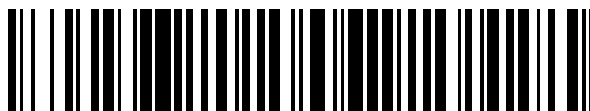


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 858**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2008** **E 12180376 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015** **EP 2535428**

54 Título: **Recogida de muestras biológicas y sistema de transporte y métodos de uso**

30 Prioridad:

01.10.2007 US 976728 P

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

02.12.2015

73 Titular/es:

LONGHORN VACCINES AND DIAGNOSTICS, LLC
(100.0%)

2 Bethesda Metro Center, Suite 910
Bethesda, MD 20814, US

72 Inventor/es:

FISCHER, GERALD y
DAUM, LUKE T

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 552 858 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

Recogida de muestras biológicas y sistema de transporte y métodos de uso

1.1 Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones acuosas para la recogida, el transporte y almacenamiento de una muestra biológica que contiene una población de ácidos nucleicos en un único recipiente de reacción, que posteriormente puede ser purificada y/o analizada utilizando métodos convencionales de biología molecular. En concreto, la invención está dirigida a una composición de un solo paso que a) inactiva los virus o microbios de la muestra, b) lisa las células o tejidos biológicos para liberar los ácidos nucleicos de restos celulares y biomoléculas extrañas, c) protege los ácidos nucleicos frente a la degradación a través de la actividad de la endonucleasa, y d) preserva los ácidos nucleicos para su posterior aislamiento, detección, amplificación y/o análisis molecular. En una aplicación ventajosa, se pueden conseguir estas cuatro funciones en una única composición y en un único recipiente de reacción, y la muestra resultante se puede almacenar a temperatura ambiente durante periodos prolongados sin que se produzca una degradación significativa de los polinucleótidos contenidos en la muestra.

1.2 Antecedentes de la invención

En el ámbito del análisis molecular y diagnóstico, a menudo la capacidad para mantener la estabilidad de los ácidos nucleicos de una muestra biológica, tanto si la muestra se toma en un lugar remoto, en la consulta de un médico o en un laboratorio, determina el éxito del análisis de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos de una muestra biológica se degradan y/o desnaturalizan rápidamente a temperatura ambiente y, por lo general, es necesario almacenarlos en condiciones de congelación para que se mantengan estables; aun así, con el paso del tiempo se produce cierta degradación. Este problema se agrava cuando se recoge una muestra en un lugar remoto o a una distancia importante de la consulta de un médico o del entorno del laboratorio y especialmente cuando puede haber un acceso limitado o no se tiene acceso a unas condiciones de refrigeración/congelación constantes hasta el momento en el que se analiza la muestra, por ejemplo cuando no se tiene acceso a una fuente de energía (es decir, electricidad) o cuando no se dispone de un equipo de congelación o este no mantiene una temperatura constante. El problema es todavía mayor cuando los ácidos nucleicos necesarios para el análisis posterior incluyen ácido ribonucleico (ARN), que resulta particularmente susceptible a la degradación, por ej., por la actividad de la endonucleasa endógena o exógena. La tecnología para el transporte de muestras actualmente disponible en la técnica suele utilizar medios de transporte especiales para el transporte de las muestras biológicas a un laboratorio, en particular, embalajes que imponen plazos reducidos, bajas temperaturas y límites de viabilidad.

Además de las preocupaciones asociadas a la estabilidad de la muestra, a menudo se plantean otros problemas asociados con los reactivos utilizados para almacenar y/o transportar las muestras recogidas. Por ejemplo, los propios reactivos a menudo requieren bajas temperaturas u otros cuidados especiales para mantener la estabilidad. Debido a estos problemas de estabilidad, por ejemplo, el transporte de los reactivos a un punto operativo, el almacenamiento en el punto operativo antes de la utilización, y el transporte de regreso de las muestras biológicas y los reactivos al punto operativo continúan generando una preocupación importante.

Otro problema significativo cuando se trabaja con muestras biológicas es la potencial inoculación, liberación o diseminación de agentes biológicos o patógenos infecciosos vivos de la muestra al medio ambiente. En la actualidad existen protocolos específicos que se aplican a la hora de manipular muestras que pueden ser infecciosas o presentar otros riesgos para la salud o la seguridad. Si la muestra se mantiene viable y/o biológicamente intacta para preservar su integridad para el ensayo, las personas que participan en el proceso de recogida, transferencia y ensayo se encuentran potencialmente expuestas a contagios altamente peligrosos. Por otra parte, puede haber terceros no implicados en las proximidades de un punto operativo (o durante el transporte) que se vean expuestos en caso de que se produzca un contagio. Como resultado, las medidas de seguridad necesarias normalmente incrementan los gastos y esfuerzos necesarios para desplazar estas muestras de un lugar a otro.

Hasta hace poco, los métodos de los laboratorios clínicos para la detección de patógenos eran procesos con unos costes elevados y que exigían una gran carga de trabajo por parte de científicos altamente cualificados y expertos dotados de experiencia en el campo. La mayoría de los laboratorios de diagnóstico clínico empleaban métodos de cultivo tradicionales que por lo general requerían entre tres y siete días para un cultivo viral —e incluso más en el caso de otros objetivos bacterianos—. Por otra parte, el cultivo tradicional requiere la recogida, el transporte y la propagación y la manipulación en laboratorio de agentes biológicos potencialmente infecciosos, tales como el Ébola, la gripe aviar, la neumonía asiática (SARS), etc.

El campo del diagnóstico molecular clínico cambió por completo con la llegada de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) a mediados de los ochenta y poco después con la PCR en tiempo real, a mediados de los noventa. La PCR en tiempo real (RT-PCR) puede dar los resultados en unas horas y la mayoría de los laboratorios de diagnóstico modernos están abandonando el cultivo tradicional en favor de plataformas de detección basadas en los ácidos nucleicos, tales como la PCR en tiempo real. Las recientes mejoras de la química de detección, tales como los nuevos y más eficaces fluores reporters/inhibidores de la fluorescencia, ligandos de unión al surco menor (MGB), y reactivos de amplificación estabilizados han preparado el camino para ensayos de detección de patógenos más sensibles y específicos que han demostrado ser más oportunos, sólidos y económicos que los métodos de cultivo anticuados. Los avances en otras estrategias de detección de ácido nucleico (además de la PCR en tiempo

real), tales como la amplificación mediada por transcripción, la reacción en cadena de ligasa (LCR), microarrays y chips de genes patógenos también han contribuido a la transición desde los viales de cultivo en el laboratorio clínico.

Diversas empresas (como Qiagen, Roche y bioMérieux) han desarrollado instrumentos automáticos para la extracción del ácido nucleico y han intentado automatizar las distintas etapas que integran el proceso que comprende desde el aislamiento de la muestra hasta el análisis molecular. Por ejemplo, Tigris DTS® (Gen-Probe, San Diego, CA, USA) automatiza la totalidad del proceso de detección y a finales de 2004 obtuvo la aprobación de la FDA para su uso con el ensayo Gen-Probe's APTIMA COMBO 2®, un ensayo de ácido nucleico amplificado (NAT) aprobado por la FDA para la detección simultánea de *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae*.

Por consiguiente, existe la necesidad en esta técnica de un sistema seguro de recogida, almacenamiento y transporte que mantenga la integridad de los ácidos nucleicos incluso de una muestra biológica peligrosa, normalmente para su posterior ensayo de diagnóstico o análisis molecular, sin necesidad de congelar la muestra biológica recogida, los reactivos empleados para recoger la muestra ni la muestra recogida en los reactivos, sin que esto suponga un riesgo para los trabajadores o terceros no implicados, y permitir el uso de métodos de transporte menos costosos y más cómodos o precauciones de transporte complicadas.

WO 97/05248 A divulga soluciones y métodos para el aislamiento/extracción de ADN, ARN y proteínas.

EP0313224 A divulga líneas celulares procedentes de tejido pulmonar epitelial que producen proteínas asociadas a agentes tensoactivos total o parcialmente procesadas.

US 2007/202511 A1 divulga composiciones de extracción y métodos para el aislamiento de pequeñas moléculas de ARN de una muestra biológica.

WO 2004/072270 A divulga métodos y composiciones para preparar muestras biológicas al objeto de preservar las macromoléculas de las muestras.

WO 91/02740 A1 divulga métodos y composiciones para el aislamiento de ácidos nucleicos de las células.

2. Breve resumen de la invención

La presente invención incluye composiciones nuevas y útiles, así como métodos para producirlas y emplearlas, que pueden mejorar de forma ventajosa los métodos convencionales de recogida, lisis, transporte y almacenamiento para la preparación de ácidos nucleicos a partir de una o más fuentes biológicas. Por consiguiente, la presente invención puede proporcionar de forma ventajosa un método de recogida y una formulación de preservación para inactivar y lisar una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos, y preservar los ácidos nucleicos (ARN/ADN) de la muestra biológica, preferiblemente en un único recipiente de reacción, de forma que la integridad de los ácidos nucleicos se mantenga al menos de forma sustancial —y preferiblemente de forma integral— y que una parte de los ácidos nucleicos se encuentre fácilmente disponible para el análisis de diagnóstico molecular.

Una ventaja adicional de la presente invención es que el método puede permitir que los ácidos nucleicos separados o liberados se mantengan al menos sustancialmente estables, sin necesidad de temperaturas de enfriamiento uniformes y constantes, como en el caso de la refrigeración o congelación.

Las formulaciones de un solo paso divulgadas en el presente cumplen las siguientes funciones principales: inactivación o eliminación de patógenos en la muestra; lisis de células y separación o liberación de ácidos nucleicos de las células; inactivación de nucleasas endógenas o exógenas y otras enzimas celulares para prevenir la degradación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra; y facilitación de la recogida y manipulación de la muestra a temperaturas ambiente, estabilización de los ácidos nucleicos durante el posterior transporte y almacenamiento de la muestra, y preservación/mantenimiento de la integridad de uno o más polinucleótidos contenidos en los ácidos nucleicos liberados.

La capacidad para conseguir todas estas funciones deseables con una formulación de un solo paso, preferiblemente en una única zona de reacción o un único recipiente de reacción, representa una ventaja particularmente destacada respecto a la técnica disponible en estos momentos. Las tecnologías que existen en estos momentos no incluyen una composición de un solo paso que permita la inactivación de componentes biológicos que contienen ácidos nucleicos, la liberación de ácidos nucleicos a través de la lisis de células y la separación o liberación de ácidos nucleicos, y el mantenimiento de la integridad de los ácidos nucleicos. Sin ánimo de limitarnos a la teoría, se cree que esto se debe en parte a que el proceso de eliminación del organismo biológico presente en una muestra provoca típicamente la liberación y activación de enzimas que degradan las proteínas y los ácidos nucleicos. La degradación enzimática produce la destrucción de la muestra e impide su análisis. Sin embargo, la presente invención estabiliza y preserva la integridad de los ácidos nucleicos presentes en la muestra para el ensayo de diagnóstico.

Las formulaciones de un solo paso de la presente invención permiten preferiblemente la inactivación simultánea de los componentes biológicos que contienen ácidos nucleicos, la lisis y separación o liberación de los ácidos nucleicos, la estabilización y preservación. En una realización, la totalidad o parte de la inactivación, lisis y separación o liberación, estabilización y preservación son secuenciales. Sin embargo, en una realización preferible la mayoría o preferiblemente la totalidad de estas funciones se produce de forma simultánea. En todas las realizaciones, la formulación de un paso se combina con la muestra para iniciar estas funciones. Esto contrasta con la tecnología

existente hasta la fecha en la que la inactivación no se producía necesariamente; y la lisis, estabilización y preservación se producían en una sucesión de pasos separados, utilizándose típicamente en cada paso uno o más reactivos y protocolos distintos que se añadían por separado.

El formato secuencial de los procedimientos anteriores era necesario para minimizar los errores, evitar la incompatibilidad entre reactivos y proporcionar un control paso a paso de los resultados. La presente invención ofrece todas estas ventajas y añade los beneficios adicionales de mantener la integridad de los ácidos nucleicos, permitiendo que se encuentren disponibles para la extracción y purificación, y mejorando por tanto su rendimiento final. Las funciones de la formulación de un solo paso de inactivación preferiblemente simultánea de los componentes biológicos que contienen ácidos nucleicos, la lisis y liberación de ácidos nucleicos de los restos celulares, la estabilización y preservación de los ácidos nucleicos reducen las posibilidades de degradación del ARN/ADN de la muestra que se puede producir durante la lisis, o con posterioridad a la lisis y antes de la estabilización, lo que contribuye a un rendimiento mejorado de los ácidos nucleicos que se extraen finalmente. Un rendimiento mejorado puede proporcionar unos resultados de ensayo superiores.

La presente invención es la que se establece en las reivindicaciones. En concreto, la presente invención es la que se establece en las cláusulas siguientes:

1. Una composición acuosa que incluye los componentes siguientes:

un caotropo presente en una cantidad de entre 0,5 M y 6M;

un detergente presente en una cantidad de entre 0,1% y 1% (peso/vol.), donde el detergente comprende docecilsulfato sódico (SDS), dodecilsulfato de litio (LDS), taurodesoxicolato sódico (NaTDC), taurocolato sódico (NaTC), glicocolato sódico (NaGC), desoxicolato sódico (NaDC), colato sódico, sulfonato de alquilbenceno sódico (NaABS), N-lauril sarcosina (NLS), sales de ácidos carboxílicos, sales de ácidos sulfónicos, sales de ácido sulfúrico, ésteres de ácido fosfórico y polifosfórico, alquilfosfatos, fosfato de monoalquilo (MAP), sales de ácidos perfluorocarboxílicos, detergentes aniónicos o cualquier combinación de estos elementos;

un agente reductor, donde el agente reductor es β -ME, DTT, DMSO o formamida presente en una cantidad de entre 0,05 M y 0,3 M, o donde el agente reductor es TCEP presente en una cantidad de entre 0,5 mM y 30 mM;

un agente quelante presente en una cantidad de entre 0,5 mM y 50 mM;

un agente tensoactivo presente en una cantidad de entre 0,0001% y 0,3% (peso/vol.), donde el agente tensoactivo comprende cocamidopropil hidroxisultaina, ácidos alquilaminopropiónicos, carboxilatos de imidazolina, betaínas, sulfobetainas, sultainas, etoxilatos de alquilfenol, etoxilatos de alcohol, glicoles de polioxipropileno polioxietilenados, mercaptanos polioxietilenados, ésteres de ácido carboxílico de cadena larga, alcanolamidas, glicoles acetilénicos terciarios, siliconas polioxietilenadas, N-alquilpirrolidonas, alquilpoliglicosidasas, polímeros de silicona como Antifoam A®, o polisorbatos como Tween®, o cualquier combinación de estos elementos;

un alcohol de cadena corta presente en una cantidad de entre 1 y 25% (vol./vol.);

una solución tampón que proporciona a la composición un pH de entre 6 y 7, y agua libre de nucleasa, donde los componentes se encuentran presentes todos juntos en una cantidad suficiente como para desnaturalizar proteínas, inactivar nucleasas, eliminar patógenos y no degradar el ácido nucleico de una muestra que se sospecha que contiene agentes patógenos y donde la muestra está en contacto con la composición.

2. La composición de la cláusula 1 donde la solución tampón proporciona a la composición un pH de entre 6.4 y 6.8.

3. La composición de la cláusula 1 o la cláusula 2 donde el caotropo comprende triocianato de guanidina, isocianato de guanidina o hidrocloreuro de guanidina.

4. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 o 3, donde el detergente comprende dodecilsulfato sódico, dodecilsulfato de litio, taurodesoxicolato sódico, taurocolato sódico, glicocolato sódico, desoxicolato sódico, colato sódico, sulfonato de alquilbenceno sódico o N-lauril sarcosina.

5. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 4, donde el agente reductor comprende 2-mercaptoetanol, tris(2-carboxietil)fosfina, ditiotretol, dimetilsulfoxida o tris(2-carboxietil)fosfina.

6. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 5, donde el agente quelante comprende ácido etilenglicoltetraacético, ácido hidroxietilendiamintriácético, ácido dietilentriaminpentaacético, N,N-bis(carboximetil)glicina, ácido etilendiamintetraacético, citrato anhidro, citrato sódico, citrato cálcico, citrato amónico, bicitrato amónico, ácido cítrico, citrato diamónico, citrato de amonio férrico o citrato de litio.

7. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 6, donde el alcohol de cadena corta comprende metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol o hexanol.

8. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 7, donde la solución tampón comprende tris(hidroximetil)aminometano, citrato, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, ácido N, N -Bis(2-hidroxietil)-2 -aminoetanosulfónico, 1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)propano, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico, ácido 3-(N -morfolino)propanosulfónico, bicarbonato o fosfato.

9. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 8, donde los patógenos comprenden virus influenza, células infectadas por el virus influenza, bacterias de la tuberculosis o células infectadas por la bacteria de la tuberculosis.
10. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 9, que comprende además ARN desnudo, ADN o una combinación de estos elementos; opcionalmente, donde el ARN desnudo, ARN o la combinación de estos elementos sirve como vehículo o contiene una secuencia predeterminada de ácido nucleico como control positivo interno.
11. La composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 10, donde el caotropro, el detergente, el agente reductor, el agente quelante, el agente tensoactivo, el alcohol de cadena corta y/o la solución tampón incluyen uno o más caotropos, uno o más detergentes, uno o más agentes reductores, uno o más agentes quelantes, uno o más agentes tensoactivos, uno o más alcoholes de cadena corta y/o una o más soluciones tampón.
12. Un sistema para la recogida de muestras que comprende:
un dispositivo de recogida de muestras y un recipiente de recogida en el que se coloca la muestra, donde el recipiente de recogida contiene una cantidad de la composición de cualquiera de las cláusulas 1 a 11, donde la composición es efectiva para mantener la integridad del ácido nucleico que puede estar presente en la composición para permitir la identificación mediante PCR de un patógeno presente en la muestra cuando la composición que contiene la muestra se almacena a temperatura ambiente o superior durante un periodo de siete días o más.
13. Un método para detectar una secuencia de ácido nucleico que es indicativa de la presencia de un patógeno en la muestra que consiste, en un solo paso, en poner en contacto la muestra con una cantidad de la composición acuosa de cualquiera de las cláusulas 1 a 11, donde la composición es efectiva para eliminar todos los patógenos de la muestra sin degradar ni modificar el ácido nucleico de la muestra, de forma que la secuencia de ácido nucleico del patógeno resulta detectable mediante amplificación por PCR.
14. El método de la cláusula 13, donde el patógeno comprende bacterias, virus o un hongo; opcionalmente, donde la bacteria es tuberculosis o el virus es influenza.
15. El método de cualquiera de las cláusulas 13 o 14, donde la secuencia de ácido nucleico se encuentra presente en la composición en una cantidad de 1 pg/mL a 1 ug/mL.
16. Un método para preparar la composición acuosa de cualquiera de las cláusulas 1 a 11, que comprende:
la combinación de dicho caotropro y agua libre de nucleasa a una temperatura de entre 20 °C y 90 °C;
la combinación del caotropro con un agente reductor, un agente quelante, un agente tensoactivo y un detergente para formar una composición intermedia;
opcionalmente la combinación de un polímero de silicona con la composición intermedia en una cantidad suficiente para minimizar la espuma durante la posterior preparación;
la combinación de una cantidad suficiente de solución tampón con la composición intermedia para obtener un pH de entre 5 y 7;
el aumento de la temperatura de la composición intermedia hasta 60-95 °C durante uno a 30 minutos y posteriormente reducirla hasta la temperatura ambiente;
la combinación de un alcohol C1-6 con la composición intermedia; y
el ajuste de la formulación a un pH de entre 6 y 7 para formar la composición acuosa.
- En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona una composición que incluye: a) uno o más caotropos (cada uno preferiblemente presente en la composición en una cantidad de 0,5 M a 6M); b) uno o más detergentes (cada uno preferiblemente presente en la composición en una cantidad de entre 0,1% a 1%); c) uno o más agentes quelantes (cada uno preferiblemente presente en la composición en una cantidad de entre 0,01 mM y 1 mM); d) uno o más agentes reductores (cada uno preferiblemente presente en la composición en una cantidad de entre 0,05 M y 0,3 M); y e) uno o más agentes antiespumantes (cada uno preferiblemente presente en la composición en una cantidad de entre 0,0001% y 0,3%).
- Entre los ejemplos de caotropos se incluyen, a título meramente enunciativo, tiocianato de guanidina (GuSCN), hidrocloreuro de guanidina (GuHCl), isotionato de guanidina, tiocianato de potasio (KSCN), yoduro de sodio, perclorato de sodio, urea o cualquier combinación de los mismos. Las descripciones de otros ejemplos de caotropos y sales caotrópicas se pueden encontrar, por ejemplo, en la Patente estadounidense N° 5 234 809.
- Entre los ejemplos de detergentes se incluyen, a título meramente enunciativo, docecilsulfato sódico (SDS), dodecilsulfato de litio (LDS), taurodesoxicolato sódico (NaTDC), taurocolato sódico (NaTC), glicocolato sódico (NaGC), desoxicolato sódico (NaDC), colato sódico, sulfonato de alquilbenceno sódico (NaABS), N-lauril sarcosina (NLS), sales de ácidos carboxílicos (es decir, jabones), sales de ácidos sulfónicos, sales de ácido sulfúrico, ésteres de ácido fosfórico y polifosfórico, alquilfosfatos, fosfato de monoalquilo (MAP), y sales de ácidos perfluorocarboxílicos, detergentes aniónicos incluyendo los que se describen en la Patente estadounidense N° 5 691 299, o cualquier combinación de estos elementos.

