

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 607**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2017 PCT/EP2017/050166**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.07.2017 WO17118673**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2017 E 17701273 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3400308**

54 Título: **Captura sucesiva de ácido nucleico mediante partículas de vidrio magnético**

30 Prioridad:

05.01.2016 US 201662275010 P

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

07.10.2020

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**HOLCOMB, CHERIE;
CASILLA, ALAN;
GRISWOLD, JENNIFER;
HRYCE, TREVOR;
KAMPANI, KARAN y
LEGASPI, SHARON**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 785 607 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

Captura sucesiva de ácido nucleico mediante partículas de vidrio magnético

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El concepto de "biopsia líquida" ha obtenido fuerza en los últimos años. En lugar de tomar una muestra de tejido sólido, las biopsias líquidas capturan células, vesículas extracelulares tales como exosomas y/o moléculas sin células tales como ADN, ARN o proteínas. Estos componentes se pueden recoger en líquidos orgánicos tales como sangre (o plasma o suero), orina, esputo, etc. La presencia de estos componentes puede estar asociada con, por ejemplo, cánceres, tumores, enfermedades autoinmunitarias, episodios cardiovasculares, virus, infección bacteriana o patógena, o relacionada con una respuesta farmacológica. Las moléculas de interés a menudo se asocian con cuerpos extracelulares tales como exosomas, o pueden estar "sin células" en el líquido.

Las biopsias líquidas se pueden llevar a cabo usando cualquiera de varios líquidos orgánicos, y pueden ser mínimamente invasivas (por ejemplo, extracción de sangre mediante flebotomía) o no invasivas (extracción de orina). Las biopsias líquidas son, por tanto, atractivas por la facilidad de recogida, la facilidad de recogida repetida para la monitorización del paciente, una mayor probabilidad de tolerancia por parte del paciente, la familiaridad de la recogida de muestras para los pacientes y los sitios de recogida menos especializados.

Una desventaja de las biopsias líquidas es que la concentración de ácido nucleico puede ser relativamente baja, de modo que se necesita un gran volumen para obtener suficiente material para el análisis posterior. Los equipos y dispositivos de captura de ácido nucleico están típicamente diseñados para pequeños volúmenes de muestra, típicamente en el intervalo de 0,2-1 ml.

Si bien las partículas magnéticas son altamente útiles para la captura de ácido nucleico, las partículas ferromagnéticas se magnetizan individualmente después de la exposición a un campo magnético. Actualmente se desaconseja la reutilización en serie de partículas magnéticas después de una etapa de separación magnética inicial, porque se cree que las partículas no se podrán unir eficazmente a ácido nucleico adicional. Por ejemplo, una vez que las partículas se magnetizan individualmente, forman un grupo que bloquea cualquier sitio de unión a ácido nucleico desocupado.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento automatizado para capturar ácidos nucleicos en una muestra líquida como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento se proporcionan procedimientos y composiciones para la captura de ácido nucleico usando las mismas partículas de vidrio magnético (MGP) para rondas múltiples y sucesivas de captura y purificación magnéticas. Estos procedimientos son útiles para procesar grandes volúmenes de muestra líquida en los recipientes relativamente pequeños usados en sistemas automatizados.

Se proporcionan procedimientos para capturar ácidos nucleicos en una muestra líquida que comprenden: (a) poner en contacto una primera parte alícuota de la muestra líquida con MGP en un recipiente en condiciones que permitan que los ácidos nucleicos de la muestra líquida se unan de manera no covalente a las MGP, en el que las MGP comprenden al menos un núcleo magnético en vidrio y son ferromagnéticas y no porosas; (b) aplicar un campo magnético a las MGP; (c) retirar la muestra líquida no unida de las MGP; (d) poner en contacto una segunda parte alícuota de la muestra líquida con las MGP; (e) resuspender las MGP en la segunda parte alícuota de la muestra líquida; (f) pipetear las MGP para mezclar las MGP por toda la segunda parte alícuota de muestra líquida; (g) aplicar un campo magnético a las MGP; (h) retirar la muestra líquida no unida de las MGP; e (i) opcionalmente, repetir las etapas (d)-(h) para al menos una parte alícuota adicional de muestra líquida (por ejemplo, una tercera, cuarta, quinta o sexta parte alícuota). En algunos modos de realización, la etapa (f) comprende pipetear las MGP a la parte superior de la segunda parte alícuota (o posterior) de muestra líquida y distribuir las MGP. En algunos modos de realización, el procedimiento se practica para tres, cuatro, cinco o seis partes alícuotas de la muestra líquida.

En algunos modos de realización, las MGP tienen un diámetro medio de 0,5-15 μm , por ejemplo, 1-10 μm , 0,8-2 μm . En algunos modos de realización, el vidrio comprende al menos un óxido metálico. En algunos modos de realización, el óxido metálico se selecciona de SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , K_2O , CaO y ZnO . En algunos modos de realización, el vidrio comprende SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , K_2O , CaO y ZnO en orden de porcentaje molar. En algunos modos de realización, el vidrio comprende SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , K_2O y CaO en orden de porcentaje molar.

