



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Q 1/68 (2023.02); G01N 33/48 (2023.02); C12M 3/00 (2023.02)

(21)(22) Заявка: 2022127083, 19.10.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.10.2022Дата регистрации:
14.06.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.10.2022

(45) Опубликовано: 14.06.2023 Бюл. № 17

Адрес для переписки:

117418, Москва, ул. Гарибальди, 25, корп. 2, кв.
26, Гра Ольга Алексеевне

(72) Автор(ы):

Гра Ольга Алексеевна (RU),
Гра Дмитрий Вадимович (RU),
Селезнев Виктор Васильевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Гра Ольга Алексеевна (RU),
Гра Дмитрий Вадимович (RU),
Селезнев Виктор Васильевич (RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20200196594 A1, 25.06.2020. WO
2017201612 A1, 30.11.2017. WO 2019079743 A1,
25.04.2019. US 20200318161 A1, 08.10.2020. US
10724074 B2, 28.07.2020. RU 150414 U1,
20.02.2015.

(54) Среда и устройство для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, а также их применение для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к биотехнологии и медицине и касается преаналитических систем для взятия биологического материала, содержащих стабилизирующую среду для хранения и транспортировки внеклеточных нуклеиновых кислот с целью их последующего анализа и использования полученных результатов в клинической практике. Изобретение представляет собой среду для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, где биологический образец, содержащий внеклеточные нуклеиновые кислоты, которые необходимо сохранить, представляет собой кровь или плазму; где внеклеточные нуклеиновые кислоты представляют собой внеклеточную ДНК или РНК; содержащую разделительный гель, где в качестве разделительного геля используется тиксотропный гель; и стабилизирующий раствор, содержащий по крайней мере 1 фиксирующий

клеточную мембрану агент и по крайней мере 1 антикоагулянт, где антикоагулянт может выполнять функцию ионного стабилизирующего и/или хелатирующего агента. Изобретение касается также устройства для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, содержащего среду по п. 1, которое представляет собой пробирку со средой по п. 1, причем стабилизирующий раствор, содержащий фиксирующий клеточную мембрану агент, входящий в состав среды по п. 1, расположен над тиксотропным гелем и/или указанный тиксотропный гель расположен под указанным стабилизирующим раствором. Изобретение может использоваться для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот до 15 суток при температуре от -20 до +37°C и до 12 месяцев при температуре от -86 до -20°C. 3 н. и 14 з.п. ф-лы, 5 ил., 10 табл., 3 пр.

RU 2 798 013 C1

RU 2 798 013 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12Q 1/68 (2023.02); G01N 33/48 (2023.02); C12M 3/00 (2023.02)

(21)(22) Application: **2022127083, 19.10.2022**

(24) Effective date for property rights:
19.10.2022

Registration date:
14.06.2023

Priority:
(22) Date of filing: **19.10.2022**

(45) Date of publication: **14.06.2023** Bull. № 17

Mail address:
**117418, Moskva, ul. Garibaldi, 25, korp. 2, kv. 26,
Gra Olge Alekseevne**

(72) Inventor(s):
**Gra Olga Alekseevna (RU),
Gra Dmitrij Vadimovich (RU),
Seleznev Viktor Vasilevich (RU)**

(73) Proprietor(s):
**Gra Olga Alekseevna (RU),
Gra Dmitrij Vadimovich (RU),
Seleznev Viktor Vasilevich (RU)**

(54) **ENVIRONMENT AND DEVICE FOR COLLECTING, STORING AND TRANSPORTING BIOLOGICAL SAMPLES, AS WELL AS THEIR USE FOR THE STABILIZATION OF EXTRACELLULAR NUCLEIC ACIDS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology and medicine.

SUBSTANCE: invention concerns preanalytical systems for taking biological material containing a stabilizing medium for storage and transportation of extracellular nucleic acids for the purpose of their subsequent analysis and use of the results obtained in clinical practice. The invention is a medium for collecting, storing and transporting biological samples, where the biological sample containing extracellular nucleic acids to be stored is blood or plasma; where extracellular nucleic acids are extracellular DNA or RNA; containing a release gel, where a thixotropic gel is used as the release gel; and a stabilizing solution containing at least 1 cell membrane fixing agent and at least 1 anticoagulant, where the anticoagulant can

function as an ionic stabilizing and/or chelating agent. The invention also relates to a device for collecting, storing and transporting biological samples containing the medium according to claim 1, which is a test tube with a medium according to claim 1, and a stabilizing solution containing a cell membrane fixing agent, which is part of the medium according to claim 1, located above the thixotropic gel and/or the specified thixotropic gel is located under the specified stabilizing solution.

EFFECT: invention can be used to stabilize extracellular nucleic acids for up to 15 days at temperatures from -20 to +37°C and up to 12 months at temperatures from -86 to -20°C.

17 cl, 5 dwg, 10 tbl, 3 ex

RU 2 798 013 C1

RU 2 798 013 C1

Настоящее изобретение относится к медицине и касается преаналитических систем для взятия биологического материала, содержащих стабилизирующую среду для хранения и транспортировки внеклеточных нуклеиновых кислот с целью их последующего анализа и использования полученных результатов в клинической практике. Сущность изобретения заключается в разработке среды (композиции) нового состава и содержащего данную среду (композицию) устройства для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, а также новых способов их применения, которые позволяют обеспечить сохранность внеклеточных нуклеиновых кислот в течение длительного времени в широком температурном диапазоне, и при этом подходят для работы в лабораториях с разным уровнем оснащения.

Описание изобретения

Область техники

Настоящее изобретение относится к области молекулярной биологии, биоорганической химии, и генетики, и представляет собой преаналитическую систему для взятия биологического материала, содержащую среду для стабилизации нуклеиновых кислот с целью хранения и транспортировки данных биополимеров для последующего анализа в клиничко-диагностических лабораториях и использования полученных результатов в качестве диагностических и прогностических маркеров в разных областях медицины.

Уровень техники

Анализ свободно-циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) используется для разных задач, в том числе при проведении неинвазивного пренатального тестирования - НИПТ [1], для диагностики, прогноза и отслеживания результатов лечения онкологических заболеваний [2], а также в трансплантологии [3], в спортивной медицине [4] и даже для прогнозирования течения COVID-19 [5]. Можно выделить следующие методы обеспечения сохранности внеклеточной ДНК:

1 Распространенным методом предотвращения высвобождения геномной ДНК во фракцию плазмы является сбор крови в стандартные пробирки с ЭДТА или цитратом натрия с последующим хранением образцов крови в холодильнике, с обязательным центрифугированием образца в течение 6 часов и отбором плазмы после центрифугирования. После отбора плазмы ее необходимо заморозить до выделения ДНК. В свою очередь, в случае необходимости анализа внеклеточной РНК образец цельной крови необходимо центрифугировать не позднее 1 часа после взятия и далее либо выполнить выделение РНК с последующим хранением при -86°C , либо провести реакцию обратной транскрипции для получения комплементарной ДНК (кДНК), которая является более стабильной, но при этом хранение и транспортировку которой также необходимо проводить в замороженном состоянии. Отдельно следует отметить, что даже в течение указанного времени до центрифугирования (6 часов в случае ДНК и 1 час в случае РНК) уже наблюдается значительная деградация внеклеточных нуклеиновых кислот.

Проблема с использованием данного метода заключается в том, что большинство пунктов забора крови не имеют необходимого оборудования и вынуждены отправлять образцы в централизованные лаборатории для выделения или анализа внеклеточных нуклеиновых кислот. При этом несмотря на то, что в большинстве кабинетов забора крови и лабораторий есть возможность отделить плазму, ее необходимо хранить в замороженном состоянии до выделения ДНК и последующих диагностических манипуляций. В свою очередь, работа с внеклеточной РНК - как выделение РНК, так и получение кДНК с целью отправки в замороженном виде в централизованную

лабораторию, практически не осуществима в медицинских кабинетах / пунктах забора биоматериала ввиду низкого уровня оснащения и высоких требований к квалификации персонала. В связи с этим стандартные пробирки с ЭДТА или цитратом натрия не являются идеальным или практичным решением для широкого использования

5
внуклеточных нуклеиновых кислот в диагностических приложениях, особенно для лабораторий с ограниченными ресурсами, в которых отсутствует необходимое оборудование для немедленного приготовления плазмы и/или выделения РНК и последующего хранения в морозильной камере перед отправкой. Кроме того, отправка таких образцов требует строгого соблюдения холодной цепи при транспортировке

10
при отрицательных температурах, так как при размораживании образец внуклеточной ДНК/РНК может существенно деградировать и стать непригодным для проведения дальнейших исследований.

Таким образом, данные пробирки пригодны только для лабораторий, в которых либо нет задач длительного хранения биоматериала и выделение внуклеточной ДНК/РНК проводится в течение одного рабочего дня, либо оснащение лаборатории позволяет

15
отделить плазму / выделить РНК и заморозить образец для дальнейшей транспортировки. 2. Вторым методом является усовершенствованным вариантом первого метода и заключается в сборе крови в пробирки, содержащие антикоагулянт по аналогии с методом в п. 1, полиатомный спирт в качестве стабилизатора и специальный

20
(тиксотропный) гель, который создает барьер между клетками крови и плазмой после центрифугирования. Поскольку удельный вес тиксотропного геля, используемого в пробирках, является промежуточным между удельным весом более тяжелой (клетки крови) и более легкой (плазма) фаз, то во время центрифугирования данный гель формирует промежуточный слой между клетками крови, которые остаются под гелем,

25
и верхним слоем плазмы. На положение геля после центрифугирования влияют многие характеристики геля, такие как его удельный вес, предел текучести и вязкость. На положение геля также могут оказывать влияние внешние условия, такие как температура и скорость центрифугирования. Также могут влиять дополнительные факторы, связанные с отобраным в пробирку образцом цельной крови, такие как терапия

30
гепарином, низкий гематокрит, повышенный белок плазмы, высокое содержание липидов и другие факторы, влияющие на удельный вес плазмы. Кроме того, тип полимера, который используется для создания геля, также может влиять на его вязкость, плотность и другие физические свойства.

Данный подход к стабилизации, хранению и получению внуклеточной ДНК описан

35
в патенте US20200196594 компании delta DNA Biosciences Inc. (Канада) и реализован в пробирке для взятия крови НАЕМ-ЛОК™. Используя комбинацию барьерной матрицы, специальной барьерной жидкости и единственного этапа центрифугирования, все клетки крови (включая все клетки «лейкоцитной пленки») перемещаются ниже физического барьера, образуя бесклеточную плазму. Раннее удаление всех клеток предотвращает

40
последующее высвобождение геномной ДНК из лизированных клеток и позволяет максимально эффективно извлекать внуклеточную ДНК из фракции плазмы крови, которая физически отделена от клеток крови. После центрифугирования образцы крови в НАЕМ-ЛОК™ можно хранить в исходной пробирке при температуре окружающей среды в течение 2-3 недель, что упрощает транспортировку и рабочий процесс. Помимо

45
этого, образец цельной крови допускается хранить в данной пробирке до 5 дней без центрифугирования при температуре от 0°C до +10°C, что позволяет осуществить транспортировку образца в централизованную лабораторию из медицинского кабинета / пункта забора биоматериала с низким уровнем оснащения, при этом осуществление

транспортировки требует строгого соблюдения холодной цепи. Отдельно следует отметить, что срок хранения 5 дней и верхний температурный предел +10°C обусловлены, в частности, отсутствием в составе стабилизирующего раствора данной пробирки фиксаторов клеточной мембраны или ингибиторов апоптоза, что не позволяет осуществить стабилизацию клеток, и, как следствие, предотвратить высвобождение геномной ДНК из ядродержащих клеток и лизис (гемолиз) эритроцитов в течение более длительного времени и в более широком температурном диапазоне. 3. Третий метод стабилизации с последующим отделением плазмы от клеток крови и извлечения внеклеточной ДНК из фракции плазмы крови приведен в заявке на патент WO2017201612 и основан на методе дифференциальной преципитации с целью дополнительного концентрирования внеклеточной ДНК. В нем используется принцип, который первоначально описали Джон Лис и Роберт Шлейф [6]. Авторы показали, что воздействие на ДНК комбинации полиэтиленгликоля и хлорида натрия в различных концентрациях может по-разному осаждать ДНК разных классов и размеров. Таким образом, ДНК с очень высокой молекулярной массой (геномная ДНК), которая высвобождается из клеток при высоких концентрациях хлорида натрия, немедленно осаждается в присутствии полиэтиленгликоля. Внеклеточная ДНК, которая имеет гораздо более низкий молекулярный вес, не осаждается в этих условиях, что позволяет лучше разделить эти два класса ДНК благодаря их размерам. Композиция, предложенная авторами данного патента для стабилизации внеклеточной ДНК, не содержит фиксаторов клеточной мембраны, а только консерванты, антикоагулянты и осадители, которые позволяют выделить внеклеточную ДНК в относительно высокой концентрации. Данный подход к стабилизации, хранению и выделению внеклеточных нуклеиновых кислот реализован в пробирке для взятия крови cf-DNA & cf-RNA Collection & Preservation компании Norgen Biotek Corp. (Канада), при этом пробирка с биологическим образцом до проведения анализа должна храниться при температуре не ниже +4°C во избежание гемолиза клеток.

