

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 223**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01)
C12Q 1/68	(2008.01)
G01N 33/566	(2006.01)
C07H 1/08	(2006.01)
C12N 15/10	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.11.2014 PCT/US2014/067321**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15094609**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2014 E 14872184 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 3074413**

54 Título: **Aislamiento de ARNmicro de fluido biológico**

30 Prioridad:

27.11.2013 US 201361909834 P
28.04.2014 US 201461985000 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.08.2020

73 Titular/es:

SIGMA ALDRICH CO. LLC (100.0%)
3050 Spruce Street
St. Louis, MO 63103, US

72 Inventor/es:

KREADER, CAROL

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 778 223 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 ARNm micro de fluido biológico

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a medios para aislar ARNm micro a partir de fluidos biológicos.

Antecedentes

10 Los ARNm micro (ARNmi) son pequeños ARN no codificantes que influyen en las redes reguladoras de genes mediante la regulación postranscripcional de objetivos específicos de ARN mensajero (ARNm) a través de interacciones específicas de emparejamiento de bases. Se ha demostrado que los ARNm micro están presentes en biofluidos humanos en una forma libre de células. Estos ARNm micro libres de células pueden ser no vesiculares, unidos y protegidos por
15 proteínas en complejos de proteína ARNm micro, encerrados en vesículas unidas a la membrana, como exosomas o microvesículas, o ambas. Dado el importante papel funcional del ARNm micro en la enfermedad, este conjunto de moléculas de ácido nucleico contiene candidatos para diagnosticar y pronosticar la enfermedad, y monitorizar la respuesta a las terapias en una amplia variedad de pacientes y sujetos antes de manifestar la enfermedad en una muestra biológica fácilmente disponible, tal como suero sanguíneo y plasma, orina o saliva. Los métodos actuales para aislar ARNm micro
20 están dirigidos a ARNm micro relativamente abundantes en células y tejidos, usan columnas giratorias que no se automatizan o aumentan de tamaño fácilmente, son complicadas e involucran compuestos tóxicos, o pueden aislar específicamente ARNm micro vesiculares o no vesiculares. Además, los ARNm micro de interés diagnóstico o pronóstico a menudo están presentes en baja abundancia en biofluidos, lo que dificulta su detección utilizando los métodos de aislamiento actuales. Por lo tanto, existe la necesidad de un método simple, eficiente, automatizable y escalable para
25 aislar todos o la mayoría de los ARNm micro en biofluidos.

Resumen de la invención

30 Un aspecto de la presente divulgación proporciona un método para aislar ARNm micro (ARNmi) a partir de un fluido biológico. El método comprende poner en contacto el fluido biológico con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína unión a anti-ARNmi, en el que el agente tensioactivo disocia los componentes del fluido biológico y el reactivo de proteína unión a anti-ARNmi interactúa con una proteína de unión a ARNm micro asociada con ARNm micro para formar complejos de ARNm micro inmunoprecipitados. El método comprende además liberar ARNm micro de los complejos de ARNm micro inmunoprecipitados sin purificación poniendo en contacto, a temperatura ambiente, los complejos de ARNm micro
35 inmunoprecipitados con una proteasa.

Otro aspecto de la divulgación incluye un kit para aislar ARNm micro de un fluido biológico. El kit comprende: (a) un primer agente tensioactivo que comprende (octilfenoxi)polietoxietanol (IGEPAL® CA-630), (b) un segundo agente tensioactivo que comprende desoxicolato de sodio y laurilsulfato de sodio, un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi, (c) un anticuerpo anti-Argonaut y una proteasa (d) proteinasa K.
40

Otros aspectos e iteraciones de la divulgación se describen con más detalle a continuación.

Breve descripción de las figuras

45 La figura 1 presenta dos gráficos que comparan el aislamiento de ARNm micro a partir de plasma de 0.2 ml utilizando Tri Reagent® BD o inmunoprecipitación de ARN (RIP). Las cantidades de ARNm micro aislado por RIP se presentan como la diferencia de veces de ARNm micro aislado utilizando Tri Reagent® BD. (A) representa los niveles de ARNm micro let-7a-5p, 23a-3p y 191-5p, y (B) muestra los niveles de ARNm micro 142-3p y 451a.
50

La figura 2 presenta tres gráficos que muestran los niveles de ARNm micro aislados del plasma utilizando Ago-RIP o un kit de purificación de columna Qiagen (Q1, Q2). Las cantidades de ARNm micro aislado, como copias de miR/μl eluidas, se muestran para let-7a, 23a y 142 ARNm micro (A), 191 ARNm micro (B) y 451a ARNm micro (C).

55 La figura 3 presenta tres gráficos que muestran niveles de ARNm micro aislados del plasma utilizando RIP con anticuerpos biotinilados (b-Ago2 o b-Ago) o no biotinilados (Ago2) con estreptavidina o microesferas de proteína A. Se muestran las cantidades de ARNm micro aislado representadas como copias de miR/μl eluidas para ARNm micro let-7a (A), 23a (B) y 191 (C). El anticuerpo (clon entre paréntesis) utilizado se anota en los ejes x.

60 La figura 4 presenta dos gráficos que muestran niveles de ARNm micro aislados del plasma utilizando Ago-RIP con liberación de calor. Q representa la purificación de columna Qiagen; RIP-Q representa inmunoprecipitación seguida de purificación en columna Qiagen; bRIP-Q representa la inmunoprecipitación utilizando anticuerpo biotinilado seguido de purificación en columna Qiagen. (A) representa los niveles de adición de cel-miR-39-3p sintético utilizando la purificación de columna Qiagen, RIP en combinación con purificación de columna y RIP con liberación de proteasa K.
65 Los niveles de aumento se representan como porcentaje total de cel-miR-39-3p sintético agregado durante el aislamiento. (B) representa los niveles de let7a ARNm micro aislado del plasma utilizando la purificación de columna Qiagen,

RIP en combinación con purificación de columna y RIP con liberación de proteasa K. Los niveles de let7a se representan como copias de let7a en 1 µl de muestra recuperada.

5 La figura 5 presenta dos gráficos que muestran niveles de ARNmi aislados del plasma utilizando Ago-RIP con liberación de proteasa K a diversas temperaturas. (A) representa los niveles de let7a ARNmi liberado por la proteasa K (barra izquierda a cada temperatura) y los niveles retenidos en las microesferas (barra derecha a cada temperatura). Los niveles de let7a ARNmi se representan como porcentaje total de let7a ARNmi en 0.2 ml del mismo plasma aislado con miRNeasy Serum/Plasma Kit de Qiagen. (B) representa los niveles de miR451a ARNmi liberado por la proteasa K (barra izquierda a cada temperatura) y los niveles retenidos en las microesferas (barra derecha a cada temperatura).
 10 Los niveles de miR451a ARNmi se representan como porcentaje total de miR451a ARNmi en 0.2 ml del mismo plasma aislado con el kit de suero/plasma miRNeasy de Qiagen.

15 La figura 6 presenta dos gráficos que muestran los niveles de let7a (A) o miR451a (B) ARNmi aislado del plasma utilizando métodos comercialmente disponibles de aislamiento de ARNmi, o aislamiento utilizando RIP con liberación de proteasa K en tubos estándar. E1 y E2 representan el aislamiento de ARNmi utilizando miRCury RNA Isolation Kit-Biofluids de Exiqon. Q1 y Q2 representan el aislamiento de ARNmi utilizando miRNeasy Serum/Plasma Kit de Qiagen. RIP-std-Q representa inmunoprecipitación seguida de purificación en columna Qiagen. Los niveles de ARNmi se representan como copias totales recuperadas de 0.2 ml de plasma.

20 La figura 7 presenta dos gráficos que muestran niveles de let7a ARNmi aislado a partir de plasma utilizando métodos comercialmente disponibles de aislamiento de ARNmi, o aislamiento utilizando Ago-RIP con liberación de proteasa K (RIP1-4). (A) Muestra el ensayo 1 y (B) muestra el ensayo 2. E1 y E2 representan el aislamiento de ARNmi utilizando miRCury RNA Isolation Kit-Biofluids de Exiqon. Q1 y Q2 representan el aislamiento de ARNmi utilizando el kit de miRNeasy Serum/Plasma Kit de Qiagen. Los niveles de let7a se representan como copias totales de let7a recuperadas de 0.2 ml de plasma.
 25

30 La figura 8 presenta dos gráficos que muestran niveles de ARNmi aislados del plasma utilizando Ago-RIP seguido de liberación de proteasa K con o sin inhibidores de proteasa e RNasa, y con o sin pretratamiento con detergente. +pre, +inh; Igepal e inhibidores se agregaron al plasma y se incubaron -30 minutos antes de agregar a Ago2-beads. +pre, -nh; Igepal se agregó al plasma sin inhibidores y se incubó ~30 minutos antes de agregarlo a Ago2-beads. -pre, +inh; Igepal e inhibidores añadidos al plasma al mismo tiempo que Ago2-beads. -pre, -inh; Igepal añadido al plasma sin inhibidores al mismo tiempo que Ago2-beads. (A) Representa copias de let7a ARNmi recuperado, y (B) representa copias de miR451a ARNmi recuperado.

35 La figura 9 presenta un gráfico que muestra los niveles libres (barra izquierda para cada ARNmi) y vesicular (barra derecha para cada ARNmi) para los ARNmi indicados como % de ARNmi tratados con IGEPAL total.

40 La figura 10 presenta tres gráficos que muestran niveles de ARNmi aislados de 0.2 o 0.4 ml de plasma utilizando Ago-RIP seguido de liberación de proteasa K (RIP), o de 0.2 ml de plasma utilizando miRCury RNA Isolation Kit-Biofluids de Exiqon (E). (A) representa copias de let7a ARNmi recuperado, (B) representa copias de miR191 ARNmi recuperado y (C) representa copias de miR451a ARNmi recuperado.

45 La figura 11 presenta una gráfica que muestra los niveles de let7a aislados del plasma utilizando Ago-RIP seguido de liberación de proteasa K. Las incubaciones por RIP se realizaron a temperatura ambiente durante 5, 15, 30 o 60 minutos (5', 15', 30', 60'). Los incubados durante 5, 15 o 30 minutos se lavaron todos 5 veces antes de la liberación de proteasa K. Los incubados durante 60 minutos se lavaron 5, 4, 3, 2 o 1 veces (5w, 4w, 3w, 2w, 1w). Se muestra el rendimiento total de let7a recuperado de 0.2 ml de plasma.

50 La figura 12A muestra los niveles de let7a ARNmi aislado del plasma utilizando Ago-RIP o kits de aislamiento de ARNmi a base de columna. Se presentan tres experimentos diferentes (Exp). S1 y S2 representan aislamiento utilizando Ago-RIP; E1 y E2 representan aislamiento utilizando miRCury RNA Isolation Kit-Biofluids de Exiqon; y Q1 y Q2 representan el aislamiento utilizando miRNeasy Serum/Plasma Kit de Qiagen.

55 La figura 12B presenta los niveles de ARN nuclear pequeño RNU6 y ARN nucleolar pequeño SNORD48 aislado del plasma utilizando Ago-RIP o kits de aislamiento de ARNmi basados en columna. Se presentan tres experimentos diferentes. S1 y S2 representan aislamiento utilizando Ago-RIP; E1 y E2 representan aislamiento utilizando miRCury RNA Isolation Kit-Biofluids de Exiqon; y Q1 y Q2 representan el aislamiento utilizando miRNeasy Serum/Plasma Kit de Qiagen.

60 La figura 12C muestra los niveles de ARN mensajero de GAPDH, ARN ribosómico RN18S y ARN ribosómico RN28S aislados del plasma utilizando Ago-RIP o kits de aislamiento de ARNmi basados en columnas. Se presentan tres experimentos diferentes. S1 y S2 representan aislamiento utilizando Ago-RIP; E1 y E2 representan aislamiento utilizando miRCury RNA Isolation Kit-Biofluids de Exiqon; y Q1 y Q2 representan el aislamiento utilizando miRNeasy Serum/Plasma Kit de Qiagen.
 65

La figura 13 presenta un gráfico que muestra los niveles de los ARNmi indicados aislados del plasma mediante Ago-RIP utilizando anticuerpos anti-Ago1, anticuerpos anti-Ago2 o una combinación de anticuerpos anti-Ago1 y anti-Ago2.

Descripción detallada de la invención

Un método eficaz y rápido para aislar ARNmi circulantes ha sido descubierto. Como se ilustra en los ejemplos, un método de la divulgación puede aislar simultáneamente tanto ARNmi circulantes asociados a vesículas como no asociados a vesículas. Ventajosamente, los métodos y kits de la presente divulgación permiten el aislamiento rápido y específico de preparaciones puras de ARNmi sin contaminación por otros tipos de ARN. Además, los métodos y kits divulgados en el presente documento permiten el aislamiento de ARNmi con alto rendimiento a partir de fluidos extracelulares diluidos. Además, los métodos de la presente invención son escalables, permitiendo el aislamiento de ARNmi de volúmenes crecientes de fluidos biológicos extracelulares.

Los niveles de ARNmi están correlacionados con enfermedades, que incluyen cáncer, enfermedades cardiovasculares y en muchas otras enfermedades y procesos de desarrollo, que incluyen esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer, desarrollo de células inmunitarias y modulación de inmunidad adaptativa e innata, mantenimiento de células madre y pluripotencia, desarrollo del sistema nervioso, enfermedad endocrina, incluida diabetes, desarrollo del páncreas, síndrome frágil X, curación de heridas cutáneas, progresión del ciclo celular, rechazo de tejido trasplantado, hipoxia, diferenciación del músculo esquelético. Además, los ARNmi también se expresan por virus, y se han identificado genes objetivo de esos ARNmi. Como tal, los métodos y kits de la presente divulgación pueden usarse para preparar ARNmi para ensayos para diagnosticar enfermedades o estados de enfermedad utilizando una muestra biológica fácilmente disponible, tal como sangre, suero o plasma.

I. Método

La presente divulgación abarca un método para aislar ARNmicro (ARNmi) a partir de un fluido biológico. El método comprende poner en contacto el fluido biológico con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi. El agente tensioactivo disocia los componentes del fluido biológico y el reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi interactúa con las proteínas de unión de ARNmi asociadas con ARNmi para formar complejos de ARNmi inmunoprecipitados. El método comprende además liberar ARNmi de los complejos de ARNmi inmunoprecipitados sin purificación poniendo en contacto, a temperatura ambiente, los complejos de ARNmi inmunoprecipitados con una proteasa.

El método divulgado en este documento aísla específicamente ARNmi. Como se detalla en el Ejemplo 12 a continuación, otros métodos de ARN pequeños (como los ARN nucleares pequeños o los ARN nucleolares pequeños) no se aíslan mediante el método divulgado, y las moléculas de ARN más grandes (como los ARN mensajeros o los ARN ribosómicos) no se aíslan mediante el método divulgado.

(a) fluido biológico

Un método de la presente descripción comprende el aislamiento de extracelular circulante ARNmi en una muestra de fluido biológico obtenida de un sujeto. El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a un humano o un animal. El sujeto puede ser un embrión, un juvenil o un adulto. El sujeto puede ser macho o hembra. Los animales adecuados incluyen vertebrados tales como mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Los ejemplos de mamíferos adecuados incluyen, sin límite, roedores, animales de compañía, ganado y primates. Ejemplos no limitantes de roedores incluyen ratones, ratas, hámsteres, jerbos y cobayas. Los animales de compañía adecuados incluyen, entre otros, gatos, perros, conejos, erizos y hurones. Ejemplos no limitantes de ganado incluyen caballos, cabras, ovejas, cerdos, vacas, llamas y alpacas. Los primates adecuados incluyen, entre otros, monos capuchinos, chimpancés, lémures, macacos, titíes, petiblancos, monos araña, monos ardilla y monos vervet. Ejemplos no limitantes de aves incluyen pollos, pavos, patos y gansos. Un sujeto ejemplar es un humano.

El término "fluido biológico" se puede referir a todos los líquidos biológicos y excreciones aisladas a partir de un tema determinado. Los ejemplos no limitantes de un fluido biológico pueden incluir sangre y fracciones del mismo, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, orina, excretas, semen, fluido seminal, plasma seminal, fluido prostático, fluido preeyaculatorio (fluido de Cowper), derrame pleural, lágrimas, saliva, esputo, sudor, biopsia, ascitis, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, linfa, médula, secreciones cervicales, secreciones vaginales, secreciones endometriales, secreciones gastrointestinales, secreciones bronquiales, secreciones mamarias, secreciones de quistes ováricos, líquido tisular, aspirante tumoral y muestras de fluidos de tejidos. En algunas realizaciones, un fluido biológico es suero sanguíneo. En otras realizaciones, un fluido biológico es plasma sanguíneo.

Los métodos para obtener una muestra de plasma sanguíneo o suero de un sujeto son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la punción venosa, con o sin catéter, puede usarse para recolectar una muestra de sangre para preparar suero. Los métodos para preparar plasma y suero a partir de una muestra de sangre son conocidos en la técnica. En general, una muestra de sangre es lo suficientemente grande como para suministrar cantidades suficientes de plasma o suero para procesar como se describe más adelante. Se puede procesar una muestra de plasma o suero

inmediatamente después de recolectar la muestra. Alternativamente, una muestra de plasma o suero puede congelarse para su posterior procesamiento.

