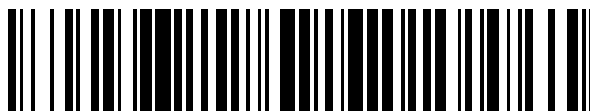


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 249**

51 Int. Cl.:

**C07H 1/08** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2004 E 18166823 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020 EP 3366771**

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

30 Prioridad:

**25.07.2003 US 490325 P**

**19.09.2003 US 667126**

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

**13.11.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CONRAD, RICHARD**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

**ES 2 793 249 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para aislar moléculas de ARN pequeño

5 Antecedentes de la invención

La presente solicitud reivindica prioridad a la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Núm. de Serie 60/490 325, presentada el 25 de julio de 2003, y a la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. de Serie 10/667 126 presentada el 19 de septiembre de 2003.

10

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a los campos de la biología molecular y la biotecnología. Más particularmente, se refiere a métodos y composiciones para aislar moléculas de ARN pequeño que son típicamente de 100 nucleótidos o menos, como siARN y miARN, en lugar de moléculas de ARN o ADN más grandes. Las moléculas de ARN pequeño aisladas pueden usarse en estudios o ensayos posteriores.

15

Descripción de la técnica relacionada

20 El estudio de moléculas de ARN-ARN pequeños del orden de 100 nucleótidos o menos, a partir de varios tejidos en muchos organismos, así como también células cultivadas, es un área de gran interés ahora, y promete seguirlo siendo para el futuro. Estos pequeños ARN incluyen moléculas de microARN (miARN) y moléculas de ARN pequeño de interferencia (siARN), que pueden tener un poderoso efecto sobre la expresión de un gen en virtud de la hibridación con su ARNm objetivo. Adicionalmente, estos procedimientos serían aplicables al aislamiento de pequeños ARN nucleolares y nucleares (snARN y snoARN), implicados en el procesamiento de ARNm y ARNr. Los procedimientos también podrían usarse para aislar ARNt junto con SS y 5,8 S ARNr, todos los cuales están implicados en la traducción de proteínas.

25

La clave de estos estudios es la necesidad de aislar moléculas de ARN en el intervalo de tamaño de 15 a 100 nucleótidos con alta eficiencia. Los métodos que proporcionan una metodología sencilla para hacer esto son, por lo tanto, bastante valiosos.

30

La preparación de ARN a partir de fuentes naturales (muestras de tejido, organismos completos, cultivos celulares, fluidos corporales) requiere la eliminación de todas las demás biomoléculas. Una vez que se elimina el agua, el componente principal de las células suele ser la proteína, que frecuentemente proporciona las tres cuartas partes de la masa. De las otras biomoléculas principales, los lípidos, los carbohidratos, las combinaciones de estos entre sí y las proteínas y el ADN son los otros componentes principales. Un objetivo de la extracción de ARN es eliminar proteínas y ADN, ya que estos proporcionan la mayor interferencia en el uso del ARN. Los restos de lípidos y carbohidratos generalmente pueden disolverse con la ayuda de un detergente. La proteína puede eliminarse del ARN (y ADN) con la ayuda de detergentes y desnaturizantes, pero aun así debe eliminarse de la solución común.

35

Se han usado históricamente dos métodos principales para lograr este fin. El primero es el uso de disolventes orgánicos que son inmiscibles con agua para disolver (literalmente, extraer químicamente) o precipitar proteínas, después de lo cual la fase acuosa libre de proteínas puede separarse por centrifugación antes de la eliminación. Por lo general, se usan mezclas de fenol o fenol-cloroformo para este propósito. El segundo método inmoviliza selectivamente el ARN en una superficie sólida y enjuaga la proteína, después de lo cual se usan las condiciones para liberar el ARN en una solución acuosa. Esto es literalmente una extracción en fase sólida. Ambos procedimientos pueden reducir la cantidad de contaminación de ADN o remanente, con una eficiencia que varía con las condiciones precisas empleadas.

40

45

Las extracciones de fenol y fenol-cloroformo proporcionan una solución de ácido nucleico extremadamente libre de proteínas y lípidos. En este procedimiento también se pierde mucho, si no todo (dependiendo de la muestra) el carbohidrato. Se sabe que el fenol-cloroformo ácido extrae parte del ADN de la solución acuosa (Chomczynski y Sacchi, 1987). Sin embargo, la solución es alta en agentes desnaturizantes como el clorhidrato de guanidinio, el tiocianato de guanidinio o la urea, todos los cuales son incompatibles con el análisis enzimático posterior, y los dos primeros con el análisis electroforético también. El ARN generalmente se separa de estas mezclas mediante precipitación selectiva, generalmente con etanol o isopropanol. Este procedimiento no es tan efectivo para moléculas pequeñas de ácido nucleico, por lo que no es ideal para la preparación de ARN pequeños.

50

55

La extracción en fase sólida se basa en un alto contenido de sal o sal y alcohol para disminuir la afinidad del ARN por el agua y aumentarla por el soporte sólido usado. Se ha demostrado que el uso del vidrio (sílice) como soporte sólido funciona para ARN grandes en presencia de altas concentraciones de sales desnaturizantes (patentes de los Estados Unidos 5,155,018; 5,990,302; 6,043,354; 6,110,363; 5,234,809; Boom y otros, 1990) o menos concentraciones de sales desnaturizantes más etanol (patente de los Estados Unidos 6,180,778). Sin embargo, las condiciones normales para unirse a la fibra de vidrio para el ARN no funcionan para el microARN, y el uso de un lisado crudo es problemático debido a los requisitos variables con diferentes tejidos.

60

65

Muchos de los protocolos conocidos implican el aislamiento de ADN o ARNm más grandes, que no son ideales para el aislamiento de moléculas de ARN pequeño porque frecuentemente no se capturan y eluyen de manera efectiva. Por lo tanto, existe la necesidad de técnicas mejoradas para el aislamiento eficiente, la detección y la cuantificación precisa de estas moléculas de ARN pequeño recientemente descubiertas.

5

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a métodos y composiciones para aislar, extraer, purificar, caracterizar, cuantificar y/o analizar moléculas de ARN pequeño de una muestra, que incluye una muestra de células. Dichas composiciones y métodos permiten la manipulación de moléculas de ARN pequeño, que frecuentemente se pierden o agotan cuando se emplean métodos para aislar generalmente moléculas de ARN más grandes.

10

La presente invención proporciona un método de enriquecimiento de ARN pequeño a partir de células que comprende: a) lisar las células con una solución de lisis para producir un lisado; b) añadir una solución de alcohol al lisado; c) aplicar el lisado a un soporte sólido; y d) eluir las moléculas de ARN del soporte sólido, en donde la solución de lisis comprende guanidinio a una concentración de entre 2,0 M y 4,0 M, y en donde la cantidad de solución de alcohol añadida al lisado le proporciona una concentración de alcohol de aproximadamente 55 % a 70 %; y

15

en donde al menos aproximadamente se aíslan 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % de las moléculas de ARN pequeño de aproximadamente 100 nucleótidos o menos en una muestra, o alternativamente

20

en donde el ARN pequeño de aproximadamente 100 nucleótidos o menos en una muestra se enriquece aproximadamente o al menos aproximadamente 3x, en moléculas de ARN pequeño como se determinó por la masa de las moléculas de ARN pequeño en relación con la masa de moléculas totales de ARN antes de colocar el lisado en el soporte sólido en comparación con después de eluir el ARN del soporte sólido.

25

Por lo tanto, se considera que la invención se refiere a moléculas de ARN pequeño, que, en la mayoría de las modalidades, se entiende que son moléculas de ARN de aproximadamente 100 nucleótidos o menos. Las moléculas de ARN pequeño incluyen moléculas de siARN y miARN. En algunas modalidades de la invención, las moléculas de ARN pequeño tienen como máximo 100 nucleótidos o menos, tienen como máximo 70 nucleótidos o menos, o tienen como máximo 30 nucleótidos o menos, o tienen como máximo 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15 nucleótidos o menos.

30

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

35

Se considera específicamente que los métodos y composiciones de la invención pueden usarse para aislar moléculas de ARN pequeño que son como máximo 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 10 o menos nucleótidos de longitud, y todos los intervalos derivables enteros entre estos. Además, dichas moléculas pueden aislarse para que una muestra se enriquezca en la cantidad de moléculas de ARN pequeño presentes.

45

Hay varias formas en que el enriquecimiento y/o la purificación de ARN pequeños pueden expresarse en el contexto de la invención. Cualquier aumento en la cantidad de moléculas de ARN pequeño presentes en una muestra está dentro del alcance de la invención.

50

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

55

El enriquecimiento y/o puede, alternativamente, medirse en términos del número de moléculas de ARN pequeño en relación con el número de moléculas totales de ARN. Pueden aislarse moléculas de ARN pequeño de manera que una muestra se enriquezca aproximadamente o al menos aproximadamente 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, 15x, 20x, 25x, 30x, 35x, 40x, 45x, 50x, 55x, 60x, 65x, 70x, 75x, 80x, 85x, 90x, 95x, 100x, 110x, 120x, 130x, 140x, 150x, 160x, 170x, 180x, 190x, 200x,

65

210x, 220x, 230x, 240x, 250x, 260x, 270x, 280x, 290x, 300x, 325x, 350x, 375x, 400x, 425x, 450x, 475x, 500x, 525x, 550x, 575x, 600x, 625x, 650x, 675x, 700x, 725x, 750x, 775x, 800x, 825x, 850x, 875x, 900x, 925x, 950x, 975x, 1000x, 1100x, 1200x, 1300x, 1400x, 1500x, 1600x, 1700x, 1800x, 1900x, 2000x (igual que el plegado) y todos los intervalos derivables en eso en las moléculas de ARN pequeño como se determinó por el número de moléculas de ARN pequeño en relación con el número total de moléculas de ARN antes de colocar el lisado en el soporte sólido en comparación con después de eluir el ARN del soporte sólido.

El enriquecimiento y/o la purificación de ARN pequeños también pueden medirse en términos del aumento de moléculas de ARN pequeño en relación con el número de moléculas totales de ARN. Las moléculas de ARN pequeño pueden aislarse de manera que la cantidad de moléculas de ARN pequeño aumente aproximadamente o al menos aproximadamente 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más con respecto a la cantidad total de ARN en la muestra antes y después del aislamiento.

Alternativamente, el enriquecimiento y/o purificación de moléculas de ARN pequeño pueden cuantificarse en términos de la ausencia de moléculas grandes de ARN presentes en la muestra después de eluir el ARN del soporte sólido. Las moléculas de ARN pequeño pueden enriquecerse de manera que el número de moléculas de ARN mayores que 200 nucleótidos en masa que permanece en la muestra después de eluir el ARN del soporte sólido no es mayor que 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0 %, o cualquier intervalo de ARN eluido del soporte sólido.

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

Los métodos de la invención incluyen métodos para aislar eficazmente moléculas de ARN pequeño de células que comprenden: a) lisar las células con una solución de lisis para producir un lisado; b) añadir una solución de alcohol al lisado; c) aplicar el lisado a un soporte sólido; y d) eluir las moléculas de ARN del soporte sólido.

Debido a que las moléculas de ARN pequeño se están aislando eficazmente, los métodos de la invención incluyen una etapa de e) usar o caracterizar las moléculas de ARN pequeño. El uso o la caracterización de las moléculas de ARN pequeño se distingue de descartar las moléculas de ARN pequeño o tenerlas como un subproducto o contaminante en una reacción o ensayo que implica otros tipos de moléculas aisladas de la muestra, tales como moléculas de ARN más largas o moléculas de ADN.

Las muestras de las que pueden aislarse moléculas de ARN pequeño incluyen cualquier muestra que contenga dichas moléculas. La muestra puede ser o contener células, tejidos, órganos u otra muestra biológica. Alternativamente, la muestra puede ser una mezcla de reacción, tal como una en la que se produjeron, generaron o crearon moléculas de ARN pequeño por medios enzimáticos, sintéticos y/o recombinantes.

En algunas modalidades, los métodos de la invención implican lisar una muestra que contiene células. Se produce un "lisado" cuando se lisa una célula o se altera su integridad. En modalidades específicas de la invención, se implementa una solución de lisis para lisar una muestra celular, y la solución incluye un agente caotrópico o detergente. Un "agente caotrópico" se refiere a un agente que despliega macromoléculas ordenadas, lo que hace que pierdan su función (lo que provoca que las proteínas de unión liberen su objetivo). Un "detergente" se refiere a una sustancia que puede dispersar una sustancia hidrofóbica (generalmente lípidos) en agua por emulsión. La concentración de un agente caotrópico en las soluciones, particularmente las soluciones de lisis, es aproximadamente, es como máximo aproximadamente, o es al menos aproximadamente 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1, 2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5 M o más, e intervalos en esto. En modalidades específicas, la concentración de guanidinio en la solución de lisis está entre aproximadamente 2,0 M y 4,0 M. En algunas modalidades, el agente caotrópico es cloruro de guanidinio o isotiocianato de guanidinio. En otras modalidades adicionales, la solución de lisis también contiene un detergente y/o tampón. La concentración de detergente tpe está entre 0,1 % y aproximadamente 2 % en algunas modalidades. El detergente, particularmente uno suave que no es desnaturizante, puede actuar para solubilizar la muestra. Los detergentes pueden ser iónicos o no iónicos. El detergente iónico N-lauroil sarcosina se considera específicamente para su uso en soluciones de la invención. La concentración del detergente en el tampón puede ser aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %, 2,5 %, 3,0 %, 3,5 %, 4,0 %, 4,5 %, 5,0 %, 5,5 %, 6,0 %, 6,5 %, 7,0 %, 7,5 %, 8,0 %, 8,5 %, 9,0 %, 9,5 %, 10,0 % o cualquier intervalo en el mismo. Se considera que la concentración del detergente puede ser hasta una cantidad en donde el detergente permanece soluble en la solución.

En otros ejemplos, hay un tampón en las soluciones de la invención, que incluye una solución de lisis. El tampón puede estar a una concentración de aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500 mM o cualquier intervalo en la solución o en la solución con la muestra. En ciertos casos, la concentración de tampón

en la solución de lisis está entre aproximadamente 10 mM y 300 mM. Además, en otras modalidades, el tampón es TrisCl, aunque se considera que también pueden emplearse otros tampones.

