



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 734**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 15/10** (2006.01)  
**B01L 3/14** (2006.01)  
**G01N 1/38** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03729743 .9**  
96 Fecha de presentación : **06.06.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1513952**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2005**

54 Título: **Composición y procedimientos para obtener ácidos nucleicos a partir de esputo.**

30 Prioridad: **07.06.2002 US 386397 P**  
**07.06.2002 US 386398 P**  
**07.06.2002 US 386399 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.04.2011**

73 Titular/es: **DNA GENOTEK Inc.**  
**Unit 200, 29 Camelot Drive**  
**Ottawa, Ontario K2G 5W6, CA**

72 Inventor/es: **Birnboim, Chaim, H.**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 356 734 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

Composición y procedimientos para obtener ácidos nucleicos a partir de esputo.

## Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos y kits para conservar ácidos nucleicos a temperatura ambiente durante periodos prolongados de tiempo y para simplificar el aislamiento de ácidos nucleicos.

10 El ADN puede extraerse virtualmente de cualquier tipo de célula del cuerpo humano, con la excepción de eritrocitos. La fuente habitual de muestras corporales para la extracción del ADN es la sangre venosa, puesto que el número de leucocitos nucleados (principalmente neutrófilos y linfocitos) es relativamente alto y bastante consistente: el intervalo normal es de aproximadamente 5 a 10 millones de leucocitos por ml de sangre. El contenido de ADN de las células humanas es de aproximadamente 6 µg por millón de células, así que 1 ml puede proporcionar teóricamente de 30 a 60 µg de ADN. Sin embargo, hay aproximadamente 5.000 millones de eritrocitos por ml de sangre que, puesto que no contienen ADN, deben retirarse para obtener ADN puro. Además, el uso de la sangre como fuente de ADN tiene muchas otras desventajas. La recogida de sangre no es un procedimiento trivial. La toma de sangre venosa requiere personal adiestrado. Es un procedimiento invasivo, que frecuentemente causa cierta incomodidad y dolor al donante. Son necesarias precauciones para minimizar la exposición del personal a patógenos de transmisión hemática. Una vez recogida, la muestra de sangre debe congelarse o transportarse rápidamente a un laboratorio para la extracción de ADN. Por estas razones, la sangre venosa no es la fuente ideal de ADN. Un procedimiento más sencillo para obtener sangre es recoger unas pocas gotas después de una punción de dedo y transferirlas a un trozo de papel de filtro. Requiere personal menos adiestrado. Una vez secado, el ADN es bastante estable. La cantidad de ADN recuperada es pequeña pero suficiente para muchos fines forenses. Sin embargo, una punción de dedo sigue siendo un procedimiento invasivo y el hemoderivado de la hemoglobina de la sangre puede inhibir algunos tipos de análisis de ADN.

25 Realizar un frotis del interior de la mejilla con una torunda (frotis bucal) es otra fuente de células que contienen ADN. Es mucho menos invasivo que la toma de sangre y puede recogerse por individuos con menos adiestramiento que el necesario en la recogida de sangre. Una vez recogido, el tiempo en que puede recuperarse el ADN utilizable puede prolongarse secando el frotis o pasándolo sobre papel de filtro y secándolo. Sin embargo, como el interior de la boca no es una fuente estéril (en comparación con la sangre), los microbios pueden degradar la calidad del ADN después de un periodo de tiempo. El número de células recuperadas mediante este procedimiento no es grande y típicamente pueden esperarse menos de 1-2 µg de ADN en toda la muestra.

30 La saliva es un fluido incoloro bastante transparente secretado principalmente por las glándulas salivares mayores (parótida, submandibular y sublingual). Su función es lubricar y limpiar la cavidad oral, así como iniciar el proceso de digestión. La glándula parótida secreta principalmente saliva serosa (acuosa), mientras que las demás glándulas secretan una mezcla de saliva serosa y mucinosa (pegajosa). Los componentes de la saliva incluyen albúmina, globulina, mucinas y enzimas digestivas. Se sabe desde hace mucho tiempo que el ADN celular está presente en la saliva y que este ADN es adecuado con fines forenses. El uso forense está limitado típicamente a la identificación de víctimas o sospechosos, usando las pequeñas cantidades de ADN de la saliva que pueden recuperarse de un lugar del delito o de la parte posterior de un sello de correos. La noción de que la saliva puede ser una fuente fiable de ADN genómico y un rival para las muestras de sangre venosa se ha investigado con este fin más recientemente en una publicación científica (van Schie y col., *J. Immunol. Methods* 208: 91-101, 1997). Los autores usaron muestras de saliva recién recogidas o congeladas y purificaron el ADN mediante un procedimiento de extracción bastante complejo. Las estimaciones de la cantidad de ADN recuperado se basaron en la absorción de luz a 260 nm, un procedimiento conocido por ser un procedimiento poco fiable, puesto que otras macromoléculas biológicas comunes, tales como ARN, tienen esencialmente el mismo espectro de absorción de luz ultravioleta. No obstante, estos autores mostraron que de hecho estaba presente ADN genómico de calidad mediante análisis electroforético en gel y análisis por reacción en cadena de la polimerasa para ciertos polimorfismos alélicos. Otra comunicación (Terasaki, y col., *Hum. Immunol.* 59: 597-598, 1998) notificó resultados similares sobre la idoneidad de la saliva como fuente de ADN para el tipado de HLA mediante análisis por reacción en cadena de la polimerasa. Aunque se notificó la cantidad de ADN recuperado, el procedimiento usado para medir el ADN no. Estos autores proporcionaron 3 ejemplos en que la saliva secada sobre papel de filtro proporcionaba ADN adecuado para análisis.

50 Con el uso creciente de análisis basados en ADN en criminología, seguridad pública, defensa, medicina humana, medicina veterinaria e investigación, existe la necesidad de un producto que permita convertir a la saliva en una fuente fiable estándar de ADN a partir de un individuo (para reemplazar a la sangre, el estándar actual). En criminología, defensa y situaciones de emergencia masiva, por ejemplo, se toman ahora muestras de ADN rutinariamente de personas vivas que se cree que son parientes de víctimas no identificadas de accidentes o asesinatos, para ayudar a la identificación de los muertos. El personal militar u otros individuos que se espera que se encuentren en situaciones peligrosas en que sus vidas puedan estar en riesgo pueden desear almacenar muestras de ADN antes de exponerse a estos riesgos. En el campo de la seguridad pública, a los criminales convictos tanto en Canadá como en Estados Unidos se les exige ahora proporcionar muestras de ADN. Se espera que las pruebas basadas en ADN aumenten en medicina, tales como ensayos para fibrosis quística, isotipos del citocromo P450, polimorfismos que afectan a la susceptibilidad a enfermedades infecciosas y autoinmunes, tipado de HLA y

5 problemas de paternidad, por nombrar algunos. En estudios clínicos, un ejemplo sería cribar en poblaciones los genes de predisposición al cáncer de colon o, en miembros de la familia de una víctima de cáncer de mama, los genes de predisposición al cáncer de mama. En todos estos casos, hay ventajas significativas en proporcionar una muestra de saliva en lugar de proporcionar una muestra de sangre como fuente de ADN. Todos los donantes preferirían donar saliva en lugar de sangre debido a la incomodidad, dolor o aprensión asociados a la flebotomía o punciones. La saliva tiene la ventaja adicional de no requerir personal especializado, reduciendo así el coste cuando se lleva a cabo una recogida de muestras masiva. El riesgo de infección con transmisión hemática se reduce igualmente.

10 Además del problema de desarrollar un procedimiento estándar de recogida y conservación de ADN en la saliva, permanece la necesidad continua de mejorar los procedimientos para superar problemas específicos de la recuperación de ácidos nucleicos de la saliva. El problema de la extracción de ADN y ARN de alto peso molecular de células de mamífero se ha planteado parcialmente por Birnboim en Methods of Enzymology 216: 154-160, 1993, pero este trabajo no se extendía a la recuperación de ácidos nucleicos de fluidos corporales que contienen mucina.

15 El documento WO 98/44158 da a conocer procedimientos de recogida de analitos de ácido nucleico y no nucleico de muestras orales. Los procedimientos implican la conservación del ADN usando agentes quelantes y detergentes.

20 Las proteínas multiméricas llamadas mucinas son proteínas glucosiladas de alto peso molecular que forman la mayor parte de la biopelícula protectora en la superficie de células epiteliales, donde pueden proporcionar una barrera para el material particulado y se unen a microorganismos. Estas glucoproteínas contribuyen en gran medida a la naturaleza viscoelástica de la saliva. La mucina de alto peso molecular principal en las secreciones salivares es MUC5B, una de las cuatro mucinas formadoras de gel que existen como proteínas multiméricas, con pesos moleculares mayores de 20-40 millones de Da. La MLTC5B es una mucina oligomérica grande compuesta por subunidades ligadas por disulfuro.

25 Es conocido que los reactivos que reducen los disulfuros reducen también la viscosidad de la mucina, tal como la encontrada en esputo o saliva. Los agentes reductores, en particular compuestos químicos que contienen azufre tales como  $\beta$ -mercaptoetanol y ditioneol, se usan ampliamente en la bioquímica. Sin embargo, muchos agentes reductores relevantes en bioquímica pueden reaccionar en disolución con el oxígeno disuelto. Esto es conocido como autooxidación (también denominada autooxidación o auto-oxidación), en que se forman intermedios de reducción de un electrón del oxígeno, a saber, radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e hidroxilo ( $OH\cdot$ ). Además, los cationes de metales de transición funcionan como catalizadores y se ha demostrado que  $O_2^{\cdot-}$  es un intermedio. Desgraciadamente, los agentes reductores y composiciones reductoras de la técnica anterior tienen una vida de almacenamiento relativamente corta, especialmente en disoluciones básicas, y no pueden prepararse y almacenarse disoluciones madre que contengan agentes reductores en condiciones ambientales durante un periodo prolongado de tiempo, habitualmente no más de un día o dos.

35 Por lo tanto, además de la necesidad de un medio para recoger esputo o saliva, y conservar posteriormente los ácidos nucleicos contenidos en el mismo poniéndolos en contacto con una composición estabilizadora, existe la necesidad de inclusión de un agente reductor estable en la composición, de tal modo que los ácidos nucleicos puedan recuperarse convenientemente de la misma, especialmente después de periodos prolongados de tiempo en presencia de oxígeno a pH neutro o ligeramente alcalino.

#### 40 Sumario

45 El presente inventor ha desarrollado una composición que, cuando se mezcla con un fluido corporal que contiene mucina según el procedimiento de la invención, conserva los ácidos nucleicos a temperatura ambiente durante periodos prolongados de tiempo. No es necesaria la congelación de las muestras antes de la recuperación y purificación de ácido nucleico. Las propiedades de esta composición son que (a) estabiliza químicamente ácidos nucleicos, (b) inhibe nucleasas que pueden estar presentes en la saliva, y (c) es compatible con enzimas proteolíticas y otros reactivos usados para purificar/amplificar oligo- o polinucleótidos. Una cuarta propiedad de esta composición es que contiene un agente que reduce rápidamente las propiedades viscosas de la mucina, facilitando en gran medida la extracción de ácidos nucleicos contenidos en la misma.

50 En consecuencia, un primer aspecto del procedimiento de la invención caracteriza una composición para conservar ácidos nucleicos que incluye un agente quelante y un agente desnaturalizante, en que el pH de la composición es mayor de 5,0. En una realización, la composición es una disolución acuosa.

55 En otra realización, la composición incluye también un agente reductor. Por ejemplo, puede incluir uno o más de los siguientes: ácido ascórbico, ditioneol, eritorbato, *N*-acetilcisteína, cisteína, glutatión, ditioneol, 2-mercaptoetanol, dieritrol, un tiol soportado en resina, una fosfina soportada en resina, vitamina E y Trolox, o sales de los mismos. Deseablemente, el agente reductor es ácido ascórbico, eritorbato, *N*-acetilcisteína, ditioneol o 2-mercaptoetanol, y lo más deseablemente, el agente reductor es ácido ascórbico. En otra realización, la composición no contiene ácido ascórbico. En otra realización más, la concentración del agente reductor en la composición es mayor o igual a 50 mM.

Los secuestrantes de radicales libres antioxidantes son también agentes reductores deseables para la composición usados para los procedimientos de la presente invención. Los ejemplos incluyen vitaminas antioxidantes, hormonas antioxidantes, enzimas antioxidantes, tioles y fenoles.