5 Una muestra de fluido biológico puede ser obtenida de un sujeto por recién recogida de una muestra. Alternativamente, se puede obtener una muestra de fluido biológico de una muestra previamente recogida y almacenada. Por ejemplo, cuando un fluido biológico es plasma sanguíneo o suero, se puede obtener una muestra de una colección de muestras de sangre almacenadas y conservadas. En algunas realizaciones, se obtiene una muestra recogiendo recientemente una muestra. En otras realizaciones, se obtiene una muestra de una muestra previamente recogida y almacenada.

10 En algunas realizaciones, una muestra de fluido biológico está sin diluir. En otras realizaciones, una muestra de fluido biológico se diluye antes del aislamiento de ARNmi. El grado de dilución puede depender de una serie de factores que incluyen, entre otros, el ARNmi, el tipo de fluido biológico en la muestra, el sujeto, el estado de la enfermedad del sujeto, el tipo de ensayo utilizado para medir el ARNmi y los reactivos utilizados en el ensayo utilizado para medir el ARNmi. En una realización, una muestra de fluido biológico se diluye añadiendo un volumen de diluyente que varía de aproximadamente 1/2 del volumen de muestra original a aproximadamente 50,000 veces el volumen de muestra original. El diluyente puede ser cualquier fluido que no interfiera con el aislamiento de ARNmi u otros métodos utilizados en los pasos de procesamiento posteriores. Ejemplos no limitantes de diluyentes adecuados incluyen agua desionizada, agua destilada, solución salina, solución de Ringer, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con TRIS, citrato salino estándar y solución salina tamponada con HEPES.

20 (b) agente tensioactivo

Se pone en contacto un fluido biológico con un agente tensioactivo (denominado alternativamente “tensioactivo” o “detergente”). Como se usa en el presente documento, el término “agente tensioactivo” se puede utilizar para describir cualquier agente capaz de disociar componentes de fluido biológico que pueden comprender un ARNmi circulante. Los ejemplos no limitantes de componentes de fluidos biológicos que pueden comprender un ARNmi circulante incluyen vesículas extracelulares tales como lipoproteínas, exosomas, microvesículas, ectosomas, cuerpos apoptóticos y otras vesículas extracelulares.

30 Como apreciará un experto en la materia, cualquier agente tensioactivo capaz de disociar componentes de fluidos biológicos se pueden utilizar en métodos de la descripción, siempre que el agente tensioactivo no interfiera con la formación de un complejo ARNmi inmunoprecipitado de la divulgación. Por ejemplo, un agente tensioactivo puede ser un agente tensioactivo aniónico, un agente tensioactivo catiónico, un agente tensioactivo zwitteriónico, un agente tensioactivo no iónico o combinaciones de los mismos. La identidad del agente tensioactivo de la invención puede variar y variará, dependiendo de la identidad de los componentes del fluido biológico en un fluido biológico que puede comprender un ARNmi circulante, el reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi y el ARNmi aislado.

En algunas realizaciones, un agente tensioactivo es un agente tensioactivo aniónico. Los agentes tensioactivos aniónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, dodecilbencenosulfonato de amina; sulfato de capril-amonio; cumenosulfonato de amonio; dihidroxi estearato de amonio; dodecilbencenosulfonato de amonio; laureth sulfato de amonio; laureth-12 sulfato de amonio; laureth-30 sulfato de amonio; lauril sarcosinato de amonio; lauril sulfato de amonio; laurilsulfosuccinato de amonio; lignosulfonato de amonio; Myreth sulfato de amonio; naftalenosulfonato de amonio; nonoxinol-20 sulfato de amonio; nonoxinol-30 sulfato de amonio; nonoxinol-4 sulfato de amonio; nonoxinol-6 sulfato de amonio; nonoxinol-9 sulfato de amonio; sulfato oleico de amonio; perfluorooctanoato de amonio; estearato de amonio; xilenosulfonato de amonio; naftaleno sulfonato de butilo; fosfato de butilo; dodecilbencenosulfonato de calcio; estearoil lactilato de calcio; tetrapropilbencenosulfonato de calcio; ácido caprílico-9 carboxílico; fosfato de cetilo; ácido cumenosulfónico; DEA-cetil fosfato; DEA-dodecilbencenosulfonato; DEA-lauril sulfato; deceth-4 fosfato; laurilsulfosuccinato de diamonio; estearil sulfosuccinamato de diamonio; diamilsulfosuccinato de sodio; diciclohexil sulfosuccinato de sodio; dihexil sulfosuccinato de sodio; diisobutil sulfosuccinato de sodio; dilaurith-7 citrato; dimeticonol; dinonoxinol-4 fosfato; dioctilamonio sulfosuccinato; dioctil sulfosuccinato de sodio; cetearil sulfosuccinamato disódico; cocamido disódico MEA-sulfosuccinato; cocamido disódico PEG-3 sulfosuccinato; disódico deceth-6 sulfosuccinato; decil difenil éter disulfonato disódico; dodeciloxipropil sulfosuccinamato disódico; isodecil sulfosuccinato disódico; laneth-5 sulfosuccinato disódico; lauramido disódico DEA-sulfosuccinato; lauramido disódico MEA-sulfosuccinato; laureth sulfosuccinato disódico; lauril sulfosuccinato disódico; miristamido disódico MEA-sulfosuccinato; oleamido disódico MEA-sulfosuccinato; oleamido disódico PEG-2 sulfosuccinato; oeth-3 sulfosuccinato disódico; MIPA cocamido PEG-4 disódico sulfosuccinato; ricinoleamido disódico MEA-sulfosuccinato; estearil sulfosuccinamato disódico; undecilenamido disódico MEA-sulfosuccinato; ditridecil sulfosuccinato de sodio; anhídrido dodecenilsulfónico; ácido dodecil difenil éter disulfónico; ácido dodecil difenilóxido disulfónico; ácido dodecilbencenosulfónico; dioleato de glicerilo SE; diestearato de glicerilo SE; ricinoleato de glicerilo SE; citrato de estearato de glicerilo; estearato de glicerilo SE; estearato de glicol SE; hexil fosfato; isopropil fosfato; dodecilbencenosulfonato de isopropilamina; isostearth-2 fosfato; isotrideceth-3 fosfato; isotrideceth-6 fosfato; laureth-1 fosfato; ácido laureth-12 carboxílico; laureth-3 fosfato; laureth-4 fosfato; laureth-6 fosfato; laureth-7 citrato; laureth-9 fosfato; lauril fosfato; lauril sulfato de litio; laureth sulfato de magnesio; sulfato de magnesio PEG-3 cocamida; MEA-laureth fosfato; MEA-lauril sulfato; IPA-laureth sulfato; MIPA-lauril sulfato; miristoil sarcosina; sulfonato de naftalenoformaldehído; fosfato de nonoxinol-10; fosfato de nonoxinol-12; fosfato de nonoxinol-3; nonoxinol-4 fosfato; nonoxinol-4 sulfato; fosfato de nonoxinol-6; fosfato de nonoxinol-7; fosfato de nonoxinol-8; nonoxinol-9 fosfato; nonil nonoxinol-

- 10 fosfato; nonil nonoxinol-15 fosfato; nonil nonoxinol-7 fosfato; ácido oleth-10 carboxílico; ácido oleth-10 fosfato; oleth-3 carboxílico; fosfato de oleth-4; fosfato de oleth-5; ácido oleth-6-carboxílico; fosfato de oleth-7; PEG-2 dilaurato SE; PEG-2 dioleato SE; PEG-2 diestearato SE; PEG-2 laurato SE; Oleato de PEG-2 SE; PEG-2 estearato SE; Ácido PEG-9 estearamida carboxílico; cetil fosfato de potasio; fosfato de potasio deceth-4; dodecylbencenosulfonato de potasio; isostearth-2 fosfato de potasio; lauroil sarcosinato de potasio; laurilsulfato de potasio; oleato de potasio; sulfato oleico de potasio; perfluorooctoato de potasio; sulfato de ricinoleico de potasio; PPG-2 laurato SE; PPG-2 oleato SE; PPG-2 estearato SE; PPG-5-ceteth-10 fosfato; laurato de propilenglicol SE; oleato de propilenglicol SE; propilenglicol ricinoleato SE; propilenglicol estearato SE; copolímero de PVM/MA; 2-etilhexil fosfato de sodio; 2- etilhexil sulfato de sodio; sodio un olefin sulfonato; aliloxi hidroxipropil sulfonato de sodio; behenoil lactilato de sodio; butoxietoxi acetato de sodio; butil naftalenosulfonato de sodio; butil oleato sulfato de sodio; butil oleato sulfonato de sodio; butil fosfato de sodio; caproil lactilato de sodio; capiril sulfonato de sodio; cetil sulfato de sodio; colato de sodio; cumenesulfonato de sodio; deceth sulfato de sodio; decil difenil éter sulfonato de sodio; decil sulfato de sodio; desoxicolato de sodio; dibutil naftalenosulfonato de sodio; didodecylbencenosulfonato de sodio; diisooctilsulfosuccinato de sodio; diisopropil naftalenosulfonato de sodio; dilaureth sódico-7 citrato; dinonilsulfosuccinato de sodio; dodecil difenil éter disulfonato de sodio; dodecil difenilóxido de sodio disulfonato; dodecylbencenosulfonato de sodio; trioleato de sulfato de glicerilo sódico; hexadecil difenil disulfonato de sodio; disulfonato de hexadecil difenilóxido de sodio; disulfonato de hexil difenilóxido de sodio; isotionato de sodio; isodecil sulfato de sodio; isooctil sulfato de sodio; isostearoil lactilato de sodio; isotrideceth-15 sulfato de sodio; lactato de sodio; lauramido de sodio DEAsulfosuccinato; Laureth fosfato de sodio; laureth sulfato de sodio; laureth sulfosuccinato de sodio; laureth-fosfato de sodio; 10 fosfato; laureth-11 carboxilato de sodio; laureth-12 sulfato de sodio; laureth-13 acetato de sodio; laureth-13 carboxilato de sodio; laureth-3 carboxilato de sodio; laureth-4 carboxilato de sodio; laureth-4 fosfato de sodio; laureth-6 carboxilato de sodio; laureth-7 carboxilato de sodio; laureth-7 sulfato de sodio; laureth-8 sulfato de sodio; lauroil glutamato de sodio; lauroil lactilato de sodio; lauroil lactilato de sodio; lauroil metilaminopropionato de sodio; lauroil sarcosinato de sodio; lauril fosfato de sodio; lauril Sulfato de Sodio; lauril sulfoacetato de sodio; lignato de sodio; lignosulfonato de sodio; metilsulfonato de sodio; metil lauroil taurato de sodio; metil miristoil taurato de sodio; metil oleoil taurato de sodio; metil palmitoil taurato de sodio; metil estearoil taurato de sodio; metilnaftalenosulfonato de sodio; m-nitrobencenosulfonato de sodio; myreth sulfato de sodio; miristoil glutamato de sodio; miristoil sarcosinato de sodio; miristilsulfato de sodio; nonoxinol sulfato de sodio; nonoxinol-10 sulfato de sodio; nonoxinol-10 sulfosuccinato de sodio; nonoxinol-15 sulfato de sodio; nonoxinol-4 sulfato de sodio; nonoxinol-5 sulfato de sodio; nonoxinol-6 fosfato de sodio; nonoxinol-6 sulfato de sodio; nonoxinol-8 sulfato de sodio; nonoxinol-9 fosfato de sodio; nonoxinol-9 sulfato de sodio; octoxinol-2 etano sulfonato de sodio; octoxinol-3 sulfato de sodio; octil sulfato de sodio; octilfenoxietoxietil sulfonato de sodio; sulfato oleico de sodio; oleth-7 fosfato de sodio; oleil fosfato de sodio; oleil sulfato de sodio; oleilsulfosuccinamato de sodio; palmitoil sarcosinato de sodio; fenil sulfonato de sodio; propil oleato sulfato de sodio; estearoil lactilato de sodio; estearil sulfosuccinamato de sodio; trideceth sulfato de sodio; trideceth-3 carboxilato de sodio; trideceth-6-carboxilato de sodio; trideceth-7 carboxilato de sodio; tridecil sulfato de sodio; tridecylbencenosulfonato de sodio; xilenosulfonato de sodio; estearoil sarcosina; TEA-glutamato de lauroil; TEA-lauril sulfato; dicarboxietil estearil sulfosuccinamato tetrasódico; TIPA-laureth sulfato; triceteareth-4 fosfato; triceteeth-5 fosfato; trideceth-2 fosfato; trideceth-3 fosfato; trideceth-5 fosfato; tridecil fosfato; y trilaueth-4 fosfato; y trioctil fosfato.
- 40 En aún otras realizaciones, un agente tensioactivo es un agente tensioactivo catiónico. Los ejemplos de agentes tensioactivos catiónicos adecuados incluyen, pero sin limitación, bromuro de alquiltrimetilamonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencildimetilhexadecilamonio; cloruro de bencildimetiltetradecilamonio; bromuro de bencildodecildimetilamonio; tetracloroyodato de benciltrimetilamonio; bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB); bromuro de dimetildioctadecilamonio; bromuro de dodecildildimetilamonio; bromuro de dodeciltrimetilamonio; bromuro de dodeciltrimetilamonio; cloruro de dodeciltrimetilamonio; bromuro de etilhexadecildimetilamonio; reactivo de Girard T; bromuro de hexadeciltrimetilamonio; bromuro de hexadeciltrimetilamonio; N,N',N'-polioxietileno(10)-N-sebo-1,3-diaminopropano; bromuro de tonzonio; y bromuro de trimetil (tetradecil) amonio.
- 50 En aún otras realizaciones, un agente tensioactivo es un agente tensioactivo iónico dipolar. Los agentes tensioactivos iónicos dipolares adecuados incluyen, pero no se limitan a, 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato (CHAPSO); 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS); 3-(4-Heptil)fenil-3-hidroxipropil)dimetilamonio)propanosulfonato (C7BzO); sal interna de 3-(N,N-dimetil)octilamonio)propanosulfonato (SB3-8); Sal interna de 3-(decildimetilamonio)propanosulfonato (SB3-10; caprilil sulfobetaina); 3-(dodecildimetilamonio) sal interna de propanosulfonato (SB3-12); 3-(N,N-dimetil)tetradecilamonio) propanosulfonato (SB3-14); 3-(N,N-dimetil)palmitil)amonio)propanosulfonato (SB3-16); 3-(N,N-dimetil)octadecilamonio) propanosulfonato (SB3-18); 3-[N, N-dimetil(3-miristoilaminopropil)amonio] propanosulfonato (ASB-14). Otros detergentes iónicos dipolares adecuados, dependiendo de la realización, incluyen: lecitina acetilada; apricotamidopropil betaína; babassuamidopropil betaína; behenil betaína; bis 2-hidroxietil sebo glicinato; alquil C12-14 dimetil betaína; canolamidopropil betaína; amidopropil betaína cáprico/caprílico; caprioloamidopropil betaína; cetil betaína; cocamidopropil betaína; colágeno hidrolizado de cocamidopropil dimetilaminohidroxipropilo; N-[3-cocamido)propil]-N,N-dimetil betaína, sal de potasio; cocamidopropil hidroxisulfato; cocamidopropil sulfobetaina; ácido cocaminobutírico; ácido cocaminopropiónico; ácido cocoanfodipropiónico; coco-betaína; cocodimetilamonio-3-sulfopropilbetaína; cocoimidoglicinato; cocoimidopropionato; coco/oleamidopropil betaína; cocoil sarcosinamida DEA; DEA-cocoanfodipropionato; dihidroxietil sebo glicinato; dimeticona propil PG-betaína; ácido N,N-dimetil-N-láurico-amidopropil-N-(3-sulfopropil)-amonio betaína; N,N-dimetil-N-miristol-N-(3-sulfopropil)-amonio betaína; N,N-

5 dimetil-N-palmitil-N-(3-sulfopropil)-amonio betaína; N,N-dimetil-N-estearamidopropil-N-(3-sulfopropil)-amonio betaína; N,N-dimetil-N-estearil-N-(3-sulfopropil)-amonio betaína; N,N-dimetil-N-sebo-N-(3-sulfopropil)-amonio betaína; caproanfodiacetato disódico; caproanfodipropionato disódico; capriloanfodiacetato disódico; capriloanfodipropionato disódico; cocoanfodiacetato disódico; cocoanfodipropionato disódico; isostearoanfodipropionato disódico; laureth-5
 10 carboxianfodiacetato disódico; lauriminodipropionato disódico; lauroanfodiacetato disódico; lauroanfodipropionato disódico; octil b-iminodipropionato disódico; oleoanfodiacetato disódico; oleoanfodipropionato disódico; PPG-2-isodeceth-7 carboxianfodiacetato disódico; soyanfodiacetato disódico; estearoanfodiacetato disódico; talanfodipropionato disódico; seboanfodiacetato disódico; seboiminodipropionato disódico; trigogermanfodiacetato disódico; N,N-diestearil-N-metil-N-(3-sulfopropil)-amonio betaína; erucamidopropil hidroxisultaína; dipropionato de etilhexilo; etil hidroximetil oleil oxazolona; etil PEG-15 sulfato de cocamina; lecitina hidrogenada; proteína hidrolizada; isostearamidopropil betaína; lauramidopropil betaína; lauramidopropil dimetil betaína; ácido lauraminopropiónico; ácido lauroanfodipropiónico; lauroil lisina; lauril betaína; lauril hidroxisultaína; lauril sultaína; linoleamidopropil betaína; lisolecitina; lípido de la leche amidopropil betaína; miristamidopropil betaína; dipropionato de octilo; octiliminodipropionato; oleamidopropil betaína; oleil betaína; 4,4(5H)-oxazodimetanol, 2-(heptadecil)-; talmitamidopropil betaína; óxido de palmitamina; ricinoleamidopropil betaína; ricinoleamidopropil betaína/copolímero de IPDI; sesamidopropil betaína; iminodipropionato de alcoxiopropilo C12-15 de sodio; caproanfoacetato de sodio; capriloanfoacetato de sodio; capriloanfohidroxipropil sulfonato de sodio; capriloanfopropionato de sodio; carboximetil sebo de sodio polipropilamina; cocaminopropionato de sodio; cocoanfoacetato de sodio; cocoanfodihidroxipropil sulfonato de sodio; cocoanfopropionato de sodio; dicarboxietil cocofosfetil imidazolona de sodio; sebo hidrogenado
 20 dimetil glicinato de sodio; isostearoanfopropionato de sodio; lauriminodipropionato de sodio; lauroanfoacetato de sodio; oleoanfodihidroxipropilsulfonato de sodio; oleoanfopropionato de sodio; estearoanfoacetato de sodio; tallamfopropionato de sodio; soyamidopropil betaína; estearil betaína; seboamidopropil hidroxisultaína; ácido de seboanfopolopolicarboxipropiónico; lauroanfo trisódico cloruro de fosfato de acetato de PG; undecilenamidopropil betaína; y trigogermamidopropil betaína.

