



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 186**

51 Int. Cl.:

A01N 59/16 (2006.01)

A01N 31/14 (2006.01)

A01N 57/16 (2006.01)

A01N 31/02 (2006.01)

A01N 43/78 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

A01N 43/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06742300 .4**

96 Fecha de presentación : **02.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1881763**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.11.2006**

54

Título: **Disoluciones de descontaminación y su uso para la desnaturalización, modificación, degradación, solubilización y eliminación de proteínas, moléculas de ácido nucleico y microorganismos.**

30

Prioridad: **30.04.2005 DE 10 2005 020 327**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.08.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.08.2011

73

Titular/es: **MULTIBIND BIOTEC GmbH
Gottfried-Hagen-Strasse 60-62
51105 Köln, DE**

72

Inventor/es: **Lisowsky, Thomas;
Esser, Karlheinz y
Lisowsky, Richard**

74

Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

ES 2 364 186 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).

DESCRIPCION

Disoluciones de descontaminación y su uso para la desnaturalización, modificación, degradación, solubilización y eliminación de proteínas, moléculas de ácido nucleico y microorganismos

5 La invención se refiere a una disolución de descontaminación para el tratamiento de superficies que están contaminadas con proteínas, moléculas de ácido nucleico o microorganismos no deseados. La invención se refiere además al uso de esta disolución de descontaminación y a un sistema tampón adecuado para ello.

10 Debido al frenético desarrollo de la biología molecular cada vez son más importantes técnicas de trabajo para la detección y amplificación de moléculas de ADN o proteínas [Sambrook, J. *et al.*, eds (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.]. Ejemplos actuales se refieren por ejemplo a diagnóstico clínico, procedimientos de identificación forense e investigaciones biomédicas.

Con el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son posibles incluso detecciones de moléculas individuales. Un nuevo problema de este refinamiento extremo de los métodos de detección es la contaminación de superficies en laboratorios, en aparatos o materiales de trabajo con moléculas de ácido nucleico, proteínas o microorganismos no deseados.

15 Las contaminaciones microbianas originan además grandes problemas y pérdidas comerciales por ejemplo en el campo de la tecnología de los alimentos, en la producción, en hospitales, institutos de higiene y también en el hogar.

Estado de la técnica

20 Desde hace tiempo existen por tanto las más diversas disoluciones de descontaminación con sustancias químicas agresivas tales como por ejemplo formaldehído, alcoholes, fenoles, azida de sodio, hipocloruro de sodio contra microorganismos o agentes oxidantes fuertes, tales como por ejemplo hipocloruro, blanqueadores o ácidos minerales, que desnaturalizan proteínas y modifican ácidos nucleicos y hacen que sean no amplificables para métodos de amplificación tales como por ejemplo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), traslado de mellas con polimerasa Klenow, amplificación por desplazamiento de cadena, reacción en cadena de la ligasa, amplificación mediada por transcripción, amplificación por círculo rodante y muchas otros.

25 A este respecto los agentes oxidantes y productos químicos fuertemente agresivos usados para la descontaminación originan una modificación y desnaturalización permanente de las proteínas y la desestabilización de la doble cadena y modificaciones que bloquean una amplificación. En general resultan a este respecto modificaciones en grupos especialmente reactivos de las moléculas y daños oxidativos.

30 Por esto tales disoluciones químicas agresivas se usan en general para el lavado y fregado de aparatos, instrumentos y superficies de trabajo.

A este respecto, son desventajas de estas disoluciones y métodos en cada caso las eficacias sólo selectivas contra proteínas, ADN o microorganismos y la eliminación incompleta de todos los ácidos nucleicos, la conservación de las moléculas modificadas, la degradación sólo parcial y la agresividad de los productos químicos usados contra los aparatos, instrumentos, superficies y también la piel y las mucosas del usuario.

35 Una mejora gradual de la eficacia de este método se obtuvo con la combinación de las disoluciones con sustancias tensioactivas. Pero también con esto las sustancias químicas agresivas y la incompleta destrucción y eliminación de los ácidos nucleicos, proteínas y microorganismos siguen siendo problemáticas.

40 El interés comercial en tales disoluciones pone de relieve la ya amplia distribución comercial de disoluciones de descontaminación de ADN y proteínas correspondientes y agentes antimicrobianos con los más diversos nombres comerciales.

Por el documento DE-A-19 936 428 se conoce por ejemplo un bactericida, que contiene iones hierro (III) (Fe^{3+}), ácido L-ascórbico y uno o varios miembros del grupo que consiste en ácido sórbico, ácido benzoico y éster del ácido para-hidroxibenzoico. El efecto bactericida de esta composición puede reforzarse por ejemplo mediante la adición de una pequeña cantidad de un agente tensioactivo.

45 Las desventajas de estas disoluciones de descontaminación y métodos conocidos son sus efectos sólo limitados contra distintas moléculas biológicas tales como o bien proteínas o bien ácidos nucleicos o un efecto sólo antimicrobiano y sus efectos químicos en parte muy agresivos con propiedades perjudiciales para la salud. Especialmente para la descontaminación de microorganismos existen hasta hoy sólo agentes que provocan la muerte, pero que no inactivan ni destruyen la información genética, el factor genético extracromosómico y proteínas.