En algunos modos de realización, las etapas (a)-(i) se llevan a cabo en presencia de un caótropro, por ejemplo, tiocianato de guanidinio, clorhidrato de guanidina o urea. En algunos modos de realización, el procedimiento incluye además eluir ácidos nucleicos de las MGP, por ejemplo, en un líquido o tampón que comprende una concentración de caótropro menor que la presente en las etapas (a)-(i), o que carece sustancialmente de caótropro (por ejemplo, agua o tampón). En algunos modos de realización, la etapa (c) comprende retirar la muestra líquida no unida de las

MGP, lavar las MGP y retirar el material no unido de las MGP. En algunos modos de realización, la etapa (h) comprende retirar la muestra líquida no unida de las MGP, lavar las MGP y retirar el material no unido de las MGP. En algunos modos de realización, las etapas (c) y (h) comprenden retirar la muestra líquida no unida de las MGP, lavar las MGP y retirar el material no unido de las MGP.

5 En algunos modos de realización, la muestra líquida es sangre, plasma, suero, orina, saliva, semen, líquido cefalorraquídeo o un lisado de los mismos. En algunos modos de realización, la muestra líquida es plasma o suero. En algunos modos de realización, la muestra líquida es orina. En algunos modos de realización, la muestra líquida tiene un volumen de al menos 2 ml, por ejemplo, 4, 5, 10, 50, 2-10, 4-50 o 2-100 ml. En algunos modos de realización, la muestra líquida tiene un volumen de 2-100 ml.

10 En algunos modos de realización, el recipiente contiene (por ejemplo, tiene una capacidad de trabajo máxima de) 5 ml o menos (por ejemplo, 3, 2 o 1 ml o menos). En algunos modos de realización, el recipiente contiene 0,2-1,5 o 0,5-2 ml. En algunos modos de realización, el recipiente es un pocillo en una placa o cartucho de múltiples pocillos. En algunos modos de realización, el recipiente es un tubo.

15 En algunos modos de realización, el procedimiento se lleva a cabo en un dispositivo automatizado. En algunos modos de realización, las etapas (b)-(i) se llevan a cabo en un dispositivo automatizado. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además eluir los ácidos nucleicos de las MGP, por ejemplo, en el dispositivo automatizado.

20 En algunos modos de realización, los ácidos nucleicos son ARN. En algunos modos de realización, los ácidos nucleicos son ADN. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende además la retrotranscripción (por ejemplo, si la muestra líquida incluye ARN) y/o PCR (por ejemplo, para amplificar el ADN en la muestra líquida o el producto de ADNc de retrotranscripción). En algunos modos de realización, la retrotranscripción y/o PCR se llevan a cabo en presencia de las MGP. En algunos modos de realización, la retrotranscripción y/o PCR se llevan a cabo en ausencia de las MGP, por ejemplo, después de la elución. En cualquier caso, la retrotranscripción y/o PCR se pueden automatizar en el mismo dispositivo automatizado usado para la separación o en un dispositivo automatizado separado.

25 30

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

La **figura 1** muestra un modo de realización del procedimiento divulgado para la captura sucesiva de ácidos nucleicos con tres rondas de captura de ácidos nucleicos de la misma muestra después de la ronda de captura inicial. Inicialmente, la muestra y las partículas de vidrio magnético (MGP) se mezclan (se ponen en contacto) en un recipiente, se aplica un imán al recipiente para recoger las MGP unidas al ácido nucleico, se aspira el líquido no unido y se retira el imán. La figura 1 muestra que se añade muestra adicional para las etapas de rotura de las microesferas, mezclado y aspiración/distribución. La captura de las microesferas y la retirada del líquido no unido (lisado residual) se llevan a cabo como antes.

35 40

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Introducción

45 Muestras líquidas de gran volumen, por ejemplo, de biopsias líquidas, pruebas prenatales no invasivas y líquidos que contienen potencialmente patógenos (víricos, bacterianos, fúngicos), se usan cada vez más para pruebas de diagnóstico. Estas muestras líquidas pueden ser grandes en relación con los recipientes (por ejemplo, pocillos o tubos) compatibles con la automatización y, a menudo, están diluidas, teniendo una baja concentración de ácido nucleico. Los procedimientos actuales permiten la captura optimizada y automatizada de ácido nucleico o proteína a partir de grandes volúmenes de líquido usando un conjunto de partículas magnéticas. Partes alícuotas del líquido se exponen a las partículas magnéticas en rondas sucesivas. Con cada ronda sucesiva, más de la superficie de las microesferas se ocupa con ácido nucleico o proteína de la muestra líquida. Al llevar a cabo rondas sucesivas, se puede reunir suficiente ácido nucleico para ensayos posteriores tales como PCR o secuenciación.

50 55 El procedimiento implica una ronda inicial de exposición de partículas de vidrio magnético (MGP) a la primera parte alícuota de muestra líquida, mezclado opcional, aplicación de un campo magnético a las MGP para formar un grupo (gránulo) y separación del líquido no unido del grupo de MGP. El grupo de MGP se expone a continuación a la segunda parte alícuota de muestra líquida y se altera físicamente (por ejemplo, con la punta de la pipeta o por la fuerza del pipeteo de líquido). Las MGP alteradas a continuación se dispersan (por ejemplo, se dispersan uniformemente) por toda la segunda parte alícuota, permitiendo que las MGP se mezclen y se unan a los ácidos nucleicos en la muestra. Nuevamente, se aplica un campo magnético a las MGP para formar un grupo y se retira el líquido no unido. Se pueden llevar a cabo una tercera, cuarta, quinta o sucesivas rondas adicionales hasta que se reúna suficiente ácido nucleico o proteína, o hasta que toda la muestra líquida se haya expuesto a las MGP.