Entre los ejemplos de agentes reductores se incluyen, a título meramente enunciativo, 2-mercaptoetanol (-ME), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), ditioneitol (DTT), formamida, dimetilsulfóxido (DMSO) o cualquier combinación de estos elementos. En un aspecto de la presente divulgación, el agente reductor incluye o es TCEP.

Entre los ejemplos de agentes quelantes se incluyen, a título meramente enunciativo, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), ácido hidroxietilendiamintriacético (HEDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), N,N-bis(carboximetil)glicina (NTA), ácido etilendiamintetraacético (EDTA), citrato anhidro, citrato sódico, citrato cálcico, citrato amónico, bicitrato amónico, ácido cítrico, citrato diamónico, citrato de potasio, citrato de magnesio, citrato de amonio férrico, citrato de litio o cualquier combinación de estos elementos. En aspectos de la presente divulgación, el agente quelante incluye EDTA, un citrato o una combinación de estos elementos. En un aspecto de la presente divulgación, el agente quelante incluye EDT.

Las composiciones de la presente divulgación pueden incluir también un agente antiespumante para evitar la formación de burbujas típicamente resultante de la presencia de detergentes en la formulación. Los agentes antiespumantes facilitan el pipeteo y la manipulación de las composiciones divulgadas. Entre los ejemplos de agentes tensoactivos/antiespumantes se incluyen, a título meramente enunciativo, cocamidopropil hidroxisultaina, ácidos alquilaminopropiónicos, carboxilatos de imidazolina, betainas, sulfobetainas, sultainas, etoxilatos de alquilfenol, etoxilatos de alcohol, glicoles de polioxipropileno polioxietilenados, mercaptanos polioxietilenados, ésteres de ácido carboxílico de cadena larga, alcanolamidas, glicoles acetilénicos terciarios, siliconas polioxietilenadas, N-alquilpirrolidonas, alquilpoliglicosidasas, polímeros de silicona como Antifoam A®, o polisorbatos como Tween®, o cualquier combinación de estos elementos. En un aspecto de la presente divulgación, un agente antiespumante incluye un polímero de silicona.

Opcionalmente, las composiciones de la presente divulgación pueden incluir asimismo una o más soluciones tampón (cada una preferiblemente presente en la composición final en una cantidad aproximada de entre 1 mM y 1 M). Entre los ejemplos de soluciones tampón se incluyen, a título meramente enunciativo, 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 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico (HEPES), ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), N-AM3is(2-hidroxietil) glicina (Bicina), N-[tris(hidroximetil)metil]glicina (Tricina), ácido N-2-acetamido-2-iminodiacético (ADA), ácido N-(2-Acetanu)-2-aminoetanosulfónico (ACES), ácido piperazina-1,4-bis(2-etanosulfónico) (PIPES), bicarbonato, fosfato, o cualquier combinación de estos elementos. En un aspecto de la presente divulgación, la solución tampón incluye un citrato.

La inclusión de una o más de estas soluciones tampón opcionales resulta recomendable para controlar el pH de las formulaciones, dado que se ha descubierto que la extracción de ácido nucleico resulta óptima en un rango de pH de entre 5 y 7. Opcionalmente la solución o soluciones tampón empleadas en las composiciones divulgadas son seleccionadas para proporcionar una capacidad amortiguadora significativa en el rango de un pH aproximado de entre 6 y 8, más preferiblemente en un rango de pH aproximado de entre 6 y 7, y más preferiblemente todavía, en un rango de pH aproximado de entre 6.2 y 6.8. En algunos ejemplos de realizaciones, el pH de PrimeStore™ Solutions (también denominado en el presente "PSS") es opcionalmente de 6.7 ± 0.25.

Las composiciones de la presente divulgación también pueden incluir opcionalmente uno o más alcoholes de cadena corta (preferiblemente alcoholes de 1- a 6-carbonos [es decir, C₁-C₆]) (cada uno preferiblemente presente en la composición en una cantidad aproximada de entre 1% a 25%, aunque se pueden emplear porcentajes superiores de los alcoholes, si se desea). Algunos ejemplos de alcoholes de cadena corta incluyen alcoholes de cadena lineal y ramificada, tales como, a título meramente enunciativo, metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol, hexanol o una combinación de estos elementos.

Las composiciones de la presente divulgación también pueden incluir opcionalmente uno o más compuestos o reactivos adicionales, incluyendo, a título meramente enunciativo, betaína, albúmina de suero bovino, y osmolitos tales como trehalosa, sorbitol y similares.

En determinadas realizaciones de la presente divulgación, la adición de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN y/o ADN) se considera beneficiosa para diversos fines y aplicaciones de los métodos divulgados: a) como "vehículo" (se ha demostrado anteriormente que la adición de pequeñas cantidades de ADN/ARN complementario aumenta/incrementa el rendimiento total de las muestras, particularmente de las muestras originales que pueden contener bajas cantidades de la diana, es decir de las células, los virus, las bacterias); b) como control positivo interno para los posteriores procesos moleculares y para control o realizar un seguimiento de la fidelidad de la preparación de ácido nucleico desde la recogida de la muestra hasta la detección; y c) para la comparación con un "calibrador" para el posterior análisis cuantitativo, por ejemplo qRT-PCR y similares. En tales aspectos de la presente divulgación, uno o más ácidos nucleicos conocidos o de "control" se podrían añadir a las composiciones en una concentración final aproximada de entre 1 pg y 1 µg.

Opcionalmente, las composiciones proporcionan una capacidad amortiguadora suficiente como para estabilizar de forma adecuada las poblaciones de polinucleótidos obtenidas de una muestra y proporcionarán más preferiblemente una capacidad amortiguadora hasta un pH aproximado de entre 6.4 y 6.9 durante la formulación, y mantendrán las poblaciones aisladas de polinucleótidos en un rango de pH similar cuando la muestra se pone en contacto con las formulaciones de almacenamiento/recogida que se describen en el presente.

Opcionalmente, las muestras recogidas incluirán una o más poblaciones de ácidos nucleicos que son aisladas de una muestra biológica, muestra o fuente, incluyendo, por ejemplo, ARN y ADN.

Típicamente, las composiciones de la presente invención inactivarán al menos de forma sustancial, y preferiblemente por completo, cualesquiera ARNasas o ADNasas endógenas o exógenas presentes en la muestra, de forma que los ácidos nucleicos de la muestra se encuentren sustancialmente libres de cualquier degradación y preferiblemente que no se degraden ni pierdan su integridad durante la recogida, lisis, almacenamiento y transporte de la muestra para su posterior análisis *in vitro* o *in vivo*.

Entre los ejemplos de formulaciones de la invención se incluye una solución de recogida de un solo paso que lisa, estabiliza y preserva la integridad de los ácidos nucleicos preparados a partir de una muestra biológica para el posterior análisis de ARN y/o ADN.

Las composiciones divulgadas se desarrollaron y optimizaron, entre otras cosas: 1) para facilitar la preparación de ácidos nucleicos de alta calidad a partir de muestras clínicas o ambientales; 2) para inactivar, eliminar o neutralizar de otro modo patógenos potencialmente infecciosos en una muestra biológica, a fin de facilitar la manipulación y transporte seguros de las muestras recogidas; y 3) estabilizar el ADN/ARN liberado (es decir, "desnudo") durante periodos prolongados sin degradación de la nucleasa o hidrólisis de los ácidos nucleicos liberados.

Las composiciones descritas en el presente son ideales para el uso clínico, de campo y despliegue, así como para la extracción/recogida de muestras de gran volumen. Las muestras recogidas en una o más de las composiciones divulgadas se inactivan biológicamente y pueden ser transportadas de forma segura, por lo general sin necesidad siquiera de refrigeración o hielo seco.

Las formulaciones de las composiciones de almacenamiento/transporte/recogida de la presente divulgación se describen en los ejemplos adjuntos e incluyen, a título meramente enunciativo, una composición que incluye aproximadamente 4 M de un caotropo (como tiocianato de guanidina, hidrocloreuro de guanidina, isocianato de guanidina o cualquier combinación de estos elementos), aproximadamente entre 10 mM y 30 mM de un agente quelante (como EGTA, HEDTA, DTP A, NTA, EDTA, citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato de amonio férrico, citrato de litio o cualquier combinación de estos elementos), aproximadamente un 0,25% de un detergente (como SDS, LDS, NaTDC, NaGC, colato sódico, NaABS, NLS o cualquier sal o combinación de estos elementos), aproximadamente 0,1 M de un agente reductor (como -ME, DTT, DMSO, formamida, TCEP o cualquier combinación de estos elementos), y aproximadamente un 0,1% de un agente tensoactivo/antiespumante (como un polímero de silicona [p. ej., Antifoam A®] o un polisorbato [p. ej., Tween®], o cualquier combinación de estos elementos).

Las formulaciones de las composiciones de almacenamiento/transporte/recogida de la presente divulgación se describen en los ejemplos adjuntos e incluyen, a título meramente enunciativo, una composición que incluye aproximadamente 3 M de un caotropo (como tiocianato de guanidina, hidrocloreuro de guanidina, isocianato de guanidina o cualquier combinación de estos elementos), aproximadamente entre 1 mM y 10 mM de un agente quelante (como EGTA, HEDTA, DTP A, NTA, EDTA, citrato anhidro, citrato de sodio, citrato de calcio, citrato de amonio, bicitrato de amonio, ácido cítrico, citrato de diamonio, citrato de amonio férrico, citrato de litio o cualquier combinación de estos elementos), aproximadamente un 0,25% de un detergente (como SDS, LDS, NaTDC, NaGC, colato sódico, NaABS, NLS o cualquier sal o combinación de estos elementos), aproximadamente 0,1 M de un agente reductor (como -ME, DTT, DMSO, formamida, TCEP o cualquier combinación de estos elementos), y aproximadamente un 0,1% de un agente tensoactivo/antiespumante (como un polímero de silicona [p. ej., Antifoam A®] o un polisorbato [p. ej., Tween®], o cualquier combinación de estos elementos).

Otro ejemplo de formulación de las composiciones de aislamiento y estabilización de polinucleótidos divulgadas incluye, a título meramente enunciativo, una composición que contiene aproximadamente entre 1 y 4 M de un agente caotrópico, como tiocianato de guanidina, hidrocloreuro de guanidina o isocianato de guanidina; aproximadamente entre 0,5 y 100 mM de un agente quelante como EDTA, o citrato de sodio, o ambos; aproximadamente entre un 0,1 y un 1% de un detergente aniónico, como SDS o iV-lauril sarcosina, sal de sodio; aproximadamente entre un 0,001 y un 0,0001% de un agente tensoactivo o humectante, como el polímero de silicona Antifoam A®, e); aproximadamente entre 10 y 500 mM de una solución tampón como Tris-HCl; y aproximadamente entre un 10 y un 25% de un alcohol de cadena corta, como etanol.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona una composición que contiene aproximadamente 3 M de tiocianato de guanidina; aproximadamente 1 mM de TCEP; aproximadamente 10 mM de citrato de sodio; aproximadamente 0,5% de N-lauril sarcosina, sal de sodio; aproximadamente 0,0002% de Antifoam A, aproximadamente 100 mM de Tris-HCl, aproximadamente 0,1 mM de EDTA; y aproximadamente un 23% de etanol.

La presente divulgación también proporciona un método para obtener una población de polinucleótidos a partir de una muestra que se sospecha que contiene ácidos nucleicos. Por lo general, el método implica poner en contacto la muestra con una cantidad de una de las composiciones divulgadas, en condiciones efectivas para obtener una población de polinucleótidos de la muestra. La presente divulgación no requiere la separación de la población para "obtener" la muestra, dado que el diagnóstico posterior puede exigir o no dicha separación.

La presente divulgación también proporciona un método para preparar una formulación acuosa de un solo paso de las composiciones de recogida/lisis/transporte/almacenamiento descritas en el presente para la recogida de ácidos

nucleicos como ARN y/o ADN. En sentido general, el método implica combinar uno o más caotrops y agua libre de nucleasa a una temperatura de entre 20 y 90 °C en una zona de reacción; a continuación, combinar el caotropo o los caotrops disueltos con uno o más agentes reductores, uno o más agentes quelantes, y uno o más detergentes en la zona de reacción para formar una composición intermedia; opcionalmente, combinar un polímero de silicona con la composición intermedia en una cantidad suficiente para minimizar la espuma durante la posterior preparación de la formulación acuosa de un solo paso; combinar una cantidad suficiente de solución tampón con la composición intermedia para mantener un pH aproximado de entre 6 y 6.9; opcionalmente, combinar un segundo agente quelante en la zona de reacción; a continuación, incrementar la temperatura de la segunda composición intermedia hasta aproximadamente 60-95 °C durante un periodo de entre 1 y 30 minutos, y posteriormente reducirla hasta la temperatura ambiente; opcionalmente, combinar un alcohol C1-6 con el contenido de la zona de reacción; y opcionalmente ajustar el pH entre 6.4 y 6.9.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona un método para preparar formulaciones acuosas de un solo paso adaptadas para obtener una población de polinucleótidos a partir de una muestra biológica que se sospecha que contiene ácidos nucleicos. Por lo general, este método implica al menos los pasos siguientes: a) poner en contacto la muestra con una cantidad de la formulación acuosa de un solo paso que resulte efectiva para:

i) al menos eliminar o inactivar de forma sustancial los patógenos potencialmente infecciosos de la muestra;

ii) lisar una parte de las células para liberar el ARN y/o ADN de la muestra; y

iii) inhibir o evitar sustancialmente que los polinucleótidos liberados en la muestra se sometan a una posterior degradación enzimática o hidrólisis, modificación o inactivación, al objeto de obtener la población de polinucleótidos de la muestra.

Esta muestra puede ser de cualquier origen, incluyendo, a título meramente enunciativo, una muestra clínica o veterinaria, una muestra ambiental o ecológica, una muestra forense o de la escena de un crimen, o similares, y puede contener uno o más ácidos nucleicos de origen vírico, microbiano, animal, vegetal, o cualquier combinación de estos elementos.

Opcionalmente, los métodos de la presente divulgación consistirán al menos en poner en contacto la muestra con una cantidad de una o más de las composiciones divulgadas a una temperatura de entre 0 y 40 °C (más preferiblemente a una temperatura de entre 4 y 35 °C, y todavía más preferiblemente a una temperatura de entre 10 y 30 °C) durante un periodo de tiempo de al menos 24 horas, más preferiblemente durante un periodo de tiempo de al menos 48 horas, al menos 72 horas, al menos 96 horas o más, sin causar un deterioro, degradación, clivaje enzimático y/o digestión nucleolítica, modificación o procesamiento sustancial de los ácidos nucleicos presentes en la muestra que se ha puesto en contacto con dicha composición.

En determinados aspectos, los métodos de la presente divulgación consistirán al menos en poner en contacto la muestra con una cantidad de una o más de las composiciones divulgadas a una temperatura de entre 0 y 40 °C (más preferiblemente a una temperatura de entre 4 y 35 °C, y todavía más preferiblemente a una temperatura de entre 10 y 30 °C, y más preferiblemente aun a una temperatura de entre 15 y 25 °C) durante un periodo de tiempo de al menos 7 días, más preferiblemente durante un periodo de tiempo de al menos 14 días, al menos 21 días, al menos 28 días o más, sin causar un deterioro, degradación, clivaje enzimático y/o procesamiento nucleolítico sustancial de los ácidos nucleicos presentes en la muestra sometida a este proceso. Se entenderá que el hecho de poner en contacto una muestra con una composición de la invención solo es necesario que ocurra durante un periodo limitado, pero para evitar la necesidad de una separación inmediata de los ácidos nucleicos de la muestra y de la composición de un solo paso de la invención, todos los materiales pueden permanecer en contacto durante los periodos de tiempo anteriormente especificados, sin que se produzca ninguna degradación o degradación sustancial de los ácidos nucleicos.

Opcionalmente, la integridad de una población de polinucleótidos liberados de la muestra en la composición se mantendrá de forma sustancial, aun cuando la composición que comprende la muestra se almacene a temperaturas ambiente, e incluso durante periodos de tiempo prolongados, incluyendo, a título meramente enunciativo, un almacenamiento durante un periodo superior a unos 10 días, superior a unos 20 días o incluso superior a unos 30 días o más. Del mismo modo, resulta recomendable que la integridad de una población de polinucleótidos liberados de la muestra en la composición se mantenga de forma sustancial, aun cuando la composición que comprende la muestra se almacene a temperaturas subtropicales y tropicales, e incluso durante periodos de tiempo prolongados, incluyendo, a título meramente enunciativo, un almacenamiento durante un periodo superior a 5 días, superior a 15 días o incluso superior a 25 días o más.

En la práctica de los presentes métodos, resulta preferible que al menos una o más células biológicas contenidas en la muestra se sometan a una lisis sustancial al objeto de liberar al menos una primera población de polinucleótidos contenida en dichas células de la composición. Opcionalmente, los componentes de la composición divulgada son suficientes para liberar esta población a partir de los restos celulares restantes (incluyendo, a título meramente enunciativo, lípidos, proteínas, polisacáridos, componentes celulares y similares).

También resulta recomendable en la práctica de los presentes métodos que al menos una o más nucleasas exógenas o endógenas que puedan estar presentes en la muestra, sobre la muestra o alrededor de la propia muestra, sean suficientemente inactivadas por uno o más componentes de la composición de forma que los ácidos

nucleicos resultantes no se destruyan, no resulten dañados ni se sometan a un clivaje nucleolítico cuando las células biológicas incluidas en la muestra sean sustancialmente lisadas para liberar la población de polinucleótidos de las células. Preferiblemente, uno o más componentes de la composición divulgada son efectivos para eliminar, inactivar o inhibir sustancialmente la actividad biológica de una ADNasa o ARNasa, cuando esta proteína se encuentra presente en la muestra.

También resulta recomendable en la práctica de los presentes métodos que cuando haya uno o más microbios, virus y/o patógenos presentes en la muestra, sobre la muestra o alrededor de la propia muestra en el momento de su recogida, dichos microbios, virus y/o patógenos sean eliminados o suficientemente inactivados por uno o más de los componentes de la composición, al objeto de facilitar la manipulación segura de la muestra por parte del profesional de la salud. Opcionalmente, uno o más componentes de la composición divulgada son efectivos para que una muestra patogénica pase a ser sustancialmente, o de forma preferible completamente, no patogénica, sin necesidad de añadir componentes adicionales a la composición. Sin embargo, en determinadas aplicaciones, también puede resultar recomendable incluir uno o más agentes antimicrobianos, antivirales o antifúngicos a las composiciones para que pasen a ser sustancialmente no patogénicas y, por tanto, que su manipulación resulte segura para el profesional de la salud.

Opcionalmente, la composición que contiene la muestra es al menos suficientemente estable, o es completamente estable, para permitir el almacenamiento de la muestra en la composición a temperatura ambiente o inferior al menos sustancialmente (o completamente) desde el momento de la recogida hasta el momento del análisis de una población de polinucleótidos de la muestra. Para los fines del presente, "temperatura ambiente" se puede referir a temperaturas de aproximadamente entre 18 y 25 °C o en algunas realizaciones de aproximadamente entre 20 y 22 °C.

En determinados aspectos de la presente divulgación, la composición que contiene la muestra se puede almacenar a una temperatura de aproximadamente entre 0 y 40 °C, más preferiblemente a una temperatura de aproximadamente entre 4 y 30 °C, más preferiblemente, a una temperatura de aproximadamente entre 10 y 25 °C, al menos sustancialmente desde el momento de la recogida hasta el momento en el que los polinucleótidos obtenidos de la muestra son posteriormente aislados, purificados o caracterizados utilizando una o más metodologías convencionales de biología molecular.

En determinados aspectos de la presente divulgación, la composición que contiene la muestra que se sospecha que contiene ácidos nucleicos estabilizará los ácidos nucleicos en la medida en que se mantengan al menos sustancialmente en estado no degradado (es decir, al menos sustancialmente estables) incluso tras un almacenamiento prolongado de la composición a temperatura ambiente, en un refrigerador o bajo cero. Resultará recomendable que esta estabilidad permita que al menos aproximadamente el 70%, al menos aproximadamente el 85%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%, o incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 98% de los polinucleótidos contenidos en la muestra almacenada no se degrade tras un almacenamiento prolongado de la muestra. En determinados aspectos de la presente invención, sustancialmente todos los polinucleótidos contenidos en la muestra se estabilizarán de forma que la integridad original de los polinucleótidos se preserve durante la recogida, lisis, almacenamiento y transporte de la muestra procesada.

