, por ejemplo, una muestra de heces. Por ejemplo, se proporcionan en el presente documento procedimientos para aislar un ácido nucleico de una muestra de heces que comprende poner en contacto una muestra de heces con un reactivo de captura específico de la diana; unir un ácido nucleico diana, cuando está presente, al reactivo de captura específico de la diana para formar un complejo; aislar el complejo que comprende el reactivo de captura específico de la diana y el ácido nucleico diana, cuando está presente, de la muestra de heces; eluir el ácido nucleico diana, cuando está presente, del complejo para producir una solución de ácido nucleico diana que comprende el ácido nucleico diana, cuando está presente; y repetir el procedimiento usando un reactivo de captura específico de la diana diferente. Los procedimientos son adecuados para muestras grandes, por ejemplo, que tengan una masa de al menos 4 gramos. Por otra parte, cada ácido nucleico diana eluido está suficientemente purificado, suficientemente concentrado y suficientemente exento de inhibidores de tal forma que cada ácido nucleico diana

eluido, cuando está presente, se detecta mediante PCR cuantitativa cuando la solución de ácido nucleico diana constituye hasta aproximadamente una tercera parte de un volumen de la PCR cuantitativa.

5 En algunos ejemplos de los procedimientos proporcionados, el ácido nucleico diana es un ácido nucleico diana humano. En los ejemplos adicionales, el ácido nucleico diana es un ADN. Aunque sin limitación debida al procedimiento por el cual el ácido nucleico se aísla de la muestra de heces, en algunos ejemplos, el reactivo de captura específico de la diana es un reactivo de captura de ácido nucleico específico de secuencia. En algunos ejemplos, el reactivo de captura de ácido nucleico específico de secuencia es un oligonucleótido y, en algunos ejemplos, el oligonucleótido está unido covalentemente a una partícula magnética o paramagnética. Algunos ejemplos proporcionan que se use un imán en la etapa de aislamiento y, en algunos ejemplos, se proporciona el aislamiento simultáneo de más de una diana usando múltiples reactivos de captura específicos de dianas en una única etapa de aislamiento.

10 El procedimiento no está limitado a los tipos de muestras que se van a procesar. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la muestra puede ser una muestra viscosa, por ejemplo, que tengan una viscosidad de más de diez centipoise en algunos ejemplos, y que tengan una viscosidad de más de veinte centipoise en algunos ejemplos. Además, las muestras tienen una amplia gama de tamaños. Los procedimientos se utilizan para procesar muestras que tienen, en algunos ejemplos, una masa superior a un gramo y, en algunos ejemplos, la muestra tiene una masa superior a cinco gramos.

15 La tecnología proporcionada en el presente documento se dirige a la eliminación de inhibidores de las muestras hasta por debajo una cantidad que inhiba un ensayo. Por lo tanto, en algunos ejemplos, el procedimiento proporciona que la solución de ácido nucleico comprenda una primera cantidad de inhibidor del ensayo que sea menor que una segunda cantidad de inhibidor del ensayo, donde la segunda cantidad del inhibidor del ensayo inhiben la PCR cuando cinco microlitros de la solución de ácido nucleico se usan en una PCR que tiene un volumen de veinticinco microlitros. En algunos ejemplos, la solución de ácido nucleico comprende una primera cantidad del inhibidor del ensayo que es menor de una segunda cantidad del inhibidor del ensayo, en el que la segunda cantidad del inhibidor del ensayo inhibe la PCR cuando un microlitros de la solución de ácido nucleico se usa en una PCR que tiene un volumen de veinticinco microlitros.

20 La tecnología está relacionada con el diagnóstico médico molecular en el que se interroga el estado, presencia, cantidad, secuencia, etc., de una sustancia biológica (por ejemplo, una molécula) para ayudar en la evaluación médica. Por consiguiente, en algunos ejemplos, el ácido nucleico diana se correlaciona con una patología seleccionada entre el conjunto que consiste en cáncer de colon y adenoma.

25 La tecnología descrita en el presente documento se proporciona en una forma de kit en algunos ejemplos -por ejemplo, se proporciona que la tecnología es un kit para aislar un ácido nucleico diana de una muestra que comprende un reactivo de captura que comprende un oligonucleótido unido covalentemente a una partícula magnética, un aparato para producir un campo magnético, polivinilpirrolidona, e instrucciones de uso. En algunos ejemplos, el kit comprende además una solución para homogeneización. En algunos ejemplos, el kit comprende además una solución para elución y, en algunos ejemplos, el kit comprende además tiocianato de guanidina. En algunos ejemplos, es conveniente que la polivinilpirrolidona esté en una forma premedida. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la polivinilpirrolidona se proporciona en un comprimido o cápsula. Algunos ejemplos del kit proporcionan un filtro de centrifugación para eliminar la polivinilpirrolidona.

30 En algunos ejemplos, el ácido nucleico diana se aísla usando un campo magnético. Como tal, los ejemplos de los kits descritos en el presente documento proporcionan un aparato que produce un campo magnético. Un dispositivo que se usa para producir un campo magnético adecuado para su uso con la tecnología proporcionada en el presente documento comprenden dos imanes o conjuntos de imanes, y sitúa el uno o más polos norte del primer imán o conjunto de imanes muy cerca de la muestra y el uno o más polos sur del segundo imán o conjunto de imanes muy cerca de la muestra. En algunos ejemplos, los kits proporcionan además un dispositivo para recoger una muestra, por ejemplo, un dispositivo que tiene un cuerpo y una cápsula de muestra desmontable unida al cuerpo, en la que la cápsula de muestra desmontable comprende un espacio para recogida de muestra adaptado para incluir una muestra (por ejemplo, como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos N°. 61/476,707).

35 En algunos ejemplos, el kit proporciona recipientes (por ejemplo, un tubo, un vial, un frasco, y similares) usados para procesar muestras y contener diferentes composiciones utilizadas para procesar muestras o que son el resultado del procesamiento de muestras. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el kit puede comprender además un recipiente en el que contener la muestra y, en algunos ejemplos, el kit comprende además un recipiente para contener el ácido nucleico diana aislado. El kit, en algunos ejemplos, se utiliza en un lugar diferente al de procesamiento de la muestra y/o donde el analito se analiza. Por consiguiente, en algunos ejemplos, el kit comprende además un recipiente para envío.

40 La tecnología proporcionada en el presente documento encuentra uso en sistemas para preparar un ácido nucleico a partir de una muestra. En algunos ejemplos, el sistema comprende polivinilpirrolidona para eliminar un inhibidor de la muestra, un reactivo para capturar un ácido nucleico diana de la muestra, y una funcionalidad para producir un campo magnético. En algunos ejemplos, el sistema comprende además una funcionalidad para recoger la muestra y en algunos ejemplos el sistema comprende además una funcionalizar para enviar la solución de ácido nucleico.

Otros ejemplos serán evidentes para las personas expertas en la técnica relevante basándose en las enseñanzas contenidas en el presente documento.

### **Breve descripción de los dibujos**

5 Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente tecnología se entenderán mejor con respecto a los siguientes dibujos:

La Figura 1 proporciona diagramas de aspectos del procedimiento de aislamiento de ácido nucleico. La Figura 1A proporciona un diagrama que muestra las etapas del procedimiento de aislamiento de ácido nucleico. La Figura 1B es un diagrama de flujo que muestra el procedimiento que es útil para la extracción secuencial de múltiples dianas a partir de la muestra como aspecto del procedimiento global de la Figura 1A.

10 La Figura 2 es una estructura química de la polivinilpirrolidona.

La Figura 3 es un dibujo de un filtro de centrifugación ilustrativo.

La Figura 4 es un dibujo que muestra una vista en despiece ordenado del filtro de centrifugación mostrado en la Figura 3.

15 La Figura 5 es una serie de dibujos que muestran los extremos inferiores de un filtro de centrifugación asociados con el filtro de centrifugación de las Figuras 3 y 4.

La Figura 5A es un dibujo de un extremo inferior discoidal sólido (por ejemplo, no poroso o no permeable); La Figura 5B es un dibujo de un extremo inferior discoidal poroso (permeable); La Figura 5C es un dibujo de un extremo inferior cónico poroso.

La Figura 6 es un dibujo de un filtro de centrifugación montado con un tubo de recogida.

20 La Figura 7 es un dibujo en sección del filtro de centrifugación representado en la Figura 6.

La Figura 8 es un dibujo de un filtro de centrifugación que comprende un cuerpo de un material poroso y un extremo inferior proporcionado mediante un soporte de filtro. La Figura 8A es una vista montada y la Figura 8B es una vista en despiece ordenado.

25 Las Figuras 9A-9D son representaciones gráficas que muestran la eliminación de inhibidores de una muestra de heces.

Las Figuras 10A-10D son representaciones gráficas que muestran que la filtración con centrifugación mejora la eliminación de inhibidores.

30 La Figura 11A es una representación gráfica de datos que comparan la eficacia de localización de la tecnología convencional para muestras que tengan viscosidades de 1 centipoise y 25 centipoise. La Figura 11B es una representación gráfica de datos que comparan la eficacia de localización del dispositivo de localización magnética proporcionado por Light y Miller (documento US 2012/0262260 A1) proporcionado para muestras que tienen viscosidades de 1 centipoise y 25 centipoise.

35 La Figura 12A es una representación gráfica que muestra los resultados de una PCR cuantitativa en la que una sola extracción de una muestra de heces recupera la mayoría del ADN diana. La Figura 12B muestra las concentraciones de Gen A y Gen V en soluciones de ácido nucleico procedentes de una primera extracción y una segunda extracción.

Las Figuras 13A - 13D muestran gráficas que muestran los resultados de PCR cuantitativas en las que las recuperaciones de cuatro ADN dianas son similares con independencia del orden en el que los cuatro ADN dianas se extrajeron de la muestra de heces.

40 La Figura 14 proporciona un diagrama que compara el flujo de trabajo de una realización (Proceso A) con un procedimiento ilustrativo para aislar ADN de muestras de heces usando etapas basadas en procedimientos existentes (Proceso B, véase, *por ejemplo*, el documento WO 2010/028382).

### **Descripción detallada**

45 La invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Las realizaciones de la descripción que no caen dentro del ámbito de dichas reivindicaciones de proporcionan solo para fines de ilustración y no forman parte de la presente invención.

50 La presente tecnología está relacionada con la producción de muestras de ADN y, en particular, a procedimientos para producir muestras de ADN que comprenden ácidos nucleicos muy purificados de baja abundancia en un pequeño volumen (por ejemplo, menos de 100, menos de 60 microlitros) y que están prácticamente y/o eficazmente exentos de sustancias que inhiben los ensayos usados para analizar las muestras de ADN (por ejemplo, PCR, INVADER, QuARTS, etc.). Dichas muestras de ADN son de utilidad en ensayos diagnósticos que detectan de forma cualitativa la presencia de, o que miden de forma cuantitativa, la actividad, expresión o cantidad de un gen, una variante genética (por ejemplo, un alelo), o una modificación genética (por ejemplo, metilación) presente en una muestra tomada de un paciente. Por ejemplo, algunos tipos de cáncer se han correlacionado con la presencia de alelos mutantes concretos o estados de metilación concretos y, por tanto, la detección y/o cuantificación de dichos alelos mutantes o estados de metilación tiene valor predictivo en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

60 Muchos marcadores genéticos valiosos están presentes en cantidades extremadamente pequeñas en muestras, y muchos de los eventos que producen dichos marcadores son raros. Por consiguiente, incluso procedimientos de detección sensibles tales como la PCR requieren una gran cantidad de ADN para proporcionar suficiente cantidad de una diana poco abundante para alcanzar o superar el umbral de detección del ensayo. Por otra parte, la presencia de

incluso bajas cantidades de sustancias inhibitoras alteran negativamente la exactitud y precisión de estos ensayos dirigidos a detectar dichas cantidades bajas de una diana. Por consiguiente, se proporcionan en el presente documento procedimientos que proporcionan la gestión de volumen y concentración necesaria para producir este tipo de muestras de ADN.

- 5 Algunas muestras biológicas, tales como muestras de heces, contienen una amplia diversidad de diferentes compuestos que son inhibidores de la PCR. Por lo tanto, los procedimientos de extracción de ADN incluyen procedimientos para eliminar y/o inactivar los inhibidores de la PCR. Como tal, se proporciona en el presente documento una tecnología relacionada con el procesamiento y preparación de las muestras y, en particular, pero no de forma exclusiva, a procedimientos, sistemas y kits para eliminar inhibidores de los ensayos de las muestras que comprenden ácidos nucleicos.

### **Definiciones**

Para facilitar la comprensión de la presente tecnología, se definen a continuación varios términos y frases. Se proporcionan definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

- 15 Tal como se usa en el presente documento, las palabras "un" o "uno" o "el" pueden significar uno o más uno. Por ejemplo, "un" artilugio puede significar un artilugio o una pluralidad de artilugios.

Tal como se usa en el presente documento, un "inhibidor" significa cualquier compuesto, sustancia o composición, o combinación de los mismos, que actúa para disminuir la actividad, precisión o exactitud de un ensayo, bien directa o indirectamente, con respecto a la actividad, precisión o exactitud del ensayo cuando el inhibidor está ausente. Un inhibidor puede ser una molécula, un átomo, o una combinación de moléculas o átomos sin carácter limitante.

- 20 Tal como se usa en el presente documento, el procedimiento de hacer pasar una mezcla por un filtro se denominad "filtración". El líquido producido después de filtrar una suspensión de un sólido en un líquido se denomina "filtrado", mientras que el sólido remanente en el filtro se denomina "retentato", "residuo", o "filtrando".

- 25 Tal como se usa en el presente documento, "insoluble" se refiere a la propiedad de una sustancia que no se disuelve prácticamente en agua y es esencialmente inmisible con ella. En la separación de una fase acuosa de una fase no acuosa, una sustancia no insoluble no se reparte en ni se repare junto con la fase acuosa.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a cualquier animal, tal como un perro, gato, ave, ganado, y especialmente a un mamífero, preferentemente un ser humano. En algunos casos, el sujeto es también un "usuario" (y, por tanto, el usuario es también el sujeto o paciente).

- 30 Tal como se usa en el presente documento, el término "muestras" y "espécimen" se utilizan indistintamente, y en el sentido más amplio. En un sentido, se entiende que muestra incluye un espécimen o cultivo obtenido de cualquier origen, así como muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas se pueden obtener de animales (incluidos los seres humanos) y abarcan fluidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras biológicas incluyen hemoderivados, tales como plasma, suero, heces, orina y similares. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como material de la superficie, suelo, lodo, fango, biopelículas, agua, cristales, y muestras industriales. Sin embargo, dichos ejemplos no deben tomarse como una limitación de los tipos de muestra.