4 Четвертый, наиболее широко используемый метод предотвращения высвобождения геномной ДНК во фракцию плазмы крови заключается в использовании химических агентов, стабилизирующих клеточную мембрану, таких как альдегиды (например, формальдегид или глутаральдегид), которые стабилизируют ядродержащие клетки посредством фиксации их мембраны. У данного метода есть ряд недостатков, который обусловлен использованием альдегидов в качестве консервантов для стабилизации внеклеточной ДНК, так как они могут обуславливать образование перекрестных связей ДНК-белок и ДНК-ДНК, которые в свою очередь могут негативно влиять на последующую амплификацию и секвенирование ДНК. В свою очередь, для нивелирования потенциально негативного действия альдегидов на внеклеточные нуклеиновые кислоты и эффективность прохождения молекулярно-генетического исследования, композиции по данному методу все чаще содержат дополнительные компоненты, нейтрализующие действие альдегидов и их производных. Подобный подход к обеспечению сохранности внеклеточных нуклеиновых кислот посредством фиксации среднего объема эритроцитов, предотвращения лизиса лейкоцитов и, как следствие, предотвращения высвобождения мембранных везикул во внеклеточное пространство - плазму, описан в международной заявке на патент WO2019/079743 A1. Разработанный авторами состав предназначен для стабилизации лейкоцитов и эритроцитов, предотвращая высвобождение нуклеиновых кислот и мембранных везикул из клеток в биологическом образце. При этом, ввиду наличия в составе консервирующего раствора «гасителя» альдегида, композиция по предложенному авторами изобретению

подходит для стабилизации биологических образцов с целью последующего анализа методами иммуноанализа, ПЦР, секвенирования следующего поколения (NGS) и др. Похожий состав используется авторами в заявке на патент US2020/0318161 A1 для стабилизации свободно-циркулирующей внеклеточной РНК, при этом композиция по
5 данному изобретению дополнительно содержит ингибиторы нуклеаз/протеаз и ингибиторы транскрипции, которые обеспечивают стабилизацию РНК и при этом сохраняют уровень экспрессии РНК на момент забора крови.

Таким образом, использование пробирок с химическими стабилизаторами, которые содержат осадители (по п. 3) или фиксаторы мембраны (по п. 4), позволяет решить
10 задачу длительного хранения и транспортировки образца цельной крови в диапазоне температур от +4 до +37°C, при этом нет необходимости в предварительном отделении плазмы и замораживании, что позволяет использовать данные пробирки в лабораториях и медицинских кабинетах с ограниченными ресурсами.

При этом пробирки с химическими стабилизаторами, которые содержат осадители
15 или фиксаторы мембраны, также как и пробирки с антикоагулянтами без и с добавлением барьерного геля не предназначены для хранения образца с внеклеточной ДНК/РНК при температурах ниже 0°C, в связи с чем для решения логистических задач в холодное время года в регионы с умеренным или субполярным климатом требуется либо 1) предварительно отделить плазму от клеток крови, заморозить образцы плазмы
20 и осуществлять их транспортировку в замороженном виде со строгим соблюдением холодовой цепи, либо 2) проводить транспортировку цельной крови в пробирках с химическими стабилизаторами, но также со строгим соблюдением температурного режима хранения и транспортировки не ниже +4°C.

При этом строгое соблюдение температурного режима в узком температурном
25 диапазоне при хранении и транспортировке в сочетании с использованием терморегистраторов (логгеров) или термоиндикаторов определяет более высокую стоимость доставки биоматериала в централизованную лабораторию, что может негативно влиять на конечную стоимость исследования для пациента, и при этом не
30 всегда дает гарантию сохранности биоматериала, что может обуславливать повышенный риск повторного взятия крови и более длительного времени ожидания до получения результата исследования, а, следовательно, до возможности принятия врачебного/медицинского решения в случае необходимости.

Для решения задачи хранения и транспортировки биологических образцов в широком
диапазоне температур наиболее близким аналогом технического решения является
35 среда для хранения и транспортировки образцов крови, описанная в международной заявке на патент WO2004032750A1. Среда по указанному в заявке изобретению включает разделительный гель и стабилизирующий раствор, содержащий в качестве стабилизирующих агентов ингибиторы каспаз - протеолитических ферментов,
относящихся к семейству цистеиновых протеаз и расщепляющих белки исключительно
40 после аспартата (цистеинил-аспартат-специфические протеазы). В заявке также указано, что среда содержит по меньшей мере один стабилизирующий агент в количестве, достаточном для предотвращения или устранения возникновения морфологических изменений, деградации клеточной мембраны, фрагментации ДНК или потери клеточной функции или жизнеспособности.

Известно, что каспазы регулируют многие клеточные и биохимические изменения
45 в погибающих апоптотических клетках. В частности, наблюдаемая при апоптозе фрагментация ДНК является результатом расщепления эффекторной каспазой комплекса, состоящего из клеточной ДНКазы CAD (caspase-activated DNase) и ее

ингибитора ICAD. При расщеплении ингибитора активная ДНКаза CAD начинает расщеплять ДНК по наиболее доступным местам между нуклеосомами, что приводит к ее деградации и обнаружению характерной «лесенки» из фрагментов ДНК разных размеров, наблюдаемой при апоптозе. В свою очередь, суммарно ингибирование каспаз может предотвращать запуск каспаззависимого пути апоптоза клеток и последующее высвобождение внутриклеточных нуклеиновых кислот, а также способствовать меньшей деградации внеклеточной ДНК за счет отсутствия высвобождения внутриклеточных ДНКаз [7].

Так как помимо каспаззависимого пути апоптоза известно множество других механизмов клеточной гибели, то во всех остальных случаях, включая апоптоз клеток по каспазозависимому пути, указанный авторами международной заявки на патент WO2004032750A1 стабилизирующий раствор, содержащий в качестве стабилизирующих агентов один или несколько ингибиторов каспаз, не сможет обеспечить сохранность и стабильность исходной концентрации внеклеточных нуклеиновых кислот, а именно ДНК и, особенно, РНК, в биологическом образце ввиду отсутствия в составе стабилизирующего раствора универсального агента, способного предотвратить высвобождение внутриклеточных нуклеиновых кислот, а также деградацию внеклеточных нуклеиновых кислот за счет отсутствия высвобождения внутриклеточных нуклеопротеаз.

Возможно, по этой причине авторы данной международной заявки на изобретение не позиционируют разработанную ими среду для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот, прецизионное качество которых необходимо для последующего проведения таких высокочувствительных к качеству анализируемого образца методов исследований, как НИПТ и жидкостная биопсия, а преимущественно для хранения цельной крови с целью последующего проведения стандартных общеклинических исследований, при этом диапазон температур и срок такого хранения в данной заявке не указан.

Необходимость использования дополнительных стабилизирующих клетки компонентов, помимо ингибиторов каспаз, приводится в патентах на изобретения US10724074B2 и US10144952B2 компании Qiagen GmbH. В частности, авторами было показано, что ингибиторы каспаз снижают загрязнение популяции внеклеточных нуклеиновых кислот внутриклеточными нуклеиновыми кислотами, в частности, фрагментированной геномной ДНК, которая высвобождается из содержащихся в образце клеток, например, из поврежденных или умирающих клеток. При этом только стабилизирующая комбинация, которая включает ингибитор апоптоза и дополнительный стабилизирующий агент, такой как N,N-диалкилпропанамид, в частности, N,N-диметилпропанамид (DMPA), или бутанамид, эффективна для сохранения популяции внеклеточных нуклеиновых кислот, содержащейся в образце на момент взятия биологического образца, и для стабилизации транскриптома содержащихся клеток.

Механизм действия N,N-диалкилпропанамидов, в частности, DMPA, и бутанамида, до конца не изучен, при этом есть данные, что некоторые из производных бутанамида демонстрируют ингибирующее действие на деацетилазы гистонов, которые являются ключевыми ферментами, контролирующими статус пролиферации или дифференцировки большинства клеток. В свою очередь, N,N-диалкилпропанамиды, и в частности, DMPA, способны стабилизировать профиль транскрипции генов путем ингибирования изменений уровней транскриптов, при этом клетки лимфоцитов остаются интактными. Таким образом, данные стабилизирующие агенты, которые используются преимущественно в комбинации с ингибиторами каспаз, стабилизируют клетки

«изнутри», предотвращая их гибель по апоптотическому пути, но при этом не оказывают внешнего стабилизирующего действия на ядродержащие клетки посредством фиксации их мембраны. Это объясняет, почему приведенные в указанных патентах US10724074B2 и US10144952B2 на изобретения композиции для стабилизации, хранения и

5 транспортировки нуклеиновых кислот позволяют обеспечить стабилизирующий эффект максимум до семи суток (преимущественно 2-3 дня) при комнатной температуре без возможности охлаждения / замораживания или хранения в течение более длительного промежутка времени.

Таким образом, несмотря на имеющийся прогресс в стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот, остается потребность в композиции и устройстве для сбора,

10 хранения и транспортировки биологических образцов, комбинация которых позволяла бы обеспечить сохранность внеклеточных нуклеиновых кислот в течение длительного времени в широком диапазоне отрицательных и положительных температур, и при этом подходила бы для работы в лабораториях с любым уровнем оснащения, в том

15 числе для медицинских кабинетов/пунктов забора биоматериала с минимальной приборной базой.

Такая композиция (среда) и устройство, а также способы их применения для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот обеспечиваются настоящим изобретением.

20 Раскрытие изобретения

Сущность изобретения заключается в разработке Среды нового состава и создании содержащего данную среду Устройства для сбора и последующего хранения и транспортировки биологических образцов в течение длительного времени в широком температурном диапазоне, а также новых способов их применения для стабилизации

25 нуклеиновых кислот в лабораториях с разным уровнем оснащения.

Технический результат, возникающий при осуществлении изобретения заключается в следующем:

- Стабилизация мембраны клеток за счет перекрестных связей и, как следствие, фиксация мембраны клеток, которая предотвращает их гемолиз вне зависимости от

30 природы апоптотических процессов внутри клеток и их зрелости, в связи с чем фиксированные клетки не только не высвобождают внутриклеточную ДНК или РНК в процессе хранения до центрифугирования, обеспечивая сохранность концентрации нуклеиновых кислот на момент взятия крови, но и при центрифугировании за счет подфиксированной мембраны становятся устойчивее к механическим воздействиям,

35 что позволяет не только переместить все клетки крови без повреждений под гелевый барьер, получив бесклеточную плазму, но и избежать высвобождения в плазму внутриклеточных нуклеиновых кислот при центрифугировании.

- Увеличение сроков стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот в широком диапазоне температур: до 15 суток при температуре от -20°C до $+37^{\circ}\text{C}$ и до 12 месяцев

40 при температуре от -86°C до -20°C , что позволяет обеспечить хранение и транспортировку пробы, которая преимущественно представляет собой образец крови и содержит внеклеточные нуклеиновые кислоты, которые требуется сохранить, практически при любых условиях и ресурсах, имеющихся у лаборатории.

- Изобретение позволяет проводить центрифугирование с центробежным ускорением

45 уже от 2000 и до 3600g в более широких временных диапазонах от 10 до 30 минут без механической травматизации мембраны клеток, тогда как в известном уровне техники рекомендуется использовать принципиально более щадящий режим центрифугирования: 10 минут при 2000g во избежание дополнительного высвобождения нуклеиновых кислот

из клеток вследствие их травматизации. В свою очередь, более длительное центрифугирование с более высоким ускорением позволяет гарантированно изолировать остаточные клетки крови, внеклеточные структуры и клеточный дебрис, что, в свою очередь, делает возможным после отбора плазмы не проводить второй раунд центрифугирования при 13000-16000g в течение 10-20 минут непосредственно перед этапом выделения нуклеиновых кислот. Данный технический результат актуален для лабораторий с обширной приборной базой, большим потоком исследований и необходимостью сокращения среднего времени проведения работ по пробоподготовке и выделению нуклеиновых кислот.

• Изобретение позволяет проводить эффективное центрифугирование тромбоцитов без дегрануляции с одновременной адсорбцией тромбоцитов гелем, что полностью исключает высвобождение митохондриальной ДНК в плазму, планируемую к дальнейшему анализу. Это позволяет даже при минимально рекомендованном времени центрифугирования в течение 10 минут и ускорении в 2000g изолировать от плазмы все клетки, включая тромбоциты и клетки «лейкоцитной пленки», и получить бесклеточную плазму без примесей митохондриальной и апоптотической ДНК, привнесенной дополнительно из клеток после забора крови. Данный технический результат позволяет снизить требования к оборудованию до минимума и проводить центрифугирование в медицинских кабинетах / пунктах забора биоматериала с ограниченными ресурсами с использованием компактных лабораторных центрифуг.

• Более высокая концентрация внеклеточной ДНК и РНК, которая обнаруживается при выделении ДНК / РНК после центрифугирования из образцов крови в пробирках согласно изобретению с антикоагулянтом (например, ЭДТА), фиксатором клеточной мембраны и гелем по сравнению с пробирками с ЭДТА без / с разделительным гелем и специализированными пробирками для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот, в частности, с пробирками Cell-Free DNA VCT® производства компании Streck (США) с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля.

Проведенные исследования показали, что

✓ в случае ДНК - это увеличение до 2,4 / 2,4 и 1,7 раз соответственно;

✓ в случае РНК - это увеличение в среднем до 464 / 567 и 36 раз соответственно.

• Более высокая концентрация внеклеточной ДНК и РНК, которая обнаруживается при выделении ДНК / РНК после центрифугирования и 1 цикла замораживания / размораживания образца крови в пробирках согласно изобретению с антикоагулянтом (например, ЭДТА), фиксатором клеточной мембраны и гелем по сравнению с пробирками с ЭДТА без / с разделительным гелем и специализированными пробирками для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот, в частности, с пробирками RNA Complete VCT® производства компании Streck (США) с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля без циклов заморозки.

Проведенные исследования показали, что

✓ в случае ДНК - это увеличение до 2,9 / 3,0 и 2,0 раз соответственно;

✓ в случае РНК - это увеличение в среднем до 1013 / 1317 и 76 раз соответственно.