50 Se sabe que en cantidades fisiológicas de concentraciones micromolares, antioxidantes en combinación con iones metálicos divalentes pueden conducir ocasionalmente a daños y roturas de cadenas parciales en moléculas de ácido nucleico (Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J.H., Chen S., Corpe C., Dutta A, Dutta SK y Levine M. (2003) Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.* 1, 18-35;

Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. (2003) Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals Botany* 91:179-194; Veal J. M., Merchant K. y Rill R. L. (1991) The influence of reducing agent and 1,10-phenanthroline concentration on DNA cleavage by phenanthroline + copper. *Nucl Acids Res* Vol. 19, N.º 12, 3383-3388). Sin embargo éstos son sólo resultados aislados, ocasionales, que sólo puede aplicarse al caso individual respectivo.

5 Los nuevos conocimientos de la biología molecular moderna e ingeniería genética muestran que ya la información genética sola, genes individuales o incluso partes de los mismos, así como determinadas proteínas son suficientes para desencadenar enfermedades o para provocar cambios genéticos indeseados.

10 Por tanto, en la práctica existe la necesidad de procedimientos, agentes, métodos y disoluciones mejorados para una descontaminación eficaz y sobre todo completamente cuidadosa de superficies y aparatos de proteínas, ácidos nucleicos y microorganismos.

Resumen de la invención

Por tanto, el objetivo de la presente invención es vencer las desventajas del estado de la técnica y desarrollar nuevos procedimientos y disoluciones, que no trabajen con productos químicos agresivos o agentes fuertemente oxidantes y además descontaminen completamente los sustratos tratados.

15 Este objetivo se soluciona según la invención mediante una disolución de descontaminación, que contiene al menos una mezcla sinérgica de

a) al menos una vitamina en cantidades de desde 10 mM hasta 100 mM,

b) al menos un ion metálico en cantidades de desde 1 mM hasta 100 mM y

20 c) al menos un compuesto tensioactivo en cantidades de desde el 0,1% hasta el 10% en peso de la disolución total.

25 Con el uso de antioxidantes naturales en combinación con iones metálicos y sustancias tensioactivas se ha comprobado sorprendentemente que las más diversas vitaminas en combinación con iones metálicos y detergentes conducen a roturas de cadena y modificaciones masivas, extremadamente rápidas, en moléculas de ácido nucleico y proteínas. Este efecto sorprendente conduce a una muerte eficaz de los microorganismos mediante la inactivación y destrucción de su información genética y proteínas. Especialmente sorprendente y novedoso es el hallazgo de que con el sistema de tres componentes según la invención la inactivación y degradación transcurre esencialmente con la misma eficacia en todo el intervalo de pH de desde 2 hasta 8,5. Dado que puede trabajarse en un intervalo de pH suave en comparación, la disolución según la invención cuida las superficies que van a tratarse de manera ventajosa y además es compatible con la piel del usuario. Pulverizando, extendiendo o sumergiendo en la disolución los tres componentes, se desnaturalizan, solubilizan, inactivan, degradan y eliminan proteínas y ácidos nucleicos y con ello se destruyen entonces también microorganismos de manera muy eficaz.

30 En una configuración ventajosa de la invención se prevé que la mezcla presente un valor de pH en el intervalo de desde 3 hasta 7, preferiblemente desde 4 hasta 6. En estos intervalos de pH la disolución según la invención es estable durante periodos de tiempo mayores y posibilitan una degradación especialmente eficaz de los ácidos nucleicos. Además, en el intervalo de desde pH 4 hasta 6 la compatibilidad con la piel de la disolución según la invención es óptima.

35 Se prefiere especialmente una forma de realización ventajosa en la que la mezcla contiene adicionalmente un sistema tampón con carbonatos y derivados del ácido succínico, preferiblemente en cada caso en una concentración de desde 1 mM hasta 500 mM. Con el uso de este sistema tampón según la invención en la disolución de contaminación según la invención, el valor de pH de la disolución, que se encuentra en el intervalo fuertemente ácido debido a los componentes disueltos, en particular a las vitaminas ácidas, puede elevarse fácilmente hasta por ejemplo el intervalo neutro o débilmente básico, sin que precipiten los iones metálicos disueltos.

40 En una forma de realización preferida de la disolución de contaminación según la invención las vitaminas contenidas según la invención o sus sales o derivados ácidos son uno o varios compuestos y/o sus sales seleccionados del grupo de las vitaminas solubles en agua con las propiedades de los antioxidantes, tales como preferiblemente vitamina C, riboflavina y niacina. Se utilizan en cantidades de desde 10 mM hasta 100 mM con respecto a la disolución total.

45 En una forma de realización preferida adicional de la disolución de contaminación según la invención los iones metálicos contenidos según la invención son iones bi y/o trivalentes de los metales del 4º periodo y/o los subgrupos I, II y VIII del sistema periódico de los elementos. Se utilizan en forma de sus sales con ácidos o bases orgánicos y/o inorgánicos ácidos. Según la invención se prefieren uno o varios compuestos seleccionados del subgrupo VIII, en particular hierro, cobalto níquel, cobre o zinc. Se utilizan en cantidades de desde 1 mM hasta 100 mM, con respecto a la disolución total, en particular en cantidades de desde 5 mM hasta 10 mM.

5 Las sustancias tensioactivas contenidas según la invención pueden ser por ejemplo tensioactivos inertes aniónicos, no iónicos, anfóteros o catiónicos o mezclas adecuadas entre sí o unos con otros. En particular pueden utilizarse alquiletersulfatos, alquil- y/o arilsulfonatos, alquilsulfatos, tensioactivos anfóteros, betaínas, alquilamidoalquilaminas, aminoácidos alquilsustituídos, iminoácidos alquilsustituídos, aminoácidos acilados, combinaciones de tensioactivos anfóteros. Fundamentalmente son adecuados todos los tensioactivos inertes. Inerte significa que no influye ni en la disolución sinérgica ni en el resultado del ensayo. Según la invención se prefieren tensioactivos aniónicos y no iónicos. Se utilizan en cantidades de desde el 0,1% hasta el 10% en peso, con respecto a la disolución total, en particular en cantidades de desde el 0,2% hasta el 0,5% en peso.

