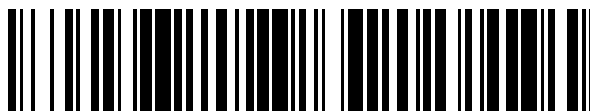


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 762**

51 Int. Cl.:

C12N 1/06 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2010 PCT/US2010/047653**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011 WO11028887**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2010 E 10814484 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2473596**

54 Título: **Métodos y composiciones para lisis química directa**

30 Prioridad:

03.09.2009 US 239553 P

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

26.03.2018

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive, MC 110
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**YANG, FENG;
WANG, SHA-SHA;
VAUGHAN, LAURENCE, MICHAEL;
PORTER, MICHAEL y
ROSE, ELAINE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 660 762 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

Métodos y composiciones para lisis química directa

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La invención se refiere en términos generales a métodos y composiciones para llevar a cabo ensayo diagnóstico en muestras biológicas conservadas y, en particular, para llevar a cabo métodos de extracción y amplificación de ácidos nucleicos en tales muestras conservadas.

En los campos del diagnóstico médico y la investigación médica, se toman muestras (por ejemplo, tejidos) de un paciente o sujeto (por ejemplo, un paciente humano, un sujeto humano, un modelo de animal experimental de una enfermedad humana) para determinar las condiciones del sujeto en apoyo de la investigación, determinar las condiciones actuales del paciente para realizar un diagnóstico médico, determinar la respuesta del paciente al curso actual de la terapia o tratamiento, etc.

Las muestras que se obtienen para análisis, ya sea para llevar a cabo diagnóstico médico o para su uso en investigación científica, se sitúan a menudo en un medio de transporte/conservación especial para evitar que la muestra se degrade o descomponga cuando se retira del sujeto. De ese modo, la muestra estará tan cerca como sea posible de las condiciones exactas en las que estaba cuando se retiró del sujeto. Esto asegura que la muestra refleje de forma precisa el estado del paciente o sujeto en el momento de la toma de muestra y por lo tanto producirá el resultado más preciso en cualquier estudio posterior de la muestra. Algunos de estos estudios implicarán extracción y amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN)).

La extracción de ADN y/o ARN de muestras biológicas requiere, entre otras etapas, la lisis de la pared celular (en el caso de células procariotas), la lisis de la membrana celular (en el caso de ciertas células eucariotas) o la lisis de la cápside viral (en el caso de virus). La amplificación posterior requiere, en parte, la unión de cebadores a sitios específicos en el ácido nucleico diana.

Existe cierto número de protocolos disponibles para la extracción y posterior amplificación de los ácidos nucleicos. Algunos de estos protocolos utilizan dispositivos de alto rendimiento. Los dispositivos de alto rendimiento son automáticos en el sentido de que se sitúa la muestra en el dispositivo junto con los productos químicos apropiados y las etapas de extracción y amplificación tienen lugar sin ninguna entrada adicional del operador (por ejemplo, el Sistema Viper™ XTR de Becton Dickinson® BD ProbeTec Q^x Amplified DNA Assay Package Insert, Becton Dickinson 2008). Como ejemplo adicional, el documento de Patente WO 2006/023471 proporciona un sistema para la recogida, estabilización y preparación de ADN total para la purificación directa a partir de muestras biológicas. Otros protocolos utilizan un equipo menos sofisticado y se denominan por lo general procedimientos manuales. A modo de ejemplo, el documento de Patente EP 1 506 995 proporciona un método de lisis de una bacteria ácido-alcohol resistente. Sin embargo, independientemente del protocolo, permanecen la necesidad de lisar las células o las cápsides virales con el fin de liberar el ácido nucleico, la necesidad de unir el ácido nucleico a partículas tales como óxido férrico con el fin de extraer el ácido nucleico del resto de la muestra, y la necesidad de unir cebadores al ácido nucleico diana con el fin de amplificar el ácido nucleico.

Los medios de transporte (por ejemplo, medio líquido de citología) contienen por lo general uno o más constituyentes que conservan ciertas células de una o más formas (por ejemplo, evitan la descomposición de la pared celular o la membrana celular por lisis celular). Además, algunos de estos constituyentes sirven con el doble fin de conservación y descontaminación de la muestra. Se conoce que estos constituyentes interfieren en la capacidad de lisar membranas y paredes celulares, la capacidad de los ácidos nucleicos extraídos de unirse a las partículas utilizadas en la extracción de ácidos nucleicos, y la capacidad de amplificar el ácido nucleico diana.

Las composiciones de citología basadas en líquido tales como la solución SurePath® (Tripath Imaging, Inc., N.C.) o la solución ThinPrep® PreservCyt® (Hologic Inc., MA), afectan de forma adversa a la capacidad de extraer ácido nucleico diana amplificable de las muestras expuestas a los mismos. Se han sugerido numerosas razones para explicar este efecto adverso observado que incluyen: 1) degradación de los ácidos nucleicos por constituyentes en los medios; 2) alteración química de los ácidos nucleicos por constituyentes en los medios; y 3) inhibición del mecanismo de lisado celular en el tejido, que inhibe la liberación de los ácidos nucleicos para extracción y amplificación. Con el fin de evitar los efectos adversos de las composiciones líquidas de citología en el ADN extraído, las células se extraen de las composiciones antes de la lisis. Por lo general, la extracción requiere centrifugación para decantar la composición líquida de citología de las células. A continuación, las células se resuspenden en un tampón y se lisan con una enzima. Tales etapas adicionales no son compatibles por lo general con muchos dispositivos automáticos de alto rendimiento tales como, por ejemplo, el Sistema Viper™ mencionado anteriormente. Incluso en situaciones en donde no está implicada la automatización, no obstante tales etapas consumen tiempo. El tiempo adicional requerido por estas etapas puede retrasar la obtención de los resultados de ensayo y preferiblemente se evitan.

Un ejemplo de un kit de medios para purificación de ácidos nucleicos es el Kit de Medios QIAamp MinElute de Qiagen. Este kit de medios se describe en el Manual de Medios QIAamp MinElute de fecha febrero de 2004. Se describe que el procedimiento de QIAamp tiene cuatro etapas: lisis, unión, lavado y elución. En este procedimiento, las muestras se lisan usando proteinasa K seguido de la unión de los ácidos nucleicos a la columna QIAamp MinElute mediante absorción sobre el lisado de gel de sílice. Aunque el procedimiento de QIAamp es un método probado, se optimiza para la purificación de solo 250 ml de medios líquidos de citología y es tanto laborioso como largo (es decir, requiere 18 etapas que incluyen 65 minutos de incubaciones a diferentes temperaturas, 5 etapas de centrifugación, 2 etapas de filtración al vacío y varias etapas de mezcla). Hasta la fecha, se ha requerido el uso de tales métodos de múltiples etapas para purificar con éxito ácidos nucleicos de muestras fijadas tales como tejido embebido en medios líquidos de citología y parafina. Se conoce bien que la purificación de los ácidos nucleicos a partir de medios fijados es más difícil que a partir de tejido reciente debido a que los fijadores de los medios introducen modificaciones químicas indeseables de las moléculas diana en la muestra. Se pueden producir reacciones que reticulen o modifiquen de otro modo los ácidos nucleicos en una muestra. Otros aditivos de los medios de transporte también pueden causar reticulación indeseada. Por ejemplo, se describe la reticulación debida a la presencia de formalina en los medios de transporte en Rai, V.K., *et al.*, "Modeling formalin fixation and antigen retrieval with bovine pancreatic ribonuclease A: I-Structural and functional alterations," *Lab. Invest.* Vol. 84(3):292-299 (marzo de 2004). El formaldehído también produce la reticulación entre ácidos nucleicos y proteínas como se describe en Solomon, M.J., "Formaldehyde-mediated DNA-protein crosslinking: A probe for *in vivo* chromatin structures," *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 82, pp. 6470-6474 (octubre de 1983). Como se describe en Sepp, R., *et al.* "Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR," *J. Clin. Pathol.* Vol. 47:318-323 (1994), la extracción de ADN de células tomadas de cera de parafina fijada con formalina requiere por lo general etapas de procesamiento (por ejemplo, ebullición prolongada) que pueden afectar de forma adversa a la cantidad de ADN para la amplificación. De acuerdo con Sepp, R., *et al.*, la ebullición de la muestra es necesaria para, entre otras cosas, inactivar la proteinasa K. Además, la proteinasa K se inhibe por parte de los constituyentes de numerosos fijadores haciendo su uso directo de eficacia limitada en la descomposición de reticulaciones de proteínas.

Por lo tanto, se continúan buscando métodos y composiciones para extraer ADN de tejidos y otras células y componentes celulares que subsanen los problemas de la reticulación y otras modificaciones indeseadas en los ácidos nucleicos que no requieran un procesamiento prolongado a alta temperatura que pueda afectar de forma adversa a la muestra o hagan el proceso más caro y prolongado.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se caracteriza por las realizaciones que se definen en las reivindicaciones. De ese modo, se refiere a los siguientes apartados:

1. Una composición que comprende una composición de lisis química directa en combinación con una muestra de citología basada en líquido o una muestra fijada con formalina, embebida en parafina, comprendiendo la composición de lisis química directa: a) una composición de tampón que comprende un componente de tampón y un componente de sal metálica, en donde el componente de sal metálica se selecciona entre el grupo que consiste en cloruro sódico (NaCl), cloruro potásico (KCl), acetato sódico ($C_2H_3NaO_2$) y sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) en donde la concentración del componente de tampón está en el intervalo de 0,2 M a 2 M y la concentración del componente de sal metálica están intervalo de 0,01 M a 1 M; y b) un tensioactivo no iónico, en donde la concentración del tensioactivo no iónico está en el intervalo de un 0,01 a un 2 por ciento (v/v); en donde cuando se almacena una muestra biológica en una composición de citología basada en líquido o en la composición fijada con formalina, embebida en parafina y se combina con la composición de lisis química directa, la composición de lisis química directa es capaz de lisar las células de la muestra biológica directamente de la composición de citología basada en líquido o una composición fijada con formalina, embebida en parafina.

2. Un método para analizar muestras biológicas almacenadas en una composición de almacenamiento de muestra que comprende: combinar una muestra biológica con una combinación de una composición de citología basada en líquido o una composición fijada con formalina, embebida en parafina y una composición de lisis química directa, en donde la muestra no se centrifuga antes de la combinación con el tampón de lisis química directa, y en donde la composición de lisis química directa comprende a) una composición de tampón que comprende un componente de tampón y un componente de sal metálica, en donde el componente de sal metálica se selecciona entre el grupo que consiste en cloruro sódico (NaCl), cloruro potásico (KCl), acetato sódico ($C_2H_3NaO_2$) y sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$) en donde la concentración del componente de tampón está en el intervalo de 0,2 M a 2 M y la concentración del componente de sal metálica está en el intervalo de 0,01 M a 1 M; y b) un tensioactivo no iónico, en donde la concentración del tensioactivo no iónico está en el intervalo de un 0,01 a un 2 por ciento (v/v); en donde cuando se almacena una muestra biológica en una composición de citología basada en líquido o en la composición fijada con formalina, embebida en parafina y se combina con la composición de lisis química directa, la composición de lisis química directa es capaz de lisar las células de la muestra biológica directamente de la composición de citología basada en líquido o una composición fijada con formalina, embebida en parafina.

3. La composición para ensayo del apartado 1, o el método del apartado 2, en donde el pH de la composición de lisis química directa está en el intervalo de 6,6 a 10.

4. La composición para ensayo del apartado 1, o el método del apartado 2, en donde el tensioactivo no iónico es un tensioactivo no iónico basado en polietilenglicol.

5. La composición para ensayo del apartado 1 o el método del apartado 2, en donde el componente de tampón es la sal ácida de tris(hidroximetil)aminometano y la concentración del componente de tampón es aproximadamente 0,75 M, la concentración de NaCl es aproximadamente 0,19 M y la concentración de polietilenglicol octilfenil éter es aproximadamente un 0,75 por ciento (v/v).

6. El método del apartado 2 en donde la diana es un ácido nucleico diana y el ensayo es un ensayo de amplificación para el ácido nucleico diana.

7. El método del apartado 2 en donde se la muestra biológica es una muestra de sangre o células seleccionadas entre el grupo que consiste en células vaginales, células cervicales, células endocervicales, células animales, células exfoliadas, células orales, células de la garganta y células peritoneales.

8. El método del apartado 2 en donde la composición de citología basada en líquido o la composición fijada con formalina, embebida en parafina tiene al menos un constituyente seleccionado entre el grupo que consiste en formaldehído, ácido fórmico, metanol, etanol, formalina tamponada, AEDT, polipéptidos, poliaminoácidos, y polisacáridos.

9. El método del apartado 2 en donde la muestra no se separa de la composición de citología basada en líquido o una composición fijada con formalina, embebida en parafina antes de las etapas de lisado y extracción.

Una composición de lisis química directa para combinación con una composición de almacenamiento de muestra incluye una composición de tampón compatible de ensayo y un tensioactivo compatible de ensayo. Tales composiciones evitan modificaciones indeseadas del ácido nucleico lisado a partir de las células en la muestra biológica y los ensayos de las muestras de tales composiciones no requieren etapas caras y prolongadas tales como centrifugación y procesamiento prolongado a alta temperatura.