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

20 Se considera que el pH de cualquier solución, o del componente tampón de cualquier solución, o de cualquier solución con la muestra esté entre aproximadamente 4,5 y 10,5, aunque puede ser aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5 o cualquier intervalo en el mismo.

25 Otros métodos de la invención también incluyen extraer moléculas de ARN pequeño del lisado con una solución de extracción que comprende un disolvente orgánico sin alcohol antes de aplicar el lisado al soporte sólido. En modalidades específicas, la solución de extracción contiene un disolvente orgánico sin alcohol tal como fenol y/o cloroformo. Se entiende que la solución de solvente orgánico sin alcohol contiene al menos un solvente orgánico sin alcohol, aunque también puede contener un alcohol. Las concentraciones descritas anteriormente con respecto a las soluciones de alcohol son aplicables a las concentraciones de soluciones que tienen solventes orgánicos sin alcohol. En modalidades específicas, se mezclan cantidades iguales de 1) el lisado y 2) fenol y/o cloroformo. En modalidades específicas, la solución de alcohol se añade al lisado antes de la extracción con un disolvente orgánico sin alcohol.

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

50 La extracción de ARN del lisado incluye el uso de un soporte sólido, tal como un soporte mineral o polimérico. Un "soporte sólido" se refiere a una estructura física que contiene un material que contacta con el lisado y que no reacciona irreversiblemente a las macromoléculas en el lisado, particularmente con moléculas de ARN pequeño. En modalidades particulares, el soporte sólido se une a moléculas de ARN pequeño; en casos adicionales, une moléculas de ARN pequeño, pero no une uno o más de otros tipos de macromoléculas en la muestra. El material en el soporte sólido puede incluir un mineral o polímero, en cuyo caso el soporte se denomina "soporte mineral o polimérico". Los soportes minerales o poliméricos incluyen soportes que implican sílice. En algunas modalidades, la sílice es vidrio. Los soportes incluyen, pero no se limitan a, cuentas, columnas y filtros. En modalidades adicionales, el soporte mineral o polimérico es un filtro de fibra de vidrio o columna.

60 Alternativamente, en algunas modalidades, el soporte mineral o polimérico puede incluir polímeros o no polímeros con grupos electronegativos. En algunas modalidades, el material es o tiene poliacrilato, poliestireno, látex, poliácilonitrilo, cloruro de polivinilo, metacrilato y/o metacrilato de metilo. Dichos soportes se consideran específicamente para su uso con la presente invención.

65 En algunos métodos de la invención, un lisado que puede o no haberse mezclado con una solución de solvente orgánico con o sin alcohol se aplica a un soporte sólido y el ARN se eluye del soporte.

Después de aplicar o mezclar un lisado con un soporte sólido, el material puede lavarse con una solución. En algunas modalidades, un soporte mineral o polimérico se lava con una primera solución de lavado después de aplicar el lisado al soporte mineral o polimérico. En modalidades adicionales, una solución de lavado comprende un agente caotrópico o reductor. El agente caotrópico es guanidinio en algunas soluciones de lavado. Una solución de lavado incluye alcohol en algunas modalidades de la invención, y en algunos casos, tiene tanto alcohol como guanidinio. Se considera además que los métodos de la invención implican 1, 2, 3, 4, 5 o más lavados con una solución de lavado. La solución de lavado usada cuando implica más de un lavado puede ser igual o diferente. En algunas modalidades, las soluciones de lavado tienen los mismos componentes pero en diferentes concentraciones entre sí. En general, se entiende que las moléculas que atraviesan el material en un ciclo de lavado se descartan.

En otros métodos de la invención, las moléculas de ARN deseadas se eluyen del soporte sólido. En determinadas modalidades, las moléculas de ARN pequeño se eluyen de un soporte sólido tal como un soporte mineral o polimérico a una temperatura de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 100 °C. Se considera que la temperatura a la que se eluyen las moléculas de ARN es aproximadamente o al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 °C o más, o cualquier intervalo en el mismo. Las moléculas pueden eluirse con cualquier solución de elución. En algunas modalidades, la solución de elución es una solución iónica, es decir, incluye iones. En modalidades particulares, la solución de elución incluye hasta 10 mM de sal. Se considera que sea aproximadamente, al menos aproximadamente, o como máximo aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más mM de sal. En ciertas modalidades, la sal consiste en una combinación de Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como catión y er, Br<sup>-</sup>; r, etilendiaminotetraacetato o citrato como anión.

Las etapas adicionales del método incluyen pasar las moléculas de ARN pequeño a través de un GFF mientras se unen solo los ARN más grandes. En algunas modalidades, las moléculas de ARN pequeño pasadas se capturan en un segundo GFF y luego se eluyen. El material que no se captura en el segundo filtro GFF se descarta o no se usa en métodos adicionales de la invención.

Los métodos específicos de la invención se refieren a aislar miARN o siARN de una muestra por al menos las siguientes etapas: a) obtener una muestra que tiene miARN o siARN; b) añadir una solución de extracción a la muestra; c) añadir una solución de alcohol a la muestra extraída; d) aplicar la muestra a un soporte mineral o polimérico; y, e) eluir el ARN que contiene siARN o miARN del soporte mineral o polimérico con una solución iónica. En modalidades particulares, la muestra es un lisado celular. El lisado celular, en algunos casos, se produce mediante la adición de una solución de lisis que comprende un agente caotrópico o detergente a las células que tienen miARN o siARN. En algunas modalidades, la muestra eluida se enriquece al menos aproximadamente 10 veces en masa para miARN y/o siARN.

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

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

Después de extraer el ARN, las moléculas de ARN individuales o específicas y/o los grupos de moléculas de ARN (así como la población completa de ARN aislado) pueden estar sujetos a reacciones y/o ensayos adicionales. En algunos casos, estas reacciones y/o ensayos implican la amplificación del ARN o de una molécula de ADN generada a partir del ARN. Por ejemplo, la RT-PCR puede emplearse para generar moléculas que pueden caracterizarse.

En algunas modalidades, una molécula de ARN particular o una población de ARN puede cuantificarse o caracterizarse. La cuantificación incluye cualquier procedimiento conocido por los expertos en la técnica, como los que implican una o más reacciones de amplificación o ensayos de protección de nucleasa, tal como los que usan ribonucleasa para discriminar entre la sonda que se hibrida con un objetivo específico de miARN o no se hibrida, como se incorpora en el Kit de detección de miARN mirVana de Ambion. Estos procedimientos incluyen PCR de transcriptasa inversa cuantitativa (qRT-PCR). En algunas modalidades, se realiza la caracterización del ARN aislado. Las moléculas de ADNc se generan a partir del ARN extraído. Se consideran otros ensayos de caracterización y cuantificación como parte de la invención. Los métodos y composiciones de la invención permiten cuantificar y caracterizar moléculas de ARN pequeño. Las moléculas de ARN pequeño también pueden usarse con matrices; para generar ADNc para su uso en matrices o como objetivos para ser detectados por matrices, después de ser marcados por etiquetas radiactivas, fluorescentes o luminiscentes. Otros ensayos incluyen el uso de la espectrofotometría, la electroforesis y la secuenciación.

La presente invención también se refiere a kits para aislar moléculas de ARN pequeño, tales como miARN y/o ARNip de una muestra, particularmente una muestra celular. Por lo tanto, cualquiera de las composiciones discutidas anteriormente puede incluirse con cualquier otra composición discutida anteriormente para su inclusión en un kit. En algunas

modalidades, existen kits para aislar moléculas de ARN pequeño que comprenden: a) fenol-cloroformo ácido; b) un tampón de lisis/unión, c) un aditivo homogenado de ARN pequeño, d) una o más solución(es) de lavado de ARN pequeño, y e) una solución de elución.

5 En una modalidad preferida, el kit contiene: a) un fenol-cloroformo ácido; b) un tampón de lisis/unión que comprende GuSCN 4 M, beta-mercaptoetanol 0,1 M, N-lauroil sarcosina al 0,5 %, citrato de sodio 25 mM, pH 7,2; c) un aditivo homogenado de ARN pequeño que comprende acetato de sodio 2 M, pH 4, para añadirse en 0,1 volumen antes de la extracción con PC; d) una solución de lavado #1 que comprende GuSCN 1,6 M en etanol al 70 %; e) una solución de lavado #2/3 que comprende etanol al 80 %, NaCl 0,1 M, EDTA 4,5 mM, TrisHCl 10 mM, pH 7,5; f) una solución de elución que comprende EDTA 0,1 mM, pH 8; g) un tampón de carga de gel II; h) tubos de recogida; e i) cartuchos de filtro.

15 En algunas modalidades, los kits de la invención incluyen uno o más de los siguientes en un medio contenedor adecuado (consistente con las composiciones discutidas anteriormente): un tampón de lisis con un agente caotrópico; un filtro de fibra de vidrio o columna; tampón de elución; tampón de lavado; solución de alcohol; e inhibidor de RNasa.

Los componentes de los kits pueden envasarse en medios acuosos o en forma liofilizada. El medio contenedor de los kits generalmente incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otro medio contenedor, en el que puede colocarse un componente, y preferentemente, alícuotas adecuadas. Cuando hay más de un componente en el kit (pueden empacarse juntos), el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro contenedor adicional en el que los componentes adicionales pueden colocarse por separado. Sin embargo, varias combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener el ARN y cualquier otro recipiente de reactivo en confinamiento cerrado para venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico inyectados o moldeados por soplado en los que se retienen los viales deseados. Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, prefiriéndose particularmente una solución acuosa estéril.

30 Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también pueda proporcionarse en otro medio contenedor. El medio contenedor generalmente incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa y/u otro medio contenedor, en el que se colocan las formulaciones de ácido nucleico, preferentemente, asignadas de manera adecuada. Los kits también pueden comprender un segundo medio contenedor para contener un tampón y/u otro diluyente estéril, farmacéuticamente aceptable.

35 Dichos kits también pueden incluir componentes que preservan o mantienen el ARN o que protegen contra su degradación. Dichos componentes pueden estar libres de ARNasa o proteger contra ARNasas. Dichos kits generalmente comprenderán, en medios adecuados, recipientes distintos para cada reactivo o solución individual.

40 Se considera que cualquier modalidad discutida en la presente descripción puede implementarse con respecto a cualquier método o composición de la invención, y viceversa. Además, las composiciones y kits de la invención pueden usarse para lograr los métodos de la invención.

45 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refieren solo a alternativas o que las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas y "y/o."

A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la desviación estándar de error para el dispositivo o método empleado para determinar el valor.

50 Siguiendo una ley de patentes de larga data, las palabras "un" y "una", cuando se usan junto con la palabra "que comprende" en las reivindicaciones o especificaciones, denotan una o más, a menos que se indique específicamente.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican modalidades preferidas, se dan solo a modo de ilustración, ya que diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

#### Breve descripción de los dibujos

60 Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de modalidades específicas que se presentan en la presente descripción.

65 Figura 1. Comportamiento de unión de miARN let-7 en extractos crudos de cerebro, corazón e hígado de ratón a diversas concentraciones de etanol. Se añadió etanol absoluto al lisado crudo para crear las concentraciones finales de etanol indicadas.

Figura 2. Comportamiento de unión del miARN let-7 en extractos de fenol-cloroformo del cerebro, corazón e hígado de ratón a diversas concentraciones de etanol. Se añadió etanol absoluto a los lisados después de la extracción por fenol-cloroformo (como en el procedimiento estándar) para crear las concentraciones finales de etanol indicadas.

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

10 Figura 4. Comportamiento de unión de P-actina, GAPDH, PPI, U2 y let-7 a concentraciones variables de etanol en presencia de GuSCN 2 M, con la concentración de etanol ajustada mediante la adición de etanol absoluto.

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

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

20 Figura 7. Enriquecimiento relativo de ARN P-actina, GAPDH, U2 y let-7.

Figura 8. Enriquecimiento relativo de ARN U2 y let-7.

25 Figura 9. Rendimiento del procedimiento actual en comparación con la extracción estándar de fenol-cloroformo y precipitación con etanol

Figura 10. Comparación del rendimiento absoluto de tres ARN pequeños, let-7 (22nt), U43 (62nt) y U2 (187nt), mediante el uso del proceso actual (Ambion microRNA Isolation Kit = AMIK) versus un sistema de fibra de vidrio actualmente disponible (RNeasy).

30 Figura 11. Comparación del rendimiento de las células cultivadas, con y sin extracción previa. Se determinó el rendimiento de U2 y let-7.

35 Figura 12. Efectos de diferentes concentraciones de NaOH a dos pHs para la extracción de fenol-cloroformo antes de la inmovilización en vidrio con rendimiento de U2, U43 y let-7.

#### Descripción de modalidades ilustrativas

##### I. Moléculas de ARN pequeño

40 Las poblaciones naturales de ARN se aíslan rutinariamente de tejidos animales y vegetales, así como de células crecidas en cultivo. Sin embargo, la mayoría de estos procedimientos no tienen que ver con la retención de ARN pequeños, en el intervalo de menos de 100 nucleótidos de largo. De hecho, se sabe que los procedimientos estándar de precipitación con alcohol son ineficientes para capturar ácidos nucleicos más pequeños que alrededor de 100 nucleótidos.

45 La presencia de moléculas de ARN pequeño y los nucleótidos libres se ha observado durante mucho tiempo en el ARN extraído a partir de muestras biológicas y supone el reflejo de los productos de degradación de los ARN funcionales y codificantes de proteínas más grandes, que incluyen aquellos implicados en la traducción y el procesamiento de complejos de ARN. En los últimos años, se ha encontrado que pequeños ARN implicados en la regulación de la expresión génica están presentes en prácticamente todos los organismos eucariotas. En 1993, el laboratorio de Ambrose publicó un informe sobre el descubrimiento que el *gen let-7*, que da como resultado una nebulización del desarrollo, o heterocromía, en el nematodo *Caenorhabditis elegans* codificó un ARN de 22-nt (Lee y otros, 1993.). Este pequeño ARN monocatenario (ahora denominado microARN o miARN) afecta la expresión de un conjunto de genes del desarrollo al inhibir su capacidad de funcionar en la traducción basada en la complementariedad de secuencia parcial con el gen objetivo. Se encontró que

50 la presencia de este pequeño ARN se conserva en muchas especies evolutivamente divergentes (Pasquinelli y otros, 2000), que incluyen vertebrados, ascidias, hemicordados, moluscos, anélidos y artrópodos.