60 65

II. Definiciones

El término "partícula de vidrio magnético" o "MGP" se refiere a una partícula que comprende vidrio que se une de forma no covalente a ácidos nucleicos, y al menos un núcleo magnético (por ejemplo, una dispersión de núcleos magnéticos) que responden a un campo magnético. El vidrio no es necesariamente sílice pura, aunque la sílice puede ser un componente. Las MGP son lo suficientemente pequeñas como para pipetearlas en una punta de pipeta estándar y formar una suspensión, típicamente 0,5-15 μm . Las MGP son más o menos esféricas en promedio, y pueden ser porosas o no porosas. El núcleo magnético puede ser ferromagnético o paramagnético (solo magnetizado en presencia de un campo magnético). Las MGP adecuadas se describen con más detalle, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 6255477 y 6545143. Los términos "gránulo", "grupo" y términos similares se refieren a la agrupación de MGP formada en presencia de un campo magnético.

Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a polímeros de nucleótidos (por ejemplo, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) e incluyen ácidos nucleicos naturales (adenosina, guanidina, citosina, uracilo y timidina), no naturales y modificados. El término no se limita por la longitud (por ejemplo, número de monómeros) del polímero. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario y en general contendrá enlaces 5'-3' fosfodiéster, aunque, en algunos casos, los análogos nucleotídicos pueden tener otros enlaces. Los monómeros se denominan típicamente nucleótidos. El término "nucleótido no natural" o "nucleótido modificado" se refiere a un nucleótido que contiene una base nitrogenada, glúcido o grupo fosfato modificado, o que incorpora un resto no natural en su estructura. Los ejemplos de nucleótidos no naturales incluyen didesoxinucleótidos, nucleótidos biotinilados, aminados, desaminados, alquilados, bencilados y marcados con fluoróforo.

Las palabras "proteína", "péptido" y "polipéptido" se refieren a un polímero de aminoácidos o un conjunto de dos o más polímeros de aminoácidos que interactúan o se unen. Los términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos aminoacídicos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos naturales, aquellos que contienen residuos modificados y polímero de aminoácidos no naturales.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos naturales y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, gamma-carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, por ejemplo, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Miméticos de aminoácidos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de forma similar a un aminoácido natural.

El término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región estructural de un gen de inmunoglobulina, o fragmentos del mismo, que se une a y reconoce específicamente un antígeno, o cualquier diana deseada. Típicamente, la "región variable" contiene la región de unión al antígeno del anticuerpo (o su equivalente funcional) y es la más crucial en la especificidad y afinidad de unión. Véase Paul, *Fundamental Immunology* (2003).

Los anticuerpos intactos se pueden describir de acuerdo con el isotipo, como se define por la región constante de la cadena pesada. Las cadenas ligeras de los anticuerpos se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de isotipo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Los anticuerpos pueden existir como inmunoglobulinas intactas o como cualquiera de varios fragmentos bien caracterizados que incluyen actividad de unión a antígeno específica. Dichos fragmentos se pueden producir por digestión con diversas peptidasas. La pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región de bisagra para producir $F(ab)_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El $F(ab)_2$ se puede reducir en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región de bisagra, convirtiendo de este modo el dímero $F(ab)_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región de bisagra (véase *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3.ª ed. 1993)). Aunque diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos se pueden sintetizar *de novo* ya sea químicamente o usando metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos por la modificación de anticuerpos completos, o aquellos sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv monocatenario) o aquellos identificados usando colecciones de presentación en fagos (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348: 552-554 (1990)).

El término "captura" o "unión", en el contexto de una MGP que se une a ácido nucleico, se refiere a la unión no covalente, por ejemplo, a través de interacción caótrópica o iónica. La interacción de MGP-ácido nucleico se puede alterar por elución, por ejemplo, usando un tampón de elución que interfiera con la interacción no covalente. Los términos también se pueden referir a la unión de una MGP a una proteína, por ejemplo, por medio de una interacción de anticuerpo-antígeno, receptor-ligando o estreptavidina-biotina. En dichos modos de realización, un

resto de unión a la diana (por ejemplo, anticuerpo) se une a la MGP para permitir la purificación por afinidad específica de una diana en la muestra líquida.

5 El término "cebador" se refiere a un ácido nucleico corto (típicamente un oligonucleótido de aproximadamente 8-40, 6-20, 12-50 o 15-25 nucleótidos) que actúa como un punto de inicio de la síntesis de hebras polinucleotídicas por una ácido nucleico polimerasa en condiciones adecuadas. A menos que se describa de otro modo, un "producto de extensión" es la hebra polinucleotídica que se extiende desde el extremo 3' del cebador tras la síntesis. Las reacciones de síntesis y amplificación de polinucleótidos incluyen típicamente un tampón apropiado, dNTP y/o rNTP, y uno o más cofactores opcionales, y se llevan a cabo a una temperatura adecuada. Un cebador incluye típicamente
10 al menos una región que puede hibridar con una secuencia diana y que es al menos sustancialmente complementaria a la secuencia diana. Esta región tiene típicamente una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 nucleótidos, e incluye 0, 1, 2 o 3 emparejamientos erróneos.