- 35 El término "diana", cuando se usa en referencia a la captura de un ácido nucleico, la detección o el procedimiento de análisis, se refiere por lo general a un ácido nucleico que tiene un rasgo, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos particular que se debe detectar o analizar, *por ejemplo*, en una muestra con sospecha de contener el ácido nucleico diana. En algunos ejemplos, una diana es un ácido nucleico que tiene una secuencia particular para la que es deseable determinar un estado de metilación. Cuando se usa en referencia a la reacción en cadena de la polimerasa, "diana" se refiere por lo general a la región de ácido nucleico rodeado por los cebadores usados en la reacción en cadena de la polimerasa. Por lo tanto, se desea separar la "diana" de otras secuencias de ácidos nucleicos que puedan estar presentes en una muestra. Un "segmento" se define como una región de ácido nucleico dentro de la secuencia diana. La expresión "plantilla de ADN" se refiere a un ácido nucleico procedente de una muestra que se ha analizado para determinar la presencia de una diana.

- 40 Tal como se usa en el presente documento, el término "locus" se refiere a una posición determinada, *por ejemplo*, de una mutación, polimorfismo, o resto C en un dinucleótido CpG, dentro de una región o segmento de ácido nucleico definidos, tal como un gen o cualquier otra secuencia caracterizada en un cromosoma o molécula de ARN. Un locus no está limitado a ningún tamaño o longitud concreto, y se puede referir a una porción de un cromosoma, un gen, elemento genético funcional, o un único nucleótido o par de bases. Tal como se usa en el presente documento en referencia a los sitios CpG que pueden estar metilados, un locus se refiere al resto C del dinucleótido CpG.

- 45 Tal como se usa en el presente documento, un "líquido de recogida" es un líquido en el que introducir una muestra para conservar, estabilizar, y mantener de otra forma su integridad como una muestra representativa del espécimen del que se ha tomado la muestra. Aunque no está limitado en lo que respecta a los tipos de composiciones que son útiles como líquidos de recogida, los ejemplos de líquidos de recogida son tampones acuosos que comprenden de forma opcional un conservante y disolventes orgánicos, tales como acetonitrilo.

Tal como se usa en el presente documento, "un reactivo de captura" se refiere a cualquier agente que sea capaz de unirse a un analito (por ejemplo, una diana). Preferentemente, "un reactivo de captura" se refiere a cualquier agente que sea capaz de unirse específicamente a un analito, por ejemplo, que tenga una mayor afinidad de unión y/o especificidad de unión para el analito que para cualquier otro resto. Cualquier resto, tal como una célula, un orgánulo celular, una molécula inorgánica, una molécula orgánica y una mezcla o complejo de los mismos se puede usar como reactivo de captura si tiene la necesaria afinidad de unión y/o especificidad de unión para el analito. Los reactivos de captura pueden ser péptidos, proteínas, por ejemplo, anticuerpos o receptores, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, vitaminas, oligosacáridos, carbohidratos, lípidos, moléculas pequeñas, o un complejo de los mismos. Los reactivos de captura que comprenden ácidos nucleicos, por ejemplo, oligonucleótidos, pueden capturar un ácido nucleico diana mediante hibridación específica de secuencia (por ejemplo, mediante la formación de pares de bases de Watson-Crick convencionales), o mediante otras interacciones de unión. Cuando un oligonucleótido de captura se hibrida con un ácido nucleico diana, la hibridación puede implicar una porción del oligonucleótido, o la secuencia completa del oligonucleótido, y el oligonucleótido se puede unir a una porción o a la totalidad de la secuencia de ácido nucleico diana.

Tal como se usa en el presente documento, "PVP" se refiere a polivinilpirrolidona, que es un polímero soluble en agua fabricado a partir del monómero *N*-vinilpirrolidona. El término PVP se usa en el presente documento para referirse a la PVP en diferentes estados de polimerización reticulada, incluidas las preparaciones de PVP que también se pueden conocer en la técnica como polivinilpolipirrolidona (PVPP).

Tal como se usa en el presente documento, un "imán" es un material u objeto que genera un campo magnético. Un imán puede ser un imán permanente o un electroimán.

El término "amplificar" o "amplificación" en el contexto de ácidos nucleicos se refiere a la producción de múltiples copias de un polinucleótido, o de una parte de polinucleótido, de forma típica, partiendo de una pequeña cantidad del polinucleótido (por ejemplo, una única molécula de polinucleótido), donde los productos de la amplificación, o amplicones, se pueden detectar de forma general. La amplificación de los polinucleótidos abarca una variedad de procedimientos químicos y enzimáticos. La generación de múltiples copias de ADN a partir de una o unas pocas copias de una molécula de ADN diana o molde durante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o una reacción en cadena de la ligasa (LCR; véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 5.494.810) son formas de amplificación. Los tipos adicionales de amplificación incluyen, aunque no de forma limitativa, PCR específica de alelo (véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 5.639.611), la PCR con ensamblaje (véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 5.965.408), amplificación dependiente de helicasa (véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos n.º 7.662.594), PCR de inicio caliente (véanse, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos con números 5.773.258 y 5.338.671), PCR específica de intersecuencia, PCR inversa (véanse, *por ejemplo*, Triglia, y col. (1988) *Nucleic Acids Res.*, 16:8186), PCR mediada por ligadura (véase, *por ejemplo*, Guilfoyle, R. y col., *Nucleic Acids Research*, 25:1854-1858 (1997); la patente de Estados Unidos n.º 5.508.169), PCR específica de metilación (véase, *por ejemplo*, Herman, y col., (1996) *PNAS* 93(13) 9821-9826), PCR con minicebador, amplificación de sonda multiplexada dependiente de la ligadura (véase, *por ejemplo*, Schouten, y col., (2002) *Nucleic Acids Research* 30(12): e57), PCR multiplexada (véanse, *por ejemplo*, Chamberlain, y col., (1988) *Nucleic Acids Research* 16(23) 11141-11156; Ballabio, y col., (1990) *Human Genetics* 84(6) 571-573; Hayden, y col., (2008) *BMC Genetics* 9:80), PCR anidada, PCR con extensión por solapamiento (véase, *por ejemplo*, Higuchi, y col., (1988) *Nucleic Acids Research* 16(15) 7351-7367), PCR en tiempo real (véanse, *por ejemplo*, Higuchi, y col., (1992) *Biotechnology* 10:413-417; Higuchi, y col., (1993) *Biotechnology* 11:1026-1030), PCR con transcripción inversa (véase, *por ejemplo*, Bustin, S.A. (2000) *J. Molecular Endocrinology* 25:169-193, PCR en fase sólida, PCR entrelazada térmica asimétrica, y la PCR Touchdown (véase, *por ejemplo*, Don, y col., *Nucleic Acids Research* (1991) 19(14) 4008; Roux, K. (1994) *Biotechniques* 16(5) 812-814; Hecker, y col., (1996) *Biotechniques* 20(3) 478-485). La amplificación de los polinucleótidos también se puede llevar a cabo usando PCR digital (véanse, *por ejemplo*, Kalinina, y col., *Nucleic Acids Research*. 25; 1999-2004, (1997); Vogelstein y Kinzler, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 96; 9236-41, (1999); publicación de patente internacional n.º WO05023091A2; publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 20070202525).

La expresión "reacción en cadena de la polimerasa" ("PCR") se refiere al procedimiento de K.B. Mullis, patentes de Estados Unidos con números 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188, que describen un procedimiento para aumentar la concentración de un segmento de una secuencia diana en una mezcla de ADN genómico u otro ADN o ARN, sin clonación o purificación. Este procedimiento para amplificar la secuencia diana consiste en introducir un importante exceso de dos oligonucleótidos cebadores en la mezcla de ADN que contiene la secuencia diana deseada, seguido por una secuencia precisa de ciclación térmica en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios de sus respectivas hebras de la secuencia diana bicatenaria. Para realizar la amplificación, la mezcla se desnaturaliza, y los cebadores se hibridan con sus secuencias complementarias dentro de la molécula diana. Tras la hibridación, los cebadores se extienden con una polimerasa para formar un nuevo par de hebras complementarias. Las etapas de desnaturalización, hibridación de cebadores, y extensión con polimerasa se pueden repetir varias veces (es decir, la desnaturalización, la hibridación y la extensión constituyen un "ciclo"; puede haber numerosos "ciclos") para obtener una elevada concentración de un segmento amplificado de la secuencia diana deseada. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada se determina mediante las posiciones relativas de los cebadores entre sí y, por tanto, su longitud es un parámetro controlable. En virtud de los aspectos repetitivos del procedimiento, el procedimiento se denomina como la "reacción en cadena de la polimerasa" ("PCR"). Puesto que los segmentos amplificados deseados de la secuencia diana se convierten en las secuencias predominantes (en términos de

concentración) de la mezcla, se dice que están "amplificadas mediante PCR" y son "productos de PCR" o "amplicones". Los expertos en la materia entenderán que el término "PCR" abarca muchas variantes del procedimiento originalmente descrito que utilizan, por ejemplo, PCR en tiempo real, PCR anidada, PCR con transcripción inversa (RT-PCR), PCR de un solo cebador y con cebador arbitrario, etc.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ensayo de detección de ácidos nucleicos" se refiere a cualquier procedimiento para determinar la composición de nucleótidos de un ácido nucleico de interés. El ensayo de detección de ácidos nucleicos incluye, aunque no de forma limitativa, procedimientos de secuenciación de ADN, procedimientos de hibridación de sondas, ensayos de escisión específicos de la estructura (*por ejemplo*, el ensayo INVADER, (Hologic, Inc.) y se describen, *por ejemplo*, en las patentes de los Estados Unidos números 5.846.717, 5.985.557, 5.994.069, 6.001.567, 6.090.543 y 6.872.816; Lyamichev y col., Nat. Biotech., 17:292 (1999), Hall y col., PNAS, USA, 97:8272 (2000), y en el documento US 2009/0253142); procedimientos de escisión por emparejamiento enzimático incorrecto (por ejemplo, Variagenics, patentes de EE.UU. n.º 6.110.684, 5.958.692, 5.851.770); reacción en cadena de la polimerasa (PCR), anteriormente descrita; procedimientos de hibridación con ramificación (por ejemplo, Chiron, patentes de EE.UU. n.º 5.849.481, 5.710.264, 5.124.246 y 5.624.802); replicación con círculo rodante (por ejemplo, patentes de EE.UU. n.º 6.210.884, 6.183.960 y 6.235.502); NASBA (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 5.409.818); tecnología de baliza molecular (por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 6.150.097); tecnología E-sensor (Motorola, patentes de Estados Unidos con números 6.248.229, 6.221.583, 6.013.170 y 6.063.573); tecnología de sonda ciclante (por ejemplo, patentes de EE.UU. n.º 5.403.711, 5.011.769 y 5.660.988); procedimientos de amplificación de la señal Dade Behring (por ejemplo, patentes de EE.UU. n.º 6.121.001, 6.110.677, 5.914.230, 5.882.867 y 5.792.614); reacción en cadena de la ligasa (por ejemplo, Baranay Proc. Natl. Acad. Sci USA 88, 189-93 (1991)); y procedimientos de hibridación en sándwich (por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 5.288.609).

El ácido nucleico diana puede amplificarse (por ejemplo, mediante PCR) y el ácido nucleico amplificado se detecta simultáneamente usando un ensayo de escisión invasivo. Los ensayos configurado para llevar a cabo un ensayo de detección (por ejemplo, ensayo de escisión invasivo) junto con un ensayo de amplificación se describen en la publicación de patente de Estados Unidos US 20090253142 A1 (solicitud con n.º serie 12/404,240). Configuraciones adicionales de amplificación junto con detección invasiva mediante escisión, denominada procedimiento QuARTS, se describen en las solicitudes de patente de Estados Unidos con números de serie 12/946.737; 12/946.745; y 12/946.752.

La expresión "estructura de escisión invasiva" como se usa en el presente documento se refiere a una estructura de escisión que comprende i) un ácido nucleico diana, ii) un ácido nucleico en dirección 5' (por ejemplo, un oligonucleótido INVADER), y iii) un ácido nucleico en dirección 3' (por ejemplo, una sonda), donde los ácidos nucleicos en las direcciones 5' y 3' se hibridan a regiones contiguas del ácido nucleico diana, y donde se forma un solapamiento entre la porción 3' del ácido nucleico en dirección 3' y se forma un duplete entre el ácido nucleico en dirección 5' y el ácido nucleico diana. Se produce solapamiento cuando una o más bases de los ácidos nucleicos en las direcciones 5' y 3' ocupan la misma posición con respecto a una base del ácido nucleico diana, tanto si la una o varias bases solapantes son complementarias, o no, del ácido nucleico en dirección 5', y tanto si dichas bases son, o no son, bases naturales o bases no naturales. En La porción en 3' del ácido nucleico en dirección 5' que solapa con el duplete en dirección 3' puede ser un resto químico no base, tal como una estructura de anillo aromático, por ejemplo, según se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n.º 6.090.543. En algunos ejemplos, uno o más de los ácidos nucleicos diana pueden estar unidos entre sí, por ejemplo, mediante un enlace covalente tal como un tallo-bucle de ácido nucleico, o mediante un enlace químico de ácido no nucleico (por ejemplo, una cadena de varios átomos de carbono).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "complementario" o "complementariedad", usados en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) se refiere a polinucleótidos unidos por reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "5'-A-G-T-3'," es complementaria de la secuencia "3'-T-C-A-5'." La complementariedad puede ser "parcial", en la que solamente parte de las bases de los ácidos nucleicos están emparejadas según las reglas de emparejamiento de bases. O, puede existir una complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las hebras de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficacia y la intensidad de la hibridación entre las hebras de ácido nucleico. Esto es de especial importancia en las reacciones de amplificación, así como en procedimientos de detección que dependen de la unión entre ácidos nucleicos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, tanto de origen natural, como purificado mediante una reacción de digestión, o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario de una hebra de ácido nucleico (por ejemplo, en presencia de nucleótidos y de un agente inductor tal como un biocatalizador (por ejemplo, una ADN polimerasa o similar). De forma típica, el cebador es monocatenario para obtener la mayor eficacia de amplificación, aunque de forma alternativa, puede ser parcial o completamente bicatenario. La porción del cebador que se hibrida con un ácido nucleico molde es lo suficientemente larga como para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerá de muchos factores, entre los que se incluyen la temperatura, origen del cebador y el uso del procedimiento. Los cebadores pueden comprender marcas, etiquetas, resto de captura, etc.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere a cualquier molécula que contenga ácido nucleico, incluyendo pero no limitado a, ADN o ARN. La expresión abarca secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases de ADN y ARN conocidos, aunque no de forma limitativa, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridincitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetil-aminometiluracilo, dihidrouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metil-citosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxi-amino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N-isopenteniladenina, metiléster del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metil éster del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, y 2,6-diaminopurina.

