

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 285**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2016** **E 16155286 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018** **EP 3205722**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos de sangre entera**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.12.2018**

73 Titular/es:

**SARSTEDT AG & CO. KG (100.0%)**  
**Sarstedtstrasse 1**  
**51588 Nürnberg, DE**

72 Inventor/es:

**SCHUSTER, RAINER**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 694 285 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

Dispositivo y procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos de sangre entera

La presente invención se refiere al uso de una composición y a un procedimiento para la estabilización de ARN, incluido el ARN contenido en células, de sangre entera, preferiblemente con el aislamiento subsiguiente del ARN.

- 5 Asimismo se describe un dispositivo para uso como tubo de extracción de sangre, que contiene la composición adecuada para la estabilización del ARN completo y para el subsiguiente aislamiento. La composición para la estabilización del ARN de sangre entera, el procedimiento y el tubo de extracción de sangre utilizable para el procedimiento, que contiene la composición, se caracterizan porque se alcanza una estabilización efectiva de ARN en sangre entera y se posibilita un procedimiento rápido y eficaz para el aislamiento. En este caso, la estabilización  
10 comprende el ARN completo, incluido el ARN contenido en plasma exento de células, y el ARN contenido en células presentes en la sangre.

**Estado de la técnica**

- 15 El documento WO 2009/018034 A1 se refiere al aumento de la solubilidad de SDS en tampón de lisis para células mediante la adición de un detergente no iónico y un procedimiento para el aislamiento de ADN a partir de tejido animal con la adición de un tampón de lisis a base de NaCl 2M, SDS al 1,2%, EDTA 12 mM, Tris-HCl 24 mM, pH 8,0, con Tween al 2% y subsiguiente adición del volumen décuplo de un tampón de extracción a base de Tris-HCl 50 mM, pH 7, EDTA 10 mM, guanidina-HCl 7M, Tween 20 al 5%.

- 20 El documento WO 2007/060248 A1 se dirige a la lisis de células con sal caotrópica y subsiguiente adición de sal no caotrópica para la unión de ácidos nucleicos a material de soporte. Para el aislamiento de ADN de tejido del hígado se describe, p. ej., un tampón de lisis a base de tiocianato de guanidina 4M, N-laurilsarcosina al 1% y EDTA 2 mM con subsiguiente contacto de la mezcla con material de fibras de vidrio para la adsorción del ADN.

El documento CN 103820431 A no describe, según el resumen en inglés, composición alguna para la lisis de células.

- 25 El documento DE 101 47 439 A1 describe para el aislamiento de ADN de sangre que se añade un reactivo de lisis y, a continuación, se separan mediante centrifugación los componentes celulares con contenido en ADN. El ADN sedimentado se purifica, p. ej., de proteína mediante resuspensión con hidrocloreuro de guanidinio y separación de impurezas, y se precipita mediante la adición de alcohol y se separa.

El documento DE 10 2014 220 090 B3 describe para la recogida de muestras biológicas con contenido en ácidos nucleicos un recipiente en el que se puede incorporar un frotis, conteniendo el recipiente un líquido de lisis.

- 30 El documento CN 104673623 A describe, según el resumen en inglés, para un recipiente de muestra con tapa una composición para la estabilización de ácidos nucleicos de hematocitos y de ADN exento de células.

- 35 El documento WO 2006/052680 A1 describe el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de muestras de sangre con un procedimiento en el que primeramente se separa mediante centrifugación un sedimento, el cual es purificado mediante lavado de componentes de la sangre y, a continuación, se separa de nuevo por centrifugación para formar un sedimento. A continuación, los sedimentos se disuelven en tampón de lisis a base de LiCl 6 M, Triton X-100 al 5%, DGME al 5%, EDTA 10 mM, TRIZMA 100 mM, pH 8,8, con adición de coadyuvantes de disolución (TRIZMA base 38 mM, TRIZMA HCl 12 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 5%), opcionalmente mediante la adición de Triton X-100 adicional. A continuación, esta mezcla se puso en contacto con el agente de adsorción para ácidos nucleicos.

- 40 El documento US 2016/0032277 A1 describe para el aislamiento de microARNs un procedimiento en el que primeramente se realiza una extracción con fenol-cloroformo y, a continuación, la fase acuosa se separa por centrifugación y se pone en contacto con un soporte para ácidos nucleicos. Como tampón de lisis puede utilizarse una mezcla acuosa a base de detergente, p. ej., Triton o Tween, guanidina-HCl, EDTA y TRIS, que también puede estar exenta de agentes reductores ( $\beta$ -mercaptoetanol).

- 45 El documento WO 02/056030 A2 describe para la estabilización del contenido en ARN en una muestra un recipiente con un vacío predeterminado para absorber un volumen de muestra predeterminado, estando dispuesto en el recipiente un agente para la inhibición de la inducción génica y contra la degradación enzimática de ácidos nucleicos, en particular mercaptoetanol, ditiotretol (DTT) y una sal caotrópica, en particular isotiocianato de guanidinio o hidrocloreuro de guanidinio.

- 50 El documento WO 00/09746 A1 describe un recipiente para la extracción de sangre que, para la lisis de células y para la estabilización de ácidos nucleicos, contiene una solución con una sal de guanidinio, tampón, detergente y un agente reductor, en particular DTT,  $\beta$ -mercaptoetanol y TCEP (Tris(2-carboxietil)fosfina). El agente reductor, en particular  $\beta$ -mercaptoetanol o DTT, se considera en el mismo esencial para la estabilización de ARN en suero.

**Misión de la invención**

La invención establece como misión proporcionar un uso alternativo de la composición y, preferiblemente, un procedimiento alternativo para la estabilización y el subsiguiente aislamiento del ARN completo de sangre entera. Preferiblemente, la composición debe estabilizar el ARN completo de sangre entera y permitir un rápido procedimiento para el aislamiento del ARN completo. Más preferiblemente, la composición debe permitir la estabilización del ARN para un volumen variable de sangre, de modo que para filtrar un volumen de sangre predeterminado no tenga necesariamente que disponerse un tubo de extracción de sangre que contenga la composición.

**Descripción de la invención**

La invención resuelve el problema con las características de las reivindicaciones, en particular mediante el uso de una composición para la estabilización del ARN completo y un procedimiento para la estabilización del ARN completo de sangre entera para el subsiguiente aislamiento y sirve al mismo tiempo para la disgregación de células, de modo que ácidos nucleicos celulares en el estado en el caso del contacto con la composición, en particular en el momento de la extracción de sangre, se liberan y se mantienen estables en relación con la naturaleza y concentración y, a continuación, se pueden aislar. En este caso, la composición se caracteriza porque impide, en particular, la degradación y la síntesis nueva de ARN en sangre entera en la que se incorporó por mezclado. De manera correspondiente, la invención se refiere al uso de la composición, contenida preferiblemente en un tubo de extracción de sangre, para el procedimiento, en particular como medio para la estabilización y el aislamiento del ARN completo de la sangre sin la etapa de la precipitación y separación de ARN antes de la adsorción del ARN a un agente de adsorción. Para el aislamiento, la mezcla a base de sangre y de la composición acuosa puede ponerse en contacto, sin precipitación del ARN, con un agente de adsorción. El aislamiento del ARN mediante el contacto de la mezcla a base de la composición acuosa y sangre con un agente de adsorción puede tener lugar directamente a partir de la mezcla completa de la composición acuosa, es decir, p. ej., sin precipitación y separación de ácidos nucleicos de la mezcla, opcionalmente después de un almacenamiento durante el cual la mezcla es transportada, p. ej., desde el lugar de la extracción de sangre al lugar del procedimiento de análisis.

