

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 393**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C07H 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2010 E 10767644 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2421993**

54 Título: **Composiciones y métodos para la recogida/transporte de un espécimen biológico**

30 Prioridad:

**20.04.2009 US 426890**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.11.2013**

73 Titular/es:

**LONGHORN VACCINES & DIAGNOSTICS, LLC  
(100.0%)  
2 Bethesda Metro Center, Suite 910  
Bethesda, MD 20814, US**

72 Inventor/es:

**FISCHER, GERALD W. y  
DAUM, LUKE T.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 431 393 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

Composiciones y métodos para la recogida/transporte de un espécimen biológico

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a composiciones y métodos para la recogida, transporte y almacenamiento de una muestra biológica que contiene una población de ácidos nucleicos, que pueden aislarse, purificarse y o caracterizarse posteriormente utilizando uno o más métodos o ensayos convencionales.

10

**Antecedente de la técnica**

En el campo del análisis molecular y para diagnóstico, la capacidad de mantener ácidos nucleicos en una muestra biológica (y en particular, aquellos contenidos en muestras diagnósticas obtenidas de pacientes humanos) tanto si el espécimen se recoge en una ubicación de campo remota, como en un consultorio médico o en un laboratorio, determina a menudo si los ácidos nucleicos se pueden analizar de manera satisfactoria. Los ácidos nucleicos de una muestra biológica se degradan y/o desnaturalizan rápidamente a temperatura ambiente y deben almacenarse generalmente a temperaturas de congelación para permanecer estables; sin embargo, se sigue produciendo algún grado de degradación en el tiempo. Este problema se ve aumentado cuando se recoge un espécimen en un sitio de campo remoto, o a una distancia significativa del consultorio médico o el entorno del laboratorio, y especialmente cuando el acceso a condiciones de enfriador/refrigerador/congelador consistentes y constantes hasta que la muestra se analiza, puede estar limitada o no existir, tales como cuando el acceso a la energía eléctrica, o al equipo refrigerador/congelador es tanto no fiable, como inexistente. Los problemas asociados con la recogida y la manipulación de especímenes biológicos a partir de los cuales es deseable obtener ácidos nucleicos se agravan adicionalmente cuando los ácidos nucleicos deseados del análisis de la purificación incluyen ácido ribonucleico (ARN), que es particularmente susceptible a la degradación por la actividad de la nucleasa endógena o exógena. Los métodos de transporte de especímenes utilizan a menudo medios de transporte especiales para las muestras biológicas para el transporte desde el punto de recogida hasta el punto de análisis, y en particular, un envasado que impone limitaciones sobre el tiempo que se puede almacenar una muestra, requiere un mantenimiento continuo de las muestras a bajas temperaturas, incluso durante el transporte o el almacenamiento extendido, y limita en la práctica el tiempo y las distancias posibles entre el sitio de recogida y el laboratorio diagnóstico.

15

20

25

30

Además de los riesgos relativos a la estabilidad del espécimen, existen a menudo riesgos adicionales con respecto a la manipulación y/o el almacenamiento de reactivos utilizados en el almacenamiento y el transporte de las muestras recogidas. Por ejemplo, los propios reactivos requieren con frecuencia temperaturas frías u otros cuidados especiales para mantener la estabilidad. Debido a estas características de estabilidad, por ejemplo, el transporte de los reactivos hasta un sitio de almacenamiento, el almacenamiento en el sitio de campo antes del uso, y el transporte de los especímenes y reactivos biológicos hasta un sitio de ensayo es un problema principal.

35

40

Otro riesgo significativo cuando se trabaja con especímenes biológicos es la inoculación, liberación, o diseminación potencial de agentes patógenos o biológicos infecciosos vivos procedentes del espécimen en el medio ambiente. Existen actualmente protocolos específicos que se emplean cuando se manipulan muestras que pueden ser infecciosas o representan cualquier otro riesgo para la salud o la seguridad. Si la muestra se mantiene viable y/o intacta biológicamente para conservar su integridad para el ensayo, los individuos implicados en el procedimiento de recogida, transferencia, y ensayo están potencialmente expuestos a contagios muy peligrosos. Adicionalmente, espectadores inocentes próximos a un sitio de campo o de recogida de muestras (o próximos durante el transporte) pueden estar expuestos si se produce una liberación del contagio. Como resultado, las medidas de seguridad requeridas aumentan normalmente el gasto y el esfuerzo requeridos para mover dichas muestras desde una localización a otra.

45

50

Hasta hace poco, los métodos clínicos de laboratorio para la detección de patógenos eran métodos caros que requerían mano de obra y científicos con muchos conocimientos y expertos, con experiencia específica. La mayoría de laboratorios clínicos de diagnóstico empleaban el uso de métodos de cultivo tradicionales que requieren normalmente de 3 a 7 días para un cultivo vírico —e incluso lapsos de tiempo mayores para algunos otros agentes bacterianos. Además, el cultivo tradicional requiere la recogida, el transporte y la propagación en laboratorio y la manipulación de agentes biológicos potencialmente infecciosos tales como Ébola, gripe aviar, síndrome respiratorio agudo severo (SARS), etc.

55

60

El campo del diagnóstico clínico molecular cambió de forma drástica con la llegada de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la década de los ochenta del siglo pasado, sin embargo, poco después con la PCR en tiempo real a mediados de la década de los noventa del siglo pasado. Las plataformas de detección basadas en ácido nucleico que emplean, por ejemplo, ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) o PCR mediante transcriptasa inversa (RT-PCR) y PCR cuantitativa en tiempo real mediante transcriptasa inversa (qRT-PCR) pueden proporcionar resultados en horas frente a los días requeridos para los métodos de cultivo y aislamiento tradicionales que convierten los métodos de detección molecular en el núcleo fundamental de los modernos análisis diagnósticos de laboratorio. Recientes mejoras en las químicas de detección, tales como flúores indicadores/inactivadores nuevos

65

y mejorados, compuestos de unión al surco menor (MGB) (TaqMan MGB™, Applied Biosystems; para una referencia general, véase también, *por ejemplo* Baraldi y col., Pure Appl. Chem., 75(2-3):187-194, 2003), y reactivos de amplificación estabilizados han sentado las bases de ensayos de detección de ácidos nucleicos más sensibles y muy específicos, y han demostrado ser más precisos, sólidos, y económicos que los anticuados métodos basados en cultivos celulares. Los avances en otras estrategias de detección de ácidos nucleicos tales como la amplificación mediada por transcripción, la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y los así denominados ensayos multiplexados de tipo "laboratorio en un chip", han contribuido también a la transición de viales de cultivo a micromatrices en el laboratorio clínico.

Algunas compañías comerciales (por ejemplo. Qiagen [Valencia, CA, EE:UU.], Roche Applied Science [Indianápolis, IN, EE.UU.], Gen-Probe [San Diego, CA, EE.UU.], y bioMérieux [Durham, NC, EE:UU.]) han desarrollado instrumentos para automatizar el procedimiento de extracción de ácido nucleico desde el aislamiento de la muestra hasta el análisis molecular. Por ejemplo, el Tigris DTS® ((Gen-Probe, San Diego, CA, EE.UU.) automatiza el método de detección completo, y en 2004 fue aprobado por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) para detectar de forma simultánea *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* utilizando el ensayo del test del ácido nucleico amplificado (NAT) mediante Gen-Probe's APTIMA COMBO-2®.

Se ha divulgado el uso del bacteriófago MS2 como un control interno del ARN en los ensayos víricos de la PCR mediante transcripción inversa (Dreier y col., J. Clin. Microbiol 43(9): 4551-4557, 2005)

A la vista de los requerimientos de muestras de ácidos nucleicos de alta calidad en los sistemas actuales de detección y de ensayo, existe ahora una necesidad en la técnica de sistemas de recogida, almacenamiento y transporte seguros y fáciles que mantengan la integridad y la calidad de los ácidos nucleicos contenidos en una variedad de muestras y especímenes biológicos. Además, existe también ahora la necesidad de recoger, conservar y transportar muestras (y particularmente aquellas que contienen organismos perjudiciales o patógenos) en localizaciones remotas o de campo en condiciones ambientales del entorno (*es decir*, no ideales) durante periodos largos de tiempo sin refrigerar, congelar, o manipular de otra manera especial el(los) reactivo(s) de recogida, la propia muestra biológica, o la población de ácidos nucleicos contenidos en la anterior. Además, existe ahora una necesidad de medios de recogida/transporte/almacenamiento menos caros y más convenientes que minimicen el riesgo de la exposición a patógenos de los trabajadores o transeúntes inocentes, que permitan el uso de formulaciones en una única etapa, y faciliten un transporte ambiente conveniente de los especímenes biológicos durante largas distancias o largos periodos de tiempo que contengan poblaciones de ácidos nucleicos de elevada fidelidad, de alta calidad.

### Breve resumen de la invención

La presente invención abarca nuevas y útiles composiciones, así como métodos para prepararlas y emplearlas que pueden mejorar ventajosamente los métodos de recogida, lisis y almacenamiento convencionales para la preparación de ácidos nucleicos procedentes de una o más fuentes biológicas. De acuerdo con esto, la presente invención proporciona de forma ventajosa una formulación de recogida y conservación para inactivar y lisar un espécimen biológico que contiene ácidos nucleicos, y conservar los ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN o ADN) en el espécimen biológico, preferentemente todo en un único recipiente de reacción, de tal manera que se mantenga al menos sustancialmente la integridad de los ácidos nucleicos, y se mantenga de forma completamente preferible, de tal manera que la porción de los ácidos nucleicos esté fácilmente disponible para el análisis de diagnóstico molecular. Una ventaja adicional de la presente invención es que la formulación puede permitir a los ácidos nucleicos separados o liberados permanecer al menos sustancialmente estables sin requerir temperaturas del enfriador consistentes y constantes, tales como las de refrigeración o congelación

Las formulaciones en una etapa divulgadas en el presente documento pueden llevar a cabo las siguientes funciones principales, inactivación o muerte de patógenos en la muestra; lisis de células y separación o liberación de ácidos nucleicos procedentes de las células; inactivación de nucleasas endógenas o exógenas y de otras enzimas celulares para evitar la degradación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra, y facilitación de la recogida y la manipulación de la muestra a temperaturas ambientes, estabilización de los ácidos nucleicos durante el posterior transporte y almacenamiento de la muestra, conservación de la integridad de la muestra mediante el uso de moléculas portadoras de ARN extragenómico finalizadoras que sirven también como control positivo interno (IPC) para controlar la fidelidad de las muestras procesadas.

La capacidad para conseguir todas estas funciones deseables en una formulación de una única etapa, preferentemente en una única zona de reacción o recipiente de reacción, es una ventaja particularmente marcada sobre la actualmente disponible. Actualmente, las tecnologías existentes no incluyen una composición en una única etapa que proporciona la inactivación de los componentes biológicos que contienen los ácidos nucleicos, la liberación de los ácidos nucleicos mediante la lisis de las células y la separación o liberación de los ácidos nucleicos, el mantenimiento de la integridad de la población liberada de ácidos nucleicos, y los IPC convenientes para cuantificar la fidelidad del espécimen. La presente invención estabiliza y preserva la integridad de los ácidos nucleicos presentes en el espécimen para el ensayo diagnóstico, proporcionando también a la vez métodos para controlar la fidelidad del medio de recogida que emplea una molécula portadora de ARN cuantificable, fácilmente

detectable.

Las formulaciones en una etapa de la presente invención permiten la inactivación preferentemente simultánea de los componentes biológicos que contienen ácidos nucleicos, la lisis y separación o liberación de los ácidos nucleicos, la estabilización, y la conservación. En una realización, algo o toda la inactivación, lisis y separación o liberación, estabilización, y conservación, son secuenciales. En una realización preferida, sin embargo, una mayoría o preferentemente todas estas funciones se producen de forma simultánea. En todas las realizaciones, la formulación en una etapa se combina con la muestra para iniciar estas funciones. Esto está en contraste con la tecnología anterior donde no se produce necesariamente la inactivación, y la lisis, estabilización, y conservación se producen en una sucesión de etapas separadas, utilizando cada etapa normalmente uno o más reactivos y protocolos distintos que se han añadido por separado. A diferencia de los métodos de aislamiento de ácidos nucleicos anteriores que requerían numerosas etapas secuenciales para minimizar los errores, evitar incompatibilidades entre reactivos, y proporcionar el control por etapas de los resultados, la presente invención proporciona todos estos beneficios en una formulación en una única etapa, y añade también los beneficios adicionales de mantener la integridad de los ácidos nucleicos, controlando la fidelidad del procedimiento de almacenamiento/recogida/transporte mediante el uso de una molécula portadora de ARN finalizadora interna, facilitando mayores eficacias de extracción y purificación de los ácidos nucleicos de la muestra, y mejorando en última instancia su rendimiento. Las formulaciones en una etapa de la presente invención facilitan preferentemente la inactivación simultánea de los componentes biológicos que contienen los ácidos nucleicos, la lisis y la liberación de los ácidos nucleicos a partir de los desechos celulares, la estabilización, y la conservación de los ácidos nucleicos reduce la posibilidad de degradación de la población de ácidos nucleicos contenidos en la muestra biológica que puede producirse antes, durante, o después de la lisis.

Las composiciones divulgadas se han desarrollado y optimizado: 1) para facilitar la preparación de ácidos nucleicos de alta calidad procedentes de especímenes clínicos o ambientales, 2) para inactivar, destruir, o neutralizar de otra manera los patógenos potencialmente infecciosos en una muestra biológica para facilitar una manipulación y transporte seguros de los especímenes recogidos, y 3) para estabilizar los ADN/ARN liberados (*es decir*, 'inactivados') durante periodos prolongados sin hidrólisis o degradación por la nucleasa de los ácidos nucleicos liberados.

Las composiciones descritas en el presente documento son ideales para su uso clínico, de campo y para implementación, o para una recogida/extracción de un elevado volumen de muestras. Los especímenes recogidos en una o más de las composiciones divulgadas están biológicamente inactivados, y se pueden transportar de forma segura, normalmente incluso sin refrigeración o hielo seco.

En determinadas realizaciones, la adición de ácidos nucleicos (*por ejemplo*, ARN y/o ADN) se contempla por ser beneficiosa para una variedad de fines y aplicaciones de los métodos divulgados: a) como un "portador" (La adición de pequeñas cantidades de ARN/ADN suplementarios ha demostrado aumentar/incrementar el rendimiento global de las muestras/especímenes, particularmente de especímenes originales que pueden contener bajas cantidades de dianas, *es decir*, células, virus, bacterias); b) como un IPC para métodos moleculares de purificación y para rastrear o controlar la fidelidad de la preparación del ácido nucleico desde la recogida a la detección de la muestra, y c) para la comparación con un 'calibrador' para el análisis cuantitativo de purificación, *por ejemplo*, qRT-PCR y similar. En dichas realizaciones, uno o más ácidos nucleicos conocidos o de "control" podrían añadirse a las composiciones en una concentración final de entre aproximadamente 1 ag a aproximadamente 1 mg, de forma más preferible entre aproximadamente 1 fg a aproximadamente 1 µg, y de forma más preferible aún, entre aproximadamente 1 pg a aproximadamente 1 ng.

En una realización ilustrativa, la invención proporciona un ARN, ADN, ANP monocatenario (ss) o bicatenario (ds) aislado, o uno de sus híbridos que es útil: (a) como una molécula portadora para ayudar en la recuperación de los polinucleótidos de una muestra biológica sospechosa de contener ácidos nucleicos, y/o (b) como una secuencia IPC (*es decir*, una "conocida", "indicadora", de "control", "estándar" o "marcadora") para controlar la integridad y la fidelidad de la recogida del espécimen y del aislamiento/estabilización del polinucleótido. En determinadas realizaciones, la invención proporciona un ARN-ds, ADN-ds, ANP-ds aislado, o uno de sus híbridos que es útil como una molécula portadora y/o un IPC. En otras realizaciones, la invención proporciona un ARNss, ADNss, APNss aislado, o uno de sus híbridos que es útil como una molécula portadora y/o como una secuencia IPC. En las realizaciones ilustrativas, la invención proporciona una molécula de ARNss aislado que es útil como una molécula portadora y una secuencia IPC.

Dichas moléculas se pueden aislar de fuentes naturales, prepararse en el laboratorio, o de forma alternativa, un híbrido que contiene secuencias naturales y no naturales. Tal como se ha señalado en el presente documento, debido a que las composiciones de la invención son particularmente útiles para el aislamiento y la caracterización de especímenes biológicos obtenidos de fuentes de mamíferos (y en particular, seres humanos) que son sospechosas de contener polinucleótidos de origen patógeno, es preferible que la(s) secuencia(s) empleada(s) como portadoras y/o compuestos control positivos contengan sustancialmente una secuencia de nucleótidos primaria que no se encuentra normalmente en el genoma de un mamífero, o en el genoma de un organismo que es patógeno para dicho mamífero. Los mamíferos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, bovinos, ovinos, porcinos, lupinos, caninos, equinos, felinos, ursinos, murinos, leoninos, leporinos, caprinos, y primates no humanos.

Preferentemente, esta secuencia indicadora/portadora específica no de mamífero, no patógena no es reactiva en cruzado, *es decir*, no se hibrida sustancialmente, o de forma preferible con secuencias de mamíferos o específicas de patógenos, y como tales, se prefieren de forma particular secuencias no codificantes, no degeneradas (*es decir*, finalizadoras) en la formulación de secuencias de control/portadoras, para minimizar la hibridación de la secuencia de control/portadora con un miembro de la población aislada de polinucleótidos obtenidos a partir del espécimen recogido. Las secuencias portadoras/de control a modo de ejemplo por tanto, no se unen de forma sustancial o preferible (por ejemplo, no se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas) para una población de nucleótidos aislados a partir del genoma de un mamífero, o para una población de polinucleótidos aislados a partir del genoma de una bacteria, hongo, virus que es patógeno para un mamífero. Las condiciones de hibridación rigurosas a modo de ejemplo conocidas por las personas normalmente expertas en la materia incluyen, sin limitación, (a) prelavar en una disolución que contiene aproximadamente 5X SSC, SDS al 0,5 %, y EDTA 1,0 mM (pH 8,0); (b) hibridar a una temperatura de entre aproximadamente 60° C a aproximadamente 70° C en 5X SSC durante la noche, y (c) lavar posteriormente a aproximadamente 65 a 70° C durante 20 min, con cada uno de 2X, 0,5X y 0,2X SSC que contiene SDS al 0,1 %), o condiciones de hibridación equivalentes a las anteriores.

Aunque puede utilizarse cualquier longitud práctica de molécula portadora en las composiciones de la invención, y en particular, en las formulaciones divulgadas en el presente documento (por ejemplo, formulaciones PSS), la longitud de la molécula portadora es aproximadamente de 40 a aproximadamente 900 nucleótidos de longitud; de forma más preferible, de aproximadamente 50 a aproximadamente 800, o de forma alternativa, de aproximadamente 60 a aproximadamente 700 nucleótidos de longitud, aún de forma más preferible, de aproximadamente 70 a aproximadamente 600, o de forma alternativa, de aproximadamente 80 a aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, e incluso de forma aún más preferible, de aproximadamente 90 a aproximadamente 400 nucleótidos, o, de forma alternativa, de aproximadamente 100 a aproximadamente 300 o más nucleótidos de longitud.

Como tales, se contemplan todas las longitudes intermedias de polinucleótidos que quedan comprendidas en el alcance de la presente divulgación, incluyendo, sin limitación, secuencias de la molécula portadora que tienen aproximadamente 45 nucleótidos de longitud, aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, aproximadamente 55 nucleótidos de longitud, aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, aproximadamente 65 nucleótidos de longitud, aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, aproximadamente 75 nucleótidos de longitud, aproximadamente 80 nucleótidos de longitud, aproximadamente 85 nucleótidos de longitud, aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, aproximadamente 95 nucleótidos de longitud, aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, aproximadamente 140 nucleótidos de longitud, aproximadamente 160 nucleótidos de longitud, aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, aproximadamente 220 nucleótidos de longitud, aproximadamente 240 nucleótidos de longitud, aproximadamente 260 nucleótidos de longitud, aproximadamente 280 nucleótidos de longitud, o incluso aproximadamente 300 nucleótidos o más de longitud.

Aunque se contempla cualquier secuencia de polinucleótido práctica finalizadora/que se hibride mínimamente en cruzado para ser útil en la preparación de una secuencia portadora para facilitar un aislamiento mejorado de la población diana de polinucleótidos, en circunstancias donde se desea una secuencia control, se imponen los requerimientos adicionales de la secuencia de ácidos nucleicos primaria de la molécula, concretamente que la secuencia debe ser detectable y/o cuantificable utilizando una o más técnicas de biología molecular convencionales.

A este fin, la invención proporciona moléculas portadoras/indicadoras que contienen al menos un primer dominio de la secuencia que se hibrida de forma específica (*es decir*, se une) a una sonda detectable de forma adecuada, incluyendo, sin limitación, sondas marcadas molecularmente y sus derivados. Las sondas marcadas a modo de ejemplo son aquellas que incluyen marcas radioactivas, luminiscentes, quimioluminiscentes, fluorescentes, enzimáticas, magnéticas, o de resonancia de espín conocidas por las personas normalmente expertas en las técnicas moleculares. En las realizaciones ilustrativas, la sonda marcada contiene al menos un compuesto de unión al surco menor. En determinadas realizaciones, para facilitar la unión de sondas de marca detectable convencionales, las moléculas portadoras/indicadoras de la invención contendrán al menos un primer dominio de la secuencia de entre aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud que se une de forma específica a al menos una primera sonda detectable.

Aunque el primer dominio de la secuencia puede ser cualquier longitud práctica en la totalidad de la secuencia portadora, preferentemente, el primer dominio de la secuencia estará entre aproximadamente 12 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud; de forma más preferible, entre aproximadamente 14 a aproximadamente 45 nucleótidos de longitud; aún de forma más preferible, entre aproximadamente 16 a aproximadamente 40 o más nucleótidos de longitud, y de forma más preferible aún, entre aproximadamente 18 a aproximadamente 30 o más nucleótidos de longitud.

De esta forma, se contempla que todas las longitudes intermedias de los dominios de secuencias que se hibridan a sondas están comprendidos en el alcance de la presente divulgación, incluyendo, sin limitación, los dominios de unión a sonda que tienen aproximadamente 13 nucleótidos de longitud, aproximadamente 14 nucleótidos de longitud, aproximadamente 15 nucleótidos de longitud, aproximadamente 16 nucleótidos de longitud, aproximadamente 17 nucleótidos de longitud, aproximadamente 18 nucleótidos de longitud, aproximadamente 19

nucleótidos de longitud, aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, aproximadamente 21 nucleótidos de longitud, aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, aproximadamente 24 nucleótidos de longitud, aproximadamente 25 nucleótidos de longitud, aproximadamente 26 nucleótidos de longitud, aproximadamente 27 nucleótidos de longitud, aproximadamente 28, o incluso aproximadamente 29 o 30 o más nucleótidos de longitud.

5 Cuando es deseable que la secuencia portadora/indicadora sea detectable por una o más metodologías basadas en la amplificación (incluyendo, sin limitación, metodologías basadas en la PCR), son deseables características moleculares adicionales para la secuencia portadora/indicadora, concretamente que la secuencia, o al menos una porción de la misma, sea amplificable utilizando uno o más ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa. Para las metodologías basadas en la PCR o FRET, por ejemplo, es deseable que la molécula portadora/indicadora contenga al menos un segundo dominio de la secuencia que se une de forma específica al cebador directo de la amplificación de la PCR (normalmente de entre aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud) y un tercer dominio de la secuencia que se une de forma específica a un cebador inverso de amplificación de la PCR de (también normalmente de entre aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud). Preferentemente, el segundo y el tercer dominios de la secuencia se sitúan de manera operable para facilitar la amplificación dirigida por la PCR de al menos una primera porción del segmento de ácido nucleico procedente de los cebadores directo e inverso en condiciones eficaces para amplificar al menos una primera porción.

10 Cuando es deseable que la secuencia portadora/indicadora sea detectable por una o más metodologías basadas en la amplificación no simétrica (que incluyen, sin limitación, PCR asimétrica, hibridación molecular, metodologías basadas en marcas de afinidad, y similares) no es esencial que se requiera una pareja de dominios de unión a un cebador directo e inverso – puede ser suficiente solo un segundo dominio de unión a secuencia único para detectar la secuencia portadora utilizando los ensayos diagnósticos adecuados. En dichas realizaciones, se puede emplear un único cebador de detección/replicación (o el dominio de unión a la polimerasa). Normalmente, dichos dominios de la secuencia tendrán entre aproximadamente 15 a aproximadamente 35 o más nucleótidos de longitud, aunque se puede emplear cualquier dominio diana convencional utilizando métodos analíticos convencionales. El diseño y la secuencia primaria de dichos dominios se consideran rutinarios en las técnicas moleculares, y de esta forma, están comprendidos también en el ámbito de la persona normalmente experta.

20 Dependiendo de la longitud y de los nucleótidos primarios de la secuencia IPC, en determinadas realizaciones, el primer dominio de la secuencia comparte al menos una primera región común de la secuencia de nucleótidos, con el segundo, tercero, o incluso ambos dominios de la segunda y tercera secuencia. El solapamiento de dichas secuencias puede ser de solo uno o más nucleótidos, o, de forma alternativa, regiones más grandes de solapamiento que consisten en 5 a 10 o más nucleótidos.

35 En las realizaciones ilustrativas, se puede preparar la secuencia IPC mediante una o más técnicas adecuadas de biología molecular, que incluyen, por ejemplo, mediante la transcripción *in vitro* de un polinucleótido que comprende la secuencia del control, o de forma alternativa, comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria de la secuencia del propio control. Tal como se describe en los siguientes ejemplos, un método de preparación de la secuencia control implica la preparación de un duplete de ADN, a partir del cual se puede sintetizar una secuencia control de ARN monocatenario.

40 Las secuencias control de ARN monocatenario a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aquellas que contienen al menos aproximadamente 105, al menos aproximadamente 95, al menos aproximadamente 85, al menos aproximadamente 75, al menos aproximadamente 65, al menos aproximadamente 55, al menos aproximadamente 45, al menos aproximadamente 35, o al menos aproximadamente 25 o más nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia de ARN: 5'-CCC UUAGCAGCAGUCAGUCAGGGAGCCAAUUUCAGAGCUCAGCG  
50 AGACAGUUUUUAUAGGCAUGGCAUCAGCUACGCUCAGGCUAGUCAGGUCCAAAGUUUCAGUU -3' (SEC ID N°: 2). En las realizaciones ilustrativas, la molécula de ácido ribonucleico monocatenario aislada se puede preparar mediante un procedimiento que incluye la transcripción *in vitro* de un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o, de forma alternativa, consiste de, la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 2.

55 En una de dichas realizaciones, la secuencia control de ARN monocatenario se puede sintetizar *in vitro* a partir de una secuencia de ADN que contiene al menos aproximadamente 90, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 30, o al menos aproximadamente 20, o unos pocos nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia 5'-CCC UUAGCAGCAGUCAGUCAGGGAGCCAAUUUCAGAGCUCAGC  
60 GAGACAGUUUUUAUAGGCAUGGCAUCAGCUACGCUCAGGCUAGUCAGGUCCAAAGUUUCAGUU -3' (SEC ID N°: 1). En las realizaciones ilustrativas, la molécula de ácido ribonucleico monocatenario aislada se puede preparar mediante un procedimiento que incluye la transcripción *in vitro* de un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o, de forma alternativa, consiste de la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N°: 1.

65 En un aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar la presencia o ausencia de la molécula portadora de ARN en una pluralidad de polinucleótidos obtenidos a partir de una muestra biológica preparada

utilizando una formulación de recogida/almacenamiento de muestras divulgada, que incluye, sin limitación, una o más formulaciones tal como se describe en el presente documento, que incluyen, sin limitación, formulaciones PPS. Existe también un método para cuantificar la cantidad de molécula portadora de ARN en la muestra y controlar la eficacia de las formulaciones en la estabilización y la protección de la fidelidad molecular de los polinucleótidos aislados. Comparando la cantidad de molécula portadora que permanece en la muestra tras un periodo transcurrido de tiempo con la de la cantidad conocida de molécula portadora presente en la disolución inicial, se puede determinar la cantidad de degradación que ha experimentado la molécula portadora a la vez en presencia de la muestra biológica. Se puede usar esta correlación como la estimación de la extensión de la degradación que tiene lugar en el tiempo en la población de polinucleótidos liberados procedentes de la muestra original.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar rápidamente en una muestra biológica, una secuencia de polinucleótidos concreta, tal como la de la secuencia IPC. En un sentido global y general, este método comprende la amplificación de una población de nucleótidos sospechosa de contener la secuencia concreta utilizando métodos convencionales tales como la PCR y los cebadores directo e inverso que son específicos para la secuencia diana, la hibridación de un conjunto específico de sonda con el producto de la PCR monocatenario resultante, llevando a cabo el análisis de la curva de fusión y analizando el cambio de la  $T_m$  del híbrido del producto de la PCR monocatenario con las sondas de hibridación.

En una realización, la presente invención proporciona un método para detectar rápidamente la presencia de un polinucleótido (tal como una secuencia IPC portadora), utilizando una metodología basada en la PCR, que comprende generalmente las etapas de (a) aislar polinucleótidos procedentes de la muestra que se va a analizar, (b) amplificar los polinucleótidos mediante la PCR utilizando un conjunto de cebadores que es específico para la secuencia diana; (c) hibridar una o más sondas marcadas que son específicas para el polinucleótido de interés con el producto de la PCR monocatenario obtenido de la etapa (b), y (d) detectar la presencia de la sonda marcada en la muestra, indicativa de la presencia de la secuencia diana específica en la población de los polinucleótidos aislados.

Uno de dichos métodos para la detección de polinucleótidos que utiliza una secuencia de "sonda" marcada utiliza el procedimiento de transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia (FRET). Las metodologías de detección FRET a modo de ejemplo implican a menudo parejas de fluoróforos que comprenden un fluoróforo donante y un fluoróforo aceptor, donde el fluoróforo donante es capaz de transferir energía de resonancia al fluoróforo aceptor. En los ensayos FRET a modo de ejemplo, el espectro de absorción del fluoróforo donante no solapa sustancialmente el espectro de absorción del fluoróforo aceptor. Tal como se usa en el presente documento "una sonda de oligonucleótidos donante" se refiere a un oligonucleótido que está marcado con un fluoróforo donante de una pareja de transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia. Tal como se usa en el presente documento "una sonda de oligonucleótidos aceptora" se refiere a un oligonucleótido que está marcado con un fluoróforo aceptor de una pareja de transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia. Tal como se usa en el presente documento, una pareja de oligonucleótidos FRET comprenderá normalmente una sonda de oligonucleótidos "ancla" o "donante" y una sonda de oligonucleótidos "aceptora" o "sensora", y dicha pareja forma una relación FRET cuando la sonda de oligonucleótidos donante y la sonda de oligonucleótidos aceptora se hibridan con las secuencias de ácidos nucleicos diana complementarias. Las parejas de fluoróforos aceptables para uso como parejas de transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a., fluoresceína/rodamina, ficoeritrina/Cy7, fluoresceína/Cy5, fluoresceína/Cy5,5, fluoresceína/LC Rojo 640, y fluoresceína/LC Rojo 705, y similares.

Se pueden diseñar cebadores útiles en la amplificación de una secuencia IPC concreta utilizando, por ejemplo, un programa informático tal como OLIGO® (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, CO, EE.UU.). Normalmente, los cebadores de oligonucleótidos son desde aproximadamente 10 a aproximadamente 60 o más nucleótidos de longitud (incluyendo, sin limitación) todos los enteros intermedios, por ejemplo, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o incluso 60 o más nucleótidos de longitud), aunque pueden ser útiles cebadores de cualquier longitud práctica en la práctica de la invención. La invención proporciona también un método para aumentar la eficacia de obtener una población purificada de polinucleótidos procedentes de una muestra biológica sospechosa de contener dichos polinucleótidos. En un sentido global y general, el método incluye poner en contacto la muestra con una composición que comprenda una o más de las formulaciones descritas en el presente documento durante un tiempo suficiente para aumentar la eficacia de obtener la población purificada de polinucleótidos procedente de la muestra biológica.

En las realizaciones ilustrativas, la integridad de una población de polinucleótidos en la muestra biológica, y/o la fidelidad de al menos una primera secuencia de al menos uno de los polinucleótidos obtenidos a partir de la muestra se mantiene al menos sustancialmente (*es decir*, al menos un 75 % de los nucleótidos en la población son sustancialmente de longitud completa) cuando la composición que comprende la muestra se almacena a una temperatura de entre aproximadamente  $-20^{\circ}$  C a aproximadamente  $40^{\circ}$  C durante un periodo de entre aproximadamente 7 a aproximadamente 14 días o más, de forma alternativa a una temperatura de entre aproximadamente  $-20^{\circ}$  C a aproximadamente  $40^{\circ}$  C durante un periodo de entre aproximadamente 7 a aproximadamente 14 días o más, o de forma alternativa a una temperatura de entre aproximadamente  $20^{\circ}$  C a aproximadamente  $40^{\circ}$  C durante un periodo de entre aproximadamente 14 a aproximadamente 30 días o más.

Alternativamente, la integridad de una población de polinucleótidos en la muestra biológica se mantiene al menos sustancialmente de tal manera que al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % o más de los nucleótidos en la población están presentes en la disolución cuando se comparan con la cantidad presente en la disolución cuando la muestra se ha recogido inicialmente. En realizaciones preferidas, la integridad de la muestra se mantendrá sustancialmente de tal manera que todos, o casi todos los polinucleótidos presentes en la muestra inicial se mantendrán (*es decir*, no se degradan de forma detectable) en el tiempo.

En la práctica de los métodos divulgados, preferentemente desde el momento de recogida al momento de aislamiento, purificación o caracterización de una población de polinucleótidos de la anterior, menos de aproximadamente un 20 % de la población de polinucleótidos originalmente presente en la muestra recogida se degradará en el tiempo durante el almacenamiento posterior. De forma preferible, sustancialmente menos de aproximadamente el 15 % de la población de polinucleótidos originalmente presente en la muestra recogida se degradará en el tiempo durante el almacenamiento posterior, de forma más preferible, menos de aproximadamente el 10 % de la población de polinucleótidos originalmente presente en la muestra recogida se degradará en el tiempo durante el almacenamiento posterior, y de forma más preferible aún, menos de aproximadamente el 5 % de la población de polinucleótidos originalmente presente en la muestra recogida se degradará en el tiempo durante el almacenamiento posterior. En las realizaciones particularmente preferidas, no más de aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 3 %, aproximadamente un 2 % o aproximadamente un 1 % de la población de polinucleótidos originalmente presente en la muestra recogida se degradará en el tiempo durante el almacenamiento posterior. Es preferible dicha conservación de elevada integridad de la calidad de la muestra, con respecto a las condiciones donde la muestra se almacena, y se mantendrá sustancialmente durante un periodo de tiempo de al menos aproximadamente 7 días, al menos aproximadamente 14 días, al menos aproximadamente 21 días, al menos aproximadamente 30 días, al menos aproximadamente 45 días, al menos aproximadamente 60 días o incluso al menos aproximadamente 90 días o más.

Los métodos divulgados para recoger, almacenar, y/o transportar muestras de origen biológico a partir de las cuales se pueden obtener una o más poblaciones de ácidos nucleicos, pueden incluir también opcionalmente de manera adicional una o más etapas, que incluyen, sin limitación, (a) analizar y/o cuantificar uno o más polinucleótidos obtenidos a partir de la muestra, (b) detectar la presencia de la molécula portadora (*es decir*, la IPC) en la muestra recogida; (c) cuantificar la cantidad de la IPC en la muestra recogida, y/o (d) medir la fidelidad de la secuencia de, o determinar el porcentaje de degradación de la IPC en la muestra recogida.