25 En otras realizaciones, un agente tensioactivo es preferiblemente un agente tensioactivo no iónico. Los ejemplos de agentes tensioactivos no iónicos adecuados incluyen, pero sin limitación, polioxietilen (10) cetil éter (BRIJ® 56); polioxietilen (20) cetil éter (BRIJ® 58); polioxietilenglicol dodecil éter (BRIJ® 35); polioxietileno (9) p-t-octilfenol (NONIDET™ P-40); polioxietileno (4-5) p-t-octilfenol (TRITON™ X-45); polioxietileno (7-8) p-t-octilfenol (TRITON™ X-114); polioxietileno (9-10) p-t-octilfenol (TRITON™ X-100); polioxietilen (9-10) nonilfenol (TRITON™ N-101); monolaurato de sorbitol polioxietileno (20) (TWEEN® 20); monopalmitato de sorbitol polioxietileno (20) (TWEEN® 40); monooleato de sorbitol polioxietileno (20) (TWEEN® 80); óxido de dimetildecilfosfina (APO-10); óxido de dimetildodecilfosfina (APO-12); ciclohexil-n-etil-β-D-maltosido; ciclohexil-n-hexil-β-D-maltosido; ciclohexil-n-metil-β-maltosido; n-decanoilsucrosa; n-decil-β-D-glucopiranosido; n-decil-β-maltopiranosido; n-decil-β-D-tiomaltosido; n-dodecanoil sacarosa; decaetilenglicol monododecil éter; N-decanoil-N-metilglucamina; n-decil α-D-glucopiranosido; decil β-D-maltopiranosido; n-dodecanoil-N-metilglucamida; n-dodecil β-D-maltosido; n-dodecil β-D-maltosido; heptano-1,2,3-triol; heptaetilenglicol monodecil éter; heptaetilenglicol monododecil éter; heptaetilenglicol monotetradecil éter; n-hexadecil β-D-maltosido; hexaetilenglicol monododecil éter; hexaetilenglicol monohexadecil éter; hexaetilenglicol mono-octadecil éter; hexaetilenglicol monotetradecil éter; metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-α-D-glucopiranosido; nonaetilenglicol monododecil éter; N-nonanoil-N-metilglucamina; N-nonanoil-N-metilglucamina; octaetilenglicol monodecil éter; octaetilenglicol monododecil éter; octaetilenglicol monohexadecil éter; octaetilenglicol mono-octadecil éter; octaetilenglicol monotetradecil éter; octil-β-glucósido; octil-β-tiogluósido; octil-β-D-glucopiranosido; octil-β-D-1-tiogluopiranosido; pentaetilenglicol monodecil éter; pentaetilenglicol monododecil éter; pentaetilenglicol monohexadecil éter; pentaetilenglicol monohexil éter; pentaetilenglicol mono-octadecil éter; pentaetilenglicol mono-octil éter; polietilenglicol diglicidil éter; éter de polietilenglicol; polioxietilen 10 tridecil éter; estearato de polioxietileno (100); polioxietilen (20) isohexadecil éter; polioxietilen (20) oleil éter; estearato de polioxietileno (40); estearato de polioxietileno (50); estearato de polioxietileno (8); polioxietilen bis(imidazolil carbonilo); estearato de polioxietilen (25) propilenglicol; saponina de corteza de Quillaja; tetradecil-β-D-maltosido; tetraetilenglicol monodecil éter; tetraetilenglicol monododecil éter; tetraetilenglicol monotetradecil éter; trietilenglicol monodecil éter; trietilenglicol monododecil éter; trietilenglicol monohexadecil éter; trietilenglicol mono-octil éter; trietilenglicol monotetradecil éter; tiloxapol; n-undecil β-D-glucopiranosido, (octilfenoxi) polietoxietanol (IGEPAL® CA-630); polioxietilen (5) nonilfeniléter (IGEPAL® CO-520); y polioxietilen (150) dinonilfenil éter (IGEPAL® DM-970). En una realización, un agente tensioactivo es polioxietilen (5) nonilfeniléter (IGEPAL® CO-520). En otra realización, un agente tensioactivo es dinonilfenil éter de polioxietileno (150) (IGEPAL® DM-970). En una realización, un agente tensioactivo es preferiblemente (octilfenoxi) polietoxietanol (IGEPAL® CA-630).

60 Como se apreciará por un experto en la materia, la cantidad de agente tensioactivo agregado a la lata fluido biológico y pueden variar dependiendo de la identidad de los componentes de fluidos biológicos en un fluido biológico que puede comprender un ARNm circulante. En algunas realizaciones, la concentración final de agente tensioactivo en el fluido biológico puede variar de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 10%. En una realización, la concentración de agente tensioactivo puede variar de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 0.01%. En otra realización, la concentración de agente tensioactivo puede variar de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.1%. En otra realización más, la concentración de agente tensioactivo puede variar de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 1%. En otra realización, la concentración de agente tensioactivo puede variar de aproximadamente 1% a

aproximadamente 5%. En una realización adicional, la concentración de agente tensioactivo puede variar de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%.

(c) reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi

5 Un fluido biológico se pone en contacto con un reactivo de la proteína de unión a anti-ARNmi. Un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi puede ser cualquier agente capaz de unirse a una proteína de unión a ARNmi asociada con ARNmi circulantes. Una proteína de unión a ARNmi asociada con ARNmi circulantes puede unirse a un ARNmi directamente, o puede asociarse indirectamente con un complejo de proteína ARN que comprende ARNmi. Los ejemplos no limitativos de proteínas de unión a ARNmi que pueden asociarse con ARNmi circulantes pueden incluir Argonaut, Dicer, proteína de unión a ARN de respuesta de transactivación (TRBP) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), activador de proteínas de la proteína quinasa inducida por interferón (PACT), el Complejo SMN, proteína de retraso mental X frágil (FMRP), proteína que contiene el dominio de nucleasa estafilocócica Tudor (Tudor-SN), la supuesta ADN helicasa MOV10 y el motivo de reconocimiento de ARN que contiene la proteína TNRC6B u otros componentes del complejo RISC o que puede asociarse de manera transitoria o permanente con el complejo RISC.

En algunas realizaciones, un fluido biológico se pone en contacto preferiblemente con un reactivo anti-Argonaut. Los ejemplos no limitantes de una proteína Argonaut pueden incluir Ago1, Ago2, Ago3 y Ago4. En una realización, un fluido biológico se pone en contacto con un reactivo anti-Ago1. En otra realización, un fluido biológico se pone en contacto con un reactivo anti-Ago2. En otra realización más, un fluido biológico se pone en contacto con un reactivo anti-Ago3. En una realización adicional, un fluido biológico se pone en contacto con un reactivo anti-Ago4. En otra realización, un fluido biológico se pone en contacto preferiblemente con un reactivo capaz de unir más de una proteína Argonaut. Por ejemplo, un fluido biológico puede ponerse en contacto con un reactivo anti-Ago1 y anti-Ago2. En otra realización más, un fluido biológico se pone en contacto preferiblemente con un reactivo capaz de unirse a Ago1, Ago2, Ago3 y Ago4.

Un anticuerpo anti-ARNmi vinculante reactivo de proteína puede ser un agente de unión a epítipo. Los ejemplos no limitantes de agentes de unión a epítipos adecuados, dependiendo de la molécula objetivo, incluyen agentes seleccionados del grupo que consiste en un aptámero, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una secuencia de ADN de doble cadena, ácidos nucleicos modificados, imitadores de ácido nucleico, un ligando, un fragmento de ligando, un receptor, un fragmento de receptor, un polipéptido, un péptido, una coenzima, un corregulador, una molécula alostérica y un ion.

En algunas realizaciones, un agente de unión a epítipo es un anticuerpo. Los ejemplos no limitantes de anticuerpos que pueden usarse incluyen anticuerpos policlonales, ascitis, fragmentos Fab, fragmentos Fab', anticuerpos monoclonales, anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos de dominio único, anticuerpos humanizados y otros fragmentos que contienen el sitio de unión del epítipo del anticuerpo.

En algunas realizaciones, un fluido biológico se pone en contacto con un anticuerpo anti-Argonaut. En una realización, un fluido biológico se pone en contacto con un anticuerpo anti-Ago1. En otra realización, un fluido biológico se pone en contacto con un anticuerpo anti-Ago2. En otra realización más, un fluido biológico se pone en contacto con un anticuerpo anti-Ago3. En otra realización, un fluido biológico se pone en contacto con un anticuerpo anti-Ago4. En una realización adicional, un fluido biológico se pone en contacto con dos anticuerpos anti-Ago elegidos entre los anticuerpos anti-Ago1, anti-Ago2, anti-Ago3 o anti-Ago4. Por ejemplo, un fluido biológico se pone en contacto con anticuerpos anti-Ago1 y anti-Ago2. En una realización adicional, un fluido biológico se pone en contacto con tres anticuerpos anti-Ago elegidos entre anti-Ago1, anti-Ago2, anti-Ago3 o anti-Ago4. En otra realización más, un fluido biológico se pone en contacto con los cuatro anticuerpos anti-Ago. En una realización adicional, un fluido biológico se pone en contacto con un anticuerpo capaz de reconocer más de una proteína Argonaut. Dichos anticuerpos pueden reconocer una, dos, tres o cuatro proteínas Argonaut. En una realización, un fluido biológico se pone en contacto con un anticuerpo anti-Argonaut capaz de reconocer las cuatro proteínas de Argonaut humana.

Poner en contacto un fluido biológico con un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi de la descripción forma complejos de ARNmi inmunoprecipitados. Como tal, un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi se une normalmente a un soporte sólido para formar complejos de ARNmi inmunoprecipitados cuando se pone en contacto un fluido biológico con el reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi inmovilizado. El soporte sólido puede ser un material que puede modificarse para contener sitios individuales discretos apropiados para la unión o asociación de un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi. Ejemplos no limitativos de materiales de soporte sólidos incluyen vidrio, vidrio modificado o funcionalizado, plásticos que incluyen acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos o TeflonJ, nylon, nitrocelulosa, polisacáridos, resinas, sílice o materiales a base de sílice, incluidos silicio y silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos y plásticos. El tamaño y la forma del soporte sólido pueden variar sin apartarse del alcance de la invención. Un soporte sólido puede ser plano, un soporte sólido puede ser un pozo, es decir, una placa de 364 pozos, o alternativamente, un soporte sólido puede ser un cordón o una corredera. En algunas realizaciones, un soporte sólido es un pozo de una placa de paredes múltiples. En otras realizaciones, un soporte sólido es una superficie interna de una punta de

pipeta. En otras realizaciones más, un soporte sólido es preferiblemente una perla. En algunas realizaciones, un soporte sólido es preferiblemente una microesfera magnética.

5 El reactivo proteínico de unión a anti-ARNmi se puede unir a un soporte sólido en una amplia variedad de formas, como será apreciado por los expertos en la técnica. Un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi y un soporte sólido pueden derivarse con grupos químicos funcionales para la posterior unión de los dos. Por ejemplo, un soporte sólido puede derivarse con un grupo químico funcional que incluye, pero no se limita a, grupos amino, grupos carboxilo, grupos oxo o grupos tiol. Usando estos grupos funcionales, se puede unir un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi utilizando grupos funcionales directa o indirectamente utilizando enlazadores. Alternativamente, el reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi también puede unirse al soporte sólido de forma no covalente. Por ejemplo, se puede preparar un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi biotilado, que puede unirse a un soporte sólido recubierto covalentemente con estreptavidina, dando como resultado la unión. Los métodos adicionales para unir un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi a un soporte sólido son bien conocidos en la técnica, y pueden ser como se describe en manuales de laboratorio publicados como en "Current Protocols in Molecular Biology" Ausubel et al., John Wiley & Sons, Nueva York, 2003 o "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 3a edición, 2001. En algunas realizaciones, se prepara un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi biotilado, que puede unirse a un soporte sólido de microesferas recubierto covalentemente con estreptavidina, dando como resultado la unión. Como se describe en la Sección I(d) a continuación, un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi se puede unir a un soporte sólido antes de poner en contacto un fluido biológico en un método de la divulgación. Alternativamente, un fluido biológico de la divulgación puede ponerse en contacto simultáneamente con un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi y un soporte sólido, donde el reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi se une al soporte sólido. Un fluido biológico de la divulgación también puede ponerse en contacto con un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi antes de poner en contacto el fluido biológico con un soporte sólido, donde el reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi se une al soporte sólido. Como apreciará un experto en la materia, la cantidad y concentración de reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi puede variar y variará dependiendo de la identidad del reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi, en el volumen de fluido biológico utilizado, la concentración de un ARNmi en el fluido biológico y la proteína de unión a ARNmi entre otros factores, y pueden determinarse experimentalmente. Cuando un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi es un anticuerpo purificado, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 10 µg se pueden utilizar de anticuerpo para cada muestra de plasma o suero de 0.2 ml.

(d) poner en contacto fluido biológico y aislar ARNmi

35 En un método de la divulgación, un fluido biológico se pone en contacto con un agente tensioactivo y un reactivo de la proteína de unión a anti-ARNmi. Como apreciará un experto en la materia, un fluido biológico puede ponerse en contacto con una variedad de otros agentes sin apartarse del alcance de la invención. Por ejemplo, un fluido biológico puede ponerse en contacto con un agente reductor de tiol para bloquear la formación de enlaces disulfuro e inhibir la actividad de la ribonucleasa durante el aislamiento de ARNmi. Los agentes reductores de tiol adecuados incluyen ditiotreitil (DTT), 2-mercaptoetanol, 2-mercaptoetilamina y tris(carboxietil) fosfina (TCEP). También se puede poner en contacto un fluido biológico con un agente antiespumante. Los ejemplos de agentes antiespumantes incluyen Antifoam 204 y Antifoam O-30, Antifoam A, Antifoam B, Antifoam C, Antifoam Y-30 y Sag 471. También se puede poner en contacto un fluido biológico con inhibidores de degradación de ARN y proteínas para preservar ARNmi y ARNmi-complejos proteicos.

45 En algunas realizaciones, un agente de tamponamiento se puede utilizar para mantener un pH adecuado para el aislamiento de ARNmi. A modo de ejemplo no limitativo, los agentes tamponantes pueden incluir, pero sin limitación, acetato de trietilo, EDTA, tris, glicina y citrato.

50 En algunas realizaciones, un método de la divulgación comprende poner en contacto un fluido biológico con un agente tensioactivo para disociar los componentes de fluido biológico antes de poner en contacto el fluido biológico con un reactivo de la proteína de unión a anti-ARNmi para formar complejos ARNmi inmunoprecipitados. En otras realizaciones, un fluido biológico se pone en contacto con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi simultáneamente.

55 En algunas realizaciones, una muestra no diluida de fluido biológico se pone en contacto con un agente tensioactivo y un reactivo de la proteína anti-ARNmi de unión. En otras realizaciones, un fluido biológico se diluye antes de poner en contacto con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi. La dilución de un fluido biológico puede ser como se describe en la sección I(a) anterior.