La muestra biológica es sangre entera, también denominada sangre.

La composición presenta en solución acuosa al menos una sal de guanidinio,

preferiblemente tiocianato de guanidinio, al menos una sustancia tampón, preferiblemente ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES),

un detergente no iónico, preferiblemente Triton X-100, y

un formador de complejos para cationes divalentes, preferiblemente tetra-acetato de etilendiamina (EDTA)

o se compone de los mismos,

y está particularmente exenta de agentes reductores, p. ej., exenta de compuestos de tiol o sus compuestos precursores, en particular exenta de  $\beta$ -mercaptoetanol y ditioneitol (DTT).

En solución acuosa, la composición se compone de la al menos una sal de guanidinio, p. ej., 1,8 a 2,6 M, preferiblemente 2,0 a 2,4 M, más preferiblemente 2,2 M,

la al menos una sustancia tampón en una concentración que tampona un volumen de sangre a un pH de 5,0 a 8,0, p. ej., de pH 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 o 6,0 a 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, preferiblemente pH 6,5 a 7,3, p. ej., MES al menos 50 mM, preferiblemente al menos 70 mM, p. ej., hasta 100 mM o hasta 74 mM,

el detergente no iónico, p. ej., Triton X-100, en 10 a 20% en peso/vol., preferiblemente 12 a 18% en peso/vol.,

un formador de complejos para cationes divalentes, en particular EDTA, de, p. ej., 50 a 100 mM, preferiblemente 70 a 80 mM, más preferiblemente aprox. 72 mM,

p. ej., para un volumen de sangre en una relación al volumen de la composición acuosa de 1:13 a 1:3 o hasta 1:2, preferiblemente hasta 1:2,6 o hasta 1:2,5 o 1:2,4.

La sustancia tampón se elige, p. ej., de Tris(Tris(hidroxi metil)-aminometano), citrato o fosfato(di-hidrógeno-fosfato de sodio)dihidrato o bien fosfato(hidrógeno-fosfato de sodio)dihidrato, tampón BisTris (bis-(2-hidroxi metil)-imino-tris(hidroxi metil)-metano), ACES (ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminometanosulfónico), hidrógeno-carbonato de sodio, preferiblemente ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES).

El detergente no iónico se elige, p. ej., de Tween 20 (monolaurato de polioxietileno(20)-sorbitán), Nonidet P40 (4-nonilfenol-polietilenglicol), Tween 80 (monooleato de polioxietileno-sorbitán), Brij 58 (polietilenglicol-hexadeciléter), Triton X-114 (octilfenolpolietilenglicoléter), preferiblemente Triton X-100 (polietilenglicol-p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)feniléter).

La composición tiene la ventaja de disgregar las células humanas contenidas en la sangre entera y estabilizar todos los ácidos nucleicos, en particular ARN, de la sangre entera, pudiendo presentarse la sangre entera y la composición en una relación en volumen variable. Un tubo de extracción de sangre que contiene la composición puede por lo tanto disponerse para absorber un volumen de sangre variable, p. ej., el tubo de extracción de sangre puede disponerse para absorber sangre hasta una relación volumétrica de 1:13 a 1:3, preferiblemente de hasta 1:2 o de hasta 1:2,6 a la composición. Para la absorción de un volumen de sangre variable, el tubo de extracción de sangre en el que está contenida la composición puede presentar, p. ej., un émbolo extraíble manualmente de un tubo.

La composición se caracteriza porque no requiere precipitación alguna de los ácidos nucleicos a partir de la mezcla a base de sangre entera y de la composición con el fin de estabilizar y aislar el ARN de la sangre entera. Por lo tanto, el procedimiento de acuerdo con la invención presenta el aislamiento de ARN a partir de la mezcla de sangre entera y de la composición sin una etapa de la precipitación de ácidos nucleicos, en particular ARN o bien sin una etapa de la centrifugación para la separación de los ácidos nucleicos precipitados antes de la unión del ARN a un agente de adsorción.

De acuerdo con la invención, el ARN completo se aísla de la mezcla a base de sangre entera y de la composición debido a que la mezcla a base de sangre entera y de la composición,

opcionalmente después de la adición de proteinasa, p. ej., proteinasa K, e incubación, p. ej., a la temperatura ambiente durante aprox. 15 min, opcionalmente antes o después de la adición de la proteinasa y adición de DNasa,

se pone en contacto con un agente de adsorción para ácidos nucleicos,

en donde a partir de la mezcla, opcionalmente incluida la proteinasa y/o DNasa añadida, no se separa antes del contacto con el agente de adsorción sustancia constitutiva alguna,

a continuación, se separan las sustancias no unidas al agente de adsorción, p. ej., mediante lavado del agente de adsorción, y

se eluyen los ácidos nucleicos unidos al agente de adsorción, p. ej., mediante contacto del agente de adsorción con un tampón acuoso con un valor del pH, un contenido en alcohol y/o una concentración de iones que disuelve los ácidos nucleicos unidos al agente de adsorción.

La mezcla a base de sangre entera y de la composición puede ponerse en contacto por completo y directamente en el tiempo después de la preparación de la mezcla con el agente de adsorción para ácidos nucleicos. De ello resulta la ventaja de que el procedimiento para el aislamiento del ARN no requiere incubación alguna para la precipitación y centrifugación alguna antes de la puesta en contacto de la mezcla con el agente de adsorción y adición alguna de otras sustancias y, por lo tanto, se puede llevar a cabo de forma sencilla y rápida.

Después de la puesta en contacto de la mezcla a base de sangre entera y de la composición, que contiene opcionalmente proteinasa añadida, puede añadirse opcionalmente DNasa, de modo que se digiere ADN y se aísla en esencia ARN.

El agente de adsorción para ácidos nucleicos es, p. ej., una superficie de sílice, en particular una membrana de (gel de) sílice, suspensión de (gel de) sílice o partículas magnéticas revestidas con sílice tal como se puede obtener, p. ej., bajo la denominación PAXgene de la razón social PreAnalytiX, bajo la denominación NucleoSpin de la razón social Macherey-Nagel, bajo la denominación mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow o bajo la denominación High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit de la razón social Roche para el aislamiento de ácidos nucleicos.