10 Las disoluciones de descontaminación según la invención pueden contener adicionalmente excipientes y aditivos inertes habituales adicionales tales como por ejemplo sustancias tampón adecuadas para el ajuste de un valor de pH definido tal como por ejemplo Tris (tris(hidroximetil)-aminometano), MES (ácido 2(morfolino)etanosulfónico), HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinil]-etanosulfónico y/o MOPS (ácido 3-(N-morfolino)-propanosulfónico). Estas sustancias tampón también se utilizan en cantidades de desde 1 mM hasta 500 mM con respecto a la disolución total.

15 El efecto eficaz del nuevo sistema de tres componentes es tan más sorprendente, ya que como queda comprobado, los componentes individuales respectivos no muestran ningún efecto degradante particular y además las razones de mezclado fuera del intervalo según la invención no actúan o sólo de manera insuficiente. En primer lugar la combinación de las vitaminas con iones metálicos y detergentes, preferiblemente en una razón de mezclado adecuada, conduce a un efecto sinérgico y a una degradación masiva y muy rápida de las biomoléculas. En particular manteniendo las correctas concentraciones preferidas se garantiza una eficacia eficaz de la disolución de contaminación según la invención. Fundamentalmente pueden tratarse de ese modo todas las superficies de manera muy cuidadosa para la eliminación de contaminaciones por ácidos nucleicos, proteínas y microorganismos.

20 La descontaminación tiene lugar por regla general mediante pulverización o extensión de la disolución según la invención sobre superficies contaminadas o mediante remojo. Como tiempo de acción son suficientes en general de 0,5 a 2 minutos a temperatura ambiente o temperatura débilmente elevada para la completa desnaturalización, modificación, degradación, solubilización y eliminación de proteínas, moléculas de ácido nucleico y microorganismos de superficies. Los procedimientos empleados pueden variar sin embargo, y pueden adaptarse a los respectivos requisitos.

25 Un objeto adicional de la invención es el uso de las disoluciones de descontaminación según la invención para la desnaturalización, modificación, degradación, solubilización y eliminación de proteínas y moléculas de ácido nucleico de superficies.

30 El nuevo sistema tampón ventajoso, con carbonatos y derivados del ácido succínico es especialmente adecuado para la disolución de descontaminación según la invención. Las distintas mezclas con valores de pH de entre pH 2 y 8,5 producen en cada caso disoluciones transparentes de ligeramente amarillentas a pardas, que son estables durante periodos de tiempo mayores y en particular en el intervalo de pH 4 a pH 6 producen una degradación muy eficaz de las moléculas de ADN, tal como muestra la comparación con el ácido fosfórico 0,5 M mineral de pH 1,5 en la figura 5.

35 En una configuración ventajosa del sistema tampón según la invención se prevé que los carbonatos y derivados del ácido succínico están contenidos en cada caso en una concentración de desde 1 mM hasta 500 mM.

40 La disolución con el sistema tampón puede ajustarse de manera ventajosa a un valor de pH en el intervalo de desde 2 hasta 8,5, en particular desde 3 hasta 7, preferiblemente desde 4 hasta 6. Con ello se garantiza que el resto de componentes disueltos en la disolución no se ven afectados y además puede prepararse una disolución compatible con la piel.

Por tanto, la invención se refiere también a un procedimiento para ajustar el valor de pH de una disolución que contiene al menos una mezcla de

- 45 a) al menos una vitamina en cantidades de desde 10 mM hasta 100 mM,
 b) al menos un ion metálico en cantidades de desde 1 mM hasta 100 mM y
 c) al menos un compuesto tensioactivo en cantidades de desde el 0,1% hasta el 10% en peso de la disolución total, pudiendo ajustarse la mezcla por medio del sistema tampón según la invención a un valor de pH en el intervalo de desde 2 hasta 8,5, en particular desde 3 hasta 7, preferiblemente desde 4 hasta 6.

Breve descripción de los dibujos

50 La invención se ilustra mediante las siguientes figuras, ejemplos y tablas no limitativos:

A este respecto las figuras 1 a 5 muestran la degradación eficaz de moléculas de ADN mediante el nuevo sistema de tres componentes en comparación con otras disoluciones conocidas. La figura 6 muestra el bloqueo de la capacidad de amplificación por PCR de moléculas de ADN tras el tratamiento con el nuevo sistema de tres componentes.

La figura 7 muestra la prueba convencional con ARNasaA para la inactivación de enzimas mediante el nuevo sistema de tres componentes.

La figura 8 muestra la degradación eficaz del ADN genómico y factor genético extracromosómico en microorganismos mediante el nuevo sistema de tres componentes.

5 La tabla 1 muestra la prueba para el efecto antimicrobiano del nuevo sistema de tres componentes.

La tabla 2 muestra la estructura básica preferida y las composiciones preferidas para el sistema de tres componentes de detergentes, vitaminas e iones metálicos.