60 El contacto entre un fluido biológico, un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi generalmente comprende un período de incubación para permitir la formación de complejos de ARNmi inmunoprecipitados. Se puede poner en contacto un fluido biológico con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi e incubar durante aproximadamente 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240 o 480 minutos o más. En algunas realizaciones, un fluido biológico se pone en contacto con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi y se incuba durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o unos 15 minutos. En otras realizaciones, un fluido biológico se pone en contacto con un agente tensioactivo

y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi y se incuba durante aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o aproximadamente 30 minutos. En otras realizaciones más, se pone en contacto un fluido biológico con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi y se incuba durante aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, o aproximadamente 90 minutos. En otras realizaciones, se pone en contacto un fluido biológico con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi y se incuba durante aproximadamente 90, 120, 240 o 480 minutos o más. En una realización, un fluido biológico se pone en contacto preferiblemente con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi y se incuba durante aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, o aproximadamente 60 minutos.

Un fluido biológico puede ponerse en contacto con un agente tensioactivo y un reactivo de la proteína anti-ARNmi de unión a una temperatura de alrededor de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o aproximadamente 30°C o más. En algunas realizaciones, se pone en contacto un fluido biológico con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi a una temperatura de aproximadamente 0, 1, 2, 3, 4, 5 o aproximadamente 6°C. En otras realizaciones, se pone en contacto un fluido biológico con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi a una temperatura de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o aproximadamente 15°C. En otras realizaciones, un fluido biológico se pone en contacto con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi a una temperatura de aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o aproximadamente 25°C. En otras realizaciones más, un fluido biológico se pone en contacto con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi a una temperatura de aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o aproximadamente 30°C.

Típicamente, un fluido biológico se pone en contacto con un agente tensioactivo y un reactivo de la proteína anti-ARNmi vinculante bajo agitación. Además, generalmente se puede eliminar un fluido biológico para aislar complejos de ARNmi inmunoprecipitados después de formar los complejos, y lavar los complejos de ARNmi inmunoprecipitados.

(e) liberar ARNmi

De acuerdo con un método de la divulgación, los ARNmi se liberan de los complejos de ARNmi inmunoprecipitados sin purificación poniendo en contacto, a temperatura ambiente, los complejos de ARNmi inmunoprecipitados con una proteasa. Los métodos para liberar un ácido nucleico tal como un ARNmi de un complejo de proteínas son bien conocidos en la técnica y pueden incluir la digestión de proteasas y la desnaturalización de proteínas en un complejo de ácido nucleico-proteína. En algunas realizaciones, el ARNmi se libera de los complejos de ARNmi inmunoprecipitados por desnaturalización de proteínas. Por ejemplo, ARNmi puede liberarse de complejos de ARNmi inmunoprecipitados combinando complejos de ARNmi inmunoprecipitados con una solución de guanidinio tiocianato-fenol-clorofórmico. El ARNmi liberado se puede purificar por precipitación o utilizando cromatografía en columna giratoria.

En otras realizaciones, los genes ARNmi se libera preferiblemente de complejos ARNmi inmunoprecipitados por digestión con proteasas. Los términos "proteasa", "proteínasa" y "peptidasa" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren al grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos covalentes. Las enzimas proteasas son bien conocidas en la técnica y pueden incluir proteasas ácidas y serina proteasas. En algunas realizaciones, una proteasa que puede usarse para liberar ARNmi en un método de la divulgación es una proteasa ácida. En una realización, una proteasa ácida que puede usarse para liberar ARNmi en un método de la divulgación es la pepsina.

En otras realizaciones, una proteasa que se puede utilizar para liberar ARNmi en un método de la divulgación es una proteasa ácida. Se han identificado seis clanes de serina proteasas, los dos más grandes son los clanes de quimotripsina y los de tipo subtilisina. Se conoce una gran cantidad de subtilasas. Algunas de las subtilasas que se han estudiado ampliamente incluyen las obtenidas de varias especies de *Bacillus*, incluidas la subtilisina DY, la subtilisina Carlsberg, la subtilisina BPN '(también llamada nagarse), la mesentericopeptidasa, así como la proteinasa K que se obtiene del *Tritirachium album* Limber y la termitasa. que se obtiene de *Thermoactinomyces vulgaris*. En ciertas realizaciones de la presente invención, la proteinasa K se prefiere como una enzima proteasa. Sin embargo, otras enzimas proteasas también pueden usarse en ciertas realizaciones, tales como, por ejemplo, nagarse. Por lo tanto, la enzima proteasa puede ser cualquiera de una serie de proteasas que producen al menos una descomposición parcial de proteínas en complejos de ARNmi inmunoprecipitados de manera que se libera ARNmi. En algunas realizaciones, una proteasa que puede usarse para liberar ARNmi en un método de la divulgación es preferiblemente proteasa K.

En esencia, ARNmi se libera de los complejos de genes ARNmi inmunoprecipitados poniendo en contacto los complejos con una enzima proteasa. Como apreciará un experto en la técnica, la cantidad de proteasa utilizada para liberar ARNmi puede variar y variará dependiendo de la proteasa, la abundancia de complejos de ARNmi inmunoprecipitados, la temperatura durante la digestión con proteasa, las condiciones de tampón utilizadas para la digestión y la duración de la digestión, entre otros factores. En general, los complejos de ARNmi inmunoprecipitados pueden ponerse en contacto con aproximadamente 0.3 unidades de actividad enzimática a aproximadamente 30 unidades de actividad enzimática. En ciertas realizaciones, la cantidad de proteasa en contacto con los complejos de

ARNmi inmunoprecipitados puede variar de aproximadamente 0.3 a aproximadamente 1 unidad, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 unidades, de aproximadamente 3 unidades a aproximadamente 10 unidades, o de aproximadamente 10 unidades a aproximadamente 30 unidades.

5 En algunas realizaciones, el uso de la digestión con proteasas a temperatura ambiente como se describe en el Ejemplo 1. Tal como se utiliza aquí, el término “temperatura ambiente” se utiliza para describir una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 30°C.

10 Los complejos inmunoprecipitados ARNmi se pueden incubar con una proteasa por alrededor de 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, o aproximadamente 30 minutos o más. En algunas realizaciones, los complejos de ARNmi inmunoprecipitados se incuban con una proteasa durante aproximadamente 0.5, 1, 2, 3, 4 o aproximadamente 5 minutos. En otras realizaciones, los complejos de ARNmi inmunoprecipitados se incuban con una proteasa durante aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o aproximadamente 15 minutos. En otras realizaciones más, los complejos de ARNmi inmunoprecipitados se incuban con una proteasa durante aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, o aproximadamente 30 minutos o más.

20 El ARNmi liberado puede ser apropiado para su uso posterior sin purificación adicional. Alternativamente, el ARNmi liberado puede purificarse adicionalmente para usos posteriores. Los métodos de purificación de ácido nucleico, tales como la cromatografía en columna giratoria o las técnicas de filtración, son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos en los manuales de laboratorio publicados, como en “Current Protocols in Molecular Biology” Ausubel et al., John Wiley & Sons, Nueva York, 2003 o “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 3a edición, 2001.

25 El uso posterior de ARNmi liberado puede variar. Los usos no limitantes de ARNmi liberado incluyen PCR cuantitativa en tiempo real, análisis de microarrays, secuenciación, análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), análisis de polimorfismo de nucleótido único (SNP), análisis de microsatélites, análisis de repetición en tándem corto (STR) e hibridación genómica comparativa (CGH).

30 II kits

La invención describe, además, kits que comprenden los agentes activos de superficie, reactivos de proteínas de unión anti-ARNmi, y otros reactivos que se pueden utilizar en un método de la descripción. De acuerdo con la invención, se proporciona un kit para aislar ARNmi de un fluido biológico, que comprende: (a) un primer agente tensioactivo que comprende (octilfenoxi) polietoxietanol (IGEPAL® CA-630), (b) un segundo agente tensioactivo que comprenden desoxicolato de sodio y laurilsulfato de sodio, (c) un anticuerpo anti-Argonaut y (d) proteinasa K. Los reactivos de proteínas de unión a anti-ARNmi y los agentes tensioactivos pueden ser como se describe en la sección (I) anterior. En algunas realizaciones, un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi en un kit es un anticuerpo anti-Ago unido a un soporte sólido. En ciertas realizaciones, un soporte sólido puede ser un cordón, un cordón magnético o un pozo de una placa de múltiples pozos. En otras realizaciones más, un soporte sólido puede ser una superficie interna de una punta de pipeta. En algunas realizaciones, un agente de acción superficial en un kit es IGEPAL. Un kit puede comprender además un medio para liberar ARNmi de complejos de ARNmi inmunoprecipitados. En algunas realizaciones, un kit comprende una proteasa, por ejemplo, proteasa K, para liberar ARNmi de complejos de ARNmi inmunoprecipitados.

45 Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a los expertos una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: 50 Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Ed. Walker, 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Como se usa en este documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a menos que se especifique lo contrario.

55 Cuando se introducen elementos de la presente descripción o de los aspectos preferidos(s) de la misma, los artículos “un”, “una”, “el” y “dicho” pretenden significar que hay uno o más de los elementos. Los términos “que comprende”, “que incluye” y “que tiene” pretenden ser incluyentes y significan que puede haber elementos adicionales además de los elementos enumerados.

60 Como se usa en el presente documento, “ARNmi” o “ARNmicro” significa o una pequeña, secuencia no codificante de ARN de 5 a 40 nucleótidos de longitud que se pueden detectar en una muestra biológica. Algunos ARNmi se derivan de precursores de horquilla procesados, por ejemplo, por la enzima DICER a una especie madura, por ejemplo, aproximadamente 18-25 nucleótidos, preferiblemente 21-23 nucleótidos. Las variantes de ARNmicro son comunes, por ejemplo, entre diferentes especies animales. Además, la variación en los extremos 5' y 3' de los ARNmi es común, 65 y puede ser el resultado de una escisión imprecisa por enzimas como DICER durante la maduración. Estas variantes demuestran un alcance de variación aceptable en la secuencia de los ARNmi que no afecta la función o la capacidad

de detectar los ARNm. Otro tipo de variante es la adición del procesamiento posterior a Dicer de nucleótidos no templados al extremo 3' del ARNm (estos no son templados porque no coinciden con el genoma humano). Las variantes más comunes son la secuencia de ARNm con un A o U adicional agregado al extremo 3'.

5 Como se usa en este documento, el término “fluido biológico” o “fluido corporal” se puede utilizar indistintamente y se refieren a un fluido aislado de un sujeto.

10 Los términos, “muestra biológica”, “fluido biológico”, o “muestra de fluido biológico” se pueden utilizar indistintamente y se refieren a todos los líquidos biológicos y excreciones aisladas a partir de un tema determinado. En el contexto de la invención, tales muestras incluyen, pero no se limitan a, sangre y fracciones de la misma, suero sanguíneo, plasma sanguíneo, orina, excreta, semen, fluido seminal, plasma seminal, fluido prostático, fluido preeyaculatorio (fluido de Cowper), derrame pleural, lágrimas, saliva, esputo, sudor, biopsia, ascitis, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, linfa, médula, secreciones cervicales, secreciones vaginales, secreciones endometriales, secreciones gastrointestinales, secreciones bronquiales, secreciones mamarias, quistes ováricos y muestras de fluidos de tejidos.

15 Un polinucleótido “aislado” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos un contaminante con la que está asociada normalmente en su fuente natural. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta de la forma o entorno en el que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico específica tal como existe en las células naturales.

20 Como se podrían hacer diversos cambios en los animales, células y métodos descritos anteriormente sin apartarse del alcance de la invención, se pretende que toda la materia contenida en la descripción anterior y en los ejemplos que figuran a continuación, se interpreta como ilustrativo y no limitativo.

25 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar la divulgación. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas descritas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas por los inventores para funcionar bien en la práctica de la divulgación. Sin embargo, los expertos en la materia deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se podrían hacer muchos cambios en la divulgación y aun así obtener un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y el alcance de la divulgación, por lo tanto, todo el asunto está establecido para que se interprete como ilustrativo y no en un sentido limitante.

35 Ejemplo 1: protocolo general de aislamiento de ARNm.

Un protocolo representativo usado para aislar ARNm circulante comprende realizar la inmunoprecipitación de ARN (RIP) en presencia de un detergente para liberar el ARNm asociado a vesículas de liberación. En este protocolo, los ARNm se separan de otros componentes celulares como otros ARN, proteínas plasmáticas, etc. sin el uso de fenol, caotrópicos o purificación de columna, y pueden completarse en 40-70 minutos.

40 El protocolo consta de tres pasos:

- 1) los componentes de plasma se trataron con un detergente,
- 45 2) los complejos de ARNm/proteínas se inmunoprecipitaron, y
- 3) los ARNm se liberan de los complejos de ARNm inmunoprecipitados.

50 Las microesferas de proteína A (Sigma-Aldrich GE28-9670-56), proteína G (Sigma-Aldrich GE28-9670-66) o estreptavidina (Sigma-Aldrich GE28-9857-38) se revistieron con anticuerpo anti-Ago al transferir 20 μ l de microesferas magnéticas (suspensión al 10%) al tampón de lavado RIP de 0.1 ml (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, IGEPAL® CA-630 al 0.05%), lavando las microesferas con tampón de lavado RIP una vez y utilizando un imán soporte para separar las microesferas de la solución. Las microesferas magnéticas lavadas se resuspendieron en 0.1 ml de tampón de lavado RIP antes de agregar 2.5-10 μ g de anti-Ago biotilado o no biotilado (Sigma-Aldrich SAB4800048), anticuerpo anti-Ago2 (Sigma-Aldrich SAB4200085) o anti-Ago1 (Sigma-Aldrich SAB4200084). Las microesferas y el anticuerpo se incubaron con rotación a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos. Las microesferas se separaron luego de la solución utilizando un soporte magnético. Las microesferas de anticuerpo se lavaron dos veces con 0.5 ml de tampón de lavado RIP.

60 En el primer paso del proceso de aislamiento de los ARNm, 0.2 ml de plasma, 8 μ l 25% de Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich I8896; 40 ml 25% IGEPAL por ml de plasma para producir una concentración final de 1%), 2 μ l de cóctel inhibidor de proteasa (PIC; Sigma-Aldrich P8340; 10 μ l/ml plasma), y 0.8 μ l de inhibidor de RNasa (Sigma-Aldrich R1158; 4 μ l/ml de plasma) se añadieron a las microesferas de anticuerpo Ago preparadas. Alternativamente, el plasma se puede tratar con detergente e inhibidores mientras se preparan las microesferas, y el plasma pretratado se agrega posteriormente a las microesferas de anticuerpos.

65

En el segundo paso, los complejos de ARNmi/proteína se inmunoprecipitaron mediante la incubación de la muestra a temperatura ambiente durante 1 hr o 4°C durante la noche con rotación. Las microesferas se lavaron 5X con 1 ml de tampón RIP de lavado y se recogieron utilizando el soporte magnético para separar las microesferas del sobrenadante. Las microesferas se pueden centrifugar brevemente y volver al soporte magnético para eliminar el sobrenadante residual.

En el tercer paso, el ARNmi precipitado asociado con microesferas de anticuerpo fue liberado de la proteína compleja y las microesferas mediante extracción con reactivo de lisis TRI Reagent®BD o QIAzol seguido de precipitación de isopropanol con acetato de amonio y acrilamida lineal, como se describe en Technical Bulletin for Sigma-Aldrich Imprint RNA Immunoprecipitation Kit (RIP), o purificado con el miRNeasy Serum/Plasma Kit de Qiagen. Alternativamente, y preferiblemente, ARNmi fue liberado por digestión de proteinasa K. Se agregó veinte µl de mezcla de proteinasa K (14 µl de agua, 2 µl de tampón de liberación K de proteinasa 10X, y 4 µl de proteinasa K P4850) a las microesferas de la etapa dos, y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en vórtice Genie 2, ajuste 4. El tampón de liberación de proteinasa K 10X comprende Tris 100 mM, pH 8.0, 15 mM de MgCl₂, 500 mM de KCl, 100 mM de DTT e IGEPAL al 1%. Inmediatamente después de la incubación, las microesferas se eliminaron colocándolas en un soporte magnético y transfiriendo el sobrenadante que comprende ARNmi libre a un tubo nuevo. La proteinasa K en el sobrenadante se inactivó incubando la muestra a 95°C durante 5 minutos. Se detectaron ARNmi específicos con los ensayos MystiCq RT-qPCR de Sigma-Aldrich utilizando 5 µl de cada preparación de ARNmi por 10 µl de reacción de cola de poliA. Los ARNmi sintéticos, es decir, el ARN de cadena sencilla con la misma secuencia que los ARNmi maduros enumerados en miRBase, se diluyeron en 0.02 mg/ml de acrilamida lineal a un número de copias conocido basado en la absorbancia de las soluciones madre a 260 nm, analizadas en paralelo con ARNmi preparados a partir de plasma, y se utiliza como estándar para la cuantificación absoluta.

Ejemplo 2: La inmunoprecipitación de ARNmi del plasma es más eficiente que el Tri Reagent solo.

La eficiencia de aislamiento ARNmi a partir de plasma utilizando ARN inmunoprecipitación (RIP) se comparó con el aislamiento de los genes ARNmi utilizando TRI Reagent®BD (Sigma-Aldrich). TRI Reagent®BD es un reactivo para su uso en el aislamiento simultáneo de ARN, ADN y proteínas de derivados de la sangre, como suero, plasma o sangre completa.