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

60 Los miARN observados hasta ahora han tenido una longitud de aproximadamente 21-22 nucleótidos y surgen de precursores más largos, que se transcriben de genes que no codifican proteínas. Ver revisión de Carrington y otros (2003). Los precursores forman estructuras que se pliegan entre sí en regiones autocomplementarias; luego son procesados por la nucleasa Dicer en animales o DCL1 en plantas. Las moléculas de miARN interrumpen la traducción mediante un emparejamiento de bases impreciso con sus objetivos.



Los micro ARN no son los únicos ARN de ese tamaño que se encuentran en las células eucariotas. Se encontró una vía para la degradación de los ARNm en la célula que crea pequeños ARN bicatenarios (Fire y otros, 1998; Zamore y otros, 2000; muchos otros, revisados en Timmons, 2002.). Este proceso, llamado interferencia de ARN, utiliza estos "pequeños ARN de interferencias" (siARN) para apuntar a sus sitios de degradación, generalmente de un intermediario bicatenario mucho más grande. Aunque no se conoce la función natural de este sistema, se cree que está implicado en la respuesta a los agentes infecciosos. Se ha descubierto que las plantas tienen un sistema similar, que también utiliza microARN en el silenciamiento génico postranscripcional (Hamilton y Baulcombe, 1999; Tang y otros 2003).

10 II. Aislamiento de moléculas cortas de ARN

Los métodos de la invención implican uno o más pasos para aislar y/o enriquecer eficazmente moléculas cortas de ARN. Estos pasos incluyen o implican lo siguiente: lisar células y/o crear un lisado celular;

15 A. Crear lisados celulares

Se considera que la presente invención pueda usarse para facilitar la preparación de moléculas de ARN pequeño a partir de muestras biológicas para evaluación y uso posterior. En algunas modalidades de la invención, la preparación de muestras implica homogeneizar la muestra o preparar un lisado celular a partir de la muestra. En modalidades de la invención, la homogeneización o lisis de una célula se logra mediante el uso de una solución que contiene una sal de guanidinio, detergente, tensioactivo u otro desnaturizante. Los términos homogeneización y lisis se usan indistintamente.

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

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

Una muestra biológica puede homogeneizarse o fraccionar en presencia de un detergente o tensioactivo. El detergente puede actuar para solubilizar la muestra. Los detergentes pueden ser iónicos o no iónicos. Los ejemplos de detergentes no iónicos incluyen tritón, como la serie Triton X (Triton X-100, Triton X-IOOR, Triton X-114, Triton X-450, Triton X-450R), glucósido de octilo, éter de dodecil(9)polioxietileno, digitonina, IGEPAL CA630, n-octil-beta-D-glucopiranosido (betaOG), n-dodecil-beta, C12E07, Tween 20, Tween 80, polidocanol, n-dodecilo beta-D-maltósido (DDM), NP-40, C12E8 (monoéter n-dodecil octaetilenglicol), éter mono-n-tetradecil hexaetilenglicol (C14E06), octil-beta-tioglucopiranosido (tioglucósido de octilo, OTG), Emulgen y éter 10 lauril polioxietileno (C12E10). Los ejemplos de detergentes iónicos (aniónicos o catiónicos) incluyen desoxicolato, dodecil sulfato de sodio (SDS), N-lauroilsarcosina y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). También puede usarse un reactivo de ion híbrido en los esquemas de purificación de la presente invención, tal como Chaps, zwitterion 3-14 y 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato. También se considera que se pueda añadir urea con o sin otro detergente o tensioactivo.

Las soluciones de lisis u homogeneización pueden contener además otros agentes tales como agentes reductores. Los ejemplos de dichos agentes reductores incluyen ditiotreitól (DTT), P-mercaptoetanol, DTE, GSH, cisteína, cisteamina, tricarbóxetilfosfina (TCEP) o sales de ácido sulfuroso.

En algunas modalidades de la invención, una solución de lisis incluye: tiocianato de guanidinio, N-lauroil sarcosina y TrisHCl. Una vez que la muestra se ha homogeneizado en esta solución, puede extraerse el ARN, frecuentemente con soluciones de fenol o el uso de una fase sólida adsorbente. Los métodos alternativos usan soluciones combinadas de desnaturizante/fenol para realizar la homogeneización inicial, lo que excluye la necesidad de una extracción secundaria. Ejemplos de estos reactivos serían Trizol™ (Invitrogen) o RNAwiz™ (Ambion, Inc.)

Después de la exposición a una solución de homogeneización, las muestras pueden homogeneizarse aún más por medios mecánicos. Pueden emplearse mezcladores mecánicos, homogeneizadores de rotor-estator u homogeneizadores de tipo cizalla.

Alternativamente, el tejido podría homogeneizarse en la solución de lisis, y el tejido permanecería separado por sedimentación, centrifugación o filtración. Estos restos podrían entonces tratarse con solución de homogeneización y condiciones de extracción como se describió anteriormente.

Los métodos de la invención pueden incluir además etapas que implican la eliminación de lípidos o composiciones de los mismos con detergentes o tensioactivos. Un lípido puede ser natural o sintético (*es decir*, diseñado o producido por el hombre). Sin embargo, un lípido suele ser una sustancia biológica. Los lípidos biológicos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glucoesfingolípidos, glucolípidos, sulfatidas, lípidos con éter y ácidos grasos unidos a éster y lípidos polimerizables, y sus combinaciones. La eliminación de un lípido tal como un fosfolípido se describe en la presente descripción.

Pueden usarse detergentes para facilitar la homogeneización o la creación de un lisado celular. Estos detergentes incluyen específicamente Triton X-100 y CHAPS. CHAPS es el detergente de ion híbrido 3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amonio]-1-propanosulfonato.

Otros protocolos relevantes, que incluyen modalidades de extracción, pueden encontrarse en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Titulada "METHODS AND COMPOSITIONS FOR PREPARING RNA FROM A FIXED SAMPLE", presentada a nombre de Richard Cnrad y Emily Zeringer el mismo día que la presente solicitud. Se considera específicamente que la presente invención puede usarse para preparar moléculas de ARN pequeño a partir de una muestra fija.

#### B. Extracción de moléculas de ARN pequeño

Después de lisar u homogeneizar una muestra celular, pueden implementarse procedimientos adicionales para extraer específicamente moléculas de ARN. Se considera que si la muestra implica células, la etapa de lisis u homogeneización puede considerarse parte de un proceso de extracción general, sin embargo, la extracción de ARN específicamente puede ser referida a, y se entenderá como la separación de moléculas de ARN de otras biomoléculas tales como lípidos y proteínas. La extracción de moléculas de ARN de estas otras estructuras puede implicar soluciones de extracción que contienen uno o más solventes orgánicos. En algunos casos, el solvente orgánico es un solvente orgánico sin alcohol tal como fenol y/o cloroformo. En otros, una solución contiene un alcohol, que puede ser cualquier alcohol usado para la extracción de ácidos nucleicos, pero en ciertas modalidades, el alcohol es etanol.

Las moléculas de ARN pueden extraerse de una variedad de muestras celulares. Dichas muestras celulares pueden comprender células del cerebro, cabeza, cuello, tracto gastrointestinal, pulmón, hígado, páncreas, mama, testículo, útero, vejiga, riñón, próstata, colon, riñón, piel, ovario y corazón, pero no están limitadas a dichas células.

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

Un "complemento(s)" de ácido nucleico o es "complementario" a otro ácido nucleico cuando es capaz de emparejar bases con otro ácido nucleico de acuerdo con las reglas estándar de complementariedad de unión de Watson-Crick, Hoogsteen o inversa de Hoogsteen. Como se usa en la presente descripción, "otro ácido nucleico" puede referirse a una molécula separada o una secuencia espacial separada de la misma molécula.

Como se usa en la presente descripción, el término "complementario" o "complemento(s)" también se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleobases consecutivas o nucleobases semi-consecutivas (por ejemplo, una o más porciones de nucleobase no están presentes en la molécula) capaces de hibridar a otra cadena de ácido nucleico o dúplex, incluso si menos de todas las nucleobases no se emparejan con una nucleobase de contraparte. En ciertas modalidades, un ácido nucleico "complementario" comprende una secuencia en la que aproximadamente 70 %, aproximadamente 71 %, aproximadamente 72 %, aproximadamente 73 %, aproximadamente 74 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 76 %, aproximadamente 77 %, aproximadamente 77 %, aproximadamente 78 %, aproximadamente 79 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 81 %, aproximadamente 82 %, aproximadamente 83 %, aproximadamente 84 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 86 %, aproximadamente 87 %, aproximadamente 88 %, aproximadamente 89 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, a aproximadamente 100 %, y cualquier intervalo derivable en el mismo, de la secuencia de nucleobase es capaz de emparejar bases con una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o doble durante la hibridación. En ciertas modalidades, el término "complementario" se refiere a un ácido nucleico que puede hibridarse con otra cadena de ácido nucleico o dúplex en condiciones rigurosas, como entendería un experto en la técnica.

En ciertas modalidades, un ácido nucleico "parcialmente complementario" comprende una secuencia que puede hibridarse en condiciones de baja rigurosidad con un ácido nucleico de cadena sencilla o doble, o contiene una secuencia en la que menos del 70 % de la secuencia de nucleobase es capaz de emparejar bases con una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o doble durante la hibridación.

Estas definiciones generalmente se refieren a una molécula monocatenaria, pero en modalidades específicas también abarcarán una cadena adicional que es parcial, sustancial o totalmente complementaria a la molécula monocatenaria. Por lo tanto, un ácido nucleico puede abarcar una molécula bicatenaria o una molécula de triple cadena que comprende una o más cadena(s) complementaria(s) o "complemento(s)" de una secuencia particular que comprende una molécula. Como se usa en la presente descripción, un ácido nucleico de cadena sencilla puede denotarse con el prefijo "ss", un ácido nucleico de cadena doble con el prefijo "ds" y un ácido nucleico de cadena triple con el prefijo "ts".

C. Dispositivos y soporte sólido

Un soporte sólido es una estructura que contiene material que se unirá de manera reversible con los ácidos nucleicos, particularmente moléculas de ARN pequeño, y en algunas modalidades, no se unirá a uno o más tipos de macromoléculas en la muestra. El material puede comprender plástico, vidrio, sílice, un imán, un metal como oro, carbono, celulosa, látex, poliestireno y otros polímeros sintéticos, nylon, celulosa, nitrocelulosa, poliacrilato, poliacrilonitrilo, metacrilato y/o polimetacrilato de metacrilato de metilo, cloruro de polivinilo, estireno-divinilbenceno o cualquier plástico modificado químicamente. También pueden ser materiales porosos o no porosos. La estructura también puede ser una partícula de cualquier forma que permita aislar, agotar o separar las moléculas de ARN pequeño. En algunas modalidades, es una columna que incluye cualquiera de los materiales descritos anteriormente a través de los cuales un lisado puede pasarse.

Otros componentes incluyen aparatos de aislamiento, tales como dispositivos de filtración, que incluyen filtros o columnas de centrifugación. Puede ser una esfera, como una cuenta, una varilla, o una estructura de forma plana, como una placa con pozos. La estructura y la muestra que contienen las moléculas de ARN deseadas pueden centrifugarse, filtrarse, dializarse y/o aislarse de otro modo. Cuando la estructura se centrifuga, puede granularse o pasar a través de un aparato de filtro centrífugo.

La estructura también puede pasar por una etapa de captura adicional. En algunas modalidades, la muestra se filtra posteriormente después de pasar a través de una estructura de captura. La etapa de captura puede incluir filtración mediante el uso de un sistema impulsado por presión o un sistema basado en la gravedad (por ejemplo, centrifugación). Muchas de estas estructuras están disponibles comercialmente y pueden utilizarse aquí. Pueden encontrarse otros ejemplos en los documentos WO 86/05815, WO 90/06045, patente de los Estados Unidos 5,945,525.

II. Caracterización y cuantificación de moléculas de ARN pequeño aisladas

Las moléculas de ARN pequeño obtenidas de las muestras pueden analizarse o cuantificarse mediante diversos métodos para caracterizarlas, cuantificarlas o usarlas para el análisis de otras muestras biológicas. En la presente descripción se proporcionan métodos para cuantificar o analizar ARN, o manipular el ARN para usar en ensayos que implican otro material biológico. Pueden encontrarse métodos generales para cuantificar o analizar ARN en Sambrook y *otros* (2001) o Maniatis y *otros* (1990) Más abajo se proporcionan ejemplos para usar las moléculas de ARN pequeño a partir de muestras, sin embargo, estos ejemplos no están destinados a ser limitantes.

A. Ensayos de protección de nucleasa

Los ensayos de protección de nucleasa (NPAs), que incluyen tanto los ensayos de protección de ribonucleasa (RPAs) y los ensayos de nucleasa SI, son un método extremadamente sensible para la detección, cuantificación y mapeo de ARN específicos en una mezcla compleja de ARN celular total. La base de los NPA es una hibridación en solución de una(s) sonda(s) antisentido de tamaño discreto y monocatenario a una muestra de ARN. La hibridación en solución de volumen pequeño es mucho más eficiente que la hibridación más común basada en membrana, y puede acomodar hasta 100 µg de ARN total o poli(A). Después de la hibridación, cualquier sonda no hibridada restante y muestra de ARN se eliminan mediante digestión con una mezcla de nucleasas. Luego, en una reacción de un solo paso, las nucleasas se inactivan y la sonda restante: los híbridos objetivo se precipitan. Estos productos se separan en un gel de poliacrilamida desnaturante y se visualizan por autorradiografía. Si se utilizan sondas no isotópicas, las muestras se visualizan transfiriendo el gel a una membrana y realizando una detección secundaria.