Descripción de formas de realización ventajosas y preferidas de la invención

10 Las figuras 1 a 5 muestran la degradación eficaz de moléculas de ADN mediante el nuevo sistema de tres componentes en comparación con otras disoluciones conocidas. Se trataron alícuotas idénticas de plásmidos de ADN (YEp351) durante 2 minutos con las disoluciones mencionadas. A continuación se desnaturalizaron las muestras de ADN y se separaron las moléculas de ADN monocatenarias mediante electroforesis en gel sobre un gel de agarosa (1%). Tras la coloración con bromuro de etidio se obtienen las imágenes expuestas. El control muestra el ADN de plásmido intacto tras tratamiento con agua estéril. Con la inserción de roturas de cadena se reduce el peso molecular de la molécula de ADN en cuestión. Esto puede determinarse en gel mediante la comparación con el control y con el marcador de peso molecular. Se trataron en cada caso 5 µg de ADN en 5 µl de tampón Tris estéril (1 mM; pH 8,0) con 5 µl de las disoluciones indicadas durante 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación se mezclaron las muestras con 5 µl de Tris 100 mM (pH 12), se añadió marcador de azul de bromofenol y se desnaturalizó durante 5 minutos a 95°C. Se enfriaron inmediatamente las muestras desnaturalizadas hasta 4°C y se aplicaron en cada caso alícuotas con 1 µg de ADN por carril de gel.

El ADN, tras la electroforesis en gel, en gel de agarosa al 1%, se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió.

25 La figura 1 muestra la comparación de la degradación de ácido nucleico mediante vitaminas, iones metálicos y un sistema de tres componentes de vitamina, iones metálicos y detergentes. (M: marcador de tamaño molecular de ADN de 1 kb; K: control: ADN + 5 ml de H₂O estéril; 1: FeCl₃ 5 mM; 2: FAD 1 mM; 3: FAD 1 mM + FeCl₃ 1 mM; 4: NAD 100 mM; 5: NAD 100 mM + FeCl₃ 5 mM; 6: tiamina 100 mM; 7: tiamina 100 mM + FeCl₃ 5 mM; 8: vitamina C 100 mM; 9: vitamina C 100 mM + FeCl₃ 5 mM; 10: ascorbato de Na 100 mM; 11: ascorbato de Na 100 mM + FeCl₃ 5 mM; 12: ácido ascórbico 100 mM + FeCl₃ 5 mM). Todas las muestras con en cada caso Triton-100 al 0,2% y Tween 20 al 0,2%.

30 La figura 2 muestra la prueba de la degradación de ácido nucleico mediante combinaciones de vitamina C, iones metálicos y detergentes. L: marcador de tamaño molecular de 1 kb; M: marcador de ADN lambda *EcoRI/HindIII*; 1: vitamina C 10 mM; 2: vitamina C 100 mM; 3: FeCl₃ 10 mM; 4: vitamina C 100 mM + FeCl₃ 10 mM; 5: ZnCl₂ 10 mM; 6: vitamina C 100 mM + ZnCl₂ 10 mM; 7: DNA-OFFTM; K: control: 5 µl de H₂O estéril). Todas las muestras con en cada caso TritonX-100 al 0,2% y Tween 20 al 0,2%.

35 La figura 3 muestra la comparación de la degradación de ácido nucleico mediante mezclas con ácido ascórbico o ascorbato de sodio. (M: marcador de ADN lambda *EcoRI/HindIII*; K: control: 5 µl de H₂O estéril; 1: DNA-OFF™; 2: HAC 100 mM + FeCl₃ 10 mM + TritonX-100 al 0,2%; 3: ácido ascórbico 100 mM + Triton-100 al 0,2%; 4: ácido ascórbico 100 mM + FeSO₄ 10 mM + TritonX-100 al 0,2%; 5: ácido ascórbico 100 mM + ZnCl₂ + TritonX-100 al 0,2%; 6: ascorbato de Na 100 mM + TritonX-100 al 0,2%; 7: ascorbato de Na 100 mM + FeCl₃ 10 mM + TritonX-100 al 0,2%; 8: ascorbato de Na 100 mM + ZnCl₂ + TritonX-100 al 0,2%).

40 La figura 4 muestra la comparación de la degradación de ácido nucleico mediante mezclas con ácidos minerales, ácido ascórbico o ascorbato de Na (pH de 6 a 8,5). (M: marcador de ADN lambda *EcoRI/HindIII*; K: control: ADN + 5 µl de H₂O estéril; 1: RNase-OFFTM (muestra 1); 2: RNase-OFFTM (muestra 2); 3: DNA-OFFTM (muestra 1); 4: DNA-OFFTM (muestra 2); 5: H₃PO₄ 0,5 M; 6: HNO₃ 0,5 M; 7: ácido ascórbico 100 mM + FeCl₃ 10 mM; 8: ácido ascórbico 10 mM + FeCl₃ 10 mM; 9: ascorbato de sodio 100 mM + FeCl₃ 10 mM; 10: mezcla igual que en 9 pero con pH 6; 11: mezcla igual que en 9 pero con pH 7,1; 12: mezcla igual que en 9 pero con pH 8; 13: mezcla igual que en 9 pero con pH 8,5). Las muestras 5 a 13 contienen en cada caso TritonX-100 al 0,2% y Tween 20 al 0,2%.

45 La figura 5 muestra un ejemplo para un nuevo sistema tampón con carbonato de sodio y ácido hidroxisuccínico en comparación con ácido mineral. La mezcla básica contenía ácido ascórbico 50 mM, FeCl₃ 5 mM y en cada caso TritonX-100 al 0,2% y Tween 20 al 0,2%. (M: marcador de tamaño molecular de ADN de 1 kb), K: control: ADN + 5 µl de H₂O estéril; 1: mezcla pH 10; 2: mezcla pH 9; 3: mezcla pH 7; 4: mezcla pH 6; 5: mezcla pH 4; 6: H₃PO₄ 0,5 M (pH 1,5) con TritonX-100 al 0,2% y Tween 20 al 0,2%.