5 Deseablemente, el agente reductor retiene la actividad reductora durante al menos 46 días en presencia de uno o más de los siguientes: oxígeno, aire ambiental, luz ambiental y pH alcalino.

10 El agente quelante de la composición puede seleccionarse del grupo constituido por: ciclohexanodiaminotetraacetato (CDTA), ácido dietiltri Aminopentaacético (DTPA), ácido tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA), ácido tetraazaciclotetradecanotetraacético (TETA) y desferrioxamina, o análogos quelantes de los mismos. Deseablemente, el agente quelante es ciclohexanodiaminotetraacetato (CDTA), ácido dietiltri Aminopentaacético (DTPA), ácido tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA) o desferrioxamina, y lo más deseablemente, el agente quelante es ciclohexanodiaminotetraacetato (CDTA).

15 En otra realización, el agente quelante de la composición usada en la invención inhibe el ciclo redox de metales. Por "inhibe el ciclo redox de metales", se entiende la inhibición de los ciclos de oxidación/reducción basados en metal que producen especies radicales libres de oxígeno reactivas. Los ejemplos de pares iónicos redox implicados en dichos ciclos incluyen  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$ ,  $Cu^{+}/Cu^{2+}$ , y diversos estados de oxidación de molibdeno, vanadio, níquel y cobalto. Los quelantes que se unen a uno o ambos iones de un par iónico redox pueden inhibir la producción de especies de oxígeno reactivas tales como, por ejemplo, radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ), radical hidroperoxilo ( $HOO\cdot$ ), radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical óxido nítrico ( $NO\cdot$ ) o radical peroxinitrito ( $ONO_2^{\cdot-}$ ).

20 El ácido nucleico a conservar por la composición puede ser ADN o ARN, incluyendo ARNm o ARN vírico.

20 El pH de la composición puede ser de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 11,0, deseablemente de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, y lo más deseablemente de aproximadamente 7,0. Para la conservación de ADN, puede usarse un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 10,0. Dependiendo de los demás componentes de las composiciones, los pH deseables son aproximadamente 7,5, aproximadamente 8,0, o un intervalo de pH de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 9,0. Puede añadirse a la composición un tampón, tal como HEPES, TRIS o tampón carbonato, para mantener el pH en un intervalo constante.

25 Para la conservación de ARN, puede usarse un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,0, deseablemente de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 6,8. De nuevo, puede usarse un tampón, tal como BES, para mantener el pH en un intervalo constante.

30 El agente desnaturizante de la composición puede seleccionarse del grupo constituido por: urea, dodecilsulfato, cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, perclorato y un alcohol. Deseablemente, el agente desnaturizante es urea, dodecilsulfato o un alcohol, en el que el alcohol es un 10-60% del volumen de la composición total. Los alcoholes pueden ser metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, trifluoroetanol, fenol o 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol.

35 En otra realización, la composición incluye un agente antimicrobiano. Por "agente antimicrobiano", se entiende una sustancia o grupo de sustancias que reducen la velocidad de crecimiento de un organismo en comparación con la velocidad de crecimiento del organismo en su ausencia. La reducción en la velocidad de crecimiento de un organismo puede ser de al menos un 5%, más deseablemente de al menos un 10%, aún más deseablemente de al menos un 20%, 50% o 75%, y lo más deseablemente de un 90% o más. La definición se extiende también a sustancias que afectan a la viabilidad, virulencia o patogenicidad de un organismo. Un agente antimicrobiano puede ser natural (por ejemplo, derivado de bacterias), sintético o recombinante. Un agente antimicrobiano puede ser bacteriostático, bactericida o ambos. Un agente antimicrobiano es bacteriostático si inhibe la división celular sin afectar a la viabilidad de la célula inhibida. Un agente antimicrobiano es bactericida si causa la muerte celular. La muerte se detecta comúnmente por la ausencia de crecimiento celular en el medio de crecimiento líquido (por ejemplo, ausencia de turbidez) o en una superficie sólida (por ejemplo, ausencia de formación de colonias sobre agar). Los expertos en la técnica saben que una sustancia o grupo de sustancias que es bacteriostática a una concentración dada puede ser bactericida a una concentración mayor. Ciertas sustancias bacteriostáticas no son bactericidas a ninguna concentración. Deseablemente, la composición de la invención incluye un alcohol como agente antimicrobiano, y lo más deseablemente, la composición incluye etanol.

40

45

50 En otra realización, la composición incluye también un inhibidor de ribonucleasa. Los inhibidores deseables se seleccionan del grupo constituido por: heparina, sulfato de heparano, ácido oligo(vinilsulfónico), ácido poli(vinilsulfónico), ácido oligo(vinilfosfónico) y ácido poli(vinilsulfúrico) o sales de los mismos. La inclusión de un inhibidor de ribonucleasa en la composición usada para la invención es particularmente deseable cuando el ácido nucleico para conservar es ARN, deseablemente ARNm, o cuando el ácido nucleico para conservar es de un virus o una bacteria.

55 Un segundo aspecto caracteriza un procedimiento de reducción de la viscosidad de un fluido corporal o tejido que contiene mucina mediante la reducción de los enlaces disulfuro inherentes a la mucina, en el que el fluido corporal o tejido se mezcla con una composición de la invención que incluye un agente reductor. En una realización, el fluido corporal es esputo, deseablemente saliva. Por "esputo", se entiende el material mucoide contenido en o

descargado de la cavidad nasal o bucal de un animal, incluyendo saliva y descargas de las vías respiratorias, incluyendo los pulmones. En otra realización, el procedimiento incluye la recuperación de un ácido nucleico.

5 Un tercer aspecto de la invención caracteriza un procedimiento de conservación de un ácido nucleico contenido en esputo que incluye las etapas de obtener esputo de un sujeto y de poner en contacto el esputo con una composición de la invención, conservando así el ácido nucleico.

En una realización, cuando el ácido nucleico es ADN, el ADN es estable durante más de 14 días, deseablemente más de 30 días y más deseablemente más de 60 días. En otra realización, cuando el ácido nucleico es ADN y la composición no contiene ácido ascórbico, el ADN es estable durante más de 60 días, y deseablemente más de 360 días.

10 Un cuarto aspecto de la invención caracteriza un procedimiento de recuperación de un ácido nucleico de esputo que incluye las etapas de: i) obtener esputo de un sujeto, ii) poner en contacto el esputo con una composición de la invención formando una mezcla, iii) poner en contacto la mezcla con una proteasa y iv) recuperar el ácido nucleico de la mezcla. Deseablemente, la proteasa es proteinasa K o pronasa.

15 En una realización de cualquiera del segundo, tercero o cuarto aspectos, el esputo es saliva. En otra realización, el esputo es de un mamífero, deseablemente un ser humano. En otra realización más, el ácido nucleico es ADN o ARN. Si el ácido nucleico es ARN, deseablemente es ARNm o ARN vírico. El ácido nucleico puede ser de una fuente extraña al sujeto del que se toma la muestra de esputo. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser de una bacteria o virus que reside en las vías bucal, nasal o respiratoria del sujeto.

20 En un quinto aspecto, se describe un procedimiento de conservación y/o recuperación de un ácido nucleico a partir de un fluido corporal, que incluye disponer el fluido corporal en una primera región de un recipiente, disponer una composición de la invención en una segunda región del recipiente, que está separada de la primera región por una barrera, cerrar el recipiente y alterar la integridad de la barrera de tal modo que la composición y el fluido corporal se pongan en contacto.

25 En una realización, la desestabilización de la barrera está acoplada al cierre del recipiente cuando se dispone una tapa sobre él. En un ejemplo, la barrera se perfora. En un ejemplo deseable, la barrera está en forma de un disco sellante giratorio. En este ejemplo, la unión de la tapa al recipiente fuerza al disco a girar desde su posición original de cubrir el espacio entre la primera región y la segunda región a una posición en la que ambas regiones están expuestas entre sí, permitiendo así que se forme una mezcla entre una composición de la invención y el fluido corporal. Deseablemente, el fluido corporal es esputo, y lo más deseablemente saliva.

30 En un sexto aspecto, se describe un dispositivo para conservar y/o aislar un ácido nucleico obtenido a partir de una muestra biológica. El dispositivo incluye: un recipiente que tiene una primera región para recoger una muestra biológica y una segunda región que contiene una composición para conservar un ácido nucleico, una barrera entre la primera región y la segunda región que mantiene separadas la muestra biológica y la composición, un medio para cerrar el recipiente y un medio para alterar la integridad de la barrera de tal modo que la composición pueda entrar en contacto con la muestra biológica. La primera región puede tener una abertura de 2,0 a 7,0 cm, deseablemente de 2,5 a 3,5 cm, y lo más deseablemente de 3,0 cm. Deseablemente, la muestra biológica es esputo y, lo más deseablemente, saliva.

35 En una realización del sexto aspecto, la composición conservante de ácido nucleico es una composición descrita en la presente memoria. El medio para cerrar el recipiente puede acoplarse con el medio para alterar la integridad de la barrera. El medio para cerrar el recipiente puede ser una tapa hermética.

40 Se describe también en la presente memoria un procedimiento de fabricación de un dispositivo para conservar un ácido nucleico en una muestra biológica que incluye: proporcionar un recipiente que tiene una primera región y una segunda región, siendo la primera región adecuada para contener una composición de la invención y teniendo la segunda región una abertura adecuada para la aplicación de una muestra biológica; disponer la composición en la primera región y aplicar una barrera al recipiente entre la primera región y la segunda región, siendo la barrera impermeable a la composición y pudiendo desestabilizarse.

45 La barrera puede ser un disco giratorio, en que en una primera posición el disco cubre el compartimento y separa las primera y segunda zonas. Girar el disco a una segunda posición (por ejemplo, conectando una tapa a rosca en un mecanismo de émbolo que entra en contacto con el disco, causando que gire cuando la tapa se rosca) desestabiliza la barrera y permite a la mezcla biológica contenida en la primera región entrar en contacto con la composición que está contenida en la segunda región.

Por "aproximadamente", se entiende  $\pm 10\%$  del valor indicado o un equivalente químico u obvio del mismo.

Por "alcohol", se entiende un compuesto orgánico miscible con agua que contiene un grupo hidroxilo, incluyendo mezclas miscibles con agua de compuestos orgánicos que contienen hidroxilo.

55 Por "secuestrante de radicales libres antioxidante", se entiende una sustancia que reduce una especie

radical libre de oxígeno reactivo. Dichos radicales libres incluyen, por ejemplo, radical hidroxilo (HO·), radical hidroperoxilo (HOO·), radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical óxido nítrico (NO·) o radical peroxinitrito ( $ONNO_2^{\cdot-}$ ).

Por “disolución acuosa”, se entiende una disolución o suspensión que contiene un 30% o más de agua en volumen.

5 Por “fluido corporal”, se entiende un fluido de origen natural de un animal, tal como saliva, suero, plasma, sangre, orina, moco, jugos gástricos, jugos pancreáticos, semen, productos de lactación o menstruación, lágrimas o linfa.

10 Por “muestra biológica”, se entiende cualquier muestra que contiene ácidos nucleicos que se ha obtenido de o depositado por un animal. Los ejemplos no limitantes incluyen piel, cabello, fluidos corporales, materia fecal y tejido.

Por “análogo quelante”, se entiende un compuesto quelante derivado con la misma estructura de cadena principal y que tiene las mismas propiedades generales que el compuesto quelante original.

Por “agente desnaturalizante”, se entiende una sustancia que altera el estado natural de aquello a lo que se añade.

15 Por “mucina”, se entiende cualquier mucoproteína que eleve la viscosidad del medio que rodea las células que la secreta.

Por “mucoide”, se entiende cualquier fluido corporal que contenga mucina.

Por “ácido nucleico”, se entiende una cadena nucleotídica, incluyendo ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), encontrado típicamente en cromosomas, mitocondrias, ribosomas, bacterias o virus.

20 Por “composición conservante de ácidos nucleicos”, se entiende cualquier composición de la presente invención, a menos que se especifique otra cosa.

25 Cuando se designa un ácido nucleico, se entiende por “estable” que al menos un 50% de la cantidad inicial de ácido nucleico de alto peso molecular (ADN, ARN, ARNm o ARN vírico) contenido en una muestra siga presente después de almacenar la muestra a temperatura ambiente (concretamente, 20 a 25°C) durante el periodo de tiempo especificado. La cantidad de ADN de alto peso molecular en una muestra puede cuantificarse mediante análisis de densitometría de la banda de ADN de alto peso molecular de un gel de agarosa (véanse la Figura 1 y el Ejemplo 4).