En determinados aspectos de la presente divulgación, el método proporcionará opcionalmente una población de ácidos nucleicos preparada a partir de una muestra biológica en la que menos de aproximadamente el 15% de los polinucleótidos incluidos en la muestra se degradarán durante la recogida, lisis, almacenamiento y transporte de la muestra, después de que hayan sido almacenados en la composición a una temperatura aproximada de entre -20 y 40 °C durante un periodo de al menos 24, 48, 72 o 96 horas o más desde que la muestra se introdujese inicialmente en la composición.

En aspectos relacionados de la presente divulgación, el método proporcionará opcional y preferiblemente una población de ácidos nucleicos preparada a partir de una muestra biológica en la que menos de aproximadamente el 10% de los polinucleótidos incluidos en la muestra se degradarán durante la recogida, lisis, almacenamiento y transporte de la muestra, después de que hayan sido almacenados en la composición a una temperatura aproximada de entre -20 y 40 °C durante un periodo de al menos 24, 48, 72 o 96 horas o más desde que la muestra se introdujese inicialmente en la composición.

Del mismo modo, en algunas aplicaciones de la metodología divulgada en el presente, el uso de las composiciones divulgadas proporcionará preferiblemente una población de ácidos nucleicos preparada a partir de una muestra biológica en la que menos de aproximadamente el 5% de los polinucleótidos incluidos en la muestra se degradarán durante la recogida, lisis, almacenamiento y transporte de la muestra, después de que hayan sido almacenados en la composición a una temperatura aproximada de entre -20 y 40 °C durante un periodo de al menos 24, 48, 72 o 96 horas o más desde que la muestra se introdujese inicialmente en la composición.

En algunos ejemplos, la población de ácidos nucleicos preparada a través de los métodos presentes se puede mantener con suficiente integridad para que no más del 1 o 2% de la muestra se degrade, incluso cuando la composición se almacene a una temperatura aproximada de entre 0 y 40 °C durante periodos de varios días a varias semanas. De hecho, los inventores han demostrado que las muestras de ácidos nucleicos aisladas utilizando los métodos divulgados se mantienen al menos sustancialmente estables, preferiblemente estables, en su forma no

degradada durante periodos de varias semanas o incluso varios meses o más, incluso cuando la composición que contiene los ácidos nucleicos se almacena a una temperatura de entre 10 y 40 °C. En una realización preferible, el límite superior de los mencionados rangos de temperatura es de unos 37 °C. Por tanto, a efectos del presente, el término "estable" se puede referir a las diversas realizaciones anteriormente mencionadas por lo que respecta a la integridad de la población de ácidos nucleicos tras un intervalo de tiempo concreto a una temperatura predeterminada.

2.2 Formulaciones y kits comerciales

La presente divulgación también proporciona kits y sistemas de recogida de muestras que utilizan las composiciones divulgadas y soluciones de recogida/almacenamiento/transporte descritas en el presente. En aspectos concretos de la presente divulgación, estos sistemas de recogida de muestras pueden incluir un dispositivo de recogida, como un tampón impregnado, una legra o un bucle de cultivo; y un recipiente de recogida, como un tubo de ensayo tipo vial o un vaso para muestras, que contenga una o más de las composiciones divulgadas en el presente. El recipiente de recogida preferiblemente tiene un mecanismo de apertura extraíble, de forma que se pueda abrir para insertar las composiciones de un solo paso y cerrarse y embalsarse, abrirse para insertar la muestra y opcionalmente una porción del dispositivo de recogida y cerrarse para su almacenamiento y transporte, o ambas cosas. El recipiente de recogida puede utilizar cualquier mecanismo de apertura adecuado, incluyendo, a título meramente enunciativo, una tapadera roscada, una tapadera a presión, una tapadera de presionar y girar o similares. Estos sistemas también pueden incluir opcionalmente uno o más reactivos adicionales, dispositivos de almacenamiento, dispositivos de transporte y/o instrucciones para la obtención, recogida, lisis, almacenamiento o transporte de muestras en estos sistemas. En un aspecto de la presente divulgación, las composiciones de un solo paso de la divulgación ya pueden estar dispuestas en la zona de reacción a la que se puede asociar la muestra. En estos aspectos de la presente divulgación, la divulgación solamente requiere un dispositivo de recogida y el recipiente de recogida.

El kit también puede incluir uno o más dispositivos de extracción para ayudar a liberar y separar los ácidos nucleicos para obtener al menos sustancialmente ARN/ADN puro para su análisis.

Los kits también pueden ser embalados para su distribución comercial y además pueden incluir opcionalmente uno o más dispositivos de recogida, entrega, transporte o almacenamiento para la recogida, la manipulación o procesamiento de muestras. El contenedor o contenedores de estos kits pueden incluir típicamente al menos un vial, un tubo de ensayo, un matraz, una botella, un vaso para muestras u otro contenedor, en el que se puede colocar la composición o composiciones y, preferiblemente, dividirse en partes alícuotas para la recogida, el transporte y almacenamiento de muestras individuales. El kit también puede incluir un contenedor de mayor tamaño, como un estuche, que incluye los contenedores anteriormente mencionados, junto con otros equipos, instrucciones y similares. El kit también puede incluir opcionalmente uno o más reactivos adicionales, soluciones tampón o compuestos, y puede incluir asimismo opcionalmente instrucciones de uso del kit en la recogida de una muestra clínica, de diagnóstico, ambiental o forense, así como instrucciones para el almacenamiento y transporte de dicha muestra una vez que se haya colocado en la composición o composiciones divulgadas. El kit puede incluir, por ejemplo, múltiples de cinco o más de los diversos dispositivos de recogida y recipientes de recogida, así como cualesquiera otros compuestos a incluir, de forma que los kits se puedan utilizar para recoger múltiples muestras de la misma fuente o de fuentes diferentes.

3. Breve descripción de los dibujos

Para facilitar la comprensión de los principios de la presente divulgación, ahora se hará referencia a las realizaciones o ejemplos que se ilustran en los dibujos y se utilizará el lenguaje específico para describirlas. No obstante, se entenderá que esto no pretende en modo alguno limitar el alcance de la invención. Se contempla cualquier alteración u otra modificación de las realizaciones descritas y cualquier otra aplicación de los principios de la invención aquí descrita, tal y como haría normalmente un experto en la técnica a la que se refiere la invención.

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria y se incluyen para demostrar determinados aspectos de la presente invención. La presente divulgación se puede entender mejor por referencia a la siguiente descripción interpretada conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que los mismos números de referencia identifican los mismos elementos, y en los que:

La FIG. 1 muestra la eficiencia de extracción de PrimeStore™ (ver. 1). PrimeStore (ver. 1 [ilustrado aquí como "One-step +"]) comparado con Lysis Solution incluida en el RNaqueous®- Micro Kit (Ambion, Cat#AM1931) utilizando una cantidad estándar del virus influenza A completo. Para la comparación se utilizó la formulación de un solo paso o Lysis Solution proporcionada en el kit para la lisis del ARN viral y, a continuación, se extrajo de conformidad con los protocolos del fabricante. Las reacciones replicadas se procesaron y analizaron mediante RT-PCR en tiempo real (rRT-PC) utilizando un sistema de detección de secuencias ABI7500;

La FIG. 2 muestra la eficiencia de extracción de PrimeStore™ Solution (ver. 1) en comparación con kits comerciales. Se recogieron muestras de nariz de rata algodónera homogeneizada (*) a la que se le había administrado el virus influenza A (H3N2) o un virus clínico de la influenza A humana (H1N1) durante la temporada 2006-07, se lisaron en PrimeStore™ Solution o se lisaron utilizando la respectiva solución de lisis, el protocolo y el procedimiento de extracción de tres kits disponibles en el mercado: RNaqueous-Micro (Ambion Cat#AM1931), QiaAmp Viral Mini Kit (Qiagen), y AI/NCD MaxMag (Ambion) Kit. La eficiencia de la extracción se evaluó utilizando ABI 7500 con el método del umbral del ciclo (CT) comparativo. Los resultados relativos del CT y las copias virales detectadas fueron óptimos

cuando se utilizó PrimeStore™ (representado como la "formulación de un solo paso") en lugar de las respectivas soluciones tampón de lisis de cada kit comercial;

La FIG. 3 muestra la preservación de ARN desnudo en PrimeStore™ Solution en comparación con Ambion RNA Storage Solution. Se almacenó ARN aviar H5 de cadena simple en solución PrimeStore™, solución 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 RNAqueous®-Micro Kit (Ambion, Cat#AM1931) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se analizaron mediante RT-PCR en tiempo real en ABI 7500 (Applied Biosystems). Los valores se proporcionan como umbrales del ciclo (CT) utilizando el método de cuantificación absoluta;

La FIG. 4 muestra un ejemplo de un formato de embalaje de PrimeStore™ para la recogida para el diagnóstico clínico. Instrucciones para la recogida de la muestra utilizando un tampón impregnado (Copan Diagnostics) y un tubo de 5 ml para la recogida de muestras que contiene 1.5 ml de PrimeStore™ Solution;

La FIG. 5 muestra un ejemplo de PrimeStore™ Collection Solution comercial. Tres ejemplos de formatos de solución comercial para la recogida de muestras: botella de 25 ml, y formatos de tubo de 5 ml y 1,5 ml;

La FIG. 6 ilustra la capacidad de PrimeStore™ Solution para eliminar rápidamente los microorganismos. Se muestra una comparación del crecimiento celular de MRSA en un medio de cultivo (TSB) o en una solución de PS. Tras 10 segundos en PrimeStore™ Solution, no se detectó ningún patógeno bacteriano viable.

La FIG. 7A muestra la inactivación de muestras de cloaca de gallina en PrimeStore™ Solution (Ver. 1). PrimeStore™ Solution inactiva los agentes microbianos en una hora. Se sumergieron cuatro muestras de cloaca de gallina originales en PrimeStore™ Solution (fila superior) o agua (fila inferior) y posteriormente se colocaron en placas de agar sangre;

La FIG. 7B demuestra que PrimeStore™ inhibe la hidrólisis de la base de ARN durante 30 días a temperatura ambiente. El ARN se incubó a temperatura ambiente (22-26 °C) en PrimeStore™ (barras de gel 1 y 3) y agua (barras de gel 2 y 4), y posteriormente se amplificó mediante RT-PCR (1500 pares de bases) en los Días 0 y 30. PrimeStore™ preservó el ARN recogido y evitó la degradación de ARN/ADN a temperatura ambiente hasta 30 días;

La FIG. 8A ilustra el análisis mediante RT-PCR en tiempo real de una plantilla de ARN de influenza A aviar H5 "desnudo" preservada en PrimeStore™ Solution tras la incubación en nucleasas de ARN/ADN. El ARNc H5 (2 ng) se incubó con ribonucleasa A y T1, y DNaseI durante una hora a 37 °C y se extrajo utilizando RNAqueous®-Micro Kit (Ambion). Se incluyeron reacciones por triplicado para cada una de las condiciones de reacción. Los valores del umbral de ciclo (CT) de la RT-PCR en tiempo real del ARN desnudo preservado en PrimeStore con nucleasas añadidas (CT medio: 22,88) fueron similares a los de una cantidad igual de control de una plantilla de ARNc (CT medio: 23,70). Las reacciones de la plantilla de ARNc sometidas a digestión de nucleasa sin PrimeStore™ se degradaron prácticamente por completo (CT medio: 39,58);

La FIG. 8B ilustra el análisis mediante RT-PCR en tiempo real y electroforesis en gel de una plantilla de ARN de influenza A aviar H5 "desnudo" preservada en PrimeStore™ Solution tras la incubación en nucleasas de ARN/ADN a 37 °C durante siete días. Se incubaron dos nanogramos de ARNc H5 con RNasa A y T1, y DNasa I, y a continuación se extrajeron utilizando RNAqueous®-Micro Kit (Ambion) después de siete días. Se incluyeron reacciones por duplicado para cada reacción. Los valores del umbral de ciclo (CT) de la RT-PCR en tiempo real del ARN desnudo preservado en PrimeStore con nucleasas añadidas (CT medio: 33.51) se detectaron después de siete días. Las reacciones de la plantilla de ARNc sometidas a digestión de nucleasa sin PrimeStore™ se degradaron por completo y de forma similar a las reacciones de NTC.

La FIG. 8C demuestra que PrimeStore™ es insensible a la digestión de nucleasa. Electroforesis en gel y producto tras la amplificación. La barra 3 es el producto de la PCR de la plantilla de ARN + PrimeStore™ a 37°C durante 7 días, y la barra 5 la amplificación de un ARN de control positivo. La barra 5 (sin amplificación) es ARN sin PrimeStore™ y las líneas 2 y 6 son una escalera de 100 pb y reacciones de NTC, respectivamente.

La FIG. 9 ilustra que la preservación en PrimeStore™ es superior a otras soluciones. PrimeStore™ (Ver. 2 y Ver. 2.2) Preservación de ARN de virus influenza A en comparación con solución tampón Qiagen AVL, etanol y Viral Transport Media (VTM) a temperatura ambiente (22-25°C) durante 30 días.

La FIG. 10 muestra la eficiencia de la extracción del virus influenza A preservado en PrimeStore™ (Ver. 2.2) durante 30 días a diversas temperaturas. Ambiente (21-37°C); Congelación-descongelación (-25°C; 32x); temperatura ambiente (22-26°C); y Barra 5: refrigerado (4°C).

La FIG. 11 es un gráfico del umbral crítico frente a la concentración molar utilizando virus influenza A completo con TCEP como agente reductor;

La FIG. 12 es un gráfico del umbral crítico frente a la concentración molar utilizando ARN de cadena simple de influenza aviar H5N1 con TCEP como agente reductor;

Las FIG. 13A y 13B muestran la comparación entre TCEP y β-ME como agente reductor de las composiciones PrimeStore™ Solution, utilizando un control a base de agua solamente. En la FIG. 13A, se empleó ARN de influenza aviar H5, mientras que en la FIG. 13B se utilizó el virus completo.

La FIG. 14A muestra los resultados de un estudio empleando PrimeStore™ Solution para preservar los ácidos nucleicos de la sangre. Eficiencia de extracción de PrimeStore de la sangre completa a la que se le ha añadido ARN en comparación con la solución de lisis en QIAamp® DNA Blood Mini Kit. Se añadieron 0,1 pg y 1 pg de ARN de influenza A y se practicó la extracción utilizando PrimeStore™ o una solución tampón AL Lysis. A ambas concentraciones de ARN, PrimeStore™ produjo resultados superiores tal y como ponen de manifiesto los resultados de CT de la RT-PCR en tiempo real;

La FIG. 14B incluye una tabla de datos del estudio mostrado en la FIG. 14A que implica la extracción de ARN de cadena simple de influenza aviar H5 "desnudo" de los tubos de sangre. Eficiencia de extracción de PrimeStore de la sangre completa a la que se le ha añadido ARN en comparación con la solución de lisis en QIAamp® DNA Blood Mini Kit utilizando diferentes anticoagulantes para la sangre. PrimeStore™ fue superior en comparación con AL Lysis Buffer de Qiagen utilizando sangre a la que se le había añadido ARN en tubos de recogida de sangre con anticoagulantes habituales; y

La FIG. 14C incluye una tabla de datos del estudio mostrado en la FIG. 14A que implica la comparación de PrimeStore™ Solution frente a un kit de extracción comercial (Qiagen). Se muestra la eficiencia de extracción de PrimeStore™ de la sangre completa a la que se le ha añadido ARN en comparación con la solución de lisis en QIAamp® DNA Blood Mini Kit. Se añadieron 0,1 pg y 1 pg de ARN del virus influenza A y se practicó la extracción utilizando PrimeStore™ o una solución tampón AVL Lysis. A ambas concentraciones de ARN, PrimeStore™ produjo resultados superiores tal y como ponen de manifiesto los resultados de CT de la RT-PCR en tiempo real.

4. Descripción de realizaciones ilustrativas

A continuación se describen aspectos ilustrativos de la presente divulgación. En aras de una mayor claridad, en la presente memoria no se describen todas las características de una implementación real. Se apreciará sin lugar a dudas que para el desarrollo de cualquiera de estas realizaciones reales se deben tomar numerosas decisiones específicas de la implementación para conseguir los objetivos específicos de los responsables de la implementación, tales con la conformidad con las limitaciones asociadas al sistema y a la empresa, que variarán de una implementación a otra. Por otra parte, se apreciará que este esfuerzo de desarrollo podría resultar complejo y prolongado, aunque supondría una tarea rutinaria para los expertos en la técnica que se benefician de la presente divulgación.

La mejora de la estabilización, recogida, transporte y preservación que ofrecen las formulaciones divulgadas resultan particularmente ventajosas cuando la muestra se encuentra en una región geográfica alejada de las instalaciones de ensayo. Las ubicaciones remotas, también denominadas sitios de campo, incluyen diversos entornos en los que típicamente no se realizan ensayos de diagnóstico. Estos sitios incluyen consultas médicas, centros de triaje, aeropuertos, pasos de fronteras, áreas de brote y diversas ubicaciones de exterior. Las composiciones y métodos divulgados ofrecen especiales ventajas en lugares en los que no se dispone de acceso a la electricidad y/o refrigeración o en los que este acceso no es constante. Dada la estabilidad mejorada a temperatura ambiente, se puede tomar una muestra en cualquier ubicación remota, por ejemplo, a título meramente enunciativo, en un lugar de África en el que se produce un brote de malaria, y la muestra se puede transportar a los Estados Unidos o Europa para el análisis de diagnóstico en el laboratorio. Dado que las formulaciones de recogida divulgadas son estables a temperatura ambiente o inferior, y preferiblemente incluso a temperaturas tropicales o subtropicales durante un tiempo, se pueden tomar muestras de forma rutinaria sobre el terreno sin preocuparse por el hecho de que los propios reactivos incluidos (tales como controles de ARN) se degraden hasta que la muestra se pueda analizar, típicamente en una ubicación remota con respecto al lugar de recogida.

Las composiciones de la presente divulgación pueden ser cualquier formulación acuosa adecuada descrita en el presente, incluyendo, a título meramente enunciativo, una solución, suspensión (incluyendo suspensión coloidal), lodos, emulsión, homogeneizado o similares. Una formulación acuosa preferible es una solución y, por tanto, el término "solución" se ha utilizado en los ejemplos de toda la descripción detallada de las realizaciones preferibles para referirse a cualquiera de las composiciones acuosas de la presente divulgación.

4.1 Recogida de muestras para los laboratorios de diagnóstico clínico

La recogida es el primer paso de las plataformas de diagnóstico o protocolos moleculares que requieren la detección de cantidades potencialmente mínimas de ácidos nucleicos de patógenos, incluyendo virus. Para facilitar los avances dinámicos de las estrategias de detección basadas en ácidos nucleicos y su integración en los laboratorios de diagnóstico convencionales, existe una necesidad apremiante de sistemas de recogida fiables, sólidos y normalizados desarrollados de forma específica para ser utilizados para la detección basada en ácidos nucleicos en una fase posterior del proceso, como las mencionadas plataformas. Alternativamente, la invención se puede adaptar para el transporte de ácidos nucleicos desde un quirófano o consulta médica o para su transporte a un centro regional, como un hospital.

Una muestra clínica o veterinaria de un sistema de recogida de muestras forenses o ambientales puede incluir una o más herramientas de recogida y uno o más reactivos a fin de conseguir de forma eficiente: 1) obtener un alto rendimiento de una muestra adecuada más allá de lo que resulta posible en la técnica en estos momentos; 2) inactivar los patógenos biológicos potencialmente infecciosos, de forma que dejen de ser viables y se puedan manipular, enviar o transportar con unas precauciones mínimas en materia de liberación o contaminación de patógenos; o 3) estabilizar y preservar de forma efectiva los polímeros de ARN/ADN "desnudo" lisados frente a la

hidrólisis o degradación por nucleasa durante periodos prolongados a temperaturas ambiente hasta que las muestras se puedan procesar en el laboratorio de diagnóstico, y preferiblemente para conseguir dos de estos objetivos o los tres.

- 5 Las soluciones de recogida/transporte de la presente invención pueden ofrecer una serie de mejoras y ventajas con respecto a las existentes actualmente en la técnica. Entre las ventajas se incluyen, a título meramente enunciativo, una o más de las siguientes:

inactivación, eliminación y/o lisis de microbios, virus o patógenos;

destrucción y/o inactivación de nucleasas exógenas o endógenas, incluyendo, a título meramente enunciativo, RNasa y/o DNasa;

- 10 compatibilidad con diversos sistemas convencionales de extracción de ácido nucleico, purificación y amplificación;

preservación de la integridad del ARN y/o ADN de la muestra;

facilitación del envío y transporte a temperaturas ambiente, incluso durante periodos de tiempo prolongados o con variaciones de temperaturas extremas; e

- 15 idoneidad para el almacenamiento a corto plazo (varias horas a varios días), a medio plazo (varios días a varias semanas) o a largo plazo (varias semanas a varios meses) de los ácidos nucleicos aislados.