Aunque se puede determinar la presencia de, la integridad de, o la fidelidad de la secuencia de, una secuencia de polinucleótidos concreta obtenida a partir de, o utilizada en la práctica de la presente invención, utilizando cualquier metodología convencional conocida por aquellos normalmente expertos en las técnicas moleculares, en una realización, se utilizó la amplificación mediante la PCR. Igualmente, la determinación de la integridad de un polinucleótido de interés puede incluir la determinación del umbral del ciclo de la PCR ( $C_T$ ) bajo condiciones dadas, y la determinación de la fidelidad de la secuencia, se puede determinar la integridad cualitativa de los ácidos nucleicos recogidos mediante métodos de secuenciación de ADN o ARN convencionales, que incluyen, sin limitación, los métodos basados en la química de Maxam-Gilbert, el método de terminación de la cadena didesoxi de Sanger y *col.*, el método basado en el fluoróforo del colorante de Mathies y *col.*, o las técnicas de pirosecuenciación que describen Nyren y Ronaghi.

Las formulaciones a modo de ejemplo de la invención incluyen una disolución de recogida en una etapa que lisa, estabiliza, y preserva la integridad de los ácidos nucleicos preparados a partir de una muestra biológica para el aislamiento, la detección, la cuantificación, la amplificación, y/o el análisis posterior del ARN y/o el ADN.

En determinadas realizaciones, las composiciones portador/IPC finalizadoras de la invención se formularán en un medio de recogida/almacenamiento/transporte de la muestra en una etapa que incluye: a) uno o más caótropos (cada uno presente de forma preferible en la composición en una cantidad de entre aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 6 M); b) uno o más detergentes (presente cada uno preferentemente en la composición en una cantidad de entre aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 %), c) uno o más agentes quelantes (presente cada uno preferentemente en la composición en una cantidad de entre aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM); d) uno o más agentes reductores (presente cada uno preferentemente en la composición en una cantidad de entre aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 0,3 M), y uno o más agentes desespumantes (presente cada uno preferentemente en la composición en una cantidad de entre aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 0,3 %).

Los caótropos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, tiocianato de guanidina (GuSCN), clorhidrato de guanidina (GuHCl), isotionato de guanidina, tiocianato de potasio (KSCN), yoduro de sodio, perclorato de sodio, urea, o cualquiera de sus combinaciones. Las descripciones de los caótropos y las sales caotrópicas adicionales a modo de ejemplo se pueden encontrar en la Patente de los Estados Unidos N° 5.234.809.

Los detergentes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, dodecilsulfato de sodio (SDS), dodecilsulfato de litio (LDS), taurodesoxicolato de sodio (NaTDC), taurocolato de sodio (NaTC), glicocolato de sodio (NaGC), desoxicolato

de sodio (NaDC), colato de sodio, alquilbencenosulfonato de sodio (NaABS), *N*-lauroil sarcosina (NLS), sales de ácidos carboxílicos (es decir, jabones), sales de ácidos sulfónicos, sales de ácido sulfúrico, ésteres de ácido fosfórico y polifosfórico, alquilfosfatos, monoalquilfosfato (MAP), y sales de ácidos perfluorocarboxílicos, detergentes aniónicos que incluyen los descritos en la Patente de los Estados Unidos N° 5.691.299.

5 Los agentes reductores a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, 2-mercaptoetanol ( $\beta$ -ME), tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP), ditioneitol (DTT), formamida, dimetilsulfóxido (DMSO), o cualquiera de sus combinaciones. En una realización preferida, el agente reductor incluye, o es TCEP. Los agentes quelantes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) ácido hidroxietilendiaminotetraacético (HEDTYA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), N,N-bis (carboximetil) glicina (NTA), etilendiaminatetraacético (EDTA), citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato de potasio, citrato de magnesio, citrato amonio férrico, citrato de litio, o cualquiera de sus combinaciones. En realizaciones preferidas, el agente quelante incluye EDTA, un citrato, o una de sus combinaciones. En una realización más preferida, el agente quelante incluye EDT. Las composiciones de la invención pueden incluir adicionalmente un agente desespumante para evitar la formación de burbujas que normalmente son el resultado de la presencia de detergentes en la formulación. Los agentes desespumantes facilitan el pipeteado y la manipulación de las composiciones divulgadas. Los agentes tensioactivos/despumantes a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, cocoamidopropil hidroxisulfatada, ácidos alquilaminopropiónicos, carboxilatos de imidazolina, betaínas, sulfobetaínas, sulfatadas, alquilfenol etoxilatos, etoxilatos alcohólicos, polioxipropilenglicoles polioxietilenados, mercaptanos polioxietilenados, ésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga, alcanolamidas, glicoles acetilénicos terciarios, siliconas polioxietilenadas, N-alquilpirrolidonas, alquilpoliglicosidasas, polímeros de silicona tales como Antifoam A®, o polisorbatos tales como Tween®, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización preferida, un agente desespumante incluye un polímero de silicona.

25 Opcionalmente, las composiciones de la invención pueden incluir adicionalmente uno o más tampones (presente cada uno preferentemente en la composición final en una cantidad de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1 M). Los tampones a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, tris (hidroximetil) aminometano (Tris), citrato, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), 1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)propano (Bis-Tris), ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico (CAPS), ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxipropanosulfónico (CAPSO), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), ácido 3-(N-morfolino)-2-hidroxipropanosulfónico (MOPSO), ácido piperazina-N,N'-bis(2-hidroxipropanosulfónico) (POPSO), ácido N-[Tris(hidroximetil)metil]-3-amino propanosulfónico acid (TAPS), ácido N-[Tris(hidroximetil)metil]-3-amino-2-hidroxipropanosulfónico (TAPSO), ácido N-[Tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico (TES), N,N-bis(2-hidroxietil) glicina (Bicina), N-[tris(hidroximetil)metil]glicina (Tricina), ácido N-2-acetamido-2-iminodiacético (ADA), ácido N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico (ACES), ácido piperazina-1,4-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), bicarbonato, fosfato, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización preferida, el tampón incluye un citrato.

40 La inclusión de uno o más de dichos tampones opcionales pero preferidos es deseable para controlar el pH de las formulaciones debido a que se ha encontrado que la extracción del ácido nucleico es óptima en un intervalo de pH de aproximadamente 5 a 7. Preferentemente, el uno o más tampones empleados en las composiciones divulgadas se escogen para proporcionar una capacidad tamponante significativa en el intervalo de un pH de aproximadamente 6 a un pH de aproximadamente 8, de forma más preferible en un intervalo de pH de aproximadamente 6 a 45 aproximadamente 7, y aún de forma más preferible, en un intervalo de pH de aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,8. En las realizaciones ilustrativas, el pH de la disolución PrimeStore™ (denominada también en el presente documento como "PSS") es preferentemente de aproximadamente  $6,9 \pm 0,25$ .

50 Las composiciones de la invención pueden incluir opcionalmente además uno o más compuestos o reactivos adicionales que incluyen, sin limitación, compuestos de ion híbrido funcionalizados catiónicos tales como betaínas (que incluyen, sin limitación, *N,N,N*-trimetilglicina, cocamidopropilbetaína, y similares), albuminoides (que incluyen, sin limitación, ovoalbúmina, y albúminas de suero de origen bovino, equino, o humano, y osmolitos (que incluyen sin limitación, N-óxido de trimetilamina (TMAO), dimetilsulfoniopropionato, sarcosina, y sacáridos o alcoholes azucarados que incluyen, sin limitación, trehalosa, maltosa, ramnosa, sacarosa, arabinosa, fucosa, manitol, sorbitol, adonitol, y similares).

60 Preferentemente, las composiciones de la invención proporcionan capacidad tamponante suficiente para estabilizar de forma adecuada las poblaciones de polinucleótidos obtenidos a partir de una muestra, y se tamponarán, de forma más preferible a un pH de aproximadamente 6,4 a 6,9 durante la formulación, y mantendrán las poblaciones aisladas de polinucleótidos en un intervalo de pH similar cuando la muestra se pone en contacto con las formulaciones de almacenamiento/recogida descritas en el presente documento.

65 Las composiciones de la presente invención se inactivarán normalmente al menos de forma sustancial, y de forma preferible se inactivarán de forma total, cualesquiera ARNasas o ADNasas endógenas o exógenas presentes en la muestra, tales como los ácidos nucleicos de la muestra son sustancialmente libres de cualquier degradación, y preferentemente no se degradan, o pierden la integridad, durante la recogida, la lisis, el almacenamiento, y el

transporte de la muestra para los posteriores análisis *in vitro* o *in vivo*.

Se describen formulaciones a modo de ejemplo de las composiciones de almacenamiento/transporte/recogida de la invención en los ejemplos en el presente documento e incluyen, sin limitación, una composición que incluye aproximadamente 4 M de un caótropro (tal como tiocianato de guanidina, clorhidrato de guanidina, isocianato de guanidina, o cualquiera de sus combinaciones), aproximadamente 10 mM a 30 mM de un agente quelante (tal como EGTA, HEDTA, DTPA, NTA, EDTA, citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato amonio férrico, citrato de litio, o cualquiera de sus combinaciones), aproximadamente 0,25 % de un detergente (tal como SDS, LDS, NaTDC, NaTC, NaGC, NaDC, colato de sodio, NaABS, NLS, o cualquiera de sus sales o combinaciones), aproximadamente 0,1 M de un agente reductor (tal como  $\beta$ -ME, DTT, DMSO, formamida, TCEP, o cualquiera de sus combinaciones), y aproximadamente 0,1 % de un agente tensioactivo/despumante (tal como un polímero de silicona [*por ejemplo*, Antifoam A®] o un polisorbato [*por ejemplo*, Tween®], o cualquiera de sus combinaciones).

Las formulaciones a modo de ejemplo adicionales de las composiciones de recogida del espécimen de la invención incluyen, sin limitación, una composición que incluye aproximadamente 3 M de un caótropro (tal como tiocianato de guanidina, clorhidrato de guanidina, isocianato de guanidina, o cualquiera de sus combinaciones), aproximadamente 1 mM de un agente reductor 0,5 M (tal como, por ejemplo,  $\beta$ -ME, TCEP, formamida, DTT, DMSO, o cualquiera de sus combinaciones), aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mM de un agente quelante (tal como, por ejemplo, EGTA, HEDTA, DTPA, NTA, EDTA, citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato amonio férrico, citrato de litio, o cualquiera de sus combinaciones), aproximadamente 0,25 % de un detergente (tal como SDS, LDS, NaTDC, NaTC, NaGC, NaDC, colato de sodio, NaABS, NLS, o cualquier sal o combinación de los mismos), y opcionalmente, pero de forma preferible aproximadamente 0,0002 % de un agente despumante (denominado también agente antiespumante) (tal como un polímero de silicona o un polisorbato, o cualquiera de sus combinaciones) y aproximadamente 100 mM de un tampón (tal como Tris, MES, BES, Bis-Tris, HEPES; MOPS, bicarbonato, citrato, fosfato, o cualquiera de sus combinaciones).

Otra formulación a modo de ejemplo de las composiciones de aislamiento y estabilización de polinucleótidos divulgadas incluye, sin limitación, una composición que incluye aproximadamente 1 a aproximadamente 4 M de un agente caotrópico tal como tiocianato de guanidina, clorhidrato de guanidina, o isocianato de guanidina; aproximadamente 0,5 a 100 mM de un agente quelante tal como EDTA, o citrato de sodio, o ambos; aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 % de un detergente aniónico tal como SDS o N-lauroil sarcosina, sal de sodio; aproximadamente 0,001 a aproximadamente 0,0001 de un tensioactivo o agente humectante tal como el polímero de silicona, Antifoam A®, e); aproximadamente 10 a aproximadamente 500 mM de un agente tamponante tal como Tris-HCl; y aproximadamente 10 a aproximadamente 25 % de un alcohol de cadena corta tal como etanol.

En realizaciones concretas, la invención proporciona una composición que incluye aproximadamente 2,5 M de tiocianato de guanidina, aproximadamente 0,5 mM de TCEP; aproximadamente 10 mM de citrato de sodio; aproximadamente 0,5 % de N-lauroil sarcosina, sal de sodio; aproximadamente 0,0002 % de Antifoam A, aproximadamente 100 mM de Tris-HCl, aproximadamente 0,1 mM de EDTA, y aproximadamente 23 % de etanol.

La invención proporciona también un método para obtener una población de polinucleótidos procedente de una muestra sospechosa de contener ácidos nucleicos. El método implica generalmente asociar la muestra con una cantidad de una de las composiciones divulgadas, en condiciones eficaces para obtener una población de polinucleótidos procedente de la muestra. La invención no requiere separación de la población para "obtener" la muestra, ya que el diagnóstico posterior puede necesitar o no dicha separación. La invención proporciona también un método para preparar una formulación acuosa en una etapa de las composiciones de recogida/lisis/transporte/almacenamiento descritas en el presente documento para la recogida de ácidos nucleicos tales como ARN y/o ADN. En un sentido global, el método implica generalmente combinar uno o más caótropros y agua exenta de nucleasa a una temperatura de aproximadamente 20° C a 90° C en una zona de reacción; combinar a continuación uno o más de los caótropros disueltos con uno o más agentes reductores, uno o más quelantes, y uno o más detergentes en la zona de reacción para formar una composición intermedia, combinar opcionalmente un polímero de silicona con la composición intermedia en una cantidad suficiente para minimizar el espumado durante la preparación adicional de la formulación acuosa en una etapa, combinar una cantidad suficiente de tampón con la composición intermedia para mantener un pH de aproximadamente 6 a 6,9; combinar opcionalmente un segundo agente quelante con la zona de reacción; a continuación, aumentar la temperatura de la segunda composición intermedia hasta aproximadamente 60 a 95° C durante aproximadamente 1 a 30 minutos y disminuir la temperatura hasta condiciones ambiente; opcionalmente, combinar a continuación un alcohol C<sub>1-6</sub> con los contenidos de la zona de reacción; y opcionalmente ajustar el pH para que sea de aproximadamente 6,4 a 6,9.

En realizaciones adicionales, la invención proporciona un método para preparar formulaciones acuosas en una etapa adaptadas para obtener una población de polinucleótidos procedente de una muestra o espécimen biológico que es sospechosa de contener ácidos nucleicos. Este método implica generalmente al menos las etapas de: a) poner en contacto la muestra con una cantidad de la formulación acuosa en una etapa eficaz para:

- i) al menos sustancialmente, destruir o inactivar patógenos potencialmente infecciosos en la muestra;  
 ii) al menos lisar una porción de células para liberar los ARN y/o ADN procedentes de la muestra; y  
 iii) inhibir o evitar al menos sustancialmente los polinucleótidos liberados en la muestra procedentes de la hidrólisis o degradación enzimática, modificación, o inactivación adicionales, con el fin de obtener la población de polinucleótidos procedente de la muestra.

5

Preferentemente, los métodos de la invención incluirán al menos poner en contacto la muestra con una cantidad de una o más de las composiciones divulgadas a una temperatura de entre 0°C a aproximadamente 40° C (de forma más preferible a una temperatura de 4° C a aproximadamente 35° C; y de forma aún más preferible a una temperatura de 10° C a aproximadamente 30° C) durante un periodo de tiempo de al menos 24 h, de forma más preferible, durante un periodo de tiempo de al menos 48 h, al menos 72 h, al menos 96 h, o más, sin producir deterioro, degradación, escisión enzimática, y/o digestión nucleolítica, modificación, o procesamiento sustancial de los ácidos nucleicos contenidos en la muestra puesta en contacto con dicha composición.

10

15

En determinadas realizaciones, los métodos de la invención incluirán al menos poner en contacto la muestra con una cantidad de una o más de las composiciones divulgadas a una temperatura de aproximadamente 0° C a aproximadamente 40° C (de forma más preferible a una temperatura de aproximadamente 4° C a aproximadamente 35° C, aún de forma más preferible a una temperatura de aproximadamente 10° C a aproximadamente 30° C, y de forma aún más preferible a una temperatura de aproximadamente 15° C a aproximadamente 25° C) durante un periodo de tiempo de al menos 7 días, de forma más preferible, durante un periodo de tiempo de al menos 14 días, al menos 21 días, al menos 28 días, o incluso más, sin producir deterioro, degradación, escisión enzimática, y/o procesamiento nucleolítico significativo de los ácidos nucleicos contenidos en una muestra procesada. De esta manera, debe entenderse que la asociación de una muestra con una composición inventiva necesaria solo debe producirse durante un corto tiempo, pero para evitar la necesidad de la separación inmediata de los ácidos nucleicos procedentes de la muestra y la composición en una etapa de la invención, todos los materiales pueden permanecer en contacto durante los periodos de tiempo especificados anteriormente sin ninguna degradación sustancial o sin ninguna degradación de los ácidos nucleicos. Preferentemente, la integridad de una población de polinucleótidos liberados de una muestra en la composición se mantendrá sustancialmente, incluso cuando la composición que comprende la muestra se almacena a temperaturas ambiente, e incluso durante periodos prolongados de tiempo, incluyendo, sin limitación, el almacenamiento durante más de aproximadamente 10 días, más de aproximadamente 20 días, o incluso más de aproximadamente 30 días o más. Igualmente, es deseable que la integridad de una población de nucleótidos liberados procedentes de la muestra en la composición se mantendrá sustancialmente, incluso cuando la composición que comprende la muestra se almacena a temperaturas subtropicales y tropicales — incluso durante periodos prolongados de tiempo, que incluyen, sin limitación, el almacenamiento durante más de o igual a aproximadamente 5 días, más de o igual a aproximadamente 10 días, más de o igual a aproximadamente 15 días, o incluso más de o igual a aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 60, o aproximadamente 90 días o incluso más.

20

25

30

35

40

En la práctica de los presentes métodos, es preferible que al menos una o más células biológicas contenidas en la muestra se lisen sustancialmente para liberar al menos una primera población de una primera pluralidad de polinucleótidos contenidos en dichas células en la composición. Preferentemente, los componentes de la composición divulgada son suficientes para liberar dicha población a partir de todos o sustancialmente todos los tejidos/celulares y/o desechos de las muestras restantes (que incluyen, sin limitación, lípidos, fosfolípidos, péptidos, proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos, polioles, orgánulos celulares, componentes de membrana, y similares).

45

50

Es también deseable en la práctica de los presentes métodos que puedan estar presentes al menos una o más nucleasas exógenas o endógenas en, sobre, o cerca de la propia muestra, que se inactivará de forma suficiente por uno o más componentes de la composición de tal manera que los ácidos nucleicos resultantes no se destruyen, dañan, o escinden nucleolíticamente cuando las células biológicas contenidas en la muestra se lisan sustancialmente para liberar la población de polinucleótidos procedente de las células. Preferentemente, uno o más componentes de la composición divulgada son eficaces para destruir, inactivar, o inhibir de forma sustancial la actividad biológica de una ADNasa o de una ARNasa, cuando dicha proteína está presente en la muestra.

55

60

Es también deseable en la práctica de los presentes métodos que cuando uno o más microbios, virus, hongos y/u otros patógenos u organismos de interés están presentes en, sobre, o cerca de la muestra cuando se recoge, dichos microbios, virus, hongos, y/u otros patógenos u organismos de interés se lisarán, inactivarán de forma suficiente, o se destruirán sustancialmente tras el contacto con la composición, lo que facilita una manipulación segura de la muestra por el especialista a cargo de la misma. Preferentemente, uno o más componentes de la composición divulgada son eficaces para convertir una muestra patógena en sustancialmente o preferentemente en su totalidad no patógena sin la necesidad de añadir componentes adicionales a la composición. Sin embargo, en determinadas aplicaciones, puede ser deseable incluir uno o más agentes antimicrobianos, antivíricos, o antifúngicos adicionales a las composiciones para volverlas sustancialmente no patógenas, y de esta manera, seguras para la manipulación por el especialista a cargo de las mismas.

65

Preferentemente, la composición que contiene la muestra es al menos suficientemente estable para permitir el almacenamiento de la muestra en la composición en condiciones ambiente, casi ambiente, o incluso más frías o más

calientes al menos sustancialmente (o en su totalidad) a partir del tiempo de recogida del espécimen o la muestra sustancialmente hasta el tiempo de analizar o caracterizar al menos una primera población de polinucleótidos procedentes de la muestra. Tal como se usa en el presente documento, "temperatura ambiente" puede referirse a temperaturas de aproximadamente 18° C a 25° C, o, en algunas realizaciones, de forma más preferible de aproximadamente 20° C a aproximadamente 22° C.

En determinadas realizaciones, la composición que contiene la muestra puede almacenarse a una temperatura de aproximadamente 0° C a aproximadamente 40° C, de forma más preferible a una temperatura de aproximadamente 4° C a aproximadamente 30° C, de forma más preferible, a una temperatura de aproximadamente 10° C a aproximadamente 25° C, al menos sustancialmente desde el tiempo de recogida al tiempo donde los polinucleótidos obtenidos procedentes de la muestra se aíslan, purifican, o caracterizan adicionalmente utilizando una o más metodologías convencionales de biología molecular.

En determinadas realizaciones, la composición que contiene la muestra sospechosa de contener ácidos nucleicos estabilizará los ácidos nucleicos en la medida en que donde cualquiera de ellos permanecerá al menos sustancialmente sin degradar (*es decir*, al menos sustancialmente estable) incluso tras almacenamiento prolongado de la composición a temperaturas ambiente, de refrigerador, o subcero. Será deseable que esta estabilidad consiga que al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 85 %, de forma más preferible al menos aproximadamente el 90 %, de forma más preferible al menos aproximadamente el 95 %, o incluso de forma más preferible, al menos aproximadamente el 98 % de los polinucleótidos contenidos en la muestra almacenada no se degrade tras el almacenamiento prolongado de la muestra. En determinadas realizaciones, sustancialmente todos los polinucleótidos contenidos en la muestra se estabilizarán de tal manera que la integridad original de los polinucleótidos se preserva durante la recogida, lisis, almacenamiento, y transporte de la muestra procesada.

En determinadas realizaciones, el método proporcionará preferentemente una población de ácidos nucleicos preparados a partir de una muestra biológica donde menos de aproximadamente el 15 % de los polinucleótidos contenidos en la muestra se degradará durante la recogida, lisis, almacenamiento, y transporte de la muestra después que se ha almacenado en la composición a una temperatura de entre -20°C a aproximadamente 40° C durante un periodo de al menos 24, 48, 72, o 96 h o más desde que la muestra se ha introducido inicialmente en la composición.

En realizaciones relacionadas, el método proporcionará preferentemente una población de ácidos nucleicos preparados a partir de una muestra biológica donde menos de aproximadamente el 10 % de los polinucleótidos contenidos en la muestra se degradará durante la recogida, lisis, almacenamiento, y transporte de la muestra tras haberse almacenado en la composición a una temperatura de entre -20° C a aproximadamente 40° C durante un periodo de al menos 24, 48, 72, o 96 h o más desde que la muestra se ha introducido inicialmente en la composición.

Igualmente, en algunas aplicaciones de la metodología divulgada en el presente documento, el uso de las composiciones divulgadas proporcionará preferentemente una población de ácidos nucleicos que se preparan a partir de una muestra biológica, donde menos de aproximadamente el 5 % de los polinucleótidos contenidos en la muestra se degradará durante la recogida, lisis, almacenamiento, y transporte de la muestra desde que se ha almacenado en la composición a una temperatura de -20° C a aproximadamente 40° C durante un periodo de al menos 24, 48, 72 o 96 h o más desde que la muestra se ha introducido inicialmente en la composición.

En algunos casos, la población de ácidos nucleicos preparados mediante los presente métodos se puede mantener con la suficiente integridad de tal manera que no más de aproximadamente un 1 o un 2 % de la muestra se degradará incluso cuando la composición se almacena a una temperatura de 0° C a aproximadamente 40° C durante periodos de algunos días a algunas semanas. De hecho, los inventores han mostrado que las muestras de ácidos nucleicos aislados utilizando los métodos divulgados permanecen al menos sustancialmente estables, preferentemente estables, en su forma no degradada durante periodos de algunas semanas a incluso algunos meses o más, incluso cuando la composición que contiene los ácidos nucleicos se almacena a una temperatura de 10° C a aproximadamente 40° C. en una realización preferida, el límite superior de los intervalos de temperatura anteriormente señalados es de aproximadamente 37° C. de esta manera, el término "estable" tal como se usa en el presente documento puede referirse a las diversas realizaciones señaladas anteriormente con respecto a la integridad de la población de ácidos nucleicos tras un lapso concreto de tiempo a una temperatura dada.

Los polinucleótidos de la presente invención, y particularmente aquellos útiles en la preparación de las IPC, contienen preferentemente al menos una primera región de transcripción de la polimerasa unida de manera operable a una secuencia control positiva (PCS). Dichas regiones pueden situarse operativamente en la dirección 5' de las PCS. De tal manera que la PCS se amplifica cuando una polimerasa adecuada (*por ejemplo*, la polimerasa T3, SP6, o T7, y similares) se pone en contacto con la PCS en las condiciones de reacción adecuadas. La construcción puede comprender además un único cebador, o, de forma alternativa, se pueden utilizar dos o más cebadores (por ejemplo, cebadores "directo" e "inverso") para facilitar la expresión de la PCS. Los cebadores a modo de ejemplo útiles en la práctica de la invención incluyen, pero no están limitados en manera alguna a, aquellas secuencias de cebadores que se unen de forma específica a la misma PCS o a las regiones inmediatamente en la dirección 5' (5')

y/o en la dirección 3' (3') de la PCS. En las realizaciones ilustrativas, la PCS contendrá al menos una primera región a la cual se une de forma específica una primera sonda de detección (incluyendo, sin limitación, sondas luminiscentes, fluorescentes, quimioluminiscentes, o FRET, tal como se describe en el presente documento).

5 Los polinucleótidos útiles en la preparación de las IPC pueden comprender también opcionalmente de forma adicional uno o más dominios de unión naturales, sintéticos, homólogos, heterólogos, o un(os) promotor(es) híbrido(s), potenciador(es) un(os) elemento(s) regulador(es), enlazador(es), separador(es), dominio(s) de unión, o un(os) sitio(s) de activación de la transcripción, etc.

10 En las realizaciones ilustrativas, los inventores han demostrado que los medios de recogida/transporte de la muestra divulgados pueden emplearse de forma satisfactoria para permitir la recogida y el almacenamiento de muestras biológicas durante periodos de días, a semanas, a meses, incluso cuando se almacenan en condiciones ambientales. De esta forma, las formulaciones divulgadas proporcionan composiciones eficaces para mantener la fidelidad y la integridad de las poblaciones de ácidos nucleicos aislados durante aproximadamente 1,  
15 aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, o incluso aproximadamente 10 semanas o más sin deterioro significativo en la calidad de los polinucleótidos contenidos en la muestra. De hecho, el almacenamiento a largo plazo de las muestras es incluso posible tanto en condiciones ambiente como en condiciones próximas a ambiente durante periodos de algunos meses o más –una mejora significativa sobre cualquier formulación comercial convencional examinada por los inventores durante la presente invención. Los datos obtenidos utilizando los análisis *in vitro* de los especímenes recogidos han demostrado que las muestras recogidas y almacenadas en una de las formulaciones de recogida/almacenamiento/transporte permaneció sustancialmente sin degradar, y funcionalmente viable cuando se almacenó en la disolución durante un periodo de unos pocos días a unas pocas semanas a unos pocos meses o más. La comparación de los resultado obtenidos después de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, o  
25 incluso aproximadamente 8 semanas o más demostró la eficacia de las disoluciones para evitar una actividad de la nucleasa sustancial frente a los polinucleótidos aislados, y proteger las moléculas aisladas de la contaminación o la degradación molecular.

30 La invención abarca una composición que incluye. a) uno o más caótopos; b) uno o más detergentes, c) uno o más agentes reductores, d) uno o más agentes quelantes; e) uno o más tampones; y f) una molécula de ácido nucleico monocatenario aislada de aproximadamente 60 a 500 nucleótidos de longitud que comprende un segmento de ácido nucleico que: (1) incluye un primer dominio de la secuencia que se une de forma específica a una sonda marcada de entre aproximadamente 12 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud que es específica para la detección del  
35 segmento de ácido nucleico; (2) incluye un segundo dominio de la secuencia que se une de forma específica a un cebador directo de la amplificación de la PCR de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud; y (3) incluye un tercer dominio de la secuencia que se une de forma específica a un cebador inverso de amplificación de la PCR de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud; donde el segundo y tercer dominios de la secuencia se sitúan de manera operable para facilitar la amplificación dirigida a la PCR de al menos una primera porción del segmento de ácido nucleico procedente de los cebadores directo e inverso en condiciones eficaces para amplificar la al menos primera porción; donde la molécula no se une sustancialmente en condiciones de hibridación rigurosas a un genoma de mamífero, o al genoma de una bacteria, hongo, o virus que es patógeno para un mamífero, y donde adicionalmente (a)-(e) están presentes en la composición en una cantidad suficiente para desnaturalizar una o más proteínas, inactivar una o más nucleasas, destruir uno o más patógenos, o  
45 evitar la degradación de uno o más ácidos nucleicos en una muestra sospechosa de contener una población de ácidos nucleicos cuando la muestra se pone en contacto con la composición.

En una realización, cada uno de (a)-(e) está presente en la composición en una cantidad suficiente para inhibir o evitar la degradación sustancial de la población de nucleótidos incluyendo la molécula de ácido nucleico monocatenario cuando se almacena a una temperatura de aproximadamente 10° C a aproximadamente 40° C,  
50 durante un periodo de aproximadamente 1 día a aproximadamente 90 días. En otra realización, a) el uno o más caótopos están cada uno presentes en una cantidad de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 6 M, b) el uno o más detergentes están cada uno presentes en una cantidad de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 % (p/v), c) el uno o más agentes reductores están cada uno presentes en una cantidad de aproximadamente 0,05 M a  
55 aproximadamente 0,3 M, d) el uno o más agentes quelantes están cada uno presentes en una cantidad de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM; y e) el uno o más tampones están cada uno presentes en una cantidad de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1 M. En otra realización adicional, la sonda marcada incluye al menos un primer compuesto de unión al surco; una marca radioactiva, una marca luminiscente, una marca quimioluminiscente, una marca fluorescente, una marca enzimática, una marca magnética, o una marca de resonancia de espín, o una de sus combinaciones.  
60

En una realización preferida, la composición incluye: a) el uno o más caótopos que incluyen tiocianato de guanidina, isocianato de guanidina, clorhidrato de guanidina, o cualquiera de sus combinaciones; b) el uno o más detergentes que incluyen dodecilsulfato de sodio, dodecilsulfato de litio, taurodesoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, desoxicolato de sodio, colato de sodio, alquilbencenosulfonato de sodio, N-lauroil sarcosina, o cualquiera de sus combinaciones, c) el uno o más agentes reductores que incluyen 2-mercaptoetanol, tris (2-  
65

carboxietil) fosfina, ditiotreitól, dimetilsulfóxido, o cualquiera de sus combinaciones; d) el uno o más agentes quelantes que incluyen ácido etilenglicol tetraacético, ácido hidroxietilendiamina triacético, ácido dietilentriamina pentaacético, N,N-bis(carboximetil)glicina, etilendiamina tetraacético, citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato amonio férrico, citrato de litio, o cualquiera de sus combinaciones; o e) el uno o más tampones que incluyen tris(hidroximetil)aminometano, citrato, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico, 1,3-bis(tris(hidroximetil)etilamino)propano, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico, ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico, bicarbonato, fosfato, o cualquiera de sus combinaciones. En otra realización preferida, la composición incluye además uno o más de los siguientes: g) uno o más tensioactivos seleccionados entre el grupo que consiste en un polímero de silicona, un polisorbato, y cualquiera de sus combinaciones; h) uno o más alcoholes de cadena corta seleccionados entre el grupo que consiste en metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, o hexanol, y cualquiera de sus combinaciones, e i) uno o más agentes desespumantes seleccionados entre el grupo que consiste en un polímero de silicona, un polisorbato, y cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización adicional, la composición a) se tampona a un pH de aproximadamente 6,0 a 7,0; b) está sustancialmente exenta de actividad de la ADNasa, o c) incluye además una población de polinucleótidos aislados de origen bacteriano, vírico o fúngico que incluye ARN, ADN, ANP, o cualquiera de sus combinaciones. En una realización preferida, la composición incluye: a) aproximadamente 4 M de tiocianato de guanidina; aproximadamente 30 mM de citrato de sodio; aproximadamente 0,25 % (p/v) de dodecilsulfato de sodio, aproximadamente 0,25 % (p/v) de N-lauroil sarcosina, sal de sodio; (v) aproximadamente 0,1 M de 2-mercaptoetanol; y aproximadamente 0,1 % de polímero de silicona (p/v); b) aproximadamente 3 M de tiocianato de guanidina; aproximadamente 1 mM de TCEP; aproximadamente 10 mM de citrato de sodio; aproximadamente 0,5 % de N-lauroil sarcosina; aproximadamente 0,0002 % de polímero de silicona, aproximadamente 100 mM de 2-amino-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS), y aproximadamente 0,1 mM de EDTA; c) aproximadamente 1 M a aproximadamente 4 M de tiocianato de guanidina; aproximadamente 0,5 mM a 10 mM de TCEP; aproximadamente 1 mM a 100 mM de citrato de sodio; aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 % de SDS o NLS; aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,0001 % de un polímero de silicona, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM de TRIS, aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM de APCA, EDTA, EGTA, HEDTA, DTPA, NTA, o citrato, y aproximadamente 10 % a aproximadamente 25 % de etanol (v/v), o d) aproximadamente 3 M de tiocianato de guanidina; 1 mM de TCEP; aproximadamente 10 mM de citrato de sodio, aproximadamente 0,5 % de N-lauroil sarcosina, sal de sodio; aproximadamente 0,0002 % de un polímero de silicona; aproximadamente 100 mM de TRIS; aproximadamente 0,1 mM de EDTA, y aproximadamente 10 % a aproximadamente 25 % de etanol (v/v).

En otra realización, la población de ácidos nucleicos se recoge y preserva en un único recipiente de reacción que incluye la composición. En una realización más adicional, la muestra es una muestra biológica de origen clínico, veterinario, epidemiológico, ambiental, forense, o patológico; o donde contiene, o es sospechosa de contener uno o más polinucleótidos de origen vírico, bacteriano, fúngico, o de mamífero. En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico monocatenario aislado incluye al menos 20 nucleótidos contiguos procedentes de la secuencia 5'-  
 CCCUUAGCAGCAGCAGUCAGGAGCCAAUUUCAGAGCUCAGCGAGACAGUUUUUAUAGGCAUGGCAUCAG  
 CUACGCUCGCUCAGGCUAGUCAGGUCCAAAGUUUCAGUU -3' (SEC ID N°: 2). En una realización, cada una de las composiciones anteriormente señaladas se adapta para su uso en el diagnóstico o el tratamiento de una infección microbiana, fúngica o vírica.

La invención abarca también el uso de una composición de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores en la fabricación de un medicamento para el diagnóstico o el tratamiento de una infección microbiana, o uno o más síntomas de la misma. En una realización preferida, la invención se usa para diagnosticar o tratar una infección bacteriana, vírica, o fúngica, o uno o más síntomas de la misma.

La invención abarca además un kit diagnóstico o un sistema de recogida de muestras que incluye: a) una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y b) instrucciones para usar la composición en el diagnóstico o el tratamiento de una infección microbiana.