Por “fosfina soportada en resina”, se entiende un polímero que contiene una multiplicidad de grupos fosfina unidos covalentemente.

30 Por “tiol soportado en resina”, se entiende un polímero que contiene una multiplicidad de grupos sulfhidrilo unidos covalentemente.

Por “saliva”, se entiende la secreción, o combinación de secreciones, de cualquiera de las glándulas salivares, incluyendo las glándulas parótida, submaxilar y sublingual, opcionalmente mezclada con la secreción de las glándulas bucales.

35 Por “esputo”, se entiende la materia mucoide contenida en o descargada de la cavidad nasal o bucal de un mamífero, incluyendo saliva y descargas de las vías respiratorias, incluyendo los pulmones.

Por “sujeto”, se entiende cualquier animal. Deseablemente, el sujeto es un mamífero que puede producir saliva con fines de extracción de ácido nucleico. Lo más deseablemente, el sujeto es un ser humano.

#### Breve descripción de los dibujos

40 La Figura 1 es un análisis de electroforesis en agarosa de ADN aislado de saliva usando la capacidad de los procedimientos de una realización de la invención.

La Figura 2 es una gráfica que ilustra una PCR instantánea de ADN de saliva estimulada del Ejemplo 5.

La Figura 3 es una gráfica que ilustra una PCR instantánea de ADN de saliva no estimulada del Ejemplo 6.

45 La Figura 4 es un análisis de electroforesis en agarosa del ADN en muestras de saliva mezcladas con composiciones de la invención, habiéndose incubado las mezclas durante diversos periodos a diversas temperaturas.

La Figura 5 muestra estructuras de anión ascorbato (oxidado), ácido deshidroascórbico (reducido) y un intermedio radical libre,

La Figura 6 es una recopilación de dos barridos espectrofotométricos de ascorbato de sodio (100  $\mu$ M) en

CB (CDTA 1 mM, BES 10 mM, pH 7,4), preparado en condiciones aeróbicas durante 30 minutos a temperatura ambiente (barrido 1) y 3 minutos después de la adición de unos pocos cristales de  $MnCl_2$  (barrido 2) como para el Ejemplo 8.

5 La Figura 7 es una recopilación de barridos espectrofotométricos, en los momentos indicados, de ascorbato de sodio 100  $\mu M$  preparado en CB del Ejemplo 8. Se expuso la disolución a atmósfera y temperatura ambientales entre barridos, pero no se puso en contacto con  $MnCl_2$  (véase el Ejemplo 9).

10 La Figura 8 es una gráfica de absorbancias a 265 nm, obtenida en los momentos indicados, de una disolución de ascorbato de sodio (250 mM) que contiene Tris-HCl 30 mM, pH 8,0, 30% de etanol, CDTA 3 mM, mezclada con 50 ml de CB, como para el Ejemplo 10. La disolución madre se mantuvo a temperatura ambiente y no se tomaron precauciones para excluir la atmósfera ambiental o la luz ambiental.

La Figura 9 es una recopilación de barridos espectrofotométricos de la disolución de 46 días preparada en el ejemplo 10. El barrido 1 ( $t=$  46 días) se tomó antes de la adición de  $MnCl_2$ . El barrido 2 se tomó 2 minutos después de la adición de  $MnCl_2$ . El barrido 3 se tomó 8 minutos después de la adición de  $MnCl_2$ . El barrido 4 se tomó 27 minutos después de la adición de  $MnCl_2$ .

15 La Figura 10 es una vista despiezada de un recipiente de muestra. Se incluye en la figura una vista superior en sección transversal tomada en la línea 1-1 del recipiente 3 que muestra el émbolo 4 y el canal del émbolo 5. Se muestra también una vista superior en sección transversal tomada en la línea 2-2 del recipiente 3, que muestra los soportes 6 para el disco sellante 7 (no mostrado en esta figura, pero mostrado en la Figura 11).

20 7. La Figura 11 es una vista lateral del recipiente de muestra de la Figura 10, que no muestra el disco sellante

#### Descripción detallada

25 Se usan en la presente memoria las siguientes abreviaturas estándar: ADN, ácido desoxirribonucleico; ARN, ácido ribonucleico; ARNm, ARN mensajero; HEPES, ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico; BES, ácido *N,N*-bis-[2-hidroxi-etil]-2-aminoetanosulfónico; TRIS, tris(hidroxi-metil)aminometano, CDTA, ciclohexanodiaminotetraacetato; DTPA, *N,N*-bis-(2-(bis(carboximetil)amino)etil)glicina; DOTA, ácido 1,4,7,10-tetrazaciclododecanotetraacético y TETA, ácido 1,4,8,11-tetraazaciclodecanotetraacético.

#### *Composiciones usadas para la invención*

30 Los presentes inventores han desarrollado composiciones que convierten al esputo en una opción viable al uso de sangre como fuente de ácidos nucleicos. Las composiciones proporcionan las propiedades ventajosas de una estabilización química de los ácidos nucleicos y la inhibición de nucleasas, incluyendo desoxirribonucleasas, y del crecimiento microbiano. La estabilización química de los ácidos nucleicos en una muestra de saliva se consigue mediante el uso de tampones para mantener un pH apropiado, así como el uso de agentes quelantes para prevenir el fenómeno del ciclo redox de metales o la unión de iones metálicos a la cadena fosfato principal de los ácidos nucleicos. Los agentes quelantes usados para la invención participan también en la inhibición de desoxirribonucleasas y del crecimiento microbiano, que puede inhibirse adicionalmente mediante la inclusión de agentes desnaturizantes y/u otras sustancias antimicrobianas adecuadas, tales como etanol, en las composiciones de la invención. Las composiciones usadas para la invención pueden incluir también uno o más agentes reductores, que pueden reducir la viscosidad de la muestra, haciendo así la recuperación de ácido nucleico un proceso más fácil.

40 En consecuencia, la presente invención caracteriza procedimientos y kits que usan una composición para conservar y/o recuperar ácidos nucleicos a partir de esputo, deseablemente saliva, que incluye uno o más quelantes y uno o más agentes desnaturizantes, en los que el pH de la composición es mayor de 5, deseablemente en un intervalo de pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 11, más deseablemente en un intervalo de pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 10,0, y lo más deseablemente a un pH de aproximadamente 7,0.

45 La cadena principal química y las bases de purina del ADN son más estables a pH ligeramente alcalino, estando la estabilidad óptima generalmente reconocida en el intervalo de pH de aproximadamente 7-11, y deseablemente a un pH de aproximadamente 8. Por debajo de un pH de aproximadamente 6, puede ocurrir despurinación (concretamente, pérdida espontánea de bases de purina de la cadena principal de desoxirribosa-fosfato). Por encima de un pH de aproximadamente 10, puede ocurrir pérdida espontánea de grupos amino de nucleótidos de citosina, convirtiendo así la citosina en uracilo. Por encima de un pH de aproximadamente 12, el ADN se desnaturaliza, convirtiéndose de la forma bicatenaria en la forma monocatenaria. En contraposición, el ARN es más estable en el intervalo de pH de 5,0 a 7,0, deseablemente a un pH de 6,5 a 6,8. En consecuencia, el pH de la composición puede ajustarse usando tampones de pH, deseablemente aquellos que controlan mejor el pH dentro del intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 11. Los ejemplos de tampones de pH con propiedades deseables incluyen, pero sin limitación, clorhidrato TRIS, HEPES y BES.

55 El ADN tiene una fuerte afinidad por iones metálicos, algunos de los cuales, tales como los metales de

transición comunes hierro o cobre, pueden catalizar la formación de especies de oxígeno reactivas. Por lo tanto, una composición de la invención incluye uno o más quelantes que pueden formar complejos con iones metálicos para evitar que se unan al ADN, retirar los iones metálicos que ya se han unido al ADN o unirse a iones metálicos (por ejemplo, Fe (II)/Fe (III) o Cu (I)/Cu (II)) con suficiente fuerza para inhibir su ciclo redox y, por tanto, la formación de especies de oxígeno reactivas. El EDTA, un quelante usado comúnmente en reactivos biológicos, puede ser de cierto uso para cualquiera de estos fines. Son más deseables quelantes más fuertes (concretamente, quelantes con una menor constante de disociación que EDTA cuando se unen a un metal), usados solos o en combinación, que incluyen, pero sin limitación, CDTA, DTPA, DOTA, TETA y desferrioxamina, o análogos quelantes de los mismos. La cantidad o concentración de quelante dependerá de la fuerza del quelante, que tendría que determinarse empíricamente. Para CDTA, son suficientes concentraciones en el intervalo de 1-20 mM, sin embargo, funcionarían otras concentraciones, y no se pretende que las composiciones de la invención estén limitadas a este intervalo.

Las desoxirribonucleasas y ribonucleasas son enzimas que degradan ADN o ARN, respectivamente. Su fuente principal en el tracto digestivo son las secreciones del páncreas, aunque pueden estar presentes niveles menores en células de la glándula salivar y la mucosa bucal. Además, los microorganismos residentes en la boca o de alimentos ingeridos recientemente pueden contener desoxirribonucleasas o ribonucleasas. La desoxirribonucleasa pancreática es conocida por requerir iones metálicos divalentes tales como Mg (II), Mn (II) y/o Ca (II) para la actividad enzimática. Los quelantes fuertes descritos anteriormente, además de proporcionar estabilidad química a los ácidos nucleicos, inhibirán esta clase de desoxirribonucleasas que requieren ión metálico. La acción de desoxirribonucleasas y ribonucleasas puede inhibirse también por agentes desnaturizantes que destruirán las estructuras complejas de estas enzimas (proteínas). Por tanto, los agentes desnaturizantes se incluyen en la composición de conservación de ácido nucleico usada para la invención. Los ejemplos de agentes desnaturizantes que pueden usarse (solos o en combinación) incluyen, pero sin limitación, urea, sales solubles de dodecilsulfato y otros detergentes fuertes, cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, sales solubles de perclorato, alcoholes tales como etanol a más de un 10%. Otros reactivos, tales como heparano, sulfato de heparano u ácido oligo(vinilsulfónico) (Smith, y col., *J. Biol. Chem.* 20 de marzo de 2003; [publicación electrónica antes de impresión]), son conocidos por inhibir la acción de desoxinucleasas y/o ribonucleasas.

Las proteasas de baja especificidad, tales como proteinasa K, se usan frecuentemente en la purificación de ácidos nucleicos. Puesto que las proteasas son ellas mismas proteínas, su acción puede inhibirse por agentes desnaturizantes. Por tanto, debe adoptarse un equilibrio entre la concentración de agentes desnaturizantes para que, por un lado, inhiban las desoxirribonucleasas o ribonucleasas y desnaturalicen otras proteínas en la saliva y, por otro lado, no inhiban significativamente las enzimas proteolíticas. En etapas tardías de la purificación de ADN, a menudo se concentra el ADN mediante precipitación con alcohol. Por tanto, deben elegirse las sales, tampones, quelantes y demás componentes de la disolución de conservación/recuperación de ácido nucleico de modo que no precipiten cuando se añaden concentraciones de alcohol de más de un 50% para precipitar el ADN.

La viscosidad de esputo y saliva depende de la presencia de complejos de glucoproteínas de muy alto peso molecular denominados mucinas, particularmente mucinas formadoras de gel (Offner, y col., *Adv. Dent. Res.* 14: 69-75, 2000; Seregny, y col., *Tumori* 83: 625-632, 1997). Se ha encontrado que la inclusión de un agente reductor en una composición usada para la invención tiene el efecto de reducir notablemente la viscosidad de la saliva, especialmente de saliva no estimulada, facilitando así la recuperación de ácidos nucleicos. En consecuencia, en una realización, una composición usada para la invención incluye adicionalmente uno o más agentes reductores. Los agentes reductores están deseablemente a alta concentración (mayor de 0,05 M). Aun sin querer limitarse a una teoría, se supone que el agente reductor reduce la viscosidad de la saliva al romper enlaces disulfuro que mantienen juntas las cadenas de mucina, y que sería adecuado cualquier agente reductor que tuviera el potencial redox apropiado para reducir enlaces disulfuro en proteínas. Deseablemente, el agente reductor se selecciona del grupo constituido por: ácido ascórbico, ditionito, eritorbato, *N*-acetilcisteína, cisteína, glutatión, ditiotreitolo, 2-mercaptoetanol, dieritritol, un tiol soportado en resina, una fosfina soportada en resina, vitamina E y Trolox, o sales de los mismos.