- Las composiciones divulgadas resultan particularmente adecuadas para estudios en el punto de atención o de campo, atención sanitaria o ensayos domiciliarios, evaluaciones en unidades de triaje/emergencias y urgencias, toma de muestras móviles forenses, patológicas o epidemiológicas, investigaciones de la escena del crimen, pruebas de paternidad, evaluaciones genéticas previas y posteriores al embarazo, ensayos en casos de violación/incesto y asesoramiento familiar, exámenes confidenciales y de enfermedades de transmisión sexual, incluyendo, a título meramente enunciativo, VIH, sífilis, clamidia, gonorrea y otras enfermedades venéreas y similares; y pueden resultar especialmente útiles durante el seguimiento, la etiología y control de enfermedades epidémicas o pandémicas tanto de poblaciones humanas como animales en el plano nacional e internacional. Las composiciones pueden tener especial relevancia para recopilar y analizar muestras de virus influenza, incluyendo, a título meramente enunciativo, para predecir y ayudar a gestionar la tendencia, así como para gestionar una pandemia inminente o en curso.

- En determinados aspectos de la presente divulgación, el ácido o los ácidos nucleicos aislados a través de los métodos de la presente invención pueden servir de plantilla en una o más aplicaciones posteriores de biología molecular, ensayos o técnicas, incluyendo, a título meramente enunciativo, toma de huellas genéticas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP); análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP); análisis de oligonucleótidos específicos de alelos (ASOA); análisis de microsatélites; hibridación Southern; hibridación Northern; PCR del número variable de repeticiones en tándem (VNTR); hibridación por transferencia puntiforme (dot-blot); PCR cuantitativa en tiempo real; conjunto ciclismo polimerasa (PCA); PCR anidada; PCR cuantitativa (Q-PCR); PCR asimétrica; toma de huellas de ADN; genotipo del polimorfismo de nucleótido simple (SNP); PCR de transcripción inversa (RT-PCR); PCR múltiple (m-PCR); amplificación por sonda dependiente de ligandos múltiples (MLPA); PCR mediada por ligandos (LmPCR); PCR específica de metilación (MPCR); amplificación dependiente de helicasa (HDA); PCR de solapamiento-extensión (OE-PCR); amplificación del genoma completo (WGA); aislamiento de plásmidos; amplificación de alelos; mutagénesis de sitio dirigido; examen genético de alto rendimiento o similares, o cualquier combinación de estos.

- Las composiciones de la presente invención proporcionan soluciones de recogida de muestras clínicas/ambientales que consiguen de forma eficaz al menos tres de los objetivos siguientes y preferiblemente todos ellos: 1) eliminar o inactivar patógenos potencialmente infecciosos, de forma que dejen de ser viables y que se puedan manipular, enviar o transportar de forma segura; 2) lisar células para la liberación de ARN y/o ADN de la muestra biológica incluida en el sistema de recogida; 3) proteger los polinucleótidos liberados o "desnudos" de la muestra frente a una posterior hidrólisis o degradación enzimática, modificación o inactivación; y 4) prolongar el marco temporal convencional para el almacenamiento y transporte de la muestra procesada en diversas condiciones de temperatura ambiente (inferior o superior a la temperatura óptima), a fin de mantener la fidelidad e integridad de los polinucleótidos liberados hasta que el material biológico pueda ser procesado o analizado en las instalaciones de diagnóstico o el laboratorio analítico.

- En un aspecto de ejemplo de la presente divulgación, los métodos y formulaciones mantienen al menos una estabilidad sustancial de los ácidos nucleicos de la muestra durante un periodo de tiempo ampliado, por ejemplo, hasta unos 15 días, preferiblemente hasta unos 30 días, o más preferiblemente hasta unos 60 días o más, sin refrigeración ni congelación de la muestra, e incluso cuando se almacenan a temperatura ambiente, incluyendo temperaturas templadas, climas subtropicales o tropicales y similares. En otros aspectos de la presente divulgación, el uso de las composiciones divulgadas para preparar ácidos nucleicos a partir de una muestra de origen biológico resulta recomendable para mantener al menos una integridad y fidelidad sustanciales de los ácidos nucleicos liberados por la muestra durante periodos prolongados, incluyendo, a título meramente enunciativo, al menos entre 5 y 10 días aproximadamente, preferiblemente al menos entre 10 y 20 días, más preferiblemente al menos entre 15 y

25 días, o más preferiblemente aún, al menos entre 20 y 30 días o más, sin necesidad de refrigerar ni congelar la muestra en el momento de su recogida ni hasta su posterior procesamiento (o ambas cosas) en el plazo de unas horas, días, semanas o incluso meses desde que es originalmente recogida y colocada en las formulaciones de almacenamiento/recogida/transporte/estabilización divulgadas.

- 5 Los ácidos nucleicos obtenidos de muestras biológicas en la práctica de los métodos divulgados son ventajosamente compatibles con una serie de metodologías convencionales de aislamiento, purificación, detección y/o análisis molecular y de diagnóstico. Las composiciones divulgadas facilitan el almacenamiento de recuperación y el transporte de poblaciones de polinucleótidos estabilizados y sustancialmente no degradados para su uso en diversas metodologías posteriores, incluyendo, a título meramente enunciativo, aislamiento de ácido nucleico, purificación, amplificación y pruebas de análisis molecular y/o de diagnóstico, ensayos, análisis o caracterización y similares.

4.2 Ejemplos de kits comerciales de la presente invención

A continuación se proporcionan ejemplos de kits comerciales que emplean composiciones PrimeStore™ de la presente invención (FIG. 5).

15 4.2.1 Sistema de recogida embolsado

Tubo de 5 ml que contiene 1,5 ml de PrimeStore™ Solution; tampón impregnado (p. ej., FlockedSWABS® [Copan Diagnostics, Inc., Murrieta, CA, USA]); e instrucciones de recogida y/o procesamiento de muestras, (envasados, p. ej., en 50 bolsas/unidad) (véanse las FIG. 4A, 4B, 4C, 4D y 4E para una demostración esquemática de estos sistemas).

20 4.2.2 Solución madre de PrimeStore™ (p. ej., botellas de 25 ml)

Una vez formulada, la solución madre de PrimeStore™ es estable a 4 °C o menos durante periodos de al menos un año o más. También se ha demostrado que la formulación de PrimeStore™ Solution es estable a temperatura ambiente (p. ej., a unos 20-30°C) durante periodos de entre tres y seis meses o más.

- 25 Una vez que la muestra se pone en contacto con una formulación PrimeStore™ como la divulgada en el presente, cabe esperar razonablemente que sea almacenada de forma indefinida a temperaturas de 0°C o inferiores, y al menos un año o más en condiciones de refrigeración (p. ej., 4°C y al menos 30 días o más a temperatura ambiente (p. ej., 20-30°C), sin una pérdida significativa de su composición en ácidos nucleicos, fidelidad o integridad de la muestra. Por ejemplo, a título meramente enunciativo, la integridad de una población de polinucleótidos obtenidos de la muestra se mantiene al menos sustancialmente, y preferiblemente por completo, sin una degradación detectable, cuando la composición que comprende la muestra se almacena a una temperatura de entre -20 °C hasta 40 °C durante un periodo de entre 30 y 60 días.

El kit también puede incluir uno o más viales que incluyen las composiciones de la invención y uno o más dispositivos de extracción para ayudar a liberar y separar los ácidos nucleicos para obtener al menos sustancialmente ARN/ADN puro para su análisis.

35 4.2.3 Muestra ambiental y sistemas de almacenamiento

Viales de recogida de 0,1, 0,2, 0,5, 1, 2, o 3 ml, que contiene cada uno 0,1 ml, 0,2 ml, 0,25 ml, 0,5 ml, 0,75 ml o 1 ml de solución PrimeStore™; e instrucciones para la recogida y/o el procesamiento de muestras (envasados, p. ej., en 10 viales/unidad). Los viales de recogida pueden tener un tamaño superior si resulta necesario, en función del método de recogida propuesto.

40 4.3 Definiciones

A efectos del presente, los términos "aproximado" y "aproximadamente" resultan intercambiables y por lo general se entenderá que se refieren a un intervalo de cifras cercano a un número determinado, así como a todos los números incluidos en el intervalo de cifras citado (por ejemplo, "aproximadamente entre 5 y 15" significa "desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15", a menos que se indique lo contrario. Por otra parte, se entenderá que todos los intervalos numéricos del presente incluyen todos los números enteros incluidos en el intervalo.

- 45 A efectos del presente, se entenderá que el término "vehículo" incluye todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, diluyentes, soluciones tampón, agentes isotónicos, soluciones, suspensiones, coloides, inertes o similares, o una combinación de estos elementos que resulte farmacéuticamente aceptable para su administración al animal correspondiente o aceptable a efectos del diagnóstico, según corresponda. El uso de uno o más vehículos de administración para los compuestos químicos en general, y para los péptidos y epitopos en particular, es bien conocido por los expertos en la técnica farmacéutica. Salvo en la medida en que algún agente o medio convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones de diagnóstico, profilácticas y terapéuticas. También se puede incorporar uno o más ingredientes activos complementarios o administrarse conjuntamente con una o más de las composiciones inmunogénicas divulgadas.

- 55 A efectos del presente, 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 N-glicósido de una base de purina o pirimidina, o bases de purina o pirimidina modificadas (incluyendo sitios

abásicos). A efectos del presente, el término "ácido nucleico" también incluye polímeros de ribonucleósidos o desoxirribonucleósidos covalentemente unidos, típicamente mediante enlaces de fosfodiéster entre subunidades, pero en algunos casos mediante fosforotioatos, metilfosfonatos y similares. "Ácidos nucleicos" incluyen ADN de cadena simple y doble, así como ARN de cadena simple y doble. Entre los ejemplos de ácidos nucleicos se incluyen, a título meramente enunciativo, ADNg; ARNhn; ARNm; ARNr; ARN funcional, micro ARN (miARN), ARN pequeño de interferencia (ARNpi), ARN pequeño nucleolar (snORNA); ARN pequeño nuclear (ARNpn); ARN pequeño temporal (ARNpt) y similares, así como cualquier combinación de estos elementos.

A efectos del presente, los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se utilizan de forma intercambiable e incluyen moléculas que comprenden al menos un enlace amida que se une a dos o más residuos de aminoácidos. A pesar de que se han utilizado de forma intercambiable, por lo general un péptido es una molécula relativamente corta (p. ej., de entre 2 y 100 residuos de aminoácidos de longitud), mientras que una proteína o polipéptido es un polímero relativamente más largo (p. ej., 100 o más residuos de longitud). Sin embargo, a menos que se defina específicamente por la longitud de una cadena, los términos péptido, polipéptido y proteína se emplean de forma intercambiable.

A efectos del presente, "muestra" incluye todo lo que contiene o se presume que contiene una sustancia de interés. Puede ser una composición de sustancia que contiene ácido nucleico, proteína u otra molécula de interés. Por tanto, el término "muestra" puede incluir una solución, célula, tejido o población de uno o más de estos elementos que contiene una población de ácidos nucleicos (ADN genómico, ADNc, ARN, proteína, otras moléculas celulares, etc.). A efectos del presente, los términos "fuente de ácido nucleico" y "muestra" se utilizan de forma intercambiable en un sentido amplio y pretenden abarcar diversas fuentes biológicas que contienen ácidos nucleicos, proteína, una o más biomoléculas de interés o cualquier combinación de estos elementos. Entre los ejemplos de muestras biológicas se incluyen, a título meramente enunciativo, sangre completa, plasma, suero, esputo, orina, heces, leucocitos, eritrocitos, capa leucocitaria, tampones impregnados (incluyendo, a título meramente enunciativo, bucales, de garganta, vaginales, uretrales, cervicales, rectales, de lesiones, abscesos, nasofaríngeos y similares), orina, heces, esputo, lágrimas, moco, saliva, semen, fluidos vaginales, fluido linfático, líquido amniótico, fluido espinal o cerebroespinal, efusiones peritoneales, efusiones pleurales, exudados, punciones, frotis epiteliales, biopsias, muestras de médula espinal, fluido de quistes o abscesos, líquido sinovial, humor vítreo o acuoso, lavados o aspirados oculares, lavados o aspirados pulmonares, así como órganos y tejidos, incluyendo, a título meramente enunciativo, hígado, bazo, riñón, pulmón, intestino, cerebro, corazón, músculo, páncreas y similares o cualquier combinación de estos elementos. En algunas realizaciones, la muestra puede ser o proceder de un organismo que actúa como vector, como un mosquito o garrapata, u otro insecto.

A efectos del presente, las células de cultivos de tejidos, incluyendo materiales explantados, células primarias, líneas de células secundarias y similares, así como lisados, homogenizados, extractos o materiales obtenidos de cualquier célula, se incluyen asimismo en el significado del término "muestra biológica". Los microorganismos (incluyendo, a título meramente enunciativo, procariotas como arqueobacterias y eubacterias; cianobacterias; hongos, levaduras, mohos, actinomicetos; espiroquetas y micoplasmas); virus (incluyendo, a título meramente enunciativo, Orthohepadnavirus [incluyendo, p. ej., virus de la hepatitis A, B y C], papilomavirus humano, Flavivirus [incluyendo, p. ej., el virus del dengue], Lyssavirus [incluyendo, p. ej., el virus de la rabia], Morbillivirus [incluyendo, p. ej., el virus del sarampión], Simplexvirus [incluyendo, p. ej., el virus del herpes simple], Polyomavirus, Rubulavirus [incluyendo, p. ej., el virus de las paperas], Rubivirus [incluyendo, p. ej., el virus de la rubeola], Varicellovirus [incluyendo, p. ej., el virus de la varicela], rotavirus, coronavirus, citomegalovirus, adenovirus, virus adenoasociados, baculovirus, parvovirus, retrovirus, vaccinia, poxvirus, y similares), algas, protozoos, protistas, plantas, briofitas, y similares, así como cualquier combinación de cualquiera de los elementos anteriores que pueda estar presente en una muestra biológica se incluyen en el ámbito de la invención, al igual que los materiales obtenidos de entornos clínicos o forenses que contengan uno o más ácidos nucleicos. Los expertos en la técnica apreciarán asimismo que los lisados, extractos o materiales obtenidos de cualquiera de los anteriores ejemplos de muestras biológicas se encuentran también incluidos en el ámbito de la invención.

A efectos del presente, el término "solución tampón" incluye una o más composiciones, o soluciones acuosas de estas, que resisten la fluctuación del pH cuando se añade un ácido o un alcalí a la solución o composición que incluye la solución tampón. Esta resistencia a un cambio de pH se debe a las propiedades amortiguadoras de estas soluciones y puede ser una función de uno o más compuestos concretos incluidos en la composición. Por tanto, las soluciones u otras composiciones que presentan actividad amortiguadora se denominan tampones o soluciones tampón. Por lo general, las soluciones también no tienen una capacidad ilimitada para mantener el pH de una solución o composición; por lo contrario, normalmente son capaces de mantener el pH dentro de ciertos rangos, por ejemplo en un pH de entre 5 y 7.

A efectos del presente, el término "molécula biológica" se refiere a cualquier molécula que se encuentra en el interior de una célula o producida por un organismo vivo, incluyendo virus. Esto puede incluir, a título meramente enunciativo, ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos. A efectos del presente, una "célula" se refiere a la unidad estructural más pequeña de un organismo que es capaz de funcionar independientemente y que se compone de citoplasma y diversos organelos rodeados por una membrana celular. Esto puede incluir, a título meramente enunciativo, células que funcionan independientemente, como bacterias y protistas, o células que viven en el interior de un organismo de mayor tamaño, como leucocitos y eritrocitos. Conforme a la definición del presente, una célula puede no tener un núcleo, como un glóbulo rojo humano maduro.

En la práctica de la invención, las muestras se pueden utilizar frescas o tras haber estado almacenadas durante un periodo de tiempo, o durante un periodo de tiempo prolongado, incluyendo, por ejemplo, muestras criopreservadas y similares, y pueden incluir materiales de origen clínico, veterinario, ambiental o forense; pueden ser aisladas de alimentos, bebidas, materias primas, fuentes de agua potable, corrientes de aguas residuales, residuos o efluentes industriales, fuentes de agua naturales, suelos, fuentes suspendidas, poblaciones pandémicas o epidémicas, muestras epidemiológicas, materiales de investigación, muestras patológicas, agentes sospechosos de bioterrorismo, pruebas de una escena del crimen y similares.

A efectos del presente, el término "paciente" (al que también se hace referencia de forma intercambiable como "huésped" o "sujeto") se refiere a cualquier huésped que pueda servir como fuente de una o más de las muestras biológicas que se mencionan en el presente. En determinados aspectos, el donante será un animal vertebrado, por lo que se pretende referirse a cualquier especie animal (y preferiblemente una especie de mamífero como un ser humano). En determinados aspectos, por "paciente" se entiende cualquier huésped animal, incluyendo, a título meramente enunciativo, primates humanos y no humanos, aves, reptiles, anfibios, bovinos, caninos, caprinos, caninos, corvinos, epinos, equinos, felinos, hircinos, lapinos, leporinos, lupinos, murinos, ovinos, porcinos, racinos, vulpinos y similares, incluyendo, a título meramente enunciativo, ganado domesticado, rebaños o animales o aves migratorias, especies exóticas o zoológicas, así como animales de compañía, mascotas y cualquier animal sometido a cuidado veterinario. Algunos aspectos de la presente divulgación también se pueden utilizar para controlar el brote de enfermedades, su progresión y estadísticas epidemiológicas para diversas poblaciones globales, incluyendo, a título meramente enunciativo, caquexia en ungulados, tuberculosis, ébola, SARS e influencias aviarias. En determinadas realizaciones, las muestras serán preferiblemente de origen mamífero y más preferiblemente de origen humano.

A efectos del presente, el término "caotro" o "agente caotrópico" incluyen sustancias que causan alteraciones en una proteína o ácido nucleico, por ejemplo, a título meramente enunciativo, alterando la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de una proteína o un ácido nucleico al tiempo que deja intacta la estructura primaria.

A efectos del presente, el término "p. ej.," se utiliza únicamente a modo de ejemplo, sin fines limitadores, y no se interpretará que se hace referencia únicamente a los elementos enumerados de forma explícita en la memoria.

A efectos del presente, el término "sustancialmente libre" o "esencialmente libre" significa típicamente que una composición contiene menos del 10% en peso, preferiblemente menos del 5% en peso y más preferiblemente menos del 1% en peso de un compuesto. En una realización preferible, estos términos se refieren a menos de aproximadamente un 0,5% en peso, más preferiblemente menos de un 0,1% en peso o incluso menos de un 0,01% en peso. Los términos abarcan asimismo una composición completamente libre de un compuesto u otra propiedad señalada. Con respecto a la degradación o el deterioro, el término "sustancial" también puede referirse a los porcentajes en peso anteriormente señalados, de forma que prevenir una degradación sustancial se referiría a una pérdida por degradación inferior al 15% en peso, inferior al 10% en peso, preferiblemente inferior al 5% en peso, etc. En otras realizaciones, estos términos se refieren a meros porcentajes y no a porcentajes en peso, por ejemplo con respecto al término "sustancialmente no patógeno", donde el término "sustancialmente" se refiere a que deja menos de un 10%, menos de un 5%, etc., de la actividad patogénica.

De acuerdo con las convenciones del Derecho de patentes tradicionales, los términos "un" y "una" cuando se utilizan en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones, significan "uno/una o más".

5. EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones ilustrativas de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas divulgadas en los siguientes ejemplos representan técnicas descubiertas para funcionar bien en la práctica de la invención y, por tanto, se considerarán que constituyen modos preferibles para esta práctica.

5.1 EJEMPLO 1 - FORMULACIÓN DE EJEMPLOS DE SOLUCIONES DE ALMACENAMIENTO

El presente ejemplo proporciona una formulación general de las composiciones PrimeStore™ (PanFlu) de la presente invención. Los ejemplos de formulaciones se detallan asimismo en los Ejemplos 2-5.

Materiales

Tiocianato de guanidina, citrato de sodio, Antifoam A® Concentrate, y N-laurilsarcosina, sal de sodio, todo ello adquirido en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Tris(2-carboxietil)fosfina hidrocloreto (TCEP) adquirido en Soltec Ventures Inc. (Beverly, MA, USA). 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (TRIS) adquirido en Applied Biosystems/Ambion (Austin, TX, USA), ácido 2-[2-(Bis(carboximetil)amino)etil-(carboximetil)amino]acético (EDTA) GIBCO® Ultra Pure adquirido en Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, USA). Todos los demás reactivos son comercializados por Sigma-Aldrich o USB Corporation.