Tal como se usa en el presente documento, el término "nucleobase" es sinónimo del resto de términos usados en la técnica que incluyen "nucleótido", "desoxinucleótido", "resto de nucleótido", "resto de desoxinucleótido", "trifosfato de nucleótido (NTP)", o trifosfato de desoxinucleótido (dNTP).

Un "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico que incluye al menos dos unidades monoméricas de ácido nucleico (por ejemplo, nucleótidos), de forma típica, más de tres unidades monoméricas, y de forma más típica, más de diez unidades monoméricas. El tamaño exacto de un oligonucleótido depende, por lo general, de varios factores, que incluyen la función o uso final del oligonucleótido. Como ilustración adicional, los oligonucleótidos suelen tener, de forma típica, menos de 200 restos de longitud (por ejemplo, entre 15 y 100), sin embargo, como se usa en el presente documento, también está previsto que el término abarque cadenas polinucleotídicas más largas. Los oligonucleótidos frecuentemente se denominan por su longitud. Por ejemplo, un oligonucleótido de 24 restos se denomina como un a "24-mero". Típicamente, los monómeros nucleosídicos están unidos por enlaces fosfodiésteres o análogos de los mismos, que incluyen fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidato, y similares, incluyendo los contraiones asociados, *por ejemplo*, H<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, y similares, si dichos contraiones están presentes. Además, los oligonucleótidos suelen ser monocatenarios. Los oligonucleótidos se preparan, de forma opcional, por cualquier procedimiento adecuado, incluyendo, aunque no de forma limitativa, el aislamiento de una secuencia existente o natural, replicación o amplificación del ADN, transcripción inversa, clonación digestión con restricción de las secuencias apropiadas, o síntesis química directa por un procedimiento tal como el procedimiento del fosfotriéster de Narang y col. (1979) Meth Enzymol. 68: 90-99; el procedimiento del fosfodiéster de Brown y col. (1979) Meth Enzymol. 68: 109-151; el procedimiento de la dietilfosforamidita de Beaucage y col. (1981) Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862; el procedimiento del triéster de Matteucci y col. (1981) J Am Chem Soc. 103:3185-3191; procedimientos de síntesis automatizados; o el procedimiento del soporte sólido de la patente de Estados Unidos n.º 4.458.066, titulada "PROCESS FOR PREPARING POLYNUCLEOTIDES", concedida el 3 de julio de 1984 a Caruthers y col., u otros procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

Una "secuencia" de un biopolímero se refiere al orden y la identidad de las unidades monoméricas (por ejemplo, nucleótidos, aminoácidos, etc.) en el biopolímero. La secuencia (por ejemplo, la secuencia de bases) de un ácido nucleico se lee de forma típica en la dirección 5' a 3'.

La expresión "tipo silvestre" se refiere a un gen o producto génico que tiene las características de dicho gen o producto génico cuando se aísla a partir de una fuente de origen natural. Un gen silvestre es aquel observado con mayor frecuencia en una población y, por tanto, es el que recibe la designación arbitraria de forma "normal" o "silvestre" del gen. Por el contrario, los términos "modificado", "mutante", y "variante" se refieren a un gen o producto génico que presenta modificaciones en la secuencia y/o en las propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen o producto génico silvestre o natural. Se resalta que los mutantes de origen natural se pueden aislar; estos se identifican por el hecho de que tienen características alteradas cuando se comparan con el gen o producto génico silvestre.

Tal como se usa en el presente documento, el término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que comprende las secuencias de codificación necesarias para la producción de un polipéptido, precursor, o ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido se puede codificar mediante una secuencia de codificación de longitud completa, o por cualquier porción de la secuencia de codificación siempre que se retenga la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligandos, transducción de la señal, inmunogenicidad, etc.) del polipéptido de longitud completa o fragmento. El término también abarca la región de codificación de un gen estructural y las secuencias situado junto a la región de codificación en ambos extremos 5' y 3' para una distancia de aproximadamente 1 Kb o más en cualquiera de los extremos, ya que el gen corresponde a la longitud de la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias situadas en 5' de la región de codificación y presentes en el ARNm se denominan como secuencias 5' no traducidas. Las secuencias situadas en 3' o después de la región de codificación y presentes en el ARNm se denominan secuencias 3' no traducidas. El término "gen" abarca tanto ADNc como las formas genómicas de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región de codificación interrumpida por secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intervinientes" o "secuencias intervinientes". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN nuclear (por ejemplo, hnARN); los intrones pueden contener elementos reguladores (por ejemplo, potenciadores). Los intrones se eliminan

o "retiran por corte y empalme" del transcrito nuclear o primario; por tanto, los intrones están ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm actúa durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de los aminoácidos en el polipéptido nascente.

5 Además de contener intrones, las formas genómicas de un gen también pueden incluir secuencias situadas en ambos extremos 5' y 3' de las secuencias que están presentes en el transcrito de ARN. Estas secuencias se denominan como secuencias o regiones "flanqueantes" (estas secuencias flanqueantes están situadas en 5' o 3' respecto a las secuencias no traducidas presentes en el transcrito de ARN). La región flanqueante en 5' puede contener secuencias reguladoras tales como promotores y potenciadores que controlan o alteran la transcripción del gen. La región flanqueante 3' puede contener las secuencias que dirigir la terminación o la transcripción, la escisión posterior a la transcripción y la poliadenilación.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "kit" se refiere a cualquier sistema de administración para administrar materiales. En el contexto de los sistemas de purificación y ensayos de reacción de ácidos nucleicos, dichos sistemas de administración incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte o administración de reactivos y dispositivos (por ejemplo, adsorbentes de inhibidores, partículas, desnaturizantes, oligonucleótidos, filtros de centrifugación etc. en los recipientes adecuados) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones por escrito para llevar a cabo un procedimiento, etc.) de un sitio a otro. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más recipientes (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de reacción y/o materiales de soporte más importantes. Tal como se usa en el presente documento, el término "kit fragmentado" se refiere a un sistema de administración que comprende dos o más recipientes separados, donde cada uno contiene una subparte de la totalidad de los componentes del kit. Los recipientes se pueden suministrar al recipiente previsto juntos o por separado. Por ejemplo, un primer recipiente puede contener los materiales para la recogida de muestras y un tampón, mientras que un segundo recipiente contiene oligonucleótidos de captura y un desnaturizante. La expresión "kit fragmentado" pretende abarcar kits que contienen reactivos específicos de análisis (ASR, por sus siglas en inglés) regulados de conformidad al artículo 520(e) de la ley federal estadounidense de alimentos, fármacos y productos cosméticos [Federal Food, Drug, and Cosmetic Act], pero no está limitada a estos. De hecho, cualquier sistema de administración que comprenda dos o más recipientes separados, donde cada uno contiene una subparte de la totalidad de los componentes del kit, está incluida en la expresión "kit fragmentado". Por el contrario, un "kit combinado" se refiere a un sistema de administración que contiene todos los componentes de un ensayo de reacción en un solo recipiente (por ejemplo, en una sola caja que aloja cada uno de los componentes deseados). El término "kit" incluye tanto kits fragmentados como kits combinados.

15 El término "sistema" como se usa en el presente documento se refiere a una colección de artículos para su uso con un fin específico. En algunos ejemplos, los artículos comprenden instrucciones de uso, como información facilitada, por ejemplo, sobre un artículo, en soporte papel, o en un medio grabable (por ejemplo, disquete, CD, unidad de memoria flash, etc.). En algunos ejemplos, las instrucciones dirigen a un usuario a una ubicación en línea, *por ejemplo*, un sitio web.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "información" se refiere a cualquier colección de hechos o datos. En referencia a la información almacenada o procesada usando uno o varios sistemas informáticos, que incluye pero que no se limita a internet, el término se refiere a cualquier dato almacenado en cualquier formato (por ejemplo, analógico, digital, óptico, etc.). Tal como se usa en el presente documento, la expresión "información relacionada con un sujeto" se refiere a hechos o datos pertenecientes a un sujeto (por ejemplo, un ser humano, planta o animal). La expresión "información genómica" se refiere a información que pertenece a un genoma que incluye, aunque no de forma limitativa, secuencias de ácidos nucleicos, genes, porcentaje de metilación, frecuencias de alelos, niveles de expresión del ARN, expresión de proteínas, expresión de fenotipos correlacionados con genotipos, etc. "Información sobre frecuencias de alelos" se refiere a hechos o datos que pertenecen a frecuencias alélicas, incluyendo, aunque no de forma limitativa, identidades de alelos, correlaciones estadísticas entre la presencia de un alelo y una característica de un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano), la presencia o ausencia de un alelo en un individuo o población, la posibilidad porcentual de que un alelo esté presente en un individuo que tenga una o más características particulares, etc.

### Ejemplos de la tecnología

25 Aunque la divulgación del presente documento se refiere a determinados ejemplos ilustrados, se debe entender que estos ejemplos se presentan a modo de ejemplo y no como limitación.

### 1. Procedimientos generales

30 En el presente documento se proporcionan procedimientos para aislar ADN, por ejemplo, a partir de una muestra de heces. Como se resume en la Figura 1, el procedimiento comprende homogeneizar una muestra (por ejemplo, una muestra de heces) en un tampón adecuado y preparar un sobrenadante a partir del homogenado. El sobrenadante se trata con una composición (por ejemplo, una polivinilpirrolidona (PVP) reticulada tal como polivinilpolipirrolidona (PVPP)) para eliminar los inhibidores y producir un sobrenadante clarificado. El ADN del sobrenadante clarificado se desnaturiza, por ejemplo, añadiendo tiocianato de guanidina (GTC) y/o calentando la muestra. Después, un reactivo de captura de la diana, por ejemplo, una perla magnética a la que está unida un oligonucleótido complementario de la

diana, se añade a lo anterior, y la solución se incuba en condiciones (por ejemplo, temperatura ambiente durante una hora) que favorecen la asociación (por ejemplo, mediante hibridación) de la diana con el reactivo de captura para producir un complejo diana:reactivo de captura. Tras aislar y eliminar el complejo diana:reactivo de captura (por ejemplo, mediante la aplicación de un campo magnético), la solución resultante se vuelve a calentar para desnaturalizar el ADN remanente de sobrenadante clarificado y se puede añadir otro reactivo de captura de la diana para aislar otra diana. El procedimiento se puede repetir, por ejemplo, al menos cuatro veces, para aislar tantas dianas como requiera el ensayo (por ejemplo, una extracción secuencial o en serie). Los complejos diana:reactivo de captura aislados en cada etapa de captura y aislamiento se lavan, y los ADN diana se eluyen usando un pequeño volumen de tampón adecuado para el análisis posterior.

## 2. Eliminación de inhibidores

La muestra puede ser una muestra de material que contiene impurezas que descomponen los ácidos nucleicos o inhiben las reacciones enzimáticas. En particular, dichas impurezas inhiben la actividad catalítica de las enzimas que interactúan con ácidos nucleicos, por ejemplo, nucleasas tales como endonucleasas de restricción, transcriptasas inversas, ácido nucleico polimerasas, ligasas, etc., especialmente las enzimas que se utilizan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), LCR (reacción en cadena de la ligasa), TMA (amplificación mediada por transcripción), NASBA (ampliación específica de bases del ácido nucleico), 3SR (replicación de secuencia automantenida), y similares.

### 2.1 PVP

En algunos ejemplos, los inhibidores de una muestra se eliminan por tratamiento con polivinilpirrolidona (véase además, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 61//485,338). La polivinilpirrolidona (PVP) es un polímero soluble en agua fabricado a partir del monómero *N*-vinilpirrolidona (véase la Figura 2). La polivinilpolipirrolidona (PVPP) es una modificación de la PVP fuertemente reticulada. La extensión de la reticulación varía y no existe umbral definido que establezca una división entre la PVP y la PVPP. Por consiguiente, el término PVP se usa en el presente documento para referirse a la PVP en diferentes estados de polimerización reticulada, incluidas las preparaciones de PVP que también se pueden conocer en la técnica como PVPP. Una propiedad importante, sin embargo, es que a medida que la extensión de la reticulación aumenta, el polímero se vuelve cada vez más insoluble en agua. Las formas reticuladas absorben agua, que da lugar a que el polímero se hinche. La síntesis y las propiedades físicas de la PVP y la PVPP son bien conocidas en la materia (por ejemplo, véase Haaf, Sanner, y Straub. *Polymers of N-vinylpyrrolidone: synthesis, characterization, and uses*. *Polymer J.* 17(1): 143(1985)).

La PVP se ha usado en muchas aplicaciones técnicas que incluyen su uso como expansor del plasma; como aglutinante en muchos comprimidos farmacéuticos; como adhesivo en barras de pegamento y comidas calientes; como aditivo para baterías, cerámica, fibra de vidrio, tintas, papel para impresoras de chorro de tinta y en los procedimientos químicomecánicos de alisamiento de superficies; como emulsionante y disgregante para la polimerización en solución; como fotorresistente; para la producción de membranas, tales como filtros de diálisis y para la purificación de aguas; como agente espesante en geles de blanqueamiento dental, etc.

La PVP también ha encontrado utilidad en la unión de impurezas y su eliminación de las soluciones, especialmente en la fabricación de vino y de cerveza para eliminar los polifenoles (véase, por ejemplo, Redmanji, Gopal, y Mola. *A novel stabilization of beer with Polyclar Brewbrite*. *MBAA TQ* 39(1): 24 (2002)). El uso de formas solubles e insolubles de la PVP se ha descrito con respecto al procesamiento de muestras biológicas, por ejemplo, como forma de neutralizar fenoles (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N° 7.005.266; Shames, y col. *Identification of widespread Helicobacter hepaticus infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay*. *J. Clin. Microbiol.* 33(11): 2968 (1995); Morgan y col. *Comparison of PCR and microscopy for detection of Cryptosporidium parvum in human fecal specimens: Clinical trial*. *J. Clin. Microbiol.* 36(4): 995 (1998)).