En otra realización, una composición usada para la invención que incluye un agente reductor mantiene la capacidad reductora a temperatura ambiente en un recipiente sellado en presencia de oxígeno ambiental y/o en presencia de luz ambiental durante más de una semana, deseablemente durante hasta 46 días, y lo más deseablemente, durante al menos 46 días. Esta realización combina la estabilización de ácido nucleico proporcionada por un quelante fuerte, un agente desnaturizante y un agente reductor en una composición con un pH dentro del intervalo de aproximadamente 6 a aproximadamente 11, y deseablemente un pH de aproximadamente 8,0.

Es un agente reductor particularmente deseable el ascorbato de sodio. Así como un micronutriente antioxidante dietético importante, el ácido ascórbico (vitamina C) es un agente reductor no tóxico y es económico, no tóxico y estable en presencia de los quelantes y agentes desnaturizantes que se incluyen en las composiciones de la invención. Las estructuras del anión ascorbato (oxidado), el ácido deshidroascórbico (reducido) y el intermedio radical libre se muestran en la Figura 5. La reacción de oxidación más concienzudamente estudiada del ascorbato es su oxidación por oxígeno. Como con muchos otros agentes reductores, cantidades traza de metales de transición tales como hierro o cobre pueden promover la autooxidación (Buettner, *Free Radic. Res. Commun.* 1: 349-53, 1986; Buettner y Jurkiewicz *Radiat. Res.* 145: 532-41, 1996; Miller, y col., *Free Radic. Biol. Med.* 8: 95-108, 1990). La



oxidación de ascorbato catalizada por catión metálico puede controlarse convenientemente como una reducción de la absorbancia a 265 nm (Buettner Free Radic. Res. Commun. 10: 5-9, 1990), como se describe en el Ejemplo 8 y se muestra en las Figuras 5, 6 y 8. Ciertos agentes quelantes pueden retardar apreciablemente la autooxidación de ascorbato a pH 7,0 o menor (Buettner J. Biochem. Biophys. Methods 16: 27-40, 1988), como se describe en el

5 Ejemplo 10 y se muestra en la Figura 8.

En otra realización, una composición usada para la presente invención incluye uno o más quelantes, uno o más agentes desnaturalizantes y uno o más agentes antimicrobianos, en la que el pH de la composición está dentro de un intervalo de pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 11,0, deseablemente a un pH de aproximadamente 8,0. El crecimiento microbiano puede inhibirse también por quelantes fuertes y agentes desnaturalizantes, por ejemplo etanol, descritos anteriormente. Por lo tanto, en una realización adicional de la

10 presente invención, una composición para conservar y/o recuperar ADN a partir de esputo incluye uno o más quelantes y uno o más agentes desnaturalizantes, en la que al menos uno de los agentes desnaturalizantes y/o agentes quelantes está presente en cantidades para actuar como agente antimicrobiano.

15 Pueden incluirse también reactivos que indican cuándo una muestra biológica se ha puesto en contacto con una composición de la invención como parte de la composición. Son deseables aquellos reactivos que dan como resultado un cambio de color visible de la disolución de composición tras mezclado con la muestra añadida. Estos reactivos pueden funcionar reaccionando con cualquier número de grupos funcionales que están contenidos en muestras biológicas incluyendo, por ejemplo, grupos amina, tiol o glucosilo. Dichos reactivos colorimétricos son conocidos por los expertos en la técnica y se eligen de tal manera que otros componentes de la composición no

20 interfieran con su uso eficaz.

#### *Procedimientos*

La presente invención caracteriza procedimientos de recogida, conservación y recuperación de ácidos nucleicos a partir de esputo usando una composición de la invención. Los procedimientos de la invención implican poner en contacto una muestra de esputo de un sujeto con una composición de la invención y mezclar

25 opcionalmente la disolución resultante con una proteasa, tal como pronasa o proteinasa K. Además, algunas composiciones de la invención caracterizan un agente reductor que puede facilitar la recuperación de ácidos nucleicos de mezclas de composición/muestra reduciendo la viscosidad de estas mezclas.

En consecuencia, un aspecto de la invención caracteriza un procedimiento de conservación de un ácido nucleico contenido en esputo que incluye las etapas de obtener esputo de un sujeto y poner en contacto el esputo con una composición de la invención, conservando así el ácido nucleico. Los Ejemplos 1 y 2 describen la recogida de saliva, tanto de sujetos que pueden seguir instrucciones como de aquellos que no pueden.

El esputo se pone en contacto típicamente con una composición de la invención tras la recogida o inmediatamente después de recogerse, y preferiblemente no mucho más tarde de aproximadamente 1 hora después de la recogida. Este tiempo puede variar dependiendo de las condiciones de almacenamiento del esputo después de la recogida. Por ejemplo, podría ser indefinido si se almacenara congelado o quizás de 1-2 días si se almacenara a 4°C. Puede haber un agente reductor en la composición conservante usada, o añadirse en un momento posterior antes del aislamiento de ácido nucleico. Las composiciones que contienen agente reductor deseables son aquellas que son estables y retienen la capacidad de reducción durante más de una semana, deseablemente durante hasta aproximadamente 46 días, y lo más deseablemente durante al menos 46 días.

40 En un ejemplo (véase el ejemplo 5), cuyos resultados se presentan en la Tabla 1, se recogió saliva, se mezcló con un volumen aproximadamente igual de una composición de la invención (véase el Ejemplo 3 para la preparación) y se analizó el contenido de ADN mediante análisis de PCR en puntos temporales posteriores.

Tabla 1. Cantidades estimadas de ADN en muestras de saliva\*

Saliva estimulada recogida el 26 de febrero de 2002, analizada a los 64 días por el procedimiento de ADNasa										
Nº de donante										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
21,2	21,4	16,6	16,0	28,8		44,8	22,2	16,6		
Saliva no estimulada recogida el 25 de marzo de 2002, analizada a los 15 días por el procedimiento de ADNasa										
Nº de donante										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		64,2				80,6	24,4		27,2	69,0
*Contenido de ADN en nanogramos por microlitro										

5 Para recoger el esputo del sujeto, se prefiere enjuagar la boca antes del muestreo. Las partículas de comida pueden introducir ADN extraño y la saliva transferida al besar puede ser una fuente de ADN humano extraño. La boca puede enjuagarse con aproximadamente 50 ml de agua templada o mediante gárgaras vigorosas o cepillando con un cepillo de dientes sin pasta de dientes. La saliva no estimulada es habitualmente de tipo mucinoso y se secreta a una velocidad lenta. La saliva estimulada (por anticipación de un alimento sabroso, caramelos dulces o ácidos) es de tipo seroso (acuoso) y se secreta a una velocidad más rápida. Se ha encontrado (véase la Tabla 2) que hay más ADN en 2 ml de saliva no estimulada que en 2 ml de saliva estimulada. Después de enjuagar la boca y de esperar aproximadamente 2 o 3 minutos, el donante puede escupir un volumen (por ejemplo aproximadamente 2 ml) de saliva "no estimulada" en el tubo receptor. Si esto resulta difícil, puede estimularse convenientemente el flujo de saliva con un terrón de azúcar o cualquier otra sustancia estimulante de saliva que no interfiera con la recuperación o purificación de ADN.

Tabla 2. Comparación del contenido de ADN de saliva no estimulada y estimulada

Donante nº 7	No estimulada	Estimulada
Recogida el 6 de abril de 2002, analizada 2 días después mediante el procedimiento de ADNasa	36,2*	21,8*
*Cantidad estimada de ADN en ng por µl de la muestra de saliva no diluida original		

15 Otro aspecto caracteriza un procedimiento de reducción de la viscosidad de un fluido corporal o tejido que contiene mucina mediante la reducción de los enlaces disulfuro inherentes a la mucina, en el que el fluido corporal o tejido se mezcla con una composición de la invención que incluye un agente reductor. En una realización, el fluido corporal es esputo, deseablemente saliva.

20 Aún otro aspecto de la invención caracteriza un procedimiento de recuperación de un ácido nucleico a partir de esputo que incluye las etapas de: i) obtener esputo a partir de un sujeto, ii) poner en contacto el esputo con una composición de la invención formando una mezcla, iii) poner en contacto la mezcla con una proteasa y iv) recuperar el ácido nucleico de la mezcla.

25 Las proteasas adecuadas incluyen, por ejemplo, proteinasa K o pronasa. La proteasa puede estar adecuadamente en forma secada que se activaría una vez mezclada con esputo y una composición de la invención. En una realización, la proteasa se deposita sobre la superficie interior del dispositivo de recogida. Esto puede conseguirse disolviendo la proteasa en una disolución compuesta por volúmenes iguales de sacarosa al 5% en agua y glicerol al 5% en etanol y, después, disponiendo la disolución sobre la superficie, retirando los productos volátiles a vacío controlado dejando la proteasa unida a la superficie como un residuo pegajoso. Si la composición no contiene un agente reductor (o incluso si lo contiene), puede añadirse un agente reductor en cualquier momento antes del aislamiento del ácido nucleico de la muestra, deseablemente antes o simultáneamente a poner en contacto la muestra con una proteasa adecuada.

30

5 Cuando se mezcla esputo con una composición de la presente invención, se desestabilizan las células, se liberan los ácidos nucleicos de las células, se solubiliza el material membranoso, se separan las proteínas de los ácidos nucleicos y empieza la digestión proteica. Si está presente, el agente reductor en la composición reduce la viscosidad de la mucina formadora de gel. La incubación puede ser a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo relativamente largo (días o semanas) mientras las muestras se envían a un laboratorio para análisis. Si se transfieren a un laboratorio poco después de la recogida, es suficiente una incubación a 55°C durante 4 a 16 horas para permitir que la proteasa activada digiera la mayoría de la proteína a péptidos menores o aminoácidos. En dichas condiciones, los ácidos nucleicos y polisacáridos permanecen relativamente intactos.

10 Una vez se completa la digestión, puede efectuarse el aislamiento de ácido nucleico usando cualquier técnica conocida en la técnica ("Short Protocols in Molecular Biology", 5ª edición Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J. G. Seidman, John A. Smith (Editor), Kevin Struhl (Editores). ISBN: 0-471-25092-9. 2002. John Wiley and Sons). En un ejemplo en el que se usa SDS como componente desnaturante de la composición, puede añadirse una "disolución de precipitación" compuesta, por ejemplo, por cloruro de potasio, a una porción de la mezcla de esputo-composición, dando como resultado la precipitación de dodecilsulfato de potasio, después de dejar enfriar la disolución sobre hielo. Después de un corto periodo de centrifugación para retirar el precipitado y cualquier material insoluble residual, se recoge el sobrenadante. En esta etapa, se espera que el sobrenadante contenga como máximo 10-30 ng por µl de ADN. Para análisis en que sea suficiente del orden de 1 ng de ADN, la muestra puede diluirse.

20 Cuando se requieren cantidades mayores de ADN, el ADN del sobrenadante puede precipitarse mediante la adición de alcohol y volver a disolverse en cualquier tampón adecuado. Esta etapa tiene el efecto de retirar los componentes inhibidores de la composición, que están presentes para conservar los ácidos nucleicos durante el transporte al laboratorio.

25 Si se requiere ADN más altamente purificado, pueden usarse entonces otras etapas de purificación conocidas ("Short Protocols in Molecular Biology", 5ª edición, Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J. G. Seidman, John A. Smith (Editor), Kevin Struhl (Editores). ISBN: 0-471-25092-9.2002. John Wiley and Sons), tales como extracción con fenol o extracción en fase sólida. Debe observarse que, debido a que el ADN está en estado relativamente puro usando los procedimientos descritos anteriormente, se facilita cualquier etapa de purificación adicional cuando se compara con purificaciones análogas de ADN originado a partir de una muestra de sangre.

30 Los procedimientos de la presente invención pueden usarse para aislar ácidos nucleicos a partir de esputo para cualquier aplicación que requiera una muestra de ácido nucleico. Por ejemplo, algunas aplicaciones específicas de los procedimientos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, aplicaciones forenses, aplicaciones médicas (incluyendo cribado genético y tipado de enfermedades) y ensayos de paternidad.

35 Otro aspecto de la invención caracteriza un procedimiento de conservación y/o recuperación de un ácido nucleico a partir de un fluido corporal que incluye disponer el fluido corporal en una primera región de un recipiente, disponer una composición de la invención en una segunda región del recipiente, que está separada de la primera región por una barrera, cerrar el recipiente y alterar la integridad de la barrera de tal modo que la composición y el fluido corporal se pongan en contacto. Los dispositivos de recogida de la invención, que pueden servir también como recipientes para juntar las composiciones y fluidos corporales que contienen ácido nucleico, se describen a continuación.