55 La figura 6 muestra el bloqueo de la capacidad de amplificación por PCR de moléculas de ADN tras el tratamiento con el nuevo sistema de tres componentes (mezcla A: vitamina C 100 mM + FeCl₃ 10 mM + TritonX-100 al 0,2% y Tween 20 al 0,2%). Se secaron distintas cantidades (de 0,1 a 1 ng) de una muestra de ADN en recipientes para PCR. Estos recipientes para PCR con el ADN secado se trataron durante 20 segundos con las disoluciones mencionadas. A continuación se lavaron los recipientes 2x con en cada caso 100 µl de agua destilada estéril. Entonces

se llenaron los recipientes con una mezcla de reacción para PCR de 50 µl y se realiza la reacción de PCR. La mezcla de reacción para PCR contiene pares de cebadores para la amplificación del ADN control (gen sclMP2 de levadura) y del ADN de prueba (gen scPCP1 de levadura). El ADN control (1 ng) muestra si la reacción de PCR ha transcurrido con éxito. Una banda del ADN de prueba muestra que aún están presentes moléculas de ADN intactas para este gen. En el caso de una eliminación o bloqueo completos del ADN de prueba no deberá haber ninguna banda de ADN amplificado en el gel. El ADN tras la electroforesis en gel, en gel de agarosa al 1%, se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió. Como control positivo sirve el conocido DNA-OFF™. Como control negativo se usa agua estéril (H₂O).

La figura 7 muestra la prueba convencional con ARNasaA para la inactivación de enzimas mediante el nuevo sistema de tres componentes. Se secaron alícuotas idénticas de 10 µg de ARNasaA en recipientes Eppendorf. Entonces se dotaron estos recipientes con en cada caso 1 ml de las disoluciones mencionadas, se agitaron con vórtex durante 20 segundos y entonces se incubaron 5 minutos a TA. A continuación se lavaron los recipientes 2 veces con en cada caso 1 ml de agua estéril. Entonces se añadieron en cada caso 5 µg de ARN total de *E. coli* en los recipientes y se incubó durante 30 minutos a 37°C. A continuación se dotaron las muestras de ARN total de tampón de formamida/azul de bromofenol y se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos. A continuación se separaron mediante electroforesis en gel, en un gel de agarosa (1,2%), los 5 µg completos de ARN total. Tras la tinción con EtBr se obtiene la imagen expuesta. Los controles sin tratar muestran el ARN total intacto. Con la presencia de ARNasaA activa se degradan estas moléculas de ARN. Con la inactivación completa satisfactoria de la ARNasaA las moléculas de ARN total permanecen igualmente inalteradas.

(K: control de ARN total; 1: RNase-OFF (A); 2: RNase-OFF (B); 3: mezcla de ácido ascórbico con vitamina C 100 mM + FeCl₃ 10 mM+ SDS al 0,5%; 4: blanco; 5: H₂O; 6: 10 µg de ARNasa A; 7: blanco; K: control de ARN total)

La figura 8 muestra la degradación eficaz del ADN genómico y el factor genético extracromosómico en microorganismos mediante el nuevo sistema de tres componentes. Se colocó una cepa de *Escherichia coli* recombinante con un plásmido extracromosómico (YEp351) durante la noche en medio LB con amp. En cada caso se trataron 5 µl de esta suspensión de *E. coli* con 5 µl de disolución de lisozima (1 mg/ml) durante 5 minutos y entonces se incubaron con 5 µl de las disoluciones mencionadas (1 - 5) durante otros 5 minutos. Tras la adición de azul de bromofenol se añadieron las muestras a los bolsillos de gel y se separan las moléculas de ADN mediante electroforesis. Sólo puede detectarse una degradación masiva de la molécula de ADN en la muestra 5 con el sistema de tres componentes. En el caso del control con agua estéril (K) y en el caso de la muestra 3 y 4 se observa una lisis de las células, de modo que se libera el ADN de plásmido extracromosómico y puede migrar al gel. En las muestras 1 y 2 se observa una precipitación del lisado celular y del ADN, de modo que todas las moléculas de ADN se encuentran depositadas en el bolsillo de gel.

(M: marcador de tamaño molecular de 1 kb; K: control con H₂O; 1: etanol al 70%; 2: Bacillozid™ al 0,5%; 3: SDS al 0,5%; 4: azida de Na al 0,5% + SDS al 0,5%; 5: vitamina C 100 mM + FeCl₃ 10 mM+ SDS al 0,5%; K: control: 5 µl de H₂O estéril)

La tabla 1 muestra la prueba para determinar el efecto antimicrobiano del nuevo sistema de tres componentes.

Se ajustaron cultivos recientes de los microorganismos indicados a un número de células de 10⁶ en 50 µl y entonces se mezclaron con en cada caso 50 µl de agua, etanol al 70% o el sistema de tres componentes (ácido ascórbico 100 mM, FeCl₃ 10 mM y SDS al 0,5%) a una razón 1:1. Tras un tiempo de incubación de 2 minutos se sembraron en placa las mezclas básicas de 100 µl con las bacterias sobre placas de crecimiento correspondientes. Tras una incubación de 1 - 3 días a 28°C (*Saccharomyces cerevisiae* y *Candida parapsilosis*) o 37°C (*Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*) se determinó el número de las colonias que habían crecido. En las mezclas básicas con agua estéril sobrevivieron todos los microorganismos. Ni las mezclas básicas con etanol al 70% ni el sistema de tres componentes mostraron crecimiento de colonias, lo que demuestra que en estos casos todos los microorganismos habían muerto.