15 El término "producto de amplificación" se refiere al producto de una reacción de amplificación. El producto de amplificación incluye los cebadores usados para iniciar cada ronda de síntesis de polinucleótidos. Un "amplicón" es la secuencia seleccionada para amplificación, y el término también se puede usar para referirse al producto de amplificación. Los límites 5' y 3' del amplicón están definidos por los cebadores directo e inverso.

20 El término "muestra" o "muestra biológica" se refiere a cualquier composición que contiene o que se sospecha que contiene ácido nucleico. El término incluye componentes purificados o separados de células, tejidos o sangre, por ejemplo, ADN, ARN, proteínas, partes sin células o lisados celulares. En el contexto del dispositivo divulgado actualmente, la muestra es líquida, por ejemplo, sangre o un componente sanguíneo (plasma o suero), orina, semen, saliva, esputo, moco, semen, lágrima, linfa, líquido cefalorraquídeo, enjuague bucal/de garganta, lavado broncoalveolar, material lavado de un hisopo, etc. Las muestras también pueden incluir constituyentes y
25 componentes de cultivos *in vitro* de células obtenidas de un individuo, incluyendo líneas celulares. La muestra líquida también se puede procesar parcialmente a partir de una muestra obtenida directamente de un individuo, por ejemplo, lisado celular o sangre sin glóbulos rojos.

30 En el contexto de la presente divulgación, el término "líquido no unido" o "muestra no unida" se refiere a líquido y otros componentes (por ejemplo, material proteínico o restos celulares) que no están unidos a la MGP, por ejemplo, líquido agotado de ácidos nucleicos u otra diana. El líquido no unido todavía puede incluir una cantidad residual de ácidos nucleicos o diana.

35 Las vesículas extracelulares, que incluyen exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos, son vesículas derivadas de células (cuerpo encerrado en membrana) presentes en líquidos biológicos, por ejemplo, sangre y orina. Las células pueden liberar vesículas extracelulares, por ejemplo, directamente desde la membrana plasmática, o se pueden formar cuando los cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática. Las vesículas extracelulares típicamente incluyen componentes tales como ácidos nucleicos y proteínas de su célula de origen. Los exosomas tienen típicamente un diámetro de 40-120 nm, las microvesículas tienen típicamente un diámetro de
40 50-1000 nm y los cuerpos apoptóticos tienen típicamente un diámetro de 500-2000 nm.

Una muestra o valor de "control" se refiere a una muestra que sirve como referencia, normalmente una referencia conocida, para su comparación con una muestra de prueba o condiciones de prueba. Por ejemplo, una muestra de prueba se puede tomar de una condición de prueba, por ejemplo, de una muestra procesada usando los procedimientos descritos actualmente, y se puede comparar con muestras de condiciones conocidas, por ejemplo, de una muestra no procesada usando los procedimientos descritos actualmente, o de una muestra que tiene una cantidad conocida de ácido nucleico. Un control también puede representar un valor promedio o un intervalo recopilado de una serie de pruebas o resultados. También se puede preparar un control para las condiciones de reacción. Por ejemplo, un control positivo para la presencia de ácido nucleico podría incluir cebadores o sondas que
45 detectarán una secuencia que se sabe que está presente en la muestra, mientras que un control negativo no tendría ácidos nucleicos. Un experto en la técnica reconocerá que se pueden diseñar controles para la evaluación de muchísimos parámetros. Se pueden diseñar controles para aplicaciones *in vitro*. Un experto en la técnica entenderá qué controles son valiosos en una situación dada y podrá analizar datos basados en comparaciones con valores de control. Los controles también son valiosos para determinar la significación de los datos. Por ejemplo, si los valores para un parámetro dado son muy variables en los controles, la variación en las muestras de prueba no se
50 considerará significativa.

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica. Véase, por ejemplo, Lackie, DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier (4.^a ed. 2007); Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, N.Y. 1989); Ausubel *et al.*: Current Protocols in Molecular Biology 1987, J. Wiley and Sons, NY; Pfaffl, Methods: The ongoing evolution of qPCR, vol. 50 (2010); van Pelt-Verkuil *et al.* Principles and Technical Aspects of PCR Amplification, Springer (2010).

65 III. Procedimientos y componentes para la captura sucesiva de ácido nucleico

A. Muestra biológica

La muestra biológica usada en los procedimientos divulgados actualmente es un líquido que incluye ácidos nucleicos o proteínas. Los tipos de muestra incluyen sangre (incluyendo plasma o suero), orina, saliva, esperma, enjuagues bucales o nasales, líquido cerebral, esputo, suspensiones celulares (tal como sangre), lisado de células o tejidos, etc. La muestra puede ser de un solo individuo (por ejemplo, un paciente) o una población de individuos.

Los presentes procedimientos también se pueden aplicar a líquidos, por ejemplo, preparados a partir de muestras de alimentos o plantas o de toallitas de superficies, por ejemplo, en un entorno hospitalario.

En una muestra que incluye células, las células se pueden separar (por ejemplo, usando filtración o centrifugación basada en el tamaño), dejando de este modo los ácidos nucleicos sin células (ANsc), incluyendo ácidos nucleicos en exosomas, microvesículas, partículas víricas o aquellos que circulan libremente. De forma alternativa, las células se pueden lisar para obtener ácidos nucleicos celulares, ya sea en presencia de MGP o antes de la adición del lisado celular a las MGP.