La composición de lisis química directa de la presente invención permite la extracción directa de ácidos nucleicos de las células en la muestra biológica sin la necesidad de retirar por decantación los medios de citología o intercambiar de otro modo los medios de citología con tampones compatible de ensayos. La lisis celular se puede producir directamente cuando la muestra aún esta combinada con la composición de lisis química directa. No existe ninguna necesidad de combinar la muestra con proteinasa K o alguna otra enzima para extraer los ácidos nucleicos de las células.

En una realización, la composición de lisis química directa se utiliza en forma de un aditivo en una composición de citología basada en líquido (LBC) que se usa para dilución, almacenamiento, transporte de muestra, etc. La composición de lisis química directa permite la lisis de la muestra a medida que la muestra se precalienta o se incuba antes de la extracción de AN de la muestra. Algunos ejemplos de LBC incluyen, pero no se limitan a, LBC SurePath y LBC ThinPrep PreservCyt.

En una realización, la composición de lisis química directa para combinación con una composición de almacenamiento de muestra tiene una composición de tampón compatible de ensayo y un tensioactivo compatible de ensayo. En realizaciones preferibles, la composición de tampón compatible de ensayo tiene un componente de tampón y un componente de sal metálica. En una realización preferible, el pH de la composición de lisis química directa está en el intervalo de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 10.

Algunos ejemplos de sales metálicas adecuadas incluyen cloruro sódico (NaCl), cloruro potásico (KCl), acetato sódico ($C_2H_3NaO_2$) y sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$). En la realización descrita, la concentración de la sal metálica en la composición de lisis química directa es al menos aproximadamente 0,01 M. Preferiblemente la sal es NaCl y la concentración de sal está en el intervalo de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 1 M.

En realizaciones preferibles, la concentración del componente de tampón está en el intervalo de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 2 M. Algunos ejemplos de componentes de tampón adecuados incluyen tris(hidroximetil)amino metano y la sal ácida de tris(hidroximetil)amino metano.

En ciertas realizaciones, la composición de lisis química directa también contiene un tensioactivo no iónico. Algunos ejemplos de tensioactivos adecuados incluyen tensioactivos no iónicos basados en polietilenglicol tales como polietilenglicol octilfenil éter (disponible en el mercado como Triton® x-100). Algunos ejemplos adicionales de tensioactivos no iónicos adecuados incluyen tensioactivos de polisorbato tales como monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán (conocido en el mercado como polisorbato 20 o Tween® 20). Tanto Tween® 20 como Triton® x-100

están disponibles en el mercado. En realizaciones preferibles, la concentración del tensioactivo no iónico está en el intervalo de aproximadamente un 0,01 a aproximadamente un 2 por ciento (v/v).

En ciertas realizaciones, la composición de lisis química directa también incluye glicina.

En una realización preferible la composición de lisis química directa de la reivindicación 10 en donde el componente de tampón es la sal ácida de tris(hidroximetil)amino metano y la concentración del componente de tampón es aproximadamente 0,75 M, la concentración de NaCl es aproximadamente 0,19 M y la concentración de polietilenglicol octilfenil éter es aproximadamente un 0,75 por ciento (v/v).

La presente invención también contempla un método para analizar las muestras almacenadas en una composición de almacenamiento de muestra. En el método, se combina una muestra con una composición de lisis química directa como se ha descrito anteriormente. Al menos una parte de la muestra se retira de la composición de almacenamiento de muestra junto con al menos cierta parte de la composición de almacenamiento de muestra. La muestra combinada con la composición de almacenamiento de muestra se incuba a continuación a una temperatura de al menos 80° C durante un tiempo suficiente para lisar al menos una parte de las células en la parte retirada de la muestra. El ácido nucleico se extrae de la muestra y a continuación se amplifica. La extracción se puede producir usando un proceso automatizado o manual. En ciertas realizaciones el ácido nucleico diana es ARN o ADN.

En una realización la muestra se combina con una composición de lisis química directa que comprende a) una composición de tampón compatible de ensayo; y b) un tensioactivo compatible de ensayo. Al menos una parte de la muestra se retira de la composición de almacenamiento de muestra en donde la parte retirada también incluye la composición de almacenamiento de muestra. La parte retirada de la muestra se incuba a una temperatura que es al menos 80° C durante un tiempo suficiente para lisar al menos una parte de las células en la parte retirada de la muestra. El ácido nucleico se extrae y se amplifica como se ha descrito anteriormente. En esta realización la parte retirada de la muestra no se separa adicionalmente del medio de almacenamiento de muestra antes de las etapas de lisado y extracción. Las etapas de extracción pueden ser manuales o automáticas.

Otras realizaciones de la presente invención incluyen un kit de diagnóstico para extraer, mediante lisis química directa, ácidos nucleicos de una muestra retirada de una composición de almacenamiento de muestra. El kit de diagnóstico incluye la composición de lisis química directa descrita anteriormente. La composición de almacenamiento de muestra se proporciona para conservar una muestra de tejido.

En una realización, el kit de diagnóstico para extraer ácidos nucleicos incluye una composición de almacenamiento de muestra con una composición de lisis química directa que tiene: a) un componente de tampón compatible de ensayo; y b) un tensioactivo no iónico, en donde el almacenamiento de muestra se proporciona para conservar una muestra de tejido. La composición de tampón compatible de ensayo tiene un componente de tampón y una sal metálica. En una realización, la sal metálica es NaCl y la concentración de NaCl en la composición de lisis química directa es al menos aproximadamente 0,01 M y la concentración del componente de tampón está en el intervalo de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 2 M. El pH de la composición de lisis química directa está en el intervalo de aproximadamente 7 a aproximadamente 9 y la concentración del tensioactivo no iónico está en el intervalo de aproximadamente un 0,01 a aproximadamente un 2 por ciento (v/v).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A-D ilustran el efecto del pH en la eficacia de una realización de la composición de lisis química directa. La Figura 2 ilustra la detección de biomarcadores de proteínas a partir de muestras lisadas usando una realización de la composición de lisis química directa y el método que se describe en la presente memoria.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, se ha de entender que la invención no se limita a su aplicación a los detalles que se exponen en la siguiente descripción o se muestran a modo de ejemplo mediante los ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ponerse en práctica o llevarse a cabo de diversas formas. Además, se ha de entender que la redacción y la terminología que se emplean en la presente memoria son con fines de descripción y no se deberían considerar como limitantes. Lo que sigue a continuación son definiciones de ciertos términos usados en la presente memoria descriptiva.

Una composición de lisis química directa es una composición que permite la lisis de los componentes celulares en la muestra para extracción de ácido nucleico (AN) de la misma sin la necesidad de etapas intermedias para separar la composición de lisis química de la muestra. La composición de lisis química directa también permite el ensayo/detección de otros constituyentes de la muestra (por ejemplo, biomarcadores de proteínas) si la necesidad de separar la composición de lisis química de la muestra antes del ensayo/detección de esos constituyentes.

Algunos ejemplos de AN son ADN y ARN de cadena simple o doble. Algunos ejemplos adicionales de AN que se pueden extraer mediante el método incluyen no solo ADN o ARN genómicos de animales, plantas, bacterias, virus, hongos y organismos parásitos, sino también ADN o ARN de mitocondrias o cloroplastos. Algunos ejemplos de otras

clases de AN que se pueden extraer mediante el método incluyen no solo ARNm, sino también ARN de transferencia, ARN ribosomal, ARN nuclear pequeño así como ADN de plásmido. El ADN y el ARN extraídos mediante el método de la invención también pueden ser completa o parcialmente monocatenarios o poseer otra estructura terciaria o cuaternaria. Una muestra que contiene AN se muestra a modo de ejemplo mediante muestras viables tales como células de leucocitos, el cultivo de células hospedadoras que contienen vectores o similares que se preparan por lo general mediante tecnología recombinante génica, células infectadas con virus o fagos, virus en la sangre, y el cultivo de un microorganismo simple. El cultivo puede contener microorganismos pero su sobrenadante solo es suficiente. Es aplicable no solo un cultivo artificial sino también un cultivo de origen natural. En el caso de una muestra que contenga partes de microorganismo, se puede llevar a cabo homogeneización o aplicación de ultrasonidos según se requiera para conseguir una buena eficacia de extracción.

Algunos tipos de muestra alternativos incluyen, pero no se limitan a, muestras biológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas o no infecciosas, muestras ambientales, o muestras de alimentos o agua. El AN diana puede ser una secuencia particular o puede ser una clase de AN. Una clase de ácido nucleico es, para un método de ensayo particular, las moléculas de AN cuyas propiedades químicas, físicas o biológicas son tales que se puede esperar que se extraigan de forma eficaz en los métodos usados para extracción de AN. Por lo general, pero no necesariamente, el AN de una clase son todos ADN o análogos de ADN o todos ARN o análogos de ARN. Otras dianas pueden ser secuencias de proteínas tales como biomarcadores de proteínas.

Los organismos fijados como diana pueden incluir, pero no se limitan a, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, virus del papiloma humano, virus 1/2 de la Inmunodeficiencia humana, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis B, virus del síndrome respiratorio agudo grave, virus A/B de la gripe, virus 1-6 del herpes simple, enterovirus, virus del Nilo occidental, virus parainfluenza, adenovirus, virus A/B respiratorio sincitial, *Mycobacterium paratuberculosis*, complejo intracelular de *Mycobacterium avium*, complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, citomegalovirus, estreptococos del grupo B, *Bordetella pertussis*, y *Bordetella parapertussis*.

En un aspecto de la invención, el ácido nucleico diana es un ARN o ADNc particular de una o más de las siguientes fuentes: patógenos bacterianos, no patógenos bacterianos, patógenos virales, no patógenos virales, patógenos fúngicos, no patógenos fúngicos, patógenos de levadura, no patógenos de levadura, patógenos parásitos, no patógenos parásitos, plantas, productos de animales, alimentos, ARN o ADNc total en la matriz de muestra, ARN o ADNc procarionota total, ARN o ADNc eucariota total, o ARN o ADNc viral total.

En otro aspecto de la invención, el ácido nucleico diana buscado es ADN de una o más de las siguientes fuentes: patógenos bacterianos, no patógenos bacterianos, patógenos virales, no patógenos virales, patógenos fúngicos, no patógenos fúngicos, patógenos de levadura, no patógenos de levadura, patógenos parásitos, no patógenos parásitos, plantas, productos de animales, alimentos, ADN total en la matriz de muestra, ADN procarionota total, ADN eucariota total, o ADN viral total.

En otro aspecto de la invención, la diana es un biomarcador de proteínas.

Una composición de almacenamiento de muestra es cualquier composición que se usa para almacenar o transportar una muestra biológica antes de la extracción del ácido nucleico de los componentes celulares en la muestra. Como se ha indicado anteriormente, las composiciones de almacenamiento de muestra incluyen medios LBC, medios de parafina, etc.

Compatible de ensayo, como se usa en la presente memoria, es cualquier composición que no afecte de forma significativamente adversa el ensayo al que se someten las muestras (por ejemplo, ácido nucleico/proteínas extraídas). Por ejemplo, una composición compatible de ensayo no modificará el ácido nucleico extraído en la muestra de una forma que afecte de forma adversa la capacidad del ensayo corriente abajo para detectar ácido nucleico u otros constituyentes de la muestra tales como biomarcadores de proteínas.

En una realización, la composición de lisis química directa que se describe en la presente memoria tiene una composición de tampón compatible de ensayo de dos componentes. La composición de tampón compatible de ensayo no modificará el ácido nucleico extraído en la muestra de una forma que afecte de forma adversa la capacidad del ensayo corriente abajo para detectar el ácido nucleico por sí misma o cuando se combina con otros constituyentes de la composición de lisis química o con constituyentes del ácido nucleico extraído (por ejemplo, restos de la composición de almacenamiento de muestra). El primer componente de la composición de tampón compatible de ensayo es un tampón compatible de ensayo. Tales tampones se conocen bien por el experto en la materia y no se enumeran exhaustivamente en la presente memoria. Algunos ejemplos de tampones adecuados incluyen tris(hidroximetil)amino metano y la sal ácida de tris(hidroximetil)amino metano (Tris HCl en la presente memoria). La concentración de trabajo final de tampón en la composición de lisis química directa está en el intervalo de aproximadamente 0,2 M a aproximadamente 2 M. Preferiblemente, la concentración del componente de tampón es de aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 1 M. Todas las concentraciones en la presente memoria se expresan como concentraciones de trabajo finales (es decir, concentraciones a las que se combina la composición de lisis química directa con la muestra).

El segundo componente del tampón compatible de ensayo es una sal. Algunos ejemplos de sales adecuadas incluyen NaCl, KCl, $C_2H_3NaO_2$ (acetato sódico) y $(NH_4)_2SO_4$ (sulfato de amonio). En realizaciones preferibles, la sal es una sal metálica y, lo más preferiblemente, NaCl. La concentración de la sal en la composición de lisis química directa está en el intervalo de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 1 M. En realizaciones preferibles, la concentración de la sal metálica es de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 0,5 M y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 0,4 M. La concentración de sal en una composición de lisis química directa particular depende del tampón, pH y tensioactivos (si los hubiera) en la composición.