Настоящее изобретение, обеспечивающее вышеуказанный технический результат, представляет собой следующее:

1. Среда для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов,

- где биологический образец, содержащий внеклеточные нуклеиновые кислоты, которые необходимо сохранить, представляет собой кровь или плазму;

- где внеклеточные нуклеиновые кислоты представляют собой внеклеточную ДНК

или РНК;

содержащая разделительный гель

- где в качестве разделительного геля используется тиксотропный гель;

5 - где тиксотропный гель, имеет плотность в диапазоне от 1,025 до 1,065 и химически инертен по отношению к биологическим образцам;

- где тиксотропный гель обладает достаточной вязкостью, так что при центробежных силах в диапазоне от 2000 до 3600 g он будет течь и образовывать желаемый барьер между плазмой и клетками крови;

10 стабилизирующий раствор, содержащий по крайней мере 1 фиксирующий клеточную мембрану агент

- где в качестве фиксирующего клеточную мембрану агента, входящего в состав стабилизирующего раствора, используются 2-бром-2-нитропропан-1,3-диол, диметилломочевина, гидроксиметилглицинат натрия, диазолидинилмочевина, диметилдиметилломочевина, имидазолидинилмочевина, 1,3,5-трис(гидроксиэтил)-s-триазин, 15 1,3-бис(гидроксиметил)-5,5-диметилимидазолидин-2,4-дион, диметиллом-5,5-диметилгидантоин или комбинации из них;

- где фиксирующий агент высвобождает свободный альдегид и обладает свойствами консерванта,

и по крайней мере 1 антикоагулянт

20 - где в качестве антикоагулянта, входящего в состав стабилизирующего раствора, используются этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА) и ее соли, цитрат натрия, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и ее соли, фторид натрия или комбинации из них;

25 - где антикоагулянт может выполнять функцию ионного стабилизирующего и/или хелатирующего агента.

2. Среда по п. 1, где содержание фиксирующего агента преимущественно может составлять от 0,2% до 63,4% от веса всей композиции.

3. Среда по п. 1, где содержание антикоагулянта преимущественно может составлять от 0,1% до 28,3% по массе от всей композиции.

30 4. Среда по п. 1, где в состав стабилизирующего раствора не обязательно может входить гасящий агент в количестве, достаточном для реакции с любым свободным альдегидом, который может присутствовать до или после взятия образца и который образуется из фиксирующего агента с образованием продукта реакции, который не будет оказывать денатурирующее действие на белки в биологических образцах, при 35 этом содержание гасящего агента преимущественно может составлять от 0% до 7,8% от веса всей композиции,

- где в качестве гасящего агента может использоваться соединение, которое включает по крайней мере одну функциональную группу, способную реагировать с электрондефицитной функциональной группой альдегида;

40 - где в качестве гасящего агента могут использоваться этилендиамин, аминоксусная кислота, лизин, аргинин, аденин, гуанин, цитозин, тимин, триптофан, тирозин, фенилаланин, орнитин, S-аденозилметионин, аланин, аргинин, цистеин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, гистидин, лейцин, лизин, пролин, серин, треонин, гомоцистеин, никотинамид или комбинации из них.

45 5. Среда по п. 1, где в состав стабилизирующего раствора не обязательно могут входить дополнительные неионогенные стабилизирующие агенты в концентрации от 0% до 18,5% от веса всей композиции, которые растворяются в водном растворе без образования ионов и могут быть выбраны из группы полиолов (многоатомных спиртов),

таких как сахароза, лактоза, трегалоза, мелибиоза, маннитол или комбинации из них.

6. Среда по п. 1, где в состав стабилизирующего раствора не обязательно могут входить ингибиторы ферментов - нуклеаз и/или протеаз, в том числе ингибиторы ферментов метаболизма и ингибиторы фосфатаз, которые предотвращают деградацию нуклеиновых кислот и обеспечивают их стабилизацию, а также ингибиторы апоптоза, включая ингибиторы каспаз, в том числе в сочетании с N,N-диалкилпропанамидом, например, с N,N-диметилпропанамидом (DMPA), или бутанамидом, которые предотвращают апоптоз клеток по каспазависимому пути, и ингибиторы транскрипции, которые предназначены для сохранения базового уровня экспрессии РНК на момент забора крови посредством ингибирования синтеза новых РНК-транскриптов, включая мРНК, микроРНК, lncRNA, piRNA, YRNA, circRNA и других ncRNA:

- ингибиторы ферментов могут быть выбраны из следующих групп соединений: диэтилпируват, этанола, ауринтрикарбоновой кислоты (АТА), глицеральдегидов, формамида, бентонита, сульфата аммония, дитиотреитола (ДТТ), бета-меркаптоэтанола, цистеина, дитиоэритрита, трис(2-карбоксиил)фосфин гидрохлорида или комбинаций из них, но не ограничиваясь этим;

- ингибиторы ферментов метаболизма могут быть выбраны из следующих групп соединений: глицеральдегида, дигидроксиацетонфосфата, глицеральдегид-3-фосфата, 1,3-бисфосфоглицерата, 3-фосфоглицерата, 2-фосфоглицерата, фосфоенолпирувата, пируват и глицератдигидроксиацетата, оксалата калия или комбинаций из них, но не ограничиваясь этим;

- ингибиторы протеаз могут быть выбраны из следующих групп соединений: антипаина, химостатина, эластатина, фенилметилсульфонилфторида (PMSF), APMSF, TLCK, TPCK, лейпептина, соевого ингибитора трипсина, индолуксусной кислоты (IAA), E64, пепстатина, 1,10-фенантролина, фосфорамодона, амастатина, бестатина, дипротина А, дипротина В, альфа-2-макроглобулина, ингибитора панкреатической протеазы, овостатина, цистатина, ингибитора протеаз или комбинаций из них, но не ограничиваясь этим;

- ингибиторы фосфатаз могут быть выбраны из следующих групп соединений: каликулина А, нодуларина, NIPP-1, микроцистина LR, таутомицина, окадаевой (окадаиковой) кислоты, кантаридина, фостриецина, эндоталла, циклоспорина А, FK 506/иммунофилиновые комплексы, циперметрина, дельтаметрина, фенвалерата, дефостатина, mрV (pic) DMHV, ортованадата натрия или комбинаций из них, но не ограничиваясь этим;

- содержание ингибиторов ферментов - нуклеаз и/или протеаз, в том числе ингибиторов ферментов метаболизма и ингибиторов фосфатаз, преимущественно может составлять от 0% до 25,8% по массе от всей композиции.

7. Среда по п. 1, где в состав стабилизирующего раствора не обязательно могут входить в концентрации от 0% до 5,4% один или несколько агентов, повышающих проницаемость клеток, которые могут быть выбраны из следующих соединений или их комбинаций: ДМСО (диметилсульфоксида), этиленгликоля, глицерина, целлозольвов, диметилового эфира этиленгликоля, феноксиэтанола, Тритона X 100, Тритона X 705 (неионогенный детергент), 1-метил-2-пирролидинона, Tween 20, Tween 40 (неионогенный детергент), Vrij 35 (неионогенный детергент), полиоксиэтиленового эфира (Polyox), монензина, монактина, пентахлорфенола, 2,4-динитрофенола, сапонина, SDS (додецилсульфата натрия).

8. Среда по п. 1, где в состав стабилизирующего раствора не обязательно могут входить следующие вещества или их комбинации в концентрации от 0% до 6,2%:

- белки, такие как: биотин, альбумины: яичный, бычий, включая бычий сывороточный альбумин - BSA, желатин и подобные им соединения;

- дополнительные стабилизаторы нуклеиновых кислот, такие как: гуанидина гидрохлорид, поликатионы, такие как полиэтиленимин, и подобные им соединения;

5 - антиоксиданты/восстановители, такие как Тролокс, α -токоферол, никотинамид и подобные им соединения;

- красители нуклеиновых кислот, такие как: DAPI (диамидино-2-фенилиндол), пропидий йодид, флуоресцеиндиацетат и подобные соединения;

10 - антибиотики и другие дополнительные компоненты, такие как: доксициклин, сульфасалазин, куркумин, 6-аминокапроновая кислота, миноциклин, хитозан, фитиновая кислота, β -ситостерол, ц-АМФ, полилизин, биоханин А, демеклоциклин, хлортетрациклин, окситетрациклин, циклогексамид, рифампицин, соевое молоко, сурамин, N-масляная кислота, пеницилламин, N-ацетилцистеин, бензамидин, 2-аминоэтилбензилсульфонилфторид (AEBSF), включая, но не ограничиваясь этим.

15 9. Среда по п. 1, где pH стабилизирующего раствора может быть, в зависимости от сочетания входящих в его состав агентов и дополнительных компонентов, от 4 до 10, преимущественно от 6 до 8.

10. Устройство для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, содержащее среду по п. 1, которое представляет собой пробирки со средой по п. 1, 20 причем стабилизирующий раствор, содержащий фиксирующий клеточную мембрану агент, входящий в состав среды по п. 1, расположен над тиксотропным гелем и/или указанный тиксотропный гель расположен под указанным стабилизирующим раствором.

11. Устройство по п. 10, представляющее собой вакуумные пробирки, в том числе стерильные, которое может содержать вакуум, предназначенный для аспирации 25 биологического образца, при этом вакуумные пробирки предпочтительно могут обладать номинальной вместимостью 9,0 мл, 8,5 мл, 8,0 мл, 7,5 мл, 7,0 мл (типоразмер 16×100 мм), 6,0 мл, 5,5 мл, 5,0 мл (типоразмер 13×100 мм), 2,0 мл, 2,5 мл, 3,0 мл, 3,5 мл, 4,0 мл, 4,5 мл (13×75 мм), но не ограничиваясь этим.

12. Устройство по п. 10, в котором содержание разделительного геля 30 преимущественно составляет от 0,3 г до 2,5 г на пробирку, но не ограничиваясь этим.

13. Применение устройства по п. 10, содержащего среду по п. 1, для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот до 15 суток при температуре от -20°C до $+37^{\circ}\text{C}$ и до 12 месяцев при температуре от -86°C до -20°C .

14. Применение по п. 13, где применение осуществляется посредством взаимодействия 35 биологического образца, находящегося в устройстве по п. 10, с фиксирующим клеточную мембрану агентом, входящим в состав стабилизирующего раствора среды по п. 1, и разделительным гелем, который после центрифугирования в течение 10-30 минут при 2000-3600g создает разделительный барьер между надосадочной жидкостью и клетками, преимущественно плазмой и клетками крови, благодаря чему нуклеиновые кислоты в 40 образце плазмы подходят для выделения и последующего анализа, включая, но не ограничиваясь, использованием ПЦР и проведением секвенирования;

15. Применение по п. 13, где применение включает в себя взятие биологического образца с возможностью хранения и транспортировки без центрифугирования до 24 часов после взятия при температуре от $+4^{\circ}\text{C}$ до $+37^{\circ}\text{C}$ с последующим 45 центрифугированием и далее хранением и транспортировкой от 5 до 15 суток при температуре от -20°C до $+37^{\circ}\text{C}$ с возможностью после центрифугирования многократного замораживания / размораживания образца с хранением при температуре от -86°C до -20°C до 12 месяцев.

16. Применение по п. 13, где применение включает возможность хранения и транспортировки биологического образца без центрифугирования от 5 до 15 суток после взятия при температуре от +4°C до +37°C и центрифугирование непосредственно перед отбором надосадочной жидкости, преимущественно плазмы, для удаления клеток, 5
внутриклеточных структур и клеточного дебриса с получением бесклеточной плазмы.

17. Применение по п. 13, где применение включает возможность хранения и транспортировки биологического образца без центрифугирования от 5 до 15 суток после взятия при температуре от +4°C до +37°C с сохранением внеклеточных нуклеиновых кислот, а также циркулирующих клеток и/или внеклеточных структур в 10
случае необходимости.

Основным аспектом изобретения является Среда для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, содержащая разделительный тиксотропный гель, стабилизирующий раствор, включающий по крайней мере один фиксирующий клеточную мембрану агент и антикоагулянт. Фиксирующий клеточную мембрану агент 15
в предпочтительной концентрации от 0,2% до 63,4% может быть выбран из следующих групп соединений или комбинации из них: 2-бром-2-нитропропан-1,3-диола, диметилломочевины, гидроксиметилглицинат натрия, диазолидинилмочевины, диметилдиметиллом-гидантоина, имидазолидинилмочевины, 1,3,5-трис(гидроксиэтил)-s-триазина, 1,3-бис(гидроксиметил)-5,5-диметилимидазолидин-2,4-диола, диметиллом-5,5- 20
диметилгидантоина, при этом фиксирующее действие выбранных соединений преимущественно связано с их реакцией с мембранными белками, а именно с образованием ковалентных связей как внутри белков, так и между ними. Это приводит к тому, что мембрана клетки становится жесткой и, следовательно, намного лучше сопротивляется деградации и механическому воздействию, в отличие от действия 25
ингибиторов каспаз, указанных в международной заявке на патент WO2004032750A1, а также в патентах на изобретения US10724074B2 и US10144952B2, которые не химически «фиксируют» клеточную мембрану, делая ее за счет сшивки мембранных белков более жесткой, а опосредованно с помощью ингибирования каспаз предотвращают апоптоз клеток по каспазависимому пути и высвобождение внутриклеточной ДНК, а также 30
деградацию внеклеточной ДНК.

В состав стабилизирующего раствора, входящего в Среду по основному аспекту изобретения, входит по крайней мере 1 антикоагулянт

- где в качестве антикоагулянта, входящего в состав стабилизирующего раствора, используются этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА) и ее соли, цитрат натрия, 35
этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и ее соли, фторид натрия или комбинации из них;

- где антикоагулянт может выполнять функцию ионного стабилизирующего и/или хелатирующего агента.