La tabla 2 muestra las composiciones preferidas de la disolución con tres componentes a partir de sustancia tensioactiva, vitaminas e iones metálicos para la eliminación de moléculas de ADN de superficies y aparatos.

Lista con explicación de las abreviaturas en las figuras

amp: ampicilina

Bacillozid™: disolución antibacteriana comercial

DNase-OFF™: disolución comercial para la inactivación de ADN

EtBr: bromuro de etidio

FAD: flavinadeninucleótido

K: control

M: marcador de peso molecular

PCR: reacción en cadena de la polimerasa / *Polymerase Chain Reaction*

RNase-OFF™: disolución comercial para la inactivación de ARNasas

ARNasaA: ribonucleasa A (de páncreas bovino)

TA: temperatura ambiente

5 sc: *Saccharomyces cerevisiae*

scIMP2: gen de *Saccharomyces cerevisiae* para la proteasa 2 de membrana interna

scPCP1: gen de *Saccharomyces cerevisiae* para procesar la peroxidasa de citocromo c

SDS: dodecilsulfato de sodio

TX: TritonX-100 (detergente no iónico)

10 YEp351: plásmido episómico de levadura

Tabla 1

Prueba para determinar el efecto antimicrobiano del nuevo sistema de tres componentes			
	H ₂ O	Etanol al 70%	Sistema de tres componentes
Microorganismos			
<i>Escherichia coli</i>	10 ⁶	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	10 ⁶	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10 ⁶	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	10 ⁶	0	0

Tabla 2

Composiciones preferidas de la disolución con tres componentes a partir de sustancia tensioactiva, vitaminas e iones metálicos para la eliminación de moléculas de ADN de superficies y aparatos.
Mezclas básicas de disolución
Intervalo de pH: 2,0 – 8,5
Vitaminas: 1 mM -100 mM
iones metálicos: de 1 mM a 50 mM
Detergentes: del 0,1% al 5%

15

REIVINDICACIONES

1. Disolución de descontaminación, que contiene al menos una mezcla sinérgica de
 - a) al menos una vitamina en cantidades de desde 10 mM hasta 100 mM,
 - b) al menos un ion metálico en cantidades de desde 1 mM hasta 100 mM y
- 5 c) al menos un compuesto tensioactivo en cantidades de desde el 0,1% hasta el 10% en peso de la disolución total.
2. Disolución de descontaminación según la reivindicación 1, caracterizada porque la mezcla presenta un valor de pH en el intervalo de desde 2 hasta 8,5.
- 10 3. Disolución de descontaminación según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque la mezcla contiene adicionalmente un sistema tampón con carbonatos y derivados del ácido succínico.
4. Disolución de descontaminación según al menos una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque como vitaminas, sus sales o derivados ácidos, está contenido al menos un compuesto, seleccionado del grupo de las vitaminas solubles en agua con las propiedades de los antioxidantes.
- 15 5. Disolución de descontaminación según al menos una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque los iones metálicos proceden de los metales del 4º periodo y de los subgrupos I, II o VIII del sistema periódico de los elementos.
6. Disolución de descontaminación según la reivindicación 5, caracterizada porque los metales se encuentran en forma de sus sales con ácidos o bases.
- 20 7. Disolución de descontaminación según al menos una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque como sustancia tensioactiva está contenido al menos un compuesto seleccionado del grupo de los tensioactivos aniónicos, no iónicos, anfóteros o catiónicos o mezclas adecuadas entre sí o unos con otros.
8. Disolución de descontaminación según al menos una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada porque el ion metálico según b) está contenido en cantidades de desde 5 mM hasta 10 mM.
- 25 9. Disolución de descontaminación según al menos una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizada porque la sustancia tensioactiva según c) está contenida en cantidades de desde el 0,2% hasta el 0,5% en peso de la disolución total.
10. Uso no terapéutico de las disoluciones según al menos una de las reivindicaciones 1 a 9, para la desnaturalización, modificación, degradación, solubilización y eliminación de proteínas y moléculas de ácido nucleico de superficies.
- 30 11. Procedimiento para ajustar el valor de pH de una disolución de descontaminación según al menos una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la mezcla se ajusta por medio de un sistema tampón que comprende carbonatos y derivados del ácido succínico a un valor de pH en el intervalo de desde 2 hasta 8,5.