B. Partículas de vidrio magnético

Las partículas de vidrio magnético (MGP) son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 6255477 y 6545143. Las partículas usadas para los procedimientos descritos actualmente son ferromagnéticas. Las partículas son en promedio más o menos esféricas con un diámetro de 0,5-15 µm (por ejemplo, 1-10, 0,8-2 o 1-1,5 µm). En algunos modos de realización, las partículas son no porosas.

Las MGP pueden tener un solo núcleo magnético recubierto con vidrio, o comprender vidrio con varios objetos magnéticos infundidos. La sustancia magnética puede ser hierro u óxido de hierro como magnetita (Fe_3O_4) o Fe_2O_3 (por ejemplo, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Se puede usar ferrita de bario, níquel, cobalto, aleaciones de Al-Ni-Fe-Co u otras sustancias ferromagnéticas. Los óxidos metálicos también se pueden incluir en el núcleo magnético, por ejemplo, óxido de aluminio, óxido de hierro, óxido de cromo, óxido de cobre, óxido de manganeso, óxido de plomo, óxido de estaño, óxido de titanio, óxido de cinc u óxido de circonio.

El componente de vidrio está típicamente basado en sílice, por ejemplo, óxido de silicio y polvo de vidrio, alquil-sílice, silicato de aluminio o sílice activada con NH_2 . En algunos modos de realización, el vidrio comprende al menos un óxido metálico (por ejemplo, SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , K_2O , CaO y/o ZnO). En algunos modos de realización, el vidrio comprende SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , K_2O y CaO en orden de porcentaje molar. En algunos modos de realización, el vidrio comprende SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , K_2O , CaO y ZnO en orden de porcentaje molar. En algunos modos de realización, además de SiO_2 , el vidrio puede incluir B_2O_3 (0-30 %), Al_2O_3 (0-20 %), CaO (0-20 %), BaO (0-10 %), K_2O (0-20 %), Na_2O (0-20 %), MgO (0-18 %), Pb_2O_3 (0-15 %), ZnO (0-6 %). En algunos modos de realización, el vidrio comprende aproximadamente un 70-75 % de SiO_2 , aproximadamente un 14-16 % de B_2O_3 , aproximadamente un 4-6 % de Al_2O_3 , aproximadamente un 4-5 % de K_2O , aproximadamente un 2-3 % de CaO y aproximadamente un 0-5 % de ZnO . Las MGP apropiadas están disponibles comercialmente en kits MagNAPure de Roche.

El ácido nucleico se une a las MGP en solución caótrica. Las soluciones caótricas pueden incluir tiocianato de guanidinio (GuSCN), clorhidrato de guanidina, urea, yoduro de sodio, perclorato de sodio, ion de tiocianato, ion de yodo, ion de perclorato, ion de nitrato, ion de bromo, ion de acetato, ion de cloro, ion de flúor o ion de azufre, o combinaciones de los mismos. En algunos modos de realización, el caótrico está en solución a aproximadamente 1-10 M, por ejemplo, 2-8 o 4-6 M, para permitir la unión del ácido nucleico.

C. Automatización

Los procedimientos actuales se pueden practicar en formato manual, semiautomatizado o automatizado. Por supuesto, la automatización es ventajosa para reducir el tiempo dedicado a manipular múltiples muestras y procedimientos de múltiples etapas, contaminación entre muestras y dentro de una muestra en diferentes etapas de procesamiento, lesiones repetitivas y exposición a sustancias potencialmente peligrosas tales como muestras de sangre.

Se puede usar cualquier instrumento que pueda llevar a cabo una separación magnética usando MGP. Dependiendo del dispositivo, las muestras se pueden procesar en cartuchos o placas de múltiples recipientes, o en recipientes individuales. Los recipientes (por ejemplo, tubos o pocillos de procesamiento) para su uso en instrumentos automatizados típicamente contienen un volumen de líquido de 50 µl a 4 ml, más típicamente 1-2 ml.

Ejemplos de instrumentos que se puede usar para automatizar los procedimientos divulgados actualmente incluyen, pero no se limitan a los instrumentos MagNA Pure (Roche), instrumentos Dynamag® (Thermo Fisher), sistemas QIASymphony® (Qiagen) y los instrumentos Maxwell® (Promega).

En el presente documento, el instrumento puede llevar a cabo todo el procedimiento, por ejemplo, pipetear la muestra de un gran volumen en partes alícuotas sucesivas en el recipiente de procesamiento, llevar a cabo las

rondas sucesivas de captura de ácido nucleico en las MGP, recogida magnética de MGP, retirada del líquido no unido, resuspensión de las MGP en la siguiente parte alícuota de muestra y elución de los ácidos nucleicos de las MGP. En algunas disposiciones, el instrumento lleva a cabo las sucesivas rondas de captura de ácido nucleico en las MGP, sedimentación de MGP, retirada del líquido no unido y resuspensión de las MGP en la siguiente parte alícuota de muestra. En algunas disposiciones, se accede a la misma muestra líquida grande múltiples veces para rondas sucesivas. En algunas disposiciones, el usuario o el instrumento "divide previamente en partes alícuotas" la muestra líquida más grande en múltiples partes alícuotas a las que se accede sucesivamente para su captura, etc.