La invención abarca además un método para aumentar la eficacia de obtener una población purificada de polinucleótidos a partir de una muestra biológica sospechosa de contener dichos polinucleótidos, que incluye: poner en contacto la muestra con una composición que incluye la molécula de ácido nucleico monocatenario aislada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para aumentar la eficacia de obtener la población purificada de polinucleótidos a partir de la muestra biológica. En una realización, la integridad de una población de polinucleótidos en la muestra biológica o la fidelidad de al menos una primera secuencia de uno de los polinucleótidos se mantiene al menos sustancialmente cuando la composición que incluye la muestra se almacena a una temperatura de aproximadamente 10° C a aproximadamente 40° C (a) durante un periodo de aproximadamente 7 a aproximadamente 14 días, o (b) durante un periodo de aproximadamente 14 a aproximadamente 30 días. En otra realización, (a) la composición que incluye la muestra se almacena a una temperatura de aproximadamente 10° C a aproximadamente 40° C sustancialmente desde el momento de recogida al momento de aislamiento, purificación, o caracterización de una población de polinucleótidos de la anterior; o (b) menos de aproximadamente 5 % de la población de polinucleótidos contenida en la muestra se degrada después de almacenar la composición que incluye la muestra a una temperatura de aproximadamente 10° C a aproximadamente

40° C durante un periodo de aproximadamente 7 a aproximadamente 30 días. En realizaciones preferidas, la composición que incluye la muestra se almacena a una temperatura de (a) aproximadamente 10° C a aproximadamente 40° C durante un periodo de aproximadamente 24 a aproximadamente 96 h, o (b) aproximadamente 10° C a aproximadamente 30° C durante un periodo de aproximadamente 7 días a aproximadamente 30 días. En una realización preferida, el método incluye además analizar o cuantificar una población de polinucleótidos obtenidos a partir de la muestra purificada. En otra realización adicional, la etapa de cuantificación incluye la determinación de un umbral de ciclo de la PCR (CT) de la molécula.

La invención abarca también obtener una población de polinucleótidos a partir de una muestra biológica sospechosa de contener ácidos nucleicos, que incluye poner en contacto la muestra con una cantidad de una composición que incluye: aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 M de tiocianato de guanidina, aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 10 mM de TCEP, aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM de citrato de sodio, aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 % de N-lauroil sarcosina, sal de sodio, aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,010 % de una disolución al 10 % de antiespumante A, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM de Tris, aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM de EDTA, aproximadamente 10 % a aproximadamente 25 % de etanol (v/v) y la molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia 5'-CCC UUAGCAGCAGCAGUCAGUCAGGGAGCCAAUUUCAGAGCUCAGCGAGACAGUUUUUAUAGGCAUGGCAUCAGCUACGCUCGCUCAGGCUAGUCAGGUCCAAAGUUUCAGUU-3' (SEC ID N°: 2), presente en una cantidad suficiente para estabilizar la población de polinucleótidos de tal manera que menos de aproximadamente el 30 % de la población de polinucleótidos contenidos en la muestra se degrada después de la composición incluyendo la muestra que se ha almacenado a una temperatura de aproximadamente 10° C a aproximadamente 40° C durante un periodo de al menos aproximadamente 7 días a aproximadamente 30 días.

#### Formulaciones y kits comerciales

La presente invención proporciona también kits y sistemas de recogida de muestras que utilizan las composiciones divulgadas y disoluciones de recogida/almacenamiento/transporte descritas en el presente documento. En las realizaciones concretas, dichos sistemas de recogida de muestras pueden incluir un dispositivo de recogida, tal como un frotis, lanceta, o asa de siembra; y un recipiente de recogida, tal como un tubo de ensayo de viales, o copa para especímenes, que contiene una o más de las composiciones divulgadas en el presente documento. El recipiente de recogida es preferentemente de fácil apertura, de tal manera que se puede abrir para insertar las composiciones en una etapa y cerrarse y envasarse, abrirse para insertar la muestra y opcionalmente una porción del dispositivo de recogida y cerrarse para el almacenamiento y el transporte, o ambos. El recipiente de recogida puede usar cualquier mecanismo liberable o aperturizable adecuado, incluyendo, sin limitación, un tapón roscado, una parte superior que se puede levantar, una parte superior que se puede presionar y girar, o similar. Dichos sistemas pueden incluir opcionalmente además uno o más reactivos, dispositivos de almacenamiento, dispositivos de transporte, y/o instrucciones adicionales para obtener, recoger, lisar, almacenar, o transportar muestras en dichos sistemas. En una realización preferida, las composiciones en una etapa de la invención pueden disponerse ya en la zona de reacción donde se puede asociar la muestra. En dichas realizaciones, la invención requiere solo un dispositivo de recogida y el recipiente de reacción. El kit puede incluir también uno o más dispositivos de aislamiento o extracción para ayudar a liberar y/o separar una o más poblaciones de pluralidades de ácidos nucleicos contenidos en la muestra de una o más biomoléculas diferentes o componentes de muestras para obtener al menos parcialmente, o purificar de forma sustancial los ácidos nucleicos adecuados para la identificación, detección, o análisis molecular adicional.

Los kits pueden también envasarse para su distribución comercial, y pueden incluir opcionalmente además uno o más dispositivos de recogida, administración, transporte, o almacenamiento para la recogida, manipulación, o procesamiento de la muestra o el espécimen. El(los) recipiente(s) para dichos kits puede incluir normalmente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, copa, u otro recipiente o dispositivo de recogida adecuado, donde se puede(n) colocar la(s) composición(es), y, preferentemente, distribuirse en alícuotas de forma adecuada para la recogida del espécimen individual, el transporte, y/o el almacenamiento. El kit puede incluir también un recipiente más grande, tal como en un caso, que incluye los recipientes individuales más pequeños señalados anteriormente, junto con otros dispositivos de recogida, equipo, reactivos, instrucciones, y/o similares. El kit puede incluir opcionalmente también uno o más tampones, compuestos, o composiciones adicionales, y puede incluir opcionalmente además una o más instrucciones detallando el(los) uso(s) del kit en cualquiera de las muestras de recogida o almacenamiento de una o más muestras biológicas, clínica, diagnóstica, ambiental, o forense. Opcionalmente, el kit puede proporcionar además también instrucciones para el transporte de la muestra una vez colocada en una o más de las composiciones divulgadas, y puede incluso incluir instrucciones o reactivos adicionales detallando uno o más métodos o ensayos analíticos posteriores que emplean los ácidos nucleicos aislados a partir de la muestra o espécimen. Dichos kits pueden incluir también múltiples de los diversos dispositivos de recogida y recipientes de recogida y cualquier otro componente que se vaya a incluir, de tal manera que los kits se pueden usar para recoger múltiples muestras procedentes de la misma fuente o diferentes fuentes. En una aplicación comercial, los kits se envasan en conjuntos de cinco o más para la conveniente venta y uso.

### Breve descripción de los dibujos

Para promover y comprender los principios de la invención, se hará referencia ahora a las realizaciones, o ejemplos, ilustrados en los dibujos y al lenguaje específico que se usará para describir los mismos, se entenderá, sin embargo, que no se pretende por tanto limitación del alcance de la invención.

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar determinados aspectos de la presente invención. La invención puede comprenderse mejor por referencia a la siguiente descripción tomada junto con los dibujos que la acompañan, donde números de referencia iguales identifican elementos iguales, y donde:

La **Fig. 1** muestra la eficacia de extracción de PSS (ver. 1). PSS (ver. 1 [representada gráficamente aquí como "Una etapa +"]) en comparación disolución de lisis proporcionada en el Micro Kit RNAaqueous® (Ambion, nº de Catálogo AM1931) utilizando una cantidad normalizada del virus de la gripe A completo. Para la comparación, tanto la formulación en una etapa o la disolución de lisis proporcionada en el Micro Kit RNAaqueous se usó para las lisis de ARN vírico y a continuación se extrajo de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se procesaron reacciones replicadas y se analizaron mediante qRT-PCR utilizando, por ejemplo, el sistema de detección de secuencias ABI7500 de Applied Biosystems (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.);

La **Fig. 2** muestra la eficacia de extracción de PSS (ver. 1) en comparación con los kits comerciales. Muestras nasales de rata del algodón homogeneizadas (\*) estimuladas con gripe A (H3N2) o una gripe Aclínica humana (H1N1) recogidas durante 2006-07 se lisaron en el PSS o se lisaron utilizando la respectiva disolución de lisis, protocolo, y método de extracción procedentes de tres kits comercialmente disponibles: Micro Kit RNAaqueous- (Ambion), Mini Kit QiaAmp™ Viral (Qiagen), y el Kit AI/NCD MaxMag™ (Ambion). Se evaluó la eficacia de extracción utilizando la plataforma ABI7500 de Applied Biosystems con el método comparativo de  $C_T$ . Las puntuaciones relativas de  $C_T$  y las copias víricas detectadas fueron óptimas cuando se utilizó PSS (representado gráficamente como la "formulación en una etapa") en lugar del tampón de lisis respectivo proporcionado en cada kit normalizado comercialmente disponible;

La **Fig. 3** muestra la conservación de ARN inactivado en PSS frente a la Disolución de Almacenamiento de ARN de Ambion. Se almacenó ARN de H5 de Aves monocatenario en PSS, disolución de almacenamiento de ARN (Ambion), o agua a temperatura ambiente (22-24° C) durante 96 horas. Se extrajeron un total de 5 pg de ARN utilizando el Micro kit RNAaqueous® (Ambion, nº de Cat AM1931) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, y se analizó posteriormente utilizando qRT-PCR en la plataforma ABI7500 de Applied Biosystems (Life Technologies). Se proporcionan valores como  $C_T$  utilizando el método de cuantificación absoluta;

La **Fig. 4** muestra un ejemplo de un formato de envase de PSS para la recogida diagnóstica clínica. Las direcciones de recogida de la muestra utilizando un frotis de recogida clínica (Copan Diagnostic) y un tubo de recogida de 5 ml que contenía 1,5 ml de PSS;

La **Fig. 5** muestra una formulación comercial a modo de ejemplo de PSS. Se representan gráficamente tres formatos de disolución de recogida comercial a modo de ejemplo; una botella de 25 ml, y los tubos de ensayo de 5 ml y 1,5 ml;

La **Fig. 6** ilustra la capacidad de PSS para destruir microorganismos con rapidez. Se muestra una comparación del crecimiento celular de meticilina resistente a Staphylococcus aureus (MRSA) tanto en medio de cultivo (TSB) como en una disolución de PS. Después de 10 segundos en PSS, no se detectaron patógenos bacterianos viables;

La **Fig. 7A** muestra la inactivación de especímenes cloacales de pollo en PSS (ver. 1). PSS (ver. 1) inactivó los agentes microbianos en  $\leq 1$  h. Cuatro muestras cloacales de pollo originales se sumergieron en PSS (ver. 1) (hilera superior) o agua (hilera inferior) y se plaquearon posteriormente sobre placas de agar sangre;

La **Fig. 7B** demuestra que PSS inhibe la hidrólisis de bases del ARN durante 30 días a temperatura ambiente. Se incubó ARN a temperatura ambiente (22-26° C) en PSS (banda del gel 1 y 3) y agua (banda del gel 2 y 4), y se amplificó posteriormente mediante la RT-PCR (1500 pares de bases) en el Día 0 y el Día 30. PSS conservó el ARN recogido, y evitó la degradación del ARN/ADN a temperatura ambiente hasta 30' días;

La **Fig. 8A** representa gráficamente el análisis de la qRT-PCR del molde de ARN H5 de la gripe A aviar "inactivado" preservado en PSS después de incubación en las ARN/ADN nucleasas. ARNc H5 (2 ng) se incubó con ribonucleasa A y T1, y ADNasa I durante 1 h @ 37° C y se extrajo utilizando el Micro Kit RNAaqueous® (Ambion). Se incluyeron reacciones por triplicado para cada condición de reacción. Los valores  $C_T$  de la qRT-PCR del ARN inactivado preservados en PSS con nucleasas añadidas ( $C_T$  promedio: 22,88) fueron similares a una cantidad igual de molde de ARNc del control ( $C_T$  promedio: 23,70). Las reacciones del molde de ARNc sometido a la digestión de la nucleasa sin PSS se degradaron casi completamente ( $C_T$  promedio; 39,58);

La **Fig. 8B** representa gráficamente el análisis de la qRT-PCR y la electroforesis en gel del molde de ARN H5 de la gripe A aviar inactivado preservado en PSS tras la incubación en ARN/ADN nucleasas a 37° C durante 7 días. Se incubaron dos nanogramos de ARNc H5 con ARNasa A, ARNasa T1, y ADNasa I, a continuación se extrajeron utilizando el Micro Kit RNAaqueous® (Ambion) después de 7 días. Se incluyeron reacciones por duplicado para cada reacción. Los valores  $C_T$  de la qRT-PCR del ARN inactivado preservado en PSS con nucleasas añadidas ( $C_T$  promedio: 33,51) se detectaron después de 7 días. Las reacciones del molde de ARNc sometido a la digestión de la nucleasa sin PSS se degradaron completamente, y fueron similares a las

reacciones de la NTC.

La **Fig. 8C** demuestra que las formulaciones de la PSS inhibieron de forma sustancial la digestión de los polinucleótidos de la muestra por las nucleasas endógenas. Electroforesis en gel del producto amplificado posteriormente. La banda 3 es el producto de la PCR procedente del molde de ARN + PSS a 37° C durante 7 días, y Banda 5 de amplificación del ARN del control positivo. La banda 5 (sin amplificación) contenía ARN sin PSS; las Bandas 2 y 6 son una escalera de 100 pb, y reacciones NTC, respectivamente.

La **Fig. 9** ilustra que la conservación de los ácidos nucleicos conseguida en PSS es superior a la de las otras disoluciones. PSS (ver. 2 y ver. 2.2). Conservación del ARN del virus de la gripe A en comparación con el tampón AVL de Qiagen, etanol, y medio de transporte vírico (VTM) (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) a temperatura ambiente (22-25° C) durante 30 días.

La **Fig. 10** muestra la eficacia de extracción del virus de la gripe A preservado en PSS (ver. 2.2) durante 30 días a diversas temperaturas. Ambiental (21-37° C), Congelación-descongelación (-25° C; 32X); temperatura ambiente (22-26° C), y Banda 5; refrigerada (4° C).

La **Fig. 11** es una gráfica de  $C_T$  frente a la concentración molar utilizando virus de la gripe A completo con TCEP como agente reductor;

La **Fig. 12** es una gráfica de  $C_T$  frente a la concentración molar utilizando ARNss de gripe aviar H5N1 con TCEP como agente reductor;

La **Fig. 13A** y la **Fig. 13B** muestra la comparación entre TCEP y  $\beta$ .ME como componentes del agente reductor en las formulaciones de PSS, sirviendo solo agua como el control. En la **Fig. 13A**, se empleó ARN de la gripe aviar H5, mientras que en la **Fig. 13B** se utilizó virus completo.

La **Fig. 14A** muestra los resultados de un estudio que emplea PSS en la conservación de ácidos nucleicos procedentes de sangre. La eficacia de extracción de PSS de sangre completa enriquecida con ARN se comparó con la disolución de lisis en el Mini Kit de Sangre de ADN QIAamp® que se enriqueció con 0,1 pg y 1 pg de ARN de gripe A y se extrajo utilizando PSS o tampón de lisis AL. A ambas concentraciones de ARN, PSS produjo superiores resultados como resultado evidente a partir de las puntuaciones de  $C_T$  de la qRT-PCR;

La **Fig. 14B** tabula los datos procedentes del estudio del estudio que se muestra en la **Fig. 14A** que implica la extracción del ARNss de la gripe aviar H5 "inactivado" procedente de los tubos con sangre. La eficacia de extracción de PSS de la sangre completa enriquecida con ARN se comparó con la disolución de lisis en el Mini Kit de sangre del ADN QIAamp® utilizando diferentes anticoagulantes sanguíneos. PSS fue superior en comparación con el Tampón de Lisis AL de Qiagen utilizando sangre enriquecida con ARN en tubos comunes de recogida de sangre con anticoagulantes; y

La **Fig. 14C** tabula los datos procedentes del estudio que se muestra en la **Fig. 14A** que implica la comparación de en PSS frente a un reactivo de almacenamiento de un kit de extracción comercial (QIAamp®, Qiagen, Inc.). Se muestra la eficacia de extracción de PSS para la sangre completa enriquecida con ARN en comparación con la disolución de lisis en el Mini Kit de Sangre del ADN QIAamp®, que se enriqueció con 0,1 pg y 1 pg de ARN del virus de la gripe A y se extrajo utilizando PSS o tampón de lisis AVL. A ambas concentraciones de ARN, PSS produjo superiores resultados como fue evidente por las puntuaciones de  $C_T$  de la qRT-PCR.

La **Fig. 15A** y la **Fig. 15B** muestran la amplificación mediante la qPCR del ADN monocatenario de 141 nucleótidos utilizando un ensayo específico para detectar la IPC. Fig. 15A: Se llevó a cabo la amplificación en reacciones por duplicado utilizando  $10^{-6}$  a  $10^{-13}$  (es decir, 8 log) de molde de ADN diluido en serie. Fig. 15B: curva patrón de la IPC de la amplificación del ADN. La pendiente del ensayo fue de -3,39 y la eficacia de la PCR calculada fue de 97,23 % utilizando  $E = 10^{(-1/pendiente)} - 1$ . Se llevó a cabo la qPCR utilizando la plataforma ABI7500 de Applied Biosystems.

La **Fig. 16A** y la **Fig. 16B** muestran la amplificación mediante la qRT-PCR de una molécula portadora de ARNss de 130 nucleótidos capaz de servir como una IPC. En la Fig. 16A, se muestra: se llevó a cabo la amplificación en reacciones por duplicado utilizando 5 picogramos (pg) ( $2,75 \times 10^7$  copias) a 5 atogramos (ag) ( $-2^{10}$  copias) de molde de ARN diluido en serie. En la Fig. 16B, se muestra la curva patrón de la IPC para la amplificación de la molécula de ARNss portadora. La pendiente del ensayo fue de -3,144 y la eficacia de la PCR calculada fue del 100 % utilizando  $E = 10^{(-1/pendiente)} - 1$ . Se llevó a cabo la qRT-PCR utilizando la plataforma ABI7500 de Applied Biosystems.

La **Fig. 17** muestra que moléculas portadoras/IPC de ARNss sintético que contienen PSS potenciaron la conservación de la diana del ADN diana patógeno inactivado. En este estudio, un molde de ARN de gripe A inactivado (1,27 ng/ $\mu$ l) se añadió a un espécimen de lavado nasal de ser humano y se conservó en PSS con (cuadrados cerrados) o sin (círculos cerrados) un aumento de ARN sintético a 37° C, se extrajo el ARN, y a continuación se detectó posteriormente mediante qRT-PCR. La presencia de moléculas portadoras/IPC de ARNss sintético en la formulación dio como resultado una extracción inicial mejorada (en el día 0) de los polinucleótidos de la muestra y también una conservación estable de los polinucleótidos aislados durante periodos extendidos de tiempo (véase, por ejemplo, día 31).

La **Fig. 18** ilustra que la capacidad de PSS de estabilizar y conservar muestras de polinucleótidos en disolución está potenciada por la adición de ácidos nucleicos portadores/IPC del ARNss sintético a la formulación de PSS. En este estudio, un virus de la gripe A completo se conservó en PSS con (cuadrados cerrados) o sin (círculos cerrados) un aumento de ARNss portador/IPC sintético a 37° C durante 35 días. El virus de la gripe completo se conservó también en VTM (triángulos cerrados). Se extrajo el ARN y se detectó utilizando la qRT-PCR. La presencia de la molécula de ARN portador sintético en la formulación dio como resultado una extracción inicial potenciada (en el día 0) de la muestra de los polinucleótidos de la muestra, y también una conservación estable

de los polinucleótidos aislados en periodos extendidos de tiempo (véase *por ejemplo*, día 35).

La Fig. 19 ilustra la estabilidad de la molécula portadora de ARNss sintético a temperatura ambiente y 37° C. en este estudio, se añadió ARN sintético (0,1 pg/μl) a PSS y se almacenó a temperatura ambiente (RT) o 37° C durante 14 días. Se midió la estabilidad del ARN como una función de la qRT-PCR usando el ensayo de IPC que utiliza la plataforma ABI7500 de Applied Biosystems. El ARN sintético fue estable a RT y 37° C durante 14 días sin pérdida significativa de valores de C<sub>T</sub>. Se muestra el promedio de reacciones por duplicado.

#### Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

Se describen a continuación realizaciones ilustrativas de la invención. En interés de la claridad, no se describen todas las características de una implementación real en esta memoria descriptiva. Se apreciará, por supuesto, que en el desarrollo de cualquiera de dichas realizaciones reales deben tomarse numerosas decisiones específicas de la implementación para conseguir las metas específicas de los desarrolladores, tales como el cumplimiento de las restricciones relacionadas con el sistema y relacionadas con la empresa, que variarán de una implementación a otra. Igualmente, se apreciará también que aunque dichos esfuerzos de desarrollo pueden ser tanto complejos como llevar tiempo, podrían ser rutinarios para una persona experimentada en la técnica que tiene el beneficio de la presente divulgación.

La estabilización, recogida, transporte, y conservación extendidas impartidas por las formulaciones divulgadas son particularmente ventajosas cuando la muestra de un espécimen se localiza en una región geográfica que es remota desde una instalación de ensayo. Las localizaciones remotas, denominadas también como sitios de campo, abarcan una variedad de ambientes donde no se lleva a cabo normalmente el ensayo diagnóstico. Estos sitios incluyen consultorios médicos, centros de triaje, aeropuertos, fronteras, zonas de epidemia, y una variedad de localizaciones al aire libre. Las composiciones y métodos divulgados para su uso ofrecen ventajas concretas en localizaciones donde no existe acceso a la electricidad y/o refrigeración, o donde el acceso es inconsistente. Debido a la extendida estabilidad a temperatura ambiente, puede tomarse una muestra en cualquier localización remota, por ejemplo, sin limitación en un sitio con brotes de malaria en África, y la muestra se puede enviar a los Estados Unidos o Europa para el análisis diagnóstico en un laboratorio. Debido a que las formulaciones de recogida divulgadas son estables a temperatura ambiente o por debajo, y preferentemente incluso a temperaturas tropicales o subtropicales durante un tiempo, pueden tomarse de forma rutinaria en el campo, sin preocuparse de que los mismos reactivos del componente (tales como los controles de ARN) se degraden hasta que se pueda analizar una muestra, normalmente en una localización remota de la recogida.

Las composiciones de la invención pueden ser cualquier formulación acuosa adecuada tal como se describe en el presente documento, que incluyen, pero que no se limitan a una disolución, suspensión (incluyendo suspensión coloidal), lechada, emulsión, homogenado, o similar. Una formulación acuosa preferida es una disolución, y por tanto, el término "disolución" se ha utilizado en el sentido ejemplar a lo largo de la descripción detallada de las realizaciones preferidas para referirse a cualquiera de las composiciones acuosas de la invención.

Importantes aspectos de la presente invención se refieren a segmentos de ARN y ADN aislados y vectores recombinantes y las poblaciones de nucleótidos que las comprenden, y la creación y el uso de metodologías recombinantes para preparar moléculas portadoras de ARN mediante la aplicación de tecnologías convencionales de biología molecular, que incluyen, sin limitación, qPCR, qRT-PCR y similares.

La presente invención se refiere también a composiciones de ácidos nucleicos que incluyen, sin limitación, ADN, ARN y ANP, aislables a partir de una o más muestras o especímenes biológicos utilizando los medios de recogida/almacenamiento/transporte del espécimen descritos en el presente documento, o los segmentos de ARN o ADN aislados utilizados como moléculas portadoras y/o IPC.

Tal como se usa en el presente documento, el término "segmento de ADN" se refiere a una molécula de ADN que se ha aislado exenta de ADN genómico total de una especie concreta. Por tanto, un segmento de ADN obtenido de una muestra biológica utilizando una de las composiciones divulgadas en el presente documento, se refiere a uno o más segmentos de ADN que se han aislado de, o se han purificado exentos de ADN genómico de mamífero o humano total. Incluidos en el término "segmento de ADN", están los segmentos de ADN y los fragmentos más pequeños de dichos segmentos, así como vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus, y similares.

De forma similar, el término "segmento de ARN" se refiere a una molécula de ARN que se ha aislado exenta de ARN celular total de una especie concreta. Por tanto, los segmentos de ARN obtenidos de una muestra biológica utilizando una de las composiciones divulgadas en el presente documento, se refieren a uno o más segmentos de ARN (de origen tanto natural como sintético) que se han aislado de, o se han purificado exentos de, otros ARN. Incluidos en el término "segmento de ARN", están los segmentos de ARN y los fragmentos más pequeños de dichos segmentos.

Un segmento de ácido nucleico que comprende un polinucleótido aislado y/o purificado se refiere a un segmento de ácido nucleico aislado sustancialmente de diferentes genes o secuencias que codifican proteínas que se producen

de manera natural, que pueden estar presentes en la muestra biológica que experimenta la recogida y el posterior análisis.

5 En realizaciones concretas, la invención se refiere a medios de recogida, almacenamiento, y transporte de muestras que comprenden una primera molécula portadora para ayudar en el aislamiento y la estabilización de los ácidos nucleicos obtenidos de dichas muestras. Preferentemente, las moléculas portadoras son moléculas de ARN monocatenario, aunque en algunas circunstancias, se pueden utilizar también dupletes de ARN:ARN o ARN:ADN.

10 Aunque el mecanismo concreto de la forma en que se lleva a cabo la incorporación de moléculas portadoras exógenas, y moléculas de ARN en particular, a las formulaciones de recogida/almacenamiento/transporte del espécimen divulgadas en el presente documento no necesita elucidarse para la práctica rutinaria de la invención, sin pretender quedar limitados por teoría particular alguna, los inventores creen que la presencia de moléculas portadoras de ARN suministradas de forma exógena en PSS y las formulaciones relacionadas descritas en el presente documento ayudan en la precipitación y estabilización de polinucleótidos que se liberan del material celular cuando se ponen en contacto con PSS, y pueden servir también como un método para "recubrir" o "revestir" los ácidos nucleicos de la muestra liberada en una forma molecular protectora que sea favorable para la aglomeración o precipitación de polinucleótidos.

20 Con respecto al mecanismo de acción, los inventores han demostrado los sorprendentes beneficios que se consiguen como resultado sobre las disoluciones convencionales de aislamiento de polinucleótidos en la preparación de poblaciones de ácidos nucleicos de alta calidad y elevada fidelidad que se ahorran los efectos perjudiciales observados de manera rutinaria en las muestras convencionales que se someten a degradación y contaminación durante los métodos de recogida, aislamiento, almacenamiento, y transporte.

25 Las moléculas portadoras y/o las secuencias que contienen IPC se pueden sintetizar en parte o de manera completa, utilizando las metodologías convencionales conocidas en la técnica, o se pueden preparar a partir de métodos biológicos moleculares recombinantes (que incluyen, sin limitación, la transcripción *in vitro* y/o métodos de traducción, tales como la amplificación mediante la PCR), o se pueden obtener a partir de fuentes biológicas naturales (preferentemente, de fuentes no de mamíferos y de fuentes que no sean patógenas para las especies de mamíferos). De forma alternativa, las moléculas de ARN portadoras de la presente invención pueden ser moléculas híbridas que contienen porciones naturales y sintéticas, unidas de manera operable utilizando uno o más métodos convencionales en las técnicas genéticas moleculares y de ADN/ARN recombinante. En determinadas aplicaciones, las moléculas portadoras de ARN pueden estar comprendidas por una o más secuencias de inicio de la transcripción, dominios de unión al cebador o la sonda, sitios de unión funcionalizados, sitios de escisión de las exonucleasas o endonucleasas, y/o motivos funcionales o sitios activos.

40 El término "una secuencia esencialmente tal como se muestra en la SEC ID N°: X" significa que la secuencia corresponde sustancialmente a una porción de la SEC ID N°: X y que tiene relativamente pocos nucleótidos (o aminoácidos en el caso de secuencias de polipéptidos) que no son idénticos a, o un equivalente biológicamente funcional de, los nucleótidos de la SEC ID N°: X. La expresión "equivalente biológicamente funcional" es bien conocida en la técnica, y se define adicionalmente en detalle en el presente documento. De acuerdo con esto, las secuencias que tienen de aproximadamente un 85 % a aproximadamente un 90 %; o de forma más preferible, de aproximadamente un 91 % a aproximadamente un 95 %; o incluso de forma más preferible, de aproximadamente un 96 % a aproximadamente un 99 % de nucleótidos que son idénticos o funcionalmente equivalentes a una o más de las secuencias de nucleótidos proporcionadas en el presente documento se contempla que son particularmente útiles en la práctica de la invención.

50 Las condiciones de hibridación normalizadas adecuadas para la presente invención incluyen, por ejemplo, hibridación en formamida al 50 %, 5 X disolución de Denhardt, 5 X SSC, fosfato de sodio 25 mM, SDS al 0,1 % y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 42° C durante 16 h seguido por 1 h de lavados secuenciales con 0,1 X SSC, disolución de SDS al 0,1 % a 60°C para eliminar la cantidad deseada de señal de fondo. Las condiciones más bajas de hibridación rigurosa para la presente invención incluyen, por ejemplo, la hibridación en formamida al 35 %, 5 X disolución de Denhardt, 5 X SSC, fosfato de sodio 25 mM, SDS al 0,1 % y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado o ADN de E. coli a 42° C durante 16 h seguido por lavados secuenciales con 0,8 X SSC, SDS al 0,1 % a 55° C. Los expertos en la materia reconocerán que las condiciones se pueden ajustar fácilmente para obtener el nivel deseado de restricción. Naturalmente, la presente invención abarca también segmentos de ADN que son complementarios, o esencialmente complementarios, de una o más de las secuencias específicas que se muestran en el presente documento. Las secuencias de ácidos nucleicos que son "complementarias" son aquellas que son capaces de emparejar las bases de acuerdo con las rutas de complementariedad normalizadas de Watson-Crick. Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencias complementarias" significa secuencias de ácidos nucleicos que son sustancialmente complementarias, que se pueden evaluar mediante la misma comparación de nucleótidos que se muestran anteriormente, o tal como se define que son capaces de hibridarse con uno o más de los segmentos de ácidos nucleicos específicos divulgados en el presente documento en condiciones relativamente rigurosas tales como las descritas de forma inmediata anteriormente.

Tal como se ha descrito anteriormente, las sondas y cebadores de la presente invención pueden tener cualquier longitud. Asignando valores numéricos a una secuencia, por ejemplo, el primer resto es 1, el segundo resto es 2, etc., se puede proponer un algoritmo que defina todos los cebadores

5 **de n a n + y**

donde n es un número entero entre 1 y el último número de la secuencia e y es la longitud del cebador menos uno, donde n + y no excede el último número de la secuencia. De esta manera, para un 25-mer, las sondas corresponden a las bases 1 a 25, 2 a 26, 3 a 27... y así sucesivamente. Para un 45-mer, las sondas corresponden a las bases 1 a 45, 2 a 46, 3 a 47...y así sucesivamente. Para un 60-mer, las sondas corresponden a las bases 1 a 60, 2 a 61, 3 a 62...y así sucesivamente.

En determinadas realizaciones, será ventajoso emplear secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención en combinación con un marcador detectable adecuado (es decir, una "marca") para determinar la hibridación. Se conocen en la técnica una amplia variedad de compuestos y composiciones indicadoras adecuadas, incluyendo, sin limitación, fluorescentes, radioactivos, enzimáticos u otros ligando, tales como avidina/biotina, etc., que se pueden detectar. En realizaciones concretas, se puede desear emplear una marca fluorescente o una etiqueta de enzima tal como ureasa, fosfatasa o peroxidasa alcalina, en vez de reactivos radioactivos u otros reactivos ambientalmente menos deseables. En el caso de etiquetas de enzimas, se conocen sustratos indicadores colorimétricos, cromogénicos, o fluorogénicos que se pueden emplear para proporcionar un método para detectar la muestra que sea visible al ojo humano, o mediante métodos analíticos tales como gammagrafía, fluorimetría, espectrofotometría, y similares, para identificar la hibridación específica con muestras que contienen una o más secuencias complementarias o sustancialmente complementarias.

En general, se prevé que las sondas de hibridación descritas en el presente documento serán útiles como reactivos en una disolución de hibridación, como en la PCR, para la detección de nucleótidos concretos, así como en realizaciones que emplean una fase sólida.

Una vez hibridado, el complejo de ácido nucleico:cebador se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis del ácido nucleico dependiente del molde. Se llevan a cabo múltiples ciclos de amplificación, denominados "ciclos" hasta que se produce una cantidad suficiente de producto de amplificación.

A continuación, se detecta el producto de amplificación. En determinadas aplicaciones, la detección se puede llevar a cabo mediante inspección visual. De forma alternativa, la detección puede implicar la identificación indirecta del producto mediante quimioluminiscencia, gammagrafía radioactiva de radiomarca o marca fluorescente incorporada o incluso mediante un sistema que utiliza señales de impulsos eléctricos o térmicos.

Están disponibles numerosos métodos dependientes de moldes para amplificar las secuencias marcadoras presentes en una muestra de molde dada, uno de los métodos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (denominada PCR) que se describe en detalle en las Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159.

Otro método de amplificación es la reacción en cadena de la ligasa ("LCR") divulgada, por ejemplo, en el documento de la EPA N<sup>o</sup> 320 308, y en la Patente de los Estados Unidos 4.883.750.

Puede ser también útil un método de amplificación isotérmica, en el cual se usan endonucleasas y ligasas de restricción para conseguir la amplificación de las moléculas diana que contienen nucleótidos 5'-[α-tio]-trifosfatos en una hebra de un sitio de restricción en la amplificación de los ácidos nucleicos en la presente invención.

La amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) es otro método para llevar a cabo la amplificación isotérmica de los ácidos nucleicos que implica múltiples ciclos de desplazamiento y síntesis de hebras, es decir, la traducción de muescas. Un método similar denominado reacción de reparación de la cadena (RCR), implica la hibridación de algunas sondas a lo largo de una región dirigida para la amplificación, seguido por la reacción de reparación donde solo dos de las cuatro bases están presentes. Las otras dos bases se pueden añadir como derivados biotinilados para la detección fácil. Se usó una solución similar en SDA. Se pueden detectar también secuencias específicas utilizando una reacción cíclica de sonda (CPR). En la CPR, una sonda que tiene secuencias 3' y 5' de ADN no específico y una secuencia intermedia de ARN específico se hibrida al ADN que está presente en una muestra. Tras la hibridación, la reacción se trata con ARNasa H, y los productos de la sonda se identifican como productos distintivos que se liberan tras la digestión. El molde original se hibrida con otra sonda de ciclación y se repite la reacción.

Los métodos basados en la ligadura de dos (o más) oligonucleótidos en presencia de ácido nucleico que tiene la secuencia del "dioligonucleótido" resultante, amplificando por tanto el di-oligonucleótido, también se pueden usar en la etapa de amplificación de la presente invención. Tras cualquier amplificación, puede ser deseable separar el producto de la amplificación del molde y el exceso de cebador para determinar si ha tenido lugar la amplificación específica. En una realización, los productos de la amplificación se separan mediante electroforesis en gel de

agarosa, agarosa-acrilamida o poliacrilamida utilizando los métodos convencionales que conocen las personas normalmente expertas en la materia.

### Composiciones de polinucleótidos y oligonucleótidos

5 Tal como se usa en el presente documento, las composiciones de “ácidos nucleicos” o “polinucleótidos” incluyen, pero no se limitan a, aquellas que contienen polinucleótidos tanto monocatenarios como bicatenarios, tales como por ejemplo, ácidos desoxirribonucleicos (ADN), ácidos ribonucleicos (ARN), ácidos nucleicos peptídicos (ANP), o cualquier combinación o sus derivados (incluyendo, por ejemplo, secuencias genómicas, extragenómicas, de plásmidos, de cósmidos, recombinantes, artificiales, y/o sintéticas). Dichas secuencias pueden ser secuencias codificantes o no codificantes, de sentido directo, de inactivación, o de sentido contrario, y pueden, pero no necesitan estar presentes en una o más poblaciones o pluralidades de polinucleótidos (cualquiera de la presente invención, y un polinucleótido puede, pero no necesitan unirse a otras moléculas y/o materiales de apoyo. Igualmente, los polinucleótidos de la presente invención, y particularmente aquellos que funcionan como polinucleótidos portadores o moléculas IPC en los medios de recogida/transporte del espécimen, no necesitan ser idénticos, o incluso sustancialmente homólogos de las secuencias concretas empleadas en las diversas realizaciones de la invención ilustradas en el presente documento. Aunque los inventores han ilustrado el uso de secuencias control de ADN y ARN concretas como herramientas para controlar la integridad y la calidad, y preferentemente, aumentar la estabilidad de los polinucleótidos recogidos, transportados, o almacenados en las composiciones descritas en el presente documento, dichas secuencias control no necesitan contener las secuencias de nucleótidos concretas empleadas.