Fig. 1

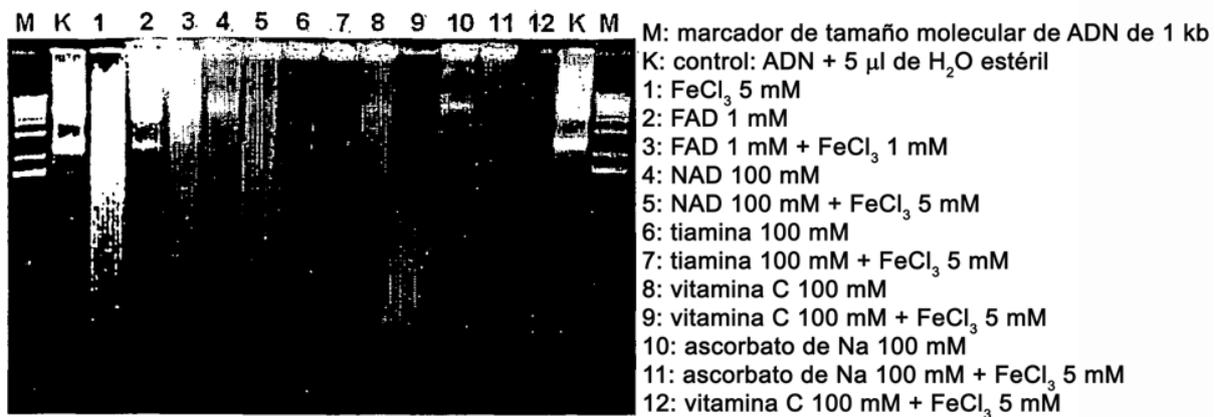


Fig. 2

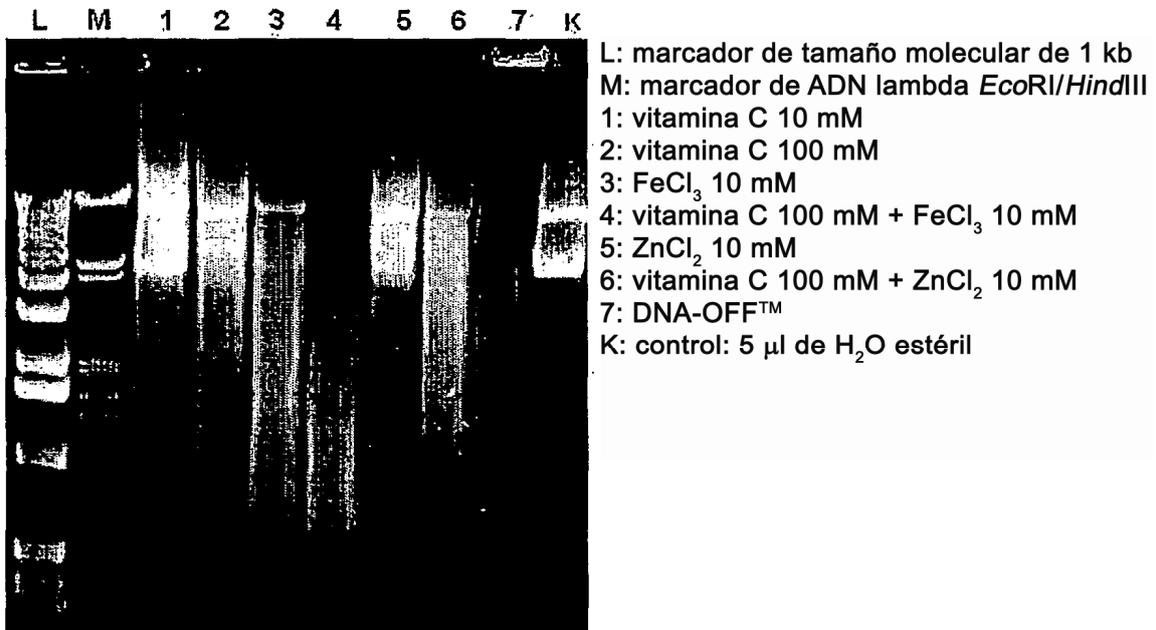


Fig. 3

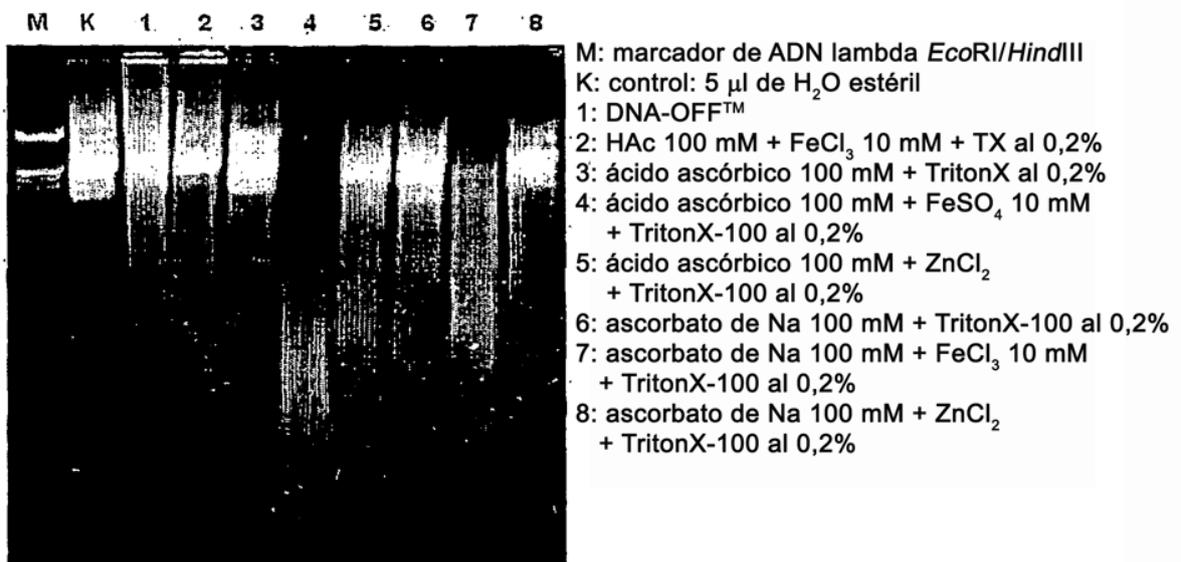


Fig. 4

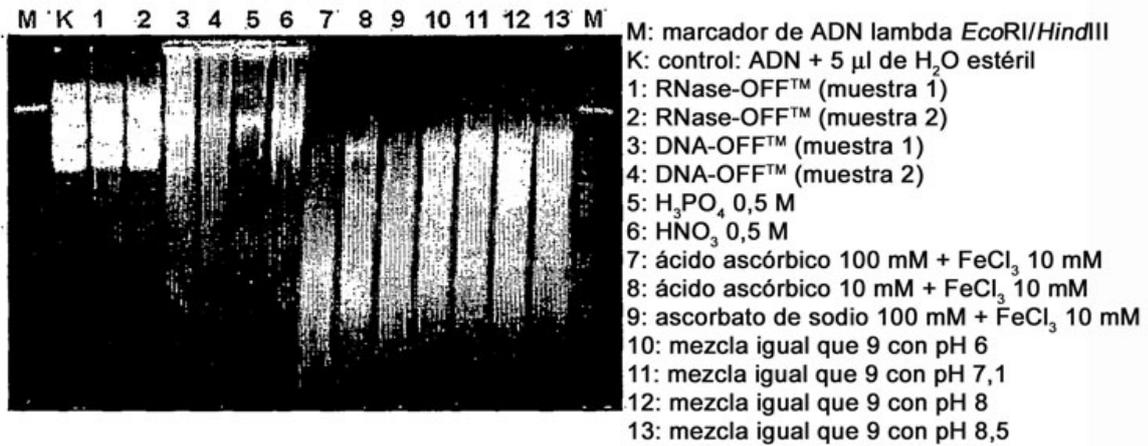


Fig. 5



M: marcador de tamaño molecular de ADN de 1kb

K: control: ADN + 5 μ l de H₂O estéril

1: mezcla de pH 10

2: mezcla de pH 9

3: mezcla de pH 7