Dichas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los kits comerciales para tales ensayos están fácilmente disponibles, como el kit Direct Protect™ Lysate RPA, el kit HybSpeed™ RPA y los kits de ensayo de protección de ribonucleasa RPA II y RPA III™ de Ambion.

B. Electroforesis en gel de agarosa desnaturante

Las moléculas de ARN pequeño aisladas de una muestra pueden cuantificarse mediante electroforesis en gel mediante el uso de un sistema de gel desnaturante. Los geles de acrilamida son la matriz preferida para separaciones de este tamaño, aunque también pueden usarse altas concentraciones (-4 % +) de agarosa modificada como NuSieve (FMC, 191 Thomaston St., Rockland, ME 04841). Se debe incluir un control positivo en el gel para que cualquier resultado inusual se pueda atribuir a un problema con el gel o un problema con el ARN bajo análisis. Pueden usarse para este propósito los marcadores de peso molecular de ARN, una muestra de ARN que se sabe que está intacta, o ambos. También es una buena idea incluir una muestra del ARN inicial que se usó en el procedimiento de enriquecimiento. La presencia de ARN pequeños específicos puede determinarse transfiriendo los contenidos de estos geles a membranas de hibridación y sondeando con sondas de oligonucleótidos radiactivos (basados en ARN o ADN).

C. Evaluación del rendimiento de ARN por absorción UV

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

- 5 Un A<sub>260</sub> de 1 es equivalente a 40 µg *RNN/ml*. Por lo tanto, la concentración (µg/ml) de ARN se calcula multiplicando el factor de dilución A<sub>260</sub> X 40 µg/ml. El siguiente es un ejemplo típico:

10 El rendimiento típico de 10 µg de ARN total es de 3 a 5 µg. Si la muestra se resuspende en 25 µl, esto significa que la concentración variará entre 120 ng/µl y 200 ng/µl. Un µl de la preparación se diluye 1:50 en 49 µl de TE. El A<sub>260</sub> = 0,1. Concentración de ARN = 0,1 x 50 x 40 µg/ml = 200 µg/ml o 0,2 µg/µl. Como hay 24 µl de la preparación restante después de usar 1 µl para medir la concentración, la cantidad total de ARN restante es 24 µl X 0,2 µg/µl = 4,8 µg.

#### D. Otros usos de moléculas de ARN pequeño a partir de las muestras

15 Las moléculas de ARN pequeño obtenidas de una muestra pueden analizarse o usarse en tecnología de micromatriz. Por ejemplo, una matriz tal como una matriz de genes son soportes sólidos sobre los cuales se ha detectado una colección de sondas específicas de genes en ubicaciones definidas. Las sondas localizan objetivos marcados complementarios de una muestra de ácido nucleico, como una muestra de ARN, población a través de hibridación. Uno de los usos más comunes para las matrices de genes es la comparación de los patrones de expresión global de una población de ARN.

20 Típicamente, puede usarse ARN aislado de dos o más muestras de tejido. Los ARN se transcriben inversamente mediante el uso de nucleótidos marcados y cebadores de secuencia aleatoria, oligo-dT específicos del objetivo para crear poblaciones marcadas de ADNc. Los ADNc se desnaturalizan del ARN molde y se hibridan con matrices idénticas. La señal hibridada en cada matriz se detecta y cuantifica. La señal que emite desde cada punto específico del gen se compara entre las poblaciones. Los genes expresados a diferentes niveles en las muestras generan diferentes cantidades de ADNc marcado y esto da como resultado puntos en la matriz con diferentes cantidades de señal.

La conversión directa de las poblaciones de ARN en ADNc marcados se usa ampliamente porque es simple y en gran medida no se ve afectada por el sesgo enzimático. Sin embargo, el marcado directo requiere grandes cantidades de ARN para crear suficiente producto marcado para que los objetivos moderadamente raros se detecten mediante análisis de matriz. La mayoría de los protocolos de matriz recomiendan que se usen 2,5 g de poliA o 50 g de ARN total para la transcripción inversa (Duggan, 1999). Para los profesionales que no pueden aislar tanto ARN de sus muestras, se han usado procedimientos de amplificación global.

35 El más frecuentemente citado de estos esquemas de amplificación global es la amplificación de ARN antisentido (ARNa) (patentes de los Estados Unidos 5,514,545 y 5,545,522). La amplificación de ARN antisentido implica la transcripción inversa de muestras de ARN con un cebador oligo-dT que tiene un promotor de transcripción tal como la secuencia promotora consenso de la polimerasa de ARN T7 en su extremo 5'. La transcripción inversa de la primera cadena crea ADNc monocatenario. Después de la síntesis de ADNc de la primera cadena, el ARN molde que se hibrida con el ADNc se degrada parcialmente creando cebadores de ARN. Los cebadores de ARN se extienden para crear ADN de doble cadena que poseen promotores de transcripción. La población se transcribe con una polimerasa de ARN apropiada para crear una secuencia de población de ARN que posee el ADNc. Debido a que la transcripción produce decenas a miles de ARN que se crean a partir de cada plantilla de ADN, puede lograrse una amplificación sustantiva. Los ARN pueden marcarse durante la transcripción y usarse directamente para el análisis de la matriz, o el ARN no marcado puede transcribirse de forma inversa con dNTPs marcados para crear una población de ADNc para la hibridación de la matriz.

45 En cualquier caso, la detección y el análisis de objetivos marcados son bien conocidos en la técnica. Otros métodos de amplificación que pueden emplearse incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa (denominada PCR™; ver las patentes de los Estados Unidos 4,683,195, 4,683,202 y 4,800,159, e Innis y otros, 1988); y reacción en cadena de la ligasa ("LCR"), descrita en la Solicitud Europea Núm. 320 308, Patente de los Estados Unidos 4,883,750, 5,912,148. Qbeta Replicase, descrita en la Solicitud PCT Núm. PCT/US87/00880, también puede usarse como un método de amplificación. Los métodos alternativos para la amplificación de un ácido nucleico como el ARN se describen en las patentes de los Estados Unidos 5,843,650, 5,846,709, 5,846,783, 5,849,546, 5,849,497, 5,849,547, 5,858,652, 5,866,366, 5,916,776, 5,922,574, 5,928,905, 5,928,906, 5,932,451, 5,935,825, 5,939,291, 5,916,779 y 5,942,391, la solicitud de GB núm. 2 202 328, y la Solicitud PCT Núm. PCT/US89/01025, la Solicitud PCT WO 89/06700, la Solicitud PCT WO 88/10315, la Solicitud Europea Núm 329 822, Kwoh y otros, 1989; Frohman, 1994; Ohara y otros, 1989; y Walker y otros, 1992.

55 Las bibliotecas de ADNc también pueden construirse y usarse para analizar el ARN extraído de una muestra. La construcción de tales bibliotecas y el análisis de ARN mediante el uso de tales bibliotecas pueden encontrarse en Sambrook y otros (2001); Maniatis y otros (1990); Efstratiadis y otros (1976); Higuchi y otros (1976); Maniatis y otros (1976); Land y otros (1981); Okayama y otros (1982); Gubler y otros (1983); Ko (1990); Patanjali y otros (1991); Solicitud de patente de los Estados Unidos. 20030104468 Los presentes métodos y kits pueden emplearse para la investigación de gran volumen. Puede crearse una biblioteca de ARN o ADN mediante el uso de los métodos y composiciones de la invención. Esta biblioteca puede usarse en ensayos de alto rendimiento, que incluyen micromatrices. Los presentes inventores consideran específicamente tecnologías de ácido nucleico basadas en chips tales como las descritas por Hacia y otros (1996) y Shoemaker y otros (1996). Brevemente, estas técnicas implican métodos cuantitativos para analizar grandes cantidades de genes de forma rápida y precisa. Mediante el uso de matrices de sondas fijas, puede emplearse tecnología de chip para separar moléculas objetivo como matrices de alta densidad y examinar estas moléculas en base

a la hibridación (ver también, Pease y otros, 1994; y Fodor y otros, 1991). El término "matriz", como se usa en la presente descripción, se refiere a una disposición sistemática de ácido nucleico. Por ejemplo, una población de ácido nucleico que es representativa de una fuente deseada (por ejemplo, cerebro humano adulto) se divide en el número mínimo de grupos en los que puede utilizarse un procedimiento de investigación deseado para detectar o agotar un gen objetivo y que puede distribuirse en una sola placa de múltiples pocillos. Las matrices pueden ser de una suspensión acuosa de una población de ácido nucleico que puede obtenerse de una fuente de ARNm deseada, que comprende: una placa de múltiples pocillos que contiene una pluralidad de pocillos individuales, cada pocillo individual que contiene una suspensión acuosa de un contenido diferente de una población de ácido nucleico. Pueden encontrarse ejemplos de matrices, sus usos y su implementación en las patentes de los Estados Unidos Núms. 6,329,209, 6,329,140, 6,324,479, 6,322,971, 6,316,193, 6,309,823, 5,412,087, 5,445,934, y 5,744,305.

Las micromatrices son conocidas en la técnica y consisten en una superficie a la que las sondas que se corresponden en secuencia con productos génicos (por ejemplo, ADNc, ARNm, ARNc, polipéptidos y sus fragmentos) pueden hibridarse o unirse específicamente en una posición conocida. En una modalidad, la micromatriz es una matriz (*es decir*, una matriz) en la que cada posición representa un sitio de unión discreto para un producto codificado por un gen (por ejemplo, una proteína o ARN), y en el que están presentes sitios de unión para productos de la mayoría o casi todos los genes en el genoma del organismo. En una modalidad preferida, el "sitio de unión" (en adelante, "sitio") es un ácido nucleico o análogo de ácido nucleico con el que un ADNc afín particular puede hibridarse específicamente. El ácido nucleico o análogo del sitio de unión puede ser, *por ejemplo*, un oligómero sintético, un ADNc de longitud completa, un ADNc de longitud inferior a la completa o un fragmento de gen.

El ácido nucleico o el análogo están unidos a un soporte sólido, que puede estar hecho de vidrio, plástico (*por ejemplo*, polipropileno, nylon), poliacrilamida, nitrocelulosa u otros materiales. Un método preferido para unir los ácidos nucleicos a una superficie es mediante impresión en placas de vidrio, como se describe generalmente por Schena *et al.*, 1995a. Ver también DeRisi y otros, 1996; Shalon y otros, 1996. También pueden usarse otros métodos para hacer micromatrices, *por ejemplo*, mediante enmascaramiento (Maskos y otros, 1992). En principio, podría utilizarse cualquier tipo de matriz, por ejemplo, manchas de puntos en una membrana de hibridación de nylon (ver Sambrook y otros, 2001, que se incorpora en su totalidad para todos los fines), aunque, como reconocerán aquellos expertos en la técnica, se preferirán matrices muy pequeñas porque los volúmenes de hibridación serán más pequeños.

También se considera el uso de un biochip, que implica la hibridación de una molécula marcada o grupo de moléculas con los objetivos inmovilizados en el biochip.

### III. Kits

En modalidades adicionales de la invención, se proporciona un kit para el aislamiento de moléculas de ARN pequeño, tales como miARN y siARN de una muestra, particularmente una muestra celular. Cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción puede estar comprendida en un kit. En un ejemplo no limitante, los reactivos para lisar células, extraer ARN del lisado celular y/o analizar o cuantificar el ARN obtenido pueden incluirse en un kit. Por lo tanto, los kits comprenderán, en medios de envase adecuados, cualquiera de los reactivos descritos en la presente descripción. También puede incluir uno o más tampones o soluciones, tales como tampón de lisis, tampón de extracción, soluciones para añadir alcohol, solución de elución, solución de lavado y otros componentes para aislar el ARN deseado, como una estructura de captura. En algunas modalidades, existen kits para aislar moléculas de ARN pequeño que comprenden: a) fenol-cloroformo ácido; b) Tampón de lisis/unión (basado en GuSCN); c) aditivo de homogenado de miARN (acetato de sodio 2 M, pH 4, que se añadirá en 0,1 vol antes de la extracción con PC); d) solución de lavado de miARN #1 (GuSCN 1,6 M en etanol al 70 %); e) Solución de lavado #2/3 (etanol al 80 %, NaCl 0,1 M, EDTA 4,5 mM, TrisHCl 10 mM, pH 7,5); f) Solución de elución (EDTA 0,1 mM, pH 8); g) tampón de carga de gel II; h) tubos de recolección; i) Cartuchos de filtro.

Los componentes de los kits pueden envasarse en medios acuosos o en forma liofilizada. El medio contenedor de los kits generalmente incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otro medio contenedor, en el que puede colocarse un componente, y preferentemente, alícuotas adecuadas. Cuando hay más de un componente en el kit (pueden empacarse juntos), el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro contenedor adicional en el que los componentes adicionales pueden colocarse por separado. Sin embargo, varias combinaciones de componentes pueden estar comprendidas en un vial. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener el ARN y cualquier otro recipiente de reactivo en confinamiento cerrado para venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico inyectados o moldeados por soplado en los que se retienen los viales deseados. Cuando los componentes del kit se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, prefiriéndose particularmente una solución acuosa estéril.

Sin embargo, los componentes del kit pueden proporcionarse como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo puede reconstituirse mediante la adición de un disolvente adecuado. Se prevé que el disolvente también pueda proporcionarse en otro medio contenedor. El medio contenedor generalmente incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa y/u otro medio contenedor, en el que se colocan las formulaciones de ácido nucleico, preferentemente, asignadas de manera adecuada. Los kits también pueden

comprender un segundo medio contenedor para contener un tampón y/u otro diluyente estéril, farmacéuticamente aceptable.

5 Dichos kits también pueden incluir componentes que preservan o mantienen el ARN o que protegen contra su degradación. Dichos componentes pueden estar libres de ARNasa o proteger contra ARNasas. Dichos kits generalmente comprenderán, en medios adecuados, recipientes distintos para cada reactivo o solución individual.