TABLA 1

RANGOS DE FORMULACIÓN DE EJEMPLOS DE COMPONENTES PARA LA PREPARACIÓN DE COMPOSICIONES PRIMESTORE™

Reactivo	Rangos de concentración finales del componente
1. Un caotropo, p. ej., Tiocianato de guanidina o Hidrocloruro de guanidina o Isocianato de guanidina 2. Un detergente aniónico, p. ej.: N-lauril sarcosina {entre otros sal de sodio) o Dodecil sulfato sódico, Dodecil sulfato de litio, Glicocolato sódico, Desoxicolato sódico, Taurodesoxicolato sódico, o Colato sódico 3. Un agente reductor, p. ej.: TCEP o β -ME, DTT, formamida, o DMSO 4. Un agente quelante, p. ej.: Citrato de sodio o EDTA, EGTA, HEDTA, DTP A, NTA, o APC A 5. Una solución tampón (p. ej., TRIS, HEPES, MOPS, MES, Bis-Tris, etc.) 6. Un ácido (p. ej., HCl o ácido cítrico) 7. Agua libre de nucleasa Opcionalmente uno o más de los elementos siguientes: 8. Un agente tensoactivo/antiespumante, p. ej.: Antifoam A® o Tween® 9. Un alcohol (p. ej., metanol, etanol, propanol, etc.) 10. ARN o ADN	 entre aprox. 0,5 M y 6 M entre aprox. 0,5 M y 6 M entre aprox. 0,5 M y 6 M entre aprox. 0,15% y 1% (peso/vol.) Igual Igual Igual Igual Igual entre aprox. 0,1% y 1% (peso/vol.) entre aprox. 0,5 mM y 30 mM entre aprox. 0,05 M y 0,3 M entre aprox. 0,5 mM y 50 mM entre aprox. 0,01 mM y 1 mM entre aprox. 1 mM y 1 M q.s. hasta ajustar a un pH de aprox. 6 a 7, preferiblemente de 6.4 a 6.8. q.s. hasta el volumen final deseado entre aprox. 0,0001 % y 0,3% (peso/vol.) entre aprox. 1% y 25% (vol./vol.) entre aprox. 1 pg y 1 μ g/mL

5.2 EJEMPLO 2 - FORMULACIÓN DE UN EJEMPLO DE SOLUCIÓN DE ALMACENAMIENTO

5 El presente ejemplo describe un primer ejemplo de formulación de las composiciones de la invención. Esta formulación también ha sido denominada alternativamente por los inventores "PrimeStore™ Solution" o "PSS" versión 1.

TABLA 2

PREPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PRIMESTORE™ (VER. 1)

Reactivo	Concentración final
Tiocianato de guanidina	4 M
Citrato de sodio	30 mM
Dodecil sulfato sódico	0,25% (peso/vol.)
7V-lauril sarcosina, sal de sodio	0,25% (peso/vol.)

2-mercaptoetanol (β -ME)	0,1 M
Antifoam A	0,1% (peso/vol.)
Ácido cítrico	q.s. para ajustar a un pH de 6.5
Agua libre de nucleasa	11,82 mL

5.3 EJEMPLO 3 - PREPARACIÓN DE UN SEGUNDO EJEMPLO DE SOLUCIÓN DE ALMACENAMIENTO

- 5 El presente ejemplo describe la preparación de otro ejemplo de solución de almacenamiento de la presente invención. Esta formulación también ha sido denominada alternativamente por los inventores PrimeStore™ versión 2.

TABLA 3

10 PREPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN PRIMESTORE™ (VER. 2)

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tiocianato de guanidina	35,488 gm	3M
TCEP	0,02867 gm	1 mM
Citrato de sodio	0,2931 gm	10 mM
7V-lauril sarcosina, sal de sodio (NLS)	0,5 gm	0,5%
Antifoam A (solución al 10%)	200 μ L	0,002%
TRIS (1 M)	10 mL	100 mM
EDTA (0,5 M)	20 μ L	0,1 mM
Ácido hidrolórico (HO)	q.s. para ajustar a un pH de 6.7	--
Agua libre de nucleasa	q.s. hasta 100 mL	--

5.4 EJEMPLO 4 - PREPARACIÓN DE UN TERCER EJEMPLO DE SOLUCIÓN DE ALMACENAMIENTO

- 15 El presente ejemplo describe la preparación de otro ejemplo de solución de almacenamiento de la presente invención. Esta formulación también ha sido denominada alternativamente por los inventores PrimeStore™ versión 2.2.

Tabla 4

Preparación de la composición PrimeStore™ (ver. 2.2)

Reactivo	Cantidad	Concentración final
Tiocianato de guanidina	35,488 gm	3M
TCEP	0,02867 gm	1 mM
Citrato de sodio	0,2931 gm	10 mM
N-lauril sarcosina, sal de sodio (NLS)	0,5 gm	0,5%
Antifoam A (solución al 10%)	200 μ L	0,002%
TRIS (1 M)	10 mL	100 mM
EDTA (0,5 M)	20 μ L	0,1 mM
Etanol, grado molecular (96-100%)	23 mL	23% (vol./vol.)
Ácido hidrolórico (HC1)	q.s. para ajustar a un pH de 6.7	--

Agua libre de nucleasa

q.s. hasta 100 mL

--

Ejemplo de protocolo para la preparación de PrimeStore™ Solution (ver. 2.2)

1. Añadir 40 ml de agua libre de nucleasa en una probeta limpia con una barra de agitar.
- 5 2. Colocar la probeta en una placa caliente/agitador y ajustar la temperatura a 60-65 ° C. Ajustar la velocidad de agitación en el nivel medio.
3. Añadir 35,488 gm de tiocianato de guanidina lentamente al agua dejando que se disuelva.
4. Añadir 0,0287 gm de TCEP a la probeta e incrementar la velocidad de agitación para ayudar a disolver los cristales.
- 10 5. Añadir 0,2931 gm de citrato de sodio a la probeta.
6. Añadir 0,5 gm de NLS a la solución. Aumentar la velocidad de agitación para crear un remolino en la probeta. Esto incorporará el NLS a la solución y ayudará a disolver el reactivo.
7. Agitar una solución preparada Antifoam A al 10% (1 ml Antifoam A Concentrate + 9 ml agua libre de nucleasa). Pipetear 200 µl de la solución Antifoam A al 10% en la solución.
- 15 8. Pipetear 10 ml de 1 M TRIS en la solución.
9. Pipetear 20 µl de 0,5 M EDTA en la solución.
10. Incrementar la temperatura para llevar la solución a 75-80 °C y agitar durante 3-5 minutos.
11. Retirar la probeta del calor y dejar que la solución se enfríe hasta la temperatura ambiente (22-25 °C).
12. Añadir 23 ml de etanol a la solución y mezclar bien.
- 20 13. Ajustar el pH a 6.7 con HCl.
14. Verter la solución en un tubo cilíndrico graduado y limpio de 100 ml.
15. Añadir agua libre de nucleasa hasta alcanzar un volumen de 100 ml.
16. Transferir la solución a un contenedor estéril etiquetado. Almacenar a temperatura ambiente (22-25 °C). *Nota: Preferiblemente, comprobar que cada uno de los reactivos está completamente disuelto antes de añadir el siguiente.

25 5.5 EJEMPLO 5 - COMPARACIÓN DE SOLUCIONES PRIMESTORE™ CON FORMULACIONES CONVENCIONALES

Una muestra de tejido nasal homogeneizado de una rata aldonera (*Sigmodon hispidus*) a la que se le había administrado el virus influenza A (H3N2) o una muestra de un virus clínico de influenza A humana (H1N1) recogido por lavado nasal clínico humano durante la temporada 2006-07 se introdujo en PrimeStore™ Solution (Ver. 1) y se sometió a ensayo en comparación con la formulación y el protocolo de lisis correspondientes, y con el procedimiento de extracción de tres kits disponibles en el mercado: RNAqueous®-Micro (Ambion, Austin, TX, USA), QIAamp Viral RNA Mini Kit (Catalogue #52904, Qiagen, Valencia, CA, USA), y MagMax AI/ND Viral RNA Isolation Kit (Catalogue #AM1929, Ambion). La eficiencia de la extracción se evaluó utilizando el sistema de detección de secuencias ABI 7500 con el método del umbral del ciclo (CT) comparativo (véase la FIG. 2). En la FIG. 2, "delta Rn" representa la señal del reporter fluorescente menos una cantidad de partida. Tal y como se muestra en la FIG. 1 y la FIG. 2, los resultados relativos del CT y las copias virales detectadas fueron óptimos cuando se usó la formulación de fijación en lugar de la solución tampón de lisis convencional correspondiente de cada uno de los kits comerciales. En estos dos tipos de muestras, las composiciones de la invención funcionaron mejor que los dos kits convencionales a efectos de la extracción. La composición PrimeStore™ Solution (ver. 1) también demostró una buena compatibilidad con los kits de extracción de ácido nucleico disponibles en el mercado. La FIG. 1 ilustra los resultados de extracción de ARN cuando se utilizó la versión 1 de PrimeStore™ Solution conjuntamente con tres kits disponibles en el mercado: Qiagen Viral Mini, Ambion RNAqueous Mini, y Ambion AI/NCD MagMax. Tal y como se muestra en la FIG. 1, cuando se sustituyó la solución tampón de lisis del kit de extracción por la formulación de fijación (denominada en la figura "One-Step+"), se consiguió una extracción superior de ácido nucleico en comparación con la extracción realizada utilizando los kits de acuerdo con el protocolo estándar (denominado en la figura "One-Step-". La eficiencia de la extracción se midió mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de transcripción inversa (RT) en tiempo real (r) [rRT-PCR].

La FIG. 3 muestra la preservación de ARN desnudo en PrimeStore™ Solution en comparación con la preservación en una solución anterior, utilizando agua como control. Tal y como se muestra en la FIG. 3, la detección (por fluorescencia) se produjo en el ciclo de amplificación más temprano en el caso del ARN guardado en PrimeStore™ Solution (ver. 1) en todos los puntos temporales sometidos a ensayo.

5.6 EJEMPLO 6 - SOLUCIÓN PRIMESTORE™ PARA LA RECOGIDA DE MUESTRAS DE LAVADO NASAL

Se realizó un estudio de detección clínico prospectivo utilizando muestras de lavado nasal de: 1) pacientes pediátricos sintomáticos, y 2) miembros de la familia sintomáticos o asintomáticos. Detección del virus influenza comparando muestras de lavado nasal recogidas en PrimeStore™ Solution y Viral Transport Medium (VTM) mediante RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) y cultivo tradicional, respectivamente. La caracterización genética de los genes del virus influenza que codifican hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y proteínas de superficie de la matriz (MA) se realizó utilizando muestras seleccionadas de lavado nasal preservadas en PrimeStore™ Solution para evaluar la efectividad de la vacuna y la sensibilidad al fármaco dentro de las cepas virales.

El virus influenza es un virus respiratorio basado en el ARN altamente mutante de forma sustancial y es responsable de más de 200 000 hospitalizaciones y unas 36 000 muertes cada año en los Estados Unidos. La aparición generalizada de variantes mutadas de influenza entre los virus humanos que circulan actualmente provocó un cambio de los tres componentes de la vacuna para la siguiente temporada 2008/2009. El incremento de la morbilidad y mortalidad durante la temporada 2007/2008 incluyó 72 muertes pediátricas asociadas con influenza y resistencia sostenida a los fármacos (oseltamivir [TamiFlu®, Roche Laboratories, Inc., Nutley, NJ, USA] y adamantadina) entre las cepas en circulación.

5.6.1 Materiales y métodos

Un total de 100 pacientes pediátricos (índice) que cumplían los criterios de caso clínico de infección por influenza y 126 contactos familiares participaron en el estudio. Los lavados nasales se introdujeron en PrimeStore™ Solution y Universal Viral Transport Medium (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) y se analizaron mediante rRT-PCR o análisis de cultivo, respectivamente. La rRT-PCR se realizó utilizando sondas/cebadores específicos para influenza tipo (A o B) y subtipo (H3, H1, H5) según Daum et al. (2007). Se realizó otra caracterización genética de muestras clínicas seleccionadas preservadas en PrimeStore™ Solution utilizando RT-PCR estándar y secuenciación de nucleótidos directa de las proteínas virales MA, NA y hemaglutinina (HA).

5.6.2 Resultados

Del total de muestras evaluadas (N = 226; índice 100, 126 contactos familiares), 66 (29%) dieron positivo en el virus influenza (45 H3N2, 2 H1N1 y 19 B) por rRT-PCR. La rRT-PCR de lavados nasales preservados en PrimeStore™ Solution detectó virus influenza en 11 (9 gripe A y 2 gripe B) que no habían sido detectados en el cultivo (Tabla 5 y Tabla 6). De estas 11 muestras, cinco procedían de pacientes participantes como contactos familiares.

El análisis filogenético de los genes de HA del virus influenza A y B mostraron una mutación en comparación con las cepas de la vacuna de 2007/2008 y revelaron una homología genética superior con las cepas de la vacuna Brisbane de 2008/2009. Se observaron algunas diferencias genéticas en los virus entre los miembros de las familias, particularmente entre las cepas de influenza A (H3N2). Los análisis MA revelaron una resistencia al adamantano en todas las cepas de la influenza A H3N2, y sensibilidad en los dos virus H1N1. Todas las cepas de la influenza B (n = 18) eran sensibles a los fármacos inhibidores de la neuraminidasa zanamivir (Relenza® GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC, USA) y oseltamivir (Tamiflu® Roche) basados en la presencia de ácido aspártico (D) en el aminoácido 197 (numeración de influenza B) del gen de NA.

Rt-pcr en tiempo real frente al cultivo

La rRT-PCR es superior al cultivo tradicional para la detección del virus influenza de las muestras de lavado nasal originales preservadas en soluciones PrimeStore™: la influenza se detectó en el plazo de dos horas (c.f. 2 a 7 días en los métodos de cultivo convencionales); y los análisis fueron más sensibles (11 muestras; 9 gripe A y 2 gripe B detectados por debajo de los límites del cultivo). Por otra parte, el uso de métodos de diagnóstico molecular en lugar del cultivo de organismos convencional no propagó virus potencialmente infecciosos y, al mismo tiempo, proporcionó el tipo y subtipo de virus influenza.

Análisis genético

Conexión con la vacuna

Cepas H3N2: El análisis del gen HA1 de la hemaglutinina (HA) de influenza A reveló una mutación genética que incluía diferencias en cinco aminoácidos en todas las cepas Texas, en comparación con la cepa de la vacuna 2007-08 A/Wisconsin/67/2005. Una mutación de HA1 observada en todas las cepas Texas (D122N) es un potencial punto de glicosilación. Todas las cepas A/Texas (H3N2) mostraron una homología de HA superior (99,0-99,7%) en comparación con la cepa recién seleccionada 2008-09 A/Brisbane/10/2007.

Cepas H1N1: El gen HA1 de hemaglutinina de 2 influenza A (H1N1) presentaba cambios en siete aminoácidos en comparación con la cepa de la vacuna A/Solomon Island/3/2006. Cuatro sustituciones (R90K, T145V, K210T y E290K) se encontraban dentro de puntos de combinación de anticuerpos HI conocidos. Las dos cepas Texas H1N1 mostraron una mayor homología de HA (98,8% y 99,4%) en comparación con la cepa de la vacuna recién seleccionada 2008-09 A/Brisbane/59/2007.

Cepas de la influenza B: El análisis de los genes HA1 de la hemaglutinina y neuraminidasa reveló que todas las cepas Texas procedían de la línea B/Yamagata y mantenían una mayor homología genética con la cepa de la vacuna 2008-09 B/Brisbane/5/2007 que con la cepa de la vacuna 2007/08 B/Malaysia/2506/2004.

Mutación en familiares

- 5 Los cambios en los aminoácidos se observaron en NA, HA1, MI y M2e entre los miembros de la familia. El HA1 de la hemaglutinina demostró el mayor grado de mutación de los genes del virus influenza analizados, con un familiar que presentaba cinco cambios en los aminoácidos.

- 10 El análisis de la bomba de protones de la superficie viral M2e del aminoácido 24 demostró algunas variaciones dentro de las familias. La cepa de un paciente del índice contenía tres sustituciones únicas de M2e en el aminoácido que eran "tipo salvaje" dentro de las cepas de los miembros de la familia.

Susceptibilidad antiviral

Adamantano: El análisis genético del gen de la matriz (MA), concretamente una sustitución de serina por asparagina en la posición 31 (S3 IN), reveló resistencia al adamantano en todas las cepas de influenza A (H3N2), pero sensibilidad en los dos virus influenza A (H1N1).

- 15 Inhibidores de la neuraminidasa: Todos los aislados Texas influenza A (H3N2) demostraron ser sensibles al oseltamivir a través del análisis genético de las sustituciones E1 19V, R292K, y N294S en el gen NA. El análisis genético del gen NA de influenza B reveló que todas las cepas Texas contenían un residuo de ácido aspártico (D) en la posición 197 y que, por tanto, son sensibles al oseltamivir.

- 20 Los protocolos y ensayos del presente se pueden adaptar para otros microbios como la tuberculosis, la malaria, el estafilococo y similares, así como para otros patógenos que impliquen la necesidad de conocer rápidamente la susceptibilidad antimicrobiana.

5.7 EJEMPLO 7 - RECOGIDA DE MUESTRAS DE INFLUENZA UTILIZANDO LA SOLUCIÓN PRIMESTORE™

- 25 Las composiciones de la presente invención prevén la recogida de una única muestra, transporte y el reactivo de almacenamiento para facilitar: 1) la obtención de ácidos nucleicos de alta calidad procedentes de muestras clínicas o ambientales; 2) la inactivación de patógenos potencialmente infecciosos para la manipulación y transporte seguro de las muestras; y 3) la estabilización y preservación del ARN/ADN "desnudo" liberado, impidiendo la hidrólisis/degradación de la nucleasa durante periodos prolongados y a temperaturas ambiente. Los resultados de estos estudios se presentan en el siguiente ejemplo:

TABLA 5

Detección del tipo de influenza: rRT-PCR frente al cultivo					
Muestras totales gripe B (n=47)	Influenza A		Influenza B		Muestras totales gripe B (n=19)
	rRt-PCR(N=47)	Cultivo	rRt-PCR(N=19)	Cultivo	
Pacientes del índice (28)	28/28 (100%) (82%)	23/28	16/16 (100%)	14/16 (88%)	Pacientes del índice (16)
Contactos familiares (19)	19/19 15/19(79%)	(100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)	Contactos familiares (3)

TABLA 6

Detección de influenza positiva: rRT-PCR frente al cultivo				
Muestras totales (N=226)	Positivo en gripe (N=66)	rRT-PCR (N=66)	Cultivo (N=66)	
Pacientes del índice (100)	44/100	39/39 (100%)	27/27 (100%)	
Contactos familiares (126)	22/126	18/27 (67%)	37/39 (94%)	

Este ejemplo ilustra la efectividad de PrimeStore™ Solution (ver. 2.2) en la eliminación de un microbio(s) patógeno.

5.7.1 Métodos

- 35 Se utilizó la RT-PCR en tiempo real para someter a ensayo el ácido nucleico del virus influenza A (H5N1) preservado en PrimeStore™ Solution. Se realizó un estudio de la evolución a temperatura ambiente para evaluar la integridad de las muestras clínicas, muestras de cloaca, y se almacenó y extrajo una plantilla de ARN del virus

influenza A (H5) aviar clonado de PrimeStore™ Solution, Viral Transport Media, RNA Storage Solution, o agua libre de nucleasa. Se comparó la eficiencia de extracción de PrimeStore™ Solution con tres kits de extracción de ácido nucleico disponibles en el mercado. Por otra parte, se evaluó la capacidad del ARN contenido en PrimeStore™ Solution para resistir la degradación de la nucleasa.

5 5.7.2 Resultados

PrimeStore™ Solution (versión 2, pero sin etanol) inactivó agentes microbianos, al tiempo que preservó el ARN/ADN liberado frente al material clínico, es decir, los lavados nasales, los tampones impregnados o las muestras ambientales. Las muestras clínicas o ambientales introducidas en esta solución se estabilizaron a temperatura ambiente durante un máximo de 30 días, mientras que en los demás medios de transporte se produjo una degradación de los ácidos nucleicos. PrimeStore™ Solution es compatible con los kits de aislamiento de ARN disponibles en el mercado y produjo una mayor producción de ácido nucleico.

5.8 EJEMPLO 8 - ELIMINACIÓN DE MRSA (ATCC33592) EN PRIMESTORE™ SOLUTION

Este ejemplo ilustra la efectividad de PrimeStore™ Solution (ver. 2.2) en la eliminación de un potencial contaminante bacteriano. La cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) ATCC33592 se diluyó 10 veces y 1000 veces en PrimeStore™ Solution (Ver. 2.2) y se cuantificó (véase la FIG. 6).