La PVP se proporciona en formas que permitan su introducción en una muestra que se va a procesar, por ejemplo, en forma de polvo, suspensión acuosa, suspensión, en gránulos, y similares. En algunos ejemplos de la tecnología proporcionada en el presente documento, la PVP se proporciona premedida en una forma lista para el uso. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la PVP se comprime en un comprimido que comprende la masa de PVP apropiada para tratar una muestra. Se proporcionan diferentes formas y tamaños de comprimidos para diferentes volúmenes y tipos de muestras. Se pueden a los comprimidos aglutinantes inertes, cargas, y otras composiciones, para proporcionar la estabilidad física, térmica, química y biológica, o para proporcionar otras características deseadas tales como la dispersión mejorada dentro de la muestra o la liberación controlada.

Tanto el grado de reticulación como el tamaño de las partículas de PVP son parámetros que afectan a los ensayos posteriores de las preparaciones de ácido nucleico resultantes. Por ejemplo, se ha descubierto que la PVP soluble inhibe algunos ensayos posteriores. Por consiguiente, el procedimiento se beneficia del uso de una PVP que sea suficientemente insoluble (por ejemplo, suficientemente reticulada) para permitir la adecuada eliminación de la PVP en las etapas de procesamiento posteriores (por ejemplo, centrifugación y/o filtración con centrifugación). Además, cuando las partículas de PVP reticulada son demasiado pequeñas, se empaquetan de forma demasiado compacta en la columna de centrifugación y restringen el flujo de efluente desde la muestra al espacio de recogida de la columna de centrifugación. Por ejemplo, los experimentos realizados durante el desarrollo de algunas realizaciones de la presente tecnología demostraron que una PVP que tiene un tamaño promedio de partícula de 100-130 micrómetros

produjo resultados satisfactorios, mientras que una PVP que tiene un tamaño promedio de partícula de 30-50 micrómetros produjo restricciones en el flujo y en la filtración. Otra experimentación puede indicar que otros tamaños y solubilidades pueden ser apropiados.

## 2.2 Filtro de centrifugación

5 La tecnología proporcionada en el presente documento abarca el uso de un filtro de centrifugación, por ejemplos, como se proporciona en la solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 61/485,214 para filtrar las muestras tratadas con PVP para eliminar los inhibidores unidos a la PVP. Como se ha analizado anteriormente, durante el desarrollo del procedimiento de tratamiento con PVP, los experimentos demostraron que las columnas de centrifugación convencionales que tienen un filtro de fritas en el extremo inferior quedan obturadas en algunas condiciones. Por consiguiente, algunos ejemplos de la tecnología comprende el uso de un filtro de centrifugación resistente a obturación. Las Figuras 3-8 representan gráficamente varias configuraciones de un filtro de centrifugación resistente a obturación en vistas ensambladas y en despiece ordenado y asociado a un tubo de recogida. El filtro resistente a obturación está diseñado para que la muestra se filtre a través de las paredes del cuerpo si el extremo inferior queda obturado con residuos de la muestra.

15 Los filtros de centrifugación adecuados para su uso con la tecnología proporcionada en el presente documento están fabricados generalmente a partir de un material que es inerte con respecto a la muestra, -esto es, el material no reacciona ni contamina o modifica la muestra de otra forma, salvo filtrándola, de una forma que afecte a un posterior ensayo (por ejemplo, produzca la degradación de la muestra, cause su descomposición, o similares). Un ejemplo de este tipo de material es polietileno. Otros materiales adecuados son, por ejemplo, nailon, acetato de celulosa, politetrafluoroetileno (PTFE, también conocido como Teflon), poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), poliéster, y poliétersulfona. La presión de operación, las características físicas y químicas de la composición a filtrar, el tamaño de la entidad a eliminar de la muestra, y las propiedades mecánicas del material (por ejemplo, capacidad para soportar la centrifugación a la velocidad necesaria para la aplicación de filtración) son factores que se consideran al seleccionar un filtro de centrifugación adecuado.

25 Los filtros se fabrican para que tengan diferentes tamaños de poro adecuados para diferentes aplicaciones de filtración. Por ejemplo, se reconoce de forma general que un filtro con un tamaño de poro de 0,2 micrómetros elimina la mayoría de las bacterias mientras que son necesarios tamaños de poro más pequeños para eliminar virus y esporas bacterianas. Para eliminar material en forma de partículas de mayor tamaño, un tamaño de poro más grande. Por ejemplo, aunque un aspecto de la tecnología proporcionada en el presente documento utiliza un filtro de centrifugación que tiene un tamaño de poro de 20 micrómetros, otros tamaños de poro que son de utilidad en las aplicaciones de filtración son 0,22, 0,45, 10, 20, 30, y 45 micrómetros. Por consiguiente, se consideran tamaños de poro mayores y menores, así como los tamaños de poro intermedio comprendidos en los intervalos delimitados por estos valores concretos. En algunas aplicaciones de filtración, el filtro se caracteriza por el peso molecular medio de las moléculas que quedan retenidas en el filtro. Por ejemplo, un filtro con un corte de peso molecular (MWCO) de 5.000 Da está diseñado para retener moléculas y complejos que tengan al menos un peso molecular de aproximadamente 5.000 Da. Los filtros pueden proporcionar MWCO de 10.000 Da; 30.000 Da; 50.000 Da; 100.000 Da, y otros límites necesarios para la tarea de filtración. La presión de funcionamiento y el tamaño de la entidad a eliminar de la muestra son factores a considerar cuando se selecciona un tamaño de poro o un valor de corte.

## 3. Captura de ácido nucleico

40 Los ácidos nucleicos diana se capturan usando un reactivo de captura de la diana específico de secuencia, por ejemplo, una perla magnética a la que está unida un oligonucleótido complementario de la diana. Tras añadir el reactivo de captura, la solución se incuba en condiciones que favorecen la asociación (por ejemplo, mediante hibridación) de la diana con el reactivo de captura para producir un complejo diana:reactivo de captura. Tras aislar y eliminar el complejo diana:reactivo de captura (por ejemplo, mediante la aplicación de un campo magnético), la solución resultante se vuelve a calentar para desnaturalizar el ADN remanente de sobrenadante clarificado y se puede añadir otro reactivo de captura de la diana para aislar otra diana (por ejemplo, mediante hibridación y aplicación de un campo magnético). El procedimiento se puede repetir, por ejemplo, al menos cuatro veces, para aislar tantas dianas como requiera el ensayo. Asimismo, se puede aislar más de una diana en una etapa de captura usando un reactivo de captura que comprende múltiples secuencias de captura.

### 3.1 Reactivos de captura

55 En un aspecto, los procedimientos proporcionados en el presente documento se refieren al uso de reactivos de captura. Dichos reactivos son moléculas, restos, sustancias o composiciones que preferentemente (por ejemplo, de forma específica y selectiva) interactúan con una diana particular que se desea aislar y purificar. En la presente tecnología se utiliza cualquier reactivo de captura que tenga la afinidad y/o especificidad de unión deseada para el análisis diana. Por ejemplo, en algunos ejemplos, el reactivo de captura puede ser una macromolécula tal como un péptido, una proteína (por ejemplo, un anticuerpo o un receptor), un oligonucleótido, un ácido nucleico, (por ejemplo, ácidos nucleicos capaces de hibridarse con los ácidos nucleicos diana), una vitamina, un oligosacárido, un hidrato de carbono, un lípido, o una molécula pequeña, o un complejo de los mismos. Como ejemplos ilustrativos y no limitativos, se puede usar un reactivo de captura de la diana de avidina para aislar y purificar dianas que comprenden un resto

biotina, se puede usar un anticuerpo para aislar y purificar dianas que comprenden el antígeno o epítipo adecuado, y se puede usar un oligonucleótido para aislar y purificar un oligonucleótido complementario (por ejemplo, se puede usar un poli-dT oligonucleótido para aislar y purificar dianas que comprenden una cola poli-A).

5 Cualesquiera ácidos nucleicos, incluidos ácidos nucleicos monocatenarios, bicatenarios y de triple cadena, que se pueden unir, o unirse específicamente, a la diana, se usan como el reactivo de captura del presente dispositivo. Los ejemplos de dichos ácidos nucleicos incluyen ADN, tales como las formas de ADN A, B o Z, y ARN tales como ARNm, ARNt y ARNr, aptámeros, ácidos péptidonucleicos, y otras modificaciones en el azúcar, el fosfato o la base nucleosídica. Por lo tanto, existen muchas estrategias para capturar una diana y, por consiguiente, los expertos en la materia conocen muchos reactivos de captura. Aunque sin limitación en lo que respecta a los medios por los que se puede capturar un ácido nucleico diana, los ejemplos de la tecnología proporcionada en el presente documento comprenden el uso de un oligonucleótido que es complementario de la diana y que por tanto captura la diana mediante hibridación específica y selectiva con el ácido nucleico diana.

10 Además, los reactivos de captura de la diana comprenden una funcionalidad para localizar, concentrar, agregar, etc. el reactivo de captura y proporcionar, de esta forma, una manera de aislar y purificar la diana cuando se captura (por ejemplo, se une, se hibrida, etc.) con el reactivo de captura, por ejemplo, cuando se forma un complejo diana:reactivo de captura. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la porción del reactivo de captura de la diana que interactúa con la diana (por ejemplo, el oligonucleótido) puede estar unido a un soporte sólido (por ejemplo, una perla, superficie, resina, columna) que permite la manipulación por el usuario en una escala macroscópica. A menudo, el soporte sólido permite el uso de un medio mecánico para aislar y purificar el complejo diana:reactivo de captura a partir de una solución heterogénea. Por ejemplo, cuando está unido a una perla, la separación se consigue retirando la perla de la solución heterogénea, por ejemplo, mediante el movimiento físico. En ejemplos en los que la perla es magnética o paramagnéticas o magnética, se utiliza un campo eléctrico para conseguir la separación física del reactivo de captura (y, por tanto, de la diana) de la solución heterogénea. Las perlas magnéticas usadas para aislar dianas se han descrito en la técnica, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.648.124 y en la solicitud de patente europea n.º 87309308.

25 En algunos ejemplos, el componente del reactivo de captura que interactúa con la diana (por ejemplo, un oligonucleótido) se une covalentemente al componente del reactivo de captura que proporciona la localización, concentración y/o agregación (por ejemplo, la perla magnética) del complejo diana:reactivo de captura. Los ejemplos de dichos reactivos de captura unirse covalentemente se proporcionan en Stone, y col. ("Detection of rRNA from four respiratory pathogens using an automated Q $\beta$  replicase assay", *Molecular and Cellular Probes* 10: 359-370 (1996)). Estos reactivos de captura unirse covalentemente son de utilidad en el aislamiento secuencial de múltiples dianas específicas a partir de la misma preparación de la muestra. Por otra parte, estos reactivos de captura proporcionan el aislamiento de las dianas de ADN sin muchos de los problemas que están asociados a otros procedimientos. Por ejemplo, el uso de una perla de estreptavidina convencional para capturar una diana biotinilada resulta ser un problema para procesar muestras que comprenden grandes cantidades de biotina libre (por ejemplo, una muestra de heces) porque la biotina libre interfiere con el aislamiento de la diana.

### 3.2 Localizador de perlas magnéticas

40 Los complejos de diana:reactivo de captura se capturan usando un localizador de perlas magnéticas. Sin embargo, la viscosidad de la muestra puede tener un efecto importante sobre la eficacia de localización debido al arrastre viscoso que afecta a las micropartículas magnéticas. Las muestras de heces tienen viscosidades comprendidas entre 20 centipoise y 40 centipoise, mientras que, como referencia, el agua a 20°C tiene una viscosidad de aproximadamente 1 centipoise y la miel a 20°C tiene una viscosidad de aproximadamente 3.000 centipoise. Por lo tanto, en algunas aplicaciones, se pueden preferir campos magnéticos intensos para proporcionar un aislamiento más eficaz.

45 Se ha descubierto que se obtienen aislamientos especialmente eficaces usando dispositivos magnéticos que tienen disposiciones especiales de los imanes. Por ejemplo, una disposición especialmente eficaz proporciona dos conjuntos de imanes dispuestos de forma circular en capas paralelas planas alrededor de la muestra, donde todos los imanes de una capa están orientados con sus polos norte hacia la muestra y todos los imanes de la otra capa están orientados con sus polos sur hacia la muestra (es decir, la configuración "N-S", en oposición a otras orientaciones tales como la orientación "N-N", en la que todos los polos norte o todos los polos sur de ambas capas están orientados hacia la muestra). Un ejemplo de dicho dispositivo se proporciona en Light y Miller, US 2012/0262260 A1 ("Magnetic Microparticle Localization Device"). En algunas configuraciones, los imanes del dispositivo están dispuestos alrededor de un orificio en el que se introduce un tubo de muestra (por ejemplo, un tubo cónico de 50 mililitros), de forma que producen un flujo magnético en la muestra. El flujo magnético consigue el movimiento de las partículas magnéticas de la solución de forma que se agregan, concentran y/o aíslan en una zona del tubo que facilita su retirada para recuperar el ADN diana (Light, *supra*).

55 Se ha demostrado que dichos dispositivos son especialmente eficaces para la localización de partículas magnéticas en muestras grandes y viscosas (por ejemplo, muestras de heces) y por tanto son útiles para el aislamiento de ADN a partir de este tipo de muestras (Light, *supra*). Por ejemplo, las Figuras 11A y 11B muestran el efecto de la viscosidad de la muestra sobre el aclaramiento de las perlas magnéticas de soluciones de 1 o 25 centipoise de viscosidad usando tecnología magnética convencional (11A) o la tecnología de localización magnética de Light y Miller (11B) (Light,

60

*supra*). En los gráficos mostrados, una disminución en la absorbancia indica una menor concentración de micropartículas suspendidas en una solución. Los datos recogidos de las soluciones de 25 centipoise se muestran con cuadrados (■) y los datos recogidos para la solución de 1 centipoise se muestran con rombos (◆). Estos gráficos muestran que el aumento de viscosidad ralentiza la separación de manera muy importante cuando se utiliza tecnología convencional, mientras que el dispositivo de localización de partículas magnéticas de Light y Miller aclara la solución más viscosa con solamente una pequeña reducción en la velocidad.