El aislamiento de ARNmi utilizando TRI Reagent®BD se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se mezclaron 0.2 ml de plasma con TRI Reagent®BD, y se extrajo ARNmi utilizando cloroformo para la separación de fases antes de la precipitación de isopropanol en presencia de acetato de amonio y acrilamida lineal, y lavado de ARN para análisis. El aislamiento de ARNmi utilizando RIP se realizó con 2.5 µg de anticuerpo anti-Ago2 unido a 20 µl de microesferas magnéticas de proteína A. El ARNmi se recuperó de las microesferas mediante extracción con TRI Reagent®BD y precipitación con isopropanol en presencia de acetato de amonio y acrilamida lineal, con respecto a la extracción directa con plasma.

El nivel de let-7a-5p, miR23a-3p, miR191-5p, miR142-3p, y miR451a ARNmi en las muestras preparadas se determinó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. RIP de ARNmi de plasma fue de aproximadamente 5 a aproximadamente 600 veces más eficiente que la TRI Reagent®BD (Fig. 1).

Ejemplo 3. Rendimiento de RIP similar al rendimiento de un kit comercial.

La eficiencia de aislamiento ARNmi a partir de plasma utilizando inmunoprecipitación de ARN (RIP) se comparó con el aislamiento de los genes ARNmi utilizando miRNeasy Suero/Plasma Kit de Qiagen (Qiagen). Qiagen miRNeasy emplea columnas giratorias que comprenden resina de sílice que se une selectivamente a ADN o ARN, y se recomienda para el aislamiento de ARNmi a partir de ≤ 0.2 ml de suero o plasma.

El aislamiento de ARNmi utilizando Qiagen miRNeasy Serum/Plasma Kit se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se mezclaron 0.2 ml de plasma con el reactivo QIAzol, y ARNmi se purificó de la capa acuosa utilizando las columnas de centrifugado proporcionadas. Aislamiento de ARNmi utilizando RIP se realizó con microesferas magnéticas de 20 µl de proteína A a la que se une 2.5 µg de anticuerpo anti-Ago2. Se liberaron ARNmi de las microesferas con reactivo QIAzol y se purificaron con el kit Qiagen, con respecto a la extracción directa de plasma.

El nivel de ARNmi let-7a, miR23a, miR191, miR142, y miR451a en las muestras preparadas se determinó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. El rendimiento de ARNmi utilizando RIP fue similar al rendimiento ARNmi utilizando el kit Qiagen solo (Fig. 2).

Ejemplo 4. Comparación de RIP utilizando anticuerpo anti-Ago biotinilado y no biotinilado y microesferas de estreptavidina.

Tanto las microesferas de Proteína A como de Proteína G se unen a IgG humano, que es extremadamente abundante en el plasma. Para evitar el co-aislamiento de IgG, los anticuerpos anti-Ago (clon 2A8) y anti-Ago2 (clon 11A9) se biotinilaron con Pierce EZLink Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Scientific) para RIP con microesferas de estreptavidina. Ago-RIP se realizó utilizando 2.5 µg del anticuerpo biotinilado anti-Ago2 (b-Ago2) o anti-Ago (b-Ago) y 20 µl de microesferas magnéticas de estreptavidina, o con 2.5 µg del anticuerpo anti-Ago2 no biotinilado y 20 µl de microesferas de proteína A. El RIP con el anticuerpo biotinilado anti-Ago2 (b-Ago2) y las microesferas de estreptavidina dieron el mismo rendimiento de ARNmi que el RIP con el anticuerpo anti-Ago2 con las microesferas de Proteína A (ver Figura 3). El RIP con anti-Ago biotinilado dio rendimientos de ARNmi significativamente más bajos, como lo hicieron con las microesferas anti-Ago y proteína A no biotiniladas.

Ejemplo 5. La liberación de calor de ARNmi aislado utilizando RIP afecta negativamente el rendimiento.

El calentamiento en agua libre de nucleasas se probó como un medio para liberar ARNmi después del RIP. Ago-RIP se realizó con 0.2 µl de plasma y 2.5 µg de anticuerpo anti-Ago o anti-Ago2 no biotinilado en microesferas magnéticas de proteína A, o anticuerpo anti-Ago o anti-Ago2 biotinilado en microesferas magnéticas de estreptavidina. Se añadieron catorce µl de agua libre de nucleasas a las microesferas, y estas mezclas se calentaron a 40°, 50° o 60°C durante 2 minutos antes de retirar las microesferas. El RIP seguido de la liberación de calor se comparó con el RIP seguido de la purificación de ARNmi con el Qiagen miRNeasy Serum/Plasma Kit, y los ARNmi purificados directamente del plasma con el kit Qiagen. Se añadió cel-miR-39-3p sintético (1.4e8 copias) después de la adición de QIAzol para las preparaciones de Qiagen o en el agua añadida a las microesferas post-RIP.

El cel-miR-39-3p sintético añadido no fue detectado después de 2 minutos a 60°C con el producto RIP sobre microesferas (Fig. 4). Tampoco se detectó ARNmi endógeno después de 2 minutos a 40°, 50° o 60°C. Se observaron resultados similares para miR23a, miR142, miR191 y miR451a. Let7a ARNmi también se perdió cuando las muestras se calentaron a 50° o 60°C. La pérdida de ARNmi probablemente se deba a la contaminación por arrastre de RNasa con RIP, ya que se sabe que la sangre contiene niveles extremadamente altos de RNasa.

Ejemplo 6. Liberación de ARNmi utilizando digestión con proteinasa K.

La digestión con proteinasa K se probó como un medio para liberar ARNmi después de Ago-RIP. El RIP se realizó con 0.2 µl de plasma y 2.5 µg de anticuerpo biotinilado anti-Ago2 unido a 20 µl de microesferas magnéticas de estreptavidina. Post-RIP, microesferas se incubó en tampón de digestión (20 µl de 10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, KCl 50 mM, DTT 10 mM, 0.1% de IGEPAL) que contiene 4 µl de proteinasa K (Sigma Aldrich P4850) a temperatura ambiente o 37°C durante 10 minutos con agitación, o a 65°C durante 2 minutos con agitación. Después de retirar las microesferas, la Proteinasa K se inactivó a 95°C durante 5 minutos y se añadieron 5 µl de cada digestión de proteinasa K a una reacción de 10 µl de colas de poliA para la detección específica de ARNmi con ensayos MystiCq RT-qPCR de Sigma-Aldrich. A modo de comparación, se extrajo una preparación paralela de microesferas post-RIP con reactivo de lisis QIAzol y se purificó con suero/plasma miRNeasy ("total", establecido al 100%). Los niveles de ARNmi de RIP-proteinasa K se expresaron en relación con los de RIP en los que se liberaron ARNmi utilizando el kit miRNeasy.

La liberación de ARNmi utilizando la digestión de proteinasa K a temperatura ambiente proporcionó más ARNmi que la liberación a temperaturas más altas (Fig. 5). En todos los casos, se perdió una cantidad significativa de ARNmi total. La pérdida se debió muy probablemente a la ARNasa residual en la muestra.

Un experimento similar se realizó mediante digestión con pepsina en tampones a pH 2, 3, o 4 para la liberación de genes ARNmi en vez de proteinasa K. La liberación de ARNmi utilizando pepsina recuperó al menos el 1% de los genes ARNmi (datos no mostrados).

Ejemplo 7. Comparación de RIP con otros métodos para la extracción de ARNmi de biofluidos.

Los ARNmi se aislaron utilizando microesferas magnéticas anti-Ago2 y de estreptavidina biotiniladas y la liberación de proteasa K esencialmente como se describe en el Ejemplo 6. Para comparación, los ARNmi también se purificaron directamente del plasma utilizando el miRCury™ RNA Isolation Kit - Biofluids de Exiqon, o el miRNeasy Serum/Plasma Kit de Qiagen (FIG. 6). Estos datos muestran que los rendimientos de ARNmi let7a a partir de ARN purificado utilizando el kit de Exiqon fueron 3-4 veces mayores que los purificados utilizando el kit de Qiagen. Los rendimientos de la mayoría de los ARNmi preparados utilizando Ago-RIP y la liberación de proteinasa K fueron intermedios entre los de Exiqon y Qiagen en la mayoría de los experimentos. Los resultados para let7a se muestran en la figura 6 y la figura 7, pero los de miR23a, miR142 y miR191 fueron similares. Por otro lado, los rendimientos de miR451a fueron similares para Ago-RIP y Exiqon. miR451a requiere actividad de segmentación Ago2 para procesar a un ARNmi maduro y, por lo tanto, solo ocurre en complejos Ago2. Otros ARNmi pueden asociarse con Ago1, Ago3 o Ago4 además de Ago2. Dado que el anticuerpo utilizado es específico para Ago2, aísla miR451a de manera más eficiente que todos los demás ARNmi maduros.

Ejemplo 8. RIP con o sin inhibidores de proteasa e inhibidores de ARNasa.

Ago-RIP se utilizó para aislar ARNmi en presencia (+inh) o ausencia (-inh) de inhibidores de proteasa e inhibidores de RNasa, y ARNmi fueron liberados de las microesferas con proteasa K. Ago-RIP realiza en presencia de inhibidores produjeron más ARNmi let7a que las muestras que no fueron tratadas con inhibidores. Se encontraron resultados similares para miR191. No hubo diferencias significativas para miR451a (Figura 8).

El pretratamiento del suero con IGEPAL con o sin inhibidores también se realizó (+pre), y se comparó con la adición de IGEPAL con o sin inhibidores al mismo tiempo que la adición de microesferas de anticuerpos (-pre). Los resultados muestran que el pretratamiento de suero con proteasa y los inhibidores de RNasa no mejoran los rendimientos de cualquiera let7a o miR451a cuando se compara con co-tratamiento (Fig. 8).

Ejemplo 9. Recuperación de ARNmi con o sin detergente.

Para determinar el efecto de detergente en el aislamiento de ARNmi, se realizó Ago-RIP (con 0.2 ml de plasma) en presencia o ausencia de detergente IGEPAL utilizando 10 µg de anticuerpo anti-Ago2 biotinilado/microesferas magnéticas de estreptavidina. Se supuso que cualquier ARNmi aislado en ausencia de detergente estaba libre (es decir, no en una vesícula), y cualquier aislado en presencia de detergente era vesicular. El ARNmi total fue el nivel de un ARNmi recuperado del plasma tratado con IGEPAL, y se ajustó al 100%. El ARNmi libre (ARNmi no asociado con vesículas) fue el nivel de un ARNmi recuperado del plasma que no fue tratado con IGEPAL. El ARNmi asociado a las vesículas se calculó como el nivel de un ARNmi en la muestra de ARNmi total restado por el nivel de dicho ARNmi en la muestra de ARNmi libre. La figura 9 muestra los niveles libres y asociados a vesículas de ARNmi let7a, miR23a, miR142 y miR451a. Estos resultados muestran que el tratamiento con detergente puede ser deseable para recuperar algunos ARNmi de manera eficiente del plasma mediante RIP.

Ejemplo 10. RIP es escalable.

El RIP se realizó con 0.2 ml de plasma y 10 µg de microesferas biotiniladas anti-Ago2/estreptavidina, o 0.4 ml de plasma y 20 µg de microesferas biotiniladas anti-Ago2/estreptavidina, seguido de liberación con digestión de proteinasa K. A modo de comparación, los ARNmi se aislaron de 0.2 ml del mismo plasma con el kit de aislamiento de ARN miRCury de Exiqon: biofluidos. Los rendimientos totales de let7a, miR191 y miR451a recuperados con cada método de preparación se muestran en la figura 10. Con Ago-RIP, el doble de plasma (es decir, 0.4 ml versus 0.2 ml) produjo 1.5-2 veces la cantidad de ARNmi analizados, mientras que los kits basados en columnas (como los de Exiqon y Qiagen) son de capacidad limitada y recomendar el uso de no más de 0.2 ml de plasma.

Ejemplo 11. Tiempos mínimos de incubación y lavado para RIP.

El RIP se realizó con 0.2 ml de plasma y 5 µg de microesferas biotiniladas anti-Ago2/estreptavidina, incubadas con rotación a temperatura ambiente durante 5, 15, 30 o 60 minutos. Los incubados durante 5, 15 o 30 minutos se lavaron todos 5 veces después de completar la incubación. Aquellos con incubaciones de 60 minutos se lavaron 5, 4, 3, 2 o 1 veces con el tampón de lavado RIP. Todos fueron liberados con proteinasa K. Los rendimientos para let7a se presentan en la figura 11. Los resultados muestran que parece que se necesita un período de incubación de más de 15 minutos para la recuperación máxima de ARNmi en las condiciones utilizadas (por ejemplo, tipo y cantidades de anticuerpos y microesferas), pero solo se necesita un lavado antes de la detección de ARNmi con Sigma- Ensayos MystiCq de Aldrich (colas políA, RT, qPCR). Se obtuvieron resultados similares para miR122, miR191 y miR451a.

Ejemplo 12. RIP es específico para ARNmi.

El siguiente ejemplo se realizó para determinar si Ago-RIP es específico para ARNmi o si Ago-RIP también aísla otros ARN. Los aislamientos se realizaron con Ago-RIP (S), el kit de aislamiento de ARN miRCury de Exiqon - Biofluids (E) o el kit de suero/plasma miRneasy de Qiagen (Q) de 0.2 ml de plasma fresco (experimentos 1 y 2) o 0.2 ml de plasma congelado (experimento 3). El experimento 1 se realizó con 2.5 µg de anticuerpo biotinilado anti-ago2/20 ml de microesferas de estreptavidina. Los experimentos 2 y 3 se realizaron con 2.5 µg de anticuerpo antiago2 biotinilado/20 µl de microesferas de estreptavidina. La digestión con proteinasa K esencialmente como se describió anteriormente en el Ejemplo 6 se usó para liberar los ARNmi de las microesferas. Se detectaron ARNmi específicos (por ejemplo, Let7a) y ARN nucleolares o nucleares pequeños específicos (por ejemplo, RNU6 o SNORD48) utilizando ensayos MystiCq RT-qPCR, y se detectaron mRNA o rRNA más largos (por ejemplo, GAPDH, RN18S, RN28S) utilizando ensayos KiCqStart® RT-qPCR (Sigma-Aldrich). Se usó ARN total de células HeLa (aislado utilizando TRI Reagent®BD) para los estándares de cuantificación.

Como se esperaba, ARNmi como let7a se aislaron utilizando Ago-RIP o cualquiera de los kits basados en columna (véase la Fig.12A). Sin embargo, otros ARN pequeños o ARN grandes no se aislaron mediante Ago-RIP sino que se aislaron con kits Exiqon y Qiagen. Como se muestra en la figura 12B y la figura 12C, se aislaron poco o nada de RNU6, SNORD48, GAPDH, RN18S o RN28S RNAS utilizando Ago-RIP, pero todos estos otros tipos de ARN se aislaron con los kits Exiqon y Qiagen. Por lo tanto, Ago-RIP aísla específicamente solo ARNmi.

Ejemplo 13. El uso de anticuerpos anti-Ago1 y anti-Ago2 aumenta el rendimiento de RIP.

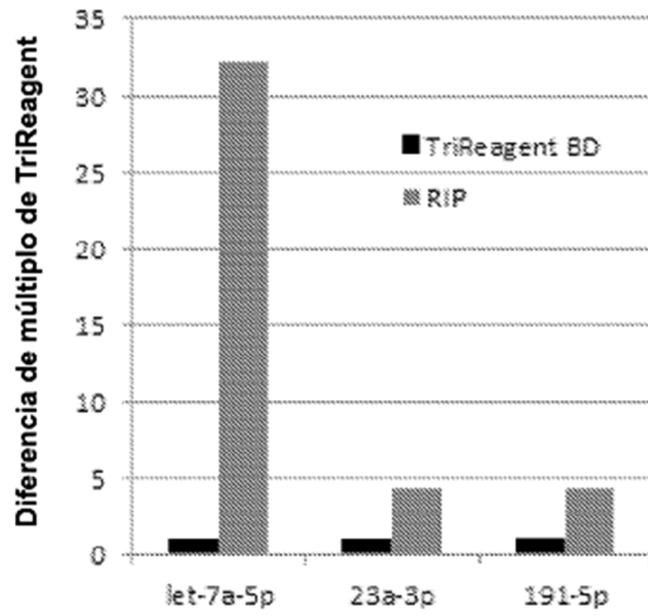
5 Puesto que los diferentes ARNmi asocian con diferentes Ago proteínas, es posible que los rendimientos de determinados ARNmi podrían mejorarse mediante el uso combinado de anticuerpos contra diferentes proteínas Ago. Por lo tanto, los ARNmi se aislaron de 0.2 ml de plasma utilizando 10 µg de anticuerpo anti-Ago1/20 µl de microesferas de proteína A, 10 µg de anticuerpo anti-Ago2/20 µl de microesferas de proteína A o 20 ml de 1:1 mezcla de cada tipo de microesfera de anticuerpos. La liberación de los ARNmi de las microesferas se realizó utilizando el reactivo de lisis QIAzol y se purificó con el kit Qiagen esencialmente como se describió anteriormente en el Ejemplo 3. Se detectaron ARNmi específicos (por ejemplo, let7a, miR142-3p, miR122, miR191 y miR451a) utilizando ensayos MystiCq RT - qPCR.