#### *Dispositivos de recogida*

45 Se describe también en la presente memoria un dispositivo de recogida novedoso usado para recoger una muestra biológica de un sujeto y, posteriormente, mezclar la muestra recogida con una composición pretendida para estabilizar, conservar o facilitar la recuperación de los componentes de la muestra. Dichos componentes pueden incluir, sin limitar la invención, ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, toxinas, quitinas, ácidos grasos y glicógenos. Son ejemplos no limitantes de muestras biológicas piel, cabello, materia fecal, fluidos corporales y tejidos.

50 El dispositivo puede usarse para conservar y/o recuperar un ácido nucleico obtenido a partir de una muestra biológica. El dispositivo incluye: un recipiente que tiene una primera región para recoger una muestra biológica y una segunda región que contiene una composición para conservar un ácido nucleico, una barrera entre la primera región y la segunda región que mantiene separadas la muestra y la composición, un medio para cerrar el recipiente y un medio para alterar la integridad de la barrera, de tal modo que la composición pueda entrar en contacto con la muestra corporal. La composición puede ser una composición descrita en la presente memoria. La muestra puede ser un fluido biológico.

55 El dispositivo de recogida sirve simultáneamente para varias funciones. Algunos de los rasgos deseables de este envase de recogida incluyen uno o más de los siguientes:

a) puede estar construido de un plástico robusto resistente a la rotura, deseablemente un plástico biocompatible. Deseablemente, el recipiente se construiría con un material que no liberara productos químicos en los contenidos del recipiente;

- b) tendría una boca ancha que hiciera relativamente sencillo para un sujeto poner el volumen necesario de muestra de fluido, deseablemente esputo expectorado, y lo más deseablemente saliva expectorada, en el recipiente del dispositivo;
- 5 c) la parte inferior del recipiente sería estrecha para reducir el volumen global del recipiente para facilitar recoger el pequeño volumen (1-2 ml) de fluido que se esperaría de un muestreo rutinario, en particular cuando la muestra es una expectoración. Opcionalmente, el dispositivo contendría marcas para poder estimar el volumen de muestra recogido;
- d) el medio para cerrar el recipiente puede ser un tapón que esté diseñado para bloquearse una vez ajustado para volverse a prueba de manipulaciones;
- 10 e) el medio para cerrar el recipiente puede ser un tapón que está diseñado para proporcionar un sello hidráulico y/o hermético para el recipiente una vez se fija el tapón en su lugar;
- f) la barrera puede ser un septo o compartimento de bolsa de plástico que separaría la composición del fluido hasta que el septo o compartimento de bolsa se perfora o se liberen de otro modo los contenidos;
- 15 g) la barrera puede estar en forma de una partición giratoria. En esta realización, la unión de la tapa al recipiente fuerza a la partición a girar desde su posición original de cubrir el espacio entre la primer región y la segunda región a una posición en que ambas regiones se exponen entre sí y se permite el contacto entre la composición contenida en un espacio y el fluido corporal contenido en el otro espacio;
- h) la barrera puede ajustarse a presión, pegarse o ajustarse por calor en su lugar;
- i) el medio para cerrar el recipiente puede estar acoplado a la desestabilización de la barrera; y
- 20 j) un agente antimicrobiano que recubre el exterior del dispositivo.

Se muestra un dispositivo en las Figuras 10 y 11. Con el tapón **1** no unido al dispositivo, se aplica una muestra biológica (no mostrada) a la primera región **8** del recipiente **3**, que está separada de una segunda región **9** por el disco sellante **7**. Después de la aplicación de la muestra, se coloca el tapón **1** sobre el dispositivo y se fija mediante un mecanismo a rosca para ajustar a presión, sellando así el recipiente **3**. A medida que se enrosca el tapón (mostrado por la línea de puntos con flecha **10**, pistón **2**, que está unido al tapón **1**), se mueve hacia abajo como se muestra por la línea de puntos con flecha **11**. Este movimiento hacia abajo fuerza al émbolo **4**, que está contenido en el cuerpo de émbolo **5**, hacia abajo como se indica por la línea de puntos con flecha **12**. El movimiento hacia abajo del émbolo **4** fuerza al disco sellante **7** a girar, como se muestra por la línea de puntos con flecha **13**. El giro del disco **7** desestabiliza la barrera entre las regiones **8** y **9**, permitiendo así el contacto entre la muestra y la composición de la invención, mostrado como una disolución punteada contenida en la región **9**.

#### *Kits*

La presente invención caracteriza también kits para efectuar los procedimientos de la invención que incluyen una composición de la invención, con instrucciones para estabilizar, conservar o facilitar la recuperación de ácidos nucleicos de una muestra biológica usando el dispositivo para poner en contacto una muestra biológica con la composición.

#### *Ejemplos*

Ejemplo 1: Protocolo para la obtención de muestras de saliva a partir de sujetos capaces de seguir instrucciones.

Se instruye al sujeto a esperar durante un periodo de 20-30 minutos después de la última comida. El sujeto cepillará sus dientes sin usar pasta de dientes, si es posible. El sujeto enjuagará su boca vigorosamente con 50 ml de agua fría o templada. El sujeto escupirá entonces saliva en el tubo de recogida especial hasta que el nivel de saliva alcance la marca de 2 ml. Esto puede llevar varios minutos. Si el sujeto encuentra que es incapaz de suministrar suficiente saliva, se le dará un terrón de azúcar para masticar, y se le dirá que no se preocupe si escupe algo del azúcar al tubo.

45 Cuando se recoge la cantidad necesaria de saliva, se mezcla con 2 ml de una composición conservante de ácido nucleico. El modo preciso en que se introduzca dependerá del diseño del recipiente.

Una vez se introduce la composición, se une el tapón al recipiente y se ajusta para sellarlo firmemente. Se agita entonces vigorosamente y se completa el proceso. El ADN está ahora en un estado conservado intermedio. Puede mantenerse en estado congelado o a cualquier temperatura de hasta aproximadamente 60°C.

El recipiente puede enviarse de vuelta al laboratorio de ensayo a temperatura ambiente.

50 Ejemplo 2: Protocolo para obtener muestras de saliva de bebés, niños muy pequeños y adultos inválidos incapaces de seguir instrucciones.

5 Se introducirá un tubo o pezón de plástico en la boca, unido a una esponja, perilla de aspiración o jeringuilla pequeña, y se mantendrá en la boca durante varios minutos hasta que ocurra un babeo visible. Se dispondrá un poco de un terrón de azúcar en la boca para estimular la saliva si es necesario. El adulto responsable llevará guantes desechables proporcionados con el fin de evitar contaminación con su ADN. El adulto responsable extraerá saliva a la perilla o jeringuilla y la transferirá al recipiente de recogida. Se introduce la composición de conservación/extracción de ADN, se tapa el recipiente y se sella. Se agita vigorosamente el tubo durante 1 minuto.

Ejemplo 3: Preparación de una composición conservante de ácido nucleico.

10 La composición de la disolución conservante de ácido nucleico usada en los Ejemplos 4-6 es TRIS-HCl 33 mM, urea 0,67 M, LiCl 0,67 M, 0,6% de dodecilsulfato de sodio, CDTA 3,3 mM, 30% de etanol y ascorbato de sodio 0,25 M, todo ajustado a un pH final de 8,0. En los ejemplos, la composición se mezcla con un volumen igual de saliva. Posteriormente a estos experimentos, se ha encontrado que una composición que es TRIS-HCl 0,3 M, urea 0,67 M, NaOAc 0,67 M, 0,6% de dodecilsulfato de sodio, CDTA 3,3 mM, 30% de etanol y ascorbato de sodio 0,1 M, todo ajustado a un pH final de 8,0, estabiliza el ADN durante periodos más largos de tiempo.

15 Ejemplo 4: Extracción de ADN cromosómico mínimamente purificado a partir de saliva estimulada de 8 donantes diferentes.

20 Después de la recogida de saliva en un volumen igual que la composición como se observa en el Ejemplo 3, seguido de 14 días de almacenamiento a temperatura ambiente, se trató una porción de 0,25 ml de cada muestra de donante con proteinasa K, se centrifugó brevemente para retirar el material insoluble y se precipitó el ADN de la misma con 2 volúmenes de etanol. Se disolvió el precipitado en 0,05 ml de agua, se analizó una alícuota de 8 µl (equivalente a aproximadamente 20 µl de saliva no diluida) mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se tiñó con bromuro de etidio para visualizar el ADN (véase la Figura 1). Ha de observarse la banda característica de ADN cromosómico presente en todas las muestras en la posición de la flecha, que corresponde a la posición de ADN cromosómico extraído de eritrocitos (datos no mostrados).

Ejemplo 5: Reacción en cadena de la polimerasa “instantánea” usando ADN de saliva no estimulada

25 Se recogieron muestras de saliva estimulada el 26 de febrero de 2002 (véase la Tabla 1), se almacenaron a temperatura ambiente y se analizaron 62 días después. Se preparó ADN mínimamente purificado como sigue: se centrifugó una alícuota para retirar el material insoluble; se añadieron 2 volúmenes de etanol al sobrenadante clarificado; se recogió el precipitado que contiene ADN mediante centrifugación y se volvió a disolver en agua. Se usó para análisis un volumen de ADN vuelto a disolver equivalente a 0,05 µl de cada una de las muestras de saliva original. Se llevó a cabo la PCR instantánea usando un instrumento Roche Light Cycler, en que se añadió el tinte fluorescente SYBR verde I para seguir la reacción (véanse los resultados de la Figura 2). Se diseñaron cebadores para detectar el gen de factor IX de coagulación humano (Grant, y col., *J. Immunol. Methods* 225: 61-6, 1999). C= ADN de eritrocito altamente purificado de control. Cada curva representa los resultados usando ADN de saliva de diferentes donantes, representados por un número. Estos resultados usando PCR instantánea demuestran la idoneidad del ADN de saliva mínimamente purificado de diferentes donantes para análisis de PCR.

Ejemplo 6: Reacción en cadena de la polimerasa “instantánea” usando ADN de saliva no estimulada.

40 La Figura 3 una gráfica que muestra muestras de ADN de saliva recogidas el 25 de marzo de 2002 (véase la Tabla 1) y analizadas 30 días después según la Figura 1. Se usó ADN mínimamente purificado en la reacción en cadena de la polimerasa y las demás condiciones como se describen en los Ejemplos 4 y 5, excepto que la recogida de saliva se realizó en condiciones no estimuladas. Los números designan donantes individuales. C es ADN de control, una muestra de ADN altamente purificado purificada a partir de sangre.

45 Las Tablas 1 y 2 muestran estimaciones del ADN recuperado a partir de muestras de saliva. En todos los casos, el donante individual se ha identificado por un único número. Estos datos muestran que la cantidad de ADN que puede recuperarse de este grupo de donantes está en el intervalo de 16 µg por ml de saliva y mayor. La estimación de la cantidad de ADN por procedimientos químicos tales como DABA presenta algunos problemas y el procedimiento de ADNasa proporciona resultados más fiables.

Ejemplo 7: Estudios de estabilidad de ADN de saliva.

50 Se mezcló saliva con un volumen igual de la composición indicada y se incubó la mezcla durante el periodo de tiempo indicado a la temperatura indicada (véase la Tabla 3). Después de la incubación, se digirieron aproximadamente 40 µl de mezcla brevemente con ribonucleasa para retirar la mayoría de ARN presente en la muestra y se aplicó entonces a la hilera indicada de un gel de agarosa al 0,8%. Después de la electroforesis, se tiñó el gel con bromuro de etidio como en el Ejemplo 4.

Tabla 3.