Среда для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов по основному 40
аспекту изобретения, помимо стабилизирующего раствора, включающего по крайней мере один фиксирующий клеточную мембрану агент, который способен эффективно предотвращать высвобождение геномной ДНК из ядродержащих клеток (что дополнительно отличает данную Среду от композиции на основе тиксотропного геля по патенту US20200196594), также содержит разделительный тиксотропный гель, что 45
отличает данную Среду от композиций на основе фиксирующего клеточную мембрану агента, представленных в заявках на изобретения EP1413874A1 и WO2019/079743A1. Использование разделительного тиксотропного геля в качестве барьерной матрицы позволяет отделить клетки от плазмы и тем самым предотвратить последующее

высвобождение геномной ДНК из лизированных клеток.

Отдельно следует отметить, что в качестве разделительного геля в составе Среды для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов по основному аспекту изобретения используется тиксотропный гель преимущественно в количестве от 0,3 г до 2,5 г, включая олефиновый, полиэфирный, полиамидный гель, но не ограничиваясь ими. Помимо этого, в качестве компонентов тиксотропного геля могут использоваться полиэфиры, денатурированные коллагены, полипропилены, полисилоксаны, такие как диметилполисилоксан и этилтриэтоксисилан, углеводородные гелеобразные материалы, такие как полибутен, и их комбинации. При этом тиксотропный гель, также называемый здесь разделительным гелем, имеет плотность в приблизительном диапазоне от 1,025 до 1,065 и химически инертен по отношению к биологическим образцам, в частности, к компонентам крови, но не ограничиваясь этим.

Таким образом, предложенный состав Среды для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов по основному аспекту изобретения обеспечивает технический результат, а именно стабилизацию за счет перекрестных связей и, как следствие, фиксацию мембраны клеток, что предотвращает их гемолиз (в том числе при апоптозе). В свою очередь, при центрифугировании клетки с подфиксированной мембраной становятся устойчивее к механическим воздействиям, что позволяет не только переместить все клетки крови без повреждений под гелевый барьер, получив бесклеточную плазму, но и избежать высвобождения в плазму при центрифугировании внутриклеточных нуклеиновых кислот, в том числе геномной ДНК, которая может вносить весомый вклад в общее количество внеклеточных нуклеиновых кислот в анализируемом образце (увеличивать количество внеклеточных нуклеиновых кислот относительно того количества, которое присутствовало в образце на момент забора крови) и, как следствие, значительно снижать чувствительность проводимого анализа, например, нарушая соотношение плодовой / материнской или геномной / опухолевой ДНК. В частности, это также касается высвобождения митохондриальной ДНК из тромбоцитов, которое происходит после активации и последующей дегрануляции данных клеток. При этом активатором тромбоцитов может являться механическое воздействие, в том числе центрифугирование, при котором избыточное ускорение повышает процент активированных тромбоцитов, что сопровождается их преждевременной дегрануляцией. Наличие фиксирующего мембрану агента делает мембрану тромбоцитов более устойчивой к механическим воздействиям, предотвращая их преждевременную активацию и высвобождение внеклеточной митохондриальной ДНК.

Среда для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов по основному аспекту изобретения может также содержать дополнительные компоненты, усиливающие стабилизирующий эффект. Так, например, в состав стабилизирующего раствора, входящего в Среду по основному аспекту изобретения, не обязательно, но может входить гасящий агент в количестве, достаточном для реакции с любым свободным формальдегидом, который может образовываться из фиксирующего клеточную мембрану агента с образованием продукта реакции, который не будет оказывать денатурирующее действие на белки в биологических образцах. В свою очередь, в качестве гасящего агента может использоваться соединение, которое включает по крайней мере одну функциональную группу, способную реагировать с электрон-дефицитной функциональной группой формальдегида, которая выбрана из группы, состоящей из аминокислоты, которая реагирует с формальдегидом с образованием метилола, и/или иминное основание Шиффа и/или цис-диоловое соединение, которое реагирует с

формальдегидом с образованием циклического ацеталя, или комбинации из них, но не ограничиваясь этим.

Гасящий агент в предпочтительной концентрации от 0% до 7,8% может быть выбран из следующих соединений / групп соединений или комбинации из них, но не

5 ограничиваясь этим:

- алкиламинов, полиаминов, аминокислот, первичных аминов, вторичных аминов, солей аммония;

- этилендиамина, мочевины, глицина, лизина, аргинина, аденина, гуанина, цитозина, тимина, спермидина, триптофана, тирозина, фенилаланина, орнитина, S-
10 аденозилметионина, аспартата, глутамина, аланина, аргинина, цистеина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, гистидина, лейцина, лизина, пролина, серина, треонина, гомоцистеина, никотинамида. Также в состав стабилизирующего раствора, входящего в Среду по основному аспекту изобретения, не обязательно, но могут входить
15 дополнительные неионогенные стабилизирующие агенты, которые растворяются в водном растворе без образования ионов. Неионогенные стабилизирующие агенты в предпочтительной концентрации от 0% до 18,5% могут быть выбраны из группы полиолов (многоатомных спиртов), таких как сахароза, лактоза, трегалоза, мелибиоза, маннитол, инозитол или комбинации из них, но не ограничиваясь этим.

Также в состав стабилизирующего раствора, входящего в Среду по основному
20 аспекту изобретения, не обязательно, но могут входить агенты-разбавители в предпочтительной концентрации от 0% до 15%, включая изо- или гипертонические растворы метризамида - йодированного органического соединения, имеющего липофильный заместитель, или среды для культивирования клеток млекопитающих, которые предотвращают или обращают вспять набухание ядросодержащих клеток,
25 что, в свою очередь, увеличивает их плавучую плотность, тем самым повышая чистоту плазмы.

Дополнительно в состав стабилизирующего раствора, входящего в Среду по основному аспекту изобретения, не обязательно, но могут входить агенты-осадители геномной ДНК в предпочтительной концентрации от 0% до 34,5%, такие как
30 полиэтиленгликоль (PEG с различными молекулярными массами, которые известны в данной области техники) или другие полимеры, в том числе циклодекстрины, включая но не ограничиваясь: поливинилпирролидон (PVP с различными молекулярными массами, которые известны в данной области техники), глюконат магния, метилцеллюлоза (МС), этилцеллюлоза (ЕС), гидроксиэтилцеллюлоза (НЕС),
35 гидроксипропилцеллюлоза (НРС), декстрины (с различными молекулярными массами, которые известны в данной области), декстраны (с различным молекулярным весом), полиэтиленоксид, полиэтилоксазолин, фикоиллы (с различным молекулярным весом), α -циклодекстрин, β -циклодекстрин, γ -циклодекстрин, желатины, сахара (без ограничений), гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксиэтилметилцеллюлоза.

Также в состав стабилизирующего раствора, входящего в Среду по основному
40 аспекту изобретения, не обязательно, но могут входить в концентрации от 0% до 25,8% ингибиторы ферментов - нуклеаз и/или протеаз, в том числе ингибиторы ферментов метаболизма и ингибиторы фосфатаз, которые предотвращают деграцию нуклеиновых кислот и обеспечивают их стабилизацию, а также ингибиторы апоптоза, включая
45 ингибиторы каспаз, в том числе в сочетании с N,N-диалкилпропанамидом, например, с N,N-диметилпропанамидом (DMPA), или бутанамидом, которые предотвращают апоптоз клеток по каспазависимому пути, и ингибиторы транскрипции, которые предназначены для сохранения базового уровня экспрессии РНК на момент забора

крови посредством ингибирования синтеза новых РНК-транскриптов (включая мРНК, микроРНК, lncRNA, piRNA, YRNA, circRNA и других ncRNA).

- Ингибиторы ферментов могут быть выбраны из следующих групп соединений:

5 диэтилпирикарбоната, этанола, глицеральдегидов, фторида натрия, этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), формамида, ауринтрикарбоновой кислоты (АТА), ванадил-рибонуклеозидных комплексов, гепарина, бентонита, сульфата аммония, дитиотреитола (ДТТ), бета-меркаптоэтанола, цистеина, дитиоэритрита, гидрохлорид

10 трис(2-карбоксиэтил)фосфена или комбинации из них, но не ограничиваясь этим. - Ингибиторы ферментов метаболизма могут быть выбраны из следующих групп соединений: глицеральдегида, дигидроксиацетонфосфата, глицеральдегид-3-фосфата, 1,3-бисфосфоглицерата, 3-фосфоглицерата, 2-фосфоглицерата, фосфоенолпирувата, пируват и глицератдигидроксиацетата, фторида натрия, оксалата калия или комбинации

15 из них, но не ограничиваясь этим. - Ингибиторы протеаз могут быть выбраны из следующих групп соединений: антипаина, апротинина, химостатина, эластатиналя, фенилметилсульфонилфторида (PMSF), APMSF, TLCK, TPCK, лейпептина, соевого ингибитора трипсина, индолуксусной кислоты (IAA), E64, пепстатина, VdLPFFVdL, ЭДТА, 1,10-фенантролина, фосфорамодона, амастатина, бестатина, дипротина А, дипротина В, альфа-2-макроглобулина, ингибитора трипсина из лимской фасоли, ингибитора панкреатической

20 протеазы, овостатина яичного белка, цистатина яичного белка, соевого ингибитора протеаз или комбинации из них, но не ограничиваясь этим.

- Ингибиторы фосфатаз могут быть выбраны из следующих групп соединений: каликулина А, нодуларина, NIPP-1, микроцистина LR, таутомицина, окадаевой (окадаиковой) кислоты, кантаридина, фостриецина, эндоталла, циклоспорина А, FK

25 506/иммунофилиновые комплексы, циперметрина, дельтаметрина, фенвалерата, дефостатина, mpV (pic) DMHV, ортованадата натрия или комбинации из них, но не ограничиваясь этим.

Дополнительно в состав стабилизирующего раствора, входящего в Среду по основному аспекту изобретения, не обязательно, но могут входить в концентрации от

30 0% до 5,4% один или несколько агентов, повышающих проницаемость клеток, которые могут быть выбраны из следующих соединений или их комбинаций: ДМСО (диметилсульфоксида), этиленгликоля, глицерина, целлозольв, диметилового эфира этиленгликоля, феноксиэтанола, Тритона X 100, Тритона X 705 (неионогенный детергент), 1-метил-2-пирролидинона, Tween 20, Tween 40 (неионогенный детергент),

35 Brij 35 (неионогенный детергент), полиоксиэтиленового эфира (Polyox), монензина, монактина, пентахлорфенола, 2,4-динитрофенола, сапонины, SDS (додецилсульфата натрия).

Также стабилизирующий раствор, входящий в состав Среды по основному аспекту изобретения, не обязательно, но может содержать в концентрации от 0% до 6,2%:

40 - белки, такие как: биотин, альбумины (яичный, бычий, включая бычий сывороточный альбумин - BSA), желатин и подобные им соединения;

- дополнительные стабилизаторы нуклеиновых кислот, такие как: гуанидина гидрохлорид, поликатионы, такие как полиэтиленимин, и подобные им соединения;

- антиоксиданты/восстановители, такие как Тролокс, α -токоферол, никотинамид и

45 подобные им соединения;

- красители нуклеиновых кислот, такие как: DAPI (диамидино-2-фенилиндол), пропидий йодид, флуоресцеиндиацетат и подобные соединения;

- антибиотики и другие дополнительные компоненты, такие как: доксициклин,

сульфасалазин, куркумин, 6-аминокапроновая кислота, миноциклин, хитозан, фитиновая кислота, β -ситостерол, ц-АМФ, полилизин, биоханин А, демеклоциклин, хлортетрациклин, окситетрациклин, циклогексамид, рифампицин, соевое молоко, сурамин, N-масляная кислота, пеницилламин, N-ацетилцистеин, бензамидин, 2-аминоэтилбензилсульфонилфторид (АЕBSF), включая, но не ограничиваясь этим.

рН стабилизирующего раствора, входящий в состав Среды по основному аспекту изобретения, может быть, в зависимости от сочетания входящих в его состав агентов и дополнительных компонентов, от 4 до 10, преимущественно от 6 до 8.

Вторым аспектом изобретения является устройство для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, содержащее Среду по основному аспекту изобретения. Устройство преимущественно представляет собой вакуумные пробирки с разделительным тиксотропным гелем и стабилизирующим раствором, содержащим по крайней мере один фиксирующий клеточную мембрану агент и расположенным над разделительным гелем. Пробирки могут характеризоваться любой номинальной вместимостью и обладать любым форм-фактором, позволяющим проводить центрифугирование и/или осаждение клеток крови, в том числе совместно с геномной ДНК, или использовать другие методы концентрирования, обеспечивающие изоляцию внеклеточных нуклеиновых кислот, в том числе от циркулирующих клеток и/или внеклеточных структур.

Отдельно следует отметить, что биологический образец, содержащий нуклеиновые кислоты, которые необходимо сохранить, представляет собой биологическую жидкость. В свою очередь, биологическая жидкость преимущественно представляет собой кровь, плазму, сыворотку, мочу, слюну, стул, грудное молоко, слезы, пот, спинномозговую жидкость, синовиальную жидкость, сперму, вагинальную жидкость, асцитную жидкость, амниотическую жидкость или среды для культивирования клеток, но не ограничиваясь этим. Сбор биологической жидкости в Устройство для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов по второму аспекту изобретения может осуществляться как с помощью венепункции с использованием стандартного флеботомического оборудования для взятия цельной крови из вены, так и посредством внесения (добавления) соответствующего объема биологической жидкости в Устройство, содержащее Среду по основному аспекту изобретения. При этом нуклеиновые кислоты, которые необходимо сохранить, преимущественно находятся в плазме крови, но не ограничиваясь этим.