D. Procesamiento adicional y detección

La purificación adicional de los ácidos nucleicos de la muestra aclarada se puede lograr de acuerdo con procedimientos estándar, por ejemplo, como se describe en Sambrook, *supra*. Los ácidos nucleicos presentes en las biopsias líquidas son a menudo cortos, por ejemplo, de 50-5000 nucleótidos de longitud. El procedimiento de purificación seleccionado debe tener esto en cuenta. Los procedimientos tradicionales incluyen extracción orgánica, precipitación en etanol y resuspensión; y separación sobre microesferas de vidrio o magnéticas seguida de elución. Los kits para ADN y ARN también están disponibles comercialmente, por ejemplo, kits High Pure de Roche y kits Wizard de Promega.

Los ácidos nucleicos se eluyen típicamente de las microesferas antes del análisis, aunque las MGP son compatibles con algunos ensayos (por ejemplo, la detección de una sonda marcada hibridada con ácido nucleico en la MGP, PCR o cuando se produce la elución como parte del ensayo, tal como transferencia de Southern). Las condiciones de elución interfieren con la interacción no covalente (por ejemplo, caótrona o iónica) del ácido nucleico con la MGP, por ejemplo, agua, tampón con una concentración de caótrono menor que la usada para unir ácidos nucleicos a las MGP, y/o temperatura elevada, como lo apreciará un experto en la técnica.

La muestra de ácido nucleico purificada se puede usar para la detección, por ejemplo, usando secuenciación de última generación, micromatrices (ARN o ADN), transferencia de Southern o Northern, o amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, usando cualquier procedimiento dependiente de cebador. Los procedimientos basados en ADN se pueden usar para amplificación y detección, por ejemplo, PCR. En algunos casos, se usa PCR ultrarrápida o cuantitativa (RT-PCR o qPCR). La qPCR permite la detección y medición fiables de productos generados durante cada ciclo del procedimiento de PCR. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica, y los kits y reactivos están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Roche Molecular Systems, Life Technologies, Bio-Rad, etc. Véase, por ejemplo, Pfaffl (2010) *Methods: The ongoing evolution of qPCR* vol. 50. En algunos casos, la parte de sonda de la sonda cebadora ramificada tiene doble marcado (por ejemplo, una sonda TaqMan, CPT, LNA o MGB) con un inhibidor y un fluoróforo (véase, por ejemplo, Gasparic *et al.* (2010) *Anal. Bioanal. Chem.* 396:2023).

En algunos casos, se lleva a cabo una etapa de retrotranscripción preliminar (también denominada RT-PCR, que no se debe confundir con PCR ultrarrápida). Véase, por ejemplo, Hierro *et al.* (2006), 72:7148. El término "qRT-PCR", como se usa en el presente documento, se refiere a retrotranscripción seguida de PCR cuantitativa. Se pueden llevar a cabo ambas reacciones en un único tubo sin interrupción, por ejemplo, para añadir reactivos. Por ejemplo, se puede usar un cebador de poliT para retrotranscribir todos los ARNm en una muestra con una cola de poliA, o se puede diseñar un cebador que sea específico para un transcrito diana particular que se retrotranscribirá en ADNc. El ADNc puede formar la hebra molde inicial que se va a usar con la sonda de cebador ramificada descrita actualmente, o el(los) otro(s) miembro(s) de su par de cebadores o conjunto de cebadores. También se pueden usar procedimientos de amplificación basados en ARN adicionales, por ejemplo, amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA) o amplificación mediada por transcripción (TMA).

Los dispositivos de detección son conocidos en la técnica y se pueden seleccionar según sea apropiado para los marcadores seleccionados. Dispositivos de detección apropiados para la PCR cuantitativa incluyen los sistemas Cobas® y Light Cycler® (Roche), sistemas de PCR ultrarrápida PRISM 7000 y 7300 (Applied Biosystems), etc.

Las proteínas se pueden eluir al interferir con su interacción con el resto de unión a la diana unido a la microesfera. Se puede usar temperatura elevada, o variando el pH o la concentración de sal. Para las interacciones de estreptavidina-biotina, se puede usar una solución de formamida.

Las proteínas se detectan típicamente usando inmunoensayos o ensayos de actividad. Los inmunoensayos incluyen diversos tipos de ELISA, inmunoelectrotransferencias, FACS u otra detección usando un anticuerpo marcado (véase, por ejemplo, Rich, *The Immunoassay Handbook* (Elsevier 4.ª ed. 2013)). Un experto comprenderá cómo detectar el ensayo de actividad apropiado dependiendo de la proteína seleccionada, por ejemplo, actividad de fosforilación de una diana de cinasa.

IV. Ejemplos

Se proporciona un procedimiento para purificar ácidos nucleicos a partir de grandes volúmenes de líquido (por ejemplo, 4 ml o más) en una plataforma automatizada típica que puede acomodar un volumen de muestra en el

intervalo de 0,5-2 ml. El enfoque es usar rondas sucesivas de captura de los ácidos nucleicos en las MGP como se muestra en la figura 1.