De hecho, en determinadas circunstancias, los polinucleótidos útiles como secuencias control internas en las composiciones de recogida/transporte/almacenamiento divulgadas pueden comprender cualquier secuencia adecuada que se puede obtener, preparar, modificar, o sintetizar para dicho fin. Además, es preferible que dichas secuencias control internas no compartan una homología o identidad significativas con las especies víricas, bacterianas, fúngicas, u otras especies patógenas si se van a identificar utilizando las formulaciones divulgadas.

De forma alternativa, los polinucleótidos adecuados como IPC pueden ser homólogos a, o incluso sustancialmente idénticos a, una o más de las secuencias IPC a modo de ejemplo divulgadas en el presente documento, y como tales, pueden ser capaces de hibridarse con una de las secuencias IPC específicas divulgadas en el presente documento (o una secuencia que sea complementaria de la anterior) en condiciones moderadamente rigurosas, muy rigurosas, y/o en condiciones de hibridación muy intensamente rigurosas.

Las personas normalmente expertas en las técnicas de biología molecular consideran rutinarios los métodos para la hibridación de ácidos nucleicos, y de esta forma, no se necesita proporcionar en el presente documento una discusión detallada de los métodos analíticos que se emplean. Sin embargo, como directriz, las condiciones de hibridación “moderadamente rigurosas” popularizadas por Southern y col, se consideradas generalmente en la técnica incluyen, *por ejemplo*, prelavar en una disolución que contiene aproximadamente 5X tampón normalizado de citrato de sodio (SSC), dodecilsulfato de sodio al 0,5 % (SDS), ácido etilendiaminatetraacético 1,0 mM (EDTA) *por ejemplo*, pH 8,0); hibridar a una temperatura de entre aproximadamente 50° C a aproximadamente 60° C en 5X SSC durante la noche; seguido por lavar dos veces a aproximadamente 60 a 65° C durante 20 min. Con cada uno de 2X, 0,5X y 0,2X SSC conteniendo SDS al 0,1 %). Igualmente, las condiciones de hibridación “rigurosas” incluyen normalmente, *por ejemplo*, prelavar en una disolución que contiene aproximadamente 5X SSC, SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0); hibridar a una temperatura de entre aproximadamente 60° C a aproximadamente 70° C en 5X SSC durante la noche; seguido por lavar dos veces a aproximadamente 65 a 70° C durante 20 min., con cada uno de 2X, 0,5X y 0,2X SSC conteniendo SDS al 0,1 %). De forma similar, los ejemplos representativos de condiciones de hibridación muy rigurosas incluyen, pero no se limitan a, prelavar en una disolución que contenga aproximadamente 5X SSC, SDS al 0,5 %, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), hibridar a una temperatura de entre aproximadamente 70° C a aproximadamente 75° C en 5X SSC durante la noche; seguido por lavar dos veces a aproximadamente 70° C a aproximadamente 75° C durante 20 min., con cada uno de 2X, 0,5X y 0,2X SSC conteniendo SDS al 0,1 %):

Las personas normalmente expertas en la materia apreciarán también que, como resultado de la degeneración del código genético, existen muchas secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos primaria dada. Algunos de estos polinucleótidos soportan una homología mínima con la secuencia de nucleótidos de cualquier gen natural. Sin embargo, se contemplan de forma específica polinucleótidos que varían debido a diferencias en la utilización del codón contempladas por la presente invención.

Se pueden preparar los IPC mediante metodologías de recombinación convencionales de biología molecular o, de forma alternativa, sintetizarlos en todo o en parte por métodos convencionales conocidos, que incluyen la síntesis química (*por ejemplo*, síntesis química de la fosforamida en fase sólida) y similares. Se pueden introducir también modificaciones en la secuencia de polinucleótidos utilizando técnicas de mutagénesis normalizadas, tales como mutagénesis específicas de oligonucleótidos dirigidas a emplazamiento. Las moléculas de ARN para las IPC pueden sintetizarse también directamente o, de forma alternativa, prepararse mediante se transcripción de ADN *in vitro* o *in vivo* utilizando sistemas adecuados (tales como las polimerasas T3, T7, y SP6 y similares). Los polinucleótidos de la presente invención y, particularmente, aquellos utilizados para preparar las IPC, se pueden modificar para aumentar

la estabilidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Dichas modificaciones incluyen, sin limitación, la adición de secuencias flanqueantes en el extremo 5', el extremo 3', o ambos; el uso de fosforotioato o 2'-o-metilo en lugar de los enlaces fosfodiesterasa de la estructura principal; y/o la inclusión de bases no tradicionales tales como inosina, queosina y wybutosina, así como acetilo, metilo, tio o formas modificadas de otra manera de adenina, citidina, guanina, timina y Uridina, o cualquiera de sus combinaciones.

Las secuencias de nucleótidos que se describen en el presente documento pueden unirse o ligarse a una variedad de diferentes secuencias de nucleótidos utilizando técnicas recombinantes establecidas. Por ejemplo, un polinucleótido útil como IPC puede producirse por clonación en cualquiera de una variedad de vectores de clonación, que incluyen uno o más de plásmidos, fagémidos, derivados del fago lambda y cósmidos. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas, y vectores de secuenciación. En general, un vector contendrá un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios convenientes para la endonucleasa de restricción y uno o más marcadores seleccionables. Otros elementos dependerán del uso deseado, y serán evidentes para las personas normalmente expertas en la materia. De forma alternativa, se pueden preparar secuencias de IPC mediante una o más metodologías de producción recombinantes dependientes de molde o dirigidas al amplicón.

En realizaciones concretas, la presente invención proporciona composiciones de polinucleótidos que se pueden añadir a los medios de recogida/almacenamiento/transporte divulgados empleados en el presente documento. Dichas composiciones de polinucleótidos pueden contener uno o más dominios de secuencia a los cuales se pueden unir polimerasas, cebadores de oligonucleótidos, y/o sondas recombinantes específicas. En las realizaciones ilustrativas, se pueden emplear IPC a modo de ejemplo, que contienen una secuencia control positiva (PCS) que se puede amplificar utilizando una o más secuencias específicas de cebadores de la amplificación, y detectarse y/o cuantificarse utilizando una o más sondas de oligonucleótidos que se hibridan de manera específica con al menos un primer dominio de la secuencia de la PCS. En determinadas realizaciones, se pueden utilizar sondas de detección que emplean metodologías de detección fluorescentes, quimioluminiscentes, o específicas de FRET para detectar y/o cuantificar la cantidad de PCS en una muestra dada. La detección de la PCS en una muestra puede proporcionar un patrón de referencia interno para controlar la eficacia y la fidelidad de las disoluciones de recogida/almacenamiento/transporte en una etapa empleadas en el presente documento. Los cebadores y sondas de oligonucleótidos de la presente invención se pueden diseñar para la amplificación y la detección selectivas de una o más PCS. Dichas secuencias de cebadores son adecuadas para su uso en los métodos de hibridación, y en los métodos de amplificación tales como los métodos de amplificación basados en la PCR (que incluye, por ejemplo, los análisis de la PCR en tiempo real, la RT-PCR y similares). Igualmente, las sondas de detección de oligonucleótidos divulgadas son adecuadas para marcar con una marca adecuada para la detección y la cuantificación de los productos resultantes de la amplificación de ácidos nucleicos utilizando una o más parejas de los cebadores de amplificación divulgados en el presente documento.

Cuando se marcan con marcadores adecuados, las sondas de detección de oligonucleótidos son particularmente adecuadas para la detección basada en la fluorescencia de las secuencias de nucleótidos específicas de IPC contenidas en el medio de recogida/almacenamiento (que incluyen, sin limitación, las formulaciones de PSS), incluyendo, por ejemplo, mediante los análisis basados en FRET. Las sondas de detección marcadas con FRET son particularmente útiles en las metodologías de detección fluorimétricas, incluyendo por ejemplo, los dispositivos de fluorimetría microvolumétrico basados en FRET. El uso de uno o más oligonucleótidos de amplificación y detección se contempla particularmente en las metodologías combinadas basadas en FRET de fluorimetría microvolumétrica/PCR en tiempo real (FRET-PCR en tiempo real), y particularmente en los análisis facilitados por la instrumentación "LightCycler®" tal como ha desarrollado Idaho Technology, Inc. (Salt Lake City, UT, EE.UU.), y fabricados y comercializados ahora por Roche Applied Science (Indianápolis, IN, EE.UU.).

#### **Secuencias control positivas internas**

En las realizaciones ilustrativas, la invención proporciona también secuencias IPC que comprenden, consisten esencialmente en o constan de, secuencias de ácidos nucleicos que son preferentemente al menos de aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 % o más idénticas a una cualquiera o más de las secuencias divulgadas anteriormente, y particularmente aquellas divulgadas en una cualquiera de la SEC ID N°. 2 a SEC ID N°. 13.

En las realizaciones relacionadas, la invención proporciona también secuencias IPC que se sintetizan *in vitro* utilizando un molde de amplicón que comprende, consiste esencialmente en, o consta de, secuencias de ácidos nucleicos que son preferentemente al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 %, o al menos aproximadamente un 99 %, o más idénticas a al menos una secuencia de 30 nucleótidos contiguos procedentes de una cualquiera o más de las secuencias divulgadas en la SEC ID N°. 1, o SEC ID N°. 14 a SEC ID N°. 23.

**Kits de amplificación de polinucleótidos**

La presente invención proporciona también kits para detectar y/o amplificar IPC, y en particular secuencias IPC de ARN o ADN contenidas en una de las formulaciones divulgadas en el presente documento, incluyendo, sin limitación, formulaciones de PSS. Dichos kits comprenden normalmente dos o más componentes necesarios para amplificar secuencias específicas de IPC, y dichos componentes pueden ser compuestos, reactivos, envases y/o equipo. Por ejemplo, un envase de un kit puede contener un primer cebador, mientras que un segundo envase del kit puede comprender un segundo cebador. Un tercer envase del kit puede contener un conjunto de sondas de hibridación, o una o más sondas fluorescentes para marcar las sondas. Además, los kits de la invención pueden comprender también instrucciones para su uso, por ejemplo, instrucciones para usar los cebadores en las reacciones de amplificación y/o detección tal como se describe en el presente documento, así como una o más moléculas fluorescentes u otros reactivos que pueden ser necesarios, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, enzimas tampón, polimerasas, ARNasas y similares.

La invención proporciona una o más composiciones de ARN o ADN portadoras junto con una o más disoluciones de recogida/transporte/almacenamiento (incluyendo, sin limitación, formulaciones de PSS), o excipientes, tampones portadores, diluyentes, adyuvantes, y/u otros componentes compatibles que se pueden emplear en el aislamiento, la detección, amplificación, o cuantificación de la herramientas diagnósticas.

**20 Detección FRET basada en la PCR en tiempo real**

Se han descrito bien en la bibliografía las metodologías FRET y de la PCR en tiempo real (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup> 4.996.143, 5.565.322, 5.849.489, 6.162.603. La plataforma LightCycler® representa un avance significativo en el cribado y el análisis de mutaciones genéticas. Este sistema incorpora un instrumento rápido, de ciclación térmica impulsada por aire que puede llevar a cabo 30 ciclos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en menos de 20 minutos. Utiliza un fluorímetro microvolumétrico en línea para detectar y cuantificar las sondas de hibridación marcadas de forma fluorescente, y proporciona los datos necesarios para la determinación de los análisis de la curva de fusión. La plataforma Lightcycler® proporciona una instrumentación innovadora para facilitar el desarrollo de las herramientas de análisis genético, y proporciona un método cualitativo rápido para el ensayo de secuencias de nucleótidos específicas, y mutaciones genéticas. La aplicación detallada de la instrumentación en los métodos de amplificación y detección puede encontrarse en el sitio web del fabricante, y en los manuales de aplicación del producto. Se ha descrito también esta tecnología, incluyendo, por ejemplo las Publicaciones de Solicitudes internacionales PCT N<sup>os</sup> WO 97/46707, WO 97/46714 y WO 97/46712.

**35 Recogidas de especímenes para los laboratorios de diagnóstico clínico**

La recogida es la primera etapa en las plataformas diagnósticas o protocolos moleculares que requieren la detección de cantidades potencialmente mínimas de ácidos nucleicos procedentes de patógenos que incluyen virus. Para facilitar los avances dinámicos en las estrategias de detección basadas en ácidos nucleicos y su integración en los principales laboratorios diagnósticos, existe una necesidad colosal de sistemas de recogida fiables, sólidos y normalizados tales como las plataformas anteriormente mencionadas. La invención puede adaptarse de forma alternativa para el transporte de ácidos nucleicos desde el consultorio médico o quirófano, o transportarse de forma alternativa a un centro regional, tal como un hospital.

Un espécimen clínico o veterinario o un sistema de recogida de muestras forenses o ambientales puede incluir una o más herramientas de recogida y uno o más reactivos para:

- 1) obtener de forma eficaz un elevado rendimiento de un espécimen más allá de lo que está actualmente disponible en la técnica;
- 2) inactivar patógenos biológicos potencialmente infecciosos de tal manera que no sean viables a largo plazo y se puedan manipular, enviar, o transportar con riesgo mínimo de liberación o contaminación del patógeno; o
- 3) estabilizar y conservar de forma eficaz polímeros de ARN/ADN 'inactivado' lisado procedentes de hidrólisis o degradación de la nucleasa durante periodos prolongados a temperaturas ambientes hasta que las muestras se puedan procesar en un laboratorio diagnóstico, y preferentemente para conseguir dos o más, o las tres, de estas metas.

Tal como se ha señalado anteriormente, las disoluciones de recogida/transporte/almacenamiento de muestras de la presente invención pueden proporcionar numerosas mejoras significativas sobre aquellas disponibles en la técnica anterior. Los beneficios a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, uno o más de los siguientes:

- inactivación, muerte, y/o lisis de microbios, virus, o patógenos;
- destrucción y/o inactivación de nucleasas exógenas o endógenas, incluyendo, sin limitación, ARNasa y/o ADNasa;
- compatibilidad con una variedad de sistemas convencionales de extracción, purificación, y amplificación de ácidos nucleicos
- conservación de la integridad del ARN y/o el ADN en la muestra,

- facilitación del transporte y el envío a temperaturas ambientes, incluso en periodos extendidos de tiempo, o variaciones extremas de la temperatura, y
- adecuabilidad para almacenamiento a corto (algunas horas a algunos días), medio (algunos días a algunas semanas), o largo (algunas semanas a algunos meses) plazo de los ácidos nucleicos aislados.

5 Las composiciones divulgadas son particularmente muy adecuadas para centros de atención primaria, estudios de campo, atención sanitaria o de prueba domiciliaria, evaluación(es) de triaje/emergencia y de bajas, pruebas forenses móviles, patología, muestreo epidemiológico, investigación en la escena del crimen, pruebas de paternidad, cribado genético anterior y posterior al embarazo, prueba de violación/incesto, asesoramiento familiar, pruebas confidenciales de enfermedades transmitidas sexualmente (incluyendo, sin limitación, VIH, sífilis, Chlamydia, gonorrea, y otras enfermedades venéreas y similares). Igualmente, las composiciones divulgadas pueden ser también de particular relevancia para la vigilancia, la etiología, y el control de enfermedades epidémicas o pandémicas en poblaciones humanas o animales, dentro del país y en el extranjero, incluyendo la recogida y el análisis de especímenes que contienen el virus de la gripe, particularmente para predecir y gestionar el “cambio y la deriva” vírica, e identificar o gestionar epidemias, pandemias, y similares, iniciales o en curso.

10 En determinadas realizaciones, un ácido nucleico aislado utilizando los métodos de la presente invención puede servir como un molde en una o más aplicaciones, ensayos, o técnicas biológicas moleculares posteriores, incluyendo, sin limitación, huella genética; PCR de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP); análisis de oligonucleótidos específicos de alelos (ASOA), análisis de microsatélites; hibridación Southern; hibridación Northern; PCR de repeticiones en tándem de número de variables (VNTR); hibridación por inmunotransferencia; ensamblaje por ciclación de la polimerasa (PCA); PCR anidada; PCR cuantitativa (qPCR); PCR asimétrica; huella genética del ADN, genotipación de polimorfismo de nucleótido único (SNP); PCR mediante transcripción inversa (RT-PCR); PCR multiplete (m-PCR), amplificación de la sonda dependiente de ligadura multiplete (MLPA); PCR mediada por ligadura (LmPCR); PCR específica de metilación (MPCR); amplificación dependiente de helicasa (HDA); PCR de extensión por solapamiento (OE-PCR); amplificación de genoma completo (WGA); aislamiento de plásmidos; amplificación alélica; mutagénesis dirigida al emplazamiento; cribado genético de alto rendimiento, o similar, o cualquiera de sus combinaciones.

20 En una realización, las formulaciones de recogida/almacenamiento/transporte de especímenes conserva, extienden, facilitan, o mantienen la estabilidad de al menos un primer ácido nucleico en una población de polinucleótidos liberados a partir del espécimen durante un periodo extendido de tiempo, y particularmente, *por ejemplo*, durante periodos de tiempo sustancialmente más largos que los que se dan lugar mediante los medios de recogida de muestras convencionales.

25 Preferentemente, la composición facilitará la conservación y la estabilización de uno o más segmentos de ácidos nucleicos a partir de dicha población aislada de polinucleótidos durante periodos de tiempo que incluyen, sin limitación, al menos aproximadamente 7 días, preferentemente al menos aproximadamente 14 días, de forma más preferible, al menos aproximadamente 21 días, y de forma aún más preferible, al menos aproximadamente 28, 35, 40 42, 56, 63, o aproximadamente 70 días o más, sin necesidad de refrigerar, o congelar, la muestra recogida – incluso cuando la muestra se recoge, o almacena, en condiciones ambientales. Dichas propiedades de conservación de especímenes mejoradas son particularmente deseables cuando dichas muestras se recogen o almacenan en localizaciones remotas, o en climas templados, subtropicales o tropicales.

45 En otra realización, la invención proporciona el uso de las composiciones divulgadas para preparar ácidos nucleicos a partir de una muestra de origen biológico en el mantenimiento de la integridad y la fidelidad de uno o más ácidos nucleicos contenidos en una población de polinucleótidos liberados a partir de la muestra durante periodos extendidos que incluyen, sin limitación, durante al menos aproximadamente 5 días, al menos aproximadamente 10 días, preferentemente al menos aproximadamente 15 días, de forma más preferible al menos aproximadamente 20 días, o de forma aún más preferible al menos aproximadamente 25 días o más, sin la necesidad de almacenar la muestra en condiciones de refrigeración o congelación.

50 Los ácidos nucleicos obtenidos en la práctica de los métodos divulgados son ventajosamente compatibles con numerosas metodologías convencionales moleculares y diagnósticas de aislamiento, purificación, detección, y/o analíticas. Las composiciones divulgadas facilitan la recuperación tras el almacenamiento, y el transporte de poblaciones de polinucleótidos estabilizados, sustancialmente no degradados, para uso en una variedad de metodologías posteriores, que incluyen, sin limitación, aislamiento, purificación, amplificación, y analítica molecular y/o ensayo diagnóstico, análisis, o caracterización de ácidos nucleicos, y similares.

#### 60 **Kits comerciales a modo de ejemplo de la presente invención**

La siguiente reseña proporciona kits comerciales a modo de ejemplo que emplean las formulaciones de PSS de la presente invención (Fig. 5).

65

**Sistema de recogida de envase esterilizado tipo peel pouch**

5 Tubos de cinco ml que contenían 1,5 ml de una Disolución PrimeStore™; frotis de recogida (*por ejemplo*, FlockedSWABS® [Copan Diagnostics, Inc., Murrieta, CA, EE.UU.]); e instrucciones para la recogida y/o el procesamiento de muestras (envasadas, *por ejemplo*, en 50 bolsas/unidad) (véase la Fig. 4ª, Fig. 4B, Fig. 4C, Fig. 4D, y Fig. 4E para la demostración esquemática de dichos sistemas)

**Disoluciones madre PRIMESTORE™**

10 Una vez formulada, la disolución madre PrimeStore es estable a 4° C o por debajo durante periodos de al menos un año o más. Las disoluciones PrimeStore™ formuladas han mostrado también ser estables a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20-30° C) durante periodos de muchos meses.

15 Una vez se pone en contacto una muestra con una formulación PrimeStore™ tal como se divulga en el presente documento, puede esperarse de forma razonable que se almacene de manera indefinida a temperaturas de 0° C o inferiores, al menos un año o más con refrigeración (por ejemplo, ~ 4° C y al menos 30 días o más a temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20-30° C), sin pérdida significativa de la composición del ácido nucleico, fidelidad o integridad de la muestra. Por ejemplo, sin limitación, la integridad de una población de polinucleótidos obtenidos a partir de la muestra se mantiene al menos sustancialmente, y se mantiene preferentemente de forma  
20 completa sin degradación detectable, cuando la composición que comprende la muestra se almacena a una temperatura de entre aproximadamente -20° C a aproximadamente 40° C, durante un periodo de entre aproximadamente 30 días a aproximadamente 60 días.

**Kits de recogida para muestras ambientales**

25 Los envases comerciales a modo de ejemplo de las formulaciones divulgadas para la recogida de muestras ambientales incluyen, sin limitación, recipientes de recogida que contienen cantidades eficaces de la disolución de almacenamiento (por ejemplo, 0,1, 0, 2, 0,5, 1, 2, o 3 ml de viales de recogida conteniendo cada uno 0,1 ml, 0,2 ml, 0,25 ml, 0,5 ml, 0,75 ml, o 1 ml de disolución PrimeStore™); e instrucciones para la recogida y/o el procesamiento de las muestras. Los recipientes de recogida pueden dimensionarse o envasarse en tamaños más pequeños o más grandes según se necesite dependiendo del(de los) espécimen(es) propuesto(s) o método(s) de recogida. En determinadas aplicaciones, puede ser deseable también envasar dispositivos de recogida individuales en múltiples recipientes (incluyendo, sin limitación, envases comerciales que contienen, por ejemplo, 10 o 20 dispositivos de recogida/envase unidad).  
35

**Comparación, identidad, y homología de secuencias**

40 Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para la correspondencia máxima, tal como se midió utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencias descritos a continuación (u otros algoritmos disponibles para personas normalmente expertas) o mediante inspección visual.

45 La frase “sustancialmente idéntico”, en el contexto de dos ácidos nucleicos se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tiene al menos aproximadamente 90 %, preferentemente 91 %, lo más preferible aproximadamente 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 98,5 %, 99 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 % o más restos de identidad de nucleótidos, cuando se compara y se alinean para la correspondencia máxima, tal como se midió utilizando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. Dichas secuencias “sustancialmente idénticas” se consideran normalmente “homólogas”, sin referencia a la antigüedad real.  
50

Para la comparación de secuencias y la determinación de la homología, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se diseñan las coordenadas de subsecuencia, y, si es necesario, se diseñan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. A continuación se puede utilizar el algoritmo de comparación de secuencias para calcular el porcentaje de identidad de la secuencia para la(s) secuencia(s) de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa diseñados  
55

60 Se puede llevar a cabo la alineación óptima de las secuencias para comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local (véase, por ejemplo, Smith y Waterman, 1981), mediante el algoritmo de alineación de la homología (véase, por ejemplo, Needleman y Wunsch, 1970), mediante el método de búsqueda de comparación de similitudes (véase, por ejemplo, Pearson y Lipman, 1988), mediante implementaciones informatizadas de algoritmos tales como GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, WI, EE.UU., o mediante inspección visual. Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para  
65

determinar el porcentaje de identidad de la secuencia y la similitud de la secuencia es el algoritmo BLAST (Altschul y col., 1990) y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase, *por ejemplo*, Henikoff y Henikoff, 1989). El software para llevar a cabo los análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

5 Además de calcular el porcentaje de identidad de la secuencia, el algoritmo BLAST lleva a cabo también un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, *por ejemplo*, Karlin y Altschul, 1993). Otro ejemplo de un algoritmo de alineación de secuencias útil es el programa PILEUP, que crea una alineación de secuencias múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas utilizando alineaciones progresivas por parejas. Se puede representar gráficamente también un árbol que muestre las relaciones de agrupación utilizadas para crear la alineación. PILEUP utiliza una simplificación del método progresivo de comparación de alineaciones (véase, *por ejemplo*, Feng y Doolittle, 1987), y emplea una matriz de alineación general similar a la descrita por Higgins y Sharp (1989).

### Definiciones ilustrativas

15 A no ser que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende una persona normalmente experta en la materia a la cual esta invención pertenece. Aunque se pueden utilizar cualesquiera métodos y composiciones similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen el presente documento métodos y composiciones preferidas. Para los fines de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos:

20 Los términos “alrededor de” y “aproximadamente” tal como se usan en el presente documento, son indistintos y debe entenderse generalmente que se refieren a un intervalo de números alrededor de un número dado, así como a todos los números en un intervalo citado de números (*por ejemplo*, “aproximadamente 5 a 15” significa aproximadamente 5 a aproximadamente 15” a no ser que se indique otra cosa). Además, debe entenderse que todos los intervalos numéricos en el presente documento incluyen cada entero completo en el intervalo.

30 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “portador” incluya cualquier(cualesquiera) disolvente(s), medio(s) de dispersión, revestimiento(s), diluyente(s), tampón(es), agente(s) isotónico(s), disolución(es), suspensión(es), coloide(s), inerte(s) o similares, o una de sus combinaciones que sea farmacéuticamente aceptable para la administración al animal relevante o aceptable a fines diagnósticos, según sea aplicable. El uso de uno o más vehículos de administración para los compuestos químicos en general, y péptidos y epítomos en particular, es bien conocido por las personas normalmente expertas en las técnicas farmacéuticas. Excepto en la medida que cualesquiera medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones diagnósticas, profilácticas, y terapéuticas. Uno o más principio(s) activo(s) suplementario(s) puede(n) incorporarse también en, o administrarse en asociación con, una o más de las composiciones inmunogénicas divulgadas.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico” incluye uno o más tipos de, polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D-ribosa), y cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un n-glicósido de una base de purina o pirimidina, o bases de purina o pirimidina modificadas (incluyendo sitios abásicos). El término “ácido nucleico”, tal como se usa en el presente documento, incluye también polímeros de ribonucleósidos o desoxirribonucleósidos que se unen covalentemente, normalmente mediante enlaces fosfodiéster entre subunidades, pero en algunos casos mediante fosforotioatos, metilfosfonatos, y similares. “Ácidos nucleicos” incluyen ADN mono y bicatenario, así como ARN mono y bicatenario. Los ácidos nucleicos a modo de ejemplo incluyen, sin limitación, ADNg, ARNhn; ARNm; ARNr, ARNt, micro ARN (miARN) ARN interferente pequeño (ARNip), ARN nucleolar pequeño (snOARN)m ARN nuclear pequeño (ARNsn, y ARN temporal pequeño (ARNst) y similares, y cualquiera de sus combinaciones.

50 Tal como se usa en el presente documento, los términos “proteína”, “polipéptido”, y “péptido” se usan de forma indistinta, e incluyen moléculas que incluyen al menos un enlace amida que se une a dos o más restos de aminoácidos juntos. Aunque se usa de manera indistinta, en general, un péptido es una molécula relativamente corta (*por ejemplo*, de 2 a aproximadamente 100 restos de aminoácidos de longitud), mientras que una proteína o un polipéptido es un polímero relativamente más largo (*por ejemplo*, 100 o más restos de longitud). Sin embargo, a no ser que se defina de forma específica por una longitud de cadena, los términos péptido, polipéptido, y proteína se utilizan de forma indistinta.

60 Tal como se usa en el presente documento, “muestra” incluye cualquiera que contiene o presume contener una sustancia de interés, de esta manera, puede ser una composición de materia que contiene ácido nucleico, proteína, u otra biomolécula de interés. El término “muestra” puede abarcar de esta manera una disolución, célula, tejido, o población de una o más de las mismas que incluye una población de ácidos nucleicos (ADN genómico, ADNc, ARN, proteína, otras moléculas celulares, etc.). Los términos “fuente de ácido nucleico”, “muestra”, y “especimen” se usan de manera indistinta en el presente documento en un sentido amplio, y se pretende que abarquen una variedad de fuentes biológicas que contienen ácidos nucleicos, proteínas, una o más de diferentes biomoléculas de interés, o cualquiera de sus combinaciones. Las muestras biológicas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, sangre

completa, plasma, suero, esputo, orina, heces, glóbulos blancos de la sangre, glóbulos rojos de la sangre, capa leucocitaria, frotis (que incluyen, sin limitación, frotis bucales, frotis de garganta, frotis vaginales, frotis de uretra, frotis de cuello de útero, frotis rectales, frotis de lesiones, frotis de abscesos, frotis nasofaríngeos y similares), orina, heces, esputo, lágrimas, moco, saliva, semen, fluidos vaginales, fluido linfático, fluido amniótico, fluido espinal o cerebroespinal, efusiones peritoneales, efusiones pleurales, exudados, punciones, manchas epiteliales, biopsias, muestras de médula ósea, fluido de quistes o contenidos de abscesos, fluido sinovial, humor vítreo o acuoso, lavados oculares o aspirados, lavados pulmonares, o aspirados de pulmón, y órganos y tejidos, que incluyen, pero que no se limitan a, hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino, cerebro, corazón, músculo, páncreas, y similares, y cualquiera de sus combinaciones. En algunas realizaciones, la muestra puede ser, o ser de, un organismo que actúa como un vector, tal como un mosquito, o pulga, u otro(s) insecto(s)

Las células para cultivo de tejidos, que incluyen material explantado, células primarias, líneas de células secundarias, y similares, así como lisados, homogenados, extractos, o materiales obtenidos de cualquier célula, están también comprendidos en el significado del término "muestra biológica" tal como se usa en el presente documento. Los microorganismos (que incluyen, sin limitación, procariotas tales como arqueobacterias y eubacterias, cianobacterias, hongos, levaduras, mohos, actinomicetos, espiroquetas, y micoplasmas), virus (que incluyen, sin limitación los Ortohepadnavirus [que incluyen, *por ejemplo*, los virus de la hepatitis A, B, y C], el virus del papiloma humano, los Flavivirus [que incluyen, por ejemplo, el virus del Dengue], los Lissavirus [que incluyen, *por ejemplo*, el virus de la rabia], los Morbilivirus [que incluyen, *por ejemplo* el virus del sarampión. Los virus Simplex [que incluyen, *por ejemplo*, el virus del herpes simple], los Poliomasvirus, Rubulavirus [que incluyen, *por ejemplo* el virus de las paperas], los Rubivirus [que incluyen, *por ejemplo*, el virus de la rubeola], Varicelovirus [que incluyen, *por ejemplo*, el virus de la viruela aviar], rotavirus, coronavirus, citomegalovirus, adenovirus, virus adenoasociados, baculovirus, parvovirus, retrovirus, vaccinia, poxvirus, y similares), algas, protozoos, protistas, plantas, briofitas, y similares, y cualquier combinación de cualquiera de los anteriores, que puede estar presente o en una muestra biológica están también comprendidos en el alcance de la invención, como son cualquiera de los materiales obtenidos de escenarios clínicos o forenses que contengan uno o más ácidos nucleicos, están también comprendidos en el alcance de la invención. El técnico normalmente experto apreciará también que los lisados, extractos, o materiales obtenidos de cualquiera de las anteriores muestras biológicas a modo de ejemplo están también comprendidos en el alcance de la invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término "tampón" incluye una o más composiciones, o disoluciones acuosas de las mismas, que resisten la fluctuación en el pH cuando se añaden un ácido o un álcali a la disolución o composición que incluye el tampón. Esta resistencia al cambio de pH es debida a las propiedades tamponantes de dichas disoluciones, y puede ser una función de uno o más compuestos específicos incluidos en la composición. De esta manera, las disoluciones u otras composiciones que presentan actividad tamponante se denominan tampones o disoluciones tamponantes. Los tampones no tienen generalmente una capacidad ilimitada para mantener el pH de una disolución o composición; más bien, son capaces normalmente de mantener el pH dentro de determinados intervalos, por ejemplo de un pH de aproximadamente 5 a 7.

Las muestras en la práctica de la invención se pueden usar recientes o se pueden usar tras haberse almacenado durante un periodo de tiempo, o durante un periodo extendido de tiempo, incluyendo, por ejemplo, muestras crioconservadas, congeladas, o refrigeradas y similares, y pueden incluir material de origen clínico, veterinario, ambiental o forense, se pueden aislar de alimentos, bebidas, comestibles, fuentes de agua potable, corrientes de aguas residuales, lavados o efluentes industriales, fuentes de agua natural, suelo, fuentes que se transmiten a través del aire, poblaciones pandémicas o epidémicas, muestras epidemiológicas, materiales de investigación, especímenes de patología, agentes sospechosos de bioterrorismo, evidencias en la escena del crimen, etc.

Tal como se usa en el presente documento, el término "paciente" (denominado también de manera indistinta como "hospedador" o "sujeto") se refiere a cualquier hospedador que puede servir como una fuente de una o más de las muestras o especímenes biológicos tal como se discute en el presente documento. En determinados aspectos, el donante puede ser un animal vertebrado, que se pretende que denote cualquier especie animal (y preferentemente, una especie de mamífero tal como un ser humano). En determinadas realizaciones, un "paciente" se refiere a cualquier hospedador animal, incluyendo, pero sin limitarse a, primates humanos y no humanos, aves, reptiles, anfibios, bovinos, caninos, caprinos, cavino, corvinos, epinos, quinos, felinos, caprinos, lapinos, leporinos, lupinos, murinos, ovinos, porcinos, racinos, vulpinos, y similares, que incluyen, sin limitación, ganadería domesticada, animales de pastoreo o migratorios o pájaros, especímenes exóticos o zoológicos, así como animales de compañía, mascotas y cualquier animal que se encuentre bajo los cuidados de un profesional veterinario. La invención se puede utilizar para vigilar los brotes de la enfermedad, la progresión, y la estadística epidemiológica de una variedad de poblaciones globales, incluyendo, sin limitación, enfermedades debilitantes en ungulados, tuberculosis, ébola, SARS, y gripes aviarias. En determinadas realizaciones, las muestras serán preferentemente de origen mamífero, y de forma más preferible, de origen humano.

El término "caótrofo" o "agente caotrófico" tal como se usa en el presente documento, incluye sustancias que producen trastornos en una proteína o ácido nucleico mediante, por ejemplo, pero sin limitarse a, alterar la estructura secundaria, terciaria, o cuaternaria de una proteína o ácido nucleico a la vez que se deja la estructura primaria intacta.

El término “*por ejemplo*”, tal como se usa en el presente documento, se utiliza meramente a modo de ejemplo, sin la limitación prevista, y no debe construirse como refiriéndose solamente a aquellos elementos explícitamente enumerados.