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

10

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar modalidades preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y por lo tanto pueden considerarse modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente descripción, apreciar que pueden hacerse muchos cambios en las modalidades específicas que se describen y aún obtener un resultado similar o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

15

20

#### Ejemplo 1

Preparación de lisado celular y aislamiento de ARN

25

El siguiente procedimiento proporciona la base para la invención y en los ejemplos se hace referencia al procedimiento del kit de aislamiento de miARN Ambion (AMIK).

30

El tejido congelado se molió bajo nitrógeno líquido hasta un polvo fino. El tampón de lisis (GuSCN 4 M; beta-mercaptoetanol 0,1 M; N-lauroil sarcosina al 0,5 %; citrato de Na 25 mM, pH 7,2) se añadió a este polvo en un recipiente apropiado en una proporción de 1 ml por cada gramo de polvo de tejido. Esto se homogeneizó mediante el uso de medios mecánicos para crear un lisado de tejido finamente disperso. Se añadió un décimo de volumen de una solución de acetato de Na 2 M (pH 4,0) y se mezcló completamente, con la adición de 0,1 ml por cada ml. El lisado se procesó inmediatamente (sin extracción orgánica) o se colocó en hielo para procesarlo en 15 minutos.

35

El procesamiento implicó la adición a la suspensión de un volumen igual de fenol-cloroformo ácido (5:1, equilibrado con solución acuosa a pH 4,5), seguido de una agitación vigorosa durante 30-60 segundos (agitando en vórtex o agitando). El fenol-cloroformo y las fases acuosas se separaron después por centrifugación a 16 000 xG durante 5 minutos, o hasta que se obtuvo una interfaz clara. La fase acuosa se eliminó por aspiración, evitando retirar cualquiera de las interfaces entre fases. Esta fase acuosa, que contenía el ARN de la muestra, se convirtió en una concentración de etanol al 55 % mediante la adición de 1,22 volúmenes de etanol.

40

45

Inmediatamente después de mezclar, la muestra se aplicó directamente a una columna de fibra de vidrio, como se usa en un kit RNAqueous® (Ambion). La muestra se pasó a través del filtro por centrifugación a, ..., 12 000 xG durante 1 minuto, después el filtro se lavó por el paso sucesivo de tres soluciones de lavado a través de él. El tubo de recolección se vació entre cada lavado, y cada lavado se pasó completamente a través del filtro a -12 000 xG durante 1 minuto o más, si fuera necesario para pasar todo el fluido. El primer lavado fue con 0,5 ml de isocianato de guanidinio M (GuSCN) 1,6 / etanol al 70 %, los dos últimos con alcohol al 80 % / NaCl 0,1 M / EDTA 4,5 mM / TrisHCl 10 mM, pH 7,5. Después de pasar el último lavado a través del filtro, el filtro se volvió a centrifugar sobre un tubo de recolección vacío para eliminar todo rastro de etanol.

50

La muestra se eluyó luego del filtro con 100 µl de EDTA 0,1 mM, pH 8,0, que se aplicó directamente al filtro a temperatura ambiente y se centrifugó en un tubo de recolección nuevo. La Figura 1 y la Figura 2 muestran las diferencias entre las preparaciones realizadas a partir de tres tejidos diferentes, corazón, cerebro e hígado, sin y con la etapa de extracción previa. Puede verse que, en cualquier circunstancia, una porción sustancial del miARN let-7 se captura con etanol al 55 %.

55

#### Ejemplo 2

Detección de miARN a través de la transferencia northern

60

Para cada muestra de ARN, se combinaron 5 µl con 5 µl de Gel de carga teñido II (Ambion). Antes de cargar en un gel de acrilamida desnaturalizante, estas muestras se calentaron a 95 °C durante 2-5 minutos. El gel estándar era 15 % de acrilamida (relación monómero: bis de 19:"1), urea 7 M, tamponada con TBE (Tris-Borate-EDTA, Peacock y Dingman, 1967). El gel se procesó previamente de forma rutinaria a 300-450 V durante 30 minutos antes de cargar las muestras en tampón de muestra, que también contenía tintes de seguimiento de azul de bromofenol y xileno cianol. La electroforesis se realizó a 300-450 V durante 45-60 min, o hasta que el colorante de seguimiento de azul de bromofenol estaba en el cuadrante inferior del gel.

65

Después de la electroforesis, el aparato de gel se desmontó y el gel se transfirió por electrodeposición a una membrana de nylon Bright-Star-Plus (Ambion). Este procedimiento puede realizarse en un aparato semiseco mediante el uso de una pila de tres hojas de papel de filtro Whatman (3 MM) empapado en TBE 0,25 x encima y debajo del empapado de gel a 200-400 mA por al menos 0,2 A-hr. Extender este tiempo no pierde muestra. Después de la transferencia, la membrana se mantuvo húmeda y reticulada por UV mediante el uso de un dispositivo de reticulación comercial (Stratalinker™, Stratagene, Inc.)

La membrana se sondeó para el miARN específico, *let-7* (Pasquinelli y otros, 2000) mediante el uso de una sonda antisentido que estaba marcada en el extremo 5' por la quinasa polinucleótido T4.

En algunos casos, otros ARN pequeños ubicuos también se sondearon con oligodesoxirribonucleótidos antisentido al mismo tiempo. Estos incluyeron el snRNA U2 (núm. de acceso X07913, complementario a las posiciones 28-42 del snRNA U2 de 187 nt de ratón), el snRNA U6 (núms. de acceso V00853 o 100648, complementario a las posiciones 83-103 del ARN de 106 nt de ratón), y U43 snoRNA (núm. de acceso AJ238853, complementario a las posiciones 20-37 del ARN humano de 62 nt U43). Todos estos se hibridan fácilmente entre ratones y humanos. Se siguió el procedimiento de Patterson y Guthrie (1987) para la hibridación previa, hibridación y lavado (Patterson y Guthrie, 1987). Las transferencias se hibridaron previamente en {6 x SSC, 10 x solución de Denhardt, 0,2 % SDS} a 65 °C durante al menos una hora, después se añadieron 10 ml de solución de hibridación {6XSSC, 5X Denhardt's, 0,2 % SDS} que contenía sondas de oligodesoxinucleótidos antisentido *let-7*, U43, U6 y/o U2 marcadas en el extremo 5' (U43, U6, *let-7* mínimo = 400 000 cpm; U2 mínimo = 200 000 cpm) y se habían filtrado (poro de 0,45µm) antes de su uso. La hibridación fue durante 8-24 h con agitación a temperatura ambiente. Después de la hibridación, las soluciones se eliminaron y la transferencia se lavó 3 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente con solución de lavado: {6 x SSC, SDS al 0,2 %}, luego una vez con la misma solución de lavado a 42 °C. Después del lavado final, las manchas se envolvieron en una envoltura de plástico y se expusieron a una pantalla de phosphorimager (Molecular Dynamics) según las instrucciones del fabricante para cuantificar la cantidad de señal presente en cada banda. La cantidad de *let-7* en la fracción eluida frecuentemente se comparó con la del flujo continuo, al proporcionar una cifra de "% unido", como se muestra en la Figura 1, la Figura 2, la Figura 3, la Figura 4, la Figura 5, y la Figura 6. Para otras cifras, la cantidad de *let-7* se comparó con otras muestras o se dio como absoluta. Ver ejemplos específicos.

Para algunos de los ejemplos, se realizó una segunda transferencia Northern a partir de un sistema de gel de agarosa para buscar la presencia de especies de ARN más grandes. Estos fueron ARNm para los genes expresados ubicuamente ciclofilina (=peptidilprolina isomerasa o PPI), GAPDH y/o -actina. Los geles de agarosa se corrieron y se secaron mediante el uso del kit NorthernMax Gly como se describe por Ambion. Para sondear la transferencia, se transcribieron sondas de ARN antisentido de plantillas proporcionadas por Ambion (números de catálogo 7675, 7431, 7423) y se hibridaron en Ultrahyb (Ambion), mediante el uso de todos los protocolos como se especifica en la literatura de Ambion.

### Ejemplo 3

#### Enriquecimiento de moléculas de ARN pequeño

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

Aproximadamente medio gramo de tejido de ratón congelado (cepa Swiss-Webster, 6-12 semanas de edad) se trituró a polvo fino bajo nitrógeno líquido en un mortero. Este polvo se dispersó posteriormente en tampón de lisis estándar (GuSCN 4 M; beta-mercaptoetanol 0,1 M; Nlauroil sarcosina al 0,5 %; citrato de Na 25 mM, pH 7,2) mediante el uso de un homogeneizador de rotor-estator con un generador de 7 mm a alta velocidad durante -30 seg.

Después de la homogeneización, se extrajeron 0,6 ml del lisado para este estudio. Se añadieron 60 µl de acetato de Na 2 M, pH 4,0, al lisado, seguido inmediatamente por 0,6 ml de fenol-cloroformo ácido. Después de 30 segundos de agitación vigorosa, la fase acuosa se separó por centrifugación a 16 000 xG durante 5 min. Se usaron cuatro alícuotas de 100 µl de esta fase acuosa en cuatro separaciones separadas. Las cuatro alícuotas tenían 100 µl de etanol al 40 %, 50 %, 60 % y 70 %, y después se pasaron a través de filtros de fibra de vidrio como en el procedimiento RNAqueous (Ambion). Las soluciones de etanol al 20 %, 25 %, 30 % y 35 % que pasaron a través de estos filtros (el flujo continuo) se ajustaron luego a una concentración final de etanol al 55 % mediante la adición de 156, 133, 111 y 88,9 µl de etanol, respectivamente. Las cuatro muestras se pasaron sobre columnas de filtro de fibra de vidrio separadas. Los filtros se lavaron después con 0,7 ml de isocianato de guanidinio (GuSCN) 4 M / etanol al 70 %, seguido de dos lavados con 0,5 ml de alcohol al 80 % / NaCl 0,1 M / EDTA 4,5 mM / TrisHCl 10 mM, pH 7,5. Después de pasar cada lavado a través del filtro, el tubo de recolección se vació y reemplazó. Cada lavado se pasó a través del filtro por centrifugación según el protocolo RNAqueous (Ambion). El filtro se vuelve a centrifugar sobre un tubo de recolección vacío para eliminar todo rastro de etanol. La muestra se eluyó del filtro con 100 µl de EDTA 0,1 mM, pH 8,0, que se aplicó directamente al filtro a temperatura ambiente y se centrifugó en un tubo de recolección nuevo. Las muestras se examinaron mediante transferencia Northern, como se describe, y se compararon en el mismo gel con otra muestra que se había preparado a partir de un volumen igual del mismo lisado mediante el uso del kit Totally RNA™ de Ambion.

Mediante el uso de las transferencias Northern tanto de agarosa como de acrilamida, se analizaron los niveles de las especies de ARN B-actina, GAPDH, U2 y let-7 presentes en el cerebro, corazón, hígado y riñón de ratón congelados en el material eluido de la primera y segunda columna para determinar la fracción recuperada en este último. Estos se muestran en la Figura 7. El ARNm más grande se elimina por completo de la fracción enriquecida con ARN pequeño.

La Figura 8 muestra el enriquecimiento relativo de ARN pequeños mediante el uso del método descrito en el Ejemplo 3 en comparación con el método de aislamiento de ARN estándar. Aquí, se homogeneizaron muestras de cuatro tejidos comunes de ratón: cerebro, corazón, riñón e hígado en tampón de lisis estándar como se describe en el Ejemplo 1. Después de la homogeneización, se tomaron dos alícuotas iguales de cada lisado. Uno se sometió a un procedimiento preparativo de ARN estándar mediante el uso de extracción orgánica y precipitación de etanol, al usar 4 volúmenes de etanol para precipitar para asegurar la recuperación completa de pequeñas especies de ARN. La otra alícuota se sometió al procedimiento de enriquecimiento como se describe en el Ejemplo 3. La concentración de ARN en cada muestra final se cuantificó mediante el uso de absorbancia a 260 nm. Se separó un microgramo de cada muestra en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 15 %. Este gel se sometió a electrodeposición y la transferencia Northern resultante se sondeó para let-7 y U2 como se describe en el Ejemplo 2. La cantidad de cada sonda hibridada con el área apropiada de la transferencia se usó para determinar las cantidades relativas de cada ARN en las muestras de 1 µg. La señal para las muestras enriquecidas se dividió por la señal para las muestras estándar para proporcionar los factores de enriquecimiento dados en la Figura 8. El enriquecimiento en este caso fue de 3,5 a 8 veces en masa.

#### Ejemplo 4

##### Comparación\_a\_extracción\_estándar\_orgánica\_y\_precipitación\_con\_etanol

Las muestras de dos hígados de ratón que se habían almacenado congelados a -80 °C se molieron en un polvo fino bajo nitrógeno líquido y se homogeneizaron en 10 volúmenes (ml/g) del tampón de lisis estándar (GuSCN 4 M; p-mercaptoetanol 0,1 M; N-lauroil sarcosina al 0,5 %; citrato de sodio 25 mM, pH 7,2) y luego dividido en cuatro alícuotas. Una de las alícuotas se extrajo dos veces con dos soluciones diferentes de fenol-cloroformo como se describe en el protocolo Totally RNATM (Ambion), y las otras tres se sometieron individualmente al procedimiento estándar de AMIK. El ARN granulado del procedimiento Totally RNA™ se redisolvió en 100 µl de EDTA 0,1 mM, pH 8. La elución final para las muestras de AMIK estaba en el mismo volumen y la misma solución. Las muestras se sometieron a electroforesis y a transferencia como se describe en geles de acrilamida al 15% y en gel de agarosa al 1%. Las transferencias apropiadas se sondearon para p-actina, GAPDH, U2, U43 y let-7 como se describe. Las recuperaciones de cada ARN en relación con el procedimiento de extracción se resumen en el gráfico de la Figura 9. El rendimiento de la invención generó cantidades de ARN pequeños iguales o mayores que el procedimiento de extracción orgánica.

#### Ejemplo 5

##### Comparación con la purificación del filtro de fibra de vidrio estándar

Las muestras de hígado de ratón congelado y cerebro de ratón congelado almacenadas a -80 °C se homogeneizaron en tampón de lisis estándar en una proporción de tejido de 1g a 10 ml de tampón. Después de la homogeneización, todos los lisados se almacenaron en hielo hasta que se aplicó uno de los dos procedimientos de procesamiento.