10 Como se muestra en la figura 13, los rendimientos utilizando ambos anticuerpos juntos fueron aproximadamente la suma de cada anticuerpo usado por separado. Para la mayoría de los ARNmi, el uso de anti-Ago2 resultó en un rendimiento mayor que el uso de anti-Ago1. Sin embargo, se recuperó más miR122 cuando se usó anti-Ago1, lo que es consistente con Turchinovich et al., 2012, RNA Biology 9 (8): 1066-75). Además, miR451a solo se recuperó con anti-Ago2, como se explicó anteriormente en el Ejemplo 7.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para aislar ARNm micro (ARNmi) de un fluido biológico, el método comprende (a) poner en contacto el fluido biológico con un agente tensioactivo y un reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi, en el que el agente tensioactivo disocia los componentes del fluido biológico y el reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi interactúa con una proteína de unión a ARNm asociada con ARNm para formar complejos de ARNm inmunoprecipitados; y (b) poner en contacto, a temperatura ambiente, los complejos de ARNm inmunoprecipitados con una proteasa para liberar ARNm de los complejos de ARNm inmunoprecipitados sin purificación.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el fluido biológico comprende ARNm vesicular y ARNm no vesicular.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el fluido biológico es plasma o suero.
- 15 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el agente tensioactivo es un agente tensioactivo no iónico.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el fluido biológico se pone en contacto con el agente tensioactivo y el reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi simultáneamente.
- 20 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el fluido biológico, el agente tensioactivo y el reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi se incuban durante aproximadamente 30 minutos.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el fluido biológico, el agente tensioactivo y el reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi se incuban a temperatura ambiente.
- 25 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el reactivo de proteína de unión a anti-ARNmi comprende un anticuerpo anti-Argonaut unido a un soporte sólido.
9. El método de la reivindicación 8, en el que el soporte sólido es microesferas magnéticas.
- 30 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la proteasa es proteinasa K.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el contacto con la proteasa continúa durante aproximadamente 10 minutos.
- 35 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el ARNm liberado de los complejos de ARNm inmunoprecipitados está libre de otros tipos de moléculas de ARN.
- 40 13. Un kit para aislar ARNm micro de un fluido biológico, el kit comprende (a) un primer agente tensioactivo que comprende (octilfenoxi) polietoxietanol (IGEPAL® CA-630), (b) un segundo agente tensioactivo que comprende desoxicolato de sodio y laurilo de sodio sulfato, (c) un anticuerpo anti-Argonaut y (d) proteinasa K.
- 45 14. El kit de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo anti-Argonaut está unido a un soporte sólido.
15. El kit de la reivindicación 14, en el que el soporte sólido es microesferas magnéticas.
16. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el anticuerpo anti-Argonaut es capaz de unirse a Ago1, Ago2, Ago3 y/o Ago4.

A



B

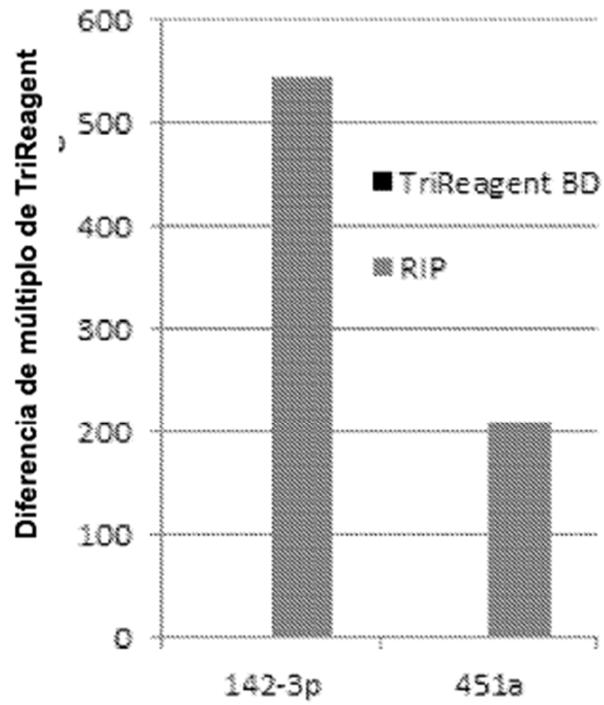


FIG. 1

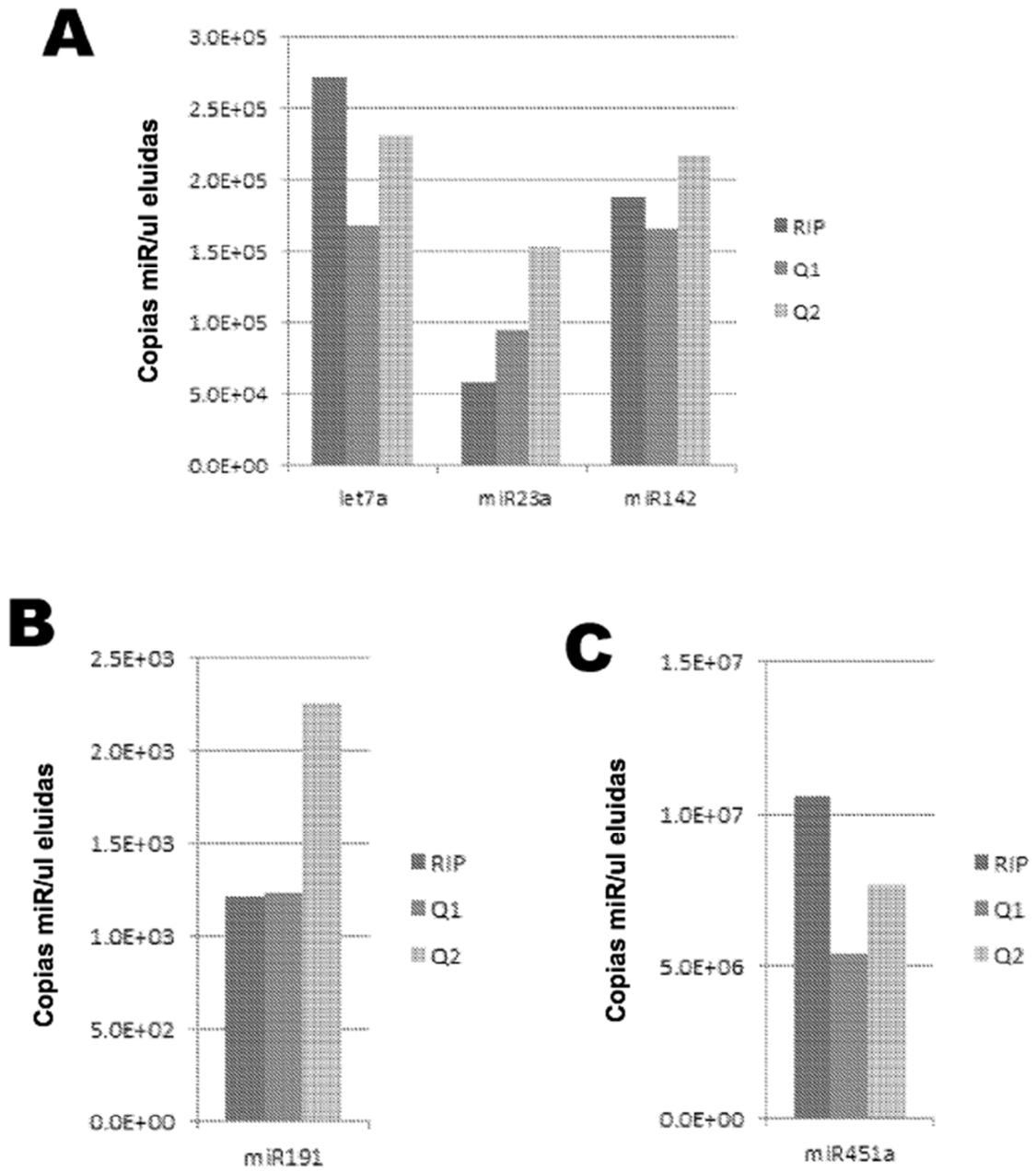


FIG. 2

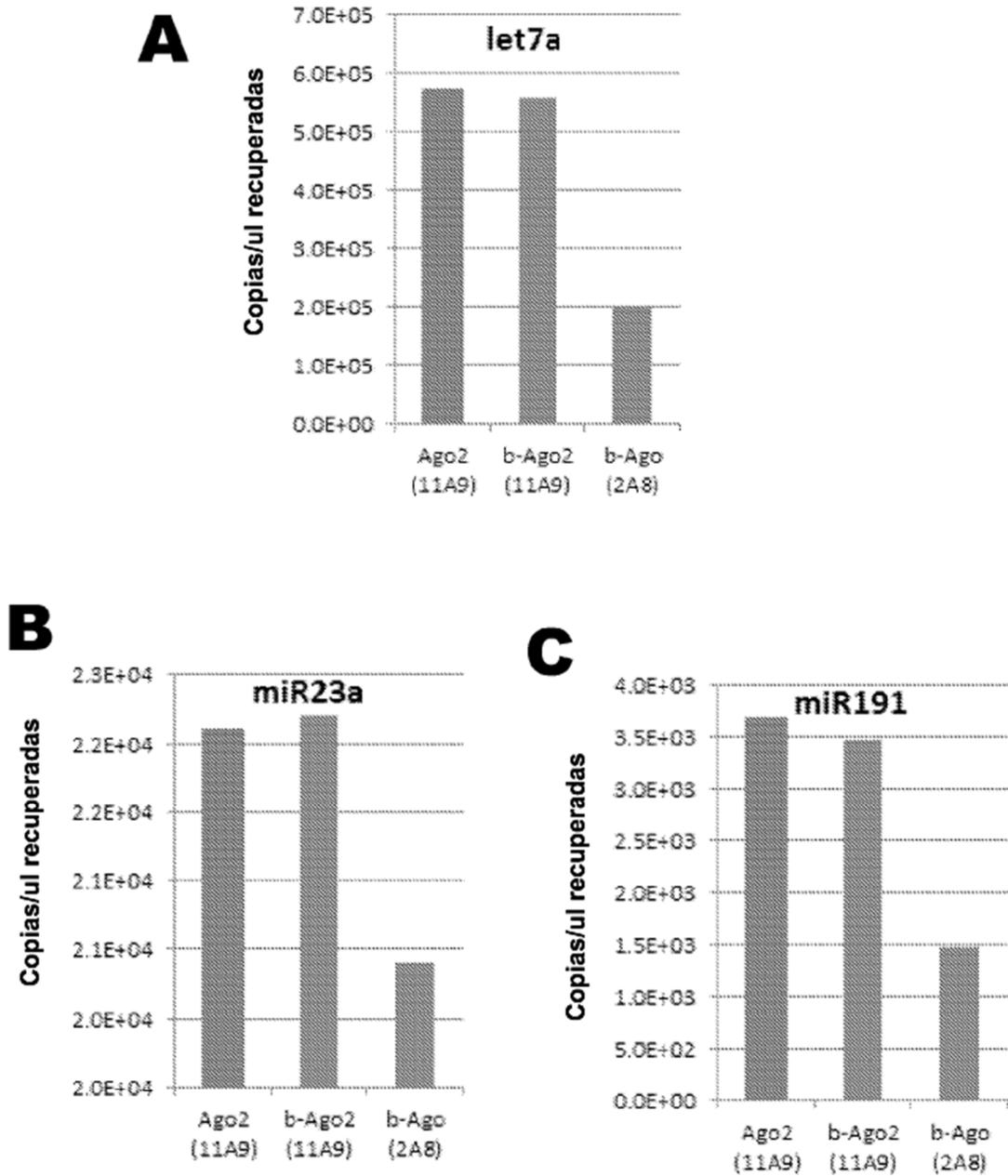


FIG. 3

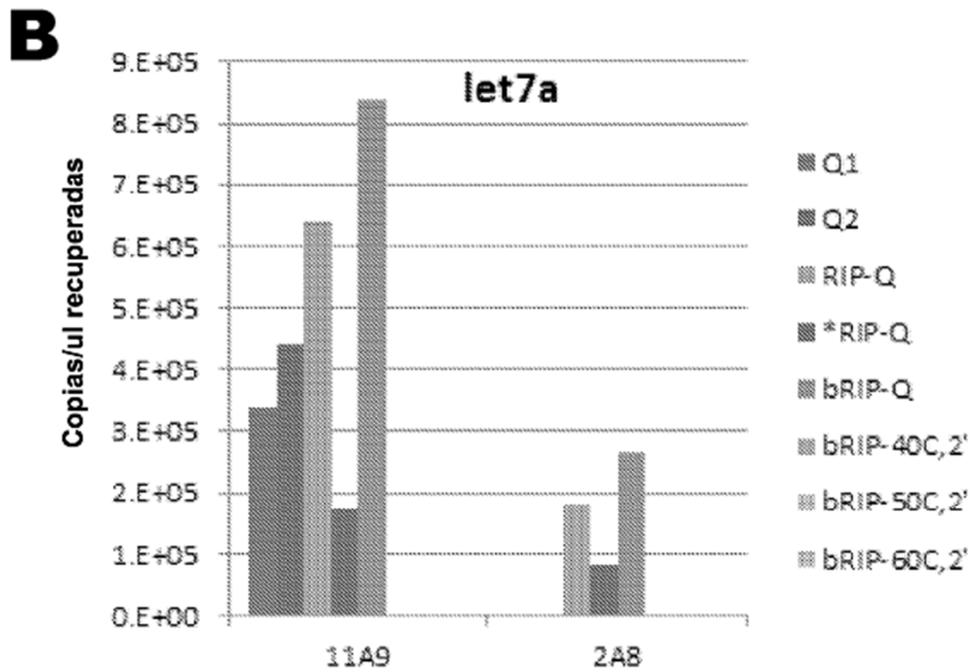
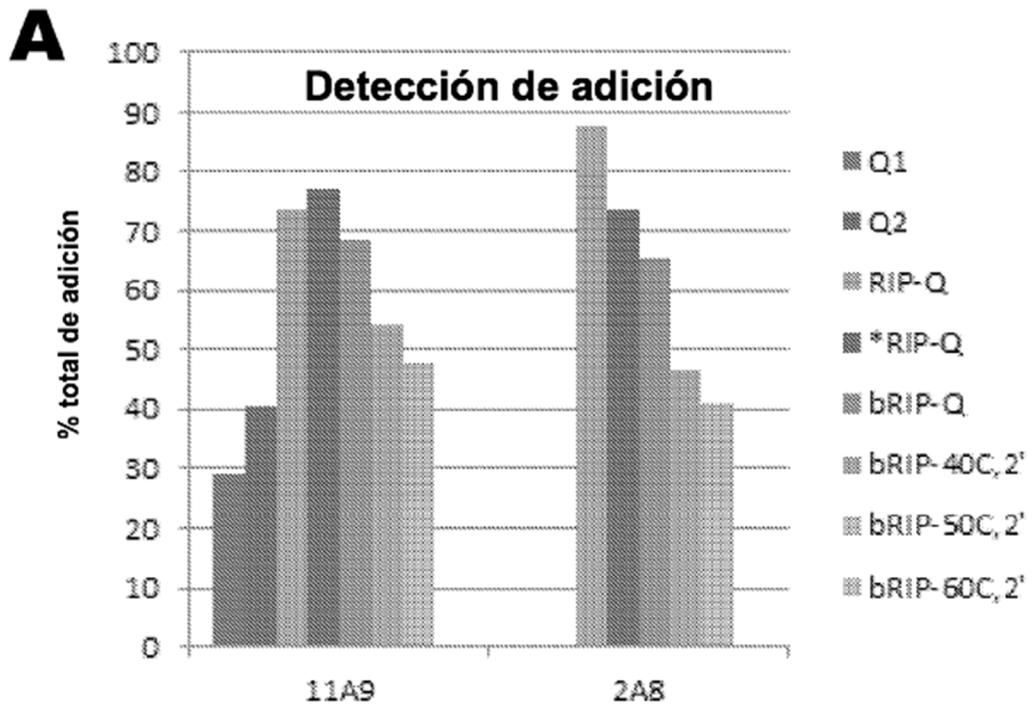
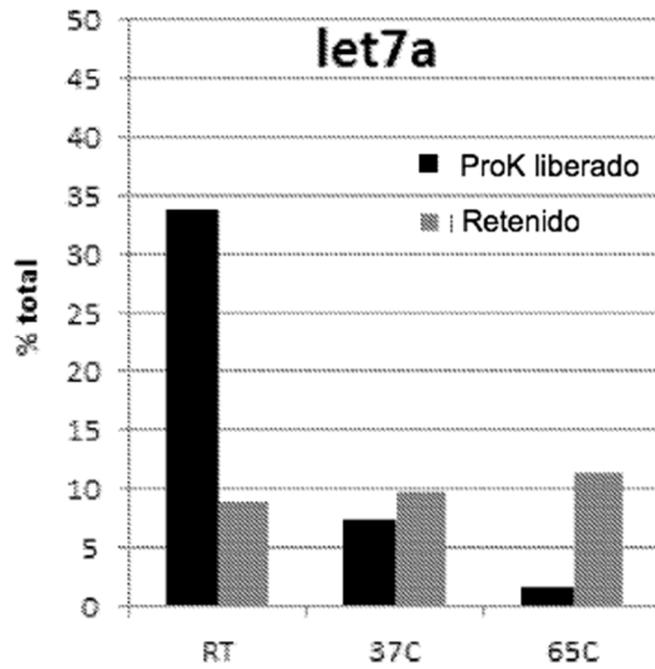