5 El término “sustancialmente exento” o “esencialmente exento”, tal como se usa en el presente documento, significa normalmente que una composición contiene menos de aproximadamente 10 por ciento en peso, preferentemente menos de aproximadamente 5 por ciento en peso, y de forma más preferible menos de aproximadamente 1 por ciento en peso de un compuesto. En una realización preferida, estos términos se refieren a menos de aproximadamente 0,5 por ciento en peso, de forma más preferible menos de aproximadamente 0,1 por ciento en peso o incluso menos de aproximadamente 0,01 por ciento en peso. Los términos abarcan también una composición que está completamente exenta de un compuesto o de otra propiedad indicada. Con respecto a la degradación o al deterioro, el término “sustancial” puede referirse también a los porcentajes en peso anteriormente señalados, de tal manera que evitar la degradación sustancial podría referirse a menos de aproximadamente un 15 por ciento en peso, menos de aproximadamente un 10 por ciento en peso, preferentemente menos de aproximadamente un 5 por ciento en peso, *etc.*, perdiéndose la degradación. En otras realizaciones, estos términos se refieren a meros porcentajes más bien que a porcentajes en peso tal como con respecto al término “sustancialmente no patogénico”, donde el término “sustancialmente” se refiere a dejar menos de aproximadamente un 10 por ciento, menos de aproximadamente un 5 por ciento, *etc.*, de la actividad patogénica.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “heterólogo” se define en relación con una secuencia de ácido nucleico referenciada predeterminada. Por ejemplo, con respecto a una secuencia génica estructural, un promotor heterólogo se define como un promotor que no se produce naturalmente adyacente al gen estructural referenciado, pero que se sitúa mediante la mano del hombre en una o más manipulaciones de laboratorio que emplean de forma rutinaria las personas normalmente expertas en las técnicas biológicas moleculares. Igualmente, se define un gen heterólogo o segmento de ácido nucleico como un gen o segmento de ácido nucleico que no se produce naturalmente adyacente a la secuencia, promotor y/o elemento(s) potenciador(es) referenciados, *etc.*

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “homología” se refiere a un grado de complementariedad entre dos o más secuencias de polinucleótidos o polipéptidos. La palabra “identidad” puede sustituirse por la palabra “homología” cuando una primera secuencia de ácido nucleico o aminoácido tiene la misma secuencia primaria exacta que la segunda secuencia de ácido nucleico o aminoácido. Se pueden determinar la homología de la secuencia y la identidad de la secuencia analizando dos o más secuencias utilizando algoritmos y programas informáticos conocidos en la técnica. Se pueden usar dichos métodos para evaluar si una secuencia dada es idéntica u homóloga a otra secuencia seleccionada.

35 Tal como se usa en el presente documento, “homólogo” significa, cuando se refiere a polinucleótidos, secuencias que tienen la misma secuencia de nucleótidos esencial, a pesar de provenir de diferentes orígenes. Normalmente, las secuencias de ácidos nucleicos homólogos se derivan de genes u organismos estrechamente relacionados que poseen una o más secuencias genómicas sustancialmente similares. En contraste, un polinucleótido “análogo” es aquel que comparte la misma función con un polinucleótido de una especie u organismo diferente, pero que puede tener una secuencia de nucleótidos primaria significativamente diferente que codifica una o más proteínas o polipéptidos que llevan a cabo funciones similares o poseen actividad biológica similar. Los polinucleótidos análogos pueden a menudo derivarse de dos o más organismos que no están estrechamente relacionados (*por ejemplo*, tanto genética como filogenéticamente).

45 Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polinucleótidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para la máxima correspondencia sobre una ventana comparativa, tal como se midió utilizando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual.

50 Un “cebador” o “secuencia cebadora” puede incluir cualquier secuencia de ácido nucleico o segmento que se hibrida selectivamente con un molde complementario de una hebra de ácido nucleico (“secuencia diana”) y funciona como un punto de inicio para la adición de nucleótidos para replicar la hebra del molde. Las secuencias del cebador de la presente invención pueden marcarse o contienen otras modificaciones que permiten la detección y/o el análisis de los productos de amplificación. Además, para servir como inicios de duplicación mediada por la polimerasa o secuencias de ADN diana, se pueden usar las secuencias del cebador para la transcripción inversa de los ARN de los moldes en los correspondientes ADN

60 Una “secuencia diana” o “secuencia de nucleótidos diana”, tal como se usa en el presente documento incluye cualquier secuencia de nucleótido a la cual se hibrida una de dichas secuencias diana en condiciones que permiten que una enzima que tiene actividad polimerasa prolongue la secuencia del cebador, y por tanto replique la hebra complementaria

65 Tal como se usa en el presente documento, el término “unido de manera operable” se refiere a un enlace de dos o más polinucleótidos de dos o más secuencias de ácidos nucleicos en una relación funcional. Un ácido nucleico se

“une de manera operable” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador se une de manera operable con una secuencia de codificación si afecta la transcripción de la secuencia de codificación. “Unido de manera operable” significa que las secuencias de ácidos nucleicos que se unen están normalmente contiguas, o sustancialmente contiguas, y, cuando es necesario para unirse a dos regiones que codifican proteínas, contiguas y en el marco de lectura. Debido a que los potenciadores funcionan generalmente cuando se separan del promotor por algunas kilobases y las secuencias intrónicas pueden ser de longitudes variables; sin embargo, algunos elementos de polinucleótidos pueden unirse de manera operable pero no son contiguos.

‘Unidad transcripcional’ se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende al menos un primer gen estructural unido de manera operable a al menos una primera secuencia promotora que actúa en cis y opcionalmente unida de manera operable a una o más secuencias de ácidos nucleicos que actúan en cis necesarias para una transcripción eficaz de las secuencias del gen estructural, y al menos un primer elemento regulatorio distal que se puede requerir para la adecuada transcripción específica de tejido y de desarrollo de la secuencia del gen estructural situada de manera operable bajo el control del promotor y/o los elementos potenciadores, así como cualquier secuencia cis adicional que sea necesaria para la transcripción ya la traducción eficaces (por ejemplo, sitio(s) de poliadenilación), secuencia(s) de control de la estabilidad del ARNm, etc.

Las frases “aislado” o “biológicamente puro” se refieren al material que está sustancial, o esencialmente, exento de componentes que normalmente acompañan al material que se encuentra en su estado natural. De esta manera, los polinucleótidos aislados de acuerdo con la invención no contienen preferentemente materiales asociados con aquellos polinucleótidos en su ambiente natural, o *in situ*.

“Enlace” o “unión” se refiere a cualquier procedimiento conocido en la técnica para conectar funcionalmente una o más proteínas, péptidos; ácidos nucleicos, o polinucleótidos, que incluyen, sin limitación, fusión recombinante, enlace covalente, enlace disulfuro, enlace iónico, enlace de hidrógeno, unión electrostática, y similares.

El término “patógeno” se define en el presente documento como cualquier clase de agente infeccioso, incluyendo, virus, priones, protozoos, parásitos, así como microbios tales como bacterias, levaduras, mohos, hongos, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término “plásmido” se refiere a una construcción genética que está compuesta por material genético (es decir, ácidos nucleicos). Normalmente, un plásmido contienen un origen de replicación que es funcional en las células hospedadoras bacterianas, por ejemplo, *Escherichia coli*, y marcadores seleccionables para detectar las células hospedadoras bacterianas que comprenden el plásmido, Los plásmidos de la presente invención pueden incluir elementos genéticos tal como se describe en el presente documento dispuestos de tal manera que una secuencia de codificación insertada se puede transcribir y traducir en células eucariotas. Además, el plásmido puede incluir uno o más ácidos nucleicos derivados de fuentes naturales o artificiales.

Tal como se usa en el presente documento, se pretende que el término “polipéptido” abarque un “polipéptido” singular así como “polipéptidos” plurales, e incluye cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos. De esta manera, tal como se usa en el presente documento, todos los términos que incluyen, pero no se limitan a “péptido”, “dipéptido”, “tripéptido”, “proteína”, “enzima”, “cadena de aminoácidos” y “secuencia de aminoácidos contiguos” están abarcados en la definición de “polipéptido”, y el término “polipéptido” se puede usar en vez de, o de forma indistinta con, cualquiera de estos términos. El término incluye además los polipéptidos que han experimentado una o más modificación(es) posterior(es) a la traducción, que incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización, escisión proteolítica, procesamiento posterior a la traducción, o modificación mediante inclusión de uno o más aminoácidos que no se producen naturalmente. Existen en la técnica nomenclaturas convencionales para las estructuras de polinucleótidos y polipéptidos. Por ejemplo, se emplean ampliamente abreviaturas de una letra y de tres letras para describir los aminoácidos: Alanina (A; Ala), Arginina (R; Arg), Asparagina (N; Asn), Ácido Aspártico (D; Asp), Cisteína (C; Cys), Glutamina (Q; Gln), Ácido Glutámico (E; Glu), Glicina (G; Gly), Histidina (H; His), Isoleucina (I; Ile), Leucina (L; Leu), Metionina (M; Met), Fenilalanina (F; Phe), Prolina (P; Pro), Serina (S; Ser), Treonina (T; Thr), Triptófano (W; Trp), Tirosina (Y; Tyr), Valina (V; Val), y Lisina (K; Lys). Los restos de aminoácidos descritos en el presente documento se prefiere que estén en la forma isomérica “L”. sin embargo, los restos en la forma isomérica “D” pueden sustituirse por cualquier resto de aminoácido L con la condición de que se retengan las propiedades deseadas del polipéptido.

“Proteína” se usa en el presente documento de forma indistinta con “péptido” y “polipéptido”, e incluye los péptidos y polipéptidos producidos de forma sintética, recombinante, o *in vitro*, y los péptidos y polipéptidos expresados *in vivo* después de que se administran secuencias de ácidos nucleicos en un hospedador animal o sujeto humano. El término “polipéptido”, se pretende preferentemente que se refiera a todas las longitudes de la cadena de aminoácidos, que incluyen aquellos péptidos de cadena corta de entre aproximadamente 2 a aproximadamente 20 restos de aminoácidos de longitud, oligopéptidos de entre aproximadamente 10 a aproximadamente 100 restos de aminoácidos de longitud, y los polipéptidos que incluyen aproximadamente 100 restos de aminoácidos o más de longitud. El término “secuencia”, cuando se refiere a aminoácidos, se refiere a toda o a una porción del orden lineal del extremo N al extremo C de los aminoácidos en una cadena de aminoácidos dada, por ejemplo, polipéptido o

proteína; "subsecuencia" significa cualquier tramo consecutivo de aminoácidos en una secuencia, por ejemplo, al menos 3 aminoácidos consecutivos en una proteína o secuencia de polipéptidos dada. Con referencia a las cadenas de nucleótidos y polinucleótidos, "secuencia" y "subsecuencia" tienen significados similares que se refieren al orden 5' a 3' de los nucleótidos.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente homólogo" abarca dos o más secuencias biomoleculares que son significativamente similares entre sí al nivel de la secuencia de nucleótidos primaria. Por ejemplo, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos, "sustancialmente homóloga" puede referirse a al menos aproximadamente un 75 %, preferentemente al menos aproximadamente un 80 %, y de forma más preferible al menos aproximadamente un 85 %, o al menos un 90 % de identidad, e incluso de forma más preferible al menos aproximadamente un 95 %, de forma más preferible al menos aproximadamente un 97 % idéntica, de forma más preferible al menos aproximadamente un 98 % idéntica, de forma más preferible al menos aproximadamente un 99 % idéntica, e incluso de forma aún más preferible, al menos sustancial o completamente un 100 % idéntica (es decir, "invariante")

15 Igualmente, tal como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente idéntica" abarca dos o más secuencias biomoleculares (y en particular, secuencias de polinucleótidos) que presentan un alto grado de identidad entre sí al nivel del nucleótido. Por ejemplo, en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos, "sustancialmente idéntica" puede referirse a las secuencias que son al menos aproximadamente un 80 %, y de forma más preferible al menos aproximadamente un 85 %, o al menos aproximadamente un 90 % idénticas entre sí, e incluso de forma más preferible al menos aproximadamente un 95 %, de forma más preferible al menos aproximadamente un 97 % idénticas, de forma más preferible al menos aproximadamente un 98 % idénticas, de forma más preferible al menos aproximadamente un 99 % idénticas, en incluso de forma aún más preferible, al menos sustancialmente o en su totalidad un 100 % idénticas (es decir, "no degeneradas". El término "recombinante" indica que el material (por ejemplo un polinucleótido o un polipéptido) se ha alterado de forma artificial o sintética (no natural) mediante la intervención humana. La alteración puede llevarse a cabo sobre el material en o eliminarse de, entorno o estado natural. De forma específica, por ejemplo, una secuencia promotora es "recombinante" cuando se produce la expresión de un segmento de ácido nucleico genomanipulado debido a la mano del hombre. Por ejemplo, un "ácido nucleico recombinante" es aquel que se prepara recombinando ácidos nucleicos, por ejemplo, durante la clonación, soplado de ADN u otros procedimientos, o mediante mutagénesis química u otras, un "polipéptido recombinante" o "proteína recombinante" es un polipéptido o proteína que se produce mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante; y un "virus recombinante", por ejemplo, un virus de gripe recombinante, se produce mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante.

35 De acuerdo con la presente invención, polinucleótidos, segmentos de ácidos nucleicos, secuencias de ácidos nucleicos, y similares, incluyen, pero no se limitan a, ADN (que incluye y no se limita a ADN genómico o extragenómico), genes, ácidos nucleicos peptídicos (ANP) ARN (que incluyen, pero no se limitan a ARNr, ARNm, y ARNt), nucleósidos, y segmentos de ácidos nucleicos adecuados obtenidos tanto de fuentes naturales, como sintetizados químicamente, modificados, o preparados o sintetizados de otra manera de forma completa o en parte por la mano del hombre.

Igualmente, de acuerdo con la convención de la ley de patentes ya implantadas, las palabras "un" y "uno" cuando se usan en esta solicitud, incluyendo las reivindicaciones, denotan "uno o más".

## 45 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se han incluido para demostrar realizaciones ilustrativas de la invención. Los expertos en la material deberán apreciar que todas las técnicas divulgadas en los ejemplos que sigue representan técnicas descubiertas que funcionan bien en la práctica de la invención, y que por tanto se pueden considerar como modos preferidos de su práctica.

### Ejemplo 1 - Formulación de disoluciones de almacenamiento a modo de ejemplo

55 El presente ejemplo proporciona una formulación general de las composiciones de PSS (PanFlu) de la presente invención. Otras formulaciones de las composiciones de PSS también se han ilustrado en los Ejemplos del 2 al 5.

#### Materiales

60 Tiocianato de guanidina, citrato de sodio, concentrado de antiespumante A@, y *N*-lauroilsarcosina, sal sódica, se compraron a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.). El clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP) se obtuvo de Soltec Ventures Inc. (Beverly, MA, EE.UU.). El 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS) se obtuvo de Applied Biosystems/Ambion (Austin, TX, EE.UU.). El ácido 2-[2-(bis(carboximetil)amino)etil-(carboximetil)amino]acético (EDTA) GIBCO® Ultra Pure se obtuvo de Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, EE.UU.). El resto de reactivos están disponibles de Sigma-Aldrich o USB Corporation.

65

Tabla 1

## Intervalos de formulación de componentes a modo de ejemplo para la preparación de composiciones de Primestore™

5	Compuesto	Intervalo final de concentraciones
10	1. Un caótopo, <i>por ejemplo</i> : Tiocianato de guanidina o Clorhidrato de guanidina o Isocianato de guanidina	de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 6 M de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 6 M de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 6 M
15	2. Un detergente aniónico, <i>por ejemplo</i> : <i>N</i> -lauroil sarcosina ( <i>inter alia</i> sal Na) (peso/vol.) o Docecil sulfato de sodio Docecil sulfato de litio Glicolato de sodio	de aproximadamente 0,15 % a aproximadamente 1 % lo mismo lo mismo lo mismo
20	Deoxiglicolato de sodio Taurodeoxiglicolato de sodio Colato de sodio	lo mismo lo mismo lo mismo
25	3. Un agente reductor, <i>por ejemplo</i> : TCEP o p-ME, DTT, formamida, o DMSO	de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 30 mM de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 0,3 M
30	4. Un quelante, <i>por ejemplo</i> : Citrato de sodio o EGTA, HEDTA, DTPA, NTA, APCA, <i>etc.</i>	de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 50 mM de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM
35	5. Un tampón ( <i>por ejemplo</i> , TRIS, HEPES, Bis-Tris, <i>etc.</i> ) 6. Un ácido ( <i>por ejemplo</i> , HCl o ácido cítrico)	de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1 M c.s. para ajustar a un pH de aproximadamente 6 a 7, preferentemente de 6,4 a 6,8
35	7. Agua exenta de nucleasa	c.s. para llegar al volumen final deseado
40	De manera opcional uno o más de: 8. Un agente tensioactivo o desespumante, <i>por ejemplo</i> : Antiespumante A® o Tween® (peso/vol.)	de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 0,3 %
40	9. Un alcohol ( <i>por ejemplo</i> , metanol, etanol, propanol, <i>etc.</i> )	de aproximadamente 1 % a aproximadamente 25 % (vol./vol.)
45	10. portador/ARN o ADN de IPC	de aproximadamente 1 pg a aproximadamente 1 µg/ml

## Ejemplo 2 - Formulación de una disolución de almacenamiento a modo de ejemplo

El presente ejemplo describe una primera formulación a modo de ejemplo de las composiciones de la invención. Esta formulación se ha denominado por los inventores, de forma alternativa, como "Disolución PrimeStore™" o "PSS" versión 1.

Tabla 2

## PREPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PRIMESTORE™ (VER. 1)

Compuesto	Concentración final
Tiocianato de guanidina	4 M
Citrato de sodio	30 mM
Dodecilsulfato de sodio	0,25 % (peso/vol.)
<i>N</i> -lauroil sarcosina, sal sódica	0,25 % (peso/vol.)
2-mercaptoetanol (P-ME)	0,1 M
Antiespumante A	0,1 % (peso/vol.)
Ácido cítrico	c.s. para ajustar el pH a 6,5
Agua exenta de nucleasa	11.82 ml

**Ejemplo 3 - Formulación de una segunda disolución de almacenamiento a modo de ejemplo**

El presente ejemplo describe la preparación de otra disolución de almacenamiento a modo de ejemplo de acuerdo con la presente invención. Esta formulación se ha denominado por los inventores, de forma alternativa, como PrimeStore™ *versión 1*.

**Tabla 3****PREPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PRIMESTORE™ (VER. 2)**

Compuesto	Cantidad	Concentración final
Tiocianato de guanidina	35,488 g	3 M
TCEP	0,02867 g	1 mM
Citrato de sodio	0,2931 g	10 mM
<i>N</i> -lauroil sarcosina, sal sódica (NLS)	0,5 g	0,5 %
Antiespumante A (disolución al 10 %)	200 µl	0,002 %
TRIS (1 M)	10 ml	100 mM
EDTA (0,5 M)	20 µl	0,1 mM
Ácido clorhídrico (HCl)	c.s. para ajustar el pH a 6.7	--
Agua exenta de nucleasa	c.s. a 100 ml	--

**10 Ejemplo 4 - Formulación de una tercera de almacenamiento a modo de ejemplo**

El presente ejemplo describe la preparación de otra disolución de almacenamiento a modo de ejemplo de acuerdo con la presente invención. Esta formulación se ha denominado por los inventores, de forma alternativa, como PSS *versión 2.2*.

**Tabla 4****PREPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PRIMESTORE™ (VER. 2.2)**

Compuesto	Cantidad	Concentración final
Tiocianato de guanidina	35,488 g	2,5 M
TCEP	0,02867 g	0,5 mM
Citrato de sodio	0,2931 g	10 mM
<i>N</i> -lauroil sarcosina, sal sódica (NLS)	0,5 g	0,4 %
Antiespumante A (disolución al 10 %)	200 µl	0,002 %
TRIS (1 M)	10 ml	100 mM
EDTA (0,5 M)	20 µl	0,1 mM
Etanol, calidad molecular (96-100 %)	23 ml	23 % (vol./vol.)
Ácido clorhídrico (HCl)	c.s. para ajustar el pH a 6.7	--
Agua exenta de nucleasa	c.s. a 100 ml	--

**Protocolo a modo de ejemplo para la preparación de PSS (VER. 2.2):**

1. Añadir 40 ml de agua exenta de nucleasa a un matraz limpio provisto de barra agitadora.
2. Colocar el matraz en una placa/agitador caliente y ajustar la temperatura a 60 - 65°C. Ajustar la velocidad de agitación a un valor medio
3. Añadir 35.488 g de tiocianato de guanidina lentamente al agua, dejando que se disuelva a medida que se añade
4. Añadir 0,0287 g de TCEP al matraz y aumentar la velocidad de agitación para disolver los cristales
5. Añadir 0,2931 g de citrato de sodio al matraz.
6. Añadir 0,5 g de NLS a la disolución. Aumentar la velocidad de agitación para crear un vórtice en el matraz. Esto llevará el NLS a la disolución y ayudará a disolver el reactivo.
7. Vortizar una disolución preparada con Antiespumante A (1 ml concentrado de antiespumante A + 9 ml agua exenta de nucleasa) al 10 %. Pipetear 200 µl del antiespumante A al 10 % en la disolución.
8. Pipetear 10 µl de TRIS 1 M a la disolución.
9. Pipetear 20 µl de EDTA 0,5 M a la disolución.
10. Aumentar la temperatura para llevar la disolución a 75-80°C y agitar durante 3-5 minutos.
11. Retirar el matraz del calor y dejar que la disolución se enfríe a temperatura ambiente (~ 22-25°C).
12. Añadir 23 ml de etanol a la disolución y mezclar completamente.
13. Ajustar el pH a 6,9 con HCl.
14. Verter la disolución en una probeta de 100 ml limpia.
15. Añadir agua exenta de nucleasa para llevar el volumen total hasta 100 ml.
16. Transferir la disolución a un recipiente estéril etiquetado. Almacenar a temperatura ambiente (~ 22-25°C).

\*Nota: Preferentemente, asegurarse de que cada reactivo está completamente disuelto antes de añadir el siguiente.

#### Ejemplo 5 – Comparación entre la disolución de PRIMESTORE™ y las formulaciones convencionales

5 Una muestra de tejido nasal homogenizado procedente de una rata del algodón (*Sigmodon hispidus*) estimulada con gripe A (H3N2) o una muestra clínica de gripe A (H1N1) humana recogida de un ser humano por lavado nasal durante la temporada 2006-07, se colocó en PSS (ver. 1) y se analizó comparándola con las respectivas formulaciones de lisis y protocolo, y método de extracción, con tres kits comerciales: RNAqueous®-Micro (Ambion, Austin, TX, EE.UU.), QIAamp Viral RNA Mini Kit (Catalogue #52904, Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.), y el kit de aislamiento de ARN vírico MagMax AI/ND (nº de catálogo AM1929, Ambion). La eficacia de extracción se evaluó mediante el sistema de detección de secuencia ABI 7500 con el método CT comparativo (véase la Fig. 2).

En la Fig. 2, "delta Rn" representa la señal indicadora fluorescente menos una cantidad inicial. Como se muestra en la Fig. 1 y la Fig. 2, las puntuaciones CT relativas y las copias víricas detectadas fueron óptimas cuando se usó la formulación de fijación en lugar de los correspondientes tampones de lisis comerciales de cada kit comercial. En estos dos tipos de muestra, las composiciones de la invención se comportaron mejor que los dos kits convencionales con fines de extracción. También se demostró que la composición de la disolución PrimeStore™ (ver. 1) era totalmente compatible con los kits comerciales de extracción de ácido nucleico. La Fig. 1 ilustra los resultados de la extracción de ARN cuando se usó la versión 1 de PSS junto con tres kits comerciales: Qiagen Viral Mini, Ambion RNAqueous Mini, y Ambion AI/NCD MagMax. Como se muestra en la Fig. 1, cuando el tampón de lisis del kit de extracción se sustituyó por la formulación de fijación (denotada en la figura como "Un paso+), se consiguió una extracción de ácido nucleico superior en comparación con la extracción usando kits de acuerdo con el protocolo normalizado fijación (denotada en la figura como "Un paso-". La eficacia de extracción se midió mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcripción inversa (RT) en tiempo real (r) [rRT-PCR].

La Fig. 3 muestra la conservación de ARN inactivado en la disolución PrimeStore™ comparada con la conservación en una disolución anterior, donde el agua se usa como control. Como se ilustra en la Fig. 3, la detección (mediante fluorescencia) se produjo en el ciclo de amplificación anterior para el ARN almacenado en PSS (ver. 1) en todos los puntos analizados.

#### Ejemplo 6 - Disolución PRIMESTORE™ para la recogida de especímenes de lavado nasal

Se llevó a cabo un estudio prospectivo de detección clínica mediante especímenes de lavado nasal procedentes de: 1) pacientes pediátricos sintomáticos y 2) miembros de la familia asintomáticos o sintomáticos. La detección del virus de la gripe comparó los especímenes de lavado nasal recogidos con la disolución PrimeStore™ y VTM mediante qRT-PCR y cultivo tradicional, respectivamente. La caracterización genética de los genes de la gripe que codificaban la hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), y proteínas de la superficie de la matriz (MA) se llevó a cabo con especímenes de lavado nasal seleccionados conservados en disolución PrimeStore™ para evaluar la eficacia de la vacuna y la sensibilidad al fármaco con cepas víricas.

La gripe es un virus de ARN muy evolutivo basado en ARN responsable de más de 200.000 hospitalizaciones y aproximadamente 36.000 fallecimientos cada año en Estados Unidos. La amplia aparición de variantes derivadas de la gripe entre los virus humanos que circulan en la actualidad provoca un cambio en los tres componentes de la vacuna de la próxima temporada 2008/09. El aumento de la morbilidad y mortalidad durante la temporada 2007/08 incluyó 72 muertes pediátricas asociadas a gripe y resistencia a fármacos continuada (oseltamivir [TamiFlu®, Roche Laboratories, Inc., Nutley, NJ, EE.UU.] y adamantadina) entre las cepas circulantes.

#### Materiales y métodos

Un total de 100 pacientes pediátricos (índice) que cumplían los criterios del caso clínico para infección por gripe y 126 contactos familiares se inscribieron en el estudio. Los lavados nasales se introdujeron en disolución PrimeStore™ y en Universal VTM y se analizaron mediante rRT-PCR o análisis por cultivo, respectivamente. La rRT-PCR se llevó a cabo con cebadores/sondas específicos del tipo (A o B) y el subtipo (H3, H1, H5) de acuerdo con Daum y col. (2007). Se llevó a cabo una caracterización genética adicional de muestras clínicas seleccionadas conservadas en PSS mediante RT-PCR convencional y secuenciación directa del nucleótido de la hemaglutinina de las proteínas víricas HA, NA, y MA.

#### Resultados

Del total de las muestras evaluadas (N = 226; índice 100, 126 contactos familiares), 66 (29 %) dieron un resultado positivo para el análisis del virus de la gripe (45 H3N2, 2 H1N1 y 19 B) mediante rRT-PCR. El rRT-PCR de los lavados nasales conservados en PSS detectó el virus de la gripe en 11 pacientes (9 Gripe A y 2 Gripe B) que no fueron detectados en cultivo (Tabla 5 y Tabla 6). De estos 11 especímenes, cinco procedían de pacientes inscritos como contactos familiares.

65

El análisis filogenético de los genes de HA de la gripe A y B mostró una deriva comparada con las cepas de la vacuna 2007/08 y reveló una homología genética superior con las cepas de la vacuna Brisbane 2008/09. Se notaron algunas diferencias genéticas en los virus entre miembros de la familia, especialmente entre cepas de gripe A (H3N2). El análisis de MA reveló Resistencia a adamantano en todas las cepas H3N2 de la gripe A, pero

5 sensibilidad para ambos virus H1N1. Todas las cepas de gripe B (n = 18) fueron sensibles a los fármacos inhibidores de la neuraminidasa zanamivir (Relenza® GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC, EE.UU.) y oseltamivir (Tamiflu® Roche) basándose en la preferencia de un ácido aspártico (D) en el aminoácido 197 (numeración de la gripe B) en el gen de la NA.

## 10 QRT-PCR comparado con los métodos de cultivo tradicionales

qRT-PCR es superior al cultivo tradicional para la detección del virus de la gripe procedente de especímenes originales de lavados nasales conservados en PSS: la gripe se detectó en 2 horas (c.f. 2 a 7 días para los métodos de cultivo convencionales); y el análisis fue más sensible (11 especímenes; 9 Gripe A y 2 Gripe B detectados por

15 debajo de los límites de cultivo). Además, el uso de métodos de diagnóstico molecular en lugar del cultivo de organismos tradicional no propagó virus potencialmente infecciosos, y proporcionó simultáneamente el tipo y el subtipo de virus de la gripe.

## 20 Análisis genético

### Relación con la vacuna

**Cepas H3N2:** el análisis del gen HA1 de la hemaglutinina (HA) de la gripe A (H3N2) revela deriva genética incluyendo diferencias en cinco aminoácidos en todas las cepas Texas comparado con la cepa de vacuna 2007-08

25 A/Wisconsin/67/2005. Una mutación en HA1 detectada en todas las cepas Texas (D122N) era un sitio de glicosidación potencial. Todas las cepas A/Texas (H3N2) mostraron una homología HA superior (99,0-99,7 %) con la nueva cepa 2008-09 A/Brisbane/10/2007 seleccionada.

**Cepas H1N1:** el gen HA1 de la hemaglutinina de la gripe A 2 (H1N1) muestra cambios en 5 aminoácidos si se compara con la cepa de vacuna A/Solomon Island/3/2006. Cuatro sustituciones (R90K, T145V, K210T y E290K) eran sitios bien conocidos de combinación del anticuerpo H1. Ambas Texas H1N1 mostraron una homología HA superior (98,8 % y 99,4 %) con la nueva cepa 2008-09 A/Brisbane/10/2007 seleccionada.

30

**Cepas Gripe B:** el análisis de los genes hemaglutinina y neuraminidasa de HA1 revela que todas las cepas Texas eran del linaje B/Yamagata y genéticamente más homólogas de la cepa de vacuna 2008-09 B/Brisbane/5/2007 que de la cepa de vacuna 2007/08 B/Malaysia/2506/2004.

35

### Mutación familiar

Se observaron cambios en aminoácidos de NA, HA1, M1 y M2e entre miembros de la familia. La hemaglutinina HA1 mostró la mayor mutación de los genes de la gripe analizados, mostrando una familia cinco cambios en aminoácidos.

40

El análisis de los 24 aminoácidos muy conservados de la bomba de protones M2e de la superficie del virus mostró alguna variación dentro de la familia. Una cepa de paciente índice contenía 3 sustituciones únicas en los aminoácidos de M2e que eran de 'tipo natural' entre las cepas de los miembros de la familia.

45

### Susceptibilidad a los antivirios

**Adamantano:** el análisis genético de los genes de la matriz (MA), específicamente una sustitución serina-a-asparagina en la posición 31 (S31N), reveló resistencia a adamantano en todas las cepas de gripe A (H3N2) pero sensibilidad en ambos virus de gripe A (H1N1).

50

**Inhibidores de la neuraminidasa:** se demostró que todos los aislados de gripe A (H3N2) Texas eran sensibles a oseltamivir mediante el análisis genético de las sustituciones E119V, R292K, y N294S del gen NA. El análisis genético del gen NA de la gripe B reveló que todas las cepas Texas contenían un resto de ácido aspártico (D) en la posición 197, y que por tanto eran sensibles a oseltamivir.

55

Los protocolos y ensayos del presente documento se pueden adaptar a otro microorganismos tales como tuberculosis, malaria, estafilococos y similares, y a otros patógenos, cuando exista necesidad de conocer rápidamente la susceptibilidad a otros antibióticos.

60

### Ejemplo 7 – Recogida de muestras de gripe mediante disoluciones de PRIMESTORE™

Las composiciones de la presente invención proporcionan un reactivo único para la recogida, transporte y almacenamiento de muestras que facilita : 1) procurar ácidos nucleicos de alta calidad procedentes de especímenes

65

clínicos o ambientales, 2) la inactivación de patógenos biológicos potencialmente infecciosos para manipulación y transporte seguros de los especímenes, y 3) estabilización y conservación de ARN/ADN inactivado liberado que evita la degradación por hidrólisis/nucleasas durante periodos prolongados a temperatura ambiente.

- 5 Los resultados de este estudio se presentan en el siguiente ejemplo. Este ejemplo ilustra la eficacia del PSS (ver. 2.2) para destruir lo(s) microorganismo(s) patógeno(s).

Tabla 5

<b>Total de muestras de gripe A (N=47)</b>	<b>Detección del subtipo de gripe: rRT-PCR comparado con Cultivo</b>				<b>Total de muestras de gripe B (N=19)</b>
	<b>Gripe A</b>		<b>Gripe B</b>		
	<b>rRT-PCR (N=47)</b>	<b>Cultivo (N=40)</b>	<b>rRT-PCR (N=19)</b>	<b>Cultivo (N=17)</b>	
<b>Pacientes índice (28)</b>	<b>28/28 (100 %)</b>	<b>23/28 (100 %)</b>	<b>16/16 (100 %)</b>	<b>14/16 (100 %)</b>	<b>Pacientes índice (16)</b>
<b>Contactos familiares (19)</b>	<b>19/19 (100 %)</b>	<b>15/19 (100 %)</b>	<b>3/3 (100 %)</b>	<b>3/3 (100 %)</b>	<b>Contactos familiares (3)</b>

10

Tabla 6

<b>Detección positiva de la gripe rRT-PCR comparado con Cultivo</b>			
<b>Total de muestras (N=226)</b>	<b>Positivas para gripe (N=66)</b>	<b>rRT-PCR (N=66)</b>	<b>Cultivo (N=66)</b>
<b>Pacientes índice (100)</b>	<b>44/100</b>	<b>39/39 (100 %)</b>	<b>37/39 (94 %)</b>
<b>Contactos familiares (126)</b>	<b>22/126</b>	<b>27/27 (100 %)</b>	<b>18/27 (67 %)</b>

**Métodos**

15

Se utilizó qRT-PCR para ensayar el virus de ácido nucleico de la gripe A (H5N1) conservado en disolución PrimeStore™. Se llevó a cabo un estudio de curso temporal a temperatura ambiente para evaluar la integridad de los especímenes clínicos, muestras cloacales, y ARN de molde clonado del virus de la gripe A aviar (H5), almacenado y extraído en disoluciones de almacenamiento PSS, VTM, RNA o en agua exenta de nucleasa. La eficacia de extracción en PrimeStore™ se comparó con tres kits de extracción de ácido nucleico comerciales. Además, se evaluó la capacidad del ARN contenido en PSS para resistir la degradación por nucleasas.

20

**Resultados**

25

PSS (ver. 2, sin etanol) inactiva agentes microbiológicos pero conservando al mismo tiempo el ARN/ADN liberado del material clínico, es decir, lavados nasales, frotis de garganta o muestras ambientales. Los especímenes clínicos o las muestras ambientales colocadas en esta disolución se estabilizaron a temperatura ambiente durante hasta 30 días mientras que en otros medios de transporte se produjo degradación de ADN. PSS es compatible con kits de aislamiento comerciales de ARN y produjo un aumento en el rendimiento de ácidos nucleicos.

30

**EJEMPLO 8 – Destrucción de MRSA (ATCC33592) en la disolución PRIMESTORE™**

35

Este ejemplo ilustra la eficacia del PSS (ver. 2.2) para destruir una bacteria patógena. La cepa ATCC33592 de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) se diluyó 10 veces y 1000 veces en PSS (ver. 2.2) y se cuantificó (véase la Fig. 6).

**Protocolo experimental**

**Método diario**

40

**0** Transferir MRSA (ATCC33592) desde un Culti-loop® (Remel) a 1,5 ml de TSB en un tubo de ensayo cónico de 15 ml. Incubar a 37°C durante aproximadamente 15 min. Vortizar suavemente la suspensión y transferir 100 µl a una placa de agar sangre. Incubar la placa durante la noche a 37°C.

45

**1** Observe el crecimiento intenso y uniforme de colonias tras 12 h de incubación. Transferir ~10 % de las colonias a 300 ml de caldo de soja tríptico (TSB) en un matraz estéril de 1 l. Colocar el matraz en el agitador a 37°C y 200 rpm.

Tras aproximadamente 4-6 h de incubación, transferir ~ 50 ml de la suspensión de bacterias a un matraz nuevo de 1 l que contenga 300 ml de TSB reciente.