Las químicas y procedimientos anteriormente descritos, cuando se usan en combinación, proporcionan un sistema para el aislamiento de ácidos nucleicos de muestras complejas e inhibitoras, tales como muestras de heces, que es significativamente más rápido que los procedimientos utilizados previamente. Por otra parte, el sistema produce preparaciones de ácido nucleico que están sustancialmente más exentas de sustancias inhibitoras y dan como resultado un mayor rendimiento del ácido nucleico diana para, por ejemplo, ensayo diagnóstico. Además, los ejemplos de este sistema se integran fácilmente en el flujo de trabajo del laboratorio para procesar eficazmente las muestras para su uso en cualquier análisis o tecnología de detección posterior. Una comparación del flujos de trabajo, línea de tiempo y rendimientos del procedimiento de un ejemplo del presente sistema y un sistema convencional ilustrativo se muestra en la Figura 14.

#### 4. Kits

Los kits se contemplan en la tecnología proporcionada en el presente documento. Los kits comprenden composiciones, dispositivos, aparatos, etc. descritos en el presente documento, e instrucciones para el uso del kit. Dichas instrucciones describen procedimientos adecuados para preparar un analito a partir de una muestra, por ejemplo, para recoger una muestra y preparar un ácido nucleico a partir de la muestra. Los componentes individuales del kit se envasan en recipientes y envases adecuados (por ejemplo, viales, cajas, envases blíster, ampollas, botellas, frascos, tubos y similares) y los componentes se envasan juntos en un envase adecuado (por ejemplo, una caja o cajas) para almacenamiento cómodo, su envío, y/o su uso por el usuario del kit. Se entiende que los componentes líquidos (por ejemplo, un tampón) se pueden proporcionar en forma liofilizada a reconstituir por el usuario. Los kits pueden incluir un control o de referencia para su evaluación, validación y/o garantía del comportamiento del kit. Por ejemplo, un kit para analizar la cantidad de un ácido nucleico presente en una muestra puede incluir un control que comprende una concentración conocida de la misma o de otro ácido nucleico para comparación y, en algunos ejemplos, un agente de detección (por ejemplo, un cebador) específico del ácido nucleico del control. Los kits son adecuados para su uso en un escenario clínico y, en algunos ejemplos, para su uso en el domicilio del usuario. Los componentes de un kit, en algunos ejemplos, proporcionan las funcionalidades de un sistema para preparar una solución de ácido nucleico a partir de una muestra. En algunos ejemplos, el usuario proporciona determinados componentes del sistema.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento, se demostró que la PVP (por ejemplo, PVPP) elimina los inhibidores de la PCR de una muestra de heces (véase la Figura 9). Se tomaron volúmenes de 20 mililitros de los sobrenadantes de dos muestras diferentes de sobrenadantes de heces. Para cada muestra de heces, una alícuota se trató con PVP y la otra se dejó sin tratar. Por otra parte, las muestras se procesaron de forma idéntica para capturar dos ácidos nucleicos diana diferentes (Figura 9, Gen A y Gen V). Tras la captura y elución final, se controlaron las recuperaciones de las dos dianas mediante un ensayo de PCR cuantitativa (qPCR) SYBR Green usando 1 microlitro de eluato en un volumen de reacción de 25 microlitros. Para ambas dianas procedentes de ambos sobrenadantes de heces, las alícuotas tratadas con PVP se amplificaron mientras que las alícuotas no tratadas no produjeron ninguna señal qPCR. Estos resultados demuestran la necesidad y la eficacia de la PVP como tratamiento de eliminación de inhibidores cuando se extrae ADN de muestras de heces para su análisis de un ensayo de PCR cuantitativa.

##### Ejemplo 2

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento, se recopilaron datos que demuestran que la filtración con centrifugación mejora la eliminación de inhibidores de la PCR. El experimento comparó PVP (por ejemplo, PVPP) de diferentes tamaños con respecto a su capacidad para eliminar inhibidores de la PCR de muestras de sobrenadantes de heces. Se compararon dos composiciones de PVP comercialmente disponibles: Polyclar® 10 y Polypladone® XL, que están compuestas por partículas de PVP que tienen un diámetro medio de 30-50 micrómetros y 100-130 micrómetros, respectivamente. La eliminación de inhibidores mediante las dos composiciones de PVP se evaluó mediante qPCR, en la que 1 microlitro o 5 microlitros de los eluatos de ADN aislado se usaron en un volumen de reacción de 25 microlitros. Primero, ambos tipos de PVP se separaron del sobrenadante de heces por aglomeración (centrifugación). Para ambos tipos de PVP, las muestras mostraron una curva de recuperación y amplificación de igual forma cuando 1 microlitro del ADN eluido se añadió a la qPCR. Sin embargo, el uso de 5 microlitros de eluato no consiguió producir ninguna señal en la qPCR, lo que indica que los inhibidores de la PCR permanecían en la muestra (véanse las Figuras 10A y 10B).

A continuación, se ensayó la filtración en columna de centrifugación como procedimiento alternativo para separar la

PVP del sobrenadante de heces. La PVP de menor tamaño no se pudo procesar de esta manera, porque la PVP aparentemente se empaquetó tan estrechamente en la columna de centrifugación que el líquido sobrenadante de heces no pudo pasar a su través. Sin embargo, la PVP con el tamaño de partículas más grandes no experimentó este mismo problema, y la preparación se pudo filtrar por centrifugación fácilmente. La columna de centrifugación contenía una frita de polietileno (tamaño de poro nominal de 20 micrómetros) para recoger la PVP. Cuando se separó la PVP con el tamaño de partículas más grandes del sobrenadante de heces mediante una columna de filtración con centrifugación provista de una frita de polietileno, el volumen de eluato en la qPCR se pudo incrementar a 5 microlitros o 6 microlitros sin inhibición evidente (véanse las Figuras 10C y 10D). Como se muestra en la Tabla 1, cuando se utilizan 5 o 6 microlitros de eluato, el número de hebras calculado fue aproximadamente cinco o seis veces el número de hebras calculado cuando se utilizó 1 microlitro de eluato. Estos resultados demuestran las ventajas del tratamiento con PVP junto con la filtración en columna con centrifugación para eliminar los inhibidores de la PCR de muestras de heces.

TABLA 1

Tratamiento	Volumen	Hebras	% Esperado
PVPP 30-50 Sin filtro de centrifugación	1 µl	950	
	5 µl	Sin señal (inhibición completa)	0
PVPP 100-130 Sin filtro de centrifugación	1 µl	907	
	5 µl	Sin señal (inhibición completa)	0
PVPP 100-130 Con filtro de centrifugación	1 µl	1136	
	5 µl	6751	119
PVPP 100-130 Con filtro de centrifugación	1 µl	3110	
	6 µl	18600	99,68

### Ejemplo 3

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento, se realizaron experimentos para comparar las eficacias de localización de la tecnología convencional (por ejemplo, un Promega PolyA Tract respaldado por un imán de neodimio N52 con 1 pulgada (2,54 cm) de diámetro exterior x 1 pulgada (2,54 cm) de espesor) y el dispositivo localizador de micropartículas magnéticas de Light y Miller (imanes de neodimio calidad N52 en la configuración S-N) para muestras de viscosidad baja (es decir, 1 centipoise) y alta (es decir, 25 centipoise).

Soluciones de ensayo de viscosidad adecuada (por ejemplo, 1 o 25 centipoise) se introdujeron en un dispositivo convencional o un dispositivo de la tecnología proporcionada en el presente documento para su análisis. Las muestras se expusieron al campo magnético, el líquido se aspiró en los intervalos de tiempo indicados para cada muestra, y las partículas remanentes en suspensión se cuantificaron por espectrometría. Una disminución en la absorbancia indica una menor concentración de micropartículas suspendidas en una solución (es decir, más partículas localizadas y eliminadas de la suspensión mediante separación magnética). Los resultados de la tecnología convencional se proporcionan a continuación en la Figura 11A. Los resultados del dispositivo de localización de micropartículas magnéticas se proporcionan en la Figura 11B. En las Figuras 11A y B, los datos recogidos de la solución de 25 centipoise se muestran con cuadrados (■) y los datos recogidos para la solución de 1 centipoise se muestran con rombos (◆).

### Ejemplo 4

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento, se demostró que la mayor parte del ADN de una diana determinada se agota de un sobrenadante de heces en una única extracción. La extracción se llevó a cabo según el diagrama de flujo mostrado en la Figura 1. Tras la elución final, las recuperaciones de las dos dianas (Gen A y Gen V) de las extracciones 1 y 2 se controlaron mediante ensayos de qPCR SYBR Green usando 1 microlitro de eluato en un volumen de reacción de 25 microlitros. Para ambas dianas, la extracción 1 produjo una buena recuperación de la diana, mientras que el eluato de la extracción 2 no consiguió producir ninguna señal en la qPCR procedente de ninguna de las dianas (Figura 12).

**Ejemplo 5**

5 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento, se demostró que la extracción del ADN se puede llevar a cabo varias veces en una sola muestra mediante un mínimo de cuatro ciclos de desnaturalización/hibridación sin alterar negativamente la integridad del ADN humano contenido en el sobrenadante de las heces. En este ejemplo, cuatro dianas (Genes A, F, V, y W) se capturaron de la muestra, y se varió el orden de su captura. Tras la elución, la recuperación de cada diana se controló mediante qPCR SYBR Green. En la Figura 13, las representaciones gráficas muestran las curvas de amplificación de cada gen cuando se capturó en primer, segundo, tercer y cuarto lugar en la secuencia de extracción. La superposición de las curvas de amplificación demuestra que las recuperaciones fueron aproximadamente iguales independientemente del orden de extracción. La

10 Tabla 3 cuantifica los resultados de la Figura 13.

**Tabla 3**

Diana	Extracción	C <sub>p</sub> promedio	Hebras/μl promedio
Gen A	n.º 1	28,92	862
	n.º 2	28,89	878
	n.º 3	28,85	907
	n.º 4	28,73	984
Gen F	n.º 1	29,32	499
	n.º 2	29,36	489
	n.º 3	29,29	511
	n.º 4	29,01	614
Gen V	n.º 1	31,29	129
	n.º 2	31,01	155
	n.º 3	31,18	139
	n.º 4	30,84	177
Gen W	n.º 1	29,17	724
	n.º 2	29,11	757
	n.º 3	28,99	819
	n.º 4	29,16	730

Para los cuatro genes, el Cp (Punto de cruce - el número de ciclo en el cual la curva de amplificación cruza un umbral fijo) promedio eran prácticamente iguales independientemente del orden de extracción.

**Ejemplo 6**

15 Procedimiento ilustrativo para el aislamiento en serie de una pluralidad de ácidos nucleicos diana:

Según se representa en la Figura 1:

1. Una muestra de heces se homogeneiza, por ejemplo, con un tampón, para formar un homogenado de heces. El homogenado se trata para separar los sólidos residuales del fluido, por ejemplo, mediante centrifugación o filtración, para producir un "sobrenadante de heces".
- 20 2. El sobrenadante de heces se trata para eliminar los inhibidores del ensayo (por ejemplos, con polivinilpirrolidona, como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º de serie 61/485,338), produciendo un "sobrenadante clarificado".
3. Diez mililitros de sobrenadante clarificado (que representa un equivalente de aproximadamente 4 gramos de heces) se mezcló con tiocianato de guanidina (GTC) hasta una concentración final de 2,4 M;
- 25 4. La mezcla se trata a continuación en un baño de agua a 90°C durante 10 minutos para desnaturalizar el ADN (y las proteínas) presentes en las heces.
5. Se añaden a la muestra partículas paramagnéticas que contienen oligonucleótidos unidos covalentemente (acoplados) complementarios de la(s) secuencia(s) diana de interés ("sondas de captura específicas de la diana"). La muestra se incuba a continuación (por ejemplo, a temperatura ambiente, aproximadamente 22 - 25°C) durante
- 30 una hora para permitir la hibridación del ADN diana para capturar las sondas sobre las partículas magnéticas.
6. La mezcla de sobrenadante clarificado, GTC, y partículas se expone a un campo magnético para separar las partículas (que ahora contienen el ADN hibridado a las sondas de captura) de la mezcla de sobrenadante de heces/GTC, que se transfiere a un tubo nuevo. Véase, por ejemplo, el documento US 2012/0262260 A1.
7. A continuación, las partículas paramagnéticas se lavan y el ADN diana se eluye, listo para su uso en ensayos
- 35 de detección.
8. La mezcla de sobrenadante/GTC retenida en la etapa 6 se devuelve al baño de agua a 90°C durante 10 minutos para la desnaturalización (etapa 4). A continuación, la Etapa 5 se repite añadiendo partículas magnéticas que contienen sondas de captura complementarias de otros ADN diana *diferentes*, y las etapas de hibridación, separación de partículas y elución se repiten para producir una muestra purificada de una segunda diana de ADN.
- 40 El ciclo de desnaturalización/hibridación/separación (etapas 4 - 6) se pueden repetir al menos cuatro o más veces para

extraer en serie diferentes ADN diana de la misma muestra de sobrenadante de heces.

### Ejemplo 7

5 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento, los procedimientos se sometieron a ensayo en una aplicación clínica. Lo siguiente proporciona un ejemplo de flujo de trabajo que utiliza los sistemas y procedimientos de la presente divulgación.

### Diseño del estudio

10 Este estudio se basó en heces de archivo bien caracterizadas procedentes de múltiples centros médicos, incluidos centros de referencia y centros médicos públicos de Estados Unidos y Dinamarca. Se obtuvo la aprobación de los comités de revisión de cada centro. Se proporcionaron heces de casos de pacientes con cáncer colorrectal demostrado (CRC), casos con al menos un adenoma colorrectal  $\geq 1$ , y pacientes de control de edad y sexo equivalentes sin neoplasia y evaluados mediante colonoscopia. Se reclutaron pacientes en escenarios tanto clínicos como de cribado, y algunos eran sintomáticos. Los que tenían síndromes cancerosos conocidos o enfermedad inflamatoria del intestino se excluyeron. Se analizaron casi 700 muestras, de las que 133 eran adenomas  $\geq 1$  centímetro y 252 eran pacientes de cáncer.

15 Se llevó a cabo un ensayo multimarcador en las heces que incluyó cuatro genes metilados (*vimentina*, *NDRG4*, *BMP3*, y *TFPI2*), *KRAS* mutante, un gen de referencia *beta-actina* (*ACTB*), y hemoglobina. Para evaluar el comportamiento del ensayo, las heces de caso y de control se distribuyeron de forma equilibrada entre dos sitios de ensayo diferentes; todos los ensayos estaban a cargo de técnicos enmascarados.

### Recogida y almacenamiento de heces.

20 Antes de la colonoscopia, que sirvió como patrón de oro, las heces completas se recogieron en cubetas de plástico. Se añadió un tampón de conservación a las heces, y las heces tamponadas se archivaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Sin embargo, el tiempo de adición de tampón, la duración entre la defecación y la congelación, y si las muestras se homogeneizaban o no antes de la congelación no se normalizaron y variaron entre los centros participantes.