В свою очередь, наличие в предлагаемом к патентованию по второму аспекту изобретения Устройстве для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, содержащем Среду по основному аспекту изобретения, разделительного тиксотропного геля в сочетании с фиксирующим клеточную мембрану агентом обуславливает не только эффективное центрифугирование тромбоцитов без дегрануляции, но также и адсорбцию тромбоцитов гелем, что полностью исключает высвобождение митохондриальной ДНК в плазму, планируемую к дальнейшему анализу. Это позволяет даже при минимально рекомендованном времени центрифугирования в течение 10 минут и ускорении в 2000g изолировать от плазмы все клетки, включая тромбоциты и клетки «лейкоцитной пленки», и получить бесклеточную плазму без примесей митохондриальной и апоптотической ДНК, привнесенной дополнительно из клеток после забора крови. Данный технический результат позволяет снизить требования к оборудованию до минимума и проводить центрифугирование в медицинских кабинетах / пунктах забора биоматериала с ограниченными ресурсами с использованием компактных лабораторных центрифуг.

При этом наличие в стабилизирующем растворе предлагаемого по второму аспекту изобретения Устройства для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, содержащего Среду по основному аспекту изобретения, фиксатора клеточной мембраны позволяет проводить центрифугирование с центробежным ускорением уже от 2000 и до 3600g в более широких временных диапазонах от 10 до 30 минут без механической травматизации мембраны клеток, тогда как в случае взятия цельной крови в стабилизирующий раствор без фиксирующего клеточную мембрану компонента авторами патента US20200196594 рекомендуется использовать принципиально более щадящий режим центрифугирования: 10 минут при 2000g во избежание дополнительного высвобождения нуклеиновых кислот из клеток вследствие их травматизации. В свою очередь, более длительное центрифугирование с более высоким ускорением позволяет гарантированно изолировать остаточные клетки крови, внеклеточные структуры и клеточный дебрис, что, в свою очередь, делает возможным после отбора плазмы не проводить второй раунд центрифугирования при 13000-16000g в течение 10-20 минут непосредственно перед этапом выделения нуклеиновых кислот. Данный технический результат актуален для лабораторий с обширной приборной базой, большим потоком исследований и необходимостью сокращения среднего времени проведения работ по пробоподготовке и выделению нуклеиновых кислот.

Третьим аспектом изобретения является применение устройства согласно изобретению для стабилизации нуклеиновых кислот в течение длительного времени в широком температурном диапазоне (до 15 суток при температуре от -20°C до $+37^{\circ}\text{C}$ и до 12 месяцев при температуре от -86°C до -20°C) с использованием Среды по основному аспекту изобретения, содержащейся в Устройстве по второму аспекту изобретения для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов в лабораториях с разным уровнем оснащения.

Технический результат по третьему аспекту изобретения достигается благодаря сбалансированному составу Среды по основному аспекту изобретения, в котором реализовано сочетание разделительного геля и стабилизирующего раствора, который расположен над разделительным гелем и содержит универсальный фиксирующий клеточную мембрану агент, оказывающий стабилизирующее действие на мембрану клеток, что позволяет с использованием Устройства по второму аспекту изобретения для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, которое преимущественно представляет собой вакуумную пробирку, обеспечить хранение и транспортировку пробы, которая преимущественно представляет собой образец крови и содержит внеклеточные нуклеиновые кислоты, которые требуется сохранить, при любых условиях и ресурсах, которые имеются у лаборатории:

- возможность хранения и транспортировки биологического образца без центрифугирования до 24 часов после взятия при температуре от $+4^{\circ}\text{C}$ до $+37^{\circ}\text{C}$ с последующим центрифугированием и далее хранением и транспортировкой от 5 до 15 суток в зависимости от комбинации компонентов стабилизирующего раствора при температуре от -20°C до $+37^{\circ}\text{C}$;

- возможность после центрифугирования на любом сроке хранения биологического образца в пределах от 5 до 15 суток в зависимости от комбинации компонентов стабилизирующего раствора многократного замораживания / размораживания образца с хранением при температуре от -86°C до -20°C до 12 месяцев.

- дополнительная возможность хранения и транспортировки биологического образца без центрифугирования от 5 до 15 суток после взятия в зависимости от комбинации компонентов стабилизирующего раствора при температуре от $+4^{\circ}\text{C}$ до $+37^{\circ}\text{C}$ с

сохранением внеклеточных нуклеиновых кислот, а также циркулирующих клеток и/или внеклеточных структур в случае необходимости;

5 - дополнительная возможность хранения и транспортировки биологического образца без центрифугирования от 5 до 15 суток после взятия в зависимости от комбинации компонентов стабилизирующего раствора при температуре от +4°C до +37°C и центрифугированием непосредственно перед отбором плазмы для удаления клеток, внеклеточных структур и клеточного дебриса с получением бесклеточной плазмы.

10 В результате решается основная задача настоящего изобретения, которая состоит в создании композиции (среды) и устройства для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, содержащего данную среду, которое позволяло бы обеспечить сохранность внеклеточных нуклеиновых кислот в течение длительного времени в широком диапазоне температур, включая отрицательные, и при этом подходила бы для работы в лабораториях с любым уровнем оснащения, в том числе для медицинских кабинетов/пунктов забора биоматериала с минимальным набором оборудования:

15 - хранение и транспортировка биологических образцов после центрифугирования до 15 суток в температурном диапазоне от -86°C до +37°C с возможностью многократной заморозки/разморозки образца, что актуально для любых лабораторий в холодное время года, позволяет не зависеть от строгого соблюдения определенного температурного режима хранения, как в случае транспортировки замороженного 20 образца плазмы при отрицательных температурах или образца цельной крови при температурах +(4-37)°C, и обеспечить необходимое качество внеклеточных нуклеиновых кислот в образце, тем самым снизить вероятность повторного забора крови у пациентов, в том числе по причине гемолиза клеток;

25 - дополнительная возможность хранения и транспортировки биологических образцов без центрифугирования до 15 суток при температуре от +4°C до +37°C, что актуально для любых лабораторий в теплое время года, но особенно для кабинетов забора крови / медицинских кабинетов с ограниченными ресурсами и низким уровнем оснащения.

Осуществление изобретения

30 Нижеследующие параграфы содержат определения терминов в соответствии с данным изобретением и предназначены для единообразного применения по всему объему описания и формулы изобретения, за исключением случаев приведения более широких определений.

Используемый здесь термин «нуклеиновая кислота» включает как рибонуклеиновую кислоту (РНК), так и дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), а также включает РНК 35 и/или ДНК, которая является линейной или разветвленной, одноцепочечной или двуцепочечной или их фрагментами. В частности, нуклеиновые кислоты могут представлять собой внеклеточную ДНК, внеклеточную РНК или любую их комбинацию. Биологический образец, содержащий нуклеиновые кислоты, которые необходимо сохранить, может быть любой биологической жидкостью и, в частности, может быть 40 кровью. Более конкретно, внеклеточные нуклеиновые кислоты могут находиться в плазме.

Более подробно, нуклеиновые кислоты могут представлять собой внеклеточную ДНК или РНК от субъекта, содержащего собственную нуклеиновую кислоту, и/или субъекта, подлежащего выявлению и/или мониторингу онкологического заболевания, 45 и/или субъекта, подлежащего обнаружению и/или мониторингу нейродегенеративного заболевания, или субъекта, подлежащего обнаружению и/или мониторингу психического заболевания, мониторинга отторжения органов при трансплантации, или субъекта, который является беременным и которому требуется исследование собственной и/или

фетальной ДНК, в том числе для выявления маркеров генетических заболеваний, предрасположенности к заболеваниям, определения пола / резус-фенотипа / генетического профиля / определения отцовства во время беременности, но не ограничиваясь этим.

5 Биологические образцы могут также содержать циркулирующие клетки и/или любые внеклеточные структуры (включая эктосомы и экзосомы) субъекта, подлежащего обнаружению и/или мониторингу онкологического заболевания, но не ограничиваясь этим.

10 Термин «разделительный тиксотропный гель» означает гель, который становится более жидким в результате встряхивания или давления, то есть вязкость которого снижается в результате встряхивания или давления. Таким образом, используемый здесь термин «разделительный тиксотропный гель» относится к гелеобразному веществу, которое является густым или вязким в статических условиях, но будет течь и становиться менее вязким при встряхивании, взбалтывании, сдвиге или другом напряжении
15 (RU2667964C1). Гель создает надежный барьер между клетками крови и плазмой, что позволяет предотвратить высвобождение геномной ДНК в плазму при гемолизе клеток во время хранения и транспортировки образца). В соответствии с данным изобретением, тиксотропный гель может представлять собой олефиновый, полиэфирный, полиамидный гель (включая, но не ограничиваясь ими). В качестве компонентов тиксотропного геля
20 также могут использоваться полиэфирные, денатурированные коллагены, полипропилены, полисилоксаны, такие как диметилполисилоксан и этилтриэтоксисилан, углеводородные гелеобразные материалы, такие как полибутен, и их комбинации (включая, но не ограничиваясь ими). Тиксотропный гель или их смеси на его основе, должен быть
25 нерастворим в воде и химически инертен по отношению к компонентам крови, которые могут быть использованы в соответствии с данным изобретением.

Задача настоящего изобретения состоит в создании среды и устройства для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, содержащего данную среду, которое позволяло бы обеспечить сохранность внеклеточных нуклеиновых кислот в течение длительного времени в широком диапазоне температур и при этом подходила
30 бы для работы в лабораториях с любым уровнем оснащения, в том числе для медицинских кабинетов/пунктов забора биоматериала с минимальным набором оборудования.

В свою очередь, использование предложенных в рамках настоящей заявки основных аспектов изобретения, а именно Среды нового состава, содержащей разделительный
35 тиксотропный гель и стабилизирующий раствор, включающий по крайней мере один фиксирующий клеточную мембрану агент, а также Устройства для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, содержащего данную среду, и способов их применения для стабилизации нуклеиновых кислот позволяет снизить вероятность того, что популяция внеклеточных нуклеиновых кислот в биологическом образце будет
40 разбавлена внутриклеточными нуклеиновыми кислотами, в частности, фрагментированной геномной ДНК, происходящей из поврежденных и/или умирающих (апоптотирующих) клеток, содержащихся в исследуемом образце.

Изобретение иллюстрируется следующими частными примерами, которые подтверждают практическую возможность использования одного из вариантов
45 воплощения Среды по основному аспекту изобретения в Устройстве для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, для стабилизации биологических образцов, в данном случае образцов цельной крови, содержащих внеклеточные нуклеиновые кислоты и клетки, при центрифугировании на разных сроках хранения, а также при

транспортировке и хранении в разных температурных диапазонах.

Представленный в примерах вариант воплощения Среды содержит стабилизирующий раствор (0,1 мл на 1 мл крови) и разделительный тиксотропный гель в Устройстве для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов в диапазонах концентраций, указанных в таблице 1.

Таблица 1. Состав Среды для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов в одном из вариантов воплощения.

<i>Компонент</i>	<i>Диапазон концентраций, %</i>
Разделительный тиксотропный гель	0,3-1,8 (г)
Стабилизирующий раствор	
этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)	0,1-28,3
диметил-5,5-диметилгидантоин	0,1-28,8
диазолидинилмочевина	1,0-34,6

Разделительный тиксотропный гель - специальный инертный сепарирующий гель, который тяжелее сыворотки, но легче кровяного сгустка (клеток крови), поэтому после центрифугирования гель в виде тонкой полоски занимает промежуточное положение и служит разделительным барьером. Позволяет изолировать клетки от плазмы/сыворотки и других биологических жидкостей, что предотвращает выход из разрушающихся клеток активных ферментов в раствор вместе с дополнительной внутриклеточной ДНК и/или РНК, которые значительно ухудшают качество и снижают концентрацию первичной свободно-циркулирующей внеклеточной ДНК/РНК, присутствовавшей на момент забора биологического образца, а также увеличивают концентрацию внутриклеточной ДНК и/или РНК.

Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) - хелатирует (связывает) двухвалентные металлы в растворе (магний, кальций и др.) и тем самым инактивирует действие металл-зависимых ферментов. Предотвращает процесс свертывания крови (один из наиболее распространенных антикоагулянтов), а также ингибирует работу нуклеаз, которые являются металл-зависимыми, предотвращая тем самым расщепление/деградацию внеклеточных нуклеиновых кислот.

Диметил-5,5-диметилгидантоин, диазолидинилмочевина - консерванты широкого спектра действия, стабилизируют мембрану клетки посредством химической фиксации, а также предотвращают пророст растворов, так как обладают активностью в отношении широкого спектра грамм-отрицательных и грамм-положительных бактерий, плесени и грибов.

Дополнительно в таблице 2 приведен состав Среды для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов в других трех возможных вариантах воплощения.

Таблица 2. Состав Среды для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов в других трех возможных вариантах воплощения.

	<i>Компонент</i>	<i>Диапазон концентраций, %</i>
5	Разделительный тиксотропный гель	0,3-1,8 (г)
	Стабилизирующий раствор	
	цитрат натрия	0,1-28,3
	диметилолмочевина	1,0-34,6
10	2-бром-2-нитропропан-1,3-диол	0,2-28,8
	<i>Компонент</i>	<i>Диапазон концентраций, %</i>
15	Разделительный тиксотропный гель	0,3-1,8 (г)
	Стабилизирующий раствор	
	этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)	0,1-13,1
	этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА)	0,1-15,2
	1,3,5-трис(гидроксиэтил)-s-триазин	0,1-32,6
20	1,3-бис(гидроксиметил)-5,5-диметилимидазолидин-2,4-дион	0,2-30,8
	<i>Компонент</i>	<i>Диапазон концентраций, %</i>
25	Разделительный тиксотропный гель	0,3-1,8 (г)
	Стабилизирующий раствор	
	этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)	0,1-28,3
	диметил-диметилол-гидантоин	0,2-63,4

При этом приведенные примеры предназначены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие данное изобретение каким-либо образом.