Comenzando con seis partes alícuotas de 100 µl de cada lisado original, se procesaron 2 muestras por el método RNeasy de Qiagen, siguiendo su mini procedimiento precisamente después de la adición de 250 µl del Tampón de lisis de tejidos (TLB) suministrado con el kit. Las cuatro alícuotas finales de cada tejido se prepararon mediante el método AMIK descrito anteriormente. Todas las muestras se eluyeron en 100 µl de agua. Para el análisis, se analizaron 5 µl de cada una de las muestras mediante electroforesis en geles de acrilamida al 15 % y transferencia, y se sondearon las transferencias para let-7, U43 y U2. Después de usar la placa de fósforo fotoestimulable para cuantificar las bandas, se compararon los niveles de señal entre los métodos para cada ARN pequeño. Estos resultados se muestran en la Figura 10. Esta invención fue mucho más eficiente para capturar todos los ARN pequeños que el procedimiento estándar de extracción con filtro de fibra de vidrio. Esta incapacidad para capturar moléculas pequeñas con un procedimiento estándar también se ve afectada en cierta medida por el tipo de tejido, ya que la captura del lisado hepático parece ser más eficiente. Esta observación es consistente con nuestras observaciones mediante el uso del lisado crudo (Figura 1).

#### Ejemplo 6

##### Eficiencia de la recuperación de ARN pequeño a partir de lisado crudo en tres tejidos diferentes.

Las muestras de corazón, hígado y cerebro congelados de ratones (cepa Swiss-Webster, 6-12 semanas de edad) se pulverizaron cada una bajo nitrógeno líquido para dar un polvo. Este polvo se pesó congelado y se añadieron 10 ml de tampón de lisis por gramo de tejido (los pesos oscilaron entre 200 y 500 mg). Las muestras se homogeneizaron con un homogeneizador rotor-estator inmediatamente después de la adición, luego se dividieron en 8 alícuotas de 100 µl en hielo. A estos, se añadió etanol absoluto 53,9, 66,7, 81,8, 100, 122,2, 150, 185,7 y 233,3 µl para obtener concentraciones finales de etanol al 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 y 70 %. Cada uno de estos se pasó sobre una columna de filtro de fibra de vidrio como se encuentra en el kit RNAqueous® (Ambion), y se recogió el flujo continuo de este. El ARN en el flujo continuo se



extrajo con fenol-cloroformo y se precipitó con etanol con cuatro volúmenes de etanol para asegurar la precipitación de los ARN pequeños. Después de granular el ARN por 30 minutos de centrifugación a 16 000 xG, el sedimento se lavó una vez con etanol al 80 % y luego se redisolvió en 60 µl de EDTA 0,5 mM, pH 8,0. Los filtros se lavaron tres veces, una vez con 0,7 ml de isocianato de guanidinio (GuSCN) 4 M / etanol al 70 %, seguido de dos lavados con 0,5 ml de alcohol al 80 % / NaCl 0,1 M / EDTA 4,5 mM / TrisHCl 10 mM, pH 7,5. Cada lavado se realizó como anteriormente, por centrifugación a 12 000 xG durante 1 minuto o tiempo suficiente para limpiar todo el líquido a través del filtro, con tubos de recolección vacíos después de cada uno. Las muestras se eluyeron mediante el uso de 2 adiciones separadas de 30 µl de EDTA 0,1 mM, pH 8,0 que se aplicó directamente al filtro después del precalentamiento a 95 °C, cada una se centrifugó a través del mismo tubo de recolección fresco. Cantidades iguales (5 µl) tanto del filtro unido y eluido como del flujo continuo se analizaron mediante la transferencia Northern como se describió anteriormente. Dado que la unión y el flujo continuo estaban en la misma transferencia, la cantidad de ARN let-7 podría calcularse para cada concentración de etanol con cada tejido. Estos datos se grafican en la Figura 1 y la Figura 2. Es evidente que el comportamiento de unión para cada tejido fue diferente, en términos de la concentración de etanol requerida para inmovilizar todo el ARN let-7 en el filtro de fibra de vidrio. Sin embargo, el máximo parece lograrse para todos los tejidos con etanol al 55 %.

15

## Ejemplo 7

## Purificación de células cultivadas

Las células se recolectaron de dos líneas, HEK-293 (derivadas de riñón embrionario humano) o células HeLa (cuello uterino humano), de frascos de cultivo mediante tripsinización. Después de contar, estas células se añadieron a un nivel de aproximadamente un millón cada una a dos tubos de microcentrífuga de 2 ml y se sedimentaron por centrifugación. Se retiró el sobrenadante y el contenido granulado de cada tubo se resuspendió en 700 µl de tampón de lisis como se describe en el procedimiento estándar (Ejemplo 1). Las células se lisaron mediante la agitación del tubo vigorosamente durante 30 segundos en lugar de usar un aparato de homogeneización. Para cada conjunto, se hizo inmediatamente un conjunto de aproximadamente etanol al 55 % mediante la adición de 860 µl de etanol absoluto. La otra alícuota se procesó como se indica en el procedimiento estándar: se acidificó mediante la adición de 70 µl de acetato de sodio 2 M tamponado a pH 4, seguido de extracción con 700 µl de fenol-cloroformo ácido, después se añadieron 860 µl de etanol para recuperar la fase superior. Ambas muestras se pasaron a través de filtros de fibra de vidrio, se lavaron tres veces y se eluyeron con 100 µl de EDTA 0,1 mM, pH 8 como se describió anteriormente. Se sometieron a electroforesis cinco µl de cada eluato en un gel de acrilamida al 15 % y se transfirió para ensayo Northern U2 y let-7. Los niveles de cada uno, según se determina a partir de la placa de fósforo fotoestimulable de la transferencia, se muestran en la Figura 11. La recuperación de ARN pequeños de todos los métodos parece buena, pero la recuperación de las células HeLa se mejoró mediante el procedimiento de extracción previa.

35

## Ejemplo 8:

## Pre-extracción mediante el uso de diferentes condiciones de sal.

El hígado de ratón congelado se homogeneizó en tampón de lisis a una concentración normal de I.IX sin citrato de Na (GuSCN 4,4 M; f3-mercaptoetanol 0,11 M; N-lauroil sarcosina al 0,55 %). Inmediatamente después de la homogeneización, se extrajeron dos alícuotas de 1,8 ml de este lisado y se añadieron a cada una 200 µl de citrato de sodio 0,25 M a pH 7,2 o 4,5. Se extrajeron cuatro alícuotas de 400 µl de estas porciones de 2 ml, y se añadieron a cada una de estas 40 µl de agua NaOOCCH<sub>3</sub> (acetato de sodio, pH 4,5), 1M, 2M o 3M, para dar una [NaOOCCH<sub>3</sub>] final de cero y aproximadamente 0,1, 0,2 y 0,3 M. Las muestras se extrajeron cada una con 440 µl de fenol-cloroformo ácido y se recuperaron 300 µl de la fase superior. Esto se hizo en etanol al 55 % mediante la adición de etanol absoluto y se purificó sobre una columna de filtro de fibra de vidrio como se describe en el procedimiento estándar. Cada muestra se aplicó a un gel de acrilamida al 15 %, se secó y se sondeó como se describió anteriormente. Los niveles de U2, U43 y let-7 determinados para cada uno se muestran en el gráfico de la Figura 12. El rendimiento parece ser aproximadamente equivalente a ambos pH (aunque U43 fue variable), pero el mejor rendimiento aparece en presencia de NaOOCCH<sub>3</sub> 0,2 M a ambos pH.

50

## Ejemplo 9:

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

El hígado de ratón se homogeneizó en tampón de lisis estándar y se extrajo con fenol-cloroformo ácido. El lisado extraído se dividió en dos porciones. Se añadió un volumen igual a cada uno de los cuales consistían en tampón de lisis sin guanidinio (P-mercaptoetanol 0,1 M; N-lauroil sarcosina al 0,5 %; citrato de sodio 25 mM, pH 7,2) o tampón de lisis con GuSCN 2 M (GuSCN 2 M; Beta-mercaptoetanol 0,1 M; N-lauroil sarcosina al 0,5 %; citrato de sodio 25 mM, pH 7,2), al crear soluciones con una [GuSCN] final de 2 M y 3 M, respectivamente. Después se dividieron en 18 alícuotas de 200 µl cada una, y las adiciones de etanol se hicieron de una de las dos maneras. El primer método fue la adición de 22,2, 35,3, 50, 66,7, 85,7, 107,7, 133,3 y 200 µl de etanol absoluto. Esto dio una concentración final de etanol de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 %, con las correspondientes concentraciones finales de guanidinio que disminuyeron con el aumento de etanol. (2,7, 2,55, 2,4, 2,25, 2,1, 1,95, 1,8, 1,65 y 1,5 M para una concentración inicial de 3 M; 1,8, 1,7, 1,6, 1,5, 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 y 1,0 M para una concentración inicial de 2 M). El segundo método añadió volúmenes iguales de soluciones de

65

etanol en agua de 20-100 % para dar las mismas concentraciones finales de etanol, pero con concentraciones de guanidinio consistentes de 1,5 o 1 M dentro de cada serie. Después de la adición de etanol, cada una de estas muestras se unió al filtro de fibra de vidrio y se siguió el procedimiento estándar. Las muestras se analizaron en geles de acrilamida y agarosa para analizar la presencia de j)-actina, GAPDH, PPI (ciclofilina), U2 y let-7. El comportamiento de unión de cada especie a medida que aumentaba la concentración de etanol se graficó para las cuatro series en la Figura 3, la Figura 4, la Figura 5, y la Figura 6. A partir de estas series, se demuestra que existen diferencias en el comportamiento de las especies de ARN de diferentes tamaños, de manera que al manipular la concentración de sal y etanol puede lograrse la unión de intervalos de tamaño de moléculas de ARN bastante restringidos, lo que indica que pueden realizarse procedimientos de fraccionamiento por tamaño más refinados.

Ejemplo 10:

Uso de ARN pequeños para sondear micromatrices

Los ARN pequeños enriquecidos mediante el uso de los procedimientos descritos en los Ejemplos 3 o 9 pueden usarse en las tecnologías de micromatriz descritas en la especificación. En un ejemplo, las sondas fijadas a la micromatriz pueden contener secuencias específicamente diseñadas para capturar miARN o siARN conocidos. Alternativamente, las sondas fijadas a la micromatriz podrían ser secuencias de ARNm para buscar posibles objetivos biológicos *in vivo* para miARN o siARN. La pequeña población de moléculas de ARN podría marcarse radiactivamente o con etiquetas que son reactivas a la luz o capaces de unirse a moléculas secundarias capaces de reaccionar con la luz. Estos marcadores directos o indirectos podrían unirse mediante medios enzimáticos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como: eliminación del fosfato 5' con fosfatasa seguido de la adición de fosfato modificado con quinasa de polinucleótido; o adición al extremo 3' de uno o varios nucleótidos marcados con ligasa de ARN o polimerasas tales como la polimerasa poli-A.

Todas las composiciones y/o métodos descritos y reivindicados en la presente descripción pueden hacerse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente descripción. Si bien las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de modalidades preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en la presente descripción sin apartarse del concepto de la invención. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están relacionados química y fisiológicamente pueden sustituirse por los agentes descritos en la presente descripción, aunque se obtendrían los mismos resultados o resultados similares.

Referencias

Patente de los Estados Unidos 4,683,195

Patente de los Estados Unidos 4,683,202

Patente de los Estados Unidos 4,800,159

Patente de los Estados Unidos 4,883,750

Patente de los Estados Unidos 5,155,018

Patente de los Estados Unidos 5,234,809

Patente de los Estados Unidos 5,412,087

Patente de los Estados Unidos 5,445,934

Patente de los Estados Unidos 5,514,545

Patente de los Estados Unidos 5,545,522

Patente de los Estados Unidos 5,744,305

Patente de los Estados Unidos 5,843,650

Patente de los Estados Unidos 5,846,709

Patente de los Estados Unidos 5,846,783

Patente de los Estados Unidos 5,849,497

Patente de los Estados Unidos 5,849,546

- Patente de los Estados Unidos 5,849,547
- Patente de los Estados Unidos 5,858,652
- 5 Patente de los Estados Unidos 5,866,366
- Patente de los Estados Unidos 5,912,148
- Patente de los Estados Unidos 5,916,776
- 10 Patente de los Estados Unidos 5,916,779
- Patente de los Estados Unidos 5,922,574
- 15 Patente de los Estados Unidos 5,928,905
- Patente de los Estados Unidos 5,928,906
- Patente de los Estados Unidos 5,932,451
- 20 Patente de los Estados Unidos 5,935,825
- Patente de los Estados Unidos 5,939,291
- 25 Patente de los Estados Unidos 5,942,391
- Patente de los Estados Unidos 5,945,525
- Patente de los Estados Unidos 5,990,302
- 30 Patente de los Estados Unidos 6,043,354
- Patente de los Estados Unidos 6,110,363
- 35 Patente de los Estados Unidos 6,180,778
- Patente de los Estados Unidos 6,309,823
- Patente de los Estados Unidos 6,316,193
- 40 Patente de los Estados Unidos 6,322,971
- Patente de los Estados Unidos 6,324,479
- 45 Patente de los Estados Unidos 6,329,140
- Patente de los Estados Unidos 6,329,209
- 50 Solicitud de patente de los Estados Unidos 200310104468
- Boom y otros, *J. Clin. Microbial.*, 28 (3):495-503, 1990.
- Carrington y otros, *Science* 301:336-338, 2003.
- 55 Chomczynski y Sacchi, *Anal. Biochem.*, 162 (1):156-159, 1987.
- DeRisi y otros, *Nature Genetics*, 14:457-460, 1996.
- Duggan y otros, *Nat. Genet.*, 21(1):10-14, 1999.
- 60 Efstratiadis y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 73(7):2289-2293, 1976.
- Europea Solicitud 329 822
- 65 Europea Solicitud Núm. 320 308