Si el agente de adsorción se compone de partículas revestidas con sílice, preferiblemente partículas magnéticas, se prefiere la adición de un diluyente en un volumen eficaz a la mezcla a base de sangre entera y la composición. El diluyente puede ser, p. ej., el reactivo de estabilización de ADN/ARN adquirible de la razón social Roche para sangre/médula ósea (Roche artículo N° 11 934 317 001) o la composición de acuerdo con la invención, en cada caso opcionalmente con un contenido de hasta 30% vol./vol. de etanol, preferiblemente 10 a 30% vol./vol. de etanol, p. ej., 20% vol./vol. de etanol. Un volumen eficaz puede determinarse como tal, en el que el ARN es adsorbido esencialmente en al menos un 80% de la cantidad total, preferiblemente en esencia por completo a las partículas revestidas con sílice. El volumen eficaz con el que se añade el diluyente a la mezcla de sangre entera y la composición asciende preferiblemente a 50 hasta 150% el volumen de la mezcla, p. ej., 80 a 120%, preferiblemente 100% el volumen de la mezcla, antes o después de la adición por mezcladura de las partículas revestidas con sílice a la mezcla, que preferiblemente son partículas magnéticas. En particular en esta forma de realización, se prefiere la adición a la mezcla de proteinasa.

Partículas revestidas con sílice pueden ser, p. ej., aquellas de la razón social Chemagen o de la razón social Applied Biosystems (perlas de unión a ARN, Art. N° 100191) o de la razón social Roche del kit de aislamiento de ARNm para sangre/médula ósea, Art. No. 11 934 333 001) o aquellas de acuerdo con Hai N.H., Phu N.D., Luong N.H., Chau N., Chinh H.D., Hoang L.H., Leslie-Pelecky D.L. (2008), Mechanism for Sustainable Magnetic Nanoparticles under Ambient Conditions, *Journal of the Korean Physical Society*, 52(5), 1327-1331 o aquellas de acuerdo con Quy D.V., Hieu N.M., Tra P.T., Nam N.H., Hai N.H., Son N.T., Nghia P.T., Anh N.T.V., Hong T.T., Luong N.H. (2013) Synthesis

of Silica-Coated Magnetic Nanoparticles and Application in the Detection of Pathogenic Viruses, *Journal of Nanomaterials*, DOI:10.1155/2013/603940.

5 También en el caso de un agente de adsorción a base de partículas revestidas con sílice que preferiblemente son partículas magnéticas revestidas con sílice, la mezcla completa a base de sangre entera y la composición con el agente de adsorción se pone en contacto con el diluyente añadido, es decir, inmediatamente o bien por completo o bien sin una separación previa de un componente de la mezcla.

10 De acuerdo con la invención, la mezcla completa puede ser puesta en contacto directamente con el agente de adsorción, dado que a partir de la mezcla de sangre entera y de la composición no se separa sustancia constitutiva alguna o bien fracción alguna, en particular no se requiere centrifugación alguna de esta mezcla para la separación de una sustancia constitutiva precipitada, p. ej., separación por centrifugación alguna de ácidos nucleicos precipitados con subsiguiente separación de la fase líquida y disolución de los ácidos nucleicos. Esto se atribuye actualmente a que la composición no precipita ácidos nucleicos, en particular ARN, en mezcla con sangre entera. La composición tiene más bien la ventaja de que una mezcla a base de sangre entera y de la composición, opcionalmente con proteinasa y/o DNasa añadida, puede ponerse en contacto sin etapas de tratamiento adicionales o bien sin adiciones con un agente de adsorción para ácidos nucleicos, en particular superficies de sílice, con el fin de unir los ácidos nucleicos al agente de adsorción. Por lo tanto, la composición permite un procedimiento para el aislamiento de ácidos nucleicos que se lleva a cabo sin separación de una fracción con contenido en ácidos nucleicos antes de la puesta en contacto con el agente de adsorción, p. ej., sin precipitación mediante centrifugación con subsiguiente disolución.

20 La composición estabiliza el ARN en la mezcla a base de sangre entera y de la composición (p. ej., en el caso de almacenamiento durante al menos 3 días, preferiblemente durante al menos 5 días, p. ej., durante hasta 4 días, en particular sin congelación, p. ej., almacenamiento a al menos 0°C, p. ej., a la temperatura ambiente hasta 22,5°C. De manera correspondiente, el procedimiento presenta preferiblemente el aislamiento del ARN a partir de la mezcla, p. ej., después de un almacenamiento sin congelación o bien a al menos 0°C, p. ej., a 15 hasta 25°C, en particular hasta 22,5°C. Alternativa o adicionalmente, la mezcla puede congelarse para el almacenamiento, p. ej., a -40°C o inferior.

La invención se describe ahora con mayor precisión con ayuda de ejemplos con referencia a las figuras, en las que muestran

30 - la Figura 1, la integridad del ARN que se aisló a partir de sangre entera en mezcla con una composición de acuerdo con la invención en diferentes relaciones volumétricas,

- la Figura 2, las concentraciones del ARN que se aislaron a partir de sangre entera en mezcla con una composición de acuerdo con la invención en diferentes relaciones volumétricas,

35 - las Figuras 3 y 4, la comparación de la integridad de ARN a base de muestras de sangre entera (Sp.1, donante N° 1 y Sp. 2, donante N° 2) después de almacenamiento en un estabilizador de acuerdo con el documento WO 00/09746 con respecto a un almacenamiento en una composición de acuerdo con la invención,

- la Figura 5, un análisis de grupos de la concentración de diferentes ARNms en el ARN total que se aisló de sangre entera en mezcla con una composición de acuerdo con la invención,

- la Figura 6, una matriz de correlación para la representación de diferencias de expresión dependientes del almacenamiento,

40 - las Figuras 7 y 8, las cantidades relativas mediante RT-PCR de determinados ARNms en muestras de dos donantes, las cuales se aislaron después del almacenamiento de sangre entera a lo largo de 5 días en mezcla con una composición de acuerdo con la invención.

45 La composición de acuerdo con la invención se dispuso en forma de una solución acuosa en un tubo de extracción de sangre en el que se absorbió una muestra de sangre. El tubo de extracción de sangre puede utilizarse directamente para la extracción de sangre. Alternativamente, la composición puede mezclarse con sangre entera que procede preferiblemente de una muestra de sangre entera tomada directamente con antelación. La disgregación de células de la muestra de sangre y la estabilización de los ácidos nucleicos, en particular del ARN, tiene lugar generalmente mediante la mezclado de la muestra de sangre entera con la composición.

Ejemplo 1: Aislamiento de ARN de sangre entera

50 Como composición de acuerdo con la invención se utilizó una solución acuosa que se componía de tiocianato de guanidinio 2,2 M, MES 72 mM, Triton X-100 al 14,4% (peso/vol.) y EDTA 72 mM en agua. De esta composición, 6,5 mL estaban contenidos en un tubo de extracción de sangre habitual en el que se absorbió sangre directamente, extraída con antelación, que no había sido tratada ulteriormente y que no contenía aditivo alguno. Esta sangre entera se absorbió en cada caso en un tubo de extracción de sangre en un volumen de 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0

mL y 2,5 mL. La mezclado a fondo tiene lugar mediante la absorción del volumen de sangre, de manera opcional adicionalmente mediante agitación, en particular después de la absorción de una burbuja de aire.