La composición de lisis química directa también contiene un tensioactivo compatible de ensayo. Algunos ejemplos de tensioactivos adecuados incluyen Triton® X-100 y Tween® 20 (polisorbato 20), descritos anteriormente. Compatible de ensayo es como se ha definido anteriormente. En una realización preferible, el tensioactivo compatible de ensayo es un tensioactivo no iónico basado en polietilenglicol. La concentración del tensioactivo no iónico está en el intervalo de aproximadamente un 0,01 a aproximadamente un 2 por ciento (v/v). En realizaciones preferibles, el tensioactivo no iónico es polietilenglicol octilfenil éter. Los tensioactivos compatibles de ensayo se conocen bien por los expertos en la materia y no se discuten con detalle aquí.

La composición de lisis química directa tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 6,6 a aproximadamente 10. En realizaciones preferibles, el pH está en el intervalo de aproximadamente 7 a aproximadamente 9.

La composición de lisis química directa que se describe en la presente memoria facilita la extracción de ácido nucleico de muestras fijadas en medios por reducción de la reticulación que se produce por lo general entre el AN y los medios constituyentes para proporcionar que el AN sea tanto extraíble como amplificable. En una realización, se combina una muestra con la lisis química directa y se incuba a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 100° C a aproximadamente 130° C y durante un tiempo en el intervalo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos para lisar químicamente al menos una parte de las células y, en la medida en la que se haya producido reticulación de AN, desreticular el AN. Esto va seguido de una extracción del AN de la muestra. En realizaciones preferibles, el AN es ADN y la extracción de ADN se consigue a través de separación magnética del ADN usando partículas de óxido férrico. En realizaciones preferibles, el protocolo de extracción es compatible con la plataforma BD Viper XTR™. Tal protocolo proporciona la unión del ADN a las partículas de óxido férrico, el lavado del resto de la muestra de las partículas y la elución del ADN de las partículas. El ADN extraído se somete a un ensayo de amplificación y detección adecuado (por ejemplo, PCR en tiempo real).

En otra realización, la muestra se analiza para antígenos diana (por ejemplo, biomarcadores de proteínas). Los ensayos convencionales para la detección de antígenos extraídos de una muestra se conocen bien por el experto en la materia y no se describen con detalle en la presente memoria. En un ejemplo, se usan moléculas de captura de anticuerpo para unirse y someter a ensayo a los antígenos diana. Los métodos de anticuerpo para tal captura se usan de forma rutinaria en una diversidad de formatos diferentes. Una de las técnicas practicadas más habitualmente es el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) que se usa de forma rutinaria en aplicaciones de diagnóstico de proteínas. Una característica deseada de los métodos de detección de proteínas es la capacidad tanto de conservar como de recuperar antígenos de una célula de un modo tal que se puedan exponer al anticuerpo de captura y en algunos casos también retengan su forma nativa y permitan que se unan específicamente anticuerpos dependientes conformacionalmente al antígeno diana. Otra característica deseada es la capacidad de permitir la unión selectiva de las moléculas de anticuerpo correctas a la diana y permitir que las interacciones no específicas se retiren durante las etapas de lavado. Por lo tanto, la detección de biomarcadores de proteínas requiere que el tampón compatible de ensayo sea compatible con y facilite las interacciones específicas de unión a proteínas. La composición de lisis química directa que se describe en la presente memoria es suficientemente fuerte para lisar las células, liberando de ese modo los contenidos de proteína de esas células. La composición de lisis química directa no afecta de forma adversa a las proteínas liberadas, y protege a las proteínas de enzimas proteolíticas. Finalmente, el tampón compatible de ensayo es compatible con la unión específica de anticuerpo y no interfiere con este proceso debido a efectos de desnaturalización, interacciones iónicas, etc.

A continuación se proporcionan algunos ejemplos para ilustrar específicamente los conceptos que se han descrito anteriormente. Los siguientes ejemplos son realizaciones altamente específicas de la presente invención y no se pretende que limiten la invención de ningún modo, excepto de forma consistente con las reivindicaciones anexas.

Ejemplo 1. Extracción de ADN de VPH de una muestra de paciente almacenada en LBC SurePath

Se compararon dos soluciones para determinar su eficacia como composiciones de lisis química directa. La primera era un diluyente que contenía Tris-HCl 1 M, NaCl 0,5 M, Triton X-100 al 1 % y tenía un pH de 9,0 (Diluyente 1 en la presente memoria). El segundo diluyente contenía Tris-HCl 330 mM, NaCl 16,67 mM y tenía un pH de 7,8 (Diluyente 2 en la presente memoria). Se recogieron células de trabajo derivadas de pacientes y se almacenaron en LBC SurePath durante 21 días. Tanto el Diluyente 1 como el Diluyente 2 son realizaciones de la composición de lisis química directa de la presente invención.

Específicamente, se dividieron células de trabajo derivadas de pacientes en LBC SurePath a una concentración de aproximadamente 12.500 células/ml. Se prepararon cuarenta y ocho tubos de muestra para ensayo en la

herramienta Becton Dickinson (BD) Viper™. Veinticuatro tubos tenían 0,85 ml de Diluyente 1 y veinticuatro tenían la misma cantidad de Diluyente 2. Se añadieron células diluidas derivadas de paciente (0,25 ml) a cada uno de los 48 tubos de muestra. Después de la combinación con las muestras, las concentraciones finales de tampón de trabajo fueron las siguientes: i) Tris-HCl 0,77 M, NaCl 0,386 M, Triton X-100 al 0,77 % (con un pH de aproximadamente 9,0) en el Diluyente 1; y ii) Tris-HCl 0,255 M, NaCl 0,0129 M (con un pH de aproximadamente 7,8) en el Diluyente 2.

Se incubaron ocho muestras de cada grupo de veinticuatro a i) temperatura ambiente, ii) 80° C, o iii) 120° C, todas durante veinte minutos. A continuación, las muestras se enfriaron durante veinticinco minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se sometieron a un protocolo de extracción de ADN Viper™ XTR modificado usando partículas de óxido de hierro (FeO) y se usaron 0,8 ml de la muestra precalentada o incubada para la extracción. El protocolo de extracción para Viper™ XTR esta disponible en el mercado y no se describe con detalle en la presente memoria. A medida que se extrajo ADN, el ADN para la muestra se eluyó en 400 µl de tampón de elución/neutralización. El eluato (20 µl) se mezcló con 5 µl de mezcla maestra de PCR, y se usaron posteriormente como confirmación 20 copias/reacción de dianas de ADN de plásmido de VPH 18 y VPH 45 en cada reacción para ensayo de inhibición de PCR. Los ensayos de PCR en tiempo real se usaron para la detección de VPH 16, 18 y 45, y el gen de control endógeno de ADN humano HBB. La detección de ADN se determinó mediante los valores de umbral de ciclo (Ct) resultantes. Los valores de Ct menores de aproximadamente 30 representan fuertes reacciones positivas indicativas de ácido nucleico diana abundante en las muestras. Los valores de Ct de 30-35 representan reacciones positivas de moderadas a bajas indicativas de cantidades de moderadas a bajas de ácido nucleico diana en la muestra. Los valores de Ct de 35-45 representan reacciones débiles que indican cantidades mínimas de ácido nucleico diana en la muestra. Los valores de Ct por encima de aproximadamente 45 se expresan como "Sin Ct", lo que indica que no se detectó ninguna cantidad de ADN.

Tabla 1

Extracción de ADN de VPH de muestras de paciente almacenadas en medios SurePath						
	Diluyente 2			Diluyente 1		
HPV16	TA	80° C	120° C	TA	80° C	120° C
1	Sin Ct	Sin Ct	32,57	Sin Ct	36,97	31,20
2	Sin Ct	Sin Ct	32,49	Sin Ct	Sin Ct	30,56
3	Sin Ct	Sin Ct	32,33	Sin Ct	Sin Ct	30,40
4	Sin Ct	Sin Ct	32,55	Sin Ct	Sin Ct	30,34
5	Sin Ct	Sin Ct	32,88	Sin Ct	Sin Ct	30,65
6	Sin Ct	Sin Ct	32,57	Sin Ct	36,99	30,54
7	36,73	Sin Ct	32,35	Sin Ct	Sin Ct	30,94
8	Sin Ct	Sin Ct	32,64	Sin Ct	Sin Ct	30,56
PROM.	32,55			30,65		
	Diluyente 2			Diluyente 1		
HPV45	TA	80° C	120° C	TA	80° C	120° C
1	33,88	33,08	32,87	32,90	33,49	33,37
2	33,61	33,34	32,67	33,86	29,31	33,09
3	33,85	34,38	33,92	33,39	32,96	32,80
4	34,14	33,54	33,47	33,46	35,02	33,14
5	34,26	34,11	33,60	32,10	34,39	33,64
6	33,18	33,58	33,64	32,98	33,73	33,71
7	33,39	33,35	34,08	33,11	32,92	33,18
8	33,44	33,86	34,04	33,60	33,92	32,69
PROM.	33,72	33,66	33,54	33,18	33,22	33,20

ES 2 660 762 T3

Extracción de ADN de VPH de muestras de paciente almacenadas en medios SurePath						
HBB	TA	80° C	120° C	TA	80° C	120° C
1	Sin Ct	Sin Ct	37,91	Sin Ct	42,51	34,85
2	Sin Ct	Sin Ct	38,68	Sin Ct	41,67	35,48
3	Sin Ct	Sin Ct	37,48	Sin Ct	Sin Ct	34,34
4	Sin Ct	Sin Ct	37,25	Sin Ct	Sin Ct	34,95
5	Sin Ct	Sin Ct	37,16	Sin Ct	Sin Ct	34,9
6	Sin Ct	Sin Ct	37,88	Sin Ct	Sin Ct	35,48
7	Sin Ct	Sin Ct	39,14	Sin Ct	Sin Ct	35,22
8	Sin Ct	Sin Ct	36,99	Sin Ct	Sin Ct	34,99
PROM.	37,80			35,03		
Diluyente 2			Diluyente 1			
HPV18	TA	80° C	120° C	TA	80° C	120° C
1	34,55	34,77	34,78	34,37	34,08	34,03
2	33,73	34,12	34,25	34,60	34,33	33,82
3	34,59	33,97	34,00	34,05	33,77	33,44
4	34,47	34,53	33,78	33,78	34,68	33,52
5	34,84	34,87	33,86	34,36	34,17	33,41
6	33,99	33,63	34,82	33,61	33,86	34,74
7	33,77	34,68	34,00	34,05	33,47	33,42
8	33,84	34,24	34,11	34,57	34,79	33,99
PROM.	34,22	34,35	34,20	34,17	34,14	33,80

5 La incubación en el Diluyente 1 a 120° C redujo el valor de Ct de VPH 16 y HBB en 1,90 y 2,77 respectivamente cuando se comparó con la incubación en el Diluyente 2 a 120° C. La incubación a temperatura ambiente o 80° C en ambos diluyentes no dio ninguna amplificación para HPV16 y HBB. La detección de VPH 45 y VPH 18 usados como confirmación confirmó que el propio ensayo funcionaba pero que no se detectaron HPV16 y HBB a temperaturas de incubación inferiores, indicando que no se produjo lisis, extracción o detección en estas muestras.

Ejemplo 2. Extracción de ADN de VPH a partir de SurePath usando diferentes diluyentes y componentes de diluyente individuales

10 Se diluyeron células de trabajo derivadas de paciente en LBC SurePath a 12500 células/ml. Se prepararon cuarenta y ocho tubos de muestra BD Viper. Había ocho tubos en cada grupo, con un total de seis grupos (a-f). En cada grupo se añadieron 0,85 ml de uno de los siguientes tampones:

- 15
- a. Tris 1 M, (pH 9,0) solo;
 - b. NaCl 0,5 M;
 - c. Triton X-100 al 1 %;
 - d. a + b + c.

20 Se añadieron células de paciente diluidas (0,25 ml) a cada uno de los 48 tubos de muestra. Después de la combinación con las muestras, las concentraciones de tampón de trabajo finales fueron las siguientes: Tris-HCl 0,77 M en el grupo a; NaCl 0,386 M para el grupo b; Triton X-100 al 0,77 % en el grupo c; y Tris-HCl 0,77 M, NaCl 0,386 M, y Triton X-100 al 0,77 % en el grupo d (la combinación de tampones de a, b, y c). Todos los tubos de muestras se incubaron a 120° C durante 20 min. A continuación, las muestras se enfriaron durante 25 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se cargaron en la herramienta BD Viper™ XTR y se usaron 25 0,8 ml para la extracción como se ha descrito anteriormente. Se eluyó el ADN de las muestras en 400 µl de tampón de elución/neutralización. El eluato (20 µl) se mezcló con 5 µl de mezcla maestra de PCR. Se usaron posteriormente como confirmación 20 copias/reacción de dianas de ADN de plásmido de VPH 18 y VPH 45 en cada reacción como

ES 2 660 762 T3

control para someter a ensayo la inhibición de PCR. Los ensayos de PCR en tiempo real se usaron para la detección de VPH 16, 18 y 45, y el gen de control endógeno de ADN humano HBB.