FIG. 4

A



B

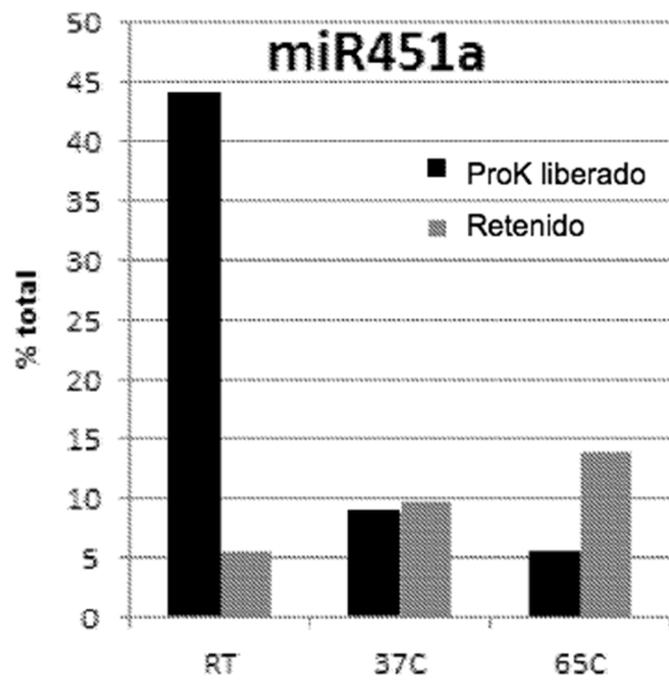
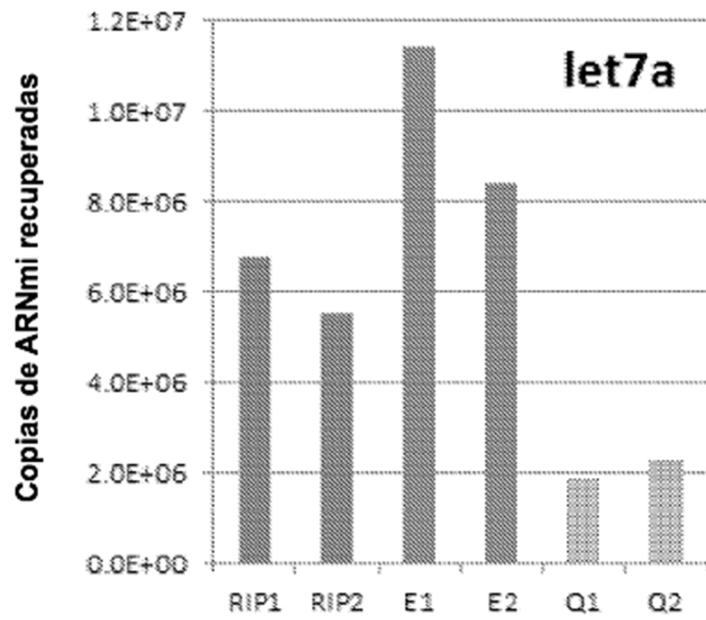


FIG. 5

A



B

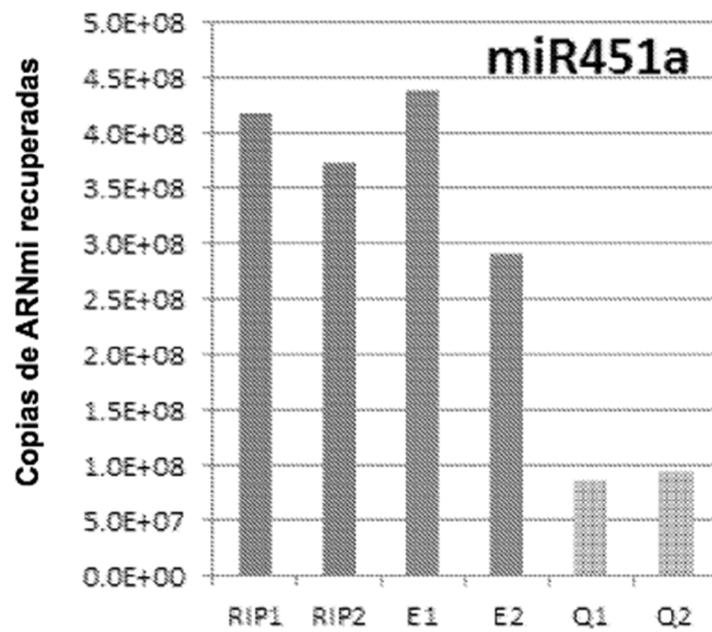
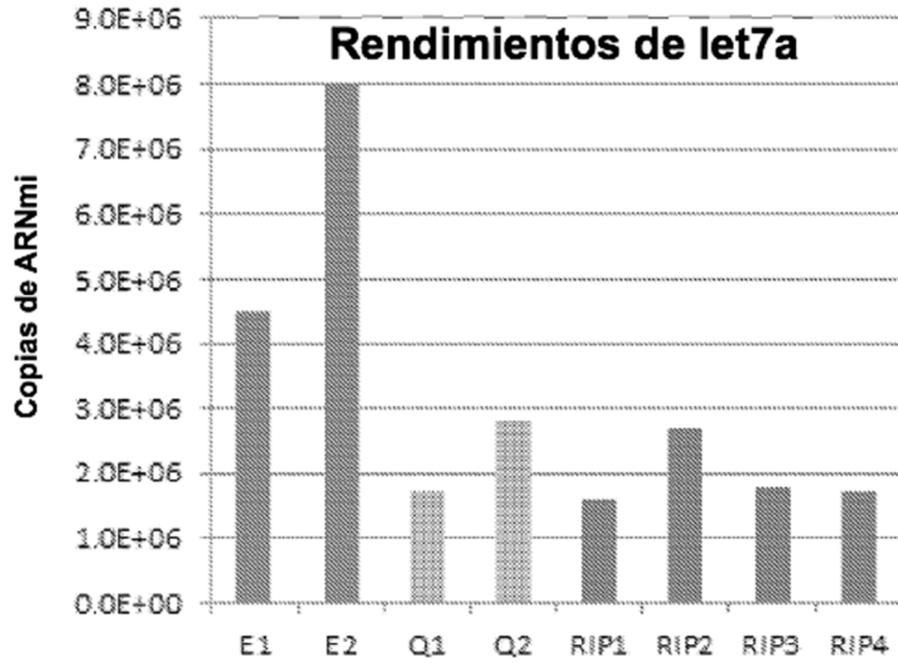