5 La mezcla a base de la composición y sangre entera se combinó con proteinasa K (250  $\mu$ L, 18  $\mu$ g/mL). La mezcla se incubó durante aprox. 15 min a la temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se hizo pasar a través de una columna con agente de adsorción (High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit, adquirible de Roche) para ácidos nucleicos. El agente de adsorción se lavó con tampón de lavado de acuerdo con las instrucciones del fabricante y a continuación los ácidos nucleicos unidos se eluyeron con 100  $\mu$ L de tampón de elución.

10 La calidad del ARN eluido se evaluó mediante electroforesis en un sistema Nano Chip de ARN (Agilent Technology, EE.UU.), detección mediante bioanalizador Agilent 2100, indicándose un denominado RIN (siglas inglesas de número de integridad de ARN) que se determina en el análisis mediante el bioanalizador 2100, como medida para la integridad de ARN. La Figura 1 muestra el resultado del análisis para las distintas relaciones en volumen de sangre entera a composición (ARN Exact) que la integridad del ARN no depende de la relación en volumen, o bien que la composición de ARN de igual calidad se estabiliza para diferentes relaciones en volumen con sangre entera y el ARN se puede aislar de su mezcla.

15 La Figura 2 muestra la concentración medida de ARN en el material eluido que se aisló para las diferentes relaciones en volumen. Los resultados demuestran mediante la concentración de ARN creciente proporcional al volumen de sangre en 100  $\mu$ L de material eluido que la composición (ARN Exact) estabiliza en igual medida las distintas relaciones en volumen y de ellas se aísla en la misma medida. Esto demuestra que la composición para la lisis de células en sangre entera y la estabilización de los ácidos nucleicos en sangre entera es adecuada en  
20 diferentes relaciones en volumen.

Ejemplo 2: Comparación del rendimiento de estabilización de la composición de acuerdo con la invención con una solución comparativa

25 Como composición de acuerdo con la invención (ARN Exact) se utilizó la del Ejemplo 1, en cada caso en 6,5 mL, y se mezcló con 2,5 mL de sangre extraída directamente con antelación, que no contenía otros aditivos, con el fin de preparar la mezcla a base de composición y sangre entera. Para fines comparativos se utilizó una solución que se componía de tiocianato de guanidinio 4,0 M, Tris/HCl 45 mM, Triton X-100 al 18,0% (peso/vol.) y DTT al 0,8% (peso/vol.) en agua y se ajustó a un valor del pH de 6,0 (comparación, correspondiente al documento WO 00/09746 A1). 2,5 mL de la solución comparativa se mezclaron, tal como se describe en el documento WO 00/09746 A1 (relación 1 + 1), asimismo con 2,5 mL de la muestra de sangre extraída directamente con antelación. Las mezclas se  
30 almacenaron a 22,5°C, y el ARN se aisló con el kit NucleoSpin RNA Blood Midi de la razón social Macherey-Nagel a partir de las mezclas. En la solución comparativa se añadió, tal como se prevé en el protocolo de Macherey-Nagel, 1/3 del volumen de etanol al 70%. Esto no es necesario para la mezcla con la composición de acuerdo con la invención. La Figura 3 y la Figura 4 muestran los resultados de la separación electroforética capilar de los materiales eluidos en un nano-chip de ARN en el bioanalizador 2100. Mientras que de la mezcla de muestras con la  
35 composición de acuerdo con la invención se puede aislar también después de 3 días y después de 5 días ARN con una elevada integridad, esto solo es posible, con el uso de la solución comparativa, el día 0, es decir, directamente después de la mezclado con sangre.

Ejemplo 3: Estabilización del ARN de sangre entera y aislamiento

40 Como composición de acuerdo con la invención se utilizó la del Ejemplo 1, en cada caso en 6,5 mL y se mezcló con 2,5 mL de sangre extraída directamente con antelación, que no contenía otros aditivos, con el fin de preparar la mezcla a base de la composición y sangre entera. Para fines comparativos, se absorbió sangre en tubitos de extracción de sangre que contenían EDTA para la inhibición de la coagulación (S-Monovetten EDTA-K3, adquiribles de la razón social Sarstedt). La sangre procedía en cada caso de tres donantes distintos.

45 Las mezclas de acuerdo con la invención y las muestras comparativas se incubaron a 22,5°C, extrayéndose inmediatamente una parte alícuota (T0, día cero), después de 1 día de incubación (T1) y después de 3 días de incubación (T3). A partir de las partes alícuotas extraídas se aisló directamente y de inmediato el ácido nucleico tal como se describe en el Ejemplo 1.

50 Los ácidos nucleicos eluidos se trataron para la separación de ADN con DNasa (Thermo Fisher Scientific, Artículo N° EN0521) y se sometieron a ensayo mediante un análisis de micro-matrices en cuanto a la concentración de aprox. 47000 transcritos (ARNm) (humanHT-12 v4.0 Expression Bead Chip, de la razón social Agilent). En el caso de la evaluación, solo diferencias de la cantidad en transcritos mayores que el factor 2 se mostraron en el caso de una cantidad total de ARN igual. En la Fig. 5, las cantidades iguales en la matriz muestran, por lo tanto, cantidades de transcrito equiparables. La Fig. 5 muestra las cantidades de transcrito para los grupos de muestras estable (composición de acuerdo con la invención), no tratado (solo mezclados con EDTA) y T0 (sin adición, aislado  
55 inmediatamente después de la extracción de sangre) en cada caso para las muestras de los donantes 1, 2 y 3, en los momentos indicados.

Las partes alícuotas que se analizan en la Figura 5 son

Donante	1		2		3	
Muestra	1T0		2T0		3T0	
Muestra	1T1	1KT1	2T1	2KT1	3T1	3KT1
Muestra	1T3	1KT3	2T3	2KT3	3T3	3KT3

estando las muestras comparativas de EDTA caracterizadas con una "K".

El análisis de grupos en 199 transcritos elegidos a modo de ejemplo, mostrado en la Figura 5, pone de manifiesto que las muestras de sangre que se mezclaron con la composición de acuerdo con la invención (estable) muestran para un donante en los distintos momentos de la incubación, en cada caso un modelo equiparable de transcritos, mientras que las muestras comparativas (no tratado), que solo se mezclaron con EDTA, mostraron en los diferentes momentos de la incubación grandes diferencias dentro de cada uno de los donantes, lo cual apunta a una modificación de las cantidades de transcrito a lo largo del tiempo y con respecto a T0.

Para las muestras de sangre mezcladas solo con EDTA, el día 3 se encontraron con respecto al día 0, 768 diferencias en la concentración de los transcritos, mientras que, por el contrario, en el caso de las muestras que se mezclaron con la composición de acuerdo con la invención, dentro de cada uno de los donantes se encontraron diferencias esencialmente menores hasta ninguna en la concentración de los ARNs individuales de las muestras analizadas en momentos posteriores en comparación con T0 (véase la matriz de correlación de la Figura 6, muestras comparativas = K, en cada caso en los momentos KT0, KT1, KT3, con la composición de acuerdo con la invención T0, T1, T3).