Ejemplo 1

5 Cantidades conocidas de ADN de línea celular purificada y plásmido linealizado se añadieron a PBS y el porcentaje de recuperación (rendimiento) se midió por qPCR. Se lisaron cuatro (4) ml de muestra fuera de placa con 4,5 ml de tampón de lisis MagNAPure 96 (Roche) y proteinasa K en un tubo de tamaño apropiado. El lisado se agitó en vórtex para mezclarlo y a continuación se añadió a la plataforma de instrumentos del Instrumento 1 o del Instrumento 2. Se
10 añadió una parte alícuota de la muestra lisada al pocillo de procesamiento para la captura automatizada de ácido nucleico en MGP. Se añadieron MGP en la etapa inicial y se mezclaron con la muestra mediante pipeteo. Las MGP se capturaron usando un imán aplicado al lateral del pocillo de procesamiento, y se aspiró el lisado líquido, dejando solo las MGP unidas a ácido nucleico en el pocillo de procesamiento. La siguiente parte alícuota de la misma muestra se añadió al mismo pocillo de procesamiento y se mezcló con las MGP. La mezcla implicó romper el grupo
15 de MGP magnetizadas pipeteando en el fondo del pocillo. En este punto, las microesferas se suspendieron en la mitad inferior del volumen de líquido. La suspensión de microesferas se pipeteó desde el fondo del pocillo de procesamiento y se distribuyó en la parte superior, permitiendo que las MGP gotearan a través del líquido. Este procedimiento se repitió para asegurar que las MGP estuvieran completamente expuestas a los ácidos nucleicos en la segunda parte alícuota. Las etapas de captura y aspiración de MGP se repitieron como en la primera ronda, y la siguiente parte alícuota de la muestra se añadió al mismo pocillo de procesamiento, se mezcló con las MGP, etc. El volumen de muestra completo de 8,5 ml se procesó en el mismo pocillo de procesamiento usando las mismas MGP.

El uso de la unión/captura de microesferas usando el Protocolo 1 de referencia (sin rotura de microesferas, pero que incluye algo de aspiración y distribución) mostró que el ADN genómico y el plásmido linealizado se capturaron con una eficacia razonable en el Instrumento 1 (78,6 % y 79,8 %, respectivamente), comparable a unión/captura de microesferas en el Instrumento 2 (81,7 % y 85,2 %, respectivamente).
25

Los resultados se compararon usando el procedimiento modificado descrito anteriormente (Protocolo 2) como se muestra en la figura 1. El Protocolo 2, que incluye la resuspensión mecánica y la mezcla de las MGP magnetizadas, dio como resultado un incremento de un 10,7 % en la recuperación de beta-globina y un incremento de un 22,2 % en la recuperación de pEF056. Todas las rondas sucesivas usaron este Protocolo 2 modificado. Los resultados se muestran en la tabla 1.
30

Tabla 1: La unión de ácidos nucleicos y rondas sucesivas de captura de microesferas se pueden ejecutar con excelentes rendimientos resultantes de ADN
35

Diana de PCR	Protocolo de purificación								
	Instrumento 1 Protocolo 1			Instrumento 2 Protocolo 1			Instrumento 2 Protocolo 2		
	Prom. Cp**	DE	% de rendimiento	Prom. Cp**	DE	% de rendimiento	Prom. Cp**	DE	% de rendimiento
pEF056	28,6	0,0	85,2 %	28,7	0,0	79,8 %	28,4	0,1	102,0 %
beta-globina	30,5	0,1	81,7 %	30,6	0,1	78,6 %	30,4	0,0	89,3 %

** Promedio de dos purificaciones

Ejemplo 2

40 El procedimiento de rotura de microesferas se repitió como se muestra en la figura 1. En este ejemplo, las cantidades conocidas de fragmentos de ADN diana se añadieron a la sangre, y el porcentaje de recuperación (rendimiento) se midió por qPCR. Se usaron ocho (8) ml de plasma, que requieren que se apliquen 4 partes alícuotas a las microesferas, que se reutilizaron en las 4 rondas de unión de ácido nucleico. Además, la temperatura de elución usada para retirar los ácidos nucleicos de las microesferas después de las rondas sucesivas de unión se redujo considerablemente. Esto, potencialmente combinado con las pequeñas longitudes de fragmento usadas como
45 diana, dio como resultado rendimientos menores en comparación con los mostrados en la tabla 1.

Si las microesferas no fueran eficaces para unir los ácidos nucleicos diana en rondas sucesivas, el rendimiento máximo que se podría esperar sería de un 25 %, es decir, solo la primera de las 4 rondas produciría ácido nucleico diana. Sin embargo, como se muestra en la tabla 2, el ácido nucleico diana significativo se unió en rondas sucesivas y se recuperó para qPCR.
50