Tabla 2

5

Extracción de ADN de VPH a partir de medios LBC SurePath usando diluyentes de VPH y tampón de componente individual				
HPV16	Tris 1 M (a)	NaCl 0,5 M (b)	Triton al 1 % (c)	a + b + c
1	35,27	35,86	34,56	32,43
2	37,07	36,62	36,55	31,03
3	34,27	Sin Ct	36,68	31,30
4	34,52	Sin Ct	35,65	30,95
5	Sin Ct	Sin Ct	34,37	31,62
6	35,90	Sin Ct	33,71	31,21
7	34,26	Sin Ct	34,46	31,20
8	34,09	35,66	35,12	30,80
PROM.	35,05	36,05	35,14	31,33
HPV45	Tris 1 M (a)	NaCl 0,5 M (b)	Triton al 1 % (c)	a + b + c
1	33,47	34,61	34,19	35,22
2	33,76	34,17	33,90	33,39
3	34,01	33,56	34,01	33,69
4	33,80	31,61	34,29	33,98
5	33,01	32,86	33,23	33,57
6	32,59	33,49	33,44	33,43
7	33,37	32,56	33,44	33,05
8	32,75	33,25	35,33	33,92
PROM.	33,35	33,26	33,98	33,78
HBB	Tris 1 M (a)	NaCl 0,5 M (b)	Triton al 1 % (c)	a + b + c
1	Sin Ct	Sin Ct	Sin Ct	42,35
2	Sin Ct	Sin Ct	44,25	41,29
3	Sin Ct	Sin Ct	43,81	40,94
4	Sin Ct	Sin Ct	Sin Ct	40,38
5	Sin Ct	Sin Ct	Sin Ct	41,67
6	43,34	Sin Ct	42,17	40,63
7	44,52	Sin Ct	44,87	41,02
8	Sin Ct	Sin Ct	Sin Ct	40,70
PROM.	43,93		43,78	41,12
HPV18	Tris 1 M (a)	NaCl 0,5 M (b)	Triton al 1 % (c)	a + b + c
1	34,99	34,94	34,05	34,34
2	33,94	34,56	33,84	34,18
3	34,80	34,68	34,65	34,27

ES 2 660 762 T3

Extracción de ADN de VPH a partir de medios LBC SurePath usando diluyentes de VPH y tampón de componente individual				
4	33,97	34,52	33,80	33,74
5	33,95	35,75	33,89	34,25
6	35,17	33,90	34,27	34,35
7	34,39	34,56	34,41	33,64
8	33,87	34,94	34,03	34,32
PROM.	34,38	34,73	34,12	34,14

Se detectaron los tipos de VPH 16, 18 y 45 usando d) anterior con incubación a 120° C. Los demás componentes de diluyente individual (Tris 1 M, NaCl 0,5 M y Triton al 1 %) no proporcionaron una detección consistente de ADN, independientemente del tipo de VPH. Cada componente individual contribuyó a mejorar la extracción de ADN. El mejor resultado se consiguió cuando se combinaron conjuntamente los componentes a, b y c.

Ejemplo 3. Comparación de la extracción de ADN a partir de LBC SurePath usando el Diluyente 1 a 120° C y el Diluyente 2 con incubación a temperatura ambiente

Se recogieron treinta y seis muestras de SurePath y se extrajeron de acuerdo con los dos protocolos siguientes.

1) Experimento sin calor. Se prepararon treinta y seis tubos de muestra BD Viper™ por adición de 0,85 ml del Diluyente 2 descrito en el Ejemplo 1. Se añadió muestra clínica de SurePath (0,25 ml) a cada tubo. Después de la combinación con las muestras, las concentraciones de tampón de trabajo finales fueron las siguientes: Tris-HCl 0,255 M, NaCl 0,0129 M (con un pH de aproximadamente 7,8) para el Diluyente 2. Los treinta y seis tubos se cargaron en el BD Viper™ y se usaron 0,8 ml de la muestra para la extracción. Se eluyó el ADN a partir de la muestra en 400 µl de tampón de elución/neutralización. El eluato (20 µl) se mezcló con 5 µl de mezcla maestra de PCR. Se usó un ensayo de PCR en tiempo real para detectar VPH 16, 18 y 45, y el gen de control endógeno de ADN humano HBB.

2) Experimento con calor. Se prepararon treinta y seis tubos de muestra BD Viper™ a los que se añadieron 0,85 ml del Diluyente 2 descrito en el Ejemplo 1. Se añadió muestra clínica de SurePath (0,25 ml) a cada tubo. Después de la combinación del diluyente con las muestras, las concentraciones de tampón de trabajo finales fueron las siguientes: Tris-HCl 0,77 M, NaCl 0,386 M, y Triton X-100 al 0,77 % (con un pH de aproximadamente 9,0) en el Diluyente 1. Todos los tubos de muestras se incubaron a 120° C durante 20 min y a continuación se enfriaron durante 25 min a temperatura ambiente. Los treinta y seis tubos se cargaron en el BD Viper™ y se usaron 0,8 ml de la muestra para la extracción. Se eluyó el ADN a partir de la muestra en 400 µl de tampón de elución/neutralización. El eluato (20 µl) se mezcló con 5 µl de mezcla maestra de PCR. Se usó un ensayo de PCR en tiempo real para detectar VPH 16, 18 y 45, y el gen de control endógeno de ADN humano HBB. No se detectaron VPH 45 y VPH 18.

Tabla 3

Comparación de la extracción de ADN: i) usando el Diluyente 1 con incubación a 120° C; y ii) Diluyente 2 con incubación a temperatura ambiente					
	HPV16		HBB		
	Sin calor	Calor	Sin calor	Calor	ΔCt
1	Sin Ct	Sin Ct	25,28	23,97	1,31
2	Sin Ct	Sin Ct	32,25	28,30	3,95
3	Sin Ct	Sin Ct	31,78	27,92	3,86
4	Sin Ct	41,33	34,78	29,83	4,95
5	Sin Ct	Sin Ct	34,69	29,74	4,95
6	Sin Ct	41,09	37,51	31,31	6,20
7	Sin Ct	Sin Ct	32,24	26,82	5,42
8	Sin Ct	Sin Ct	31,93	26,88	5,05
9	Sin Ct	Sin Ct	31,74	28,88	2,86
10	Sin Ct	Sin Ct	28,88	25,59	3,29

ES 2 660 762 T3

Comparación de la extracción de ADN: i) usando el Diluyente 1 con incubación a 120° C; y ii) Diluyente 2 con incubación a temperatura ambiente					
11	Sin Ct	Sin Ct	29,41	24,93	4,48
12	Sin Ct	Sin Ct	35,21	29,66	5,55
13	Sin Ct	Sin Ct	28,54	25,23	3,31
14	Sin Ct	Sin Ct	30,66	27,54	3,12
15	Sin Ct	35,16	32,31	26,86	5,45
16	Sin Ct	Sin Ct	36,29	29,39	6,90
17	25	21,07	32,54	28,00	4,54
18	Sin Ct	Sin Ct	35,46	29,89	5,57
19	Sin Ct	34,90	32,18	29,19	2,99
20	Sin Ct	Sin Ct	28,83	24,56	4,27
21	Sin Ct	Sin Ct	31,64	26,72	4,92
22	Sin Ct	Sin Ct	28,14	24,40	3,74
23	Sin Ct	Sin Ct	26,67	25,68	0,99
24	Sin Ct	31,33	29,38	25,09	4,29
25	Sin Ct	Sin Ct	32,74	31,56	1,18
26	Sin Ct	Sin Ct	32,91	26,57	6,34
27	Sin Ct	Sin Ct	32,96	28,30	4,66
28	Sin Ct	Sin Ct	35,79	29,64	6,15
29	Sin Ct	Sin Ct	29,96	27,84	2,12
30	Sin Ct	Sin Ct	32,76	28,77	3,99
31	Sin Ct	Sin Ct	31,37	24,60	6,77
32	Sin Ct	Sin Ct	32,79	29,07	3,72
33	Sin Ct	42,28	30,9	27,83	3,07
34	Sin Ct	Sin Ct	34,58	30,51	4,07
35	Sin Ct	Sin Ct	36,73	28,06	8,67
36	36,36	32,38	22,78	21,22	1,56

En promedio, el protocolo de incubación calentada/Diluyente 1 acortó, en 4,29 Ct, la detección de HBB en comparación con el protocolo que usa el Diluyente 2 con una incubación a temperatura ambiente. Las muestras que tenían el ADN de VPH de Tipo 16 (se supone que todas las muestras tienen el ADN de control de HBB mientras que no todas las muestras tendrán el VPH de uno o más tipos) exhibieron detección con valores de Ct acortados y por lo tanto se volvieron más detectables cuando se usó el protocolo con incubación calentada y Diluyente 1 en comparación con el uso de incubación a temperatura ambiente y el Diluyente 2.

Ejemplo 4. Comparación de la extracción de ADN a partir de LBC SurePath y ThinPrep PreservCyt con o sin calor

Se diluyeron células de trabajo derivadas de paciente en una de cualquiera de muestras clínicas negativas de SurePath o ThinPrep a 12500 células/ml. Se prepararon treinta y dos tubos de muestra BD Viper™ a los que se añadieron 0,85 ml de Diluyente 1. Se añadieron células de paciente usadas como confirmación de SurePath (0,25 ml) a 16 tubos de muestra y se añadieron células de paciente usadas como confirmación de ThinPrep (0,25 ml) a los otros 16 tubos de muestra. Después de la combinación del diluyente con las muestras, las concentraciones de tampón de trabajo finales fueron las que se han indicado en el Ejemplo 1. Se incubaron ocho tubos de muestra de cada grupo a temperatura ambiente y se incubaron ocho a 120° C durante 20 minutos. Los tubos calentados se enfriaron durante 25 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los tubos de muestra se cargaron en la plataforma BD Viper™ y se usaron 0,8 ml de las muestras para la extracción de ADN. A continuación, se eluyó el ADN en 400 µl de tampón de elución/neutralización. El eluato (20 µl) se mezcló con 5 µl de mezcla maestra de PCR. Se usaron posteriormente como confirmación 20 copias/reacción de dianas de ADN de plásmido de VPH 18 y VPH 45 en cada muestra para someter a ensayo la inhibición de PCR. Los ensayos de PCR en tiempo real se usaron

ES 2 660 762 T3

para la detección de VPH 16, 18 y 45, y el gen de control endógeno de ADN humano HBB.

Tabla 4

Extracción de ADN a partir de SurePath y ThinPrep PreservCyt LBC con o sin calor				
HPV16	ThinPrep		SurePath	
Rep	Sin calor	Calor	Sin calor	Calor
1	31,24	31,99	Sin Ct	31,64
2	30,89	31,37	Sin Ct	31,63
3	30,98	31,66	Sin Ct	32,16
4	31,39	31,58	Sin Ct	31,71
5	31,02	31,15	Sin Ct	31,16
6	31,26	31,44	Sin Ct	31,16
7	31,44	31,16	Sin Ct	31,48
8	31,85	31,33	Sin Ct	31,58
Prom.	31,26	31,46		31,57
HPV45	ThinPrep		SurePath	
Rep	Sin calor	Calor	Sin calor	Calor
1	32,25	32,22	32,67	32,56
2	32,42	32,24	32,06	32,89
3	33,2	33,15	32,54	31,91
4	32,13	32,06	32,44	31,97
5	32,48	33,03	32,19	32,85
6	31,63	33,36	32,47	32,07
7	33,65	32,17	32,69	31,53
8	32,43	32,96	32,6	32,2
Prom.	32,52	32,65	32,46	32,25
HBB	ThinPrep		SurePath	
Rep	Sin calor	Calor	Sin calor	Calor
1	27,73	27,52	33,33	29,02
2	27,99	27,09	33,63	28,88
3	28,08	27,17	33,43	29,25
4	28,21	26,89	33,28	28,71
5	28,12	26,98	33,38	28,37
6	27,98	27,04	34,3	28,36
7	27,99	27,02	34,07	28,29
8	28,43	27,38	33,96	27,84
Prom.	28,07	27,14	33,67	28,59
HPV18	ThinPrep		SurePath	
Rep	Sin calor	Calor	Sin calor	Calor

Extracción de ADN a partir de SurePath y ThinPrep PreservCyt LBC con o sin calor				
1	33,68	33,94	34,97	33,88
2	33,38	33,86	33,87	33,88
3	34,32	34,72	34,84	33,58
4	33,35	34,11	34,22	33,81
5	33,89	34,16	34,55	33,97
6	33,4	32,88	32,96	33,68
7	34,44	34,2	34,02	33,61
8	33,82	34,1	33,96	34,83
Prom.	33,79	34,00	34,17	33,91

5 La incubación de las muestras a 120° C en el Diluyente 1 acortó significativamente el valor de Ct de HBB para las muestras tanto de ThinPrep como de SurePath. La reducción (en comparación con la incubación a temperatura ambiente) fue de 0,93 Ct para las muestras de ThinPrep y 5,08 Ct para las muestras de SurePath. El calor no tuvo ningún efecto estadísticamente significativo en la detección de VPH 16 a partir de ThinPrep, pero mejoró significativamente la detección de VPH 16 a partir de SurePath.

Ejemplo 5. Extracción de ADN a partir de SurePath usando del Diluyente 1 a pH, temperatura y tiempo variables

10 Se usó el protocolo de incubación a 114° C durante 10 minutos junto con el Diluyente 1 que se ha descrito en el Ejemplo 1 (es decir, Tris 1 M, NaCl 0,5 M y Triton x100 al 1 %). Se usaron muestras con diferentes pH (9,0 y 7,8) y se sometieron a ensayo con tiempos y temperaturas de incubación variables. Los diferentes pH también se evaluaron frente al Diluyente 2 del Ejemplo 1 (NaCl 16,67 mM y Tris 330 mM).