### Selección de marcadores.

25 Se identificaron genes candidatos que, de forma individual o combinada (por ejemplo, *KRAS* + *BMP3* + *NDRG4* + *TFPI2* + *vimentina* + referencia y/o *ACTB* + hemoglobina) produjeron una separación casi completa de la neoplasia colorrectal de la mucosa normal. Surgieron cuatro marcadores génicos metilados como los más discriminantes - *NDRG4*, *BMP3*, *vimentina*, y *TFPI2*. La detección de *KRAS* mutante y hemoglobina complementa los marcadores de genes metilados detectados en las heces y, por consiguiente, también se evaluaron en el panel de marcadores.  
30 Finalmente, el ensayo de referencia de la *beta-actina* (*ACTB*) se usó para determinar los equivalentes totales de genoma humano en las heces y, puesto que los niveles de ADN humano en las heces aumenta con la neoplasia colorrectal, para servir por sí mismo como marcador candidato.

### Procesamiento de heces y captura del gen diana

35 Poco después de la descongelación, las heces tamponadas se homogeneizaron completamente y se centrifugaron. A continuación, una alícuota de 14 mililitros de sobrenadante se trató con polivinilpirrolidona a una concentración de 50 miligramos por mililitro. La captura directa de las secuencias génicas diana mediante hibridación de sondas de oligonucleótidos se llevó a cabo sobre el material sobrenadante. Brevemente, 10 mililitros de sobrenadante tratado con PVP insoluble se desnaturalizaron en isotiocianato de guanidina 2,4 M (Sigma, St. Louis MO) a  $90^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos; 300-500 microgramos de perlas Sera-Mag modificadas con carboxilato (ThermoFisher Scientific, Waltham MA) funcionalizadas con cada sonda de oligonucleótidos de captura se añadieron posteriormente al sobrenadante de heces desnaturalizado, y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Las perlas Sera-Mag se recogieron con una gradilla magnética y se lavaron tres veces con tampón de lavado MOPS (MOPS 10 mM; NaCl 150 mM, pH 7,5), y después se eluyeron en 60 microlitros de agua exenta de nucleasa con 20 nanogramos por microlitro de ARNt (Sigma). En este estudio, cuatro marcadores metilados seleccionados, *vimentina*, *NDRG4*, *BMP3*, y *TFPI2*, y un gen de referencia *ACTB*, se capturaron conjuntamente en una reacción de hibridación; el marcador de mutación *KRAS* se capturó posteriormente en otra reacción de hibridación. Las sondas de captura usadas, mostradas aquí con su enlace amino modificado para seis átomos de carbono en 5' (Integrated DNA Technology, Coralville, IA), fueron las siguientes:

para *vimentina*:

/5AmMC6/CTGTAGGTGCGGGTGGACGTAGTCACGTAGCTCCGGCTGGA-3' (SEQ ID NO: 1);

50 para *NDRG4*:

/5AmMC6/TCCCTCGCGCTGGCTTCCGCCTTCTGCGCGGCTGGGGTGCCCGGTGG-3' (SEQ ID NO: 2);

para *BMP3*:

/5AmMC6/GCGGGACACTCCGAAGGCGCAAGGAG-3' (SEQ ID NO: 3);

para *TFPI2*:

/5AmMC6/CGCCTGGAGCAGAAAGCCGCGCACCT-3' (SEQ ID NO: 4);

para *ACTB*:

/5AmMC6/CCTTGTACACGAGCCAGTGTTAGTACCTACACC-3' (SEQ ID NO: 5);

5 para *KRAS*:

/5AmMC6/GGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGC-3' (SEQ ID NO: 6); y  
/5AmMC6/CTCTATTGTTGGATCATATTCGTCCACAAAATGATTCTGAATTAGC-3' (SEQ ID NO: 7)

### Ensayos de metilación.

10 Los marcadores metilados se cuantificaron por el procedimiento QuARTS, tal como han descrito anteriormente los inventores (véanse, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos con números de serie 12/946.737,; 12/946.745; y 12/946.752,). Este procedimiento combina un procedimiento de amplificación del ADN diana basado en polimerasa con un procedimiento de amplificación de la señal basado en una escisión invasiva. Los inventores trataron 45 microlitros de ADN capturado con bisulfito usando el kit EZ-96 DNA Methylation (Zymo Research, Irvine CA) y eluyeron la muestra con 50 microlitros de Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 8,0 con 20 nanogramos por microlitro de ARNt (Sigma) en una placa de PCR de 96 pocillos; 10 microlitros de ADN tratado con bisulfito se analizaron según el procedimiento QuARTS en volúmenes de reacción de 30 microlitros en una placa de PCR de 96 pocillos. Las placas de PCR se ciclaron en un LightCycler 480 (Roche).

15 Se diseñaron dos ensayos QuARTS triplete para detectar los marcadores metilados *vimentina*, *NDRG4*, *BMP3*, y *TFPI2* usando *ACTB* como gen de referencia para cada uno de ellos. El primer ensayo triplete contenía *ACTB*, *vimentina*, y *NDRG4*, y el segundo contenía *ACTB*, *BMP3*, y *TFPI2*. Cada reacción QuARTS incorporaba 400-600 nM de cebadores y sondas de detección, 100 nM de oligonucleótido invasivo, 600-700 nM de cada casete indicador de transferencia de energía de resonancia (FRET) FAM (Hologic, Madison WI), Yellow (Hologic), y Quasor 670 (BioSearch Technologies, Novato CA), 6,675 nanogramos por microlitro de Cleavase 2.0 (Hologic), 1 unidad de ADN polimerasa GoTaq de inicio caliente (Promega, Madison WI), MOPS 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM y 250 μM de cada dNTP. Las condiciones de ciclación QuARTS consistieron en 95°C durante 3 minutos, seguido de 10 ciclos, comprendiendo cada uno 95°C durante 20 segundos, 67°C durante 30 segundos, y 70°C durante 30 segundos, seguido de 45 ciclos, comprendiendo cada uno 95°C durante 20 segundos, 53°C durante 1 minuto, y 70°C durante 30 segundos, y finalmente 30 segundos de mantenimiento en caliente a 40°C. Para cada diana indicada a continuación, los dos cebadores y sondas específicos de metilación (Integrated DNA Technology, Coralville, IA) fueron los siguientes:

30 Para *vimentina*:

Cebador 5'-GGC GGT TCG GGT ATC G-3' (SEQ ID NO: 8),  
Cebador 5'-CGT AAT CAC GTA ACT CCG AC T-3' (SEQ ID NO: 9),  
Sonda 5'-GAC GCG GAG GCG AGT CGG TCG/3'C6/ (SEQ ID NO: 10);

para *NDRG4*:

35 Cebador 5'-CGG TTT TCG TTC GTT TTT TCG-3' (SEQ ID NO: 11),  
Cebador 5'-GTA ACT TCC GCC TTC TAC GC-3' (SEQ ID NO: 12),  
Sonda 5'-CGC CGA GGG TTC GTT TAT CG/3'C6/ (SEQ ID NO: 13);

para *BMP3*:

40 Cebador 5'-GTT TAA TTT TCG GTT TCG TCG TC-3' (SEQ ID NO: 14),  
Cebador 5'-CTC CCG ACG TCG CTA CG-3' (SEQ ID NO: 15),  
Sonda 5'-CGC CGA GGC GGT TTT TTG CG/3'C6/ (SEQ ID NO: 16); y

para *TFPI2*:

45 Cebador 5'-TCG TTG GGT AAG GCG TTC-3' (SEQ ID NO: 17),  
Cebador 5'-AAA CGA ACA CCC GAA CCG-3' (SEQ ID NO: 18),  
Sonda 5'-GAC GCG GAG GCG GTT TTT TGT T/3'C6/ (SEQ ID NO: 19).

El ensayo *TFPI2* tuvo un oligonucleótido invasivo específico:

5'-GCG GGA GGA GGT GCC-3' (SEQ ID NO: 20).

Los cebadores y la sonda para detectar *ACTB* tratado con bisulfito fueron los siguientes:

50 Cebador 5'-TTT GTT TTT TTG ATT AGG TGT TTA AGA-3' (SEQ ID NO: 21),  
Cebador 5'-CAC CAA CCT CAT AAC CTT ATC-3' (SEQ ID NO: 22),

Sonda 5'-CCA CGG ACG ATA GTG TTG TGG/3'C6/ (SEQ ID NO: 23).

5 Cada placa incluyó muestras de ADN tratadas con bisulfito, muestras de curva patrón, controles positivos y negativos, y blancos de agua. Las curvas patrón se trazaron usando de 300 a 1000 secuencias diana cortadas de plásmidos genomanipulados. El ADN metilado universal CpGenome tratado con bisulfito (Millipore, Billerica, MA) y ADN genómico humano (Merck, Alemania) se usaron como controles positivos y negativos. El número de hebras de ADN se determinó comparando el Cp del gen diana con el de la curva patrón del ensayo correspondiente. La metilación porcentual de cada marcador se determinó dividiendo el número de hebras del gen metilado por el número de hebras de *ACTB* y multiplicando por 100.

### Mutación *KRAS*

10 El gen *KRAS* se amplificó en primer lugar por PCR con cebadores que flanqueaban los codones 12/13 usando 10 microlitros de ADN *KRAS* capturado como molde. La PCR se llevó a cabo con 1 x LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche, Alemania) y 200 nM de cada cebador. Las condiciones de ciclación fueron 95 °C durante 3 minutos, seguido de 15 ciclos, cada uno a 95°C durante 20 segundos, 62°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos. Las secuencias de los cebadores fueron:

15 5'-AGG CCT GCT GAA AAT GAC TG-3' (SEQ ID NO: 24), y  
5'-CTA TTG TTG GAT CAT ATT CG TC-3' (SEQ ID NO: 25).

20 Cada muestra amplificada se diluyó 500 veces en agua exenta de nucleasa. Una alícuota de 10 microlitros de las diluciones de muestra de 500 veces se añadió a una placa de PCR de 96 pocillos con un manipulador automatizado de líquidos (epMotion, Eppendorf, Hauppauge NY). Los ensayos QuARTS se usaron a continuación para evaluar siete mutaciones en los codones 12/13 del gen *KRAS*. Cada ensayo de mutación se diseñó como un ensayo singlete. Los cebadores y sondas directos para *KRAS* específicos de mutación fueron los siguientes:

para la mutación *G12S*:

Cebador 5'-CTT GTG GTA GTT GGA GCA A-3' (SEQ ID NO: 26)  
Sonda 5'-GCG CGT CCA GTG GCG TAG GC/3'C6/ (SEQ ID NO: 27);

25 para la mutación *G12C*

Cebador 5'-AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT T-3' (SEQ ID NO: 28)  
Sonda 5'-GCG CGT CCT GTG GCG TAG GC/3'C6/ (SEQ ID NO: 29);

para la mutación *G12R*

30 Cebador 5'-TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT C-3' (SEQ ID NO: 30)  
Sonda 5'-GCG CGT CCC GTG GCG TAG GC/3'C6/ (SEQ ID NO: 31);

para la mutación *G12D*

Cebador 5'-ACT TGT GGT AGT TGG AGC TCA-3' (SEQ ID NO: 32)  
Sonda 5'-GCG CGT CCA TGG CGT AGG CA/3'C6/ (SEQ ID NO: 33);

para la mutación *G12V*

35 Cebador 5'-ACT TGT GGT AGT TGG AGC TCT-3' (SEQ ID NO: 34)  
Sonda 5'-GCG CGT CCT TGG CGT AGG CA/3'C6/ (SEQ ID NO: 35);

para la mutación *G12A*

Cebador 5'-AAC TTG TGG TAG TTG GAG ATG C-3' (SEQ ID NO: 36)  
Sonda 5'-GCG CGT CCC TGG CGT AGG CA/3'C6/ (SEQ ID NO: 37);

40 para la mutación *G13D*

Cebador 5'-GGT AGT TGG AGC TGG TCA-3' (SEQ ID NO: 38)  
Sonda 5'-GCG CGT CCA CGT AGG CAA GA/3'C6/ (SEQ ID NO: 39).

Para todos los mutantes de *KRAS*, el cebador inverso utilizado es

5'-CTA TTG TTG GAT CAT ATT CGT C-3' (SEQ ID NO: 40).

45 Las condiciones de ciclación QuARTS y las concentraciones de reactivos para *KRAS* fueron iguales a las utilizadas en los ensayos de metilación. Cada placa contenía patrones fabricados con plásmidos genomanipulados, controles positivos y negativos, y blancos de agua, y se llevaron a cabo en un LightCycler 480 (Roche). El número de hebras de ADN se determinó comparando el Cp del gen diana con el de la curva patrón par dicho ensayo. La concentración de

cada marcador de mutación en 50 microlitros de *KRAS* se calculó basado en el factor de dilución de 500 veces y una eficacia de amplificación de 1,95. Este valor se dividió por la concentración de *ACTB* en el ensayo de metilación y a continuación se multiplicó por 100 para determinar el porcentaje de mutación.

**Ensayo de hemoglobina.**

- 5 Para cuantificar la hemoglobina en las heces, se llevó a cabo el ensayo HemoQuant semiautomatizado en dos alícuotas de heces tamponadas (cada una normalizada a 16 miligramos de heces) por paciente, como se describe en Ahlquist, y col. ("HemoQuant, a new quantitative assay for fecal hemoglobin. Comparison with Hemocult". Ann Intern Med 101:297-302 (1984)). Este ensayo permitió la evaluación del valor complementario de hemoglobina fecal.