Nº de hilera	Composición	Condiciones de incubación
1	NaOAc 0,5M, TRIS-HCl 0,2 M, ascorbato de sodio 0,15 M, CDTA 10 mM, 1% de SDS, 30% (v/v) de etanol, pH = 9,5	70°C durante 3 días y entonces 50°C durante 16 días
2	NaOAc 0,5 M, TRIS-HCl 0,2 M, CDTA 10 mM, 1% de SDS, 30% (v/v) de etanol, pH = 9,5	50°C durante 21 días
3	NaOAc 0,5 M, TRIS-HCl 0,2 M, CDTA 10 mM, 1% de SDS, 30% (v/v) de etanol, pH = 9,5	70°C durante 3 días, entonces 50°C durante 31 días
4	LiCl 0,67 M, TRIS-HCl 33 mM, urea 0,67 M, 0,6% de SDS, CDTA 3,3 mM, 30% (v/v) de etanol, pH = 8,0	20°C-25°C durante 15 meses
5	LiCl 0,67 M, TRIS-HCl 33 mM, urea 0,67 M, 0,6% de SDS, CDTA 3,3 mM, 30% (v/v) de etanol, pH = 8,0	20°C-25°C durante 15 meses
6	ADN cromosómico de control preparado a partir de eritrocitos	

Ejemplo 8: Autooxidación rápida de ascorbato en presencia de un ión de metal de transición

5 Se preparó reciente una disolución de ascorbato de sodio (100  $\mu$ M) en CB (BES 10 mM, pH 7,4, que contiene CDTA 1 mM) en condiciones aeróbicas (equilibrado con aire ambiental). Varios barridos espectrofotométricos durante 30 minutos a temperatura ambiente no mostraron cambios en el perfil de absorbancia (similar al barrido (1)). El barrido (2) se tomó 3 minutos después de la adición de unos pocos cristales de  $MnCl_2$ . Los resultados pueden observarse en la Figura 6. Como se muestra, el ascorbato 100  $\mu$ M a pH neutro tiene una absorbancia ( $\lambda_{m\acute{a}x}$  = 265 nm) de aproximadamente 1,25 (correspondiente al coeficiente de extinción molar ( $A_M$ ) esperado de aproximadamente 12.500). Tras la adición, el metal de transición, cloruro manganoso, catalizó la autooxidación de ascorbato, que puede controlarse convenientemente mediante la reducción de la absorbancia a  $\lambda$  = 265 nm (Buettner, *Free Radic. Res. Commun.* 10: 5-9, 1990).

Ejemplo 9: Autooxidación espontánea de ascorbato

15 Se tomaron barridos repetidos en los puntos temporales indicados de una alícuota de la disolución de ascorbato de sodio 100  $\mu$ M preparada en el Ejemplo 8, antes de la adición de  $MnCl_2$ . Se expuso la muestra al aire y se mantuvo a temperatura ambiente entre barridos. Los resultados se ilustran en la Figura 7, e indican que la autooxidación de ascorbato que ocurre a pH 7,4 puede ocurrir durante un periodo prolongado de tiempo en presencia de bajas concentraciones (1 mM) de CDTA, un quelante "fuerte".

Ejemplo 10: Estabilidad de ascorbato de sodio en una composición conservante de ácido nucleico

20 Se preparó una disolución madre de ascorbato de sodio (250 mM) en una disolución que contenía Tris-HCl 30 mM, pH 8,0, 30% de etanol, CDTA 3 mM. Se retiraron 20  $\mu$ l en los momentos indicados, se mezclaron con 50 ml de CB (véase el Ejemplo 8) y se leyó inmediatamente la absorbancia a 265 nm. Se mantuvo la disolución madre a temperatura ambiente. Los resultados se muestran en la Figura 8.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de conservación de ADN contenido en esputo que comprende las etapas de:
  - a. obtener esputo a partir de un sujeto,
  - b. poner en contacto dicho esputo con una composición que comprende un agente quelante y un agente desnaturalizante, en el que el pH de dicha composición es mayor de 5,0, formando una disolución que contiene ADN; y
  - c. almacenar dicho ADN a temperatura ambiente,

en el que dicho agente quelante se selecciona del grupo constituido por ciclohexanodiaminotetraacetato (CDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA), ácido tetraazaciclotetradecanotetraacético (TETA) y desferrioxamina.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho esputo es saliva.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho esputo es de un mamífero.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho ADN es de un virus o una bacteria.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho ADN es estable durante más de 14 días, más de 30 días, más de 60 días o más de 360 días.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho agente desnaturalizante se selecciona de dodecilsulfato de sodio y un alcohol, en el que dicho alcohol es un 10-60% de la composición total.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de recuperar dicho ADN poniendo en contacto dicha disolución que contiene ADN con una proteasa, opcionalmente en el que la proteasa está en forma desecada.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicha proteasa es proteinasa K.
9. Un kit para conservar ADN a temperatura ambiente, comprendiendo dicho kit:
  - a. una composición que comprende un agente desnaturalizante y un agente quelante; seleccionado del grupo constituido por ciclohexanodiaminotetraacetato (CDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA), ácido tetraazaciclotetradecanotetraacético (TETA) y desferrioxamina, en el que el pH de dicha composición es mayor de 5,0; y
  - b. un recipiente que comprende una primera región para recoger una muestra de dicho ADN y, separada por una barrera desestabilizable de dicha primera región, una segunda región para contener dicha composición.
10. El kit de la reivindicación 9, en el que dicha composición es una disolución acuosa.
11. El kit de la reivindicación 9, en el que dicha composición comprende adicionalmente un agente reductor.
12. El kit de la reivindicación 9, en el que dicho agente desnaturalizante se selecciona del grupo constituido por: urea, una sal de dodecilsulfato, cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, perclorato y un alcohol, siendo dicho alcohol un 10-60% del volumen de composición total.
13. El kit de la reivindicación 9, en el que dicho agente desnaturalizante es dodecilsulfato de sodio.
14. El kit de la reivindicación 12, en el que dicho alcohol se selecciona del grupo constituido por: metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, trifluoroetanol, fenol y 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol.
15. El kit de la reivindicación 11, en el que la concentración de dicho agente reductor es mayor o igual a 50 mM.
16. El kit de la reivindicación 11, en el que dicho agente reductor es un secuestrante de radicales libres antioxidante.
17. El kit de la reivindicación 16, en el que dicho secuestrante de radicales libres se selecciona del grupo de compuestos constituido por: una vitamina antioxidante, una hormona antioxidante, una enzima antioxidante, un tiol y un fenol.
18. El kit de la reivindicación 11, en el que el agente reductor se selecciona del grupo constituido por ácido ascórbico, ditionito, eritorbato, *N*-acetilcisteína, cisteína, glutatión, ditiotreitól, 2-mercaptoetanol, dieritritol, un tiol soportado en resina, una fosfina soportada en resina, vitamina E y Trolox o sales de los mismos.

19. El kit de la reivindicación 9, en el que dicho agente quelante inhibe el ciclo redox de metales.
20. El kit de la reivindicación 9, en el que dicho pH está entre 5,0 y 11,0 inclusive, entre 6,5 y 7,5 inclusive, o es de aproximadamente 7,0.
21. El kit de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente un agente antimicrobiano.
- 5 22. El kit de la reivindicación 21, en el que dicho agente antimicrobiano comprende un alcohol.
23. El kit de la reivindicación 22, en el que dicho alcohol es etanol.
24. El kit de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente un inhibidor de ribonucleasa.
25. El kit de la reivindicación 24, en el que dicho inhibidor se selecciona del grupo constituido por heparina, sulfato de heparano, ácido oligo(vinilsulfónico), ácido poli(vinilsulfónico), ácido oligo(vinilfosfónico) y ácido poli(vinilsulfúrico) o sales de los mismos.
- 10 26. El kit según la reivindicación 9, que comprende adicionalmente una proteasa para recuperar dicho ADN, estando opcionalmente dicha proteasa en forma secada.
27. El kit según la reivindicación 26, en el que dicha proteasa es proteinasa K.
- 15 28. Un procedimiento de conservación de ADN en un fluido corporal o tejido que contiene mucina y de reducción de la viscosidad de dicho fluido corporal o tejido que contiene mucina, que comprende las etapas de
- a. obtener esputo a partir de un sujeto;
- b. poner en contacto dicho esputo con una composición que comprende un agente quelante y un agente desnaturalizante, en el que
- el pH de dicha composición es mayor de 5,0 cuando se pone en contacto con dicho esputo, formando una disolución que contiene ADN; y
- 20 c. almacenar dicho ADN a temperatura ambiente;
- en el que dicho agente quelante se selecciona del grupo constituido por ciclohexanodiaminotetraacetato (CDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA), ácido tetraazaciclotetradecanotetraacético (TETA) y desferrioxamina.
- 25 29. El procedimiento según la reivindicación 28, en el que dicho ADN es estable durante más de 14 días, más de 30 días, más de 60 días o más de 360 días.
30. El procedimiento de la reivindicación 28, en el que dicho fluido corporal es esputo.
31. El procedimiento de la reivindicación 28, que comprende adicionalmente la recuperación de dicho ADN.
32. Un procedimiento de recuperación de ADN de esputo que comprende las etapas de:
- 30 a. obtener esputo a partir de un sujeto;
- b. conservar el ADN en dicho esputo usando el kit según la reivindicación 26, poner en contacto dicho esputo con la composición formando una mezcla y poner en contacto la mezcla con la proteasa en forma desecada; y
- c. recuperar dicho ADN de dicha mezcla.
- 35 33. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que dicho esputo es saliva.
34. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que dicho esputo es de un mamífero.
35. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que dicha proteasa es proteinasa K o pronasa.
- 40 36. Uso de una composición para conservar el ADN de una muestra de esputo a temperatura ambiente, en el que dicha composición comprende un agente quelante y un agente desnaturalizante y tiene un pH mayor de 5,0 cuando se pone en contacto con dicho esputo, y en el que dicho agente quelante se selecciona del grupo constituido por ciclohexanodiaminotetraacetato (CDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA), ácido tetraazaciclotetradecanotetraacético (TETA) y desferrioxamina.
37. El uso según la reivindicación 36, en el que dicho ADN es estable durante más de 14 días, más de 30 días, más de 60 días o más de 360 días.



38. El uso según la reivindicación 36, en el que la composición comprende adicionalmente un agente reductor.
39. El uso según la reivindicación 36, en el que dicho agente desnaturizante se selecciona de dodecilsulfato de sodio y un alcohol, en el que dicho alcohol es un 10-60% de la composición total.
- 5 40. El uso según la reivindicación 36, en el que dicha composición comprende adicionalmente una proteasa para recuperar dicho ADN.
41. El uso según la reivindicación 40, en el que dicha proteasa es proteinasa K.
42. Un procedimiento de conservación de ADN contenido en esputo a temperatura ambiente que comprende las etapas de:
- 10 a. obtener esputo a partir de un sujeto; y
- b. poner en contacto dicho esputo con una composición que comprende LiCl 0,67 M, TRIS-HCl 33 mM, urea 0,67 M, 0,6% de SDS, CDTA 3,3 mM, 30% (v/v) de etanol, en el que el pH de dicha composición es 8,0; y
- c. mezclar dicha disolución que contiene ADN con una proteasa.
43. Un procedimiento de conservación de ADN contenido en esputo a temperatura ambiente que comprende las etapas de:
- 15 a. obtener esputo a partir de un sujeto; y
- b. poner en contacto dicho esputo con una composición que comprende NaOAc 0,5 M, TRIS-HCl 0,2 M, CDTA 10 mM 1% de SDS, 30% (v/v) de etanol, en la que el pH de dicha composición es de 9,5; y
- c. mezclar dicha disolución que contiene ADN con una proteasa.
- 20 44. Un procedimiento de conservación de ADN contenido en esputo a temperatura ambiente que comprende las etapas de:
- a. obtener esputo a partir de un sujeto; y
- b. poner en contacto dicho esputo con una composición que comprende NaOAc 0,5 M, TRIS-HCl 0,2 M, ascorbato de sodio 0,15 M, CDTA 10 mM, 1% de SDS, 30% (v/v) de etanol, en la que el pH de dicha composición es de 9,5; y
- 25 c. mezclar dicha disolución que contiene ADN con una proteasa.
45. El procedimiento según la reivindicación 42, 43 o 44, en el que dicho ADN es estable durante más de 14 días, más de 30 días, más de 60 días o más de 360 días.
- 30 46. Una composición para conservar ADN a temperatura ambiente que comprende un agente desnaturizante y un agente quelante seleccionado del grupo constituido por ciclohexanodiaminotetraacetato (CDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido tetraazaciclododecanotetraacético (DOTA), ácido tetraazaciclodecanotetraacético (TETA) y desferrioxamina,
- en la que el pH de dicha composición es mayor de 5,0.
47. La composición de la reivindicación 46, en la que dicha composición es una disolución acuosa.
- 35 48. La composición de la reivindicación 46, en la que dicha composición comprende adicionalmente un agente reductor.
49. La composición de la reivindicación 46, en la que dicho agente desnaturizante se selecciona del grupo constituido por: urea, una sal de dodecilsulfato, cloruro de guanidinio, tiocianato de guanidinio, perclorato y un alcohol, siendo dicho alcohol un 10-60% del volumen de composición total.
- 40 50. La composición de la reivindicación 46, en la que dicho agente desnaturizante es dodecilsulfato de sodio.
51. La composición de la reivindicación 49, en la que dicho alcohol se selecciona del grupo constituido por metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, trifluoroetanol, fenol y 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol.
52. La composición de la reivindicación 48, en la que la concentración de dicho agente reductor es mayor o igual a 50 mM.
- 45 53. La composición de la reivindicación 48, en la que dicho agente reductor es un secuestrante de radicales libres antioxidante, en la que dicho secuestrante de radicales libres antioxidante se selecciona opcionalmente del

grupo de compuestos constituido por: una vitamina antioxidante, una hormona antioxidante, una enzima antioxidante, un tiol y un fenol.