Este resultado muestra, con ayuda de las cantidades constantes de transcritos para donantes individuales a lo largo de un tiempo de 3 días en las partes alícuotas mezcladas con la composición de las muestras de sangre, que la composición de la invención estabiliza las moléculas de ARN individuales a base de sangre entera a lo largo de la incubación y que la composición reduce significativamente, p. ej., en comparación con las muestras comparativas de EDTA, la degeneración y/o inducción de ARNm.

Ejemplo 4: Transcripción inversa y PCR a base del ARN de sangre entera

En cada caso 2,5 mL de sangre entera procedente de dos donantes se mezclaron directamente después de la extracción con 6,5 mL de la composición de acuerdo con la invención a base de tiocianato de guanidinio 2,2 M, MES 72 mM, Triton X-100 al 14,4% (peso/vol.) y EDTA 72 mM en agua y se incubaron a 22,5°C. A partir de estas mezclas se tomaron inmediatamente (T0) y al cabo de 3 días (T3), de 4 días (T4) y de 5 días (T5) en cada caso partes alícuotas y se congelaron a -80°C. A continuación, todas las muestras se descongelaron en paralelo y se añadieron a agente de adsorción de ácidos nucleicos (NucleoSpin RNA Blood, Macherey-Nagel) El agente de adsorción se lavó conforme a las instrucciones del fabricante y los ácidos nucleicos se eluyeron. Al material eluido se añadió DNasa (DNasa I, exenta de RNasa, Artículo N° EN0521, Thermo Fisher Scientific). ARN se transcribió de forma inversa con el kit "first strand cDNA synthesis" (Artículo N° K1612, Thermo Fisher Scientific) con el fin de obtener ADNc. Este producto se amplificó con cebadores que eran específicos para las secuencias de nucleótidos de los genes para  $\beta$ -actina, GAPDH, IL-8, c-Fos, IL-1B y TNF- $\alpha$ , mediante PCR en tiempo real, utilizando la mezcla Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Artículo N° K0222, Thermo Fisher Scientific) como tanda doble.

Para la evaluación, los valores Ct obtenidos para el ADNc de  $\beta$ -actina y GAPDH, se utilizaron como patrón interno y después se normalizaron los valores Ct medidos para IL-8, c-Fos, IL-1B y TNF- $\alpha$ . Estas concentraciones relativas de los ADNcs para IL-8, c-Fos, IL-1B y TNF- $\alpha$  a T3, T4 y T5 se refirieron adicionalmente en cuanto a su concentración respectiva a T0. Estos resultados se designan como ddCt y se muestran en la Figura 7 para la sangre de uno de los donantes y en la Figura 8 para la sangre del otro donante. Los resultados de ambas muestras ponen de manifiesto que la composición de acuerdo con la invención adquiere de forma estable las concentraciones relativas de los ARNm celulares específicamente detectados en la sangre entera a lo largo del tiempo de incubación a 22,5°C.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición como agente de disgregación para células contenidas en sangre entera, como agente de estabilización para el ARN completo de la sangre entera y para el aislamiento mediante adsorción del ARN de una mezcla de la sangre entera con la composición a un agente de adsorción para ácidos nucleicos, caracterizado por que la composición en solución acuosa se compone de
- a. al menos una sal de guanidinio,
  - b. al menos una sustancia tampón para el tamponamiento en un pH de 5,0 a 8,0,
  - c. al menos un detergente no iónico y
  - d. al menos un formador de complejos para cationes divalentes,
  - 10 e. y, opcionalmente, proteinasa y/o DNasa, y
  - f. está exenta de agentes reductores,
- 15 que impide la degradación y la síntesis renovada de ARN en la sangre entera, y porque el uso comprende el aislamiento de ARN directamente a partir de la mezcla, que se compone de sangre entera y de la composición, estando prevista la composición en una relación en volumen variable de la sangre entera a la composición de hasta 1:13 en la mezcla, mediante la puesta en contacto en la mezcla con un agente de adsorción para ácidos nucleicos, en donde a partir de la mezcla no se separa componente alguno, opcionalmente a la mezcla se añade proteinasa y/o DNasa, y el ARN no precipita de la mezcla y se separa antes de que la misma se ponga en contacto con el agente de adsorción.
- 20 2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado por que la sal de guanidinio es tiocianato de guanidinio, la sustancia tampón es ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico (MES), Tris(Tris(hidroxiometil)-aminometano), citrato, fosfato(dihidrógeno-fosfato de sodio)dihidrato, tampón BisTris (bis-(2-hidroxiometil)-imino-tris-(hidroxiometil)-metano), ACES (ácido *N*-(2-acetamido)-2-aminometanosulfónico), hidrógeno-carbonato de sodio o fosfato(hidrógeno-fosfato de sodio)dihidrato, el detergente no iónico es Triton X-100, Tween 20, Tween 80 (monooleato de polioxietilensorbitán), Brij 58 (polietilenglicol-hexadeciléter), Triton X-114 (octilfenolpolietilenglicoléter) o Nonidet P40, y el formador de
- 25 complejos es tetra-acetato de etilendiamina (EDTA) y está exenta de compuestos de tiol o sus compuestos precursores.
3. Uso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por que la composición está contenida en un tubo de extracción de sangre.
- 30 4. Uso según la reivindicación 3, caracterizado por que el tubo de extracción de sangre está dispuesto para absorber un volumen variable de la sangre entera.
5. Procedimiento para el aislamiento del ARN completo de sangre entera, caracterizado por mezclar la sangre entera con una composición que, en solución acuosa, se compone de
- a. al menos una sal de guanidinio,
  - b. al menos una sustancia tampón,
  - 35 c. al menos un detergente no iónico y
  - d. al menos un formador de complejos,
  - e. opcionalmente, proteinasa y/o DNasa, y
- 40 está exenta de agentes reductores, que impide la degradación y la síntesis renovada de ARN en la sangre entera, preparación de una mezcla que se compone de la sangre entera y de la composición en unarelación en volumen de hasta 1:13, opcionalmente con almacenamiento de la mezcla obtenida por encima de 0°C, opcionalmente con la adición de proteinasa y/o DNasa a la mezcla, puesta en contacto de la mezcla con un agente de adsorción para ácidos nucleicos, no separándose de la mezcla, antes de la puesta en contacto con el agente de adsorción, sustancia constitutiva alguna, separación de las sustancias no ligadas del agente de adsorción y elución de ARN del agente de adsorción.
- 45 6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que la puesta en contacto de la mezcla con el agente de adsorción tiene lugar sin previa precipitación, separación y disolución de ácidos nucleicos de la mezcla.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 6, caracterizado por que el almacenamiento de la mezcla tiene lugar durante al menos 3 días a como máximo 25°C.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado por que la mezcladura de la sangre entera con la composición tiene lugar en una relación en volumen de hasta 1:2.

5 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 8, caracterizado por que el agente de adsorción son partículas revestidas con sílice, y a la mezcla de la sangre entera y de la composición se añade un diluyentes en un volumen de al menos 50% el volumen de la mezcla.