15 Se diluyeron células de trabajo derivadas de paciente en SurePath a una concentración de 12500 células/ml. Se prepararon cincuenta y seis tubos para su uso en la Plataforma BD Viper XTR™. Había ocho muestras en cada uno de siete grupos. Se añadieron cada uno de los siguientes tampones (0,85 ml) en uno de los siete grupos:

- 20 a. Diluyente 1, pH 9,0 (incubación a 120° C, 20 min)
- b. Diluyente 1, pH 9,0 (incubación a 120° C, 10 min)
- c. Diluyente 1, pH 9,0 (incubación a 114° C, 20 min)
- d. Diluyente 1, pH 9,0 (incubación a 114° C, 10 min)
- e. Diluyente 1, pH 7,8 (incubación a 120° C, 20 min)
- f. Diluyente 2, pH 7,8 (incubación a 120° C, 20 min)
- 25 g. Diluyente 2, pH 9,0 (incubación a 120° C, 20 min)

Se añadieron alícuotas (0,25 ml) de las muestras de paciente diluidas a cada tubo de cada grupo. Después de la combinación del diluyente con las muestras, las concentraciones de tampón de trabajo finales son como se han expuesto en el Ejemplo 1. Cada grupo se incubó a su temperatura y tiempo especificados anteriormente. Todos los tubos se enfriaron a continuación durante 25 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se cargaron a continuación en la BD Viper XTR™ y se usaron 0,8 ml para la extracción de ADN de las muestras. El ADN se eluyó en 400 µl de tampón de elución/neutralización. El eluato (20 µl) de cada una se mezcló con 5 µl de mezcla maestra de PCR. Se usaron posteriormente como confirmación veinte copias/reacción de dianas de ADN de plásmido de VPH 18 y VPH 45 en cada reacción para someter a ensayo la inhibición de PCR. Los ensayos de PCR en tiempo real se usaron para la detección de VPH 16, 18 y 45, y el gen de control endógeno de ADN humano HBB.

Tabla 5

Extracción de ADN a partir de SurePath usando el Diluyente 1 con diferentes pH y a diferentes temperaturas y tiempos							
HPV16	Diluyente 1				Diluyente 1	Diluyente 2	
	120° C		114° C		120° C	120°	
	pH 9, 20'	pH 9, 10'	pH 9, 20'	pH 9, 10'	pH 7,8, 20'	pH 7,8, 20'	pH 9, 20'
1	32,36	33,57	33,4	Sin Ct	30,79	33,5	35,21
2	31,29	33,24	33,11	Sin Ct	30,56	32,79	33,11

ES 2 660 762 T3

Extracción de ADN a partir de SurePath usando el Diluyente 1 con diferentes pH y a diferentes temperaturas y tiempos							
3	31,18	33,23	34,02	34,84	30,55	33,05	37,78
4	31,31	32,75	32,73	Sin Ct	30,96	33,48	34,43
5	32,09	31,98	33,92	34,84	30,58	34,9	35,15
6	31,37	32,68	32,69	Sin Ct	30,67	34,53	34,32
7	30,74	32,31	32,4	Sin Ct	30,31	34,43	35,81
8	31,91	33,02	32,65	36,58	30,85	33,12	Sin Ct
Prom.	31,53	32,85	33,12	35,42	30,66	33,73	35,12
HPV45							
	Diluyente 1				Diluyente 1	Diluyente 2	
	120° C		114° C		120° C	120° C	
	pH 9, 20'	pH 9, 10'	pH 9, 20'	pH 9, 10'	pH 7,8, 20'	pH 7,8, 20'	pH 9, 20'
1	33,2	34,66	34,08	34,1	33,71	34,41	33,97
2	33,35	34,31	33,56	33,71	34,03	34,18	34,5
3	34,32	33,32	33,05	34,5	34,47	33,42	34,92
4	34,56	32,84	33,71	34,28	32,21	33,81	34,09
5	33,22	34,63	34,48	33,43	34,61	33,89	33,72
6	34,11	34,8	34,11	33,98	33,47	34,15	33,99
7	34,65	31	34,45	34,53	34,12	34,47	33,59
8	34,8	34,38	33,98	33,47	32,24	34,23	34,09
Prom.	34,03	33,87	33,93	34,00	33,61	34,07	34,11
HBB							
	Diluyente 1				Diluyente 1	Diluyente 2	
	120° C		114° C		120° C	120° C	
	pH 9, 20'	pH 9, 10'	pH 9, 20'	pH 9, 10'	pH 7,8, 20'	pH 7,8, 20'	pH 9, 20'
1	32,52	36,54	33,5	37,33	31,38	33,61	36,89
2	32,27	34,4	34,54	Sin Ct	31,23	32,89	35,48
3	31,97	33,51	33,66	36,54	31,23	33,39	36
4	32,42	32,79	33,87	Sin Ct	31,83	34,63	35,84
5	33,12	32,97	32,88	35,12	31,64	35,88	36,94
6	32,86	34,05	34,01	Sin Ct	31,42	36,71	36,63
7	31,79	33,53	33,41	37,14	31,33	34,26	Sin Ct
8	32,79	34,22	34,13	31,23	31,8	34,41	Sin Ct
Prom.	32,47	34,00	33,75	35,47	31,48	34,47	36,30
HPV18							
	Diluyente 1				Diluyente 1	Diluyente 2	
	120° C		114° C		120° C	120° C	
	pH 9, 20'	pH 9, 10'	pH 9, 20'	pH 9, 10'	pH 7,8, 20'	pH 7,8, 20'	pH 9, 20'
1	32,2	34,35	35,13	34,31	33,57	33,16	34,19
2	33,16	33,21	32,69	33,33	33,08	34,32	33,96
3	34,08	33,4	33,22	33,1	33,66	33,29	34,91

Extracción de ADN a partir de SurePath usando el Diluyente 1 con diferentes pH y a diferentes temperaturas y tiempos							
4	31,86	33,99	33,92	33,15	34,12	33,72	34,48
5	33,14	33,91	33,53	33,36	33,35	32,72	33,18
6	33,46	34,18	33,28	33,27	33,3	33,3	34,49
7	33,37	33,5	33,39	33,42	33,3	34,92	33,51
8	33,46	34,47	35,07	32,68	33,71	34,84	33,35
Prom.	33,09	33,88	33,78	33,33	33,51	33,78	34,01

El protocolo de incubación (114° C, 10 minutos) no produjo el grado de detección de VPH 16 que se obtuvo cuando se usó el protocolo de mayor calor. Sin embargo, se obtuvo el mismo grado de detección para los VPH 45 y VPH 18 usados como confirmación, independientemente del protocolo de incubación que se usó. A partir de esto se concluyó que el protocolo de 114° C proporcionó un menor grado de extracción de ADN que el protocolo de incubación de 120° C. De forma similar, la incubación a 120° C durante 10 minutos no fue tan eficaz para extraer ADN de VPH 16 como la incubación a 120° C durante 20 minutos. La extracción y la detección de ADN de VPH 16 usando el Diluyente 1 a pH 7,8 mostró una mejora de cerca de 1 Ct en comparación con la extracción y la detección usando el Diluyente 1 con un pH de 9,0 (para la incubación a 120° C durante 20 minutos). La extracción después de la incubación a 120° C en el Diluyente 1 dio como resultado una reducción significativa en la variabilidad de ensayo que se mide mediante la desviación típica para los duplicados de PCR detectados.

Ejemplo 6. Efecto del pH en la eficacia del Diluyente

Se diluyeron células de trabajo derivadas de paciente en los medios LBC SurePath a 12500 células/ml. Se prepararon cuarenta tubos de muestra para la plataforma BD Viper XTR™. Se separaron en cinco grupos. Se añadió el Diluyente 1 que se ha descrito en el Ejemplo 1 (0,85 ml) con un pH diferente a los tubos en cada grupo. Los diluyentes usados fueron:

- a. Diluyente 1, pH 6,6;
- b. Diluyente 1, pH 6,7;
- c. Diluyente 1, pH 7,3;
- d. Diluyente 1, pH 8,0;
- e. Diluyente 1, pH 9,0; y
- f. Diluyente 1, pH 10,0.

Se añadieron células de trabajo paciente diluidas (0,25 ml) a cada tubo de cada grupo. Cada grupo se incubó a 120° C durante 20 minutos, y a continuación se enfriaron durante 25 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se cargaron a continuación en la BD Viper XTR™ y se usaron 0,8 ml de las muestras para la extracción. El ADN se eluyó a partir de las muestras en 400 µl de tampón de elución/neutralización y el eluato (20 µl) se mezcló con 5 µl de mezcla maestra de PCR. Se usaron posteriormente como confirmación veinte copias de dianas de ADN de plásmido de VPH 18 y VPH 45 en cada muestra para someter a ensayo la inhibición de PCR. Los ensayos de PCR en tiempo real se usaron para la detección de VPH 16, 18 y 45, y el gen de control endógeno de ADN humano HBB.

Tabla 6

Efecto del pH en la eficacia del Diluyente 1						
HPV16 Rep	pH 6,6	pH 6,7	pH 7,3	pH 8,0	pH 9,0	pH 10
1	33,64	33,46	31,47	31,21	33,79	35,68
2	34,06	34,96	31,67	31,36	31,86	34,32
3	34,58	33,10	32,33	31,70	31,99	36,30
4	33,66	33,15	32,40	31,49	31,61	35,73
5	33,46	34,90	32,32	31,85	32,00	34,36
6	34,41	33,14	32,12	31,61	31,96	34,51
7	34,66	34,93	32,25	31,58	32,12	35,15
8	34,15	34,18	32,27	31,57	32,36	35,83
Prom.	34,08	33,98	32,10	31,55	32,21	35,24

ES 2 660 762 T3

Efecto del pH en la eficacia del Diluyente 1						
HPV45 Rep	pH 6,6	pH 6,7	pH 7,3	pH 8,0	pH 9,0	pH 10
1	33,78	32,88	33,38	33,28	34,09	33,35
2	34,56	32,95	34,40	33,41	32,83	33,56
3	34,08	33,69	34,69	32,9	33,41	33,84
4	33,15	33,45	33,65	34,41	34,11	34,64
5	35,39	33,27	33,59	33,74	33,45	33,70
6	33,21	32,51	35,39	33,77	34,14	34,38
7	34,19	32,77	32,93	33,59	33,49	33,21
8	34,6	33,92	34,24	33,58	34,29	33,89
Prom.	34,12	33,18	34,03	33,59	33,73	33,82
HBB Rep	pH 6,6	pH 6,7	pH 7,3	pH 8,0	pH 9,0	pH 10
1	33,21	35,08	33,56	32,84	35,69	38,28
2	35,82	35,28	33,79	33,93	39,51	Sin Ct
3	35,37	39,87	34,25	33,41	34,29	36,61
4	35,38	35,00	34,23	33,61	34,47	37,64
5	35,64	35,12	34,21	33,96	34,45	37,68
6	35,50	36,04	34,25	33,70	34,80	37,98
7	35,58	35,16	34,70	33,34	34,53	38,37
8	35,80	36,08	34,42	33,56	35,01	40,15
Prom.	35,66	35,33	34,16	33,54	34,72	38,10
HPV18 Rep	pH 6,6	pH 6,7	pH 7,3	pH 8,0	pH 9,0	pH 10
1	34,18	33,19	34,10	33,69	34,70	33,59
2	33,87	33,36	34,28	34,07	34,78	34,36
3	32,54	34,17	34,01	33,42	34,05	34,17
4	33,42	34,36	34,77	34,02	31,75	34,96
5	34,5	34,64	34,37	33,96	34,51	34,08
6	33,58	33,89	35,73	34,28	33,82	35,70
7	34,22	34,27	34,16	34,31	34,49	33,20
8	34,63	34,83	34,11	35,42	34,33	34,55
Prom.	33,87	34,09	34,44	34,15	34,05	34,33

Por referencia a los resultados de la Figuras 1A-D, el Diluyente 1 con un pH en el intervalo de aproximadamente 7,3-9 proporciona a los mejores resultados en términos del grado de detección de VPH de la muestra. Esto indica que la extracción de ADN a partir de la muestra es la mejor cuando se usa el diluyente que tiene un pH en este intervalo. Dado que la detección de los VPH 18 y 45 usados como confirmación fue básicamente la misma a todos los pH la mejora en la detección de VPH 16 y HBB se atribuye a la mejor extracción de ADN obtenida a valores de pH en el intervalo de 7,3 y 9,0.

Ejemplo 7. Comparación de los protocolos de extracción de ADN

Se cosecharon células derivadas de pacientes y se separaron en dos grupos iguales. La mitad se almacenó en ThinPrep y la otra mitad en LBC SurePath. Ambos grupos tenían una concentración de $1,14 \times 10^7$ células/ml. Se preparó una solución de trabajo con una concentración celular de $2,5 \times 10^4$ células/ml a partir de la solución de

ES 2 660 762 T3

trabajo de $1,14 \times 10^7$ células/ml en medios SurePath. Esta solución de trabajo se usó para los siguientes protocolos de extracción. Todos los protocolos de extracción fueron seguidos por extracción de ADN usando la plataforma BD Viper XTR™.