- Fire y otros, *Nature*, 391(6669):806-811, 1998.
- Fodor y otros, *Biochemistry*, 30(33):8102-8108, 1991.
- 5 Frohman, En: *PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications*, Academic Press, NY, 1994.
- Solicitud GB Núm. 2 202 328
- Gubler y Hoffmann, *Gene*, 25:263-269, 1983.
- 10 Hacia y otros, *Nature Genet.*, 14:441-449, 1996.
- Hamilton y Baulcombe, *Science*, 286(5441):950-952, 1999.
- 15 Higuchi y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 73(9):3146-3150, 1976.
- Innis y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 85(24):9436-9440, 1988.
- Ko y otros, *Plant Mol. Biol.*, 14(2):217-227, 1990.
- 20 Kwoh y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 86:1173, 1989.
- Lagos-Quintana y otros, *Science*, 294(5543):853-858, 2001.
- 25 Land y otros, *Nucleic Acids Res.*, 9(10):2251-2266, 1 981.
- Lau y otros, *Science*, 294(5543):858-862, 2001.
- Lee y Ambros, *Science*, 294(5543):862-864, 2001.
- 30 Lee y otros, *Cell*, 75(5):843-854, 1993.
- Maniatis y otros, *Cell*, 8:163, 1976.
- 35 Maniatis, y otros, En: *Molecular cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1990.
- Maskos y otros, *Nucleic Acids Res.*, 20(7):1679-1684, 1992.
- Ohara y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 86:5673-5677, 1989.
- 40 Okayama y Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 2(2):161-170, 1982.
- Pasquinelli y otros, *Nature*, 408(6808):86-89, 2000.
- 45 Pasquinelli y otros, *Nature*, 408(6808):86-89, 2000.
- Patanjali y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 88(5):1943-1947, 1991.
- Patterson y Guthrie, *Cell*, 49(5):613-624, 1987.
- 50 Solicitud PCT PCT/US87/00880
- Solicitud PCT PCT/US89/01025
- 55 Solicitud PCT WO 86/05815
- Solicitud PCT WO 88110315
- Solicitud PCT WO 89/06700
- 60 Solicitud PCT WO90/06045
- Peacock and Dingman, *Biochemistry*, 6(6):1818-1827, 1967.
- 65 Pease y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 91:5022-5026, 1994.

- Sambrook y otros, En: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
- Schena y otros, Science, 270:467-470, 1995.
- 5 Shalon y otros, Genome Res., 6(7):639-645, 1996.
- Shoemaker y otros, Nature Genetics, 14:450-456, 1996.
- Tang y otros, Genes Dev., 17(1):49-63, 2003.
- 10 Timmons, Mol. Cell., 10(3):435-437, 2002.
- Walker y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 89:392-396 1992.
- 15 Zamore y otros, Cell, 101(1):25-33, 2000

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de enriquecimiento de ARN pequeño a partir de células que comprende: a) lisar las células con una solución de lisis para producir un lisado; b) añadir una solución de alcohol al lisado; c) aplicar el lisado a un soporte sólido; y d) eluir las moléculas de ARN del soporte sólido, en donde la solución de lisis comprende guanidinio a una concentración de entre 2,0 M y 4,0 M, y en donde la cantidad de solución de alcohol añadida al lisado le proporciona una concentración de alcohol de aproximadamente 55 % a 70 %;
- 10 y
- 15 en donde al menos se aíslan aproximadamente 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % de las moléculas de ARN pequeño de aproximadamente 100 nucleótidos o menos en una muestra, o alternativamente en donde el ARN pequeño de aproximadamente 100 nucleótidos o menos en una muestra se enriquece aproximadamente o al menos aproximadamente 3x, en moléculas de ARN pequeño según lo determinado por la masa de moléculas de ARN pequeño en relación con la masa de las moléculas totales de ARN antes de colocar el lisado en el soporte sólido en comparación con después de eluir el ARN del soporte sólido.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde la cantidad de solución de alcohol añadida al lisado le proporciona una concentración de alcohol de aproximadamente 55 % a 60 %.
- 25 3. El método de la reivindicación 1, en donde la cantidad de solución de alcohol añadida al lisado le proporciona una concentración de alcohol de aproximadamente 55 %.
- 30 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el guanidinio es cloruro de guanidinio o isotiocianato de guanidinio.
- 35 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el soporte sólido es un filtro de fibra de vidrio o columna.
- 40 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el método incluye una etapa de extracción de moléculas de ARN pequeño del lisado con una solución de extracción que comprende un disolvente orgánico sin alcohol antes de aplicar el lisado al soporte sólido.
- 45 7. El método de la reivindicación 6, en donde la solución de extracción comprende fenol y/o cloroformo.
- 50 8. El método de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde la solución de alcohol se añade al lisado antes de la extracción con el disolvente orgánico sin alcohol.
- 55 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el soporte sólido se lava con una primera solución de lavado después de aplicar el lisado al soporte.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la solución de lavado comprende un agente caotrópico.
11. El método de la reivindicación 9, en donde el agente caotrópico es guanidinio.
12. El método de la reivindicación 9, en donde la solución de lavado comprende alcohol y guanidinio.
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la solución de lisis comprende fenol.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el número de moléculas de ARN mayores que 200 nucleótidos en masa que permanece en la muestra después de eluir el ARN del soporte sólido no es más que aproximadamente 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0 %.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las moléculas de ARN pequeño incluyen moléculas de miARN, siARN, snARN, snoARN y/o ARNt.