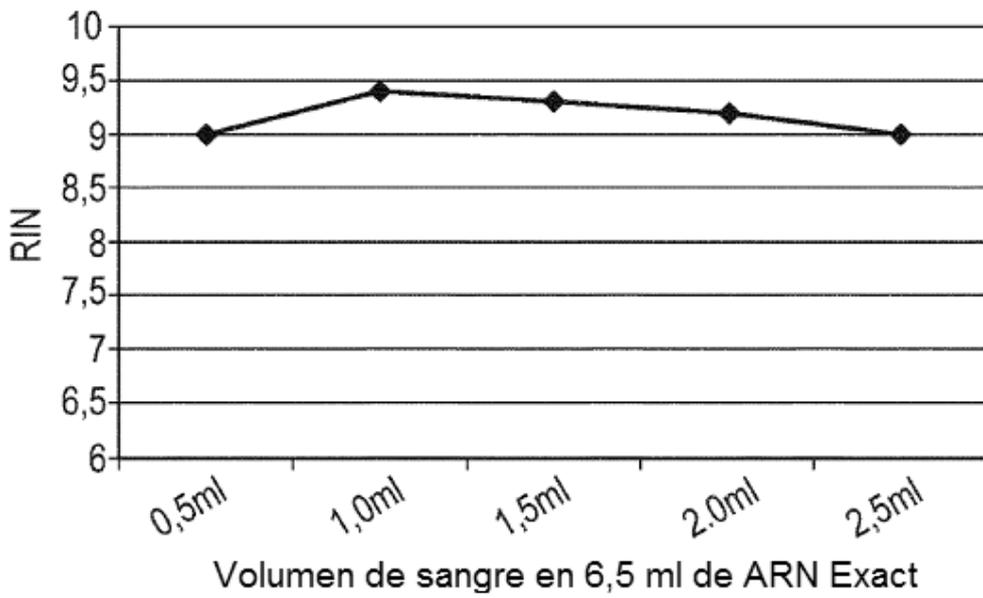


Fig. 1

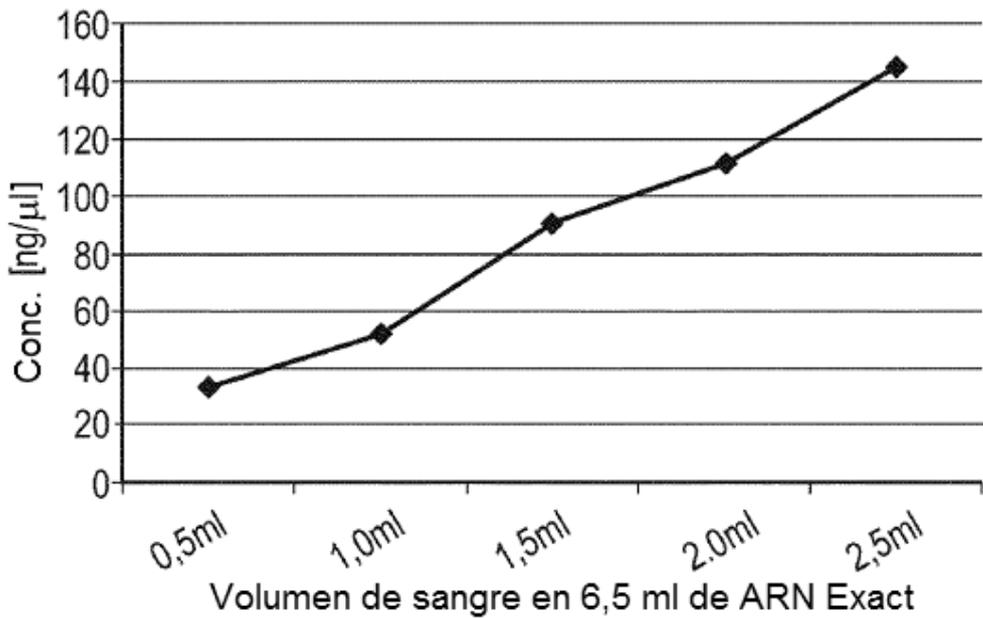


Fig. 2

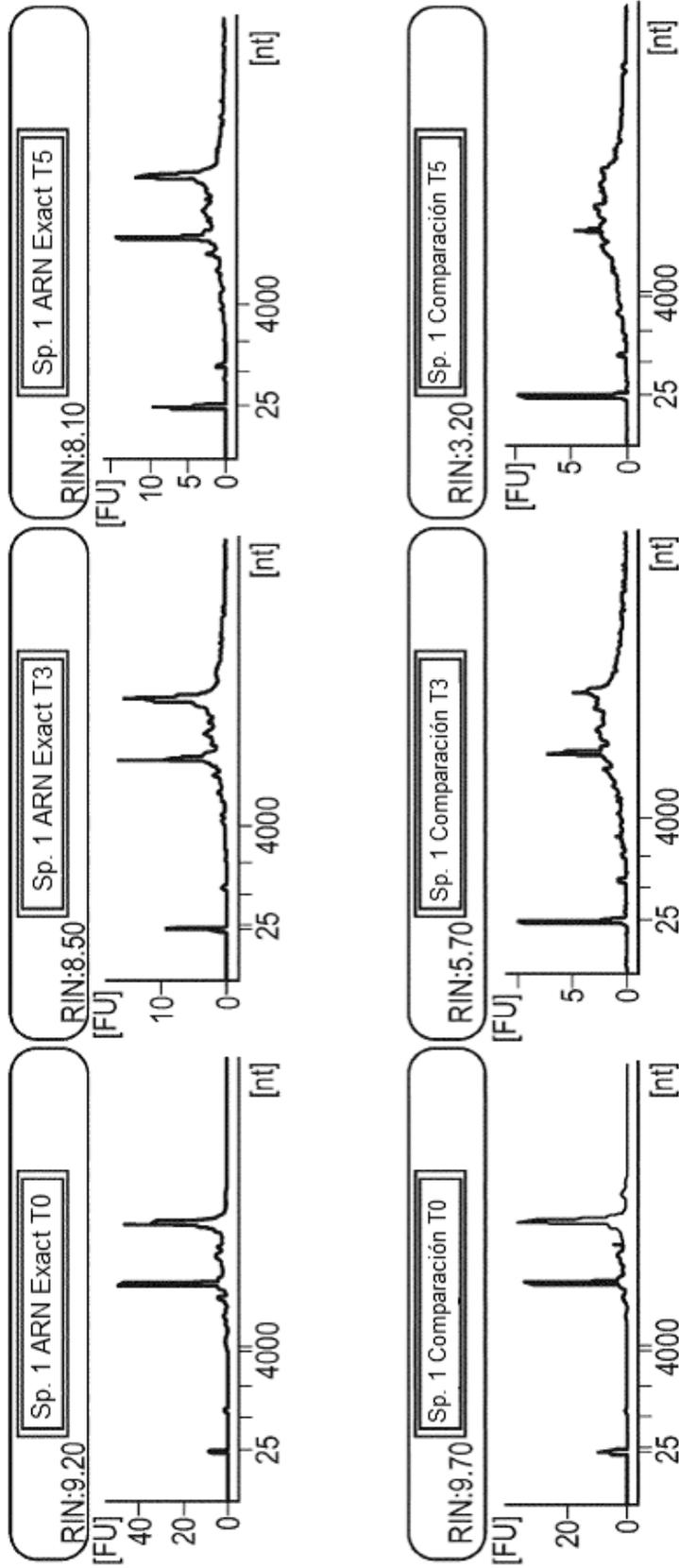