5 Tras aproximadamente 4-6 h de incubación, transferir ~ 100 µl de cultivo a 900 µl de TSB (dilución control 1:10). De esta suspensión, se transfirieron 10 µl a 990 µl de TSB (dilución control 1:1000).

Transferir 100 µl de cultivo a 900 µl de disolución PrimeStore™ (dilución 1:10 en PSS). De esta suspensión, se transfirieron 10 µl a 990 µl de TSB (dilución 1:1000 en PSS).

10 Inmediatamente después de la transferencia a TSB o disolución PrimeStore™ (ver. 2.2), las suspensiones se sometieron a una vortización suave y 100 µl de ambas disoluciones control y PrimeStore™ se plaquearon en placas de agar sangre. El punto temporal a tiempo cero fue realmente aproximadamente dos minutos después de la adición de la bacteria a TSB o PSS.

15 Las suspensiones en TSB y PSS (ver. 2.2) se mantuvieron a temperatura ambiente.

100 µl más se plaquearon en placas de agar sangre a 5, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos después de la preparación de las suspensiones en TSB y PSS.

20 Se dejó que las suspensiones bacterianas en las placas se secaran, las placas se invirtieron y se incubaron durante la noche a 37°C.

También se llevó a cabo una titulación del cultivo del agitador mezclando 100 µl de la suspensión del cultivo del agitador con 900 µl de TSB (dilución 10<sup>-1</sup>). Se prepararon diluciones en series de diez hasta 10<sup>-9</sup>. Muestras de 100 µl se plaquearon en agar sangre procedentes de todas las diluciones salvo de 10<sup>-1</sup>. Se examinaron 2 placas en busca de colonias bacterianas. Todas las placas se almacenaron a 4°C para un examen adicional, si es necesario.

25 Se examinaron 2 placas en busca de colonias bacterianas. Todas las placas se almacenaron a 4°C para un examen adicional, si es necesario.

### Resultados

30 Los resultados se presentan en la Tabla 7 y la Tabla 8. En resumen, la suspensión bacteriana contenía aproximadamente 4,7 x 10<sup>9</sup> ufc/ml. Así, la dilución 1:10 contenía aproximadamente 4,7 x 10<sup>8</sup> ucf/ml y la dilución 1:1000 contenía 4,7 x 10<sup>6</sup> ufc/ml. En todos los puntos temporales, las bacterias suspendidas en TSB fueron demasiado numerosas para contarlas. En todos los puntos temporales, las bacterias suspendidas en disolución PrimeStore™ y plaqueadas en placas de agar sangre no mostraron colonias detectables.

35

Tabla 7

DESTRUCCIÓN DE MRSA (ATCC 33592) MEDIANTE LA DISOLUCIÓN PRIMESTORE™ (VER. 2.2)					
Tiempo de incubación (minutos)	En TSB			En Primestore	
	1:10	1:1000		1:10	1:1000
0	TNTC	TNTC		0	0
5	TNTC	TNTC		0	0
15	TNTC	TNTC		0	0
30	TNTC	TNTC		0	0
60	TNTC	TNTC		0	0
120	TNTC	TNTC		0	0
240	TNTC	TNTC		0	0

TNTC = demasiado numeroso para contar

Tabla 8

40

Titulación de MRSA ATCC33592 en el cultivo en suspensión				
Dilución		UFC/placa		UFC/ml
1.E+01		TNTC		
1.E+02		TNTC		
1.E+03		TNTC		
1.E+04		TNTC		
1.E+05		TNTC		

Titulación de MRSA ATCC33592 en el cultivo en suspensión				
Dilución		UFC/placa		UFC/ml
1.E+06		TNTC		
1.E+07		35		3,5 X 10 <sup>9</sup>
1.E+08		6		6 X 10 <sup>9</sup>
1.E+09		0		
<b>NOTE:</b> los cálculos de UFC/ml se han corregido para incluir el volumen de plaqueado de 0,1 ml				
<b>Conc. final :</b> 4.7 X 10 <sup>9</sup> /ml				
TNTC = demasiado numeroso para contar.				
CFU = unidades formadoras de colonias.				

Se llevó a cabo un estudio adicional para determinar la exposición necesaria para destruir la ATCC33592 de MRSA cuando se diluyó 10 veces en PSS (Ver. 2.2), y determinar el efecto de la dilución de la bacteria tras su exposición a PSS, pero antes del plaqueado.

5

**Protocolo experimental**

**Método diario**

10 **0** Transferir el MRSA (ATCC33592) desde una placa TNTC del estudio descrito anteriormente a 4 ml de TSB. Estas placas se habían almacenado a 4°C durante aproximadamente 48 h. Las bacterias se sometieron a vortización suave y se pusieron a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 min antes del uso. 0,1 ml de suspensión bacteriana se transfirieron a 0,9 ml de PSS y se sometieron a vortización suave. Tras aproximadamente 60 s, las bacterias en PrimeStore™ se sometieron a vortización suave de nuevo, y 0,1 ml de suspensión bacteriana se transfirieron a 0,3 ml de TSB (dilución 1:4). 100 µl de bacterias en disolución PrimeStore™ (designada como "neta") y de la dilución 1:4 en TSB se plaquearon en placas agar sangre (5 % de RBC de oveja en TSA). Este procedimiento se repitió a los 5 y 15 min., y posteriormente de nuevo en disoluciones preparadas en TSB en lugar de disolución PrimeStore™. Las suspensiones líquidas bacterianas de las placas de agar sangre se dejaron secar a temperatura ambiente y después se incubaron toda la noche a 37°C.

15

20 **1** Tras aproximadamente 16 h de incubación, las placas se retiraron del incubador y se contaron las colonias.

**Resultados**

25 La suspensión bacteriana contenía un número desconocido de unidades formadoras de colonias (ufc) por ml. En todos los puntos temporales, las bacterias suspendidas en caldo de soja tríptico (TSB) fueron demasiado numeroso para contar (TNTC). En todos los puntos temporales, las bacterias suspendidas en disolución PrimeStore™ y plaqueadas en placas de agar sangre no produjeron colonias (Tabla 9).

30

**Tabla 9**

Destrucción de MRSA (ATCC33592) mediante la disolución PRIMESTORE™				
Tiempo de incubación (minutos)	En TSB		En TSB	
	neta	1:4	neta	1:4
1	TNTC	TNTC	0	0
5	TNTC	TNTC	0	0
15	TNTC	TNTC	0	0

TNTC = demasiado numeroso para contar

**Ejemplo 9 – Estudios adicionales que evalúan disoluciones PRIMESTORE™**

35 Los datos de la Fig. 7B ilustran la capacidad del PSS para inactivar microorganismos. Se muestra un estudio donde especímenes de la cloaca de pollos se recogieron en PSS (Ver. 1). La disolución PrimeStore™ inactiva los microorganismos en ≤ 1 h. Cuatro muestras de la cloaca de pollos originales se sumergieron en PSS o agua y posteriormente se plaquearon en placas de agar sangre. Estos resultados muestran que la composición divulgada puede destruir o inactivar rápidamente los microorganismos de la muestra.

40

Los datos de la Fig. 7B ilustran la capacidad del PSS para inhibir la hidrólisis de las bases del ARN durante 30 días a temperatura ambiente. El ARN se incubó a temperatura ambiente (22-26 °C) en PrimeStore™ (hilera 1 y 3 del gel) y en agua (hilera 2 y 4 del gel) y, posteriormente, se amplificó mediante RT-PCR (1500 pares de bases) en el Día 0 y en el Día 30. El PSS conservó el ARN recogido, y evitó la degradación del ARN/ADN d RNA/DNA a temperatura ambiente durante hasta 30 días (véase también, *por ejemplo*, la Tabla 11).

### Ensayo de inhibición de la gripe

Los reactivos de este ensayo incluyen:

Medio de tripsina que contiene: (a) 45 ml de N/C EMEM estéril; (b) 3 ml de disolución de almacenamiento de bicarbonato de sodio al 7,5 % (2 %); (c) 1,5 ml de SPG (1 %); (d) 75 ml de tripsina (0,05 %); (e) 1,5 ml de fungizona (1 %); y (f) 150 ml de gentamicina.

Violeta de cristal que contenía: (a) 150 ml de dialdehído glutárico; (b) 2 g de violeta de cristal y (c) 2850 ml de agua desionizada

### Preparación de las muestras de suero para ensayo

Descongelar y vortizar las muestras. Para cada muestra, marcar la tapa del tubo Spin-X™ correspondiente. Combinar 450 µl de EMEM no complete con 50 µl de suero en el tubo Spin-X™. Calentar los tubos que contienen suero y el EMEM en un baño de agua a 56°C durante 30 min. Centrifugar los tubos a 8000 RPM durante 2 min. a temperatura ambiente. Etiquetar y colocar las muestras en un congelador a -20°C hasta su ensayo.

### Placas de dilución

Cargar 160 µl de cada compuesto neto o muestra de suero en los pocillos del A1 al A12. Cargar los pocillos con 120 µl de medio tripsina. Con una pipeta multicanal, extraer 40 µl de muestra neta de la hilera A y diluirlos en los correspondientes pocillos de la hilera B. Repetir la dilución en cada hilera, mezclando bien pocillo tras la transferencia. En la hilera H, tras mezclar la transferencia de la hilera G, extraer 40 µl de cada pocillo y descartarlos. Obtener disolución de almacenamiento del virus ( $10^6$ ) del congelador a -80°C y descongelar. Diluir la disolución de almacenamiento en un medio con tripsina hasta una dilución  $10^3$ . Tras finalizar las diluciones en serie, transferir 120 µl de virus de la gripe ( $10^4$  TCID<sub>50</sub> por ml) a todos los pocillos de la placa de dilución. Esto da como resultado un total de 240 µl en todos los pocillos. Incubar la placa o placas de dilución a temperatura ambiente durante 1 hora.

### Placas de células MDCK

Esterilizar y colocar el depósito de vidrio, el dispensador combinado y las conducciones en el interior de la vitrina de protección. Dentro de la vitrina, conectar las conducciones al depósito y llenar la boquilla del dispensador combinado. Conectar el tubo de aspiración a la boquilla de vacío del dispensador combinado. Colocar el depósito en una superficie elevada y encender el aspirador. Introducir PBS en el depósito (se puede necesitar 1 l, o más dependiendo del número de placas). Lavar las placas 3x con el PBS combinado (aspirar el medio, después pulsar el botón durante aproximadamente 1 segundo para lavar los pocillos, repetir dos veces). Con una pipeta multicanal, transferir 50 µl de cada pocillo de la columna 1 de la placa de dilución a la columna 1 a 4 de la placa de células. Transferir 50 µl de cada pocillo de la columna 2 de la placa de dilución a la columna 5 a 8 de la placa de células. Transferir 50 µl de cada pocillo de la columna 3 a la columna 9 a 12 de la placa de células. Repetir la transferencia a placas de células adicionales para el resto de las muestras. Incubar las placas de células durante 1 h a 37°C. Tras el periodo de incubación, añadir 50 µl de medio de tripsina a todos los pozos de las placas de células. Devolver las placas a la cámara de incubación, e incubar durante 4 días después de la infección.

### Tinción

Añadir 100 µl de violeta de cristal a todos los pocillos. Dejar reposar durante 1 h. Enjuagar las placas en agua corriente fría y secar al aire.

TABLA 10

#### Titulación de TCEP con el virus de la gripe A completo

5 mM	10 mM	25 mM	35 mM	50 mM
30,353	24,58	24,52	24,14	25,9582
30,2261	22,74	24,26	22,74	26,0337
30,28955	23,66	24,39	23,44	25,99595
0,089732	1,301076	0,183848	0,989949	0,053387

**Titulación de TCEP con el virus de la gripe A completo**

5 mM	10 mM	25 mM	35 mM	50 mM
27,2	25,25	25,63	27,3	28,3039
26,73	24,89	25,36	27,62	26,6854
26,965	25,07	25,495	27,46	27,49465
0,33234	0,254558	0,190919	0,226274	1,144452

Titulación de TCEP usando ARNss H5 Aviar

**Curso temporal del estudio de estabilidad a largo plazo de las composiciones PRIMESTORE**

5 Los siguientes datos demuestran la eficacia de varias composiciones PrimeStore en la conservación de la integridad de ácido nucleico en un periodo de treinta días con muestras almacenadas a temperatura ambiente. Las composiciones PrimeStore se han comparado con el agua sola, etanol solo, tampones comerciales como VTM y AVL.

**DÍA 1**

VTM	Agua	EtOH	AVL	PS-V1 (años de edad)	PS-V1 (nuevo lote)	PS-V2	PS-V2.2 (con EtOH)	
VTM	Agua	EtOH	AVL	PS-V1 (años de edad)	PS-V1 (nuevo lote)	PS-V2	PS-V2.2 (con EtOH)	
27,0225	26,1403	18,4463	24,2698	24,2607	23,9524	23,4426	20,2102	
24,42	25,6044	18,3206	24,4789	24,3716	23,9615	23,7387	20,063	
25,72125	25,87235	18,4463	24,37435	24,31615	23,95695	23,59065	20,1366	<b>AVG</b>
1,840245	0,378939	0,088883	0,147856	0,0784181	0,006435	0,209374	0,10408612	<b>STDEV</b>

**DÍA 6**

VTM	Agua	EtOH	AVL	PS-V1 (años de edad)	PS-V1 (nuevo lote)	PS-V2	PS-V2.2 (con EtOH)	
29,1988	29,3053	27,4058	37,9226	27,2379	27,165	24,53	22,4887	
28,6799	28,7916	27,0781	40	26,4857	26,7658	24,4418	22,4676	
28,93935	29,04845	27,24195	38,9613	26,8618	26,9654	24,4859	22,47815	<b>AVG</b>
0,366918	0,363241	0,231719	1,468944	0,5318857	0,282277	0,062367	0,01491995	<b>STDEV</b>

**DÍA 12**

VTM	Agua	EtOH	AVL	PS-V1 (años de edad)	PS-V1 (nuevo lote)	PS-V2	PS-V2.2 (con EtOH)	
27,997	28,151	26,9011	40	30,8352	31,0478	25,8926	22,2074	
28,0062	28,2211	26,2139	38,0439	30,4502	30,1935	25,3037	22,0025	
<b>28,0016</b>	<b>28,18605</b>	<b>26,5575</b>	<b>39,02195</b>	<b>30,6427</b>	<b>30,62065</b>	<b>25,59815</b>	<b>22,10495</b>	<b>AVG</b>
0,006505	0,049568	0,485924	1,383172	0,2722361	0,604081	0,416415	0,14488618	<b>STDEV</b>

**DÍA 20**

VTM	Agua	EtOH	AVL	PS-V1 (años de edad)	PS-V1 (nuevo lote)	PS-V2	PS-V2.2 (con EtOH)	
27,9851	28,7713	27,1105		40 30,1844	27,193	25,7407	20,8364	
28,4067	27,7929	27,0105		40 30,2465	27,2274	25,6213	20,2843	
<b>28,1959</b>	<b>28,2821</b>	<b>27,0605</b>		<b>40 30,21545</b>	<b>27,2102</b>	<b>25,681</b>	<b>20,56035</b>	<b>AVG</b>
0,298116	0,691833	0,070711		0 0,0439113	0,024324	0,084429	0,39039365	<b>STDEV</b>

DÍA 30								
VTM	Agua	EtOH	AVL	PS-V1 (años edad)	de PS-V1 (nuevo lote)	PS-V2	PS-V2.2 (con EtOH)	
29,23	31,9168	33,012		40	29,1993	30,2386	23,0589	20,9348
29,9067	31,3252	32,3001		40	38,827	29,6081	22,9662	20,4973
<b>29,56835</b>	<b>31,621</b>	<b>32,65605</b>		<b>40</b>	<b>29,01315</b>	<b>29,92335</b>	<b>23,01255</b>	<b>20,71605</b> <b>AVG</b>
VTM	Agua	EtOH	AVL	PS-V1 (años edad)	de PS-V1 (nuevo lote)	PS-V2	PS-V2.2 (con EtOH)	STDEV
0,478499	0,418324	0,503389	0	0,2632559		0,445831	0,065549	0,30935922

PS-V 1 (años de edad) = PSS de un año de edad (ver. 1).  
PS-V1 (nuevo lote) = PSS reciente (ver. 2).  
PS-V2 = PSS reciente (ver 2) (sin etanol).  
PS-V2.2 (con EtOH) = PSS reciente (ver. 2.2) (es decir, con etanol).

### Ejemplo 10 Disoluciones de almacenamiento que contienen IPC

Tal como se ha indicado en el presente documento, en algunas realizaciones, es deseable incluir una molécula portadora de ácido nucleico y/o una secuencia IPC para ayudar en la preparación, estabilización y cuantificación de los polinucleótidos aislados.

En una realización, los inventores han utilizado una molécula de ARN monocatenario que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 2 que contiene la siguiente secuencia:

5'-CCC UUAGCAGCACGUCAGUCAGGGAGCCAAUUUCAGAGCUCAGCGAGACA

GUUUUAUAGGCAUGGCAUCAGCUACGCUCGCUCAGGCUAGUCAGGUCCAAAGUU

UCAGUU-3' (SEC ID N°: 2).

Los datos presentados en la Fig. 15A a Fig. 19 demuestran la eficacia de tales moléculas de IPC en la estabilización de la población aislada de polinucleótidos, y actuando como una secuencia de control que se puede ensayar. En particular, la Fig. 15A y la Fig. 15B ilustran la amplificación mediante PCR de un ADN monocatenario mediante un ensayo específico para la detección de IPC. Análogamente, la Fig. 16A y la Fig. 16B ilustran una amplificación similar mediante qRT-PCR del ARNss de 130 nt.

Los datos de la Fig. 17 demuestran que un PSS que contiene un ARN sintético potenció la conservación de un ARN inactivado de un patógeno diana. En dicho estudio, un molde de ARN inactivado de gripe A se añadió a un espécimen humano procedente de lavado nasal, y a continuación se almacenó en PSS que bien contenía o bien carecía del ARN sintético. Los resultados demuestran que la presencia del ARN sintético facilitó la extracción inicial, y la conservación a largo plazo de la muestra diana.

Análogamente, los datos de la Fig. 18 demuestran que la estabilidad de una disolución de PrimeStore™ quedó potenciada por la adición del ARN portador sintético. En este estudio, el virus de la gripe A completo se almacenó en PSS que bien contenía o bien carecía del ARN sintético. Los resultados demuestran que la presencia del ARN sintético potenció la extracción inicial, y la conservación a largo plazo del polinucleótido diana.

Finalmente, los datos de la Fig. 19 demuestran la estabilidad del ARN sintético a temperatura ambiente y a temperatura del cuerpo humano (37°C). En este estudio, la molécula portadora de ARN sintético se añadió a PSS, y se almacenó durante dos semanas a cualquier temperatura. La estabilidad del ARN se midió mediante qRT-PCR. El ARN portados sintético fue estable tanto a temperatura ambiente como a 37°C durante al menos dos semanas sin un declive significativo en los valores de CT.

Es importante resaltar que los IPC útiles en la práctica de la presente invención no necesitan incluir una de las secuencias a modo de ejemplo descritas en el presente documento y los IPC ni siquiera necesitan ser sustancialmente homólogos de cualquiera de las secuencias de IPC incluidas en el presente documento. Para ilustrar este punto, las siguientes secuencias representan variantes de la SEC ID N°: 2 que son también funcionales como portadoras de ARN/IPC, a pesar de mostrar degeneración de la secuencia:

5'-CUUAGCAGCACGUCAGUCAGGGAGCCAAUUCAGAGCUCAGCGAGACAGUU  
UAUAGCAUGGCAUCAGCUACGCUCGCUCAGGCUAGUCAGGUCCAAGUUUCAGU-  
3' (SEC ID N°: 3) .

5'-UUAGCAGCACGUCAGUCAGGGAGCCAAUCAGAGCUCAGCGAGACAGUUUAU  
AGGCAUGGCAUCAGCUACGCUCGCUCAGGCUAGUCAGGUCCAAGUUUCA-3'  
(SEC ID N°: 4) .

5'-CCUAGCAGCACGUCAGUCAGGGAGCCAUUCAGAGCUCAGCGAGACAGUUA  
UAGGCAUGGCAUCAGCUACGCUCGCUCAGGCUAGUCAGGUCCAAGUUCAG-3'  
(SEC ID N°: 5) .

5'-AGCAGCACGUCAGUCAGGGAGCCAAUUCAGAGCUCAGCGAGACAGUUAU  
UAGGCAUGCAUCAGCUACGCUCGCUCAGCCUAGUCACGUCCAUGUAUCAGU-3'  
(SEC ID N°: 6) .

5'-CUAGCAGCAGUCAGCAGGGAGCCAAUUCAGAUCAGCGAGACAGUUUAUA  
GCCGCAUGCCAUCAGCUACGCUCGCUCAGCUAGUCAGUCAAGUUUUCAGU-3'  
(SEC ID N°: 7) .

5'-UAGCAGCACGUCAGUCAGGGAGCCAAUUCAGAGCUCAGCGAGACAGUUAG  
GCAUGCCAUCAACUACGCUCGCUCAGCCUAGUCACGUCCAAGUUCAGAA-3'  
(SEC ID N°: 8) .

5'-CCUAGCAGCACGUCGUCAGGAGCCAAUUCAGAGCUCAGGAGACAGUUUAU  
AGCAUGCAUCAGCUAGCUCGCUCAGCUAGUCAGUCAAGUUCAGUU-3'  
(SEC ID N°: 9) .

5'-CUUACGCAGCACCGGUCAGUAUUCGCGGAGCCUAUUCAGAGCUCAGCGAG  
ACAGUUUAUAGCAUGCAUCAGCUACCCUCGCUCAGGCUGUCAGGUCAGUUCGAUU-  
3' (SEC ID N°: 10) .

5'-UAGCAGCACGUCAGUCAGAGCAUCAGAGCUCAGCGAGACAGAAUAAAAGC  
CCAUGCAUCAGCUGCUCAGCUAGUCAGUCCAAGUCCAGCU-3' (SEC ID N°: 11) .

5'-CCCUUAGCAGCACGUCAGUCAGGGAGCCAAUUCAGAGCUCAGCAGUUUAU  
AGGCAUGGCAUCAGCUACGCUCGCAGUAGUCAGGUCCAAGUUCAGU-3'  
(SEC ID N°: 12) .

5'-CAGCACGUCAGUCAGAGCAUCAGAGCUCAGCGAGACAGUAUAGGCAUGCA  
UCAGCACGCUCUCAGGCUAGUCAGCUCGAAAGUCAGAAU-3' (SEC ID N°: 13) .

**EJEMPLO 11 – Transcripción *in vitro* de ARNss en secuencias de IPC**

5 Como se ha indicado anteriormente, los IPC de la invención pueden sintetizarse químicamente de forma directa por métodos convencionales, o alternativamente, preparados con tecnología de ADN recombinante. El presente ejemplo proporciona un ejemplo de este último método, e ilustra la preparación de un amplicón de ADNds mediante PCR y ensayos de transcripción de ARN *in vitro*. Usando estas técnicas recombinantes, se produce un oligonucleótido para añadir a un PSS como IPC estable que actúa como normalizador en una qPCR de las secuencias específicas de patógenos. La secuencia de 141 nucleótidos se representa de 5' a 3' y muestra: 1) el sitio de inicio de la transcripción del ARN T7 (subrayado simple), 2) los cebadores internos directo e inverso (subrayado doble), y 3) secuencia de la sonda interna en tiempo real (negrita). El ARN se sintetiza mediante amplificación del ARN usando los cebadores T7 directo (subrayado simple) e IPC inverso (subrayado doble), y se transcribió *in vitro* usando el sitio de inicio de transcripción Green T7. El polímero de ARN monocatenario resultante tiene una longitud de 130 nt, y la secuencia de IPC se ubica (unida a los cebadores directo e inverso) dentro del transcrito de ARN.

5'-ATCGTATTAATACGACTCACTATAGGGAATCGTCGTGCAGTCAGTCCCTCGGTT  
AAAGTCTCGAGTCGCTCTGTCAAAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCC  
GATCAGTCCAGGTTTCAAAGTCAAATGACTA-3' (SEC ID N°: 1) .

20 Las especificaciones de la secuencia de ADN ilustrativa utiliza en este estudio son las siguientes: el número total de nucleótidos de ADN es 141, mientras que el número total de nucleótidos de ARN es 130.

%A = 26,95 (38 nucleótidos)  
%G = 22,70 (32 nucleótidos)  
%T = 26,24 (37 nucleótidos)  
%C = 24,11 (34 nucleótidos)

Contenido G+C:

%A+T = 53,19 (75 nucleótidos)  
%C+G = 46,81 (66 nucleótidos)

Recuento de bases: 38 (A), 34 (C), 32 (G), y 37 (T).

35 Las secuencias de los cebadores y de la sonda para el ensayo de IPC a modo de ejemplo se ubican dentro del polímero de ADN/ARN sintético (mostrado a continuación). La amplificación resultante tiene una longitud de 100 pb. Los cebadores y la sonda para el ensayo fueron diseñados para operar usando un protocolo de termociclado en dos pasos compuesto por un ciclo a 50°C durante 20 min y a 95°C durante 5 min para la transcripción y la activación del inicio caliente, respectivamente. Esto va seguido a continuación por 40 ciclos de 95°C durante 15 s y a 60°C durante 30 s.

40 Cebador directo: 5'-GTGCAGTCAGTCCCTCGGTTA-3' (SEC ID N°: 24).  
Cebador inverso: 5'-TTGACTTTGAAACCTGGACTGATC-3' (SEC ID N°: 25).  
Sonda: 5'-(FAM)-AAATATCCGTACCGTAGTCG-(MGB)-3' (SEC ID N°: 26).

**TABLA 12**

**Panel de ácidos nucleicos usados para evaluar la reactividad cruzada en un ensayo QPCR de IPC**

Virus	Bacteria	Otro
Gripe A (H3)	<i>S. pyogenes</i>	ADN total humano
Gripe A (H1)	<i>S. aureus</i>	ARN total humano
Gripe B	<i>B. pertussis</i>	
Paragripe 1,2,3,4	<i>S. pneumoniae</i>	
CMV (HHV5)	<i>N. gonorrhoeae</i>	
Herpes (HHV1)	<i>H. influenzae</i> B	
Adenovirus 4,7	<i>E. coli</i>	

Panel de ácidos nucleicos usados para evaluar la reactividad cruzada en un ensayo QPCR de IPC		
Virus	Bacteria	Otro
Echovirus		
RSV		
Enterovirus		

Como se ha indicado anteriormente, es deseable formular una secuencia de IPC que sea a la vez no genómica, que no se hibride de forma significativa con un genoma de mamífero o con el genoma de la especie del patógeno de interés.

5 Con este fin, el IPC producido *in vitro* mediante amplificación por PCR de la SEC ID N°: 1, se cribó contra un panel de secuencias genómicas totales procedentes de un número de especies víricas y bacterianas, así como ARN y ADN total humano. La Tabla 12 lista las especies cribadas; ninguna se hibrida de forma cruzada con la secuencia de IPC que indica su deseabilidad como secuencia de control "sin sentido" que carece de homología significativa con respecto a cualquiera de los organismos ensayados.

15 Como se ha indicado anteriormente, los IPC de la presente invención no necesitan prepararse a partir del amplicón de ADN ilustrativo divulgado en el presente documento como SEC ID N°: 1, Los ejemplos adicionales de secuencias de ADN útiles en la preparación *in vitro* del de las moléculas portadoras de ARN incluyen, sin limitación, una o más de las siguientes secuencias. En cada caso, el sitio de transcripción de la polimerasa (aquí, el sitio de transcripción T7) se muestra con el subrayado simple, mientras que las secuencias de los dominios de unión del cebador directo e inverso de la PCR se muestran como doble subrayado. Los dominios de secuencia ilustrativos a los que se unen las sondas moleculares adecuadamente etiquetadas se muestran en **negrita**.

5'-X<sub>n</sub>TATTAATACGACTCACTATAGGGX,GTGCAGTCAGTCCCTCGGTAAAGTC

TCGAGTCGCTCTGTCAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAG

20 TCCAGGTTTCAAAGTCAAX<sub>n</sub>-3' (SEC ID N°: 14) .

donde X es cualquier nucleótido y n es cualquier número entero de 0 a aproximadamente 500,

5'-ATCGTATTAATACGACTCACTATAGGGAATCGTCGTGCAGTCAGTCCCTCGGT

TAAAGTCTCGAGTCGCTCTGTCAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTC

25 CGATCAGTCCAGGTTTCAAAGTCAAATGACTA-3' (SEC ID N°: 15) .

5'-ATCGTATTAATACGACTCACTATAGGGAATCGTCGTGCAGTCAGTCCCTCGGT

TAAAGTCTCGAGTCGCTCTGTCAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGT

CCGATCAGTCCAGGTTTCAAAGTCAAATGACTA-3' (SEC ID N°: 16) .

5'-ATCGTATTAATACGACTCACTATAGGGAATCGTCGTGCAGTCAGTCCCTCGGT

TAAAGTCTCGAGTCGCTCTGTCAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTC

CGATCAGTCCAGGTTTCAAAGTCAAATGACTA-3' (SEC ID N°: 17) .

5'-ATATTAATACGACTCACTATAGGGAGTGCAGTCAGTCCCTCGGTAAAGTCT

CGAGTCGCTCTGTCAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAGT

30 CCAGGTTTCAAAGTCAAAT-3' (SEC ID N°: 18) .

5'-ATATTAATACGACTCACTATAGGGAGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTAAAGTCT  
CGAGTCGCTCTGTCAAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAG  
TCCAGGTTTCAAAGTCAAAT-3' (SEC ID N°: 19) .

5'-ATATTAATACGACTCACTATAGGGAGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTAAAGTCT  
CGAGTCGCTCTGTCAAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAGT  
CCAGGTTTCAAAGTCAAAT-3' (SEC ID N°: 20) .

5'-TATTAATACGACTCACTATAGGGGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTAAAGTCTCG  
AGTCGCTCTGTCAAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAGTCC  
AGGTTTCAAAGTCAA-3' (SEC ID N°: 21) .

5'-TATTAATACGACTCACTATAGGGGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTAAAGTCTCG  
AGTCGCTCTGTCAAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAGTCC  
AGGTTTCAAAGTCAA-3' (SEC ID N°: 22) .

5'-TATTAATACGACTCACTATAGGGGTGCAGTCAGTCCCTCGGTTAAAGTCTCG  
AGTCGCTCTGTCAAAATATCCGTACCGTAGTCGATGCGAGCGAGTCCGATCAGTCC  
AGGTTTCAAAGTCAA-3' (SEC ID N°: 23) .

10 Todas las composiciones y métodos divulgados y reivindicados en el presente documento se pueden preparar y  
ejecutar sin una experimentación extensa a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y métodos  
de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones ilustrativas, será evidente para las personas  
normalmente expertas en la materia que se pueden aplicar variaciones a la composición, los métodos y las etapas o  
15 en la secuencia de las etapas del método descrito en el presente documento sin separarse del concepto, espíritu y  
alcance de la invención. Más específicamente, será evidente que algunos agentes que están química y  
fisiológicamente relacionados pueden estar sustituidos por los agentes descritos en el presente documento siempre  
que se consigan resultados iguales o similares.

20

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para recoger y conservar una muestra de ácido nucleico que comprende:

- 5 a) uno o más caótropos;  
 b) uno o más detergentes;  
 c) uno o más agentes reductores;  
 d) uno o más quelantes;  
 e) uno o más tampones y  
 10 f) una molécula aislada de ácido nucleico monocatenario con una longitud de aproximadamente 60 a 500 nucleótidos que comprende un segmento de ácido nucleico que:

- 15 (1) comprende un primer dominio de secuencia que se une específicamente a una sonda marcada con una longitud de aproximadamente 12 a aproximadamente 40 nucleótidos que es específica para la detección del segmento de ácido nucleico;  
 (2) comprende un segundo dominio de secuencia que se une específicamente a un cebador directo de amplificación mediante PCR con una longitud de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos; y  
 (3) comprende un tercer dominio de secuencia que se une específicamente a un cebador inverso de amplificación mediante PCR con una longitud de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nucleótidos;  
 20 donde los dominios de secuencia segundo y tercero están ubicados de forma operable para facilitar una amplificación dirigida mediante PCR de al menos una primera porción del segmento de ácido nucleico a partir de los cebadores directo e inverso en condiciones eficaces para amplificar la al menos primera porción; donde la molécula no se une significativamente en condiciones de hibridación rigurosas a un genoma de un mamífero, o al genoma de una bacteria, hongo o virus que sea patógeno para un mamífero; y  
 25 además donde (a)-(e) están presentes en la composición en una cantidad suficiente para desnaturalizar proteínas, inactivar nucleasas, destruir uno o más patógenos, y la composición no degrada sustancialmente ácidos nucleicos.

2. Una composición como se reivindica en la reivindicación 1, donde la composición no degrada sustancialmente el ácido nucleico cuando se almacena a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 40°C, durante un periodo de aproximadamente 1 día a aproximadamente 90 días.

3. Una composición como se reivindica en la reivindicación 1 o en la reivindicación 2, donde

- 35 a) cada uno del uno o más caótropos está presente en una cantidad de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 6 M;  
 b) cada uno del uno o más detergentes está presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 % (peso/vol.);  
 c) cada uno del uno o más agentes reductores está presente en una cantidad de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 0,3 M;  
 40 d) cada uno del uno o más quelantes está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM; y  
 e) cada uno del uno o más tampones está presente en una cantidad de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1 M.

4. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sonda marcada comprende al menos un primer compuesto de unión al surco menor, una etiqueta radioactiva, una etiqueta luminiscente, una etiqueta quimioluminiscente, una etiqueta fluorescente, una etiqueta enzimática, una etiqueta magnética, o una etiqueta de resonancia de espín; o una combinación de los mismos.

5. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde

- 55 a) el uno o más caótropos comprende tiocianato de guanidina, isocianato de guanidina, clorhidrato de guanidina, o cualquier combinación de los mismos;  
 b) el uno o más detergentes comprende dodecilsulfato de sodio, dodecilsulfato de litio, tauodeoxisulfato de sodio, taurocolato de sodio, glicolato de sodio, desoxicolato de sodio, colato de sodio, alquilbencesosulfonato de sodio, *N*-lauroil sarcosina, o cualquier combinación de los mismos;  
 c) el uno o más agentes reductores comprenden 2-mercaptoetanol, tris(2-carboxietil) fosfina, ditiotreitól, dimetilsulfóxido, o cualquier combinación de los mismos;  
 60 d) el uno o más quelantes comprende ácido etilenglicol tetraacético, ácido hidroxietilendiaminetriacético, ácido dietilentriaminopentaacético, *N,N*-bis(carboximetil)glicina, etilendiaminotetraacético, citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato amoniférrico, citrato de litio, o cualquier combinación de los mismos; o  
 e) el uno o más tampones comprende tris(hidroximetil) aminometano, citrato, ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico, ácido *N,N*-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico, 1,3-bis(tris(hidroximetil)metil amino)propano, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico, ácido 3-(*N*-morfolino) propanosulfónico,

bicarbonato, fosfato, o cualquier combinación de los mismos.

6. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además uno o más de los siguientes:

- 5 g) uno o más tensioactivos seleccionados del grupo constituido por un polímero de silicona, un polisorbato, y cualquier combinación de los mismos;  
 h) uno o más alcoholes de cadena corta seleccionados del grupo constituido por metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, o hexanol, y cualquier combinación de los mismos; y  
 10 i) uno o más agentes desespumantes seleccionados del grupo constituido por un polímero de silicona, un polisorbato, y cualquier combinación de los mismos; y cualquier combinación de los mismos.

7. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que

- 15 a) se ha tamponado a un pH de aproximadamente 6,0 a 7,0;  
 b) está prácticamente exenta de actividad ARNsa o ADNsa; y  
 c) comprende una población de polinucleótidos aislados de origen bacteriano, vírico o fúngico que comprende ARN, ADN, ANP, o cualquier combinación de los mismos.