5.8.1 Protocolo experimental

DÍA	PROCEDIMIENTO
0	Transferencia de MRSA (ATCC33592) de Culti-loop® (Remel) a 1,5 ml de TSB en un tubo de ensayo cónico de 15 ml. Incubación a 37 °C durante unos 15 minutos. Suspensión con agitación suave y transferencia de 100 µL a una placa de agar sangre. Incubación de la placa hasta el día siguiente a 37 °C.
1	Observación de un crecimiento notable y uniforme de una colonia tras 12 horas de incubación. Transferencia de ~10% de las colonias a 300 ml de caldo de hidrolizado de caseína de soja (TSB) en un matraz estéril de un litro. Colocación del matraz en un agitador a 37 °C y 200 rpm.
25	Tras unas 4-6 horas de incubación, transferencia de unos 50 ml de suspensión bacteriana a un nuevo matraz de un litro que contenía 300 ml de TSB fresco.
	Tras unas 4-6 horas de incubación, transferencia de ~100 µL de cultivo a 900 µL de TSB (dilución de control 1:10). De esta suspensión se transfirieron 10 µL a 990 µL de TSB (dilución de control 1:1000).
	Transferencia de 100 µL de cultivo a 900 µL de PrimeStore™ Solution (dilución PrimeStore™ 1:10). De esta suspensión se transfirieron 10 µL a 990 µL de TSB (dilución PrimeStore™ 1:1000).
30	Inmediatamente después de la transferencia a TSB o PrimeStore™ Solution (ver. 2.2), las suspensiones se agitaron suavemente y se pusieron 100 µL en placas de ambas diluciones de control y suspensiones de PrimeStore™ en placas de agar sangre. El punto temporal cero fue en realidad unos dos minutos después de la adición de las bacterias al TSB o PrimeStore™ Solution.
	Las suspensiones en TSB y PrimeStore™ Solution (ver. 2.2) se mantuvieron a temperatura ambiente.
35	Otros 100 µL se colocaron en placas de agar sangre a los 5, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos de la preparación de las suspensiones en TSB y PrimeStore™ Solution.
	Se dejaron secar las suspensiones bacterianas sobre las placas, se invirtieron las placas y se incubaron hasta el día siguiente a 37 °C.
40	También se realizó una titulación del cultivo del agitador mezclando 100 µL de la suspensión del cultivo del agitador con 900 µL de TSB (dilución 10_1). Se prepararon diluciones en serie por 10 veces hasta 10-9. Se colocaron muestras de 100 µL en placas de agar sangre de todas las diluciones salvo 10-1.
2	Se observaron las placas para detectar colonias bacterianas. Todas las placas se almacenaron a 4 °C para su posterior observación, en caso necesario.

5.8.2 Resultados

Los resultados se presentan en la Tabla 7 y la Tabla 8. En resumen, la suspensión bacteriana contenía aproximadamente 4,7 x 10⁹ cfu/ml. Por tanto, la dilución 1:10 contenía aproximadamente 4,7 x 10⁸ cfu/ml y la dilución 1:1000 contenía 4,7 x 10⁶ cfu/ml. En todos los puntos temporales, las bacterias suspendidas en TSB eran demasiado numerosas para un recuento. En todos los puntos temporales, las bacterias suspendidas en PrimeStore™ Solution y colocadas en placas de agar sangre no presentaban colonias detectables.

50 TABLA 7

ELIMINACIÓN DE MRSA (ATCC 33592) POR PRIMESTORE™ SOLUTION (VER. 2.2)

Tiempo de incubación (Minutos)	de En 1:10 1:1000 TSB		Eln 1:10 1:1000 Primestore
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 el recuento.

TABLA 8

TITULACIÓN DE MRSA ATCC33592 DEL CULTIVO DE SUSPENSIÓN

Dilución		CFU/placa		CFU/ml
1.E+01		TNTC		
1.E+02		TNTC		
1.E+03		TNTC		
1.E+04		TNTC		
1.E+05		TNTC		
1.E+06		TNTC		
1.E+07		35		3,5X10 ⁹
1.E+08		6		6X10 ⁹
1.E+09		0		
NOTA: Los cálculos de CFU/ml están corregidos para incluir el volumen de las placas de 0,1 mls Conc. final: 4,7X10 ⁹ /ml				

5

TNTC = demasiado numeroso para el recuento.

CFU = unidades de formación de colonias.

Se realizó un estudio adicional para determinar el tiempo de exposición necesario para eliminar MRSA ATCC33592 cuando se diluye 10 veces en PrimeStore™ Solution (Ver. 2.2), así como para establecer el efecto de dilución de las bacterias tras la exposición a PrimeStore™ Solution, pero antes de pasar a las placas.

10

5.8.3 Protocolo experimental

DÍA PROCEDIMIENTO

0 Transferencia de MRSA (ATCC33592) de la placa TNTC del estudio anteriormente descrito a 4 ml de TSB. Estas placas se habían almacenado a 4 °C durante aproximadamente 48 horas. Las bacterias se agitaron suavemente y se dejaron a temperatura ambiente unos 10 minutos, antes de su utilización.

15

Se transfirieron 0,1 ml de suspensión bacteriana a 0,9 ml de PrimeStore™ Solution y se agitaron suavemente. Transcurridos unos 60 segundos, las bacterias de PrimeStore™ se agitaron de nuevo con suavidad y se transfirieron 0,1 ml de suspensión bacteriana a 0,3 ml de TSB (dilución 1:4).

20

Se pusieron en placas de agar sangre (5% de eritrocitos de oveja en TSA) 100 µL de bacterias en PrimeStore™ Solution (designadas "limpias") y de la dilución 1:4 en TSB.

Este proceso se repitió a los 5 y a los 15 minutos y, posteriormente, de nuevo con las diluciones realizadas en TSB en lugar de PrimeStore™ Solution.

25

Las suspensiones bacterianas líquidas de las placas de agar sangre se dejaron secar a temperatura ambiente y, a continuación, se incubaron hasta el día siguiente a 37 °C.

- 1 Tras unas 16 horas de incubación, las placas se retiraron de la incubadora y se realizó un recuento de las colonias.

5.8.4 Resultados

- 5 La suspensión bacteriana contenía un número desconocido de unidades de formación de colonias (cfu) por ml. En todos los puntos temporales, las bacterias suspendidas en caldo de soja triple (TSB) eran demasiado numerosas para un recuento (TNTC). En todos los puntos temporales, las bacterias suspendidas en las composiciones PrimeStore™ y colocadas en placas de agar sangre no produjeron colonias (Tabla 9).

Tiempo de incubación (minutos)	En TSB limpio	1:4	En TSB limpio	1:4
1	TNTC	TNTC	0	0
5	TNTC	TNTC	0	0
15	TNTC	TNTC	0	0

TNTC = demasiado numeroso para el recuento.

10

5.9 EJEMPLO 9 - ESTUDIOS ADICIONALES DE EVALUACIÓN DE LAS SOLUCIONES PRIMESTORE™

- 15 Los datos de la FIG. 7B ilustran la capacidad de PSS para inactivar microbios. Se muestra un estudio en el que se recogieron muestras de cloaca de gallina en PrimeStore™ Solution (Ver. 1). PrimeStore™ Solution inactivó los agentes microbianos en < una hora. Se sumergieron cuatro muestras de cloaca de gallina originales en PrimeStore™ Solution o agua y posteriormente se colocaron en placas de agar sangre. Estos resultados demostraron que la composición divulgada podía eliminar o inactivar rápidamente los microorganismos de la muestra.

- 20 Los datos de la FIG. 7B demuestran la capacidad de PSS para inhibir la hidrólisis de la base de ARN durante 30 días a temperatura ambiente. El ARN se incubó a temperatura ambiente (22-26 °C) en PrimeStore™ (barras de gel 1 y 3) y agua (barras de gel 2 y 4), y posteriormente se amplificó mediante RT-PCR (1500 pares de bases) en los Días 0 y 30. PrimeStore™ preservó el ARN recogido y evitó la degradación de ARN/ADN a temperatura ambiente hasta 30 días (véase también, p. ej., la Tabla 11).

5.9.1 Ensayo de inhibición de la gripe

Los reactivos de este ensayo incluyen un medio de tripsina:

- 25 145 mL de N/C EMEM estéril
3 ml de caldo 7.5% Na Bicarbonato (2%)
1.5mLSPG (1%)
75 µL de tripsina (0,05%)
1.5 ml de Fungizone (1%)
30 150 µl de gentamicina
Medio de filtrado
Cristal violeta:
150 ml de dialdehído glutárico
2 gm de cristal violeta
35 2850 ml de agua desionizada

Protocolos

Preparación de muestras de suero para el ensayo

- 40 Descongelar y agitar las muestras de suero. Para cada muestra, etiquetar la tapa del correspondiente tubo Spin-X. Combinar 450 µL de EMEM no completo con 50 µL de suero en un tubo Spin-X. Calentar los tubos que contienen los sueros y EMEM en un baño de agua durante 30 minutos. Centrifugar los tubos a 8000 rpm durante dos minutos a temperatura ambiente. Etiquetar y colocar las muestras en un congelador a -20 °C hasta el ensayo.

Placas de dilución

- 45 Cargar 160 µL de cada componente limpio o muestra de suero en los pocillos A1 a A12. Cargar los pocillos restantes con 120 µL con tripsina. Utilizando una pipeta multicanal, extraer 40 µL de la muestra limpia de la fila A y diluir en los correspondientes pocillos de la fila B. Repetir la dilución para cada una de las filas, mezclando el pocillo después de

cada transferencia. En la fila H, después de mezclar la transferencia de la fila G, extraer 40 µL de cada pocillo y desechar. Obtener caldo de virus (106) del congelador a -80 °C y descongelar. Diluir el caldo de virus en medio de tripsina a una dilución de 10³. Tras completar las diluciones en serie, transferir 120 µL de virus influenza (104 TCID₅₀ 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 una hora.

Placas de células MDCK

Esterilizar y colocar el depósito de vidrio, el dispensador de peine y los tubos que se encuentran en el interior de la campana de humos. En el interior de la campana, conectar los tubos al depósito y llenar la boquilla del peine. Conectar el tubo del aspirador a la boquilla de vacío del peine. Colocar el depósito en una superficie elevada y encender el aspirador. Colocar PBS en el depósito (se puede necesitar un litro o más en función del número de placas). Lavar las placas de las células tres veces con el peine de PBS (aspirar el medio, a continuación presionar el botón durante aproximadamente un segundo para lavar los pocillos y repetir en dos ocasiones). Utilizando una pipeta multicanal, transferir 50 µL de cada pocillo de la columna 1 de la placa de dilución a las columnas 1 a 4 de la placa de las células. Transferir 50 µL de cada pocillo de la columna 2 de la placa de dilución a las columnas 5 a 8 de la placa de las células. Transferir 50 µL de cada pocillo de la columna 3 a las columnas 9 a 12 de la placa de las células. Repetir la transferencia a otras placas de células para las muestras restantes. Incubar las placas de células durante una hora a 37 °C. Tras el periodo de incubación, añadir 50 µl de medio de tripsina a todos los pocillos de las placas de las células. Devolver las placas a la cámara de incubación e incubar durante cuatro días contados a partir de la post-infección.

Tinción

Añadir 100 µL de cristal violeta a todos los pocillos. Dejar asentar durante una hora. Enjuagar las placas en agua corriente fría y secar al aire.

TABLA 10

TITULACIÓN DE TCEP UTILIZANDO VIRUS INFLUENZA A COMPLETO

5mM	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 utilizando ARN monocatenario aviar H5				

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

5.9.2 Estudio de la evolución de la estabilidad a largo plazo de las composiciones PrimeStore

Los siguientes datos demuestran la efectividad de las diversas composiciones PrimeStore para preservar la integridad del ácido nucleico en un periodo de treinta días con las muestras almacenadas a temperatura ambiente. Las composiciones PrimeStore se han comparado con agua sola, etanol solo, soluciones tampón comercializadas como VTM y AVL.

Tabla 11

ESTUDIO DE COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN DE DIVERSAS COMPOSICIONES EN UN PERIODO DE 30 DÍAS

Día 1

VTM	Agua	EtOH	AVL	PS-V1 (año)	PS-V1 (nuevo lote)	PS-V2	PS-V2.2 (w/EtOH)	
VTM	Agua	EtOH	AVL	PS-VI (año)	PS-VI (nuevo lote)	PS-V2	PS-V2.2 (w/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	
1,840245	0,378939	0,088883	0,147856	0,0784181	0,006435	0,209374	0,10408612	AVG STDEV

Día 6

VTM	Agua	EtOH	AVL	PS-V1 (año)	PS-V1 (Nuevo lote)	PS-V2	PS-V2.2 (w/EtOH)	AVG STDEV
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	
0,366918	0,363241	0,231719	1,468944	0,5318857	0,282277	0,062367	0,01491995	

Día 12

VTM	Agua	EtOH	AVL	PS-V1 (año)	PS-V1 (Nuevo lote) ;	PS-V2	PS-V2.2 (w/EtOH)	AVG STDEV
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	
28,0016	28,18605	26,5575	39,02195	30,6427	30,62065	25,59815	22,10495	
0,006505	0,049568	0,485924	1,383172	0,2722361	0,604081	0,416415	0,14488618	

5 Día 20

VTM	Agua	EtOH	AVL	PS-V1 (año)	PS-V1 (Nuevo lote)	PS-V2	PS-V2.2 (w/EtOH)	AVG STDEV
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	
28,1959	28,2821	27,0605	40	30,21545	27,2102	25,681	20,56035	
0,298116	0,691833	0,070711	0	0,0439113	0,024324	0,084429	0,39039365	

Día 30

VTM	Agua	EtOH	AVL	PS-V1 (año)	PS-VI (nuevo lote)	PS-V2	PS-V2.2 (w/EtOH)	AVG STDEV
29,23	31,9168	33,012	40	29,1993	30,2386	23,0589	20,9348	
29,9067	31,3252	32,3001	40	28,827	29,6081	22,9662	20,4973	
29,56835	31,621	32,65605	40	29,01315	29,92335	23,01255	20,71605	
0,478499	0,418324	0,503389	0	0,2632559	0,445831	0,065549	0,30935922	

PS-V1 (años) = -Formulación PrimeStore de un año (Ver, 1),

10 PS-V1 (lote nuevo) = -Formulación PrimeStore fresca (Ver, 2),

PS-V2 = Formulación PrimeStore fresca (Ver 2) (sin etanol),

PS-V2,2 (w/EtOH) = Formulación PrimeStore fresca (Ver, 2,2) (es decir, con etanol),

Todas las composiciones y métodos divulgados y reivindicados en el presente se pueden realizar y ejecutar sin una experimentación excesiva a la luz de la presente divulgación.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa que incluye los componentes siguientes:

un caotro presente en una cantidad de entre 0,5 M y 6M;

- 5 un detergente presente en una cantidad de entre 0,1% y 1% (peso/vol.), donde el detergente comprende dodecilsulfato sódico (SDS), dodecilsulfato de litio (LDS), taurodesoxicolato sódico (NaTDC), taurocolato sódico (NaTC), glicocolato sódico (NaGC), desoxicolato sódico (NaDC), colato sódico, sulfonato de alquilbenceno sódico (NaABS), N-lauril sarcosina (NLS), sales de ácidos carboxílicos, sales de ácidos sulfónicos, sales de ácido sulfúrico, ésteres de ácido fosfórico y polifosfórico, alquilfosfatos, fosfato de monoalquilo (MAP), sales de ácidos

10 perfluorocarboxílicos, detergentes aniónicos o cualquier combinación de estos elementos;

un agente reductor, donde el agente reductor es β -ME, DTT, DMSO o formamida presente en una cantidad de entre 0,05 M y 0,3 M, o donde el agente reductor es TCEP presente en una cantidad de entre 0,5 mM y 30 mM;

un agente quelante presente en una cantidad de entre 0,5 mM y 50 mM;

- 15 un agente tensoactivo presente en una cantidad de entre 0,0001% y 0,3% (peso/vol.), donde el agente tensoactivo comprende cocamidopropil hidroxisultaina, ácidos alquilaminopropiónicos, carboxilatos de imidazolina, betaínas, sulfobetaínas, sultaínas, etoxilatos de alquilfenol, etoxilatos de alcohol, glicoles de polioxipropileno polioxietilenados, mercaptanos polioxietilenados, ésteres de ácido carboxílico de cadena larga, alcanolamidas, glicoles acetilénicos terciarios, siliconas polioxietilenadas, N-alquilpirrolidonas, alquilpoliglicosidasas, polímeros de silicona como Antifoam A®, o polisorbatos como Tween®, o cualquier combinación de estos elementos;

- 20 un alcohol de cadena corta presente en una cantidad de entre 1 y 25% (vol./vol.);

una solución tampón que proporciona a la composición un pH de entre 6 y 7, y

agua libre de nucleasa,

donde los componentes se encuentran presentes todos juntos en una cantidad suficiente como para desnaturalizar proteínas, inactivar nucleasas, eliminar patógenos y no degradar el ácido nucleico de una muestra que se sospecha

- 25 que contiene agentes patógenos y donde la muestra está en contacto con la composición,

2. La composición de la reivindicación 1 donde la solución tampón proporciona a la composición un pH de entre 6,4 y 6,8,

- 30 3. La composición de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 donde el caotro comprende triocianato de guanidina, isocianato de guanidina o hidrocloreuro de guanidina,

4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, donde el detergente comprende dodecilsulfato sódico, dodecilsulfato de litio, taurodesoxicolato sódico, taurocolato sódico, glicocolato sódico, desoxicolato sódico, colato sódico, sulfonato de alquilbenceno sódico o N-lauril sarcosina,

- 35 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el agente reductor comprende 2-mercaptoetanol, tris(2-carboxietil)fosfina, ditiotreitól, dimetilsulfoxida o tris(2-carboxietil)fosfina,

6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el agente quelante comprende ácido etilenglicoltetraacético, ácido hidroxietilendiamintriacético, ácido dietilentriaminpentaacético, N,N-bis(carboximetil)glicina, ácido etilendiamintetraacético, citrato anhidro, citrato sódico, citrato cálcico, citrato amónico, bicitrato amónico, ácido cítrico, citrato diamónico, citrato de amonio férrico o citrato de litio,

- 40 7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el alcohol de cadena corta comprende metanol, etanol, propanol, butanol, pentanol o hexanol,

8, La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la solución tampón comprende tris(hidroximetil) aminometano, citrato, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, ácido N, N -Bis(2-hidroxietil)-2 -aminoetanosulfónico, 1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)propano, ácido 4-(2-hidroxietil)-l-piperazinetanosulfónico,

- 45 ácido 3-(N -morfolino) propanosulfónico, bicarbonato o fosfato,

9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde los patógenos comprenden virus influenza, células infectadas por el virus influenza, bacterias de la tuberculosis o células infectadas por la bacteria de la tuberculosis,

- 50 10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además ARN desnudo, ADN, o una combinación de ambos; opcionalmente, donde el ARN desnudo, ARN o la combinación de estos elementos sirve como vehículo o contiene una secuencia predeterminada de ácido nucleico como control positivo interno,

11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el caotro, el detergente, el agente reductor, el agente quelante, el agente tensoactivo, el alcohol de cadena corta y/o la solución tampón incluye uno o

más caotrops, uno o más detergentes, uno o más agentes reductores, uno o más agentes quelantes, uno o más agentes tensoactivos, uno o más alcanoles de cadena corta y/o una o más soluciones tampón,

12. Un sistema para la recogida de muestras que comprende:

5 un dispositivo de recogida de muestras y un recipiente de recogida en el que se coloca la muestra, donde el recipiente de recogida contiene una cantidad de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la composición es efectiva para mantener la integridad del ácido nucleico que puede estar presente en la composición para permitir la identificación por PCR de un patógeno presente en la muestra cuando la composición que contiene la muestra se almacena a temperatura ambiente o superior durante un periodo de siete días o más,

10 13. Un método para detectar una secuencia de ácido nucleico que es indicativa de la presencia de un patógeno en la muestra que consiste, en un solo paso, en poner en contacto la muestra con una cantidad de la composición acuosa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la composición es efectiva para eliminar todos los patógenos de la muestra sin degradar ni modificar el ácido nucleico de la muestra, de forma que la secuencia de ácido nucleico del patógeno resulta detectable por amplificación por PCR,

15 14. El método de la reivindicación 13, donde el patógeno comprende bacterias, virus o un hongo; opcionalmente, donde la bacteria es tuberculosis o el virus es influenza,

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde la secuencia de ácido nucleico se encuentra presente en la composición en una cantidad de 1 pg/mL a 1 µg/mL,

16. Un método para preparar la composición acuosa de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende: la combinación de dicho caotropo y agua libre de nucleasa a una temperatura de entre 20 °C y 90 °C;

20 la combinación del caotropo con un agente reductor, un agente quelante, un agente tensoactivo y un detergente para formar una composición intermedia;

opcionalmente la combinación de un polímero de silicona con la composición intermedia en una cantidad suficiente para minimizar la espuma durante la posterior preparación;

25 la combinación de una cantidad suficiente de solución tampón con la composición intermedia para obtener un pH de entre 5 y 7;

el aumento de la temperatura de la composición intermedia de 60 a 95 °C durante uno a 30 minutos y posteriormente reducirla hasta la temperatura ambiente;

la combinación de un alcohol C₁₋₆ con la composición intermedia; y

el ajuste de la formulación a un pH de entre 6 y 7 para formar la composición acuosa.