Fig. 3

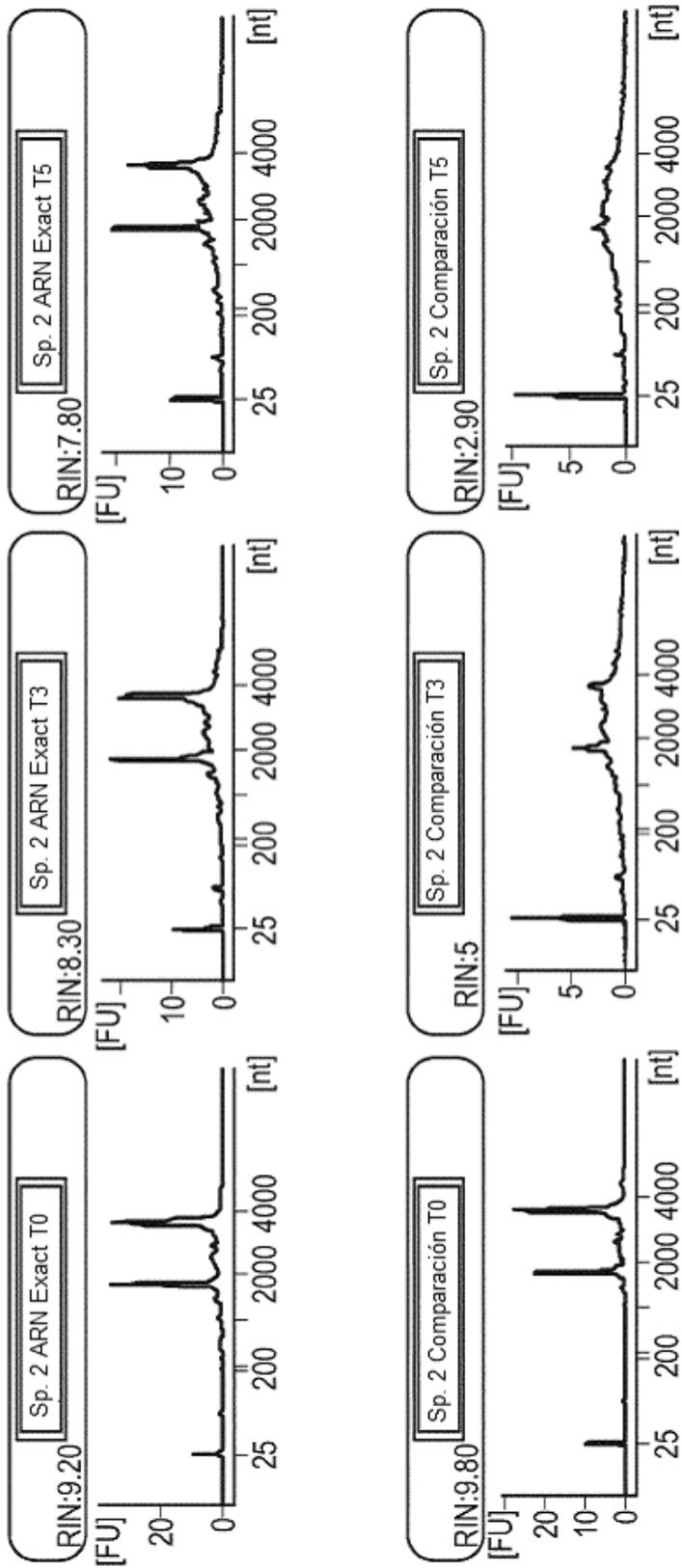


Fig. 4

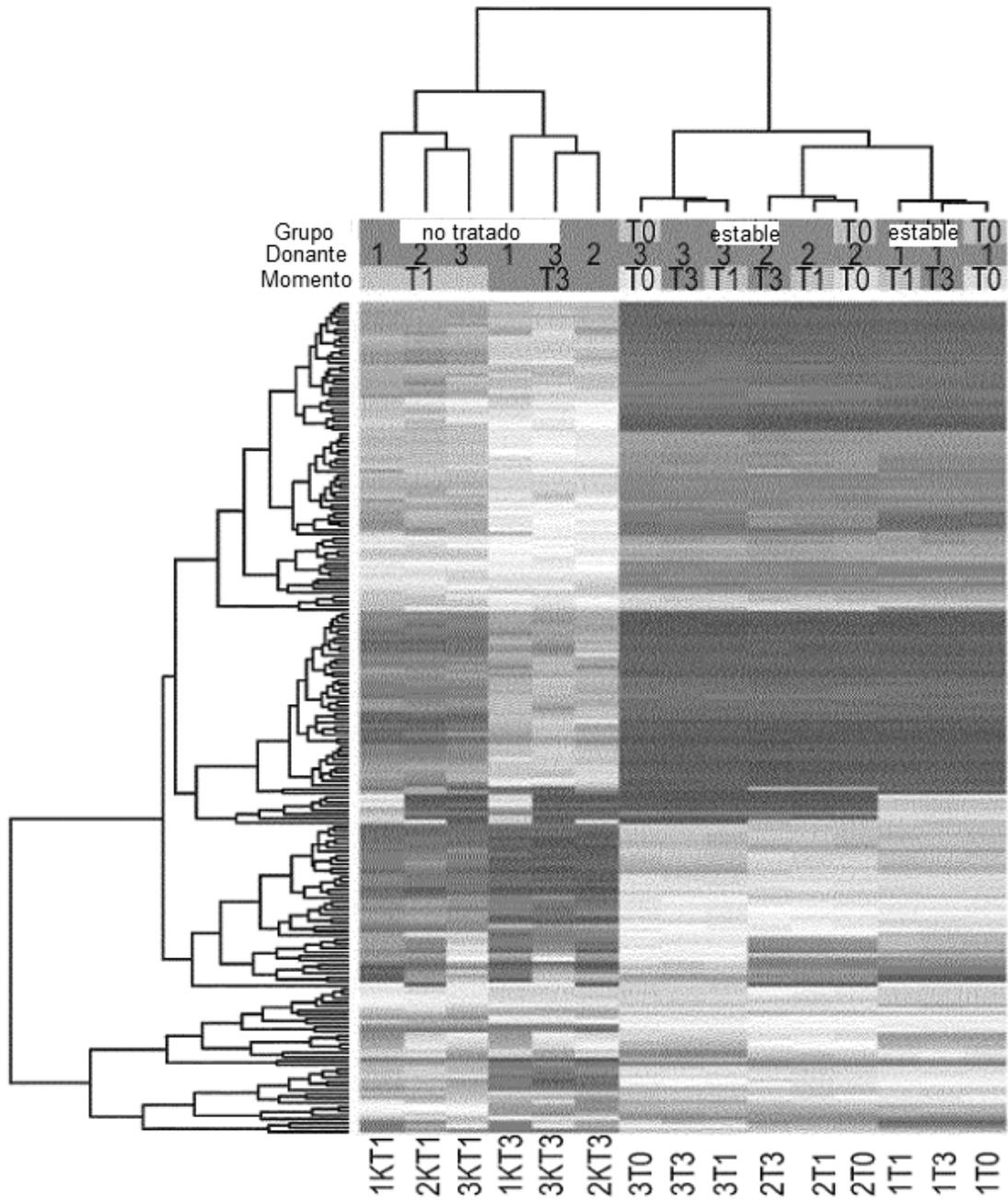


Fig. 5