FIG. 6

A



B

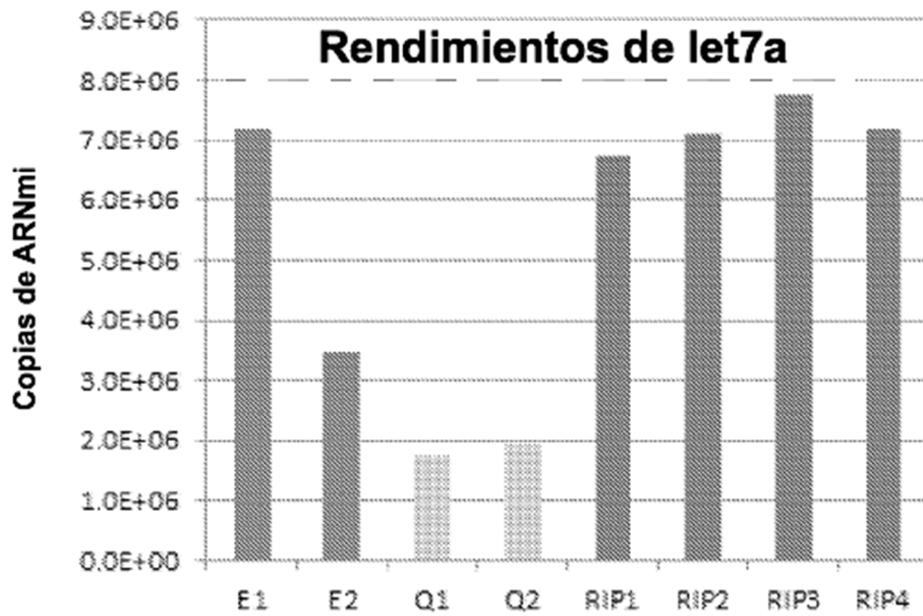


FIG. 7

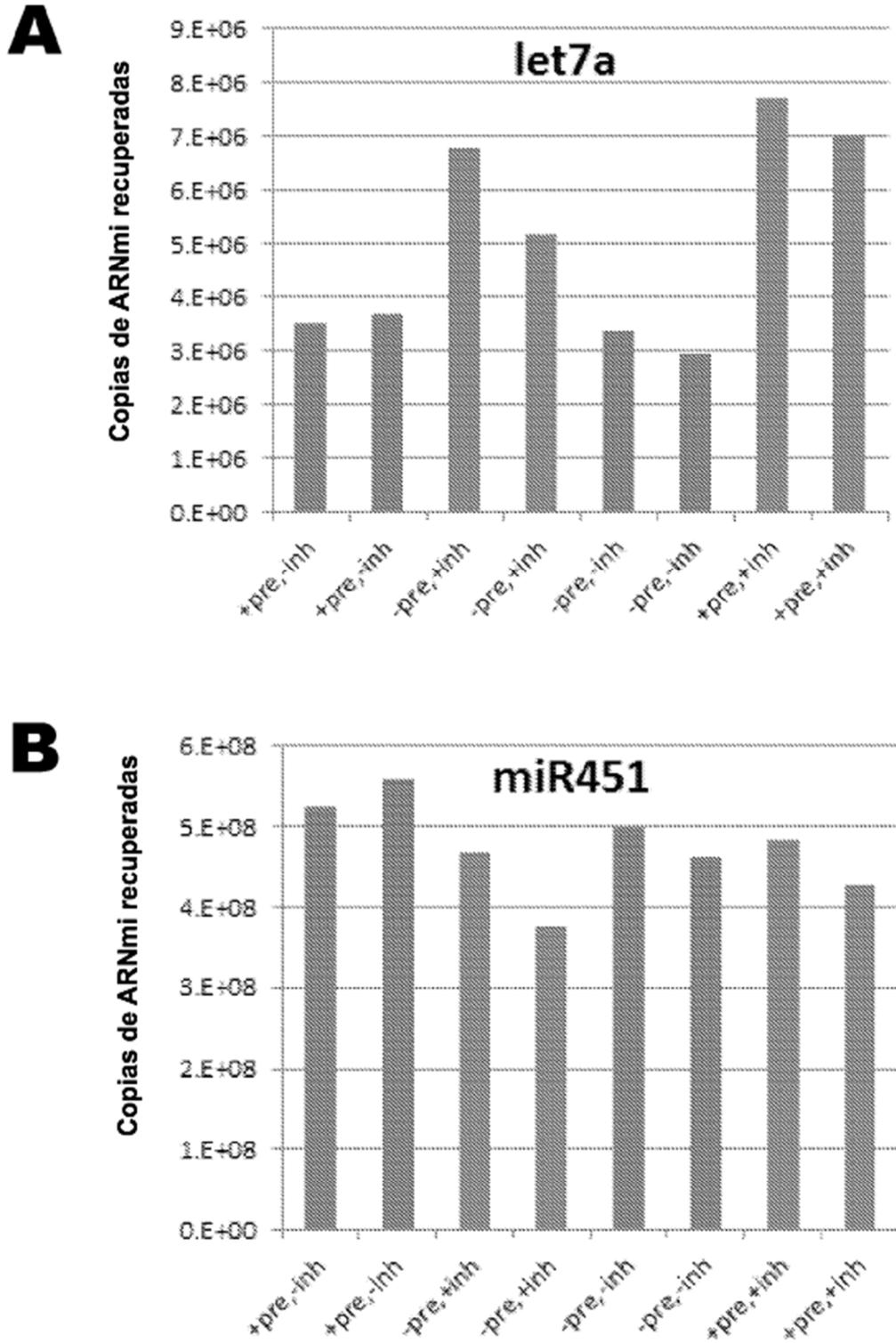


FIG. 8

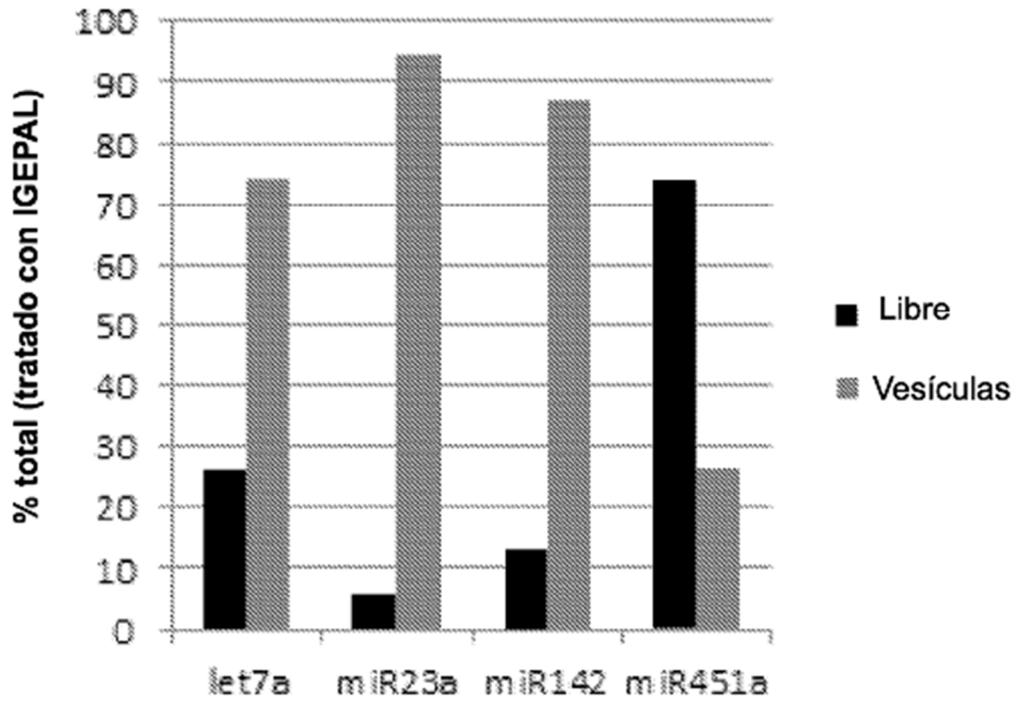


FIG. 9

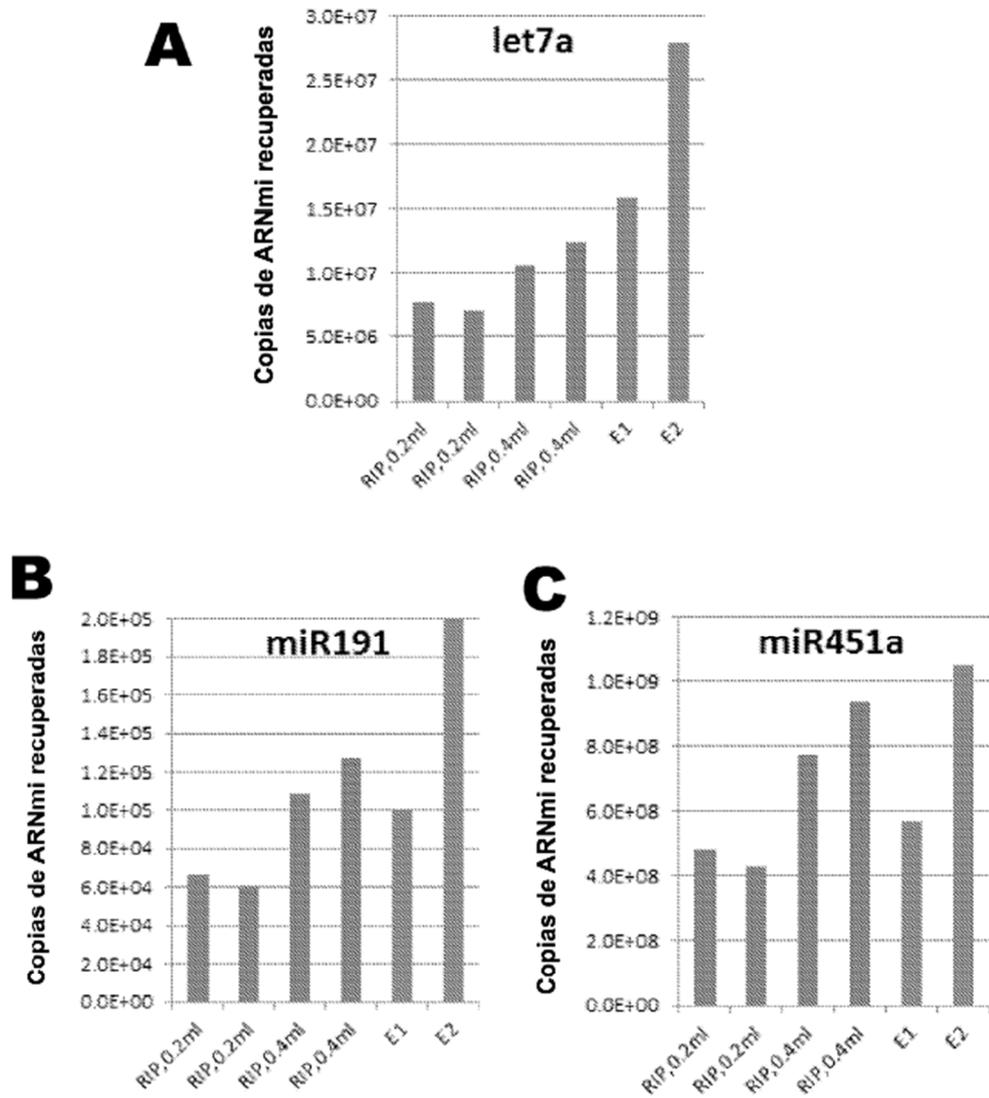


FIG. 10

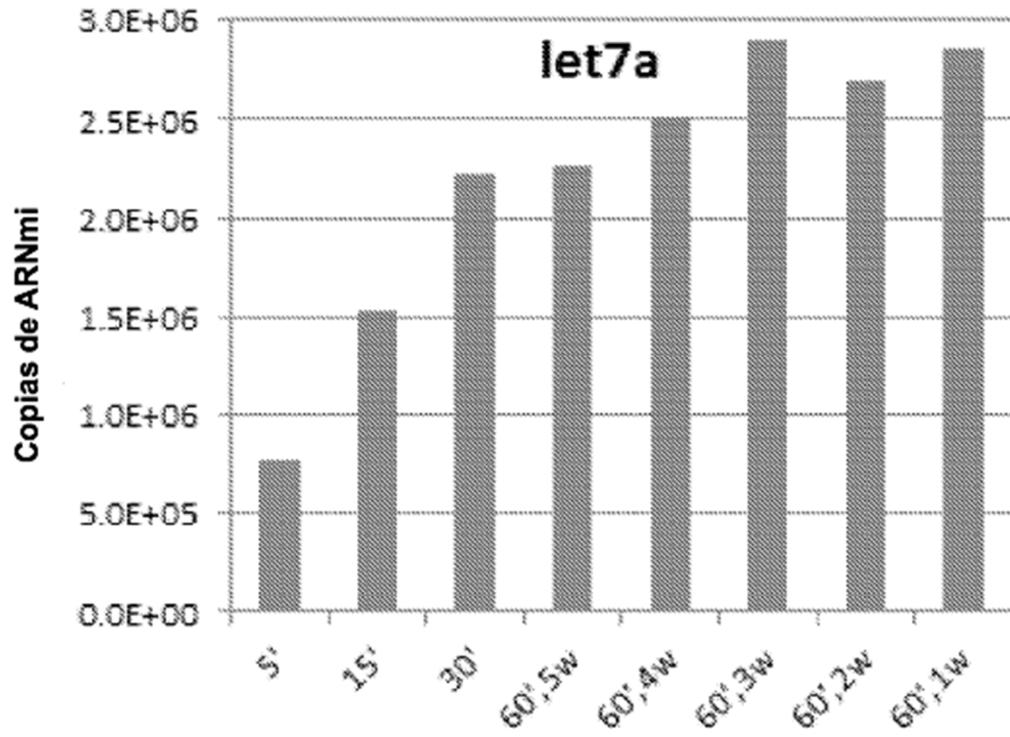


FIG. 11

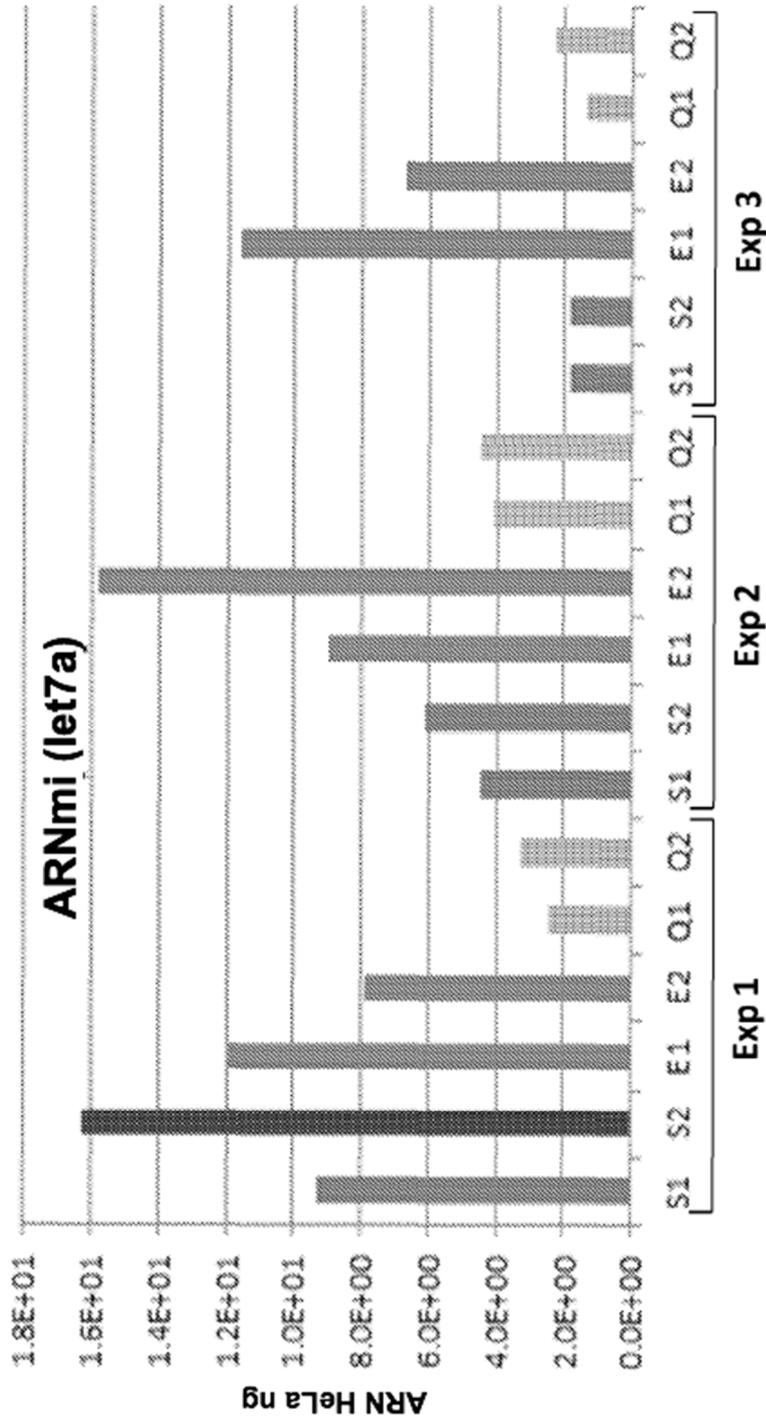


FIG. 12A

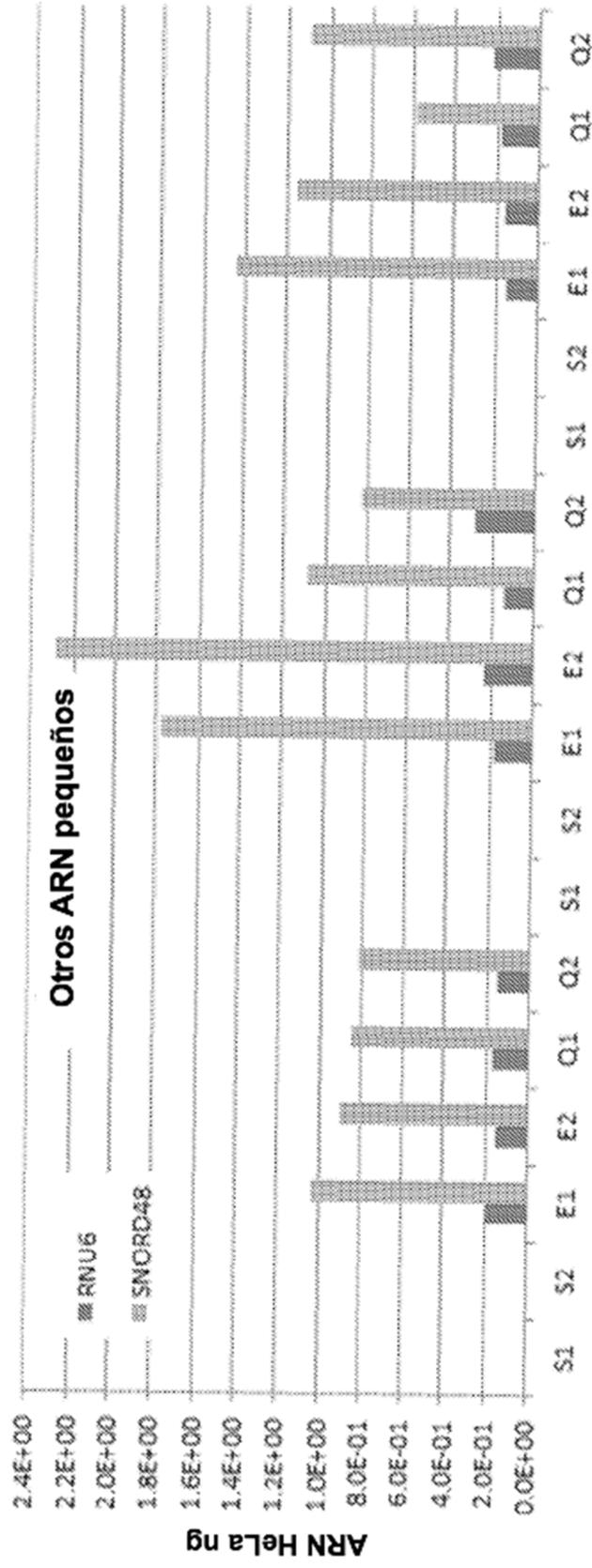


FIG. 12B

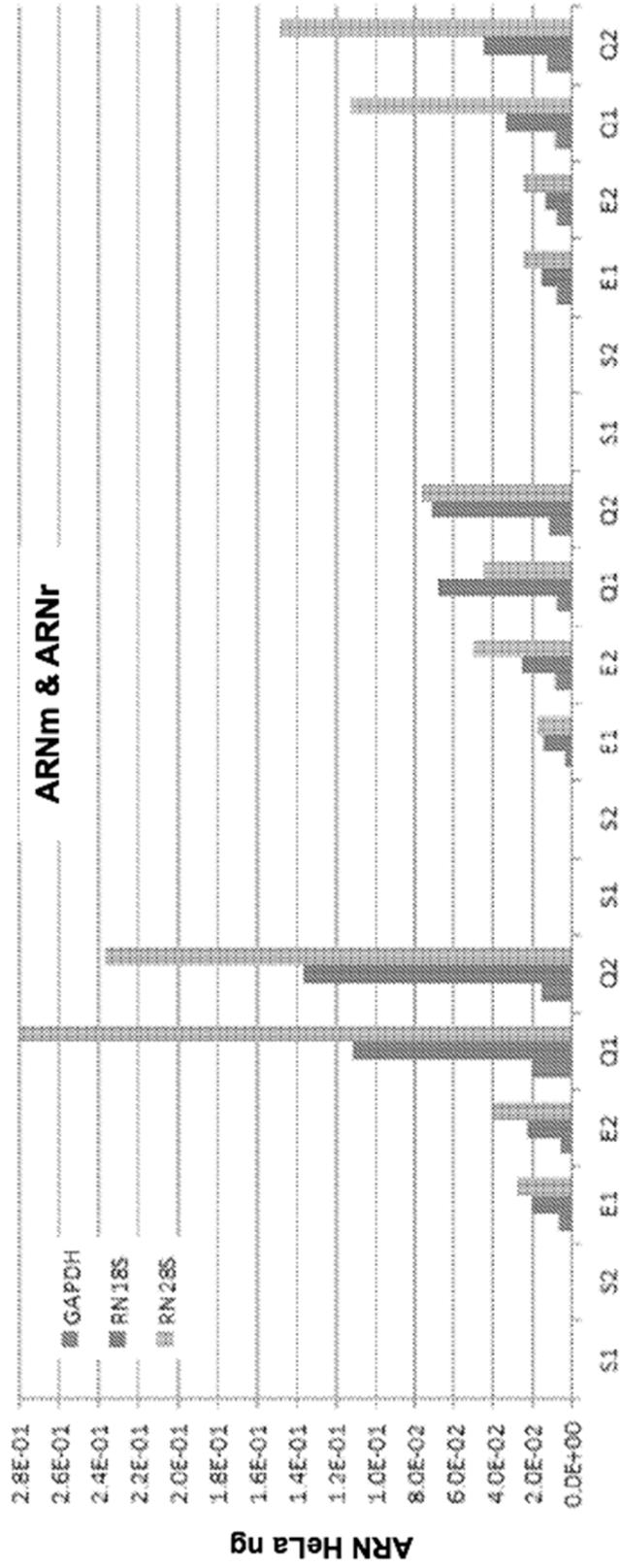


FIG. 12C

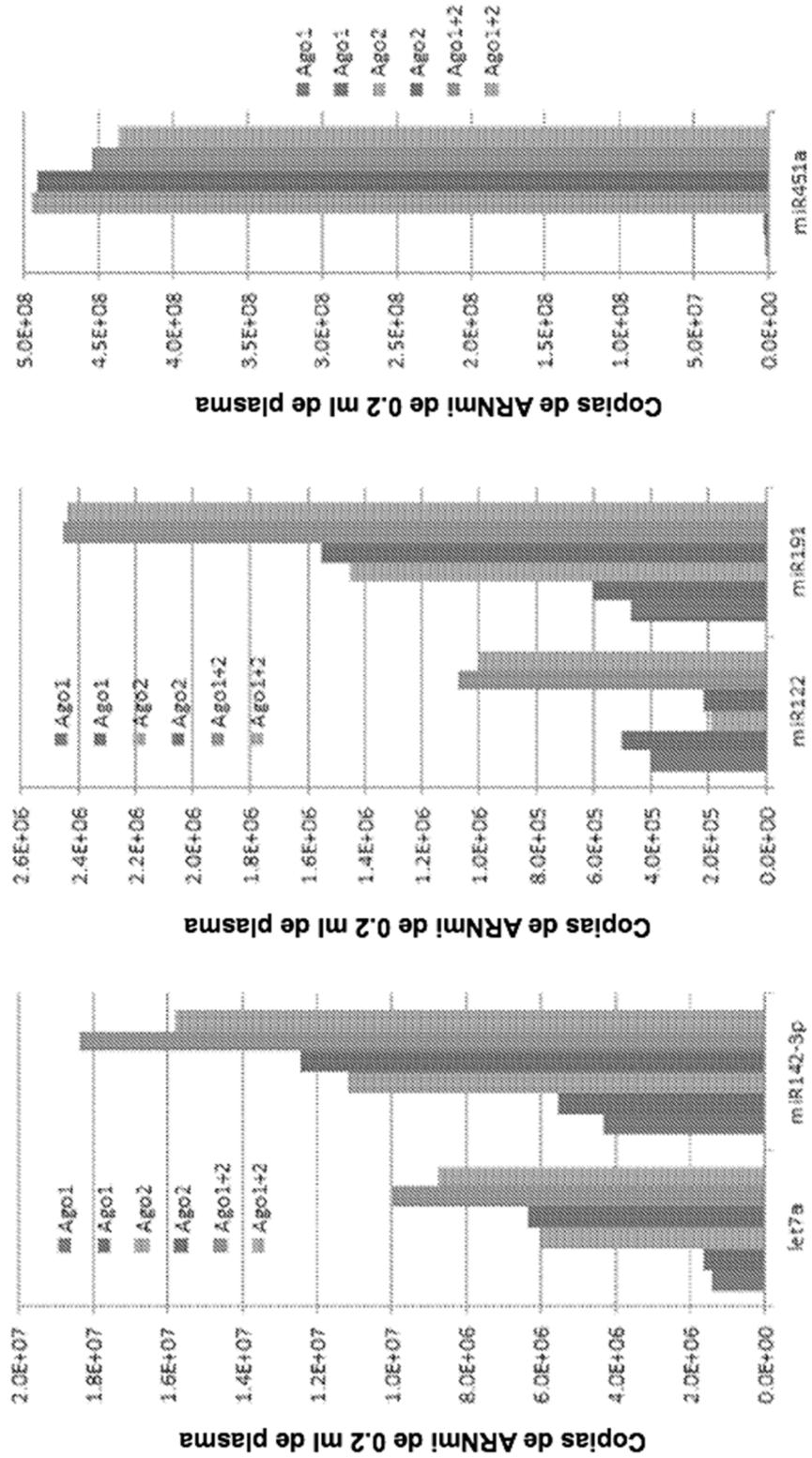


FIG. 13