30

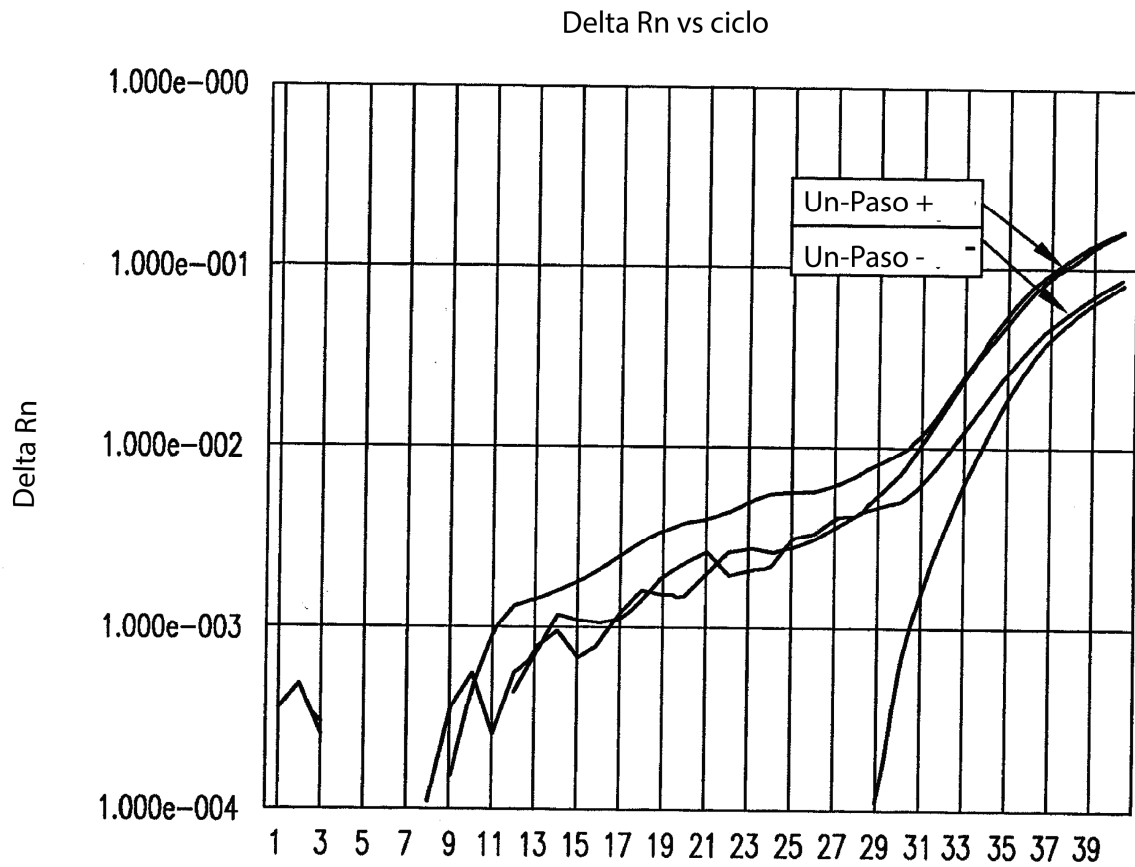


FIG.1

	Qiagen Viral Mini		Ambion RNaqueous Mini		Ambion AI/NCD MagMax	
	Un-Paso -	Un-Paso +	Un-Paso -	Un-Paso +	Un-Paso -	Un-Paso +
Valor Cr en tiempo real	19.25	19.08	32.83*	30.39*	23.95	21.26
Copias virales detectadas	4.7×10^9	5.5×10^9	2.5×10^5	6.2×10^5 *	1.12×10^{10}	2.10×10^{10}

FIG.2

Muestra	Día 1	Día 3	Día 4
Solución Un-paso	23.97	21.37	31.38
RNA Storage Solution (Ambion)	25.35	32.70	32.20
Agua	24.39	32.17	32.27

FIG.3

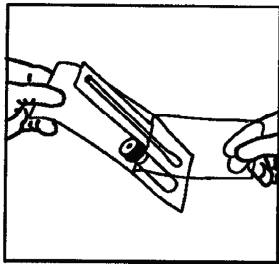


FIG.4A

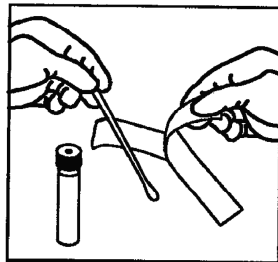


FIG.4B

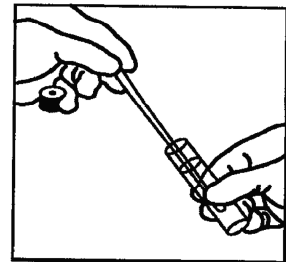


FIG.4C

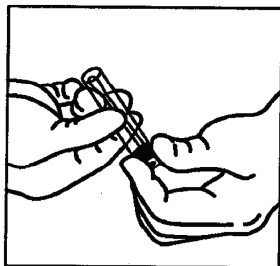


FIG.4D

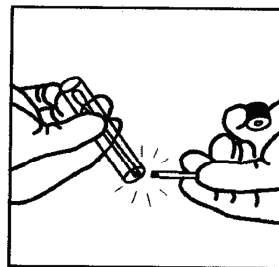


FIG.4E

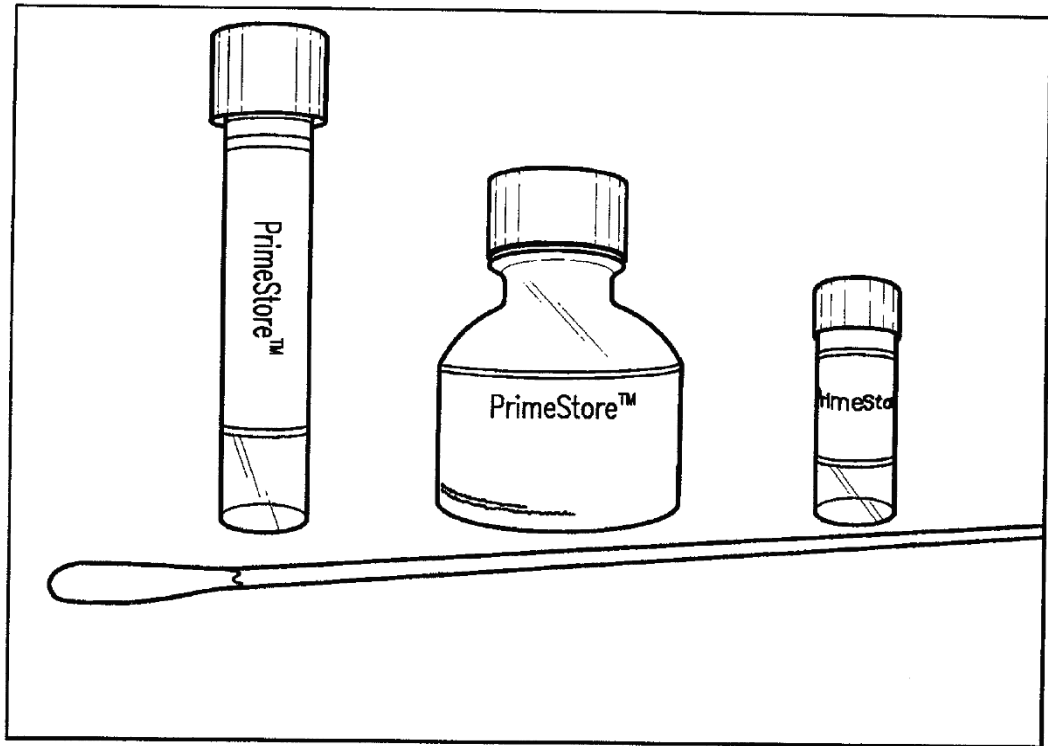


FIG.5

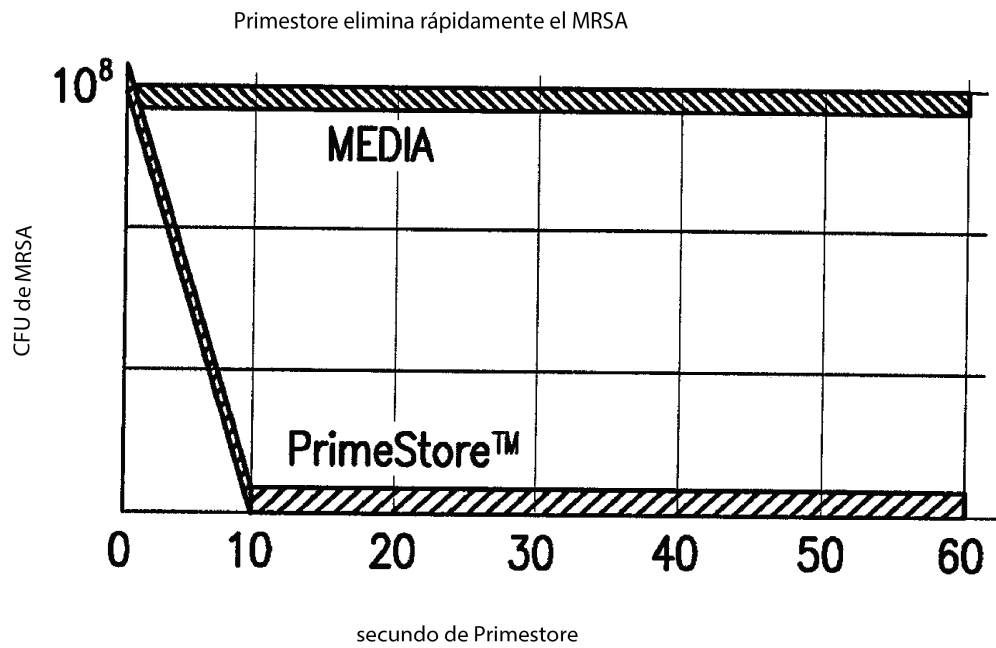


FIG.6

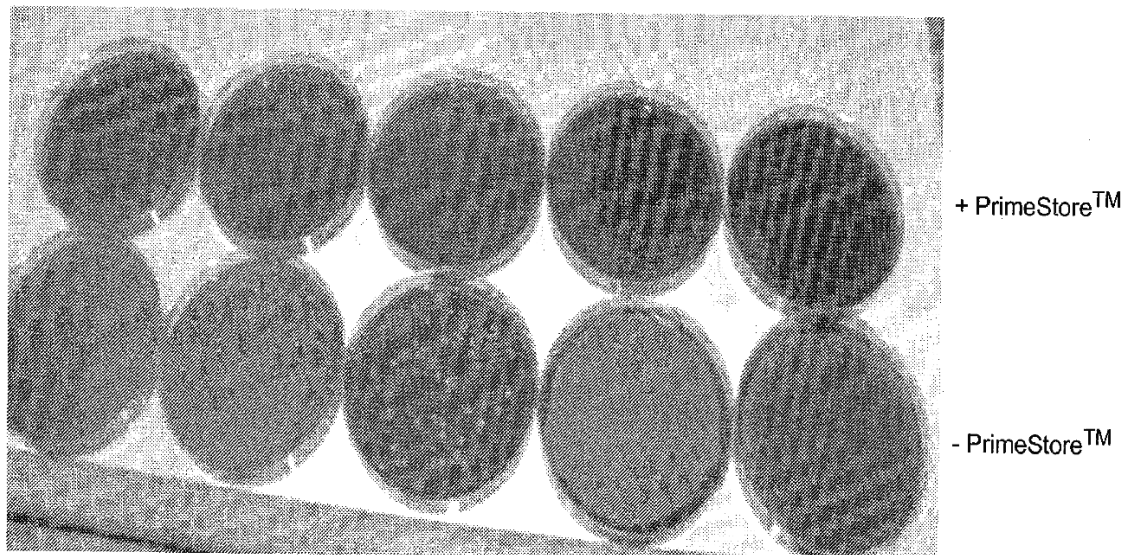


FIG.7A

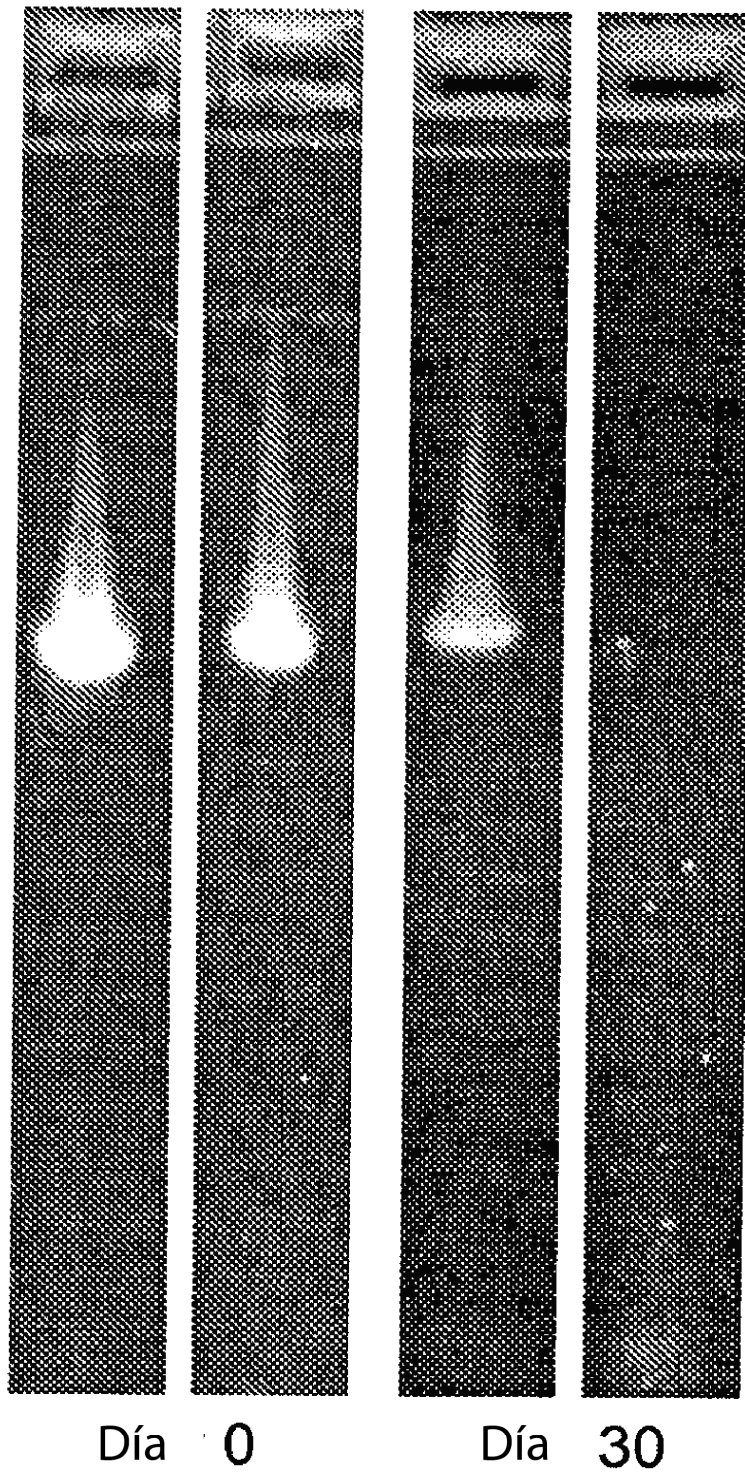


FIG.7B

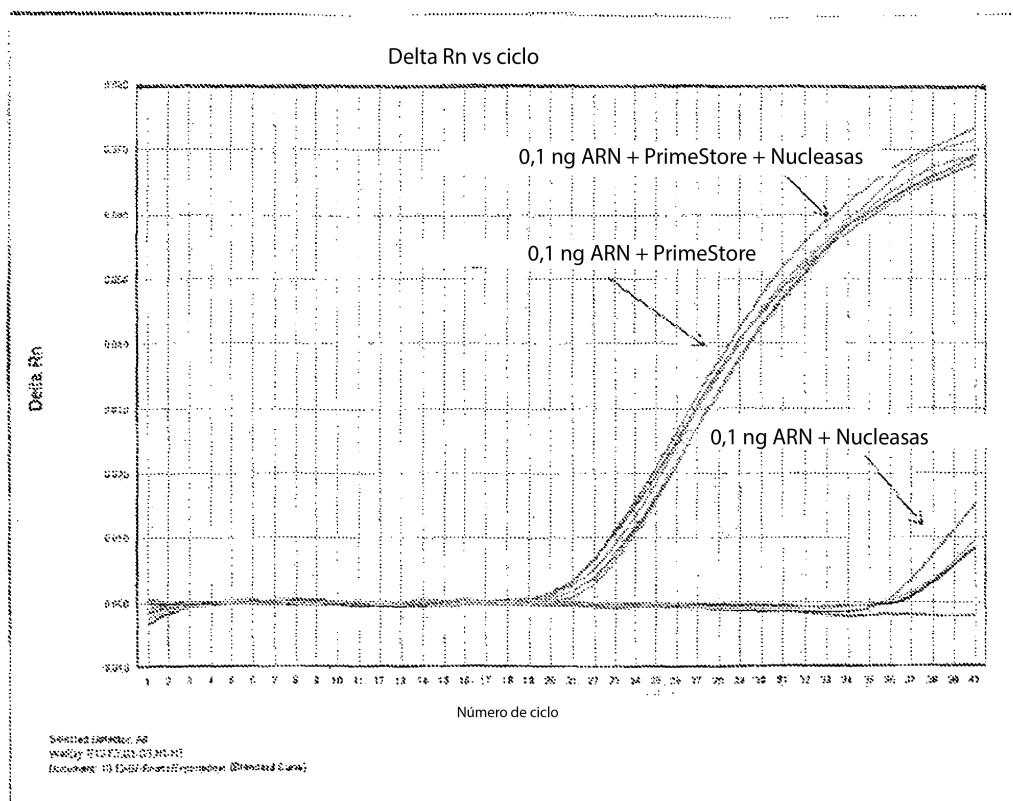


FIG. 8A

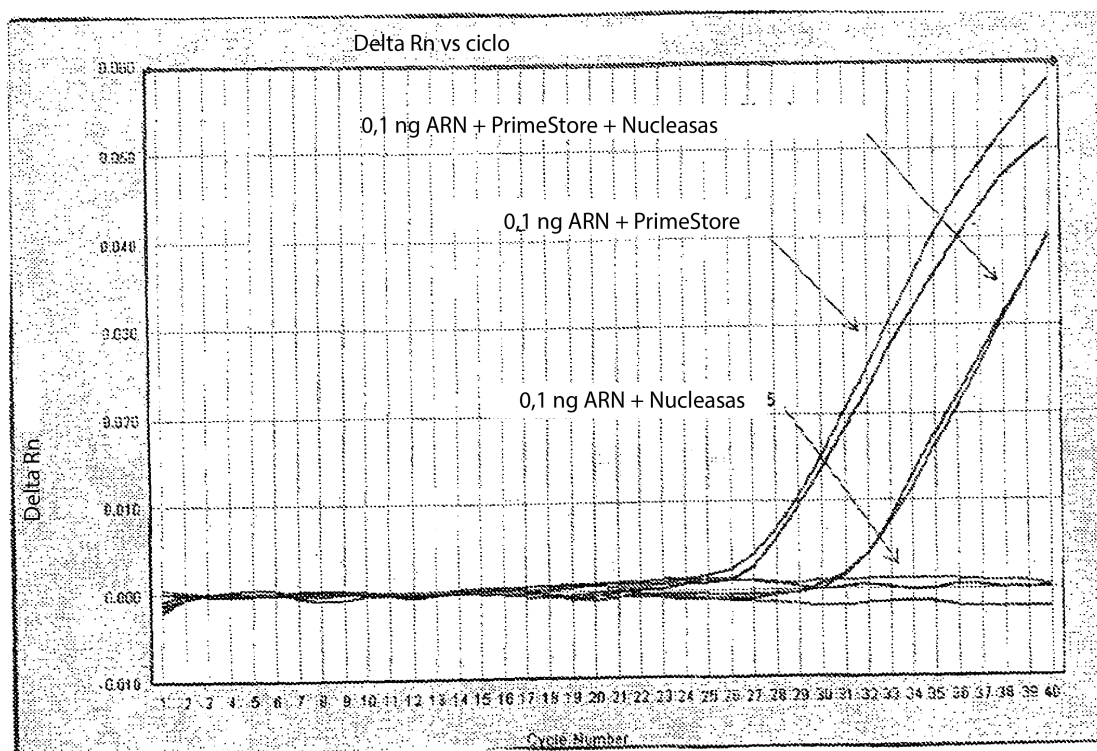


FIG. 8B

4% AGAROSA (HR)