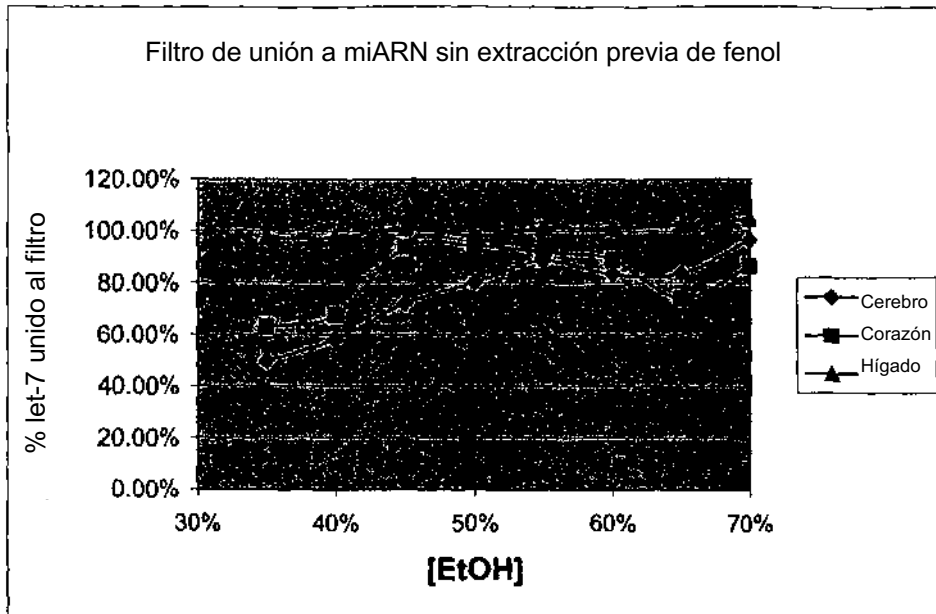


Figura 1

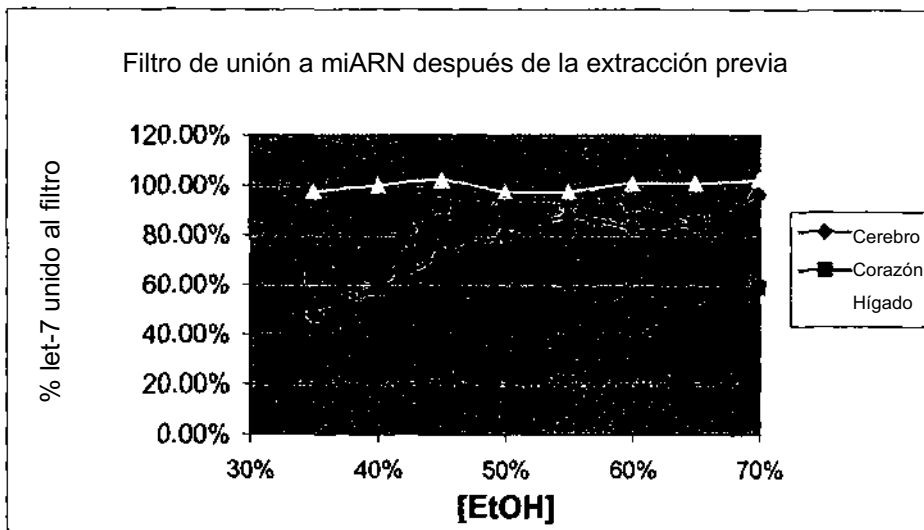


Figura 2

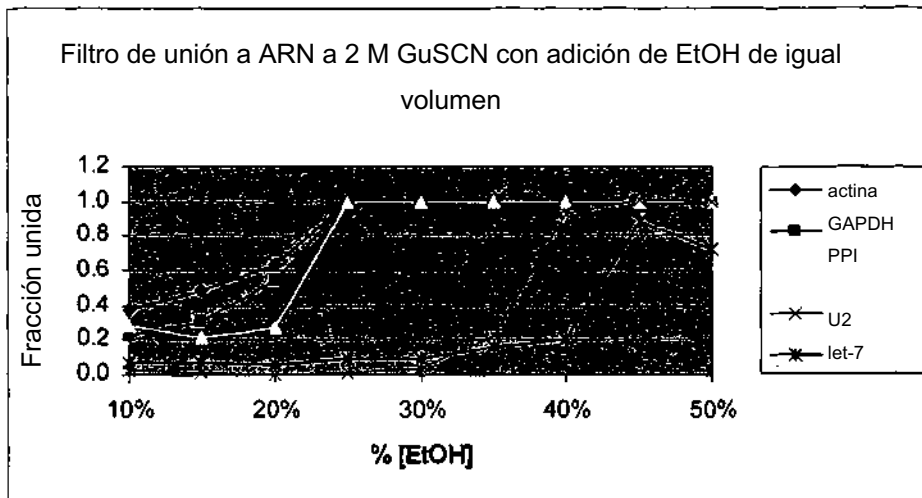


Figura 3

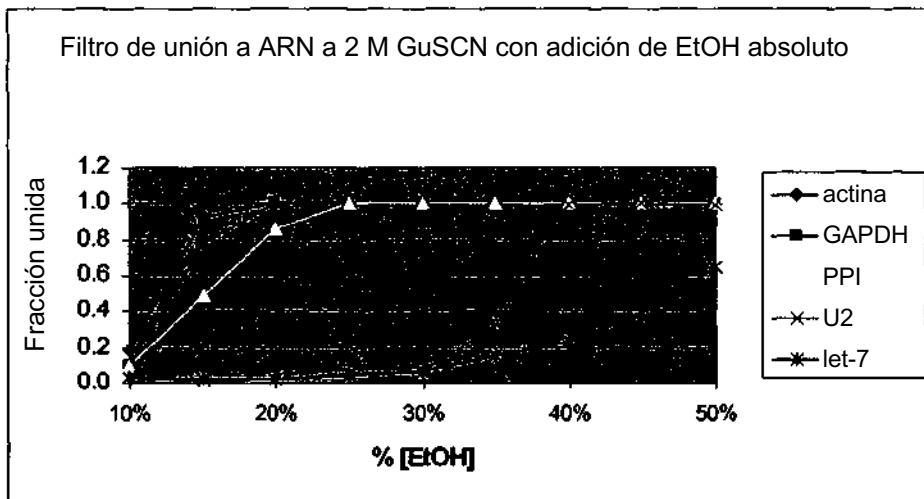


Figura 4



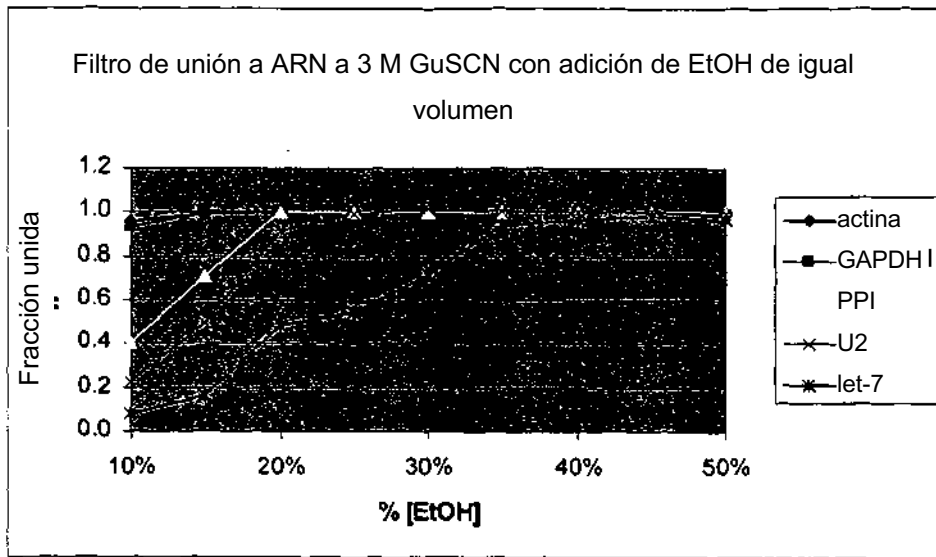


Figura 5

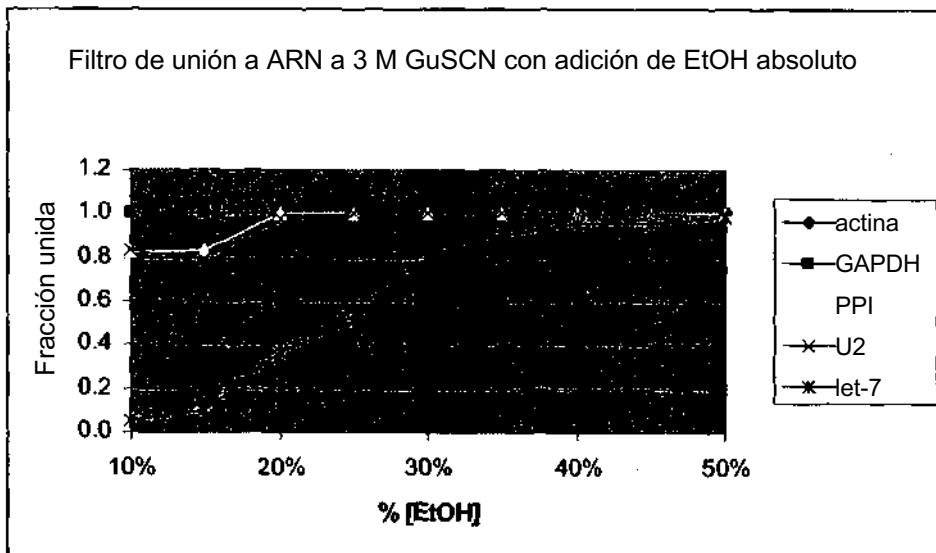


Figura 6

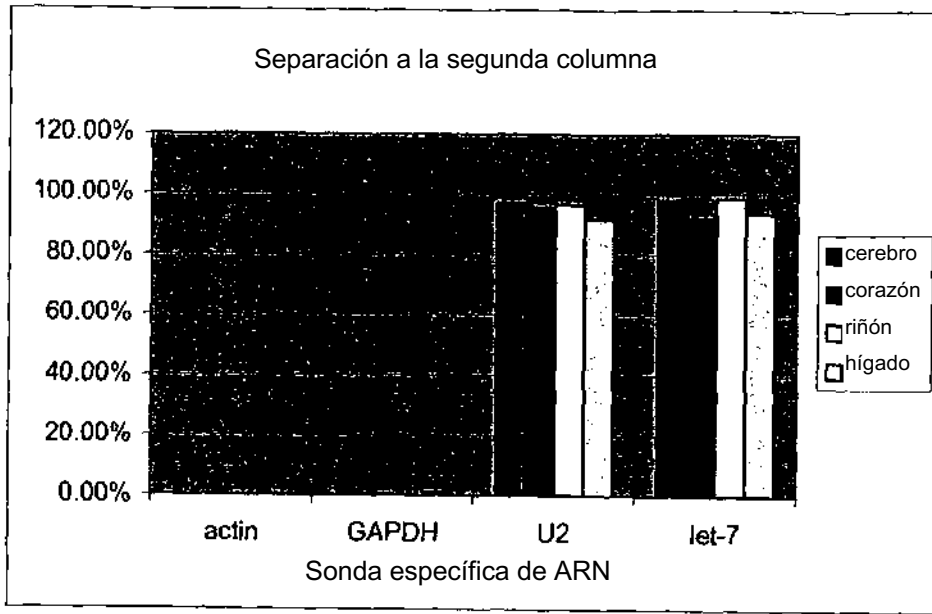


Figura 7

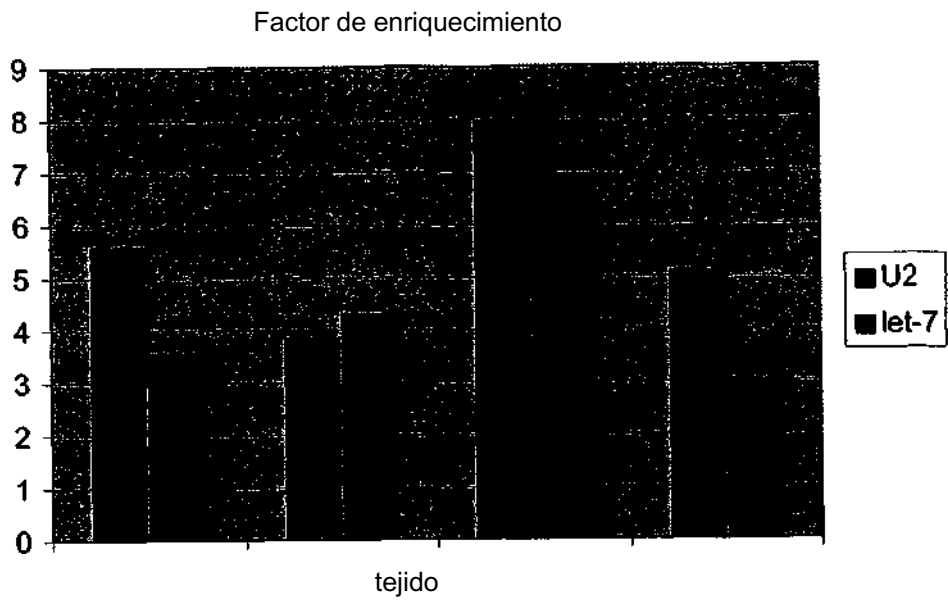


Figura 8

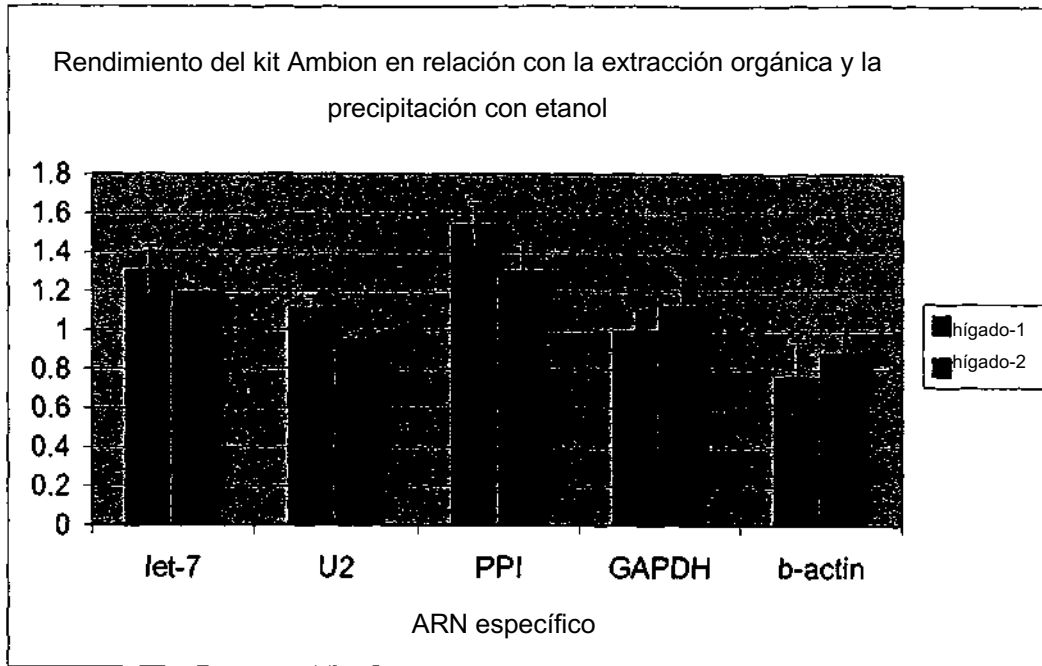


Figura 9

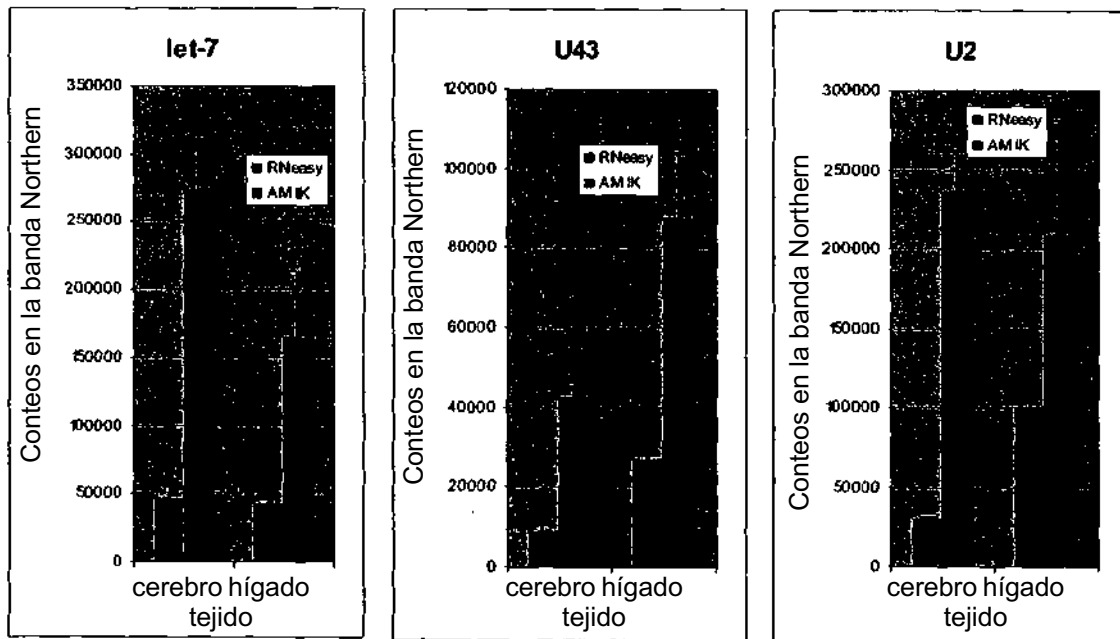


Figura 10

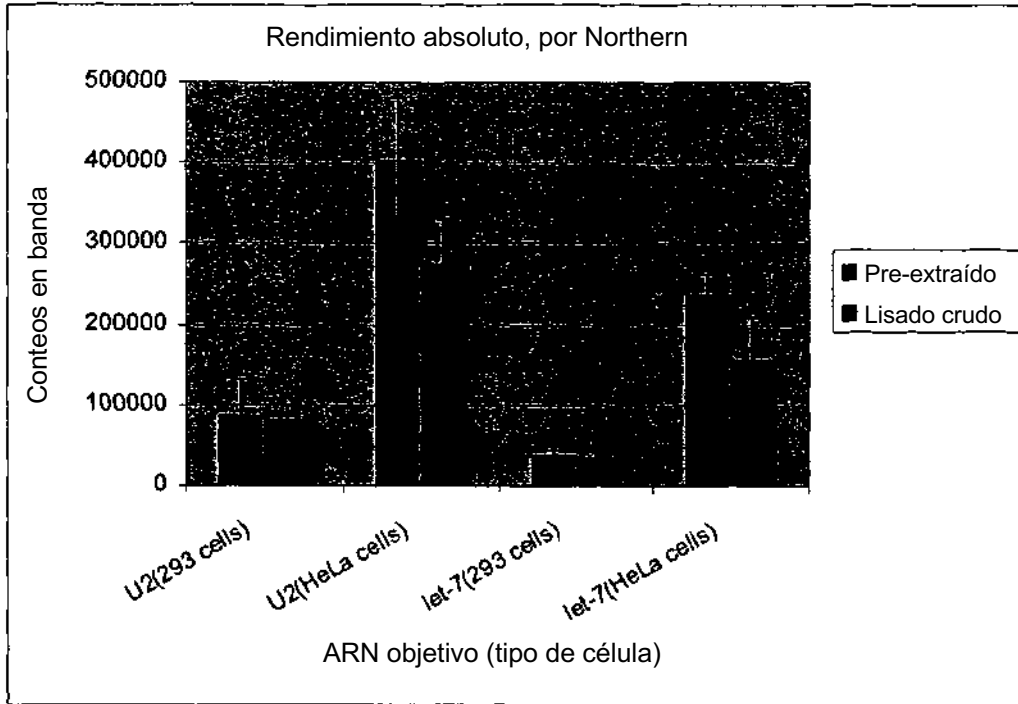


Figura 11

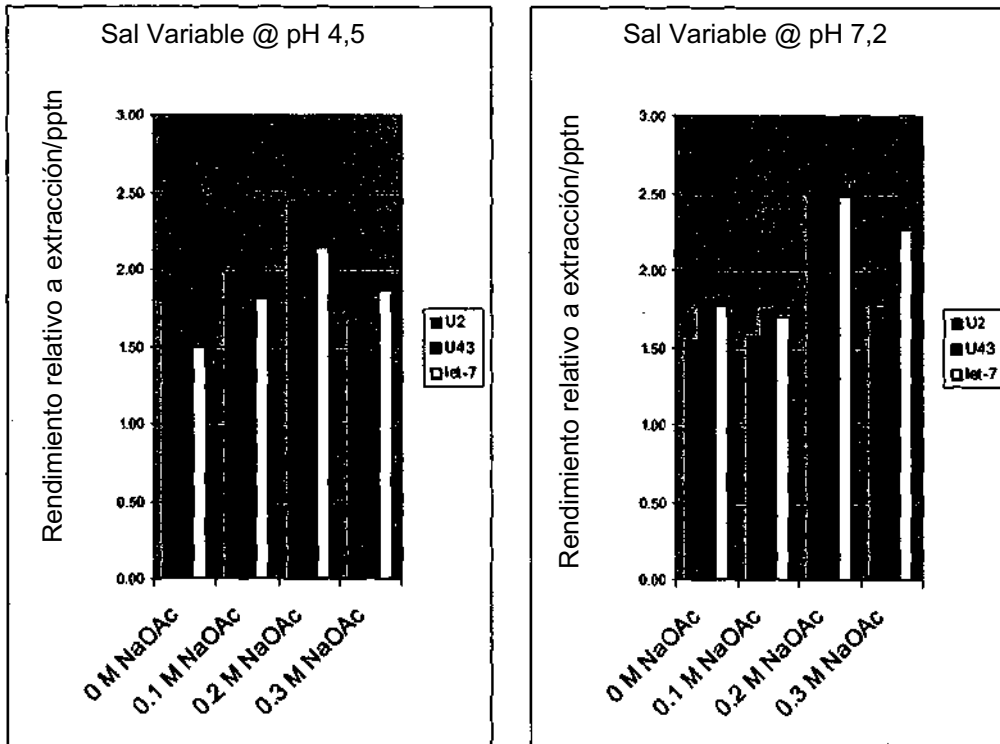


Figura 12