5 En el primer protocolo, se centrifugaron ocho muestras de 226 µl durante 5 minutos a una fuerza de 13.000 g. El sobrenadante resultante se decantó y se resuspendió en 1 ml del Diluyente 2 (descrito en el Ejemplo 1) que también contenía una proteinasa K a una concentración de 2 mg/ml. Las ocho muestras se transfirieron a tubos de muestra para su uso con la plataforma BD Viper XTR™ y se incubaron a 70° C durante 1 hora. Esto fue seguido por extracción en la plataforma BD Viper XTR™ como se describe posteriormente.

10 En el segundo protocolo se diluyeron (1:4) ocho muestras (226 µl) de solución de trabajo de SurePath por adición a las muestras de 774 µl de el Diluyente 2 que también contenía una proteinasa K a una concentración de 2 mg/ml. Las ocho muestras se transfirieron a tubos de muestra para su uso con la plataforma BD Viper XTR™ y se incubaron a 70° C durante 1 hora. Esto fue seguido por extracción en la plataforma BD Viper XTR™ como se describe posteriormente.

15 En el tercer protocolo, se combinaron ocho muestras (250 µl) de solución de trabajo de SurePath con 850 µl del Diluyente 2 (descrito en el Ejemplo 1). Las ocho muestras se transfirieron a tubos de muestra para su uso con la plataforma BD Viper XTR™ y se incubaron a 120° C durante 20 minutos. Esto fue seguido por extracción en la plataforma BD Viper XTR™ como se describe posteriormente.

20 En el cuarto protocolo, se combinaron ocho muestras (250 µl) de solución de trabajo de SurePath con 850 µl del Diluyente 1 (descrito en el Ejemplo 1). Las ocho muestras se transfirieron a tubos de muestra para su uso con la plataforma BD Viper XTR™ y se incubaron a 120° C durante 20 minutos. Esto fue seguido por extracción en la plataforma BD Viper XTR™ como se describe posteriormente.

Para un control negativo, se combinaron ocho alícuotas de 850 µl del Diluyente 2 con 250 µl de medios limpios SurePath. Esto fue seguido por extracción en la plataforma BD Viper XTR™ como se describe posteriormente.

30 Todas las muestras se cargaron en la BD Viper XTR™ y se usaron 0,8 ml de las muestras para la extracción. El ADN se eluyó a partir de las muestras en 400 µl de tampón de elución/neutralización y el se mezclaron 20 µl de eluato con 5 µl de mezcla maestra de PCR. Los ensayos de PCR en tiempo real se usaron para la detección de VPH 16, y el gen de control endógeno de ADN humano HBB.

35 Tabla 7

Comparación del protocolo de tratamiento térmico y de tratamiento con proteinasa K (PK)										
Protocolo	1		2		3		4		3	
Condiciones	Centrifugación, PK, 70° C en el Diluyente 2		Sin centrifugación, PK, 70° C en el Diluyente 2		120° C en el Diluyente 2		120° C en el Diluyente 1		Controles no diana	
Diana	HBB	HPV16	HBB	HPV16	HBB	HPV16	HBB	HPV16	HBB	HPV16
Rep 1	31,38	29,49	Sin Ct	32,85	32,19	29,97	29,94	28,01	Sin Ct	Sin Ct
Rep 2	31,38	29,48	32,85	31,21	31,30	29,35	29,45	27,75	Sin Ct	Sin Ct
Rep 3	31,00	28,92	32,26	30,40	31,62	29,88	29,83	27,96	Sin Ct	Sin Ct
Rep 4	30,55	28,66	32,39	30,66	31,01	29,02	29,72	27,56	Sin Ct	Sin Ct
Rep 5	30,12	28,37	32,16	30,06	31,88	29,61	30,16	28,26	Sin Ct	Sin Ct
Rep 6	30,68	28,86	32,15	30,36	31,62	29,49	29,79	27,83	Sin Ct	Sin Ct
Rep 7	31,09	28,9	32,26	30,15	31,56	29,51	29,95	28,22	Sin Ct	Sin Ct
Rep 8	30,55	28,66	32,26	30,23	31,61	29,32	30,19	28,57	Sin Ct	Sin Ct
Prom.	30,84	28,92	32,33	30,74	31,60	29,52	29,88	28,02		

40 La incubación en el Diluyente 1 a 120° C produjo los menores valores de Ct en promedio para VPH 16. Esto indica que, de los protocolos sometidos a ensayo, la incubación en el Diluyente 1 produjo la mejor extracción de ADN de la muestra. El protocolo que usó el Diluyente 2 con incubación a 120° C produjo un mejor resultado que el resultado de la incubación con proteinasa K a 70° C sin centrifugación. Específicamente, el Diluyente 1 redujo el valor medio de Ct de VPH 16 en 0,90, 2,72 y 1,5, respectivamente, y redujo el valor medio de Ct de HBB en 0,97, 2,45 y 1,72, respectivamente, cuando se comparó con i) tratamiento con proteinasa K (seguido de centrifugación) a 70° C; ii)

tratamiento con proteinasa K (sin centrifugación); y iii) incubación a 120° C en el Diluyente 2.

Ejemplo 8. Extracción a partir de muestras usadas como confirmación con sangre

5 Se combinaron muestras negativas clínicas mezcladas de SurePath y ThinPrep con sangre completa. Las muestras tenían un 1 %, un 2 %, un 5 % y un 10 % (volumen de sangre por volumen de la muestra). Todas las muestras se incubaron a 120° C en el Diluyente 1 descrito en el Ejemplo 1 durante 20 minutos. Esto fue seguido por extracción en la plataforma BD Viper XTR™ usando el protocolo que se describe en los ejemplos previos. Todas las muestras se cargaron en la BD Viper XTR™ y se usaron 0,8 ml de las muestras para la extracción. El ADN se eluyó a partir de las muestras en 400 µl de tampón de elución/neutralización y el se mezclaron 20 µl de eluato con 5 µl de mezcla maestra de PCR. El ensayo de PCR en tiempo real se usó para la detección del gen de control endógeno de ADN humano HBB.

Tabla 8A: Efecto de la sangre en el ensayo (SurePath)

Medios	SurePath					
	Sangre (%)	0	1	2	5	10
1		28,62	28,66	28,97	38,66	Sin Ct
2		30,02	28,99	29,34	29,76	28,78
3		28,63	28,65	28,63	28,73	28,52
4		28,34	28,43	28,81	28,61	28,28
5		27,92	28,69	28,90	29,10	28,06
6		28,24	28,97	28,67	28,98	28,64
7		28,08	29,13	28,09	28,61	28,76
8		28,48	28,92	29,46	28,15	28,73
Prom.		28,54	28,81	28,86	28,83	28,54

15

Tabla 8B: Efecto de la sangre en el ensayo (ThinPrep PreservCyt)

Medios	ThinPrep PreservCyt					
	Sangre (%)	0	1	2	5	10
1		31,99	30,99	31,16	30,75	30,38
2		32,08	31,67	30,28	30,40	29,98
3		31,92	31,62	31,02	30,19	30,34
4		31,65	31,31	31,12	30,20	30,16
5		31,55	31,43	30,79	30,10	30,06
6		31,90	31,04	30,63	30,14	30,49
7		31,31	31,40	30,53	30,29	29,96
8		31,45	31,34	30,85	29,84	29,88
Prom.		31,73	31,35	30,80	30,24	30,16

20 El ensayo no se vio afectado por la alta concentración de sangre completa, una sustancia encontrada a menudo en las muestras de LBC y conocido inhibidor de las reacciones de PCR. Este método de extracción de ADN suministra ADN adecuado para amplificación por PCR incluso con una alta concentración de sangre completa presente en las muestras clínicas.

25 Ejemplo 9. Extracción de ADN a partir de cortes de tejido fijados con formalina, embebidos en parafina

30 Se incubaron cortes de tejido de biopsia cervical fijados con formalina, embebidos en parafina a 120° C en 2 ml del Diluyente 1 descrito en el Ejemplo 1 durante 25 minutos. Las muestras se enfriaron a continuación a temperatura ambiente. Después del enfriamiento, las muestras se sometieron al protocolo de extracción descrito previamente en la plataforma BD Viper XTR™. Todas las muestras se cargaron en la BD Viper XTR™ y se usaron 0,8 ml de las muestras para la extracción. El ADN se eluyó a partir de las muestras en 400 µl de tampón de elución/neutralización

y se añadieron 50 µl de eluato a la mezcla seca maestra de PCR. Los ensayos de PCR en tiempo real se usaron para detectar los subtipos 16, 18, 45, 31, 51, 52, 59, (33, 58, 56, 66), (39, 68, 35) de VPH y el gen de control endógeno de ADN humano HBB.

Tabla 9

5

Extracción de ADN Viper a partir de corte de tejido fijado con formalina, embebido en parafina			
ID de la muestra	Grado de patología de pre-cáncer / cáncer	Resultado de Beta Globina	Resultado de VPH
DH0727	Carcinoma de células escamosas	Positivo	VPH 16
DH0847	Carcinoma de células escamosas	Positivo	VPH 16
DH0848	Carcinoma poco diferenciado	Positivo	VPH 18, 52
DH0856	Carcinoma de células escamosas	Positivo	VPH 18, 31
DH0867	Neoplasia intraepitelial cervical (CIN) III	Positivo	VPH 16
DH0869	Neoplasia intraepitelial cervical (CIN) III	Positivo	VPH de alto riesgo negativo
DH0870	Neoplasia intraepitelial cervical (CIN) III	Negativo	VPH indeterminado
DH0873	Neoplasia intraepitelial cervical (CIN) III	Positivo	VPH 16
DH0874	Neoplasia intraepitelial cervical (CIN) III	Positivo	VPH 16
DH0880	Neoplasia intraepitelial cervical (CIN) III	Positivo	VPH 16
DH0892	Carcinoma de células escamosas	Positivo	VPH 16
DH0896	Carcinoma de células escamosas	Positivo	VPH (33,58,56,66)
DH0898	Carcinoma de células escamosas	Positivo	VPH 16, 45
DH0900	Carcinoma de células escamosas	Positivo	VPH 45
DH0902	Carcinoma de células escamosas	Positivo	VPH 16
DH0903	Carcinoma de células escamosas	Positivo	VPH 16
DH0904	Carcinoma de células escamosas	Positivo	VPH 16
DH0905	Carcinoma de células escamosas	Positivo	VPH 16, 59
DH0910	Neoplasia intraepitelial cervical (CIN) III	Positivo	VPH 16
DH0911	Neoplasia intraepitelial cervical (CIN) III	Positivo	VPH 16
DH0914	Neoplasia intraepitelial cervical (CIN) III	Positivo	VPH 16
DH1408	Neoplasia intraepitelial cervical (CIN) III	Positivo	VPH 16, 59

En 20 de 22 muestras individuales, se detectaron con éxito algunos subtipos de ADN de VPH. El gen de beta-globina endógena humana se detectó en 21 de 22 muestras. Se usaron PCR en tiempo real y cebadores específicos de los subtipos de VPH y cebadores específicos de beta-globina para HBB. Los resultados de beta globina indican que no había ninguna inhibición de PCR manifiesta asociada al método de extracción de ADN actual. El fallo en la detección de la señal de beta globina en una muestra y tanto en la señal de beta globina como de VPH en una segunda se pudieron deber a la falta de suficientes células diana en la sección procesada para extracción de ADN.

Ejemplo 10. Extracción de ADN de VPH a partir de células derivadas de paciente almacenadas en medios LBC SurePath y ThinPrep usando el Diluyente 1 para lisis química directa

Se diluyeron células de trabajo derivadas de paciente en LBC SurePath y Thinprep a 5000 células/ml. Dieciséis tubos de cada tipo de muestra tenían 0,50 ml del siguiente diluyente: Tris 1,5 M, NaCl 0,386 M y Triton X-100 al 1,5 % (v/v). El diluyente tenía un pH de 7,9. Se añadieron células derivadas de paciente diluidas (0,5 ml) en SurePath y ThinPrep a cada uno de los tubos de muestra con diluyente. Después de la combinación con las muestras, las concentraciones de tampón de trabajo finales fueron las siguientes: Tris-HCl 0,75 M, NaCl 0,193 M, y Triton X-100 al 0,75 % (v/v) (con un pH de aproximadamente 7,9). La solución combinada se incubó a 120° C durante 20 minutos como lisis química directa. Después de la incubación, las muestras se prepararon para extracción en la plataforma BD Viper™ XTR. Se usó el protocolo de extracción descrito previamente. Es decir, todas las muestras se cargaron en la BD Viper XTR™ y se usaron 0,8 ml de las muestras para la extracción. La mitad de las muestras fueron con etapa de lisis durante la extracción y la mitad de las muestras no fueron. El ADN se eluyó a

ES 2 660 762 T3

partir de las muestras en 400 µl de tampón de elución/neutralización y se mezclaron 20 µl de eluato con 5 µl de mezcla maestra de PCR. Se usaron posteriormente como confirmación veinte copias de dianas de ADN de plásmido de VPH 18 y VPH 45 en cada muestra para someter a ensayo la inhibición de PCR. Los ensayos de PCR en tiempo real se usaron para la detección de VPH 16, 18 y 45, y el gen de control endógeno de ADN humano HBB. Los resultados de los ensayos se proporcionan a continuación.