1 2 3 4 5 6

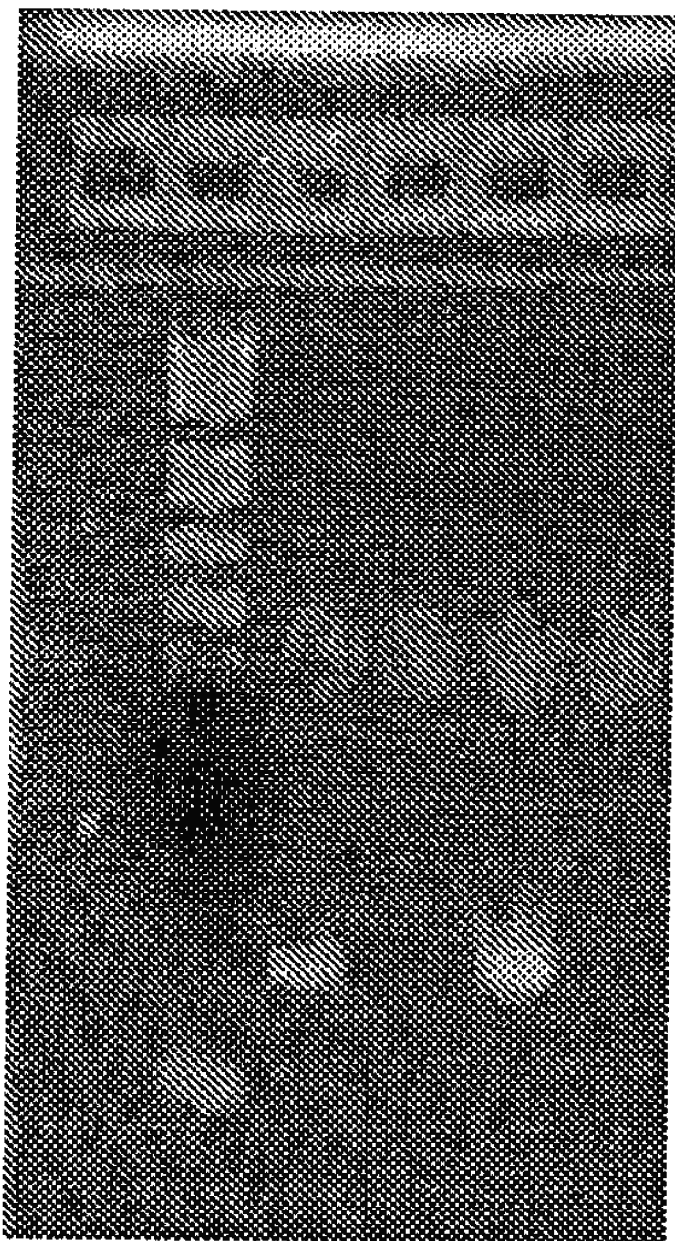


FIG.8C

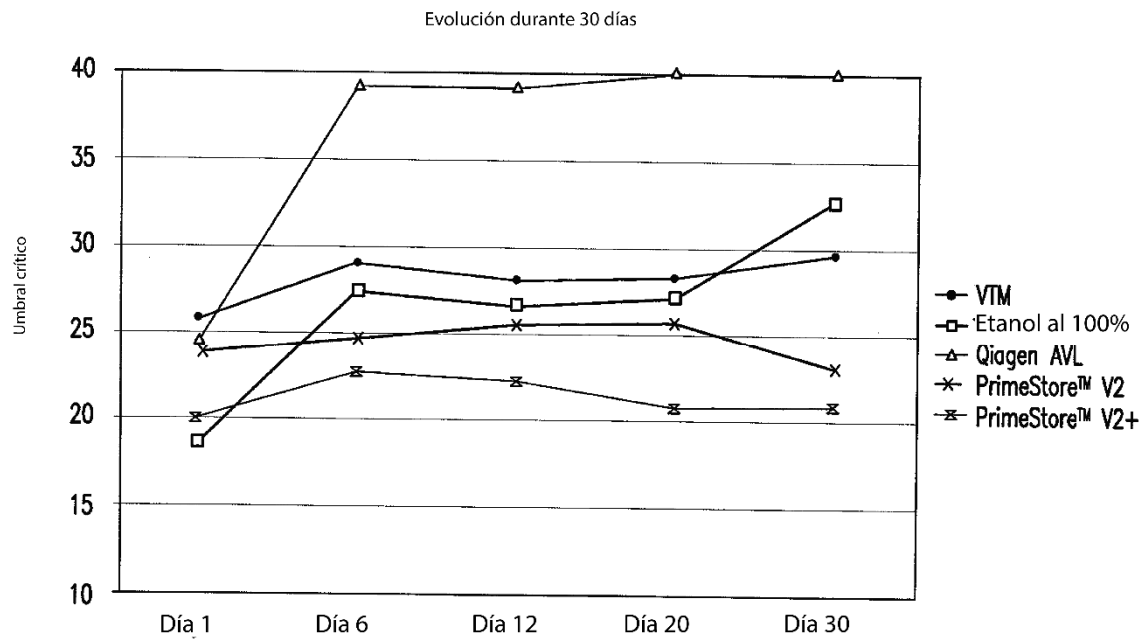


FIG.9

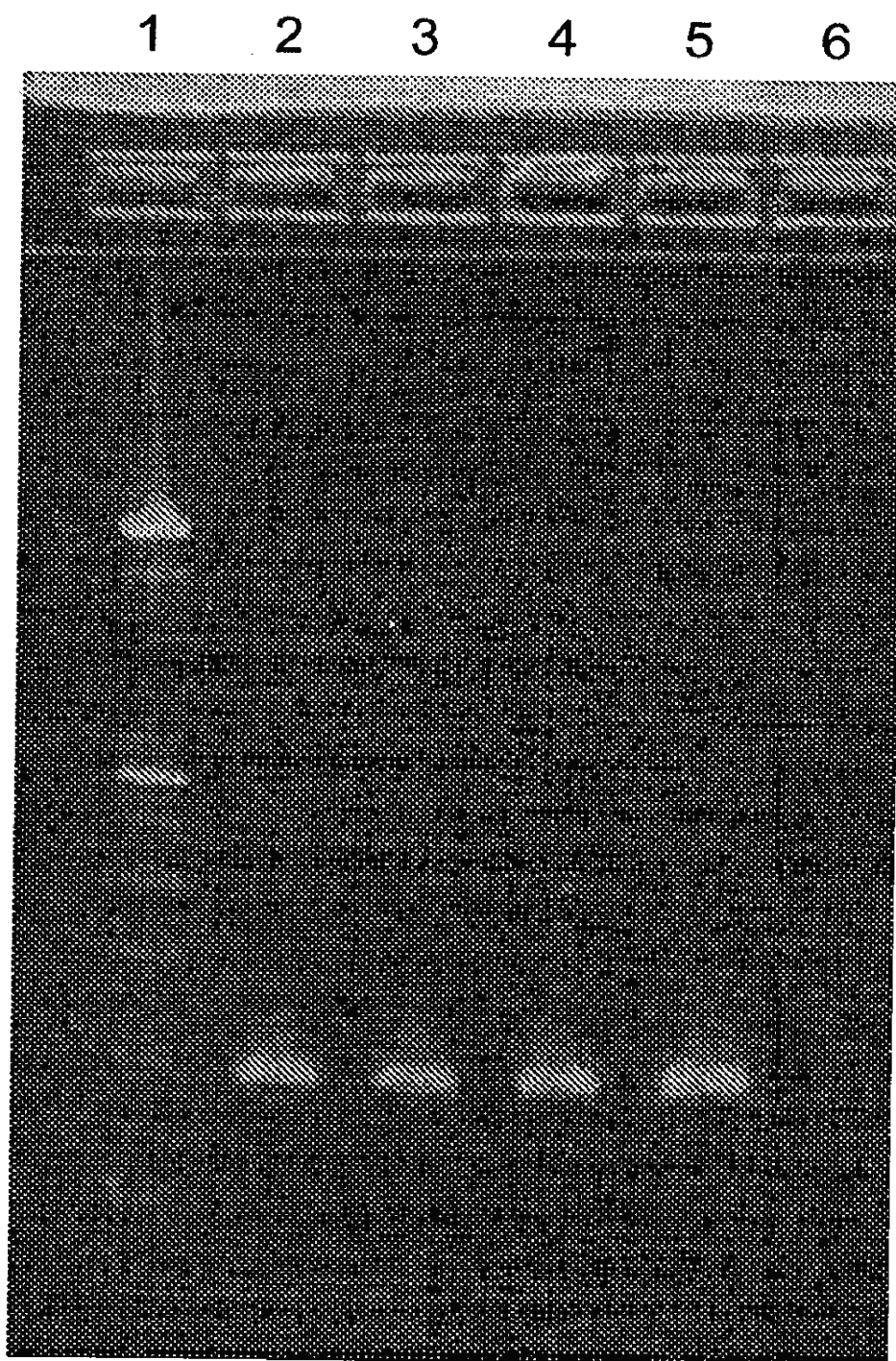


FIG.10

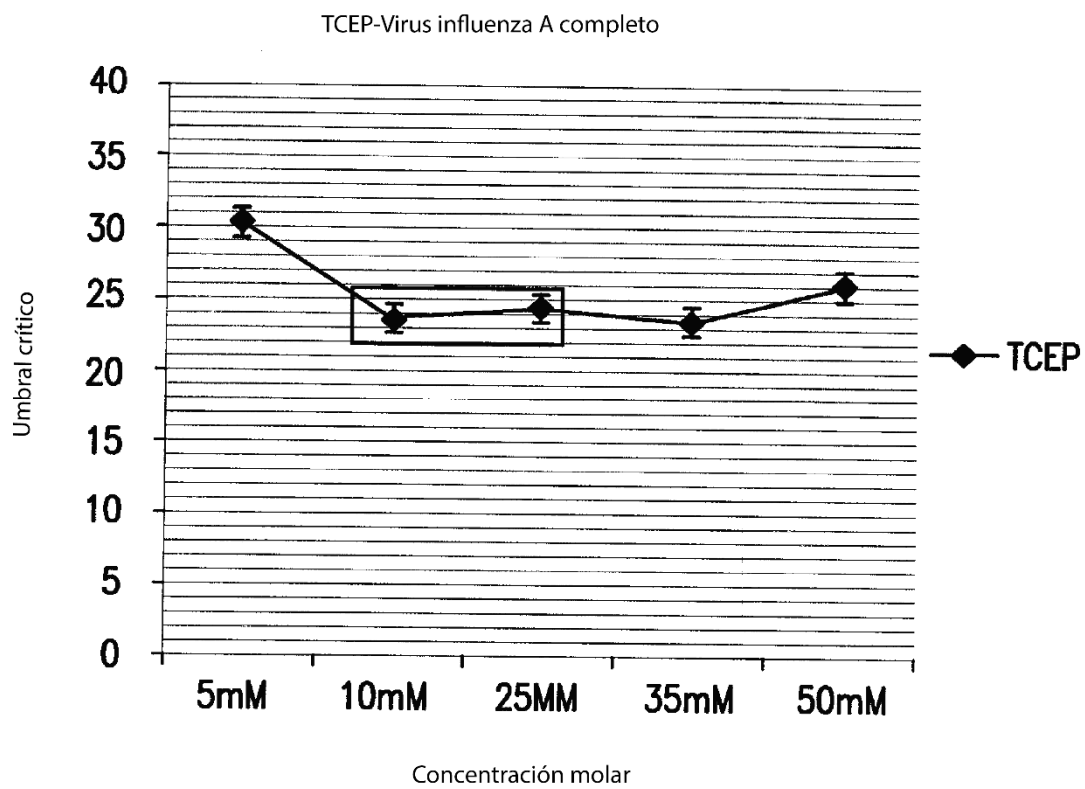


FIG. 11

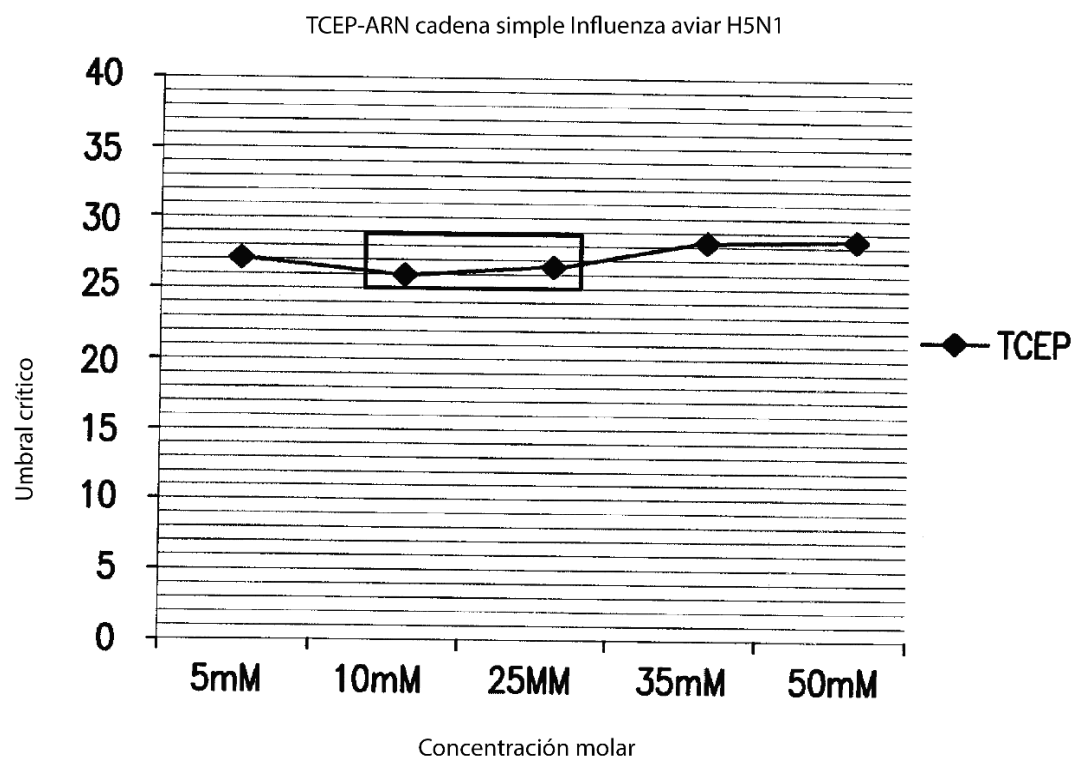


FIG.12

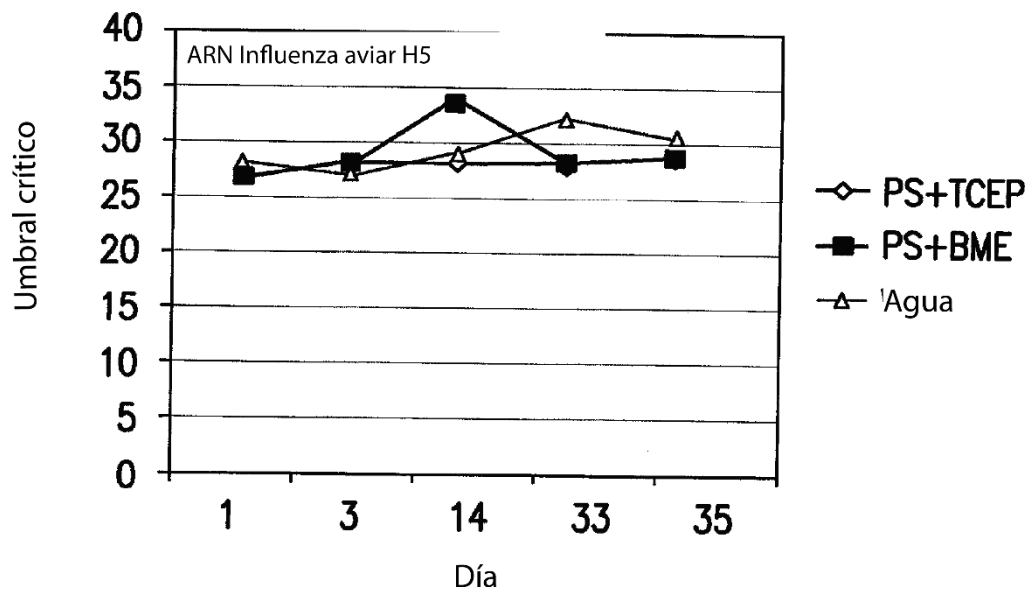


FIG.13A

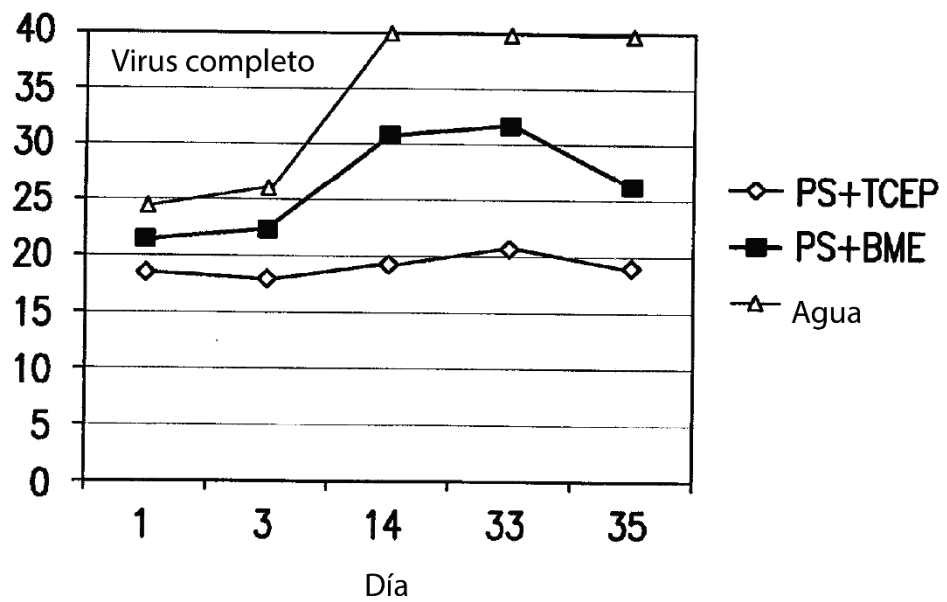
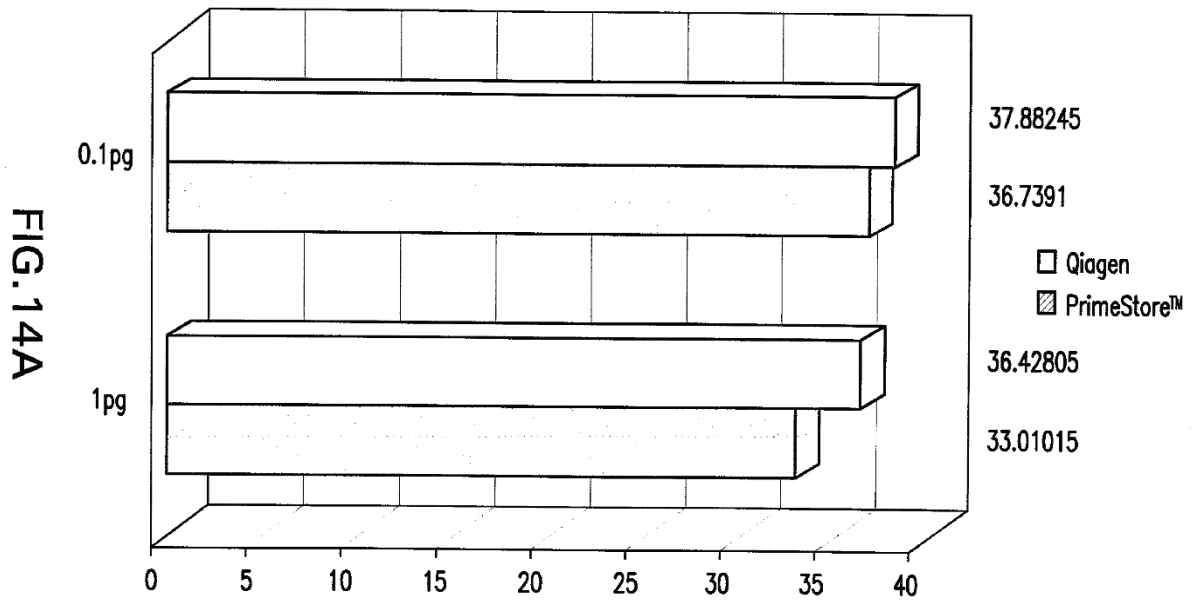


FIG.13B



	Blood Tube			
	EDTA	Citrato de sodio	HeparinaLi	HeparinaSod
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
Qiagen	35.3054	33.4051	34.4903	34.6428
	34.7485	33.4051	35.0378	35.3937
	AVG: 35.02695	33.4051	34.76405	35.01825

FIG. 14B

PrimeStore-Extracción sanguínea	
1 pg	0.1 pg
32.7715	36.434
33.2488	37.0442
33.01015	36.7391
0.337502067	0.431476558
AVG	
STDEV	

Qiagen-Extracción sanguínea	
1 pg	0.1 pg
35.8461	37.5771
37.01	38.1878
36.42805	37.88245
0.823001583	0.431830111
AVG	
STDEV	

FIG. 14C