Согласно представленному изобретению, были проанализированы все возможные комбинации состава стабилизирующего раствора, как они изложены в п. 1:

фиксатор мембран клеток

- 35 1. 2-бром-2-нитропропан-1,3-диол
2. диметилолмочевина
3. гидроксиметилглицинат натрия
4. диазолидинилмочевина
5. диметил-диметилол-гидантоин
- 40 6. имидазолидинилмочевина
7. 1,3,5-трис(гидроксиэтил)-s-триазин
8. 1,3-бис(гидроксиметил)-5,5-диметилимидазолидин-2,4-дион
9. диметил-5,5-диметилгидантоин
- антикоагулянт / ионный стабилизирующий агент
- 45 10. этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА) и ее соли
11. цитрат натрия
12. этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и ее соли
13. фторид натрия

Итого были получены и проанализированы вариации состава стабилизирующего раствора согласно таблице 3.

Таблица 3. Комбинации состава стабилизирующего раствора, проанализированные в рамках настоящего изобретения.

№ компонента	10	10-11	10-12	10-13	11	11-12	11-13	12	12-13	13
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

5

10

15

20

25

30

35

40

45

№ компонента	10	10-11	10-12	10-13	11	11-12	11-13	12	12-13	13
2-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6-7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

№ компонента	10	10-11	10-12	10-13	11	11-12	11-13	12	12-13	13
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

5 В качестве иллюстрирующего изобретение подробного примера реализации выбран состав согласно таблице 1.

Для каждой из представленных вариаций были проведены исследования, аналогичные примерам 1 и 2.

10 Во всех вариантах выявлено соответствие всех комбинаций требуемым параметрам, каждая из возможных комбинаций обеспечивает достижение заявленного технического результата.

Для всех вариантов была продемонстрирована устойчивость внеклеточной ДНК к воздействию всех испытанных климатических факторов в указанных условиях применения и способность сохранения пробы до проведения анализа.

15 Полученные данные для всех вариантов, согласно изобретению, также говорят об устойчивости внеклеточной РНК к воздействию всех испытанных климатических факторов в указанных условиях применения и способности сохранения пробы до проведения анализа.

20 При этом конструкция Устройства для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов по второму аспекту изобретения, в данном варианте воплощения изобретения представляет собой прозрачную вакуумную пробирку (ПЭТ), содержащую Среду по основному аспекту изобретения, оснащенную стоппером (бутилкаучук) и защитным колпачком (полипропилен). Стабилизирующий раствор в данном варианте воплощения изобретения расположен над разделительным гелем.
25 Конструкция в данном варианте воплощения изобретения соответствует чертежу на фиг. 1.

Пример 1. Стабилизация внеклеточной ДНК

Сбор крови

30 Взятие крови у здоровых доноров проводили на основании информированного добровольного согласия в Устройство для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов по второму аспекту изобретения, представляющее собой в данном варианте воплощения изобретения вакуумную пробирку, содержащую Среду по основному аспекту изобретения, имеющей состав как указано в таблице 1.

35 В рамках данного эксперимента образцы были предназначены для: - проверки возможности хранения и транспортировки образца без центрифугирования в течение 8 часов после взятия крови при температуре от +4°C до +37°C с последующим центрифугированием и далее хранением и транспортировкой в течение 15 суток при температуре от -20°C до +37°C;

40 - проверки возможности после центрифугирования на любом сроке хранения образца в пределах 15 суток трехкратного замораживания / размораживания образца с хранением при температуре от -86°C до -20°C в течение 6 месяцев.

Для решения этих задач было проведено взятие следующих образцов крови:

45 ○ по 2 пробирки типоразмера 16×100 от каждого донора для последующего хранения при комнатной температуре +(15-25)°C после центрифугирования - сроки проверки 0, 5, 10, 15 сутки с трехкратным замораживанием / размораживанием пробирки с образцом при температуре -86°C - образцы S1, S2;

○ по 2 пробирки типоразмера 16×100 от каждого донора для последующего хранения

в термостате суховоздушном при температуре +37°C после центрифугирования - сроки проверки 0, 5, 10, 15 сутки с трехкратным замораживанием / размораживанием пробирки с образцом при температуре -86°C - образцы S3, S4;

5 ○ по 2 пробирки типоразмера 16×100 от каждого донора для последующего хранения в холодильнике при +(4-8)°C после центрифугирования - сроки проверки 0, 5, 10, 15 сутки с трехкратным замораживанием / размораживанием пробирки с образцом при температуре -86°C - образцы S5, S6;

10 ○ по 2 пробирки типоразмера 16×100 от каждого донора для последующего хранения в морозильной камере при температуре -20°C после центрифугирования - сроки проверки 0, 5, 10, 15 сутки - образцы S7, S8.

- проверки дополнительной возможности хранения и транспортировки биологического образца без центрифугирования от 5 до 15 суток после взятия крови в зависимости от комбинации компонентов стабилизирующего раствора при температуре от +4°C до +37°C с сохранением внеклеточных нуклеиновых кислот, а также 15 циркулирующих клеток и/или внеклеточных структур в случае необходимости.

Для решения данной задачи было произведено взятие следующих образцов:

20 ○ по 2 пробирки типоразмера 16×100 от каждого донора для последующего хранения при комнатной температуре без центрифугирования - сроки проверки 0, 5, 10, 15 сутки - S9, S10 (сохранность клеток и внеклеточных структур оценивали визуально по наличию гемолиза на разных сроках хранения).

- проверки дополнительной возможности хранения и транспортировки образца без центрифугирования от 5 до 15 суток после взятия крови в зависимости от комбинации 25 компонентов стабилизирующего раствора при температуре от +4°C до +37°C и центрифугированием непосредственно перед отбором плазмы для удаления клеток, внеклеточных структур и клеточного дебриса с получением бесклеточной плазмы. Для решения этой задачи было произведено взятие следующих образцов:

30 ○ по 4 пробирки типоразмера 16×100 от каждого донора для последующего хранения при комнатной температуре с центрифугированием непосредственно перед отбором плазмы - сроки проверки 0, 5, 10, 15 сутки - S11-S14. Пробы крови отбирали в вакуумные 35 пробирки со Средой по основному аспекту изобретения процедурой венепункции стандартными двухсторонними иглами. Заполняли вакуумную пробирку до метки (квадрат черного цвета на этикетке вакуумной пробирки). Далее снимали пробирку с держателя / адаптера иглы и сразу плавно перемешивали, осторожно перевернув пробирку 10 раз (не встряхивая). Одно переворачивание пробирки - это полный поворот запястья на 180 градусов и обратно.

Подготовка плазмы

Пробы S1-S8:

40 Через 8 часов после взятия венозной крови проводили центрифугирование пробирок S1-S8 при комнатной температуре +(15-25)°C в течение 15 минут при 3000g с последующим помещением пробирок на хранение в разные температурные условия:

- при комнатной температуре: 0 и 5 сутки - S1, 10 и 15 сутки - S2;
 - в термостате суховоздушном при температуре +37°C: 0 и 5 сутки - S3, 10 и 15 сутки - S4;
 45 - в холодильнике при +(4-8)°C: 0 и 5 сутки - S5, 10 и 15 сутки - S6;
 - в морозильной камере при температуре -20°C: 0 и 5 сутки - S7, 10 и 15 сутки - S8.

Отбор и подготовку плазмы для исследования проводили на 0, 5, 10 и 15 сутки хранения следующим образом:

- осуществляли отбор $\frac{1}{2}$ объема плазмы в чистую пробирку типа Эппендорф, если в пробирках с разделительным тиксотропным гелем перед проведением тестирования на анализируемом сроке хранения находился полный объем $\approx 3-3,5$ мл плазмы (если в пробирке уже находилась $\frac{1}{2}$ объема плазмы, то отбирали весь оставшийся объем);

5 - проводили центрифугирование анализируемого образца при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 10 минут при 16000g;

- осторожно отделяли супернатант, переносили его в чистую пробирку типа Эппендорф;

10 - выполняли выделение внеклеточной ДНК из 1,5 мл плазмы в соответствии с инструкцией производителя.

В случае пробирок S7 и S8, хранившихся при -20°C , а также при анализе образцов из пробирок, подвергшихся замораживанию при -86°C , дополнительно приводили:

- размораживание пробирки при комнатной температуре;

- плавное перемешивание 4-6 раз или мягкое пипетирование;

15 ➤ далее аналогично пробиркам S1-S6 проводили отбор и подготовку плазмы с последующим выделением внеклеточной ДНК согласно инструкции производителя;

- повторное замораживание пробирки с оставшимся $\frac{1}{2}$ объемом плазмы, гелем и клетками крови при необходимости.

20 Пробы S9, S10: Стабилизированные образцы крови хранили при комнатной температуре в вертикальном положении. Отбор и подготовку плазмы для исследования проводили на 0, 5 сутки (пробирка S9) и 10, 15 сутки хранения (пробирка S10) следующим образом:

25 - осуществляли плавное перемешивание 6-8 раз и последующий отбор $\frac{1}{2}$ объема крови в вакуумную пробирку Acti-Fine® без наполнителя производства Гранат Био Тех (ОЭЗ Дубна, Россия), если в пробирке перед проведением тестирования на запланированном к проверке сроке хранения находился полный объем крови $\approx 7,5$ мл (если в пробирке уже находилась $\frac{1}{2}$ объема цельной крови, то осуществляли плавное перемешивание 6-8 раз и переносили в пробирку Acti-Fine® без наполнителя весь оставшийся объем);

30 - проводили центрифугирование отобранного образца крови в пробирках при комнатной температуре в течение 15 минут при 1600g;

- осторожно отделяли супернатант, переносили его в чистую пробирку типа Эппендорф и повторно центрифугировали для отделения клеточного дебриса при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 10 минут при 16000g;

35 - осторожно отделяли супернатант, переносили его в чистую пробирку типа Эппендорф;

- выполняли выделение внеклеточной ДНК согласно инструкции производителя.

Пробы S11-S14:

40 Стабилизированные образцы крови хранили при комнатной температуре в вертикальном положении. Отбор и подготовку плазмы для исследования проводили на 0, 5, 10 и 15 сутки хранения (пробирки S11, S12, S13 и S14 соответственно) следующим образом:

- непосредственно перед отбором плазмы проводили центрифугирование пробирок при комнатной температуре $+(15-25)^{\circ}\text{C}$ в течение 15 минут при 3000g;

45 - осуществляли отбор 1,5-2 мл плазмы в чистую пробирку типа Эппендорф;

- проводили центрифугирование анализируемого образца в пробирках при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 10 минут при 16000g;

- осторожно отделяли супернатант, переносили его в чистую пробирку типа

Эппендорф;

- выполняли выделение внеклеточной ДНК согласно инструкции производителя.

Примеры фотографий пробирок со средой по основному аспекту изобретения до и после центрифугирования приведены на фиг. 2.

5 Выделение внеклеточной ДНК

Выделение внеклеточной ДНК из плазмы проводили с использованием набора «MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit» (ThermoFisher Scientific, США). Выделение производилось по протоколу №2 без добавления протеинкиназы. Набор включает в себя буферные растворы и магнитные частицы, с которыми связываются молекулы
10 внеклеточной ДНК. На первом этапе образец плазмы в объеме 1,5 мл помещали в пробирки типа Фалькон объемом 15 мл. В каждую пробирку добавляли по 2,53 мл заранее приготовленного раствора, содержащего Лизирующий/Связывающий буфер и магнитные частицы, которые предварительно были перемешаны на центрифуге мини-вортекс «Микроспин» FV-2400 (Biosan, Латвия). Аккуратно переворачивали пробирки
15 10 раз и далее все пробирки интенсивно взбалтывали на вортексе в течение 10 минут (этот шаг необходим для связывания внеклеточной ДНК с магнитными частицами). Далее пробирки устанавливали инкубировали в магнитном штативе в течение 5 минут и после этого удаляли прозрачную надосадочную жидкость, в то время как магнитные частицы оставались на стенках пробирок.

20 Следующие этапы включали в себя промывку магнитных частиц специальным промывочным буфером (MagMAX™ Cell Free DNA Wash Solution). Для этого 1 мл буфера добавляли к магнитным частицам и перемешивали содержимое пробирок на вортексе в течение 30 секунд. Образовавшийся раствор, содержащий промывочный буфер и магнитные частицы, переносили в пробирки типа Эппендорф объемом 2 мл.

25 Данные пробирки устанавливали на магнитный штатив для 2 мл пробирок и далее оставляли на 3 минуты до тех пор, пока буфер не становился прозрачным и магнитные частицы полностью не собирались на стенках пробирки. После этого буфер аспирировали.

Второй этап промывки включал себя повтор первого: 1 мл промывочного буфера
30 добавляли к магнитным частицам -> перемешивали содержимое на вортексе в течение 30 секунд -> возвращали пробирки на магнитный штатив -> проводили аспирацию буфера.

Следующие 2 этапа промывки включали в себя использование свежеприготовленного 70%-го этанола. Для этого 1 мл 70%-го этанола добавляли в 2 мл пробирки типа
35 Эппендорф -> перемешивали содержимое на вортексе в течение 30 секунд -> возвращали пробирки на магнитный штатив -> проводили аспирацию этанола -> данный этап проводили 2 раза.

Далее магнитные частицы высушивали от остаточного этанола в течение 2-3 минут и добавляли 15 мкл буфера для элюции внеклеточной ДНК. При этом для эффективного
40 перевода ДНК в буферный раствор после добавления буфера для элюции к магнитным частицам содержимое пробирок пипетировали и оставляли в термошейкере для микропробирок и ПЦР планшетов TS-100 (Biosan, Латвия) на максимальной скорости в течение пяти минут. Далее пробирки снова устанавливали в магнитный штатив, пока
45 жидкость не становилась прозрачной, а все магнитные частицы не собирались на боковых стенках пробирок. Жидкость, содержащую элюированную ДНК, аккуратно отбирали и переносили в новую пробирку типа Эппендорф (DNA LoBind) объемом 0,5 мл.