**Análisis de datos**

- 10 Usando la combinación de procedimientos de procesamiento de muestras descritos en el presente documento, que comprenden la eliminación de inhibidores y la purificación de la captura diana, combinada con los marcadores de metilación y mutación descritos, el presente estudio de 678 muestras consiguió los siguientes niveles de sensibilidad: 63,8% de sensibilidad para la detección de adenomas y 85,3% de sensibilidad para cáncer colorrectal a un nivel de especificidad del 90 %.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para aislar un ácido nucleico diana humano a partir de una muestra de heces humanas, comprendiendo el procedimiento:
- 5 a) eliminar un inhibidor de ensayo de dicha muestra de heces para producir una preparación de muestra clarificada, en el que la eliminación de dicho inhibidor de ensayo a partir de dicha muestra comprende:
- a1) homogeneizar dicha muestra de heces para producir un homogenado;
- a2) centrifugar dicho homogenado para producir un sobrenadante.
- a3) tratar dicho sobrenadante con una polivinilpirrolidona insoluble para unir el inhibidor, si está presente, en un complejo de inhibidor; y
- 10 a4) asilar dicho complejo de inhibidor a partir de dicho sobrenadante para producir una preparación de muestra clarificada;
- b) capturar dicho ácido nucleico diana a partir de dicha preparación de muestra clarificada con un reactivo de captura específico de la diana para formar un complejo de captura en el que la captura de dicho ácido nucleico diana comprende:
- 15 b1) exponer dicha preparación de muestra clarificada a una condición desnaturalizante para producir una muestra desnaturalizada; y
- b2) unir dicho ácido nucleico diana a un reactivo de captura específico de la diana para formar un complejo de captura, en el que dicho reactivo de captura específico de la diana comprende un oligonucleótido unido a una partícula magnética, el oligonucleótido complementario a al menos una porción de dicho ácido nucleico diana;
- 20 b3) aislar dicho complejo de captura a partir de dicha preparación de muestra clarificada; y
- b4) recuperar dicho ácido nucleico diana a partir de dicho complejo de captura en una solución de ácido nucleico.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
- e) retener la preparación de muestra clarificada después de la dicha etapa de asilamiento;
- 25 f) repetir las etapas de captura, aislamiento y recuperación usando la muestra clarificada residual y un segundo agente de captura.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha polivinilpirrolidona se proporciona en una forma premedida, preferiblemente como un comprimido.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el aislamiento de dicho complejo de inhibidor comprende la centrifugación para separar dicho complejo de inhibidor a partir de dicho sobrenadante.
- 30 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que dicha centrifugación comprende centrifugar mediante un filtro de centrifugación que comprende a) un cuerpo hueco; b) un extremo inferior; y c) un extremo superior abierto opuesto al extremo inferior, en el que el cuerpo hueco y el extremo inferior están hechos de un material de filtración poroso.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha condición desnaturalizante comprende calentamiento.
- 35 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha exposición de dicha preparación de muestra clarificada a una condición desnaturalizante comprende añadir un desnaturalizante a dicha preparación de muestra clarificada.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho desnaturalizante comprende tiocianato de guanidina.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha etapa de aislamiento comprende exponer dicho complejo de captura a un campo magnético.
- 40 10. El método de la reivindicación 1, en el que la recuperación de dicho ácido nucleico diana comprende eluir dicho ácido nucleico diana a partir de dicho complejo de captura.
11. Un kit de aislamiento de un ADN humano diana a partir de una muestra de heces humanas, comprendiendo el kit:
- a) un volumen de solución de homogeneización de heces adecuado para el procesamiento de una muestra de heces humanas que tiene una masa de al menos 4 gramos;
- 45 b) polivinilpirrolidona insoluble, preferiblemente en forma premedida, preferiblemente proporcionada como un comprimido;

b) un reactivo de captura específico de la diana que comprende un oligonucleótido unido covalentemente a una partícula magnética, en el que dicho oligonucleótido es complementario a al menos una porción de dicho ADN humano diana.

12. El kit de la reivindicación 11 que comprende, además, tiocianato de guanidina.

5 13. El kit de la reivindicación 11 que comprende, además, una solución de elución o lavado.

**FIG. 1A**

<b>1. Preparar el sobrenadante clarificado</b>
Mezclar 8 g de heces con tampón
Centrifugar
Recoger el sobrenadante
Tratar con resina de eliminación de inhibidores
Filtro de centrifugación
Recuperar el sobrenadante clarificado
<b>2. Captura secuencial de los ADN de interés</b>
Añadir isotiocianato de guanidina, calor
Añadir perlas paramagnéticas conjugadas con oligonucleótidos
(Como alternativa, añadir las perlas conjugadas a la solución de isotiocianato de guanidina, después calentar)
Hibridar
<b>3. Aislar el ADN capturado</b>
Extraer las perlas de la solución con el imán
Eliminar el sobrenadante (reutilizar el sobrenadante para capturar la siguiente diana, Fig. 1B)
Lavar las perlas 3X
Eluir el ADN

FIG. 1B

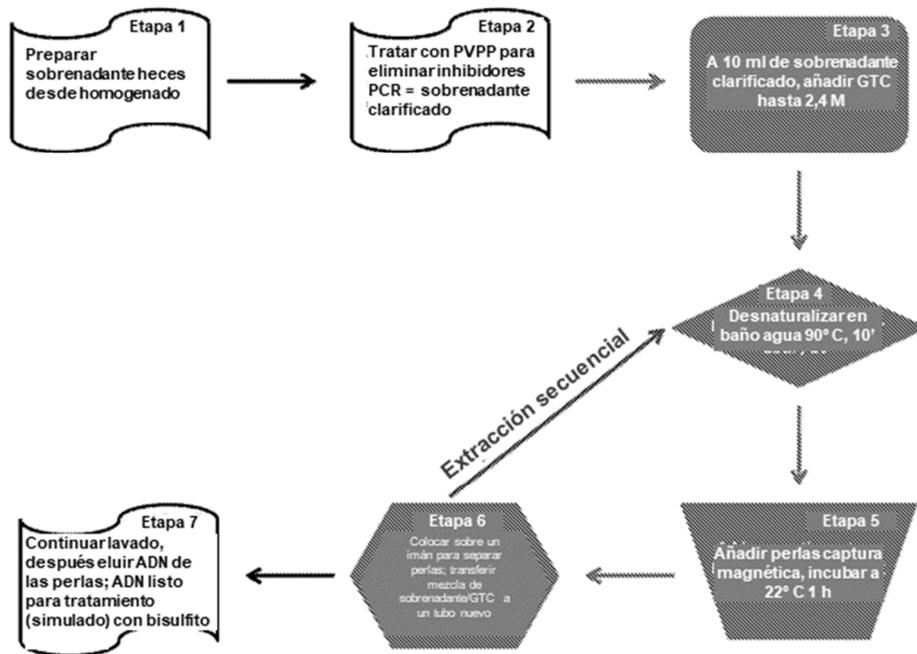


FIG. 2

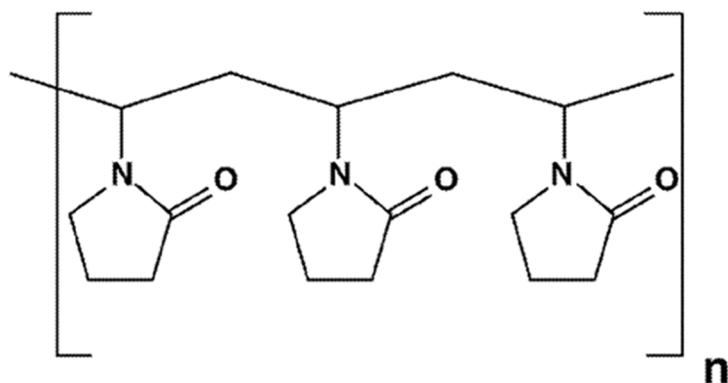




FIG. 3

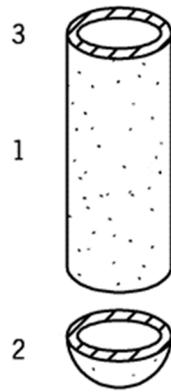


FIG. 4



FIG. 5A

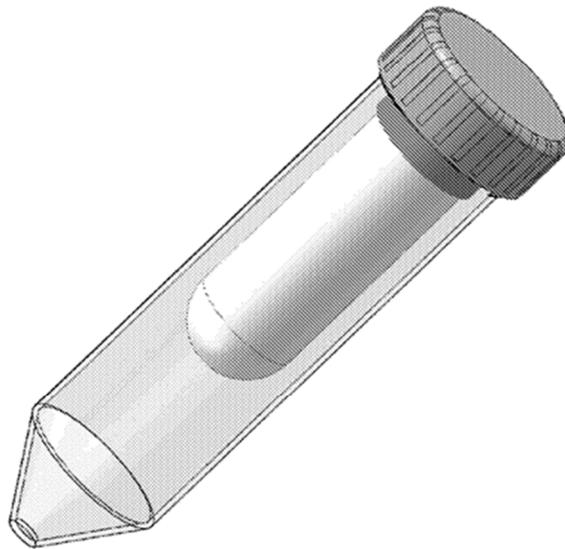


FIG. 5B



FIG. 5C

**FIG. 6**



**FIG. 7**



**FIG. 8**



**A**



**B**

FIG. 9

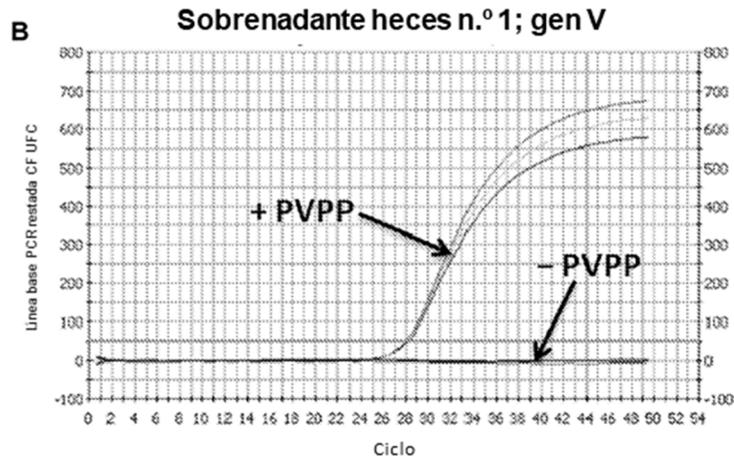
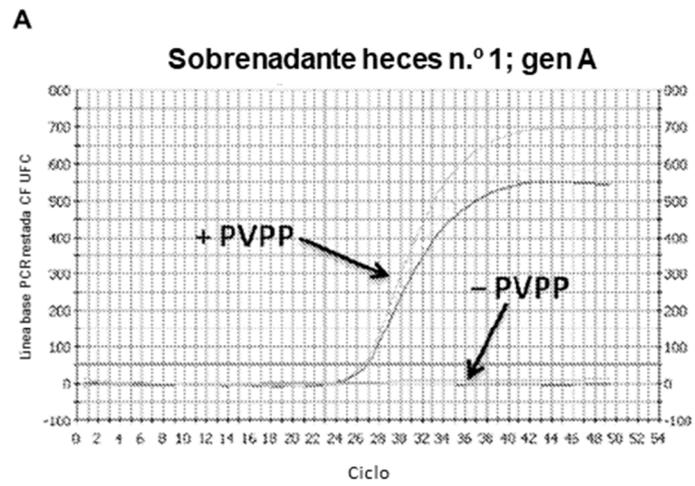
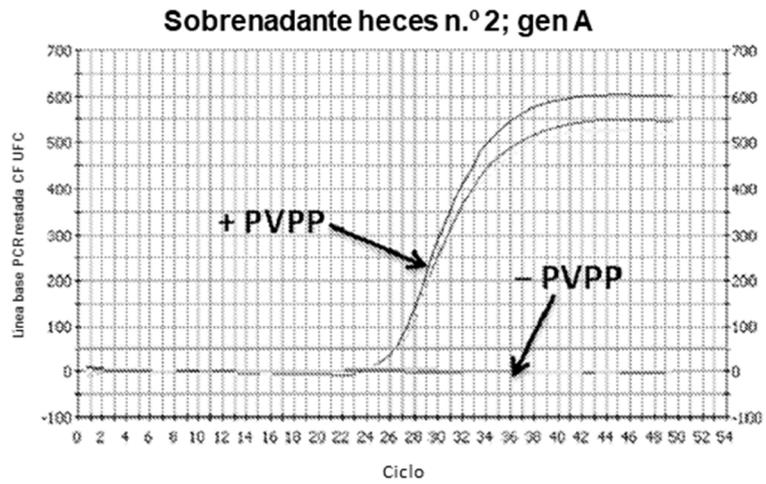
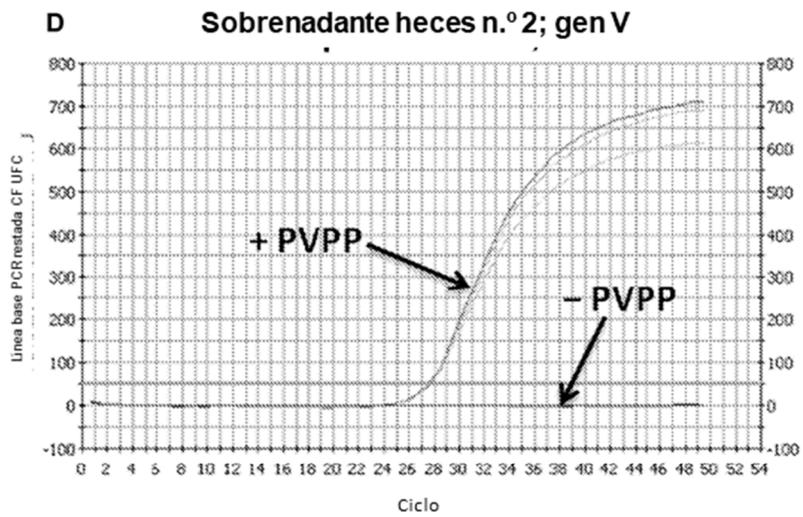