20 8. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la composición comprende:

- 25 a) tiocianato de guanidina aproximadamente 4 M; citrato de sodio aproximadamente 30 mM; aproximadamente 0,25 % (peso/vol.) de docecilsulfato de sodio; aproximadamente 0,25 % (peso/vol.) de *N*-lauroil sarcosina, sal sódica; (v) 2-mercaptoetanol aproximadamente 0,1 M; y aproximadamente 0,1 % de polímero de silicona (peso/vol.);  
 b) tiocianato de guanidina aproximadamente 3 M; TCEP aproximadamente 1 mM; citrato de sodio aproximadamente 10 mM; aproximadamente 0,5 % de *N*-lauroil sarcosina; aproximadamente 0,0002 % de polímero de silicona; 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS) aproximadamente 100 mM; y EDTA aproximadamente 0,1 mM;  
 30 c) tiocianato de guanidina de aproximadamente 1 M a aproximadamente 4 M; TCEP de aproximadamente 0,5 mM a 10 mM; citrato de sodio de aproximadamente 1 mM a 100 mM; SDS o NLS de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 %; polímero de silicona de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,0001 %, TRIS de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM, APCA, EDTA, EGTA, HEDTA, DTPA, NTA, o citrato de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM; y de aproximadamente 10 % a aproximadamente 25 % de etanol (vol./vol.); o  
 35 d) tiocianato de guanidina aproximadamente 3 M ; TCEP 1 mM ; citrato de sodio aproximadamente 10 mM ; aproximadamente 0,5 % de *N*-lauroil sarcosina, sal sódica; aproximadamente 0,0002 % de un polímero de silicona ; TRIS aproximadamente 100 mM ; aproximadamente EDTA 0,1 mM ; y de aproximadamente 10 % a aproximadamente 25 % de etanol (vol./vol.).  
 40

9. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la población de ácidos nucleicos se recoge y se conserva en un único recipiente de reacción que comprende la composición.

45 10. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra es una muestra biológica de origen clínico, veterinario, epidemiológico, ambiental, forense, o patológico; o donde contiene, o se sospecha que contiene, uno o más polinucleótidos de origen vírico, bacteriano, fúngico o mamífero.

50 11. Una composición como la de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molécula aislada de ácido nucleico monocatenario, comprende al menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia:

5'-

CCCUUAGCAGCACGUCAGUCAGGGAGCCAAUUUCAGAGCUCAGCGAGACA  
 GUUUUAUAGGCAUGGCAUCAGCUACGCUCGCUCAGGCUAGUCAGGUCCAA  
 AGUUUCAGUU-3' (SEC ID N°: 2) .

55 12. Una composición como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso en diagnóstico, tratamiento o terapia de una infección producida por microorganismos, bacterias, hongos o virus, uno o más síntomas de los mismos.

13. Un kit diagnóstico o sistema de recogida de muestra que comprende:

- a) una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11; e
- b) instrucciones para usar la composición en el diagnóstico o tratamiento de una infección por microorganismos.

5

14. Un método para aumentar la eficacia de obtener una población purificada de polinucleótidos procedentes de una muestra biológica sospechosa de contener dichos polinucleótidos, que comprende: poner en contacto la muestra con una composición que comprende la molécula aislada de ácido nucleico monocatenario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en una cantidad y durante un tiempo suficientes para aumentar la eficacia de obtener la población purificada de polinucleótidos procedentes de una muestra biológica.

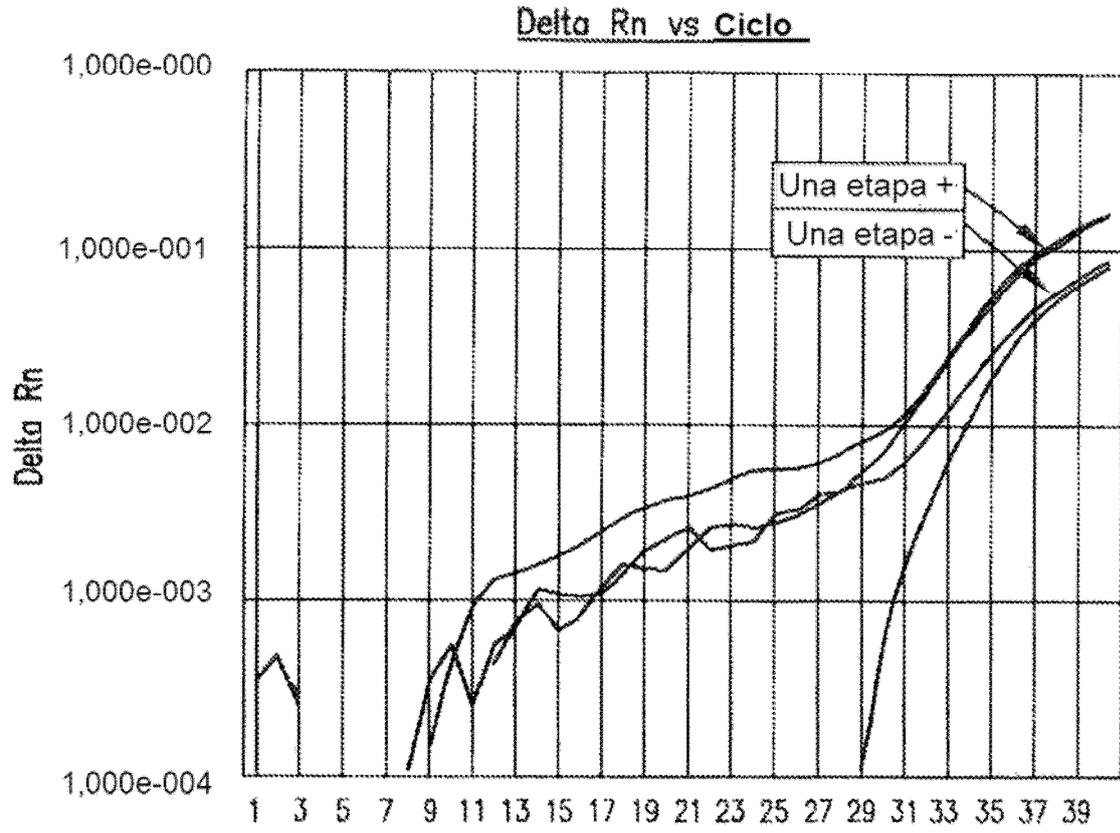
10

15. Un método como se reivindica en la reivindicación 14, donde la integridad de una población de polinucleótidos en la muestra biológica o la fidelidad de al menos una primera secuencia de uno de los polinucleótidos se mantiene al menos sustancialmente cuando la composición que comprende la muestra se almacena a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 40°C (a) durante un periodo de aproximadamente 7 a aproximadamente 14 días; o (b) durante un periodo de aproximadamente 14 a aproximadamente 30 días; y/o donde (a) la composición que comprende la muestra se almacena a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 40°C sustancialmente desde el momento de la recogida al momento de aislar, purificar o caracterizar una población de polinucleótidos de la misma; o (b) menos de aproximadamente 5 % de la población de polinucleótidos contenidos en la muestra se degrada una vez que la composición que comprende la mezcla se almacena a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 40°C durante un periodo de aproximadamente 7 a aproximadamente 30 días; preferentemente donde la composición que comprende la mezcla se almacena a una temperatura de (a) de aproximadamente 10°C a aproximadamente 40°C durante un periodo de aproximadamente 24 a aproximadamente 96 h; o (b) de aproximadamente 10°C a aproximadamente 30°C durante un periodo de aproximadamente 7 días a aproximadamente 30 días.

15

20

25



**FIG. 1**

	Qiagen Viral Mini		Ambion RNaqueous Mini		Ambion AI/NCD MagMax	
	Una etapa -	Una etapa +	Una etapa -	Una etapa +	Una etapa -	Una etapa +
Valor CT Tiempo-real	19,25	19,08	32,83*	30,39*	23,95	21,25
Copias víricas detectadas	$4,7 \times 10^9$	$5,5 \times 10^9$	$2,5 \times 10^5$	$6,2 \times 10^{5*}$	$1,12 \times 10^{10}$	$2,10 \times 10^{10}$

FIG.2

Muestra	Día 1	Día 3	Día 4
Disolución una etapa	23,97	21,37	31,38
Disolución de almacenamiento ARN (Arribion)	25,35	32,70	32,20
Agua	24,39	32,17	32,27

FIG.3

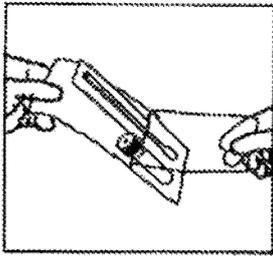


FIG. 4A

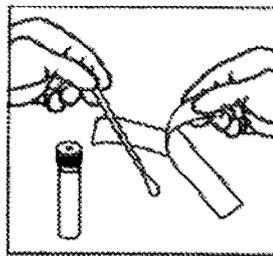


FIG. 4B

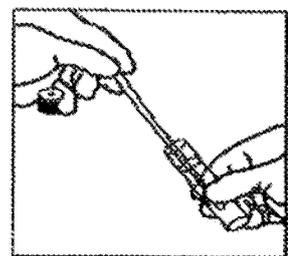


FIG. 4C

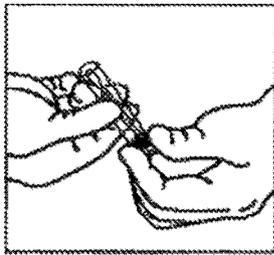


FIG. 4D

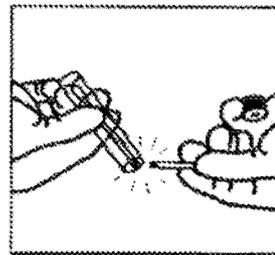


FIG. 4E

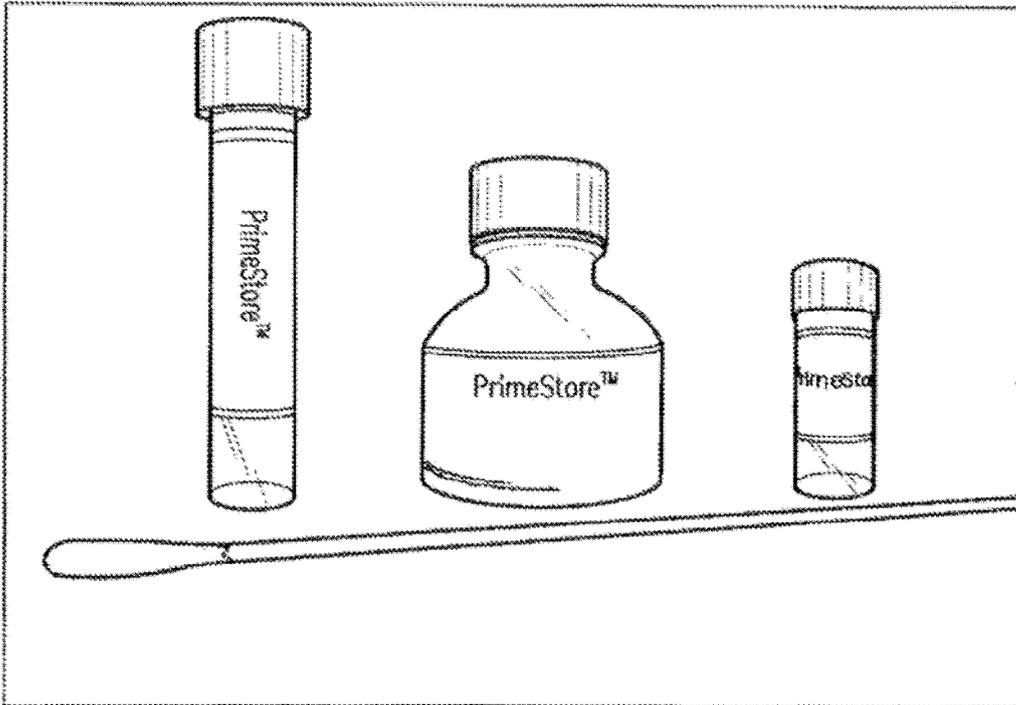


FIG. 5

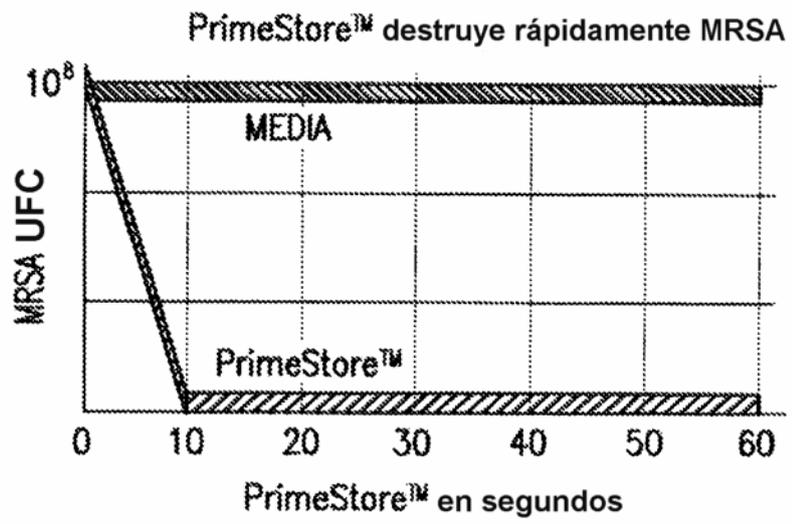


FIG. 6

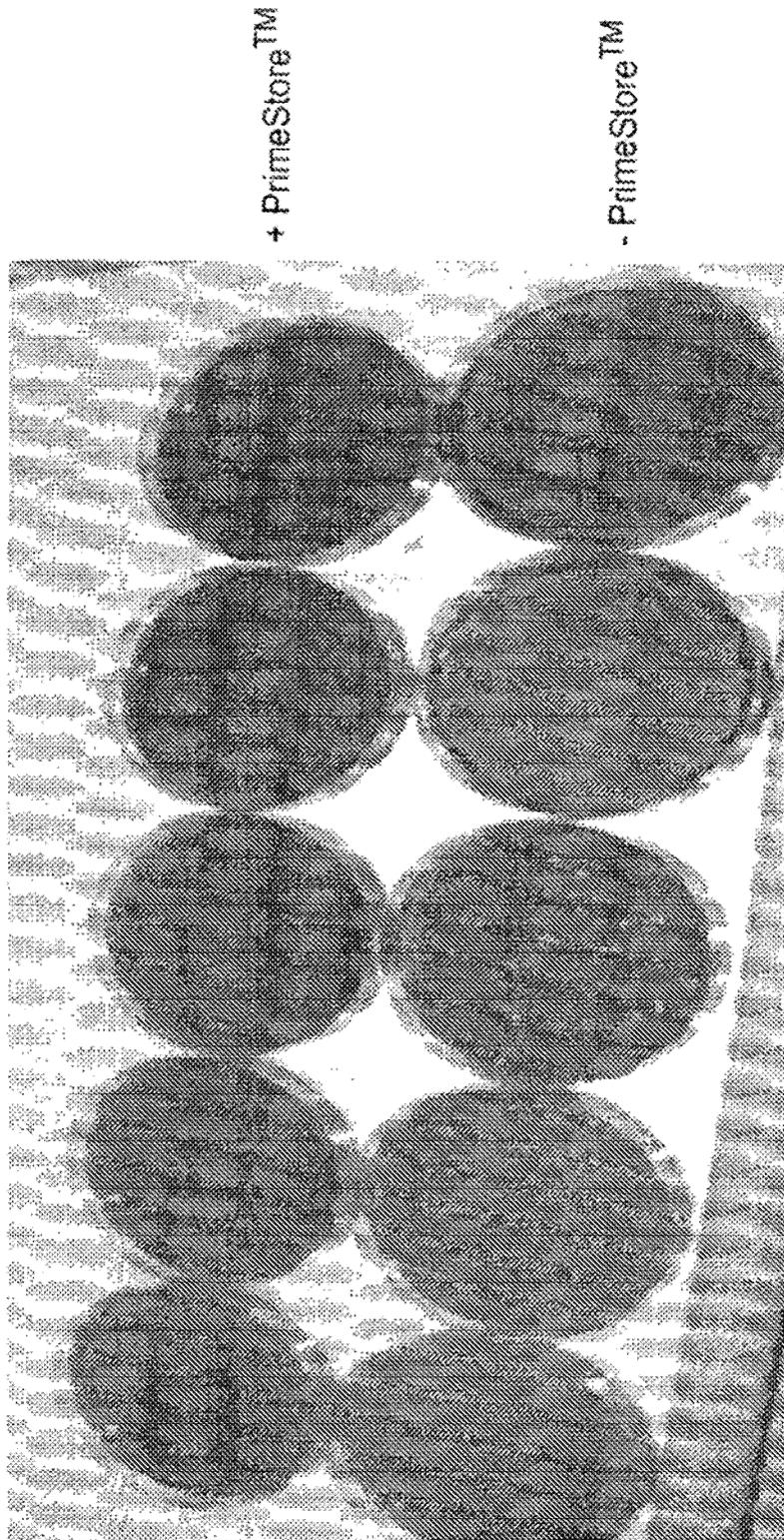


FIG.7A

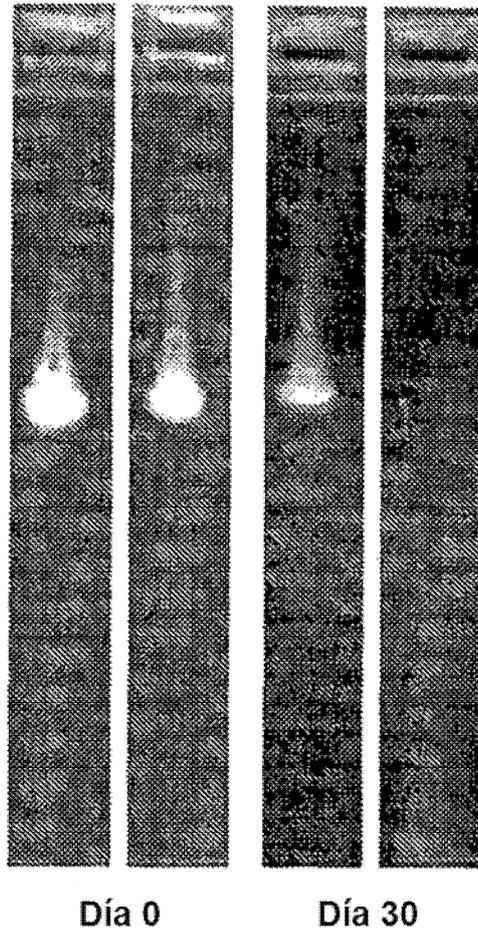


FIG. 7B

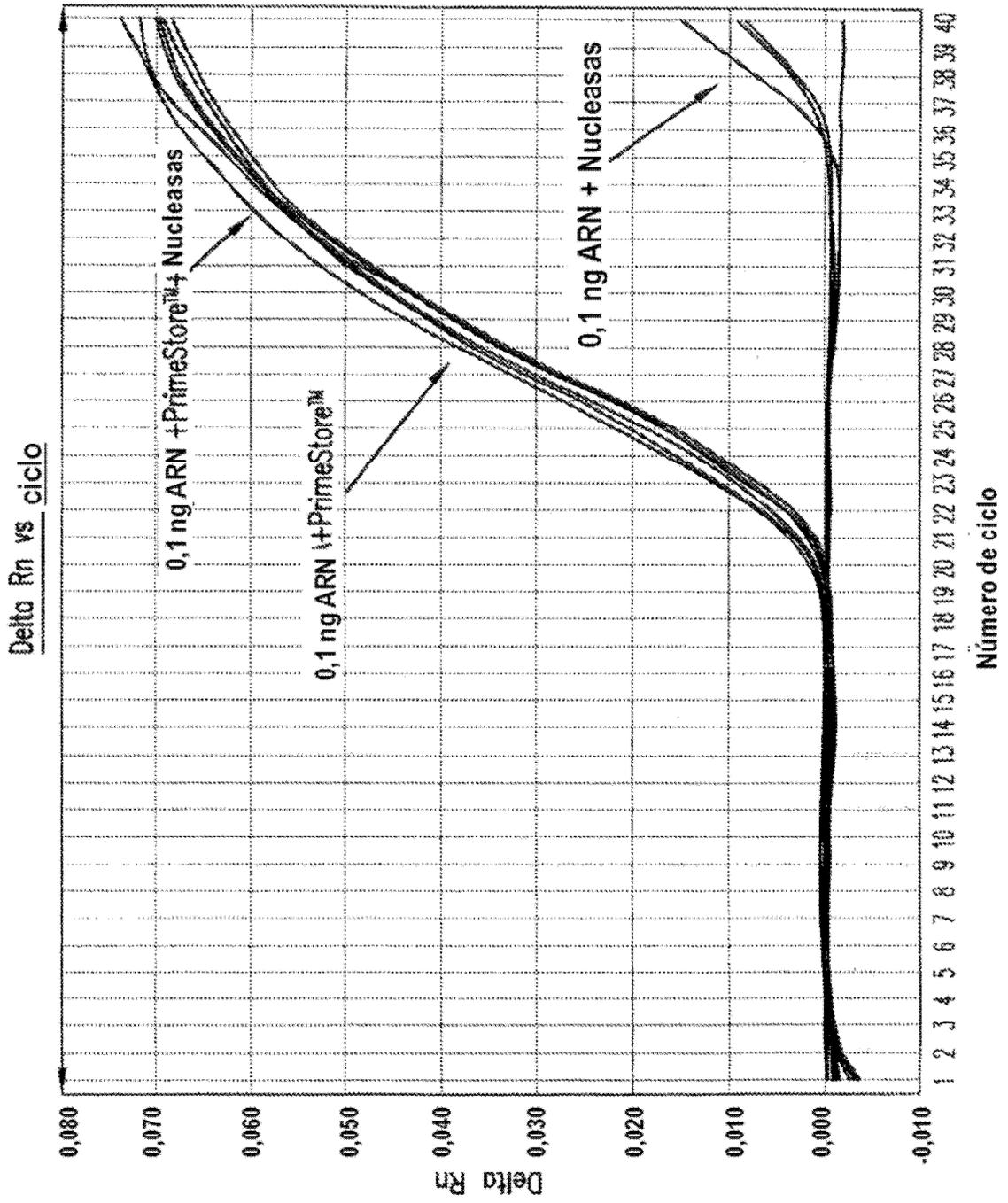


FIG. 8A

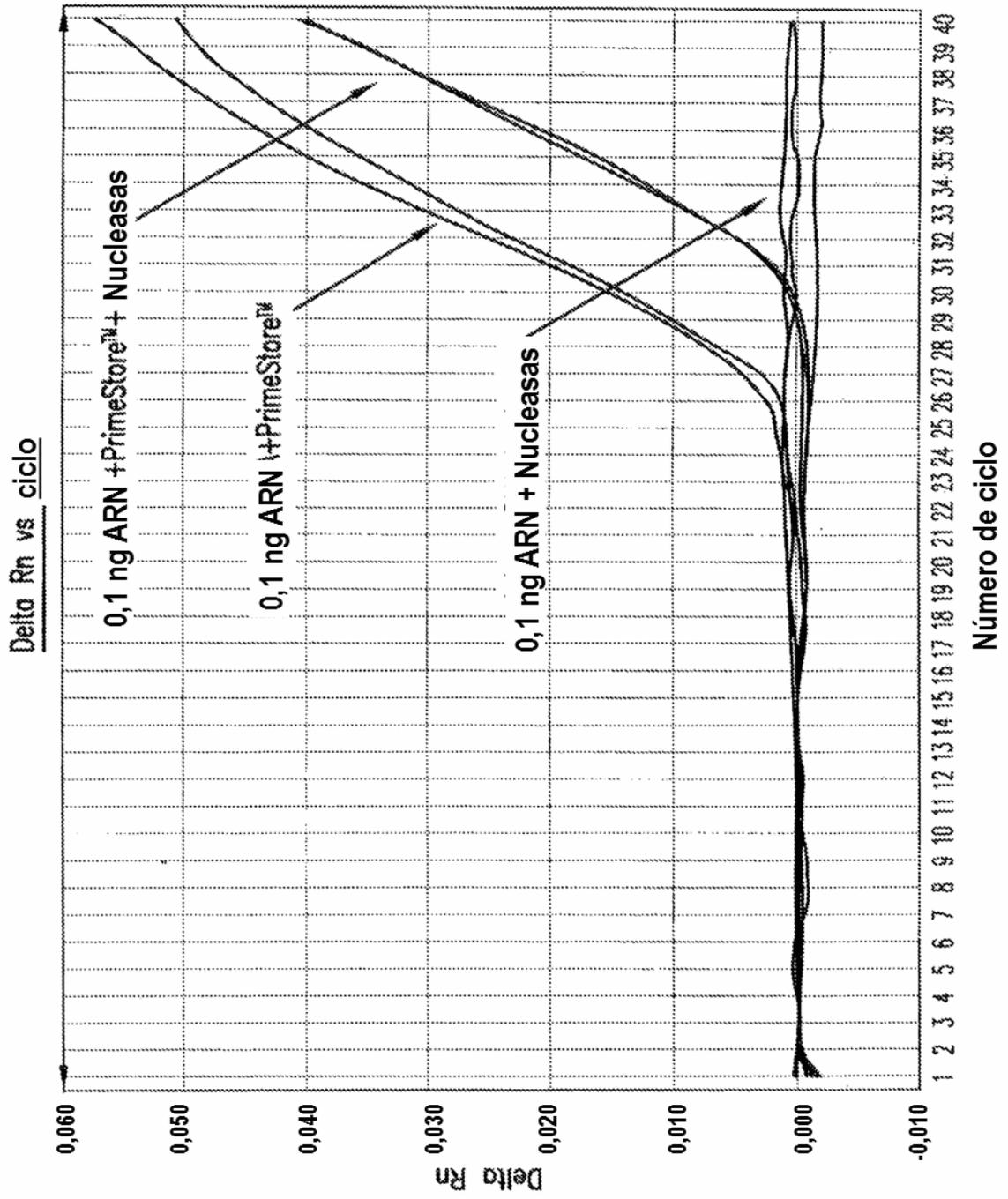


FIG. 8B

Agarosa al 4 % (HR)