Tabla 2

Diana de PCR	Porcentaje de rendimiento	CV (%)
66 pb	49,5 %	3,4
86 pb	66,1 %	1,1

ES 2 785 607 T3

150 pb	48,3	1,6
--------	------	-----

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento automatizado para capturar ácidos nucleicos en una muestra líquida, que comprende:
- 5 (a) poner en contacto una primera parte alícuota de la muestra líquida con partículas de vidrio magnético (MGP) en un recipiente en condiciones que permitan que los ácidos nucleicos de la muestra líquida se unan de forma no covalente a las MGP, en el que las MGP son no porosas y comprenden al menos un núcleo magnético ferromagnético en vidrio;
- 10 (b) aplicar un campo magnético a las MGP para formar un grupo de MGP;
- (c) retirar la muestra líquida no unida del grupo de MGP;
- 15 (d) poner en contacto una segunda parte alícuota de la muestra líquida con el grupo de MGP;
- (e) resuspender las MGP en la mitad inferior de la segunda parte alícuota de la muestra líquida pipeteando en el fondo del recipiente para romper el grupo de MGP;
- 20 (f) pipetear las MGP dentro del recipiente desde la mitad inferior de la segunda parte alícuota hasta la parte superior de la segunda parte alícuota y distribuir de este modo las MGP dentro de la segunda parte alícuota;
- (g) aplicar un campo magnético a las MGP para formar un grupo de MGP;
- 25 (h) retirar la muestra líquida no unida del grupo de MGP; y
- (i) opcionalmente, repetir las etapas (d) a (h) para al menos una parte alícuota adicional de muestra líquida.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las MGP tienen un diámetro medio entre 0,5-15 μm .
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el vidrio comprende al menos un óxido metálico.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el al menos un óxido metálico se selecciona de SiO_2 , B_2O_3 , Al_2O_3 , K_2O , CaO y ZnO .
- 35 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra líquida es sangre, plasma, suero, orina o un lisado de los mismos.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra líquida tiene un volumen de al menos 2 ml.
- 40 7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la muestra líquida tiene un volumen de 2 ml a 100 ml.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el recipiente contiene un volumen de 0,5 ml a 2 ml.
- 45 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además eluir y separar los ácidos nucleicos de las MGP.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la etapa (e) comprende pipetear las MGP en la muestra líquida.
- 50 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que los ácidos nucleicos son ARN.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que los ácidos nucleicos son ADN.
- 55 13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el recipiente es un pocillo en una placa de múltiples pocillos o un tubo.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la etapa (c) comprende retirar la muestra líquida no unida de las MGP, lavar las MGP y retirar el material no unido de las MGP.
- 60 15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la etapa (h) comprende retirar la muestra líquida no unida de las MGP, lavar las MGP y retirar el material no unido de las MGP.

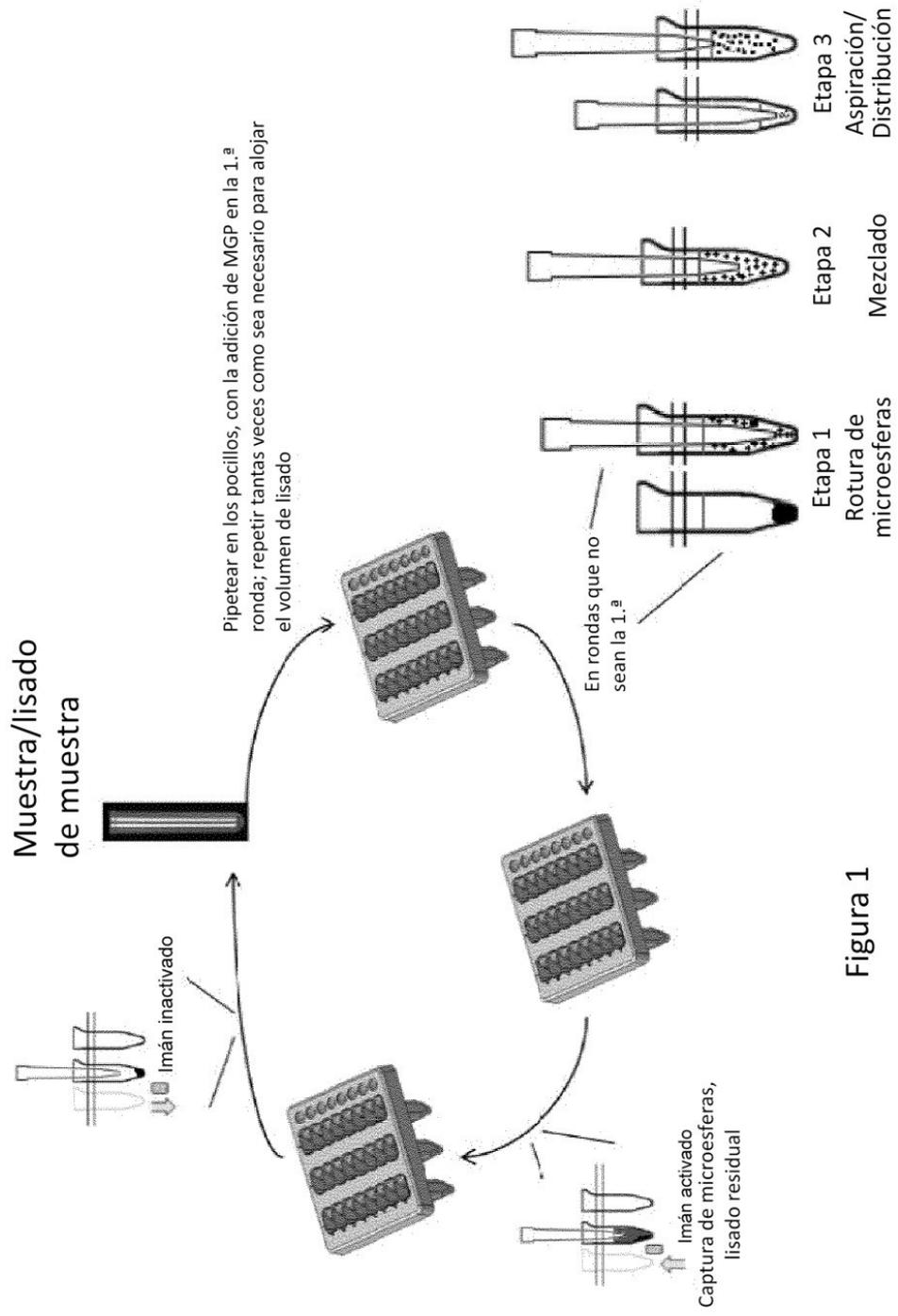


Figura 1