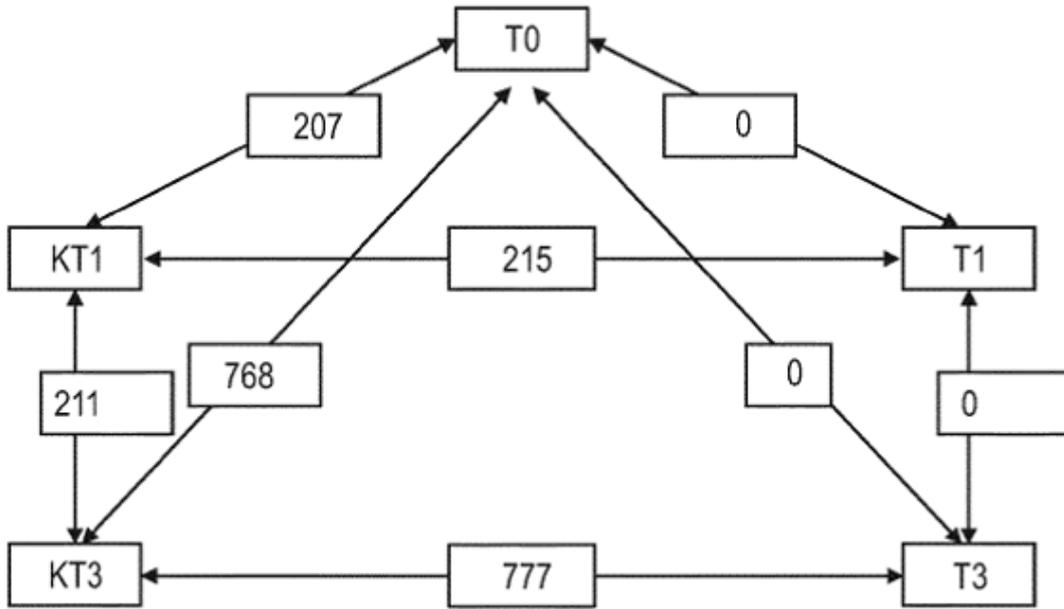


Fig. 6

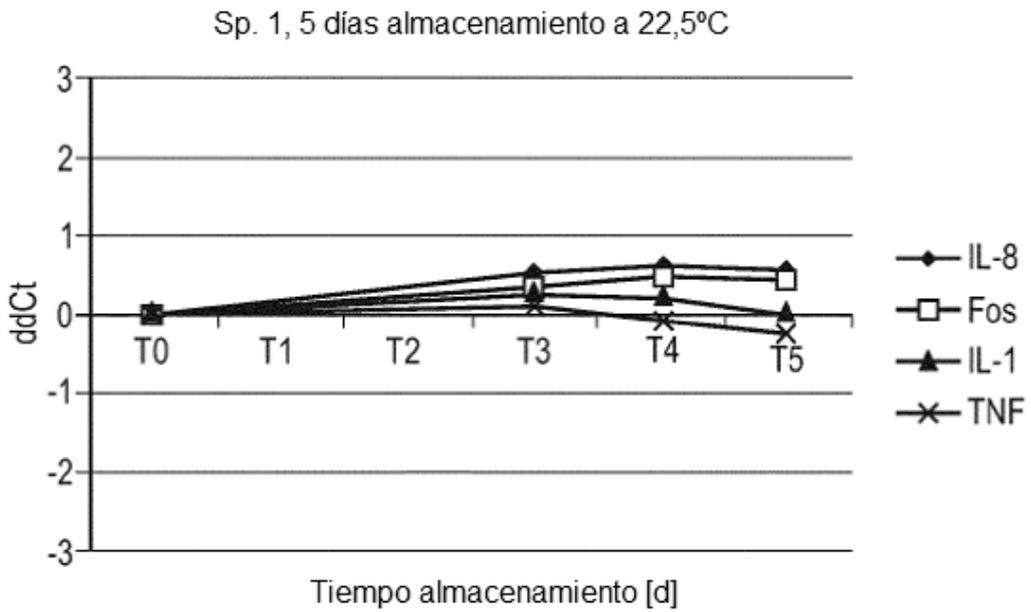


Fig. 7

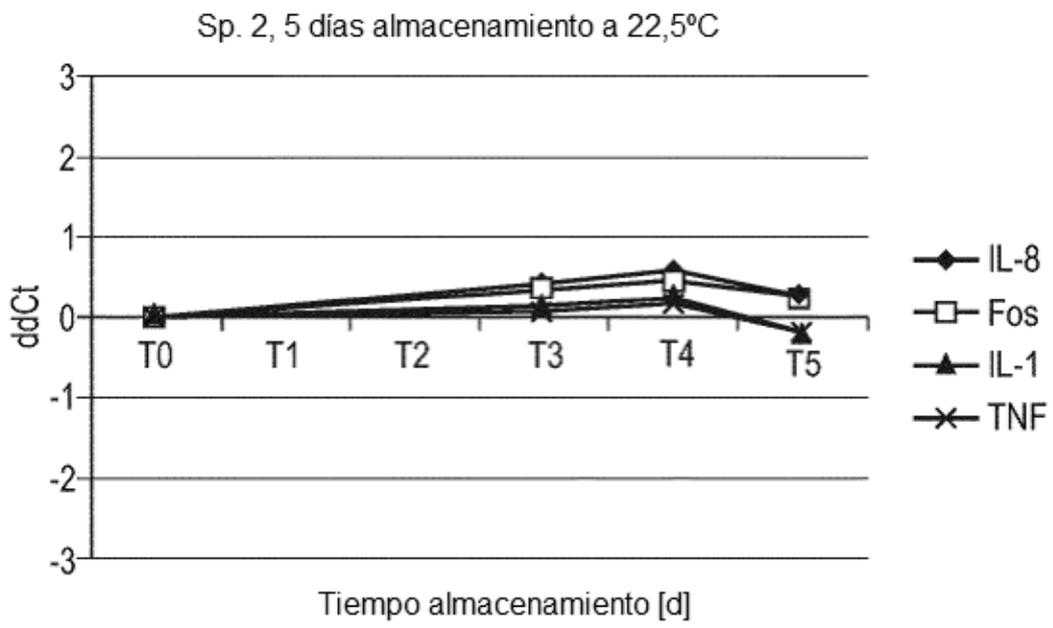


Fig. 8