54. Una composición de la reivindicación 48, en la que el agente reductor se selecciona del grupo constituido por: ácido ascórbico, ditionito, eritorbato, *N*-acetilcisteína, cisteína, glutatión, ditioneol, 2-mercaptoetanol, dieritritol, un tiol soportado en resina, una fosfina soportada en resina, vitamina E y Trolox, o sales de los mismos.
55. La composición de la reivindicación 46, en el que dicho agente quelante inhibe ciclos rédox de metales.
56. La composición de la reivindicación 46, en la que dicho pH está entre 5,0 y 11,0 inclusive, entre 6,5 y 7,5 inclusive o es de aproximadamente 7,0.
57. La composición de la reivindicación 46, que comprende adicionalmente:
- 10 (a) un agente antimicrobiano; en el que dicho agente antimicrobiano comprende opcionalmente un alcohol, y preferiblemente en el que dicho alcohol es etanol; o
- (b) un inhibidor de ribonucleasa; en el que dicho inhibidor se selecciona opcionalmente del grupo constituido por heparina, sulfato de heparano, ácido oligo(vinilsulfónico), ácido poli(vinilsulfónico), ácido oligo(vinilfosfónico) y ácido poli(vinilsulfúrico) o sales de los mismos.

# FIG. 1

N° de donante

1 2 3 4 5 6 7 9

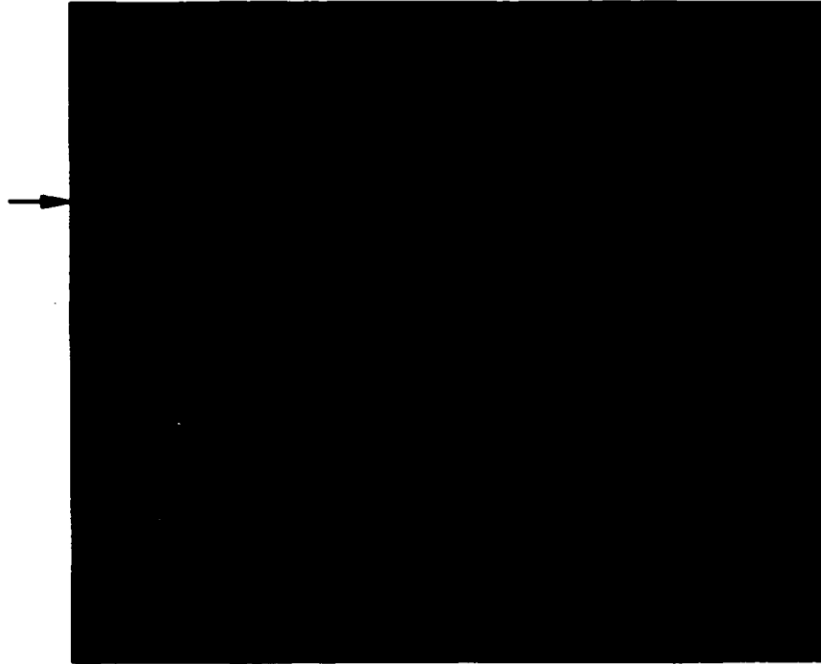


FIG. 2

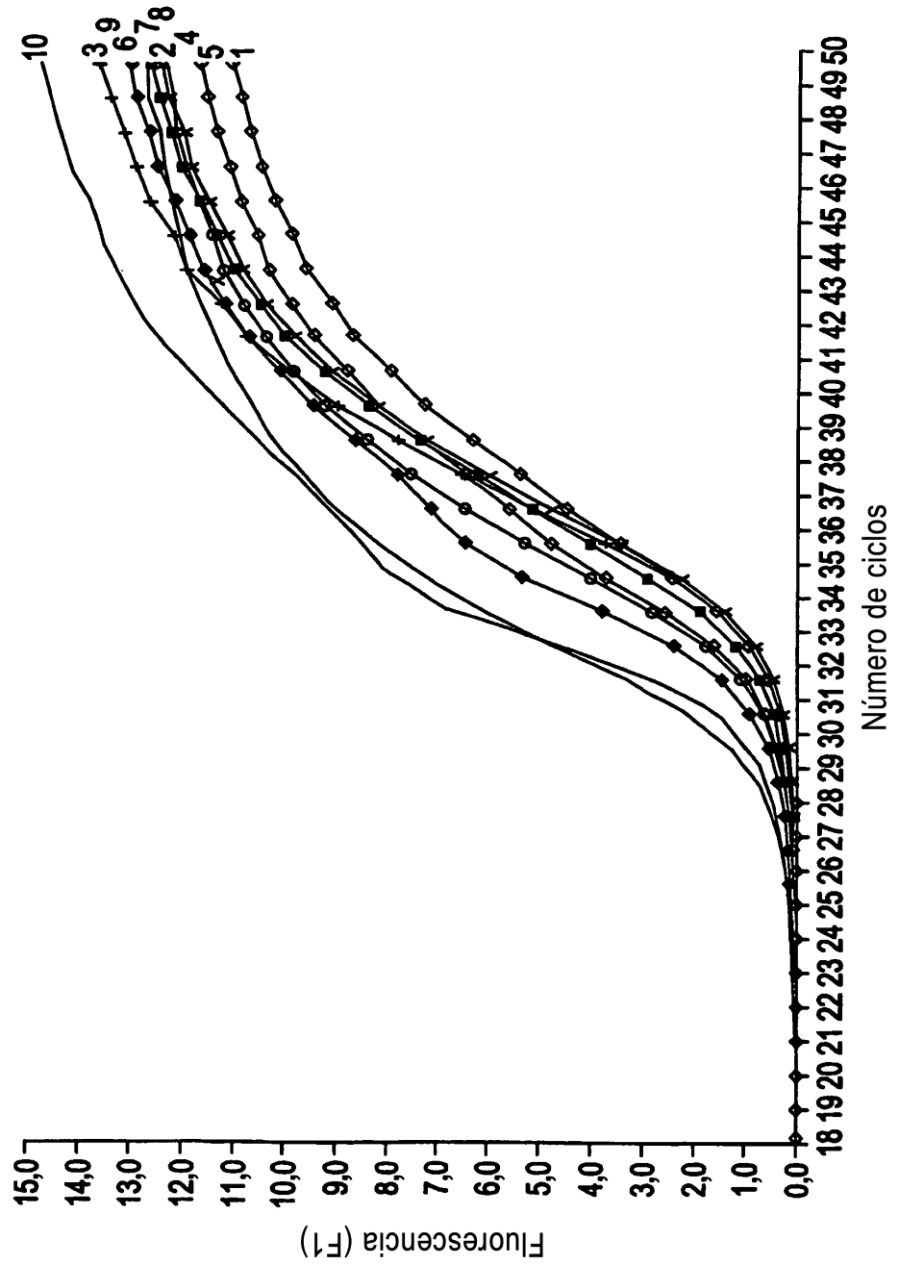


FIG. 3

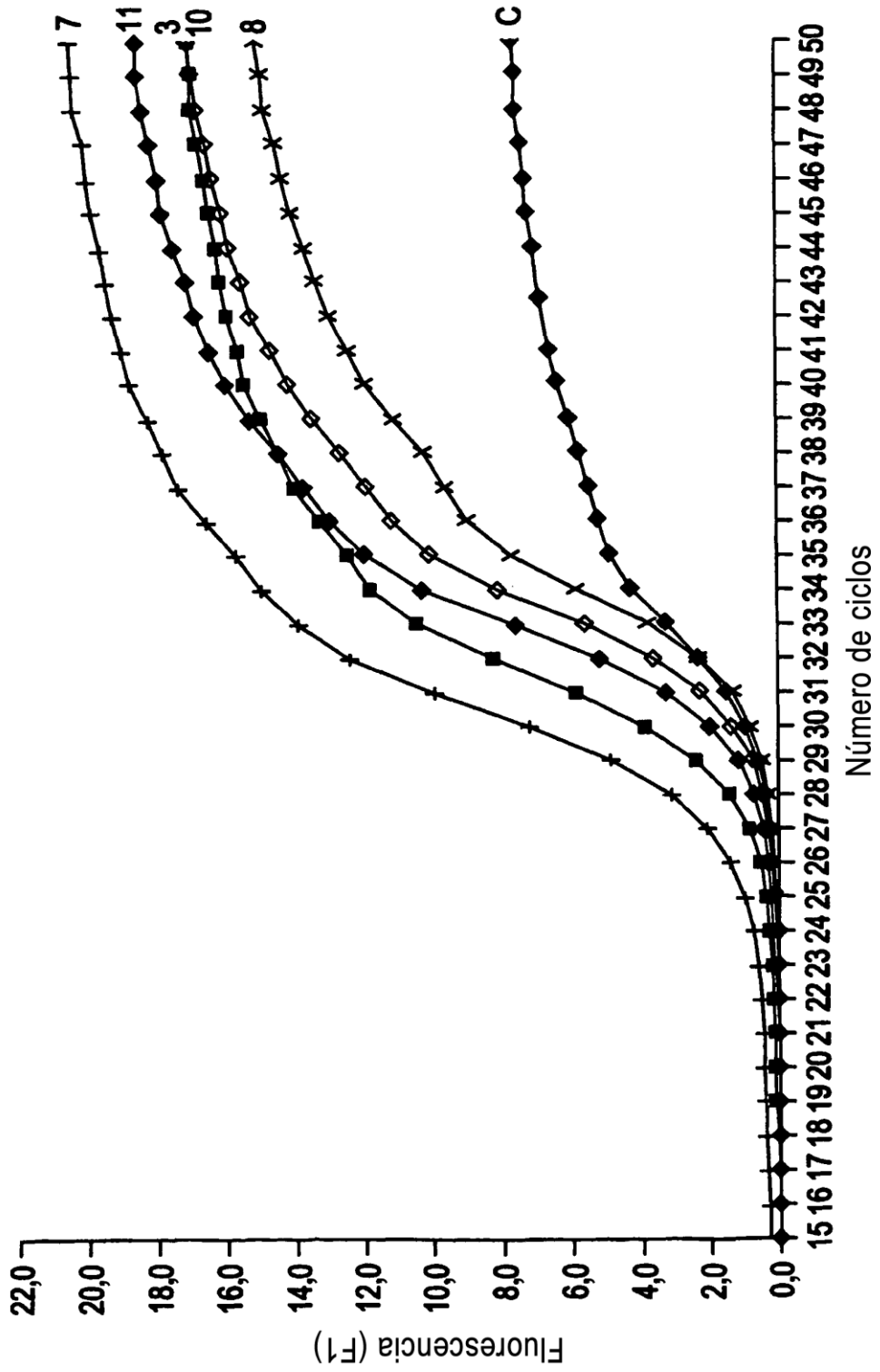


FIG. 4

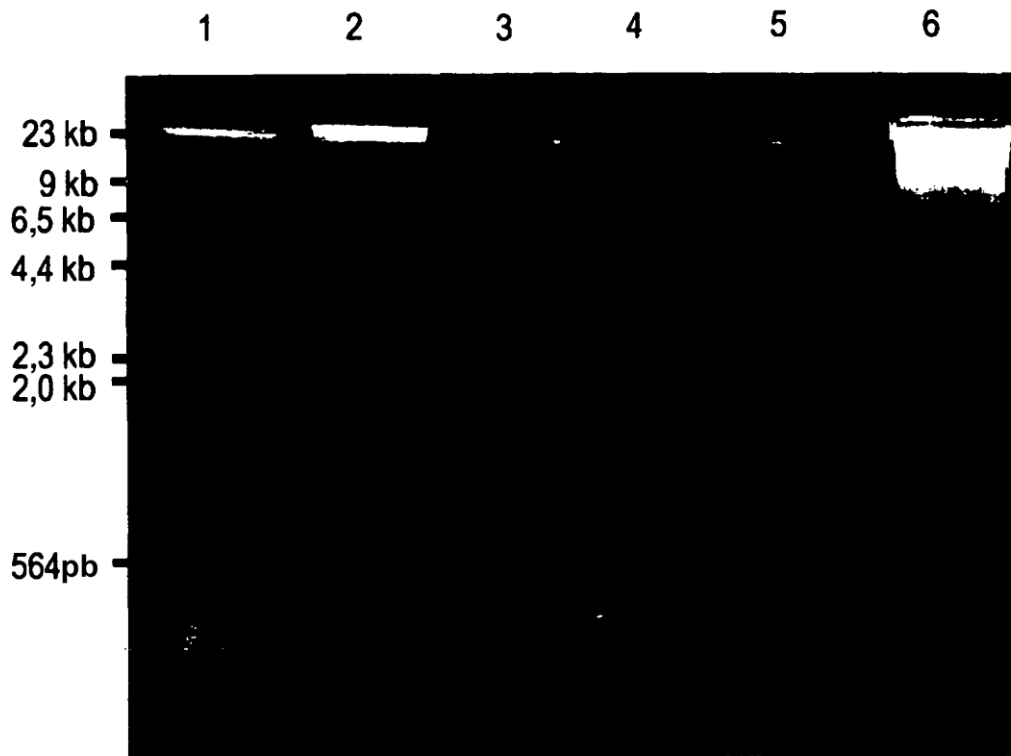
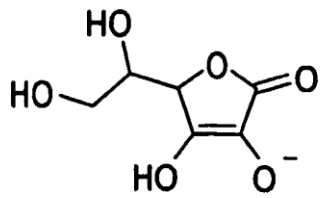
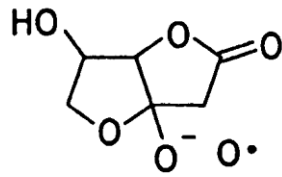