Оценка стабилизирующего действия одного из вариантов воплощения Среды для

сбора, хранения и транспортировки биологических образцов с помощью Tape Station 2200

Для оценки эффективности стабилизирующего действия одного из вариантов воплощения Среды (согласно таблице 1) по основному аспекту изобретения в Устройстве для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, а именно способности стабилизировать внеклеточные нуклеиновые кислоты и клетки биологический образец, в данном случае образец цельной крови, было проведено качественное определение наличия внеклеточной ДНК в пробирках S1-S14 от разных доноров без/с центрифугированием на разных сроках хранения, а также при транспортировке и хранении в разных температурных диапазонах. Качественное определение наличия внеклеточной ДНК проводили методом капиллярного электрофореза на оборудовании TapeStation 2200 (Agilent, США) с использованием готовых наборов реагентов в соответствии с инструкцией по применению предприятия-изготовителя. Определение внеклеточной ДНК проводили по наличию характерных пиков флуоресценции на электрофореграмме, при этом флуоресцентные пики должны были соответствовать требованиям таблицы 4.

Таблица 4. Требования к внеклеточной ДНК, полученной из образцов цельной крови до и/или после центрифугирования на разных сроках хранения, а также при транспортировке и хранении в разных температурных диапазонах.

Характеристика	День сравнения в течение срока хранения образца крови			
	0	5	10	15
Наличие пика флуоресценции в диапазоне длин фрагментов 150-250 п.н. (пар нуклеотидов), характерных для внеклеточной ДНК	+	+	+	+
Изменение интенсивности (высоты) пика флуоресценции, характерной для внеклеточной ДНК, на разных сроках хранения относительно 0 срока хранения (день забора венозной крови в вакуумные пробирки посредством венопункции – 0 день сравнения)	-	в диапазоне от 0,25 до 4 раз	в диапазоне от 0,25 до 4 раз	в диапазоне от 0,25 до 4 раз

В свою очередь, оценку наличия и определение длины фрагментов выделенной из плазмы внеклеточной ДНК методом капиллярного электрофореза проводили с использованием набора D1000 ScreenTape System и предварительной пробоподготовкой образцов согласно следующей методике. В пробирки на 0,2 мл в формате стрипов, состоящих из 8 пробирок с отдельно прикрепленными стрипованными плоскими крышками, вносили по 2 мкл буфера (D1000 Sample Buffer) в каждую пробирку. Далее, в первую пробирку вносили 2 мкл маркера длины фрагментов ДНК (D1000 Sample Ladder), а в остальные пробирки - образцы внеклеточной ДНК в количестве примерно 0,5-1 нг на каждую лунку, при этом объем внесенного образца составлял 2 мкл. Концентрацию внеклеточной ДНК предварительно измеряли с помощью флуориметра Qubit 4.0 (ThermoFisher Scientific, США) с использованием набора High Sensitivity dsDNA

по протоколу, рекомендованному производителем. Общий объем содержимого каждой пробирки был равен 4 мкл. Пробирки в стрипах по 2 штуки загружали в автоматическую систему TapeStation 2200 вместе с наконечниками для дозирования и специальным чипом для проведения капиллярного электрофореза, и далее запускали программу для получения и анализа результатов. Примеры полученных с помощью TapeStation 2200 результатов приведены на фиг. 3-5.

Дополнительные примеры результатов тестирования одного из вариантов воплощения Среды по основному аспекту изобретения в Устройстве для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, на ее способность стабилизировать внеклеточную ДНК в образцах цельной крови без/с центрифугированием на разных сроках хранения в разных температурных диапазонах приведены в таблицах 5 и 6.

В результате проведенного тестирования одного из вариантов воплощения Среды по основному аспекту изобретения, содержащей стабилизирующий раствор и разделительный тиксотропный гель в Устройстве для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов в диапазонах концентраций, указанных в таблице 1, была продемонстрирована устойчивость внеклеточной ДНК к воздействию всех испытанных климатических факторов в указанных условиях применения и способность сохранения пробы до проведения анализа.

Для всех вариантов среды, проводились аналогичные испытания. Во всех вариантах составов среды была продемонстрирована устойчивость внеклеточной ДНК к воздействию всех испытанных климатических факторов в указанных условиях применения и способность сохранения пробы до проведения анализа.

В случае внеклеточной ДНК все приведенные комбинации были проверены на соответствие параметрам, указанным в таблице 4.

Таблица 5. Результаты проверки сохранности внеклеточной ДНК для образцов, которые были подвергнуты центрифугированию через 8 часов после взятия крови и далее хранение которых осуществлялось в течение 15 суток при температурах +4°C, +(15-25)°C и +37°C с трехкратным замораживанием / размораживанием образцов при температуре -86°C.

№ донора	Требование таблицы 4		День сравнения в течение срока хранения образца крови при температуре:						Вывод
			+4°C		+(15-25)°C		+37°C		
	Характеристика	0 (S1)	15 (S2)	0 (S3)	15 (S4)	0 (S5)	15 (S6)		
1	Наличие пика флуоресценции в указанном диапазоне	150-250 п.н.	+	+	+	+	+	+	Соответствует
	Изменение интенсивности (высоты) пика флуоресценции, характерной для внеклеточной ДНК, на разных сроках хранения относительно 0 срока хранения (день забора венозной крови в вакуумные пробирки посредством венепункции – 0 день сравнения)	в диапазоне от 0,25 до 4 раз	-	0,94	-	0,91	-	0,83	Соответствует
2	Наличие пика флуоресценции в указанном диапазоне	150-250 п.н.	+	+	+	+	+	+	Соответствует
	Изменение интенсивности (высоты) пика флуоресценции, характерной для внеклеточной ДНК, на разных сроках хранения относительно 0 срока хранения (день забора венозной крови в вакуумные пробирки посредством венепункции – 0 день сравнения)	в диапазоне от 0,25 до 4 раз	-	0,87	-	0,84	-	0,76	Соответствует
3	Наличие пика флуоресценции в указанном диапазоне	150-250 п.н.	+	+	+	+	+	+	Соответствует
	Изменение интенсивности (высоты) пика флуоресценции, характерной для внеклеточной ДНК, на разных сроках хранения относительно 0 срока хранения (день забора венозной крови в вакуумные пробирки посредством венепункции – 0 день сравнения)	в диапазоне от 0,25 до 4 раз	-	0,95	-	0,88	-	0,75	Соответствует

№ донора	Требование таблицы 4		День сравнения в течение срока хранения образца крови при температуре:						Вывод	
			+4°C		+(15-25)°C		+37°C			
	Характеристика		0 (S1)	15 (S2)	0 (S3)	15 (S4)	0 (S5)	15 (S6)		
5	Наличие пика флуоресценции в указанном диапазоне		150-250 п.н.	+	+	+	+	+	+	Соответствует
	Изменение интенсивности (высоты) пика флуоресценции, характерной для внеклеточной ДНК, на разных сроках хранения относительно 0 срока хранения (день забора венозной крови в вакуумные пробирки посредством венепункции – 0 день сравнения)		в диапазоне от 0,25 до 4 раз	-	1,00	-	0,82	-	0,87	Соответствует
10	Наличие пика флуоресценции в указанном диапазоне		150-250 п.н.	+	+	+	+	+	+	Соответствует
	Изменение интенсивности (высоты) пика флуоресценции, характерной для внеклеточной ДНК, на разных сроках хранения относительно 0 срока хранения (день забора венозной крови в вакуумные пробирки посредством венепункции – 0 день сравнения)		в диапазоне от 0,25 до 4 раз	-	0,90	-	0,89	-	0,85	Соответствует

15 Таблица 6. Результаты проверки сохранности внеклеточной ДНК для образцов, которые были подвергнуты центрифугированию через **8 часов** после взятия крови и далее хранение которых осуществлялось в течение **15 суток** при температуре -20°C, а также образцов, хранение которых осуществлялось в течение **15 суток** после взятия крови при комнатной температуре +(15-25)°C без центрифугирования или с центрифугированием непосредственно перед отбором плазмы.

№ донора	Требование таблицы 4		День сравнения в течение срока хранения образца крови:						Вывод	
			Температура хранения образца крови: -20°C	Температура хранения образца крови: +(15-25)°C						
	Характеристика			0 (S7)	15 (S8)	Без центрифугирования		С центрифугированием непосредственно перед отбором плазмы		
20	Наличие пика флуоресценции в указанном диапазоне		150-250 п.н.	+	+	+	+	+	+	Соответствует
	Изменение интенсивности (высоты) пика флуоресценции, характерной для внеклеточной ДНК, на разных сроках хранения относительно 0 срока хранения (день забора венозной крови в вакуумные пробирки посредством венепункции – 0 день сравнения)		в диапазоне от 0,25 до 4 раз	-	0,97	-	0,86	-	0,85	Соответствует
25	Наличие пика флуоресценции в указанном диапазоне		150-250 п.н.	+	+	+	+	+	+	Соответствует
	Изменение интенсивности (высоты) пика флуоресценции, характерной для внеклеточной ДНК, на разных сроках хранения относительно 0 срока хранения (день забора венозной крови в вакуумные пробирки посредством венепункции – 0 день сравнения)		в диапазоне от 0,25 до 4 раз	-	1,03	-	0,93	-	0,92	Соответствует
30	Наличие пика флуоресценции в указанном диапазоне		150-250 п.н.	+	+	+	+	+	+	Соответствует
	Изменение интенсивности (высоты) пика флуоресценции, характерной для внеклеточной ДНК, на разных сроках хранения относительно 0 срока хранения (день забора венозной крови в вакуумные пробирки посредством венепункции – 0 день сравнения)		в диапазоне от 0,25 до 4 раз	-	1,03	-	0,93	-	0,92	Соответствует

№ донора	Требование таблицы 4	День сравнения в течение срока хранения образца крови:						Вывод	
		Температура хранения образца крови: -20°C		Температура хранения образца крови: +(15-25)°C					
				Без центрифугирования		С центрифугированием непосредственно перед отбором плазмы			
Характеристика		0 (S7)	15 (S8)	0 (S9)	15 (S10)	0 (S11)	15 (S14)		
	пробирки посредством венепункции – 0 день сравнения)								
5									
10	Наличие пика флуоресценции в указанном диапазоне	150-250 п.н.	+	+	+	+	+	+	Соответствует
	Изменение интенсивности (высоты) пика флуоресценции, характерной для внеклеточной ДНК, на разных сроках хранения относительно 0 срока хранения (день забора венозной крови в вакуумные пробирки посредством венепункции – 0 день сравнения)	в диапазоне от 0,25 до 4 раз	-	0,99	-	0,92	-	0,90	Соответствует
15	Наличие пика флуоресценции в указанном диапазоне	150-250 п.н.	+	+	+	+	+	+	Соответствует
	Изменение интенсивности (высоты) пика флуоресценции, характерной для внеклеточной ДНК, на разных сроках хранения относительно 0 срока хранения (день забора венозной крови в вакуумные пробирки посредством венепункции – 0 день сравнения)	в диапазоне от 0,25 до 4 раз	-	0,96	-	0,91	-	0,92	Соответствует
20									

№ донора	Требование таблицы 4	День сравнения в течение срока хранения образца крови:						Вывод	
		Температура хранения образца крови: -20°C		Температура хранения образца крови: +(15-25)°C					
				Без центрифугирования		С центрифугированием непосредственно перед отбором плазмы			
Характеристика		0 (S7)	15 (S8)	0 (S9)	15 (S10)	0 (S11)	15 (S14)		
	Наличие пика флуоресценции в указанном диапазоне	150-250 п.н.	+	+	+	+	+	+	Соответствует
25									
30	Наличие пика флуоресценции в указанном диапазоне	150-250 п.н.	+	+	+	+	+	+	Соответствует
	Изменение интенсивности (высоты) пика флуоресценции, характерной для внеклеточной ДНК, на разных сроках хранения относительно 0 срока хранения (день забора венозной крови в вакуумные пробирки посредством венепункции – 0 день сравнения)	в диапазоне от 0,25 до 4 раз	-	0,95	-	0,88	-	0,84	Соответствует

Пример 2. Стабилизация внеклеточной РНК

35 Сбор крови

Взятие крови у здоровых доноров проводили на основании информированного добровольного согласия в Устройство для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов по второму аспекту изобретения, представляющее собой в данном варианте воплощения изобретения вакуумную пробирку, содержащую Среду по основному аспекту изобретения, имеющей состав согласно таблице 1.

В рамках данного эксперимента образцы были предназначены для:

40 - проверки возможности хранения и транспортировки образца без центрифугирования в течение 8 часов после взятия крови при температуре от +4°C до +37°C с последующим центрифугированием и далее хранением и транспортировкой в течение 15 суток при

45 температуре от -20°C до +37°C;

- проверки возможности после центрифугирования на любом сроке хранения образца в пределах 15 суток трехкратного замораживания / размораживания образца с хранением при температуре от -86°C до -20°C в течение 6 месяцев.

Для решения этих задач было проведено взятие следующих образцов крови:

○ по 2 пробирки типоразмера 16×100 от каждого донора для последующего хранения при комнатной температуре +(15-25)°С после центрифугирования - сроки проверки 0, 4, 7, 10, 15 сутки с трехкратным замораживанием / размораживанием пробирки с образцом при температуре -86°С - образцы S15, S16;

○ по 2 пробирки типоразмера 16×100 от каждого донора для последующего хранения в термостате суховоздушном при температуре +37°С после центрифугирования - сроки проверки 0, 4, 7, 10, 15 сутки с трехкратным замораживанием / размораживанием пробирки с образцом при температуре -86°С - образцы S17, S18;

○ по 2 пробирки типоразмера 16×100 от каждого донора для последующего хранения в холодильнике при +(4-8)°С после центрифугирования - сроки проверки 0, 4, 7, 10, 15 сутки с трехкратным замораживанием / размораживанием пробирки с образцом при температуре -86°С - образцы S19, 20;

○ по 2 пробирки типоразмера 16×100 от каждого донора для последующего хранения в морозильной камере при температуре -20°С после центрифугирования - сроки проверки 0, 4, 7, 10, 15 сутки - образцы S21, S22;

- проверки дополнительной возможности хранения и транспортировки биологического образца без центрифугирования от 5 до 15 суток после взятия крови в зависимости от комбинации компонентов стабилизирующего раствора при температуре от +4°С до +37°С с сохранением внеклеточных нуклеиновых кислот, а также циркулирующих клеток и/или внеклеточных структур в случае необходимости;

Для решения данной задачи было произведено взятие следующих образцов:

○ по 2 пробирки типоразмера 16×100 от каждого донора для последующего хранения при комнатной температуре без центрифугирования - сроки проверки 0, 4, 7, 10, 15 сутки - S23, S24 (сохранность клеток и внеклеточных структур оценивали визуально по наличию гемолиза на разных сроках хранения).