4: mezcla de pH 6

5: mezcla de pH 4

6: H₃PO₄ 0,5 M, pH 1,5

Fig. 6

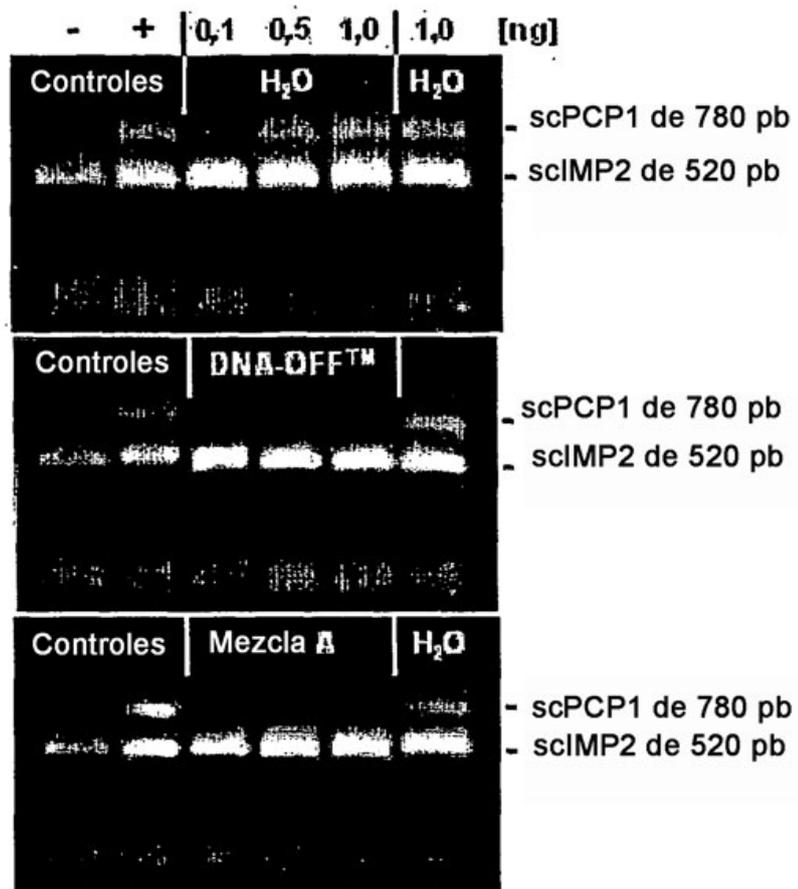


Fig. 7

- K: control de ARN total
- 1: RNase-OFF (A)
- 2: RNase-OFF (B)
- 3: mezcla de ácido ascórbico
- 4: blanco
- 5: H₂O
- 6: ARNase A 10 µg
- 7: blanco
- K: control de ARN total

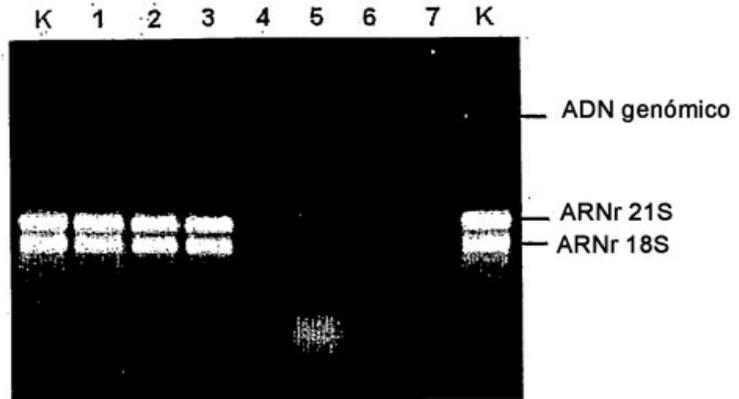


Fig. 8