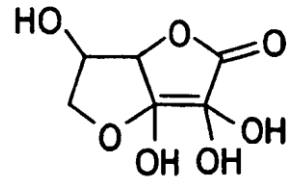
FIG. 5



Anión ascorbato



Radical ascorbato



Ácido deshidroascórbico

FIG. 6

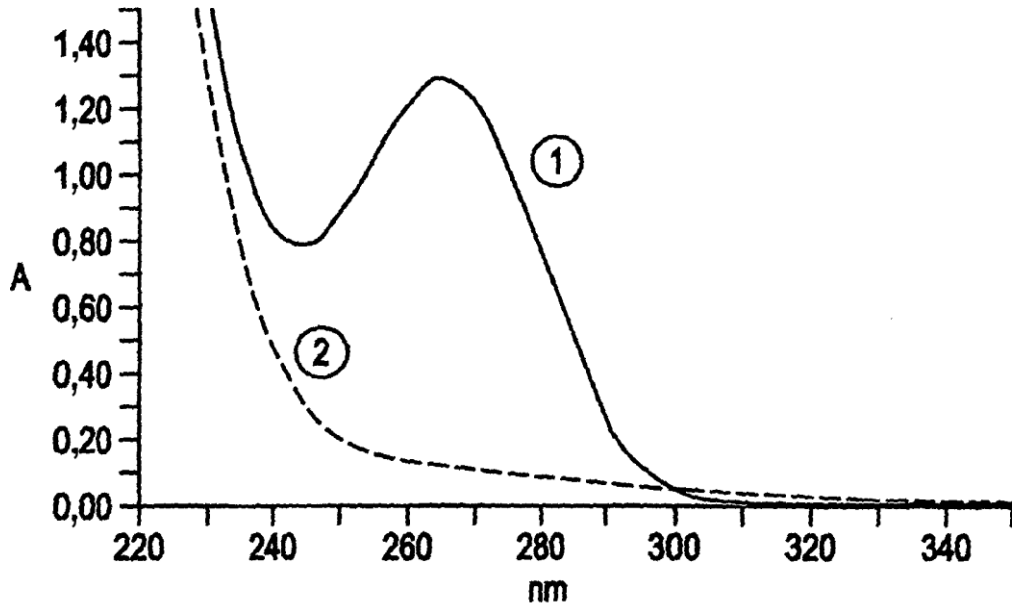




FIG. 7

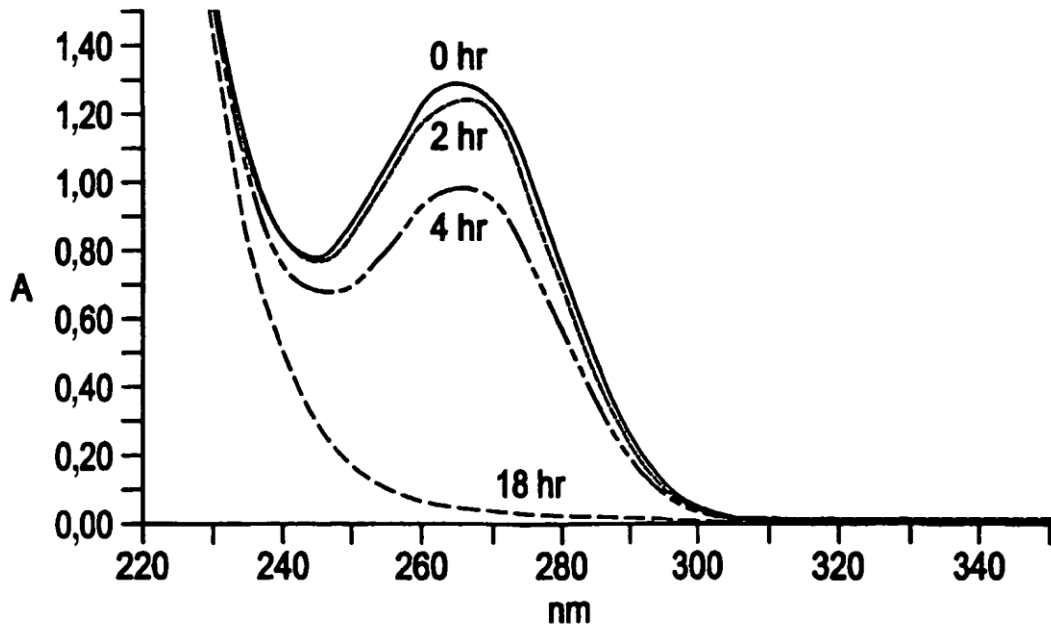
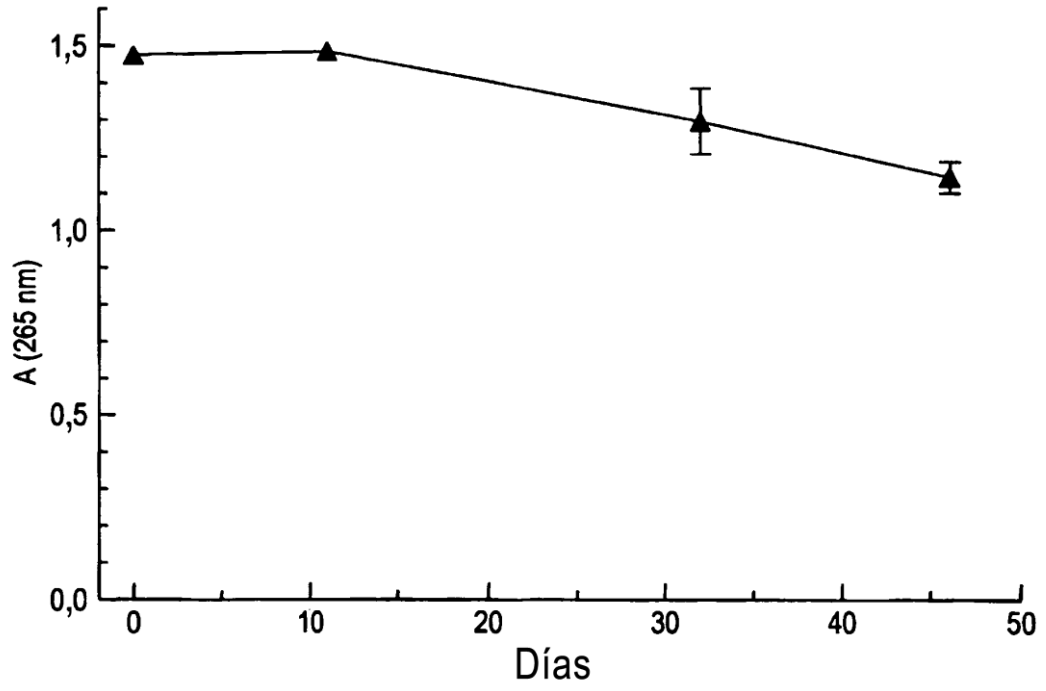
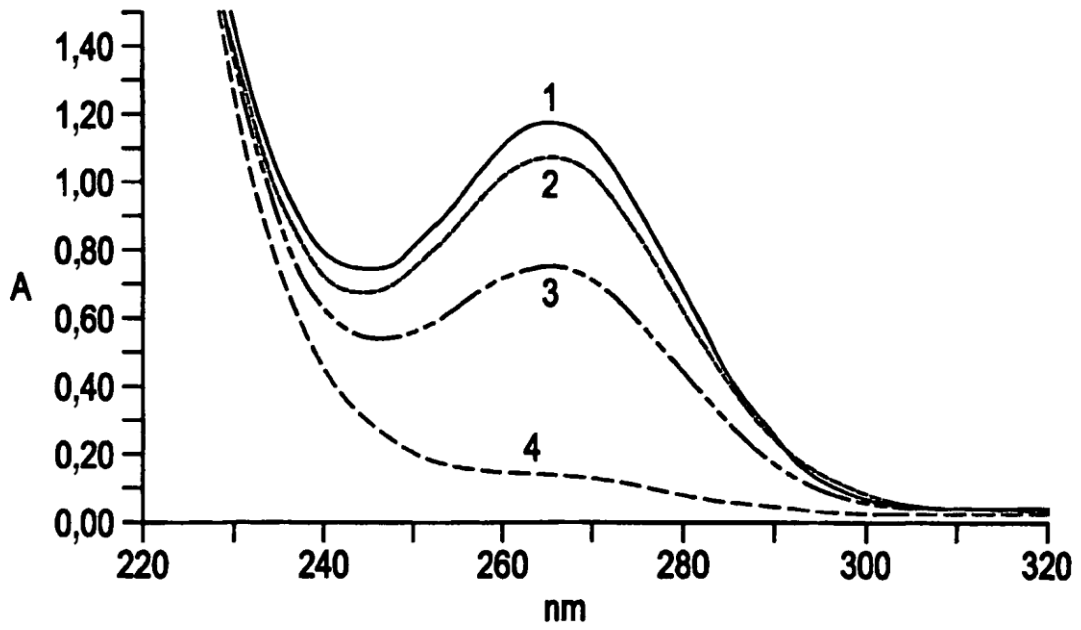


FIG. 8



**FIG. 9**



**FIG. 10**

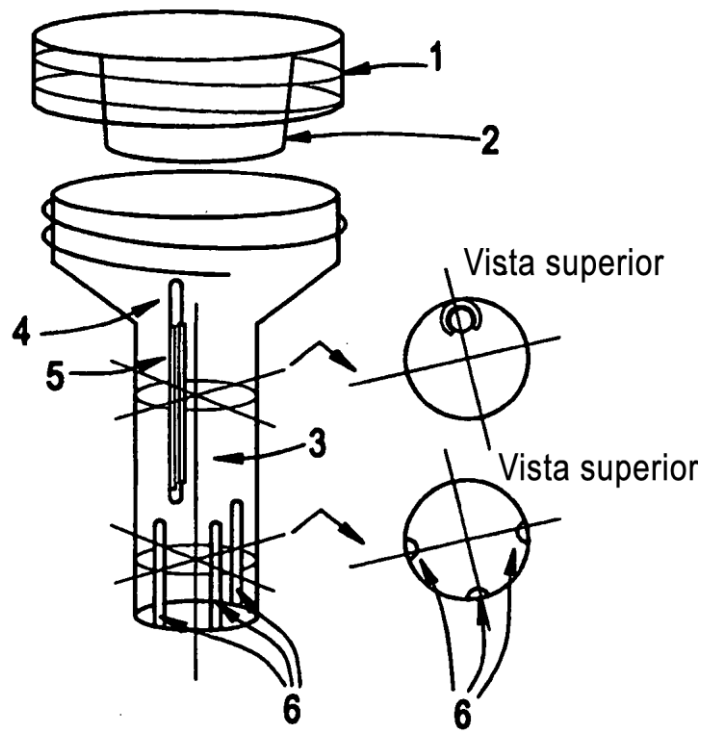


FIG. 11