5

Tabla 10

Uso de precalentamiento en el diluyente como lisis química directa seguido de extracción de ADN con y sin lisis				
HPV16	SurePath		ThinPrep	
Rep	Sin lisis	Lisis	Sin lisis	Lisis
1	31,77	32,15	31,67	32,06
2	31,83	31,43	32,04	31,68
3	31,55	31,95	31,76	31,93
4	31,76	32,35	31,86	32,00
5	32,05	32,19	31,67	32,36
6	31,73	32,02	31,46	31,55
7	31,95	31,96	31,64	32,28
8	32,18	32,30	31,85	31,41
Prom.	31,85	32,04	31,74	31,94
HPV45	SurePath		ThinPrep	
Rep	Sin lisis	Lisis	Sin lisis	Lisis
1,00	33,26	32,82	33,12	32,83
2,00	33,10	33,03	32,92	32,61
3,00	32,45	31,90	32,49	33,06
4,00	31,89	32,99	32,40	33,17
5,00	33,47	31,92	32,63	32,13
6,00	33,38	32,66	32,89	31,66
7,00	32,53	32,32	32,04	32,48
8,00	32,98	32,95	32,23	33,47
Prom.	32,88	32,57	32,59	32,69
HBB	SurePath		ThinPrep	
Rep	Sin lisis	Lisis	Sin lisis	Lisis
1	31,63	32,10	31,50	32,11
2	30,37	31,64	31,16	31,67
3	31,57	31,75	31,24	31,93
4	31,69	31,68	31,48	31,77
5	31,49	31,99	31,06	31,87
6	32,08	31,15	31,45	31,45
7	31,95	31,37	31,50	31,02
8	32,05	32,06	31,94	31,38

Uso de precalentamiento en el diluyente como lisis química directa seguido de extracción de ADN con y sin lisis				
Prom.	31,60	31,72	31,42	31,65
HPV18	SurePath		ThinPrep	
Rep	Sin lisis	Lisis	Sin lisis	Lisis
1,00	33,93	34,21	34,17	33,91
2,00	34,06	33,53	33,41	33,20
3,00	33,00	33,05	33,71	33,47
4,00	33,99	33,40	33,64	33,15
5,00	33,77	33,45	30,55	33,40
6,00	33,69	29,50	33,40	32,60
7,00	33,23	32,77	33,65	33,62
8,00	33,57	33,43	33,79	33,58
Prom.	33,66	32,92	33,29	33,37

El rendimiento de ADN tanto para el ADN extraído (es decir, VPH 16 y HBB) como para el ADN usado como confirmación (es decir, VPH 45 y VPH 18) es aproximadamente el mismo tanto para la lisis como para la no lisis durante la extracción de AN (es decir, lisis química directa usando un ejemplo de la composición y el método que se describen en la presente memoria. Esto se mantuvo cierto para ambos medios ThinPrep (TP) y SurePath (SP). Esto indica que la composición y el método que se describen en la presente memoria sirven como una lisis química directa de las células en la muestra sin necesidad de otras etapas de lisis enzimática o química.

Ejemplo 11. Capacidad de extracción de ADN Viper a partir de células derivadas de paciente almacenadas en medios LBC SurePath usando diluyente para lisis química directa

Se diluyeron células C33A que se habían almacenado en LBC SurePath durante un mes hasta 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 500, 250, 125, 62,5, 31,25 células/ml. Se incluyeron cuatro (4) duplicados en cada concentración. Se mezclaron 0,25 ml de cada concentración de soluciones de trabajo de células de SurePath (0,25 ml de cada concentración) con 0,75 ml de un diluyente de VPH (Tris 1,0 M, NaCl 0,257 M, y Triton X-100 al 1,0 % (v/v); pH de 7,9). Triton X-100 (v/v); pH de 7,9). Después de que el diluyente se combinara con las muestras, la concentración de trabajo final de la composición de lisis química directa fue Tris-HCl 0,75 M, NaCl 0,193 M, y Triton X-100 al 0,75 % (v/v) (con un pH de aproximadamente 7,9). Las muestras en el diluyente se precalentaron a 120° C durante 20 minutos, y a continuación se enfriaron a temperatura ambiente. Estas muestras (0,8 ml) se extrajeron usando el instrumento Viper XTR y se diluyeron en un volumen final de 400 μ l. El eluato de ADN (20 μ l) se mezcló con mezcla maestra de PCR (5 μ l) en PCR en tiempo real para cuantificar el número de copias de ADN de HBB extraído. Se añadió ADN genómico humano purificado a la PCR a 100.000, 10.000, 1000, 100, 10, 1 copias/reacción y se usó para la cuantificación de ADN de la muestra. La eficacia de extracción se calculó a partir de la proporción de copias de HBB extraídas cuantificadas mediante PCR en tiempo real y las copias totales de HBB basadas en el número de células introducidas.

Tabla 11

Capacidad de extracción de ADN Viper utilizando lisis química directa seguida de extracción de ADN	
Recuento de células introducidas	Eficacia de extracción
2×10^7	0,440
2×10^6	0,322
2×10^5	0,526
2×10^4	0,809
2×10^3	0,731
200	0,967

Capacidad de extracción de ADN Viper utilizando lisis química directa seguida de extracción de ADN	
Recuento de células introducidas	Eficacia de extracción
100	0,499
50	0,656
25	0,614
12,5	0,511
6,25	0,345
Prom.	0,584

La capacidad de extracción a partir de medios SurePath se ilustra en la Tabla 11 usando el diluyente descrito anteriormente. La Tabla 11 indica que la lisis química directa seguida de extracción de ADN produce más de 6 log de intervalo dinámico con una eficacia promedio de un 58 % usando la línea celular de carcinoma cervical humano en medios SurePath como sistema modelo.

Ejemplo 12. Compatibilidad del diluyente de VPH de lisis química directa con la detección de biomarcadores de proteína mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Se resuspendieron células SiHa a temperatura ambiente en diluyente de VPH con una concentración de trabajo de $6,7 \times 10^6$ células/ml y se usaron sin diluir y diluidas en serie dos veces en albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % en solución salina tamponada con fosfato con un 0,1 % de Tween. El antígeno diana se detectó en un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) de sándwich convencional. El antígeno diana se unió a la superficie de las placas de micropocillos usando un anticuerpo primario antes de detectarse usando un anticuerpo secundario conjugado con estreptoavidina y peroxidasa de rábano y un sustrato quimioluminiscente. La Figura 2 muestra los resultados para cada uno de los cuatro analitos diana (p16INK4a, HPV16 E1E4, MCM2 y MCM6), donde el antígeno diana se detectó fácilmente. La integridad del antígeno se confirmó mediante ensayo de inmunotransferencia de Western para dos de los antígenos diana (MCM2 y MCM6) donde se descubrió que ambas proteínas diana eran de longitud completa (aproximadamente 100 kilodalton) sin ningún producto de degradación significativo (no se muestran los datos). Estos resultados demuestran que el tampón del diluyente de VPH es compatible con la recuperación y la detección de biomarcadores de proteínas y se podría usar para la detección primaria de ácidos nucleicos seguida o precedida de detección de biomarcadores de proteínas para mejorar adicionalmente o refinar la detección de la enfermedad.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende una composición de lisis química directa en combinación con una muestra de citología basada en líquido o una muestra fijada con formalina, embebida en parafina comprendiendo la composición de lisis química directa:
- 10 a) una composición de tampón que comprende un componente de tampón y un componente de sal metálica, en donde el componente de sal metálica se selecciona entre el grupo que consiste en cloruro sódico (NaCl), cloruro potásico (KCl), acetato sódico (C₂H₃NaO₂) y sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) en donde la concentración del componente de tampón está en el intervalo de 0,2 M a 2 M y la concentración del componente de sal metálica están intervalo de 0,01 M a 1 M; y
- 15 b) un tensioactivo no iónico, en donde la concentración del tensioactivo no iónico está en el intervalo de un 0,01 a un 2 por ciento (v/v); en donde cuando se almacena una muestra biológica en una composición de citología basada en líquido o la composición fijada con formalina, embebida en parafina y se combina con la composición de lisis química directa, la composición de lisis química directa es capaz de lisar las células de la muestra biológica directamente de la composición de citología basada en líquido o una composición fijada con formalina, embebida en parafina.
- 20 2. Un método para analizar muestras biológicas almacenadas en una composición de almacenamiento de muestra que comprende:
- 25 combinar una muestra biológica con una combinación de una composición de citología basada en líquido o una composición fijada con formalina, embebida en parafina y una composición de lisis química directa, en donde la muestra no se centrifuga antes de la combinación con el tampón de lisis química directa, y en donde la composición de lisis química directa comprende
- 30 a) una composición de tampón que comprende un componente de tampón y un componente de sal metálica, en donde el componente de sal metálica se selecciona entre el grupo que consiste en cloruro sódico (NaCl), cloruro potásico (KCl), acetato sódico (C₂H₃NaO₂) y sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) en donde la concentración del componente de tampón está en el intervalo de 0,2 M a 2 M y la concentración del componente de sal metálica está en el intervalo de 0,01 M a 1 M; y
- 35 b) un tensioactivo no iónico en donde la concentración del tensioactivo no iónico está en el intervalo de un 0,01 a un 2 por ciento (v/v);
incubar la muestra a una temperatura que es al menos 80° C durante un tiempo suficiente para lisar una parte de las células en la muestra;
extraer una diana de la parte retirada de la muestra; y
someter a ensayo la diana en la parte retirada de la muestra.
- 40 3. La composición para ensayo de la reivindicación 1, o el método de la reivindicación 2, en donde el pH de la composición de lisis química directa está en el intervalo de 6,6 a 10.
4. La composición para ensayo de la reivindicación 1, o el método de la reivindicación 2, en donde el tensioactivo no iónico es un tensioactivo no iónico basado en polietilenglicol.
- 45 5. La composición para ensayo de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en donde el componente de tampón es la sal ácida de tris(hidroximetil)aminometano y la concentración del componente de tampón es aproximadamente 0,75 M, la concentración de NaCl es aproximadamente 0,19 M y la concentración de polietilenglicol octilfenil éter es aproximadamente un 0,75 por ciento (v/v).
- 50 6. El método de la reivindicación 2 en donde la diana es un ácido nucleico diana y el ensayo es un ensayo de amplificación para el ácido nucleico diana.
- 55 7. El método de la reivindicación 2 en donde la muestra biológica es una muestra de sangre o células seleccionadas entre el grupo que consiste en células vaginales, células cervicales, células endocervicales, células anales, células exfoliadas, células orales, células de la garganta y células peritoneales.
- 60 8. El método de la reivindicación 2 en donde la composición de citología basada en líquido o la composición fijada con formalina, embebida en parafina tiene al menos un constituyente seleccionado entre el grupo que consiste en formaldehído, ácido fórmico, metanol, etanol, formalina tamponada, AEDT, polipéptidos, poliaminoácidos, y polisacáridos.
9. El método de la reivindicación 2 en donde la muestra no se separa de la composición de citología basada en líquido o una composición fijada con formalina, embebida en parafina antes de las etapas de lisado y extracción.