1 2 3 4 5 6

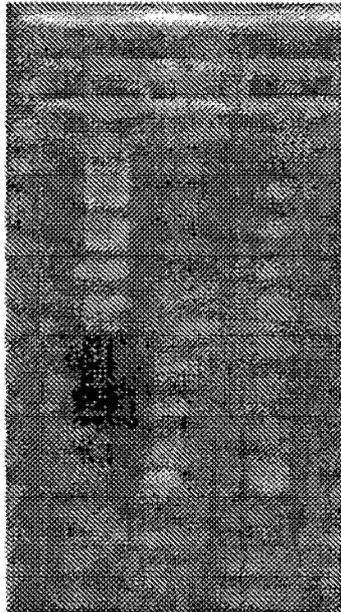


FIG.8C

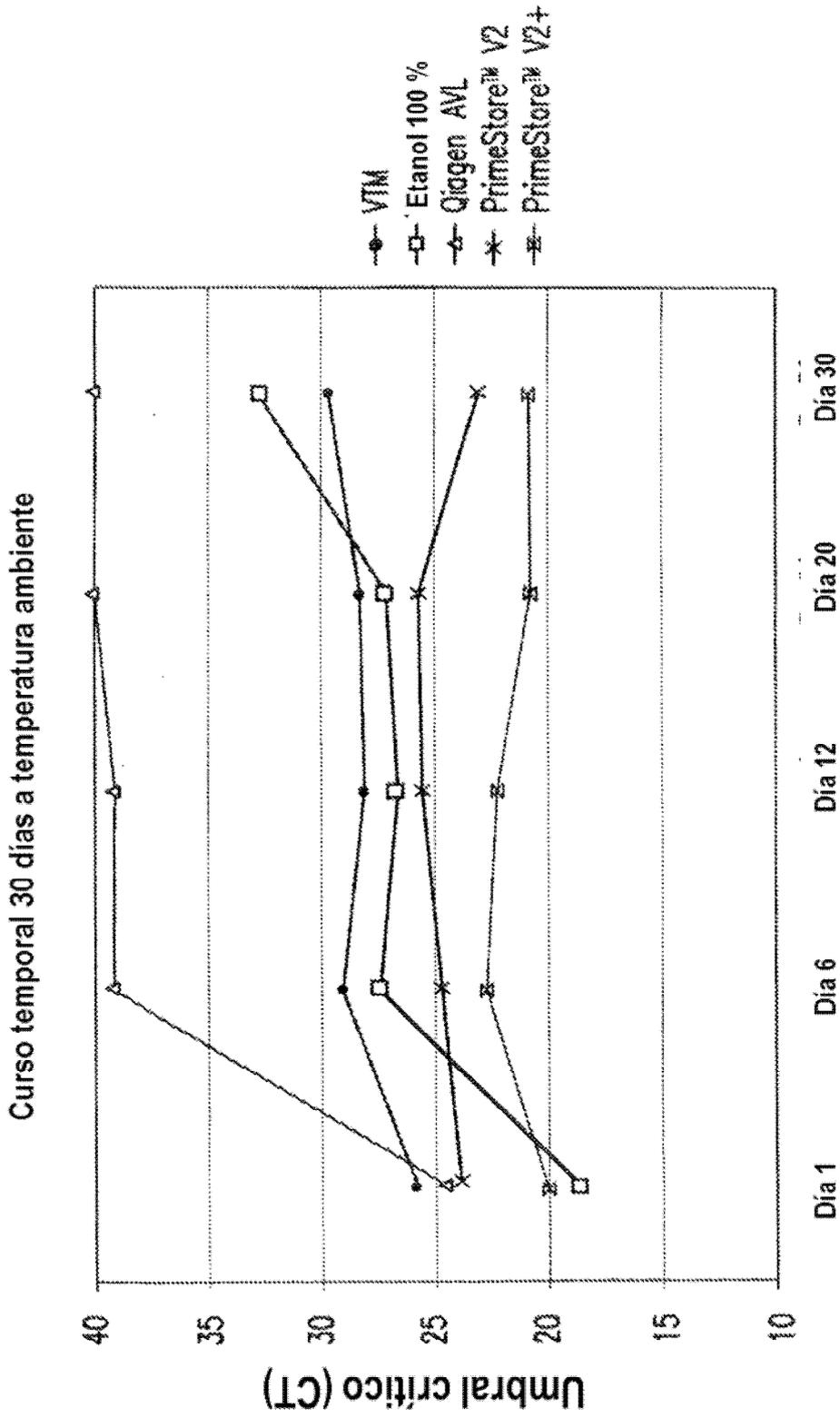


FIG.9

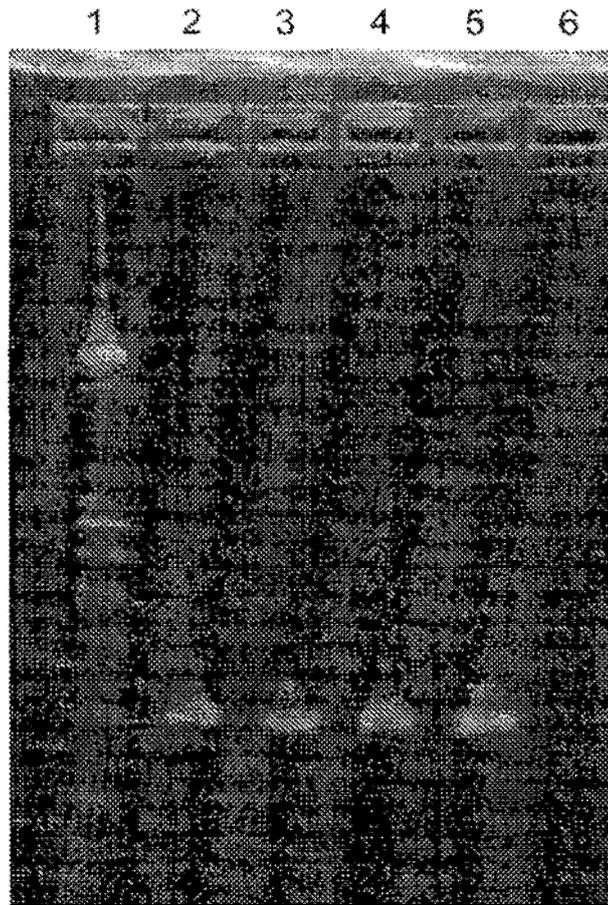


FIG.10

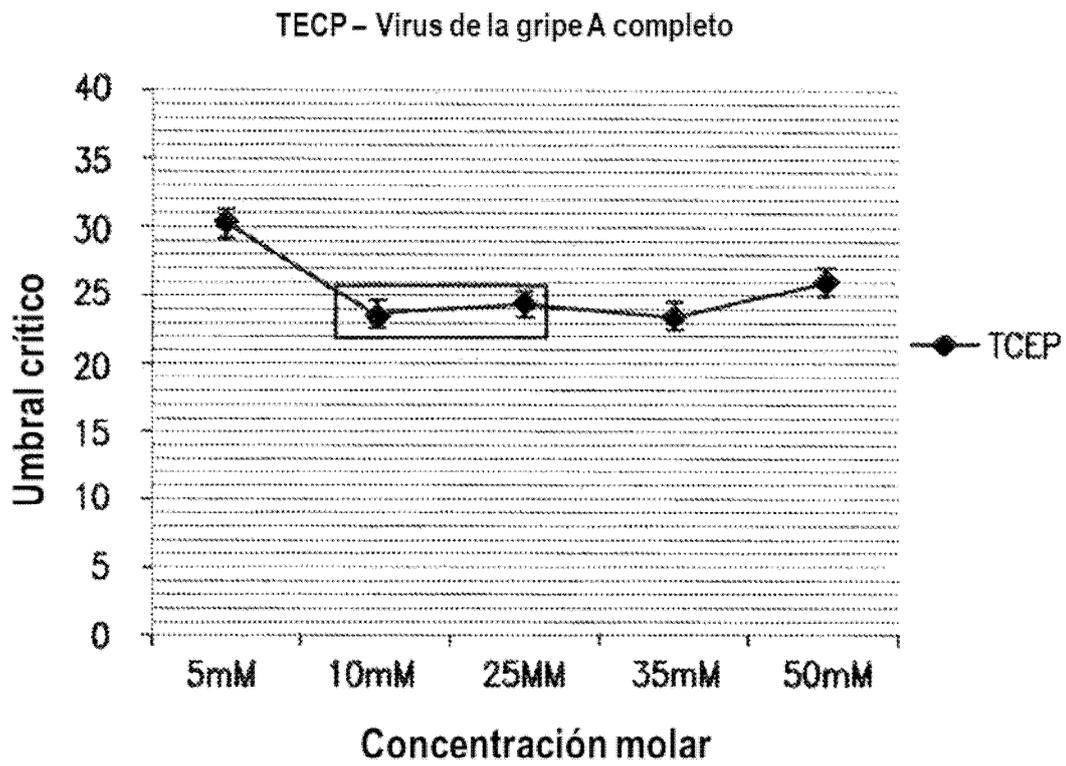


FIG. 11

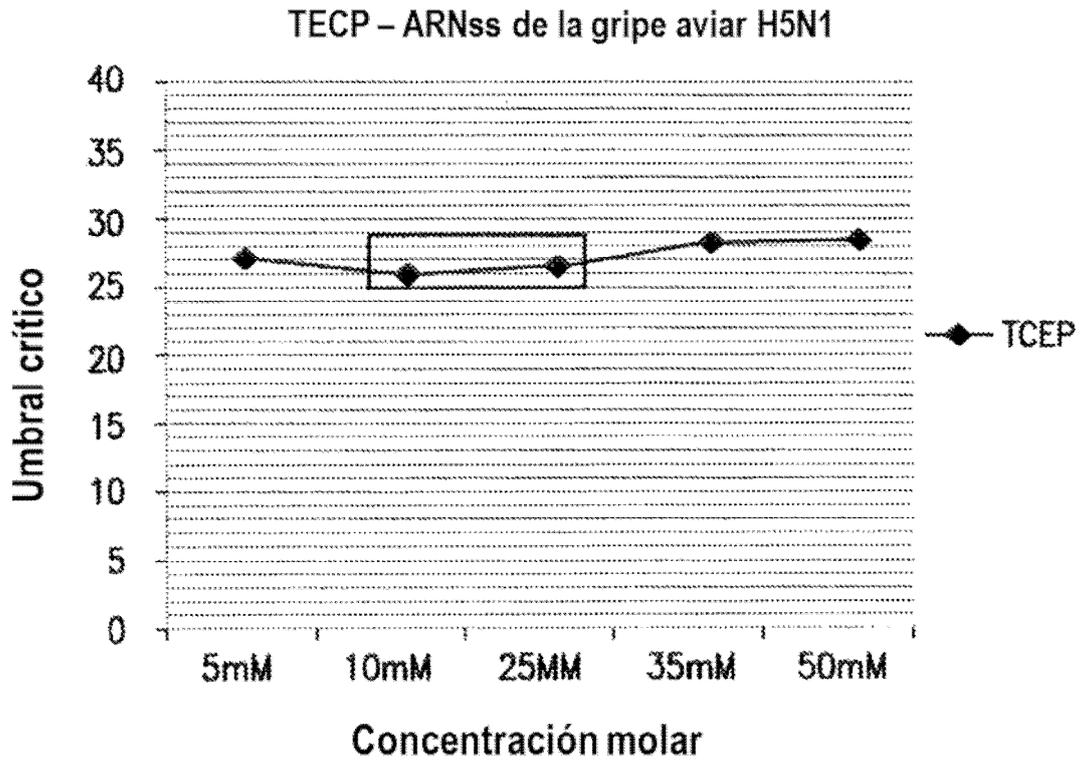


FIG. 12

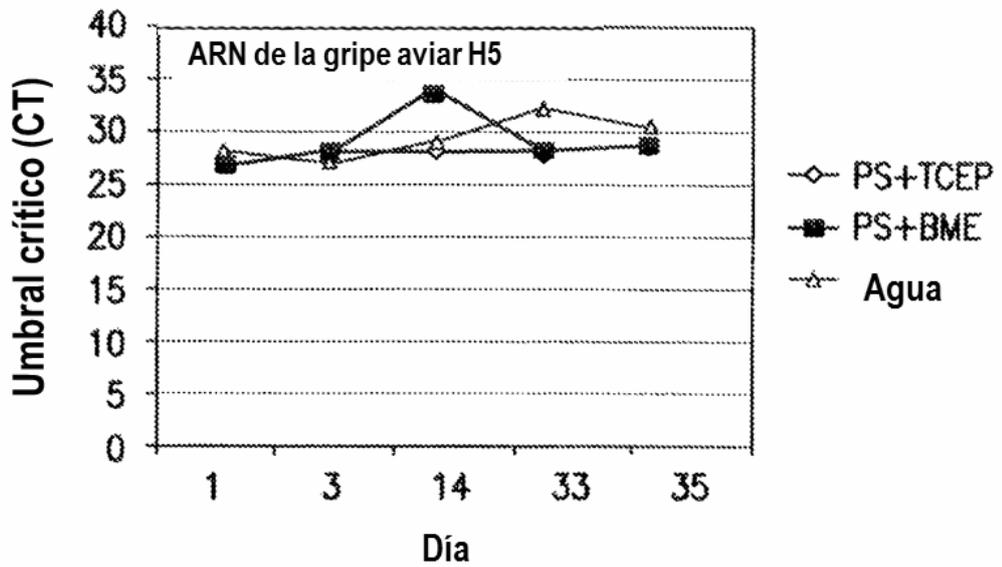


FIG. 13A

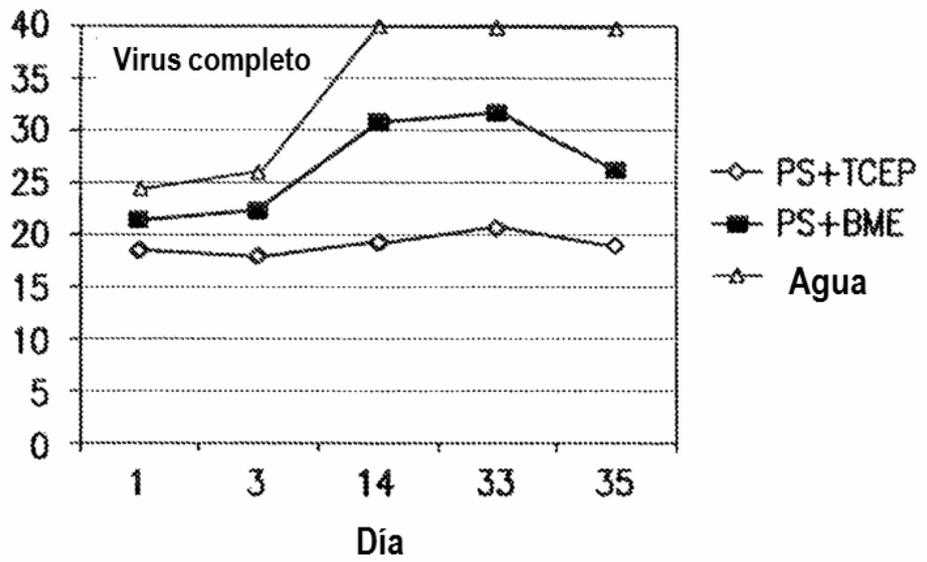


FIG. 13B

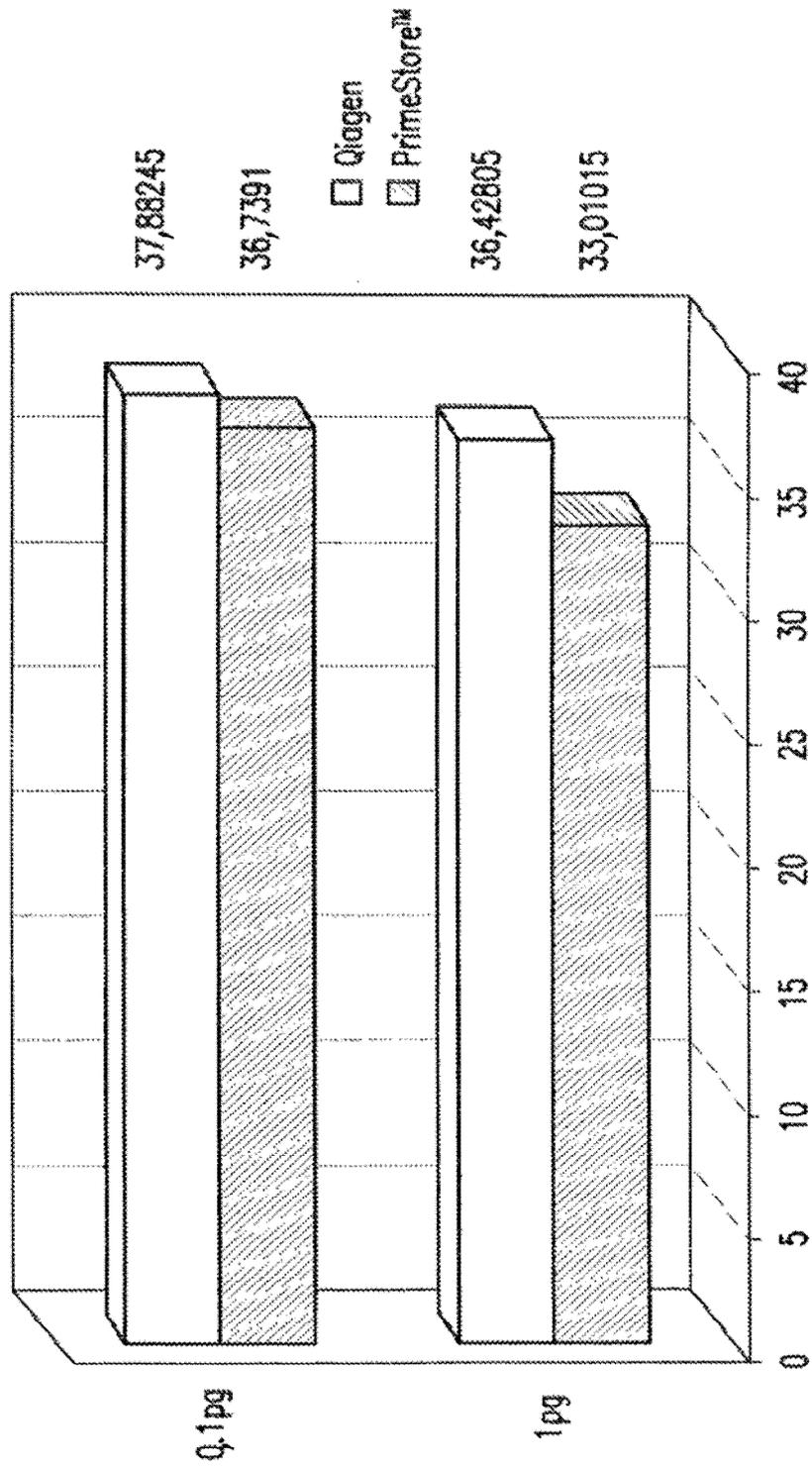


FIG. 14A

	Tubo sanguíneo			
	EDTA	CitratoNa	LiHeparina	NaHeparina
PrimeStore™	33,7804	31,9677	32,5538	33,118
	34,7485	32,0509	32,8927	32,984
AVG:	34,26445	32,0093	32,72325	33,051
	35,3054	33,4051	34,4903	34,6428
Qiagen	34,7485	33,4051	35,0378	35,3937
AVG:	35,02695	33,4051	34,76405	35,01825

FIG. 14B

PrimeStore™- Extracción de sangre		
1pg	0,1pg	
32,7715	36,434	
33,2488	37,0442	
33,01015	36,7391	
0,337502067	0,431476558	
		AVG
		STDEV

Qiagen- Extracción de sangre		
1pg	0,1pg	
35,8461	37,5771	
37,01	38,1878	
36,42805	37,88245	
0,823001583	0,431830111	
		AVG
		STDEV

FIG. 14C

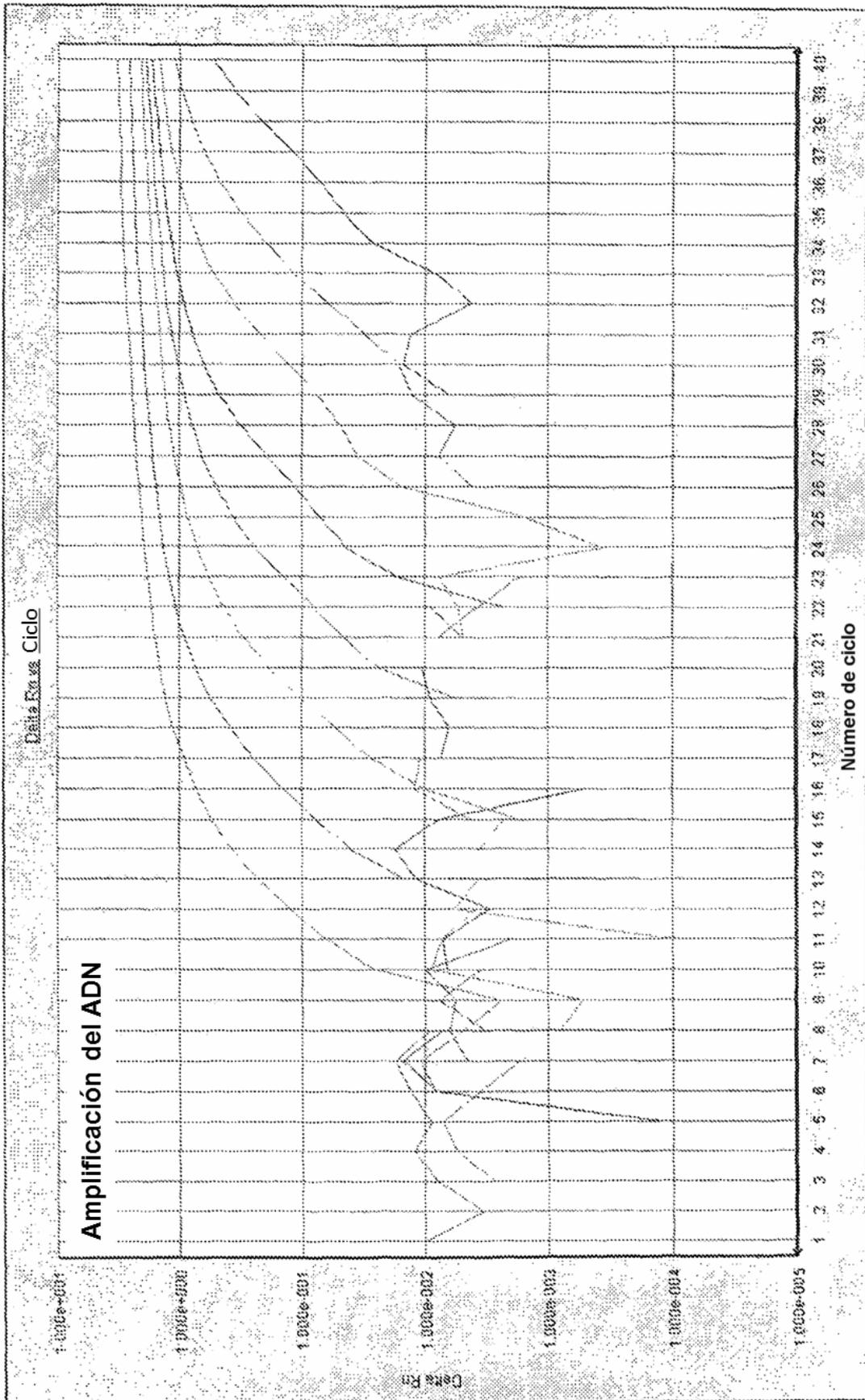


FIG 15a

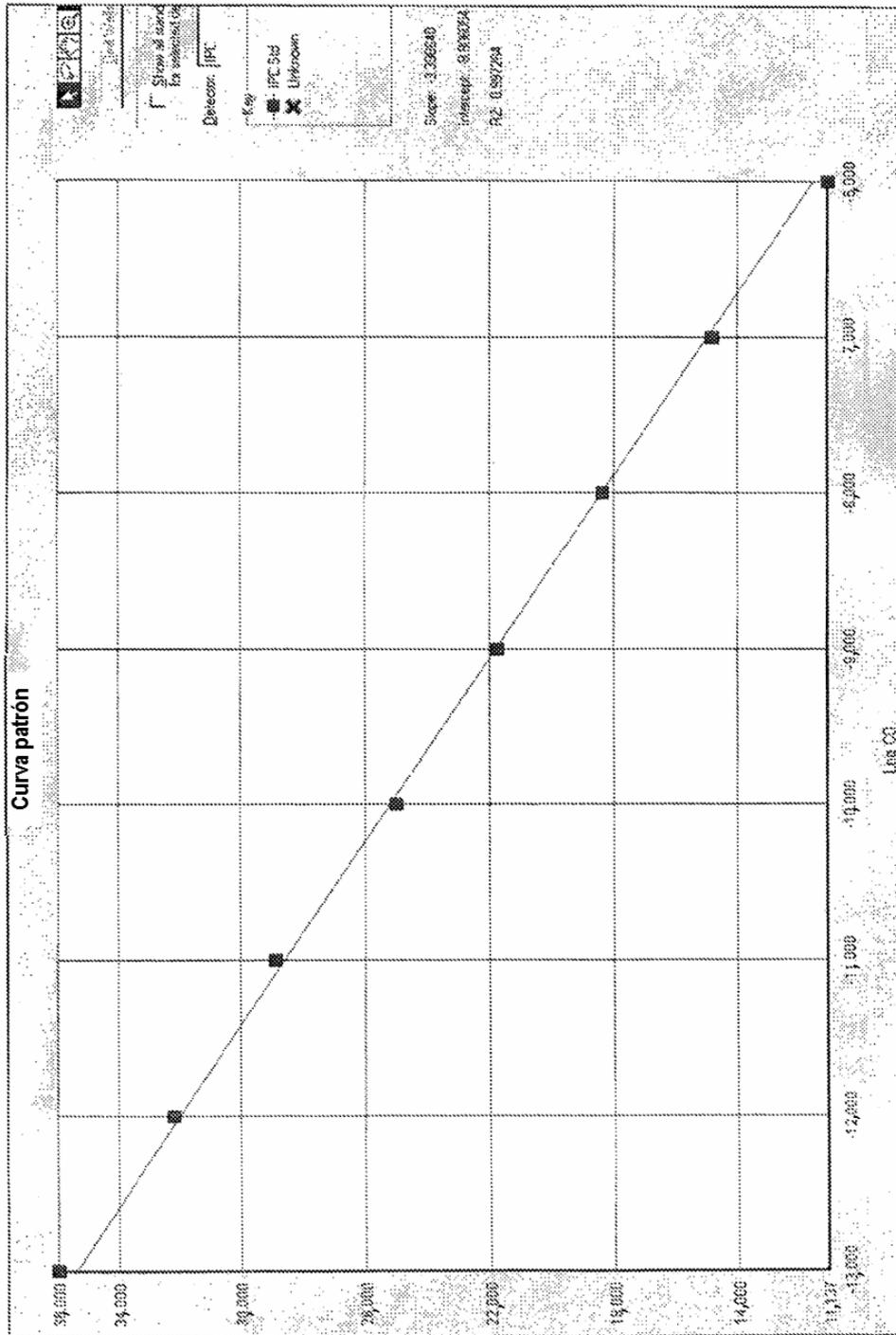


FIG. 15b

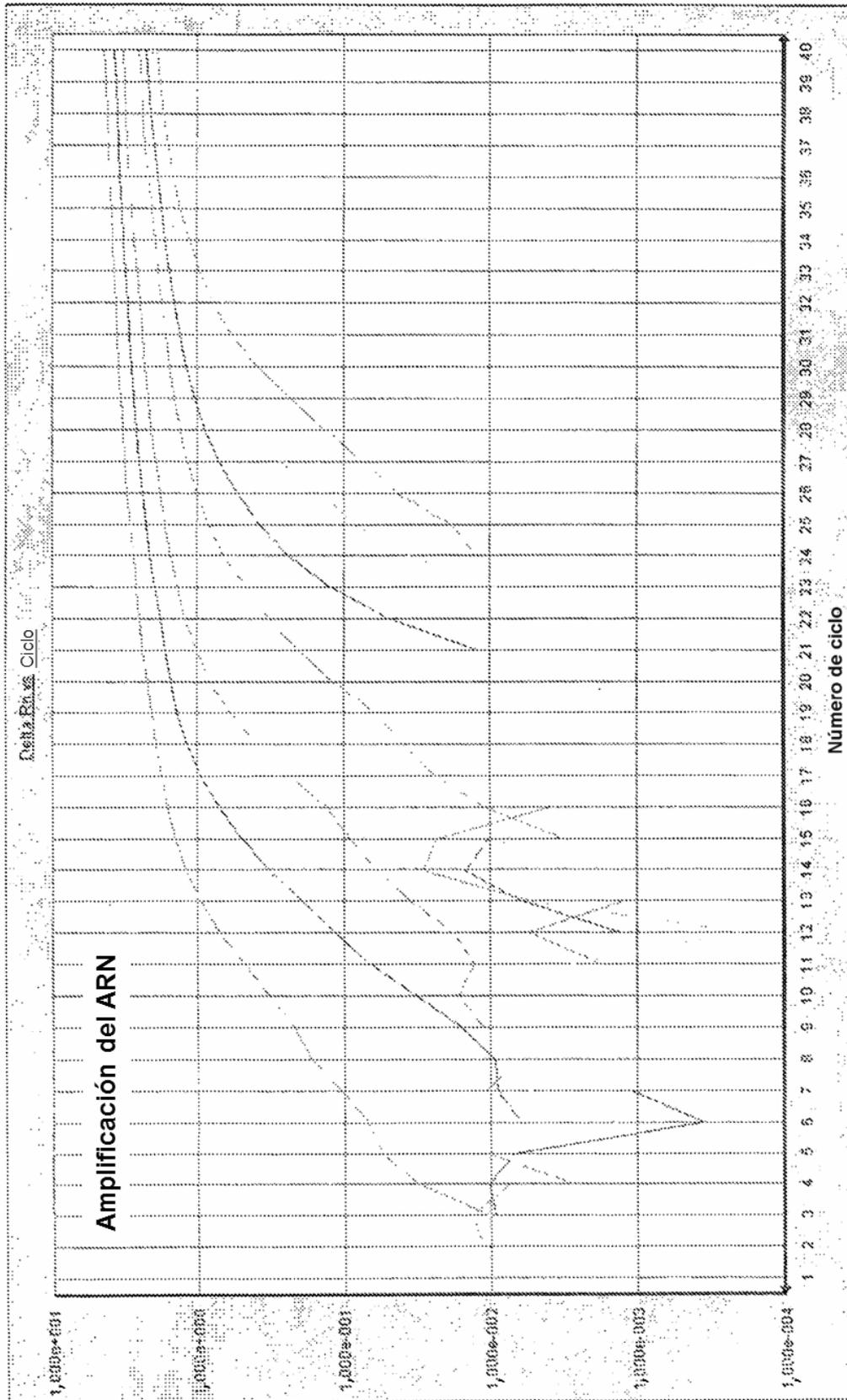


FIG. 16a

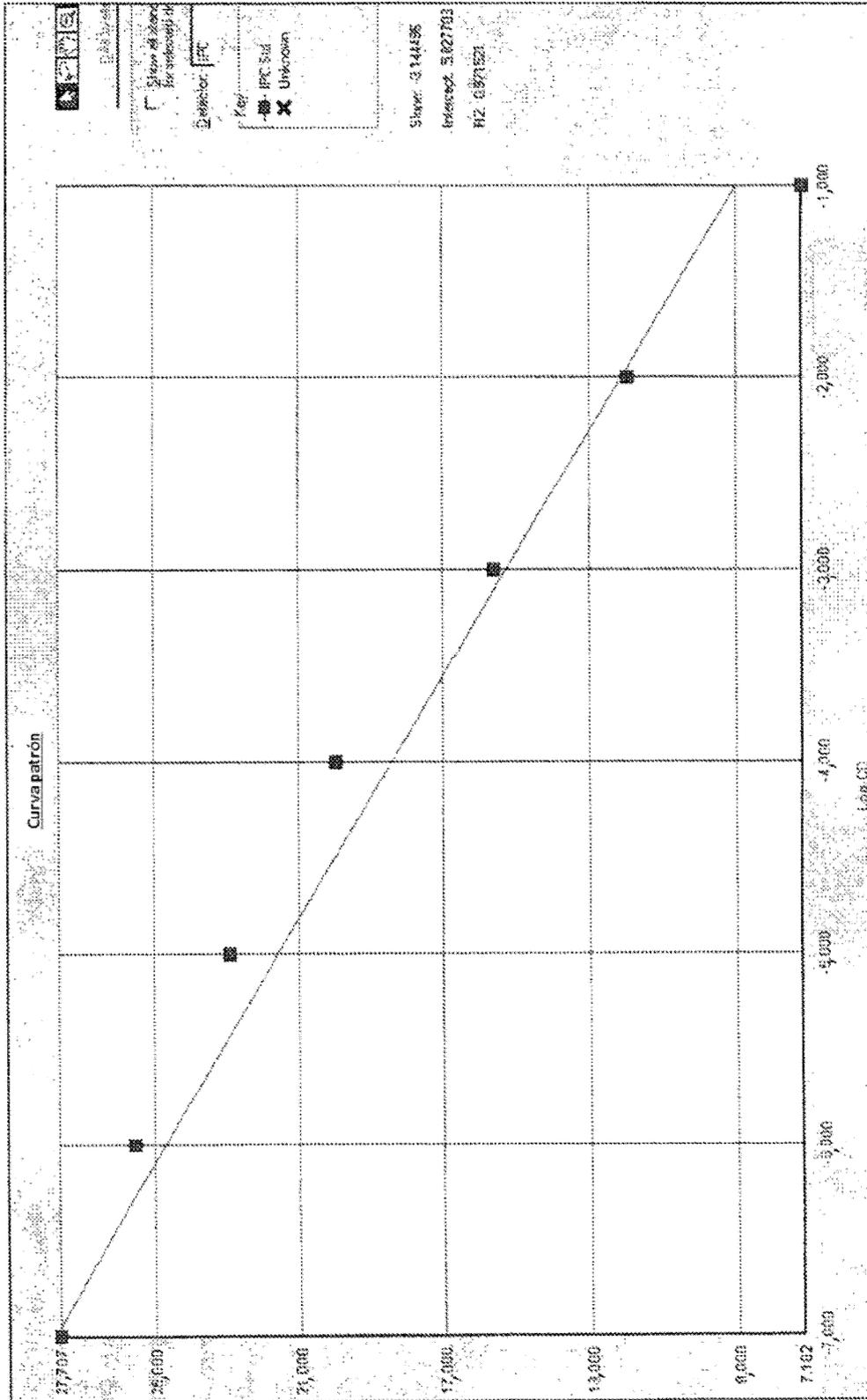
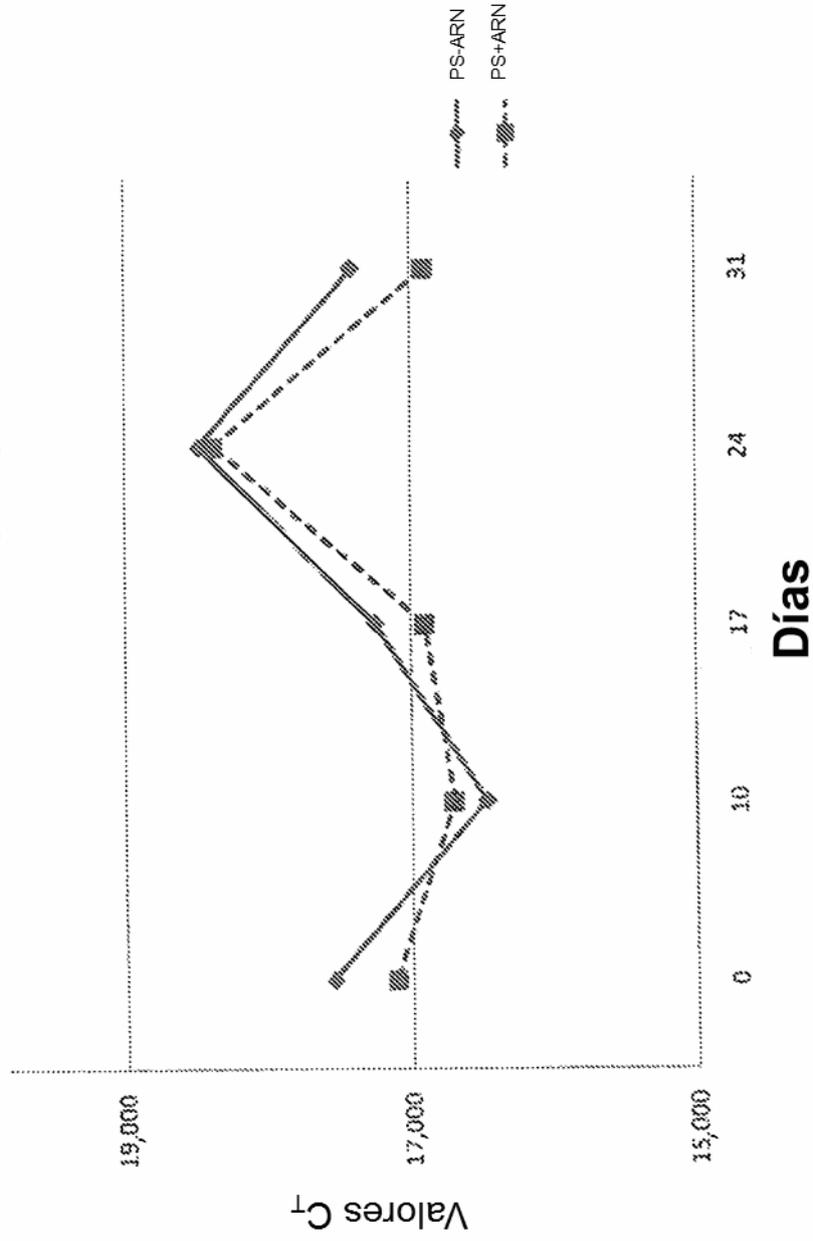


FIG. 16b

**PrimeStore con ARN sintético potencia la conservación  
del ARN inactivado del patógeno diana**



**FIG. 17**

### La estabilidad de PrimeStore se potencia con ARN sintético

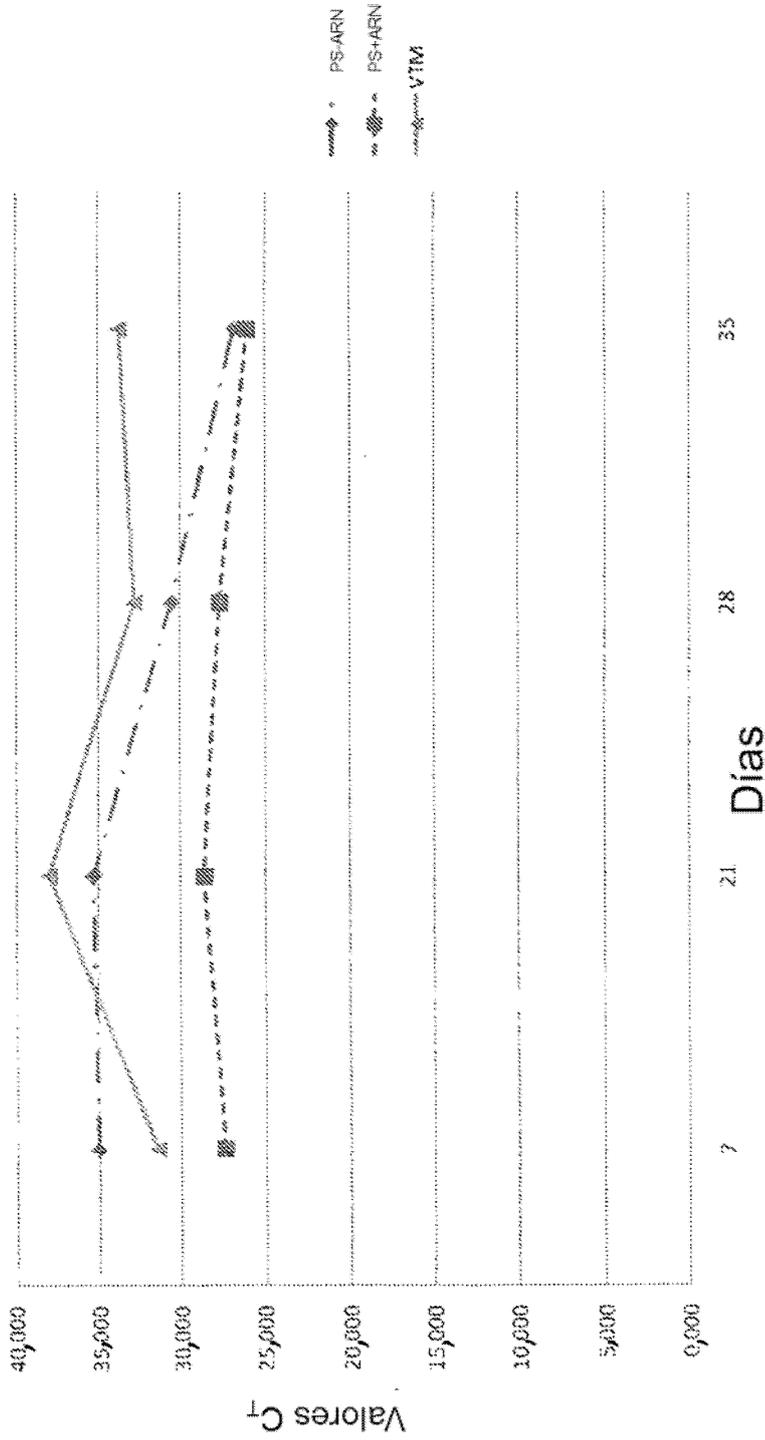


FIG. 18

Estabilidad del ARN a temperatura ambiente y 37° C

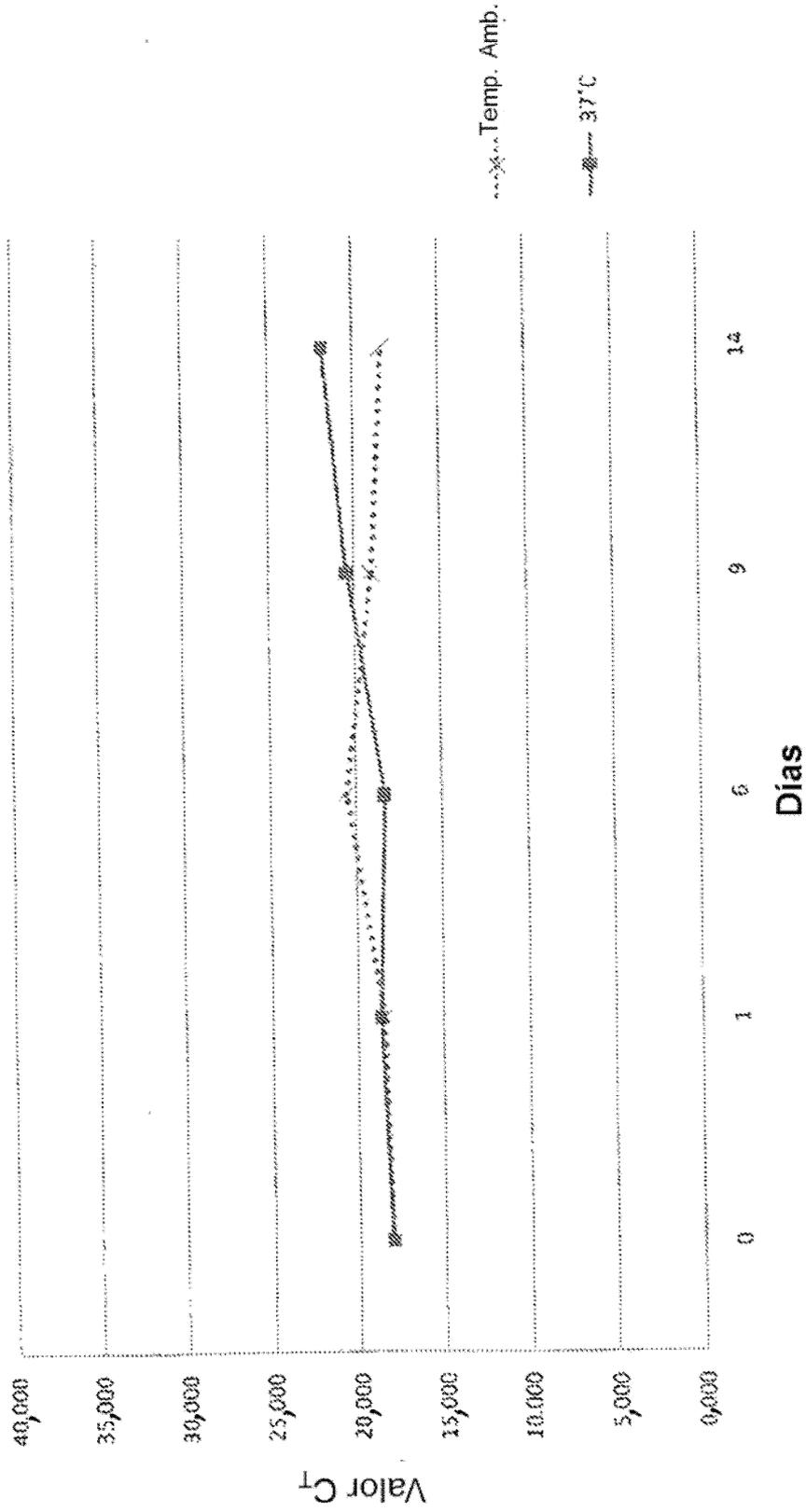


FIG. 19