FIG. 9

C

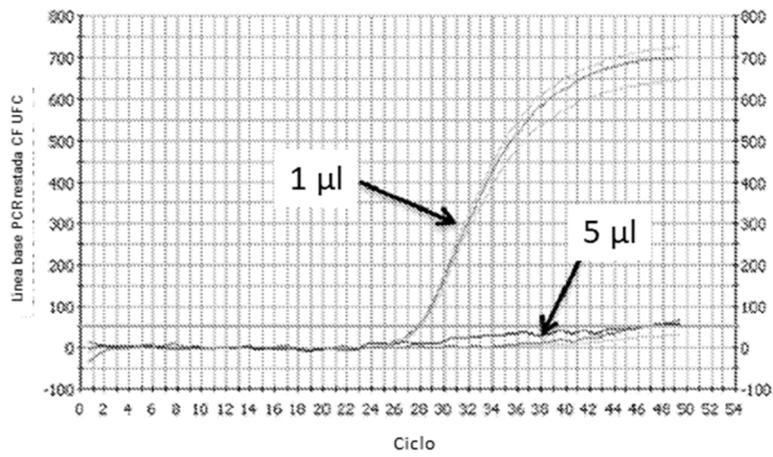


D



**FIG. 10**

**A PVPP 30-50  $\mu\text{m}$  partícula; sin filtración con centrifugación**



**B PVPP 100-130  $\mu\text{m}$  partícula; sin filtración con centrifugación**

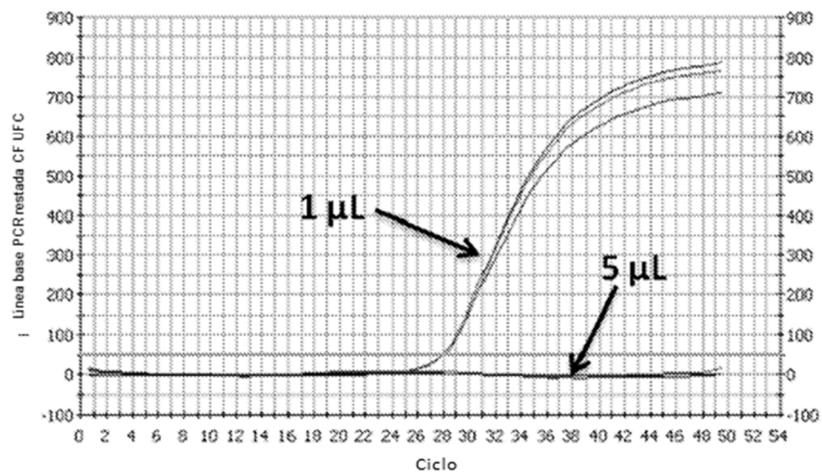
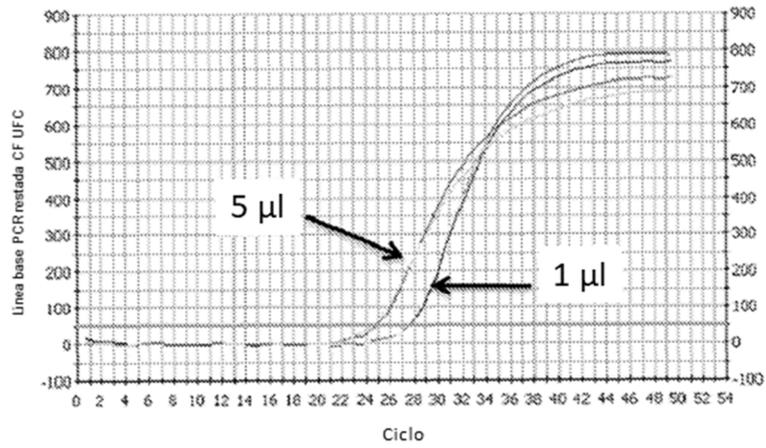


FIG. 10

C PVPP 100-130  $\mu\text{m}$  partícula; con filtración con centrifugación



D PVPP 100-130  $\mu\text{m}$  partícula; con filtración con centrifugación

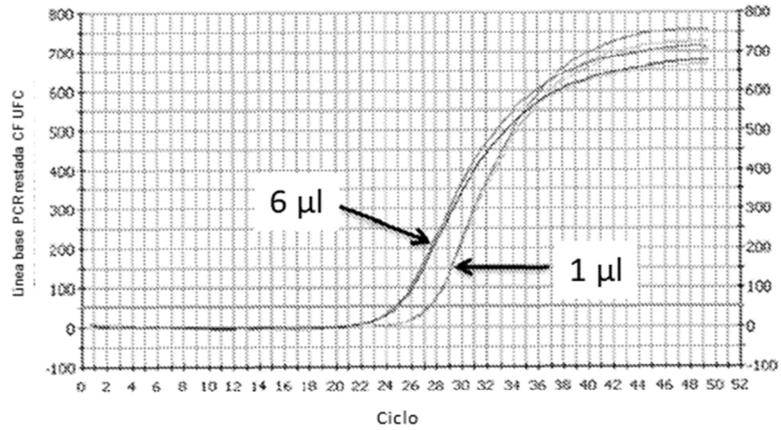
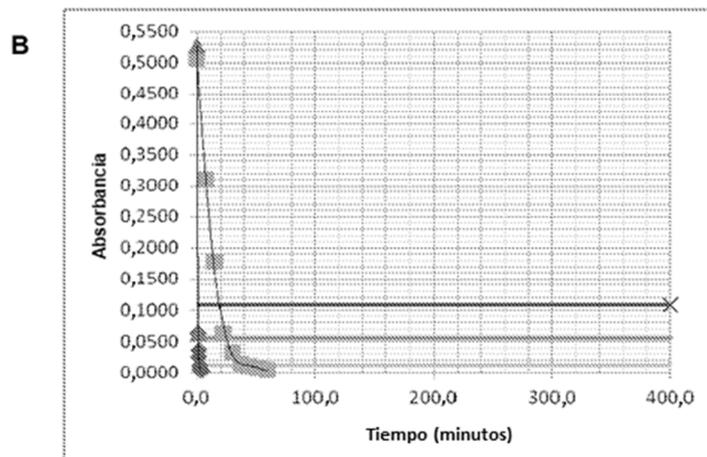
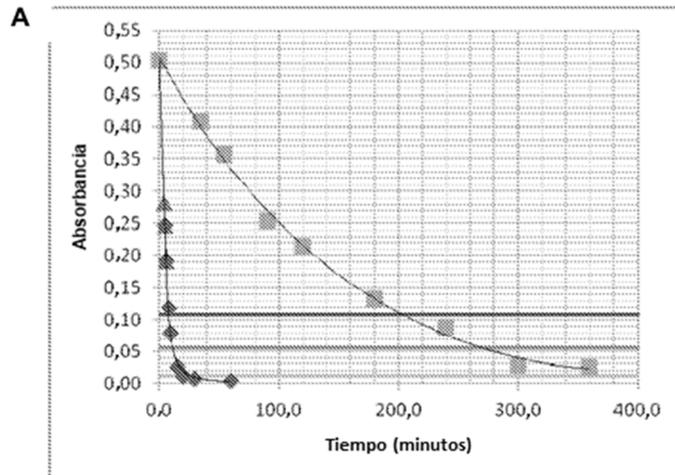
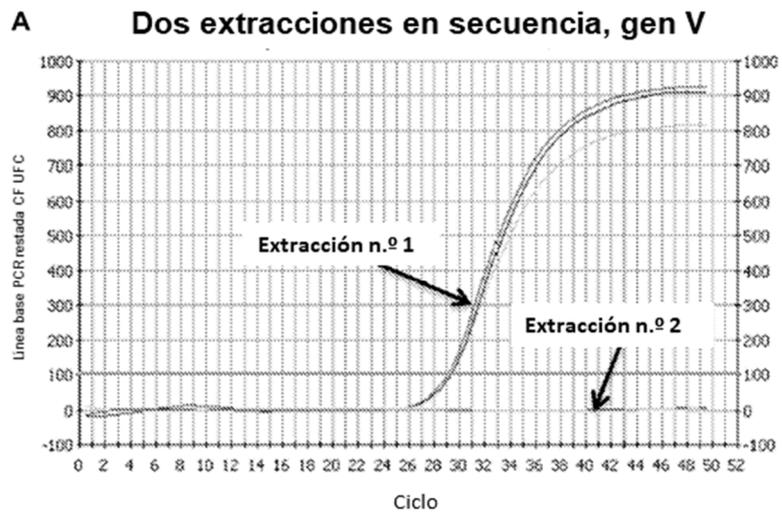


FIG. 11



**FIG. 12**

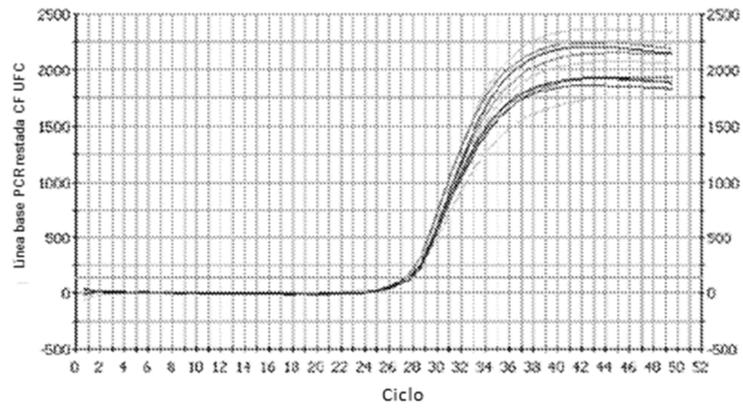


**B**

Muestra	Extracción	Hebras/ $\mu$ l
Gen A	n.º 1	2020
	n.º 2	N/A
Gen V	n.º 1	505
	n.º 2	N/A

FIG. 13

A Gen A



B Gen F

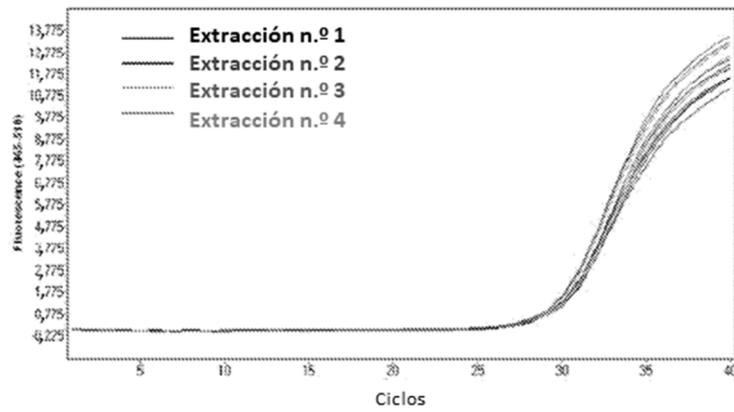
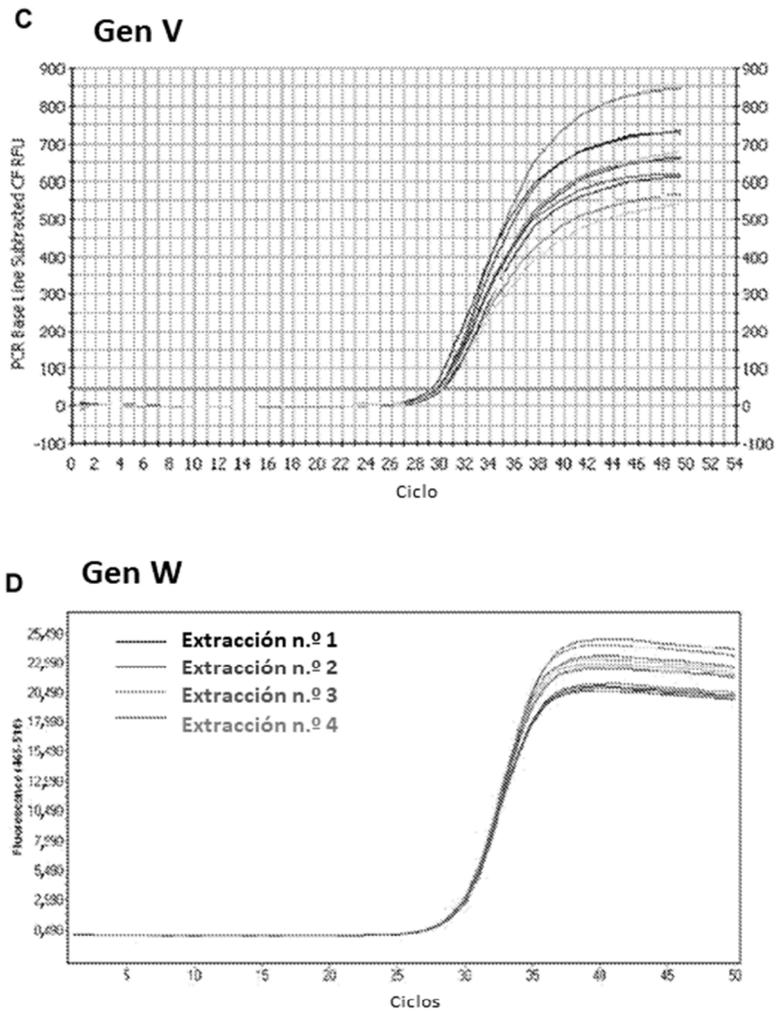


FIG. 13



**FIG. 14**

<b>Proceso A</b>		<b>Proceso B</b>	
	<b>Tiempo total (min)</b>		<b>Tiempo total (min)</b>
<b>Preparar el sobrenadante clarificado</b>	<b>55</b>	<b>Preparar el sobrenadante clarificado</b>	<b>Toda la noche (por ejemplo, 960 minutos)</b>
Mezclar 8 g de heces con 32 ml tampón		Mezclar 3 g de heces con 7 volúmenes de tampón	
Centrifugar		Centrifugar	
Recoger el sobrenadante (24 ml)		Recoger el sobrenadante	
Tratar 14 ml con resina de eliminación de inhibidores		Filtrar a través de un filtro de 0,45 µm	
Filtro de centrifugación		Recuperar el sobrenadante clarificado	
Recuperar el sobrenadante clarificado		Precipitar con isopropanol para eliminar la estreptavidina intrínseca	
		Centrifugar, descartar el sobrenadante	
	Disolver el aglomerado en 4,9 ml de tampón TE durante la noche		
<b>Captura secuencial de los ADN de interés</b>	<b>15</b>	<b>Captura en paralelo de los ADN de interés</b>	<b>30</b>
Añadir isotiocianato de guanidina a 10 ml, calentar		A una alícuota de 300 µl, añadir isotiocianato de guanidina y sonda biotinilada de oligonucleótidos	
Añadir perlas paramagnéticas conjugadas con oligonucleótidos		Hibridar	
Hibridar (60 minutos por ciclo)	<b>60</b>	Añadir perlas paramagnéticas revestidas con estreptavidina	<b>15</b>
		Hibridar los complejos de oligonucleótido/ADN a las perlas	
<b>Aislar el ADN capturado</b>	<b>30</b>	<b>Aislar el ADN capturado</b>	<b>15</b>
Extraer las perlas de la solución con el imán*		Extraer las perlas de la solución con el imán	
Eliminar el sobrenadante (reservar para captura de la siguiente diana)		Retirar y descartar el fluido	
Lavar las perlas		Lavar las perlas	
Eludir el ADN		Eludir el ADN	
<b>Tiempo de purificación total (minutos)</b>	<b>160</b>	<b>Tiempo de purificación total (minutos)</b>	<b>1020</b>
<b>Masa equivalente de heces que proporciona el ADN génico específico purificado para amplificación</b>	<b>2,0 gramos</b>	<b>Masa equivalente de heces que proporciona el ADN génico específico purificado para amplificación</b>	<b>0,18 gramos</b>

\*Véase el texto para la configuración de imanes mejorada