Figura 1A

Gráfico de cajas de 16

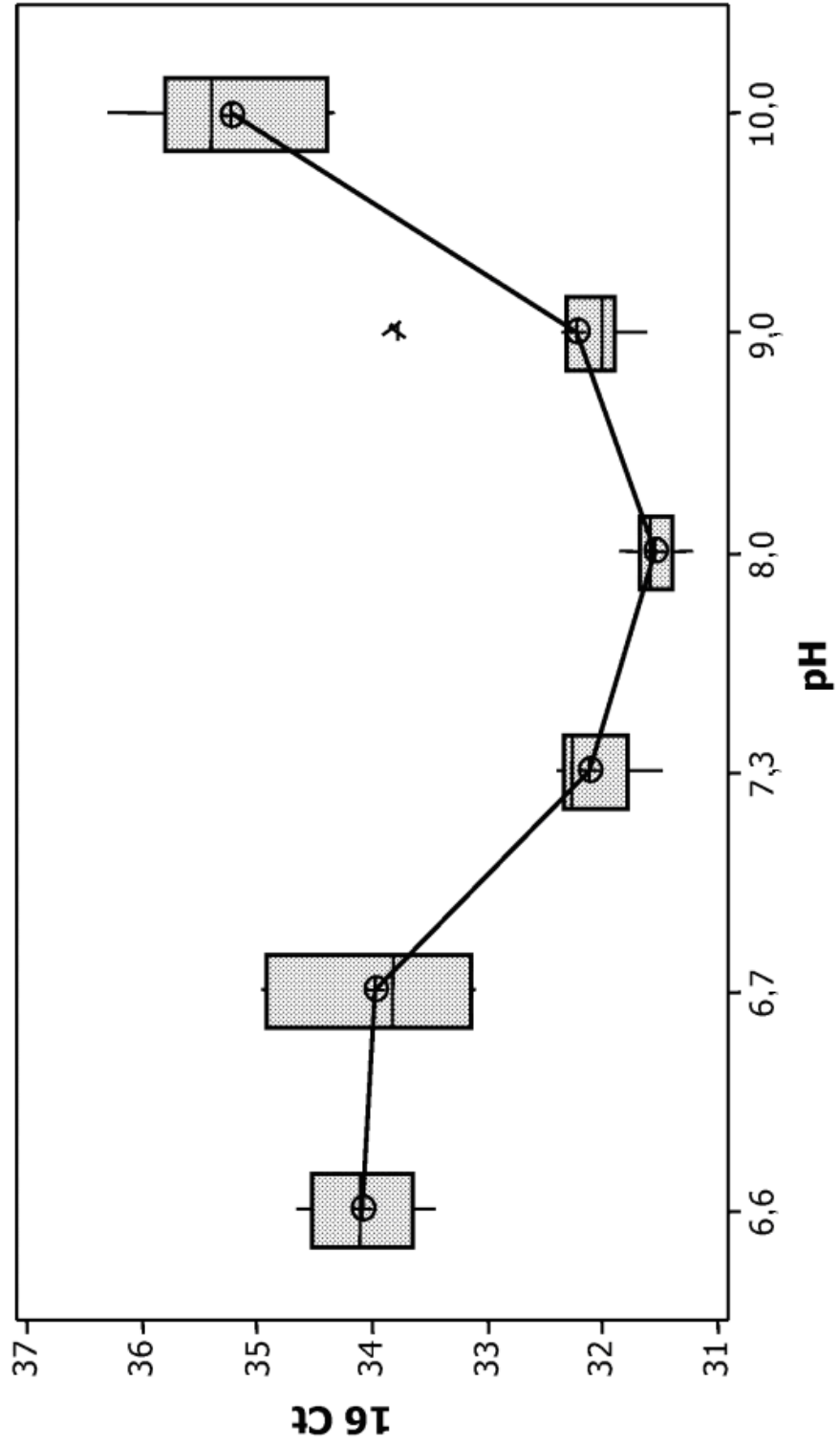


Figura 1B

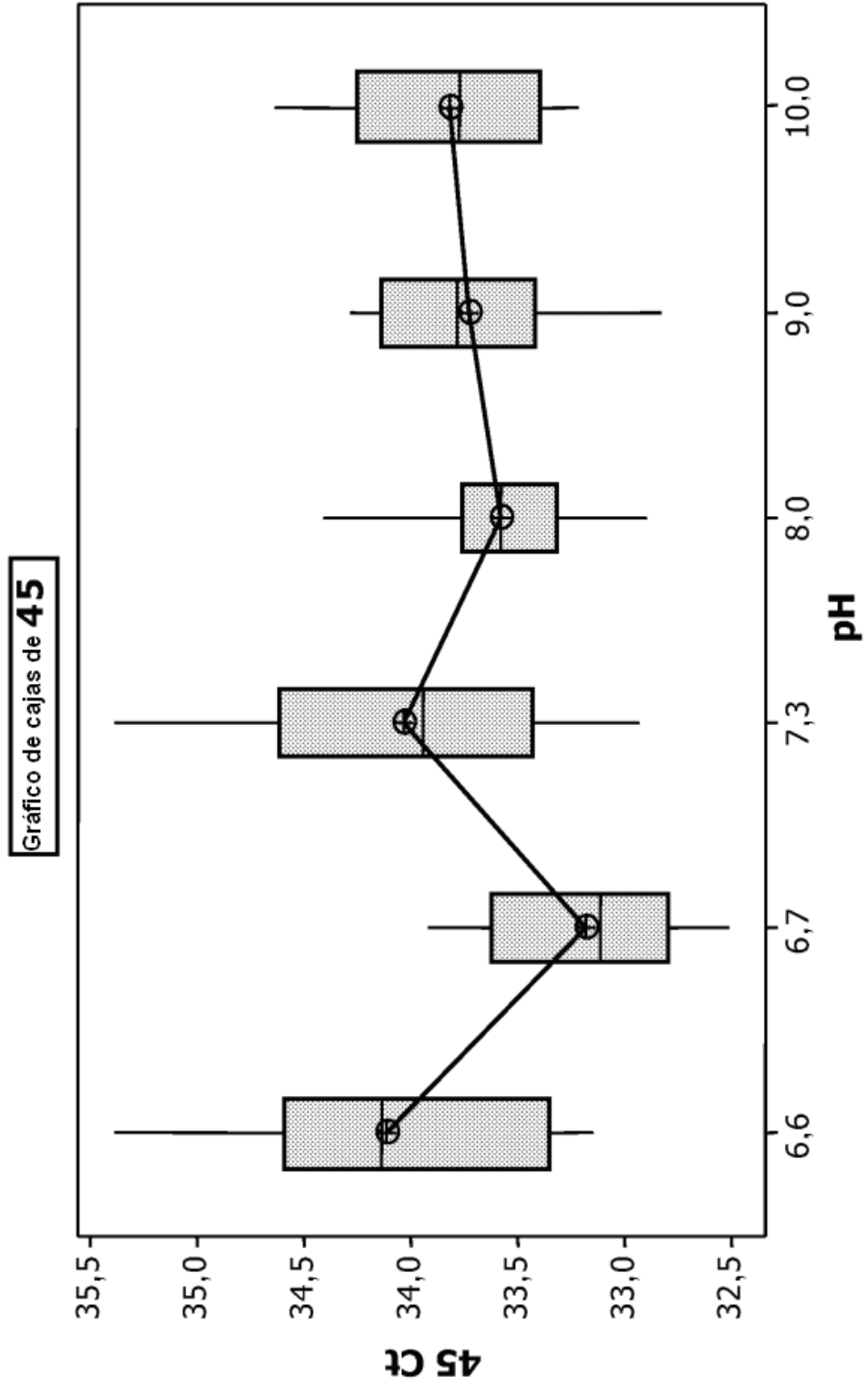


Figura 1C

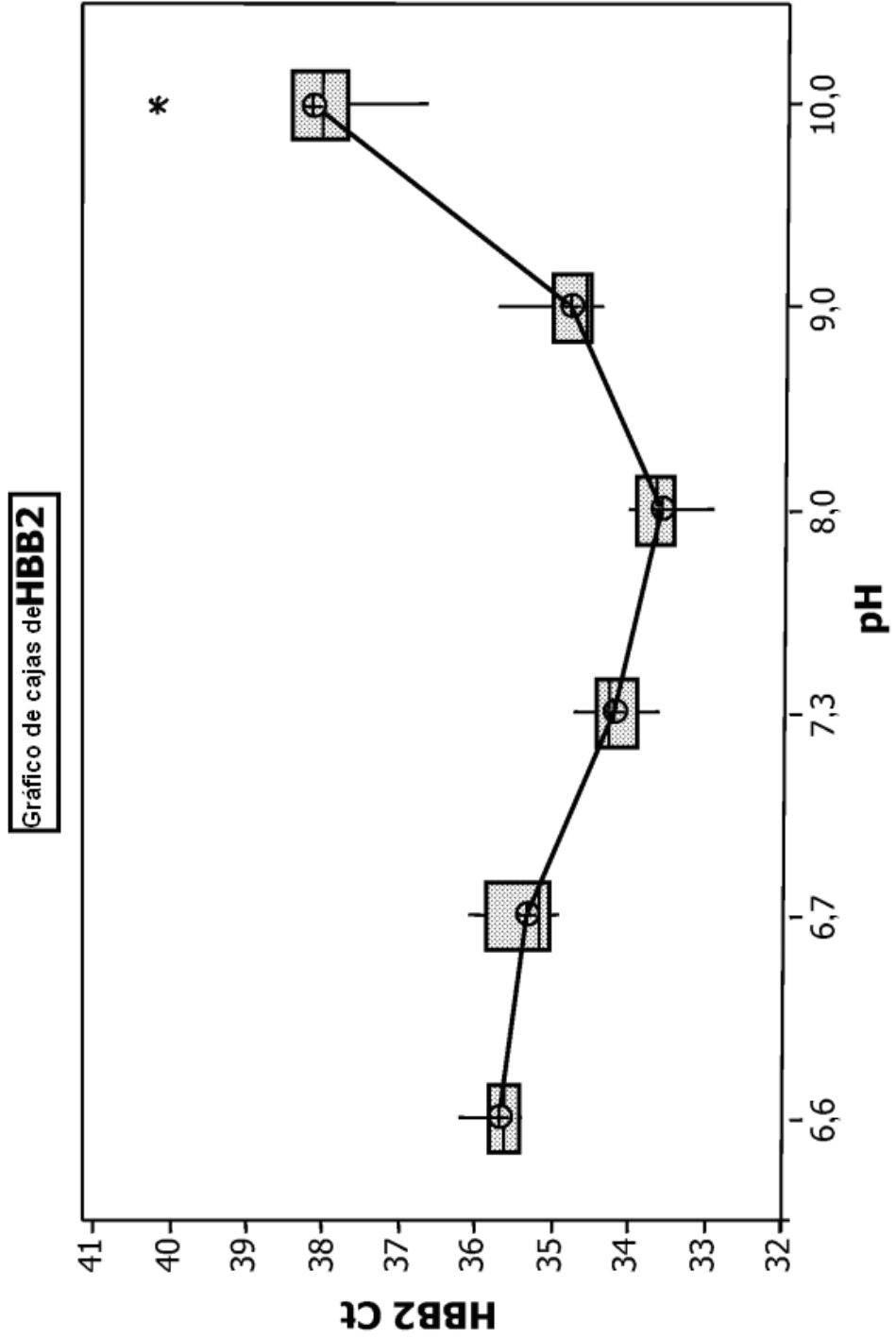


Figura 1D

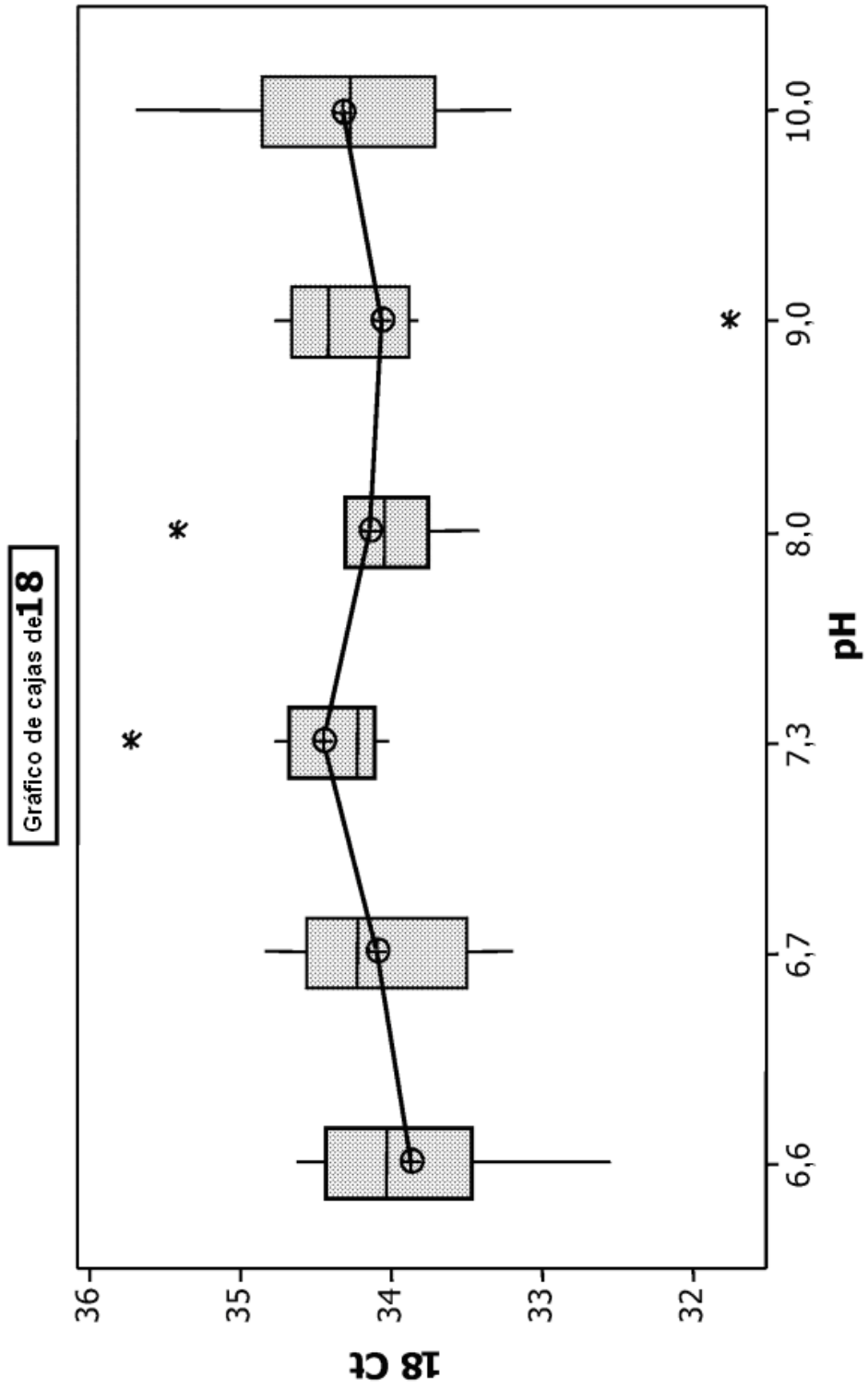


Figura 2. Detección por ELISA de biomarcadores de proteínas de células SiHa suspendidas en diluyente de VPH