- проверки дополнительной возможности хранения и транспортировки образца без центрифугирования от 5 до 15 суток после взятия крови в зависимости от комбинации компонентов стабилизирующего раствора при температуре от +4°С до +37°С и центрифугированием непосредственно перед отбором плазмы для удаления клеток, внеклеточных структур и клеточного дебриса с получением бесклеточной плазмы. Для решения этой задачи было произведено взятие следующих образцов:

○ по 4 пробирки типоразмера 16×100 от каждого донора для последующего хранения при комнатной температуре с центрифугированием непосредственно перед отбором плазмы - сроки проверки 0, 4, 7, 10, 15 сутки - S25-S29.

Пробы крови отбирали в вакуумные пробирки со Средой по основному аспекту изобретения состава согласно таблице 1 процедурой венепункции стандартными двухсторонними иглами. Заполняли вакуумную пробирку до метки (квадрат черного цвета на этикетке вакуумной пробирки). Далее снимали пробирку с держателя / адаптера иглы и сразу плавно перемешивали, осторожно перевернув пробирку 10 раз (не встряхивая). Одно переворачивание пробирки - это полный поворот запястья на 180 градусов и обратно.

Дополнительно у каждого донора проводили взятие образца крови в вакуумные пробирки BD Vacutainer® Plus с ЭДТА в качестве дополнительного контроля на 0 сутки хранения. Пробирки с ЭДТА и биологическими образцами хранили на льду и проводили все манипуляции с ними в течение 1 часа после забора крови. Фракционирование цельной крови в пробирках с ЭДТА, а именно получение свободной от клеточных элементов

плазмы, проводили путем центрифугирования при комнатной температуре в течение 20 минут на низких оборотах (900g), поскольку центрифугирование крови на высоких оборотах неизбежно ведет к разрушению части клеток и попаданию содержащихся в них нуклеиновых кислот в плазму. Плазму, свободную от форменных элементов, осторожно отбирали и сразу использовали для выделения РНК. В свою очередь, вакуумные пробирки со Средой по основному аспекту изобретения и биологическим образцом подвергались центрифугированию при более высоких оборотах (3000g) благодаря наличию в составе стабилизирующего раствора фиксирующего клеточную мембрану агента, который предотвращает разрушение клеток и высвобождение из них внутриклеточной РНК.

Подготовка плазмы

Пробы S15-S22:

Через 8 часов после взятия венозной крови проводили центрифугирование пробирок S15-S22 при комнатной температуре $+(15-25)^{\circ}\text{C}$ в течение 15 минут при 3000g с последующим помещением пробирок на хранение в разные температурные условия:

- при комнатной температуре: 0, 4, 7 сутки - S15; 10, 15 сутки - S16;
- в термостате суховоздушном при температуре $+37^{\circ}\text{C}$: 0, 4, 7 сутки - S17; 10, 15 сутки - S18;
- в холодильнике при $+(4-8)^{\circ}\text{C}$: 0, 4, 7 сутки - S19; 10, 15 сутки - S20;
- в морозильной камере при температуре -20°C : 0, 4, 7 сутки - S21; 10, 15 сутки - S22.

Отбор и подготовку плазмы для исследования проводили на 0, 4, 7, 10 и 15 сутки хранения следующим образом:

- осуществляли отбор 1 мл плазмы в чистую пробирку типа Эппендорф;
- проводили центрифугирование анализируемого образца при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 10 минут при 16000g;
- осторожно отделяли супернатант, переносили его в чистую пробирку типа Эппендорф;
- выполняли выделение внеклеточной РНК согласно инструкции производителя. В случае пробирок S21 и S22, хранившихся при -20°C , а также при анализе образцов из пробирок, подвергшихся замораживанию при -86°C , дополнительно приводили:
- размораживание пробирки при комнатной температуре;
- плавное перемешивание 4-6 раз или мягкое пипетирование;
- далее аналогично пробиркам S15-S20 проводили отбор и подготовку плазмы с последующим выделением внеклеточной РНК согласно инструкции производителя;
- повторное замораживание пробирки с оставшимся $\frac{1}{2}$ объемом плазмы, гелем и клетками крови при необходимости.

Пробы S23, S24:

Стабилизированные образцы крови хранили при комнатной температуре в вертикальном положении. Отбор и подготовку плазмы для исследования проводили на 0,4, 7 сутки (пробирка S23) и 10, 15 сутки хранения (пробирка S24) следующим образом:

- осуществляли плавное перемешивание 6-8 раз и последующий отбор 2,5 мл крови в вакуумную пробирку Acti-Fine® без наполнителя производства Гранат Био Тех (ОЭЗ Дубна, Россия);
- проводили центрифугирование отобранного образца крови в пробирках при комнатной температуре в течение 15 минут при 1800g;
- осторожно отделяли супернатант, переносили его в чистую пробирку типа Эппендорф и повторно центрифугировали для отделения клеточного дебриса при

температуре +4°C в течение 10 минут при 16000g;

- осторожно отделяли супернатант, переносили его в чистую пробирку типа Эппендорф;

- выполняли выделение внеклеточной РНК согласно инструкции производителя.

5 Пробы S25-S29:

Стабилизированные образцы крови хранили при комнатной температуре в вертикальном положении. Отбор и подготовку плазмы для исследования проводили на 0, 4, 7, 10 и 15 сутки хранения (пробирки S25, S26, S27, S28 и S29 соответственно) следующим образом:

10 - непосредственно перед отбором плазмы проводили центрифугирование пробирок при комнатной температуре +(15-25)°C в течение 15 минут при 3000g;

- осуществляли отбор 1 мл плазмы в чистую пробирку типа Эппендорф;

- проводили центрифугирование анализируемого образца в пробирках при температуре +4°C в течение 10 минут при 16000g;

15 - осторожно отделяли супернатант, переносили его в чистую пробирку типа Эппендорф;

- выполняли выделение внеклеточной РНК согласно инструкции производителя.

Выделение РНК

20 Выделение РНК из плазмы для дальнейшей постановки реакции обратной транскрипции проводили с использованием набора «Проба-НК» (ООО «ДНК-Технология», Россия) в трех повторах. В заранее промаркированные пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл вносили по 300 мкл лизирующего раствора, не касаясь края пробирки. Далее в пробирки добавляли по 100 мкл исследуемых образцов плазмы, плотно закрывали крышки пробирок и встряхивали на вортексе в течение 3-5 сек. Далее

25 проводили термостатирование пробирок при температуре 65°C в течение 15 минут и осаждали конденсат центрифугированием при 13000 об/мин в течение 30 сек при комнатной температуре.

После этого добавляли в каждую пробирку по 400 мкл реагента для преципитации, встряхивали на вортексе в течение 3-5 сек, и центрифугировали пробирки при 13000 об/

30 мин в течение 15 минут при комнатной температуре. Не задевая осадок, полностью удаляли надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, добавляли к осадку по 500 мкл промывочного раствора №1, закрывали крышки пробирок и перемешивали, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки. Далее проводили центрифугирование пробирок при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной

35 температуре. Не задевая осадок, полностью удаляли надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником, добавляли к осадку по 300 мкл промывочного раствора №2, закрывали крышки пробирок и перемешивали, 3-5 раз аккуратно перевернув пробирки. Далее проводили центрифугирование пробирок при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. Не задевая осадок, полностью удаляли

40 надосадочную жидкость из каждой пробирки отдельным наконечником и высушивали осадок при температуре 65°C в течение 5 мин в пробирках с открытыми крышками.

После этого добавляли к осадку 16,5 мкл буфера для растворения, встряхивали пробирки на вортексе в течение 3-5 сек и осаждали капли центрифугированием пробирок в течение 3-5 сек. Полученные препараты РНК сразу использовали для постановки

45 реакции обратной транскрипции.

Постановка реакции обратной транскрипции (получение кДНК)

В ходе обратной транскрипции РНК получали кДНК, обладающую значительно большей стабильностью, что позволяло в дальнейшем хранить образцы или проводить

их анализ без существенной деградации нуклеиновых кислот в течение длительного времени.

Для проведения реакции обратной транскрипции проводили маркировку пробирок типа Эппендорф объемом 0,5 мл, а также размораживали содержимое пробирок «ОТ-буфер» и «Праймеры ОТ-RANDOM+дНТФ» из комплекта реагентов для обратной транскрипции (ООО «ДНК-Технология», Россия) при комнатной температуре, затем встряхивали пробирки в течение 3-5 сек и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3-5 сек на микроцентрифуге-вортексе «Микроспин» FV-2400 (Biosan, Латвия). В отдельной пробирке готовили ОТ-смесь для постановки реакции обратной транскрипции путем смешивания $2,0 \times (N+1)$ мкл ОТ-буфера, $1,0 \times (N+1)$ мкл праймеров ОТ-RANDOM+дНТФ, $0,5 \times (N+1)$ мкл обратной транскриптазы, где N - количество анализируемых образцов (N) с запасом на 1 образец. Далее в предварительно промаркированные пробирки вносили по 3,5 мкл ОТ-смеси, добавляли по 16,5 мкл выделенных образцов РНК, встряхивали на вортексе в течение 3-5 сек и осаждали капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3-5 сек.

После этого пробирки помещали в термостат и инкубировали при температуре $+40^\circ\text{C}$ в течение 30 минут, затем при температуре $+95^\circ\text{C}$ в течение 5 минут. Далее для осаждения конденсата проводили центрифугирование при 13000 об/мин в течение 30 сек и добавляли к полученной кДНК по 35 мкл буфера для растворения из комплекта для выделения нуклеиновых кислот. Пробирки встряхивали на вортексе в течение 3-5 сек и осаждали капли центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3-5 сек. Полученные образцы кДНК использовали как матрицу для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени.

Постановка ПЦР в реальном времени

Полученные в результате обратной транскрипции образцы кДНК использовали для оценки уровня экспрессии гена домашнего хозяйства - бета-2-микроглобулина (b2M) методом ПЦР в режиме реального времени. Количественную ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием готовой ПЦР-системы iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США). Реакционная смесь для ПЦР общим объемом 25 мкл содержала 12,5 мкл двухкратного iQ SYBR Green Supermix («Bio-Rad», США), по 5 пмоль прямого (5'-CGTACTCCAAAGATTCAGGTT-3') и обратного (5'-TGCTGCTTACATGTCTCGAT-3') праймеров к участкам, присутствующим в транскрипте гена b2M, последовательности и оптимальные условия амплификации которых была получены из данных литературы [8], 5 мкл воды без нуклеаз («Thermo Scientific», США) и по 5 мкл кДНК на одну реакцию. ПЦР проводили при помощи амплификатора «ДТ-Прайм» (ООО «ДНК-технология», Россия) при следующих условиях: 1) 95°C , 5 мин; 2) 90°C , 10 с; 3) 64°C , 15 с; 4) 72°C , 20 с (45 циклов 2 \rightarrow 4). Детекцию флуоресценции проводили при 72°C в конце каждого цикла. Кривые накопления флуоресцентного сигнала анализировали по каналу FAM. Для каждого образца были выполнены три технических повтора ПЦР, при этом полученные результаты представляли собой средний пороговый цикл (Ct) прохождения реакции с определенными стандартными отклонениями (SD). Анализ полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения используемого амплификатора. Дополнительно определяли значение $\Delta\text{Ct}=\text{Ct}^{\text{ЭДТА}}$ (средний пороговый цикл образца кДНК, полученного с использованием вакуумных пробирок BD Vacutainer® Plus с ЭДТА на 0 сутки хранения) - $\text{Ct}^{\text{образца}}$ (средний пороговый цикл исследуемого образца кДНК, полученного с использованием одного из вариантов воплощения Среды по основному аспекту изобретения в Устройстве для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, на разных сроках хранения в разных температурных условиях).

По результатам оценки средних значений экспрессии гена b2M делали заключение о сохранности образцов внеклеточной РНК.

Примеры результатов тестирования одного из вариантов воплощения Среды по основному аспекту изобретения согласно таблице 1 в Устройстве для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, на ее способность стабилизировать внеклеточную РНК в образцах цельной крови без/с центрифугированием на разных сроках хранения в разных температурных диапазонах приведены в таблицах 7 и 8.

Таблица 7. Результаты проверки сохранности внеклеточной РНК для образцов, которые были подвергнуты центрифугированию через **8 часов** после взятия крови и далее хранение которых осуществлялось в течение **15 суток** при температурах $+4^{\circ}\text{C}$, $+(15-25)^{\circ}\text{C}$ и $+37^{\circ}\text{C}$ с трехкратным замораживанием / размораживанием образцов при температуре -86°C .

№ донора	хар-ка	0 сутки (ЭДТА)	День сравнения в течение срока хранения образца крови при температуре хранения образца:								
			$+4^{\circ}\text{C}$			$+(15-25)^{\circ}\text{C}$			$+37^{\circ}\text{C}$		
			0 (S15)	7 (S15)	15 (S16)	0 (S17)	7 (S17)	15 (S18)	0 (S19)	7 (S19)	15 (S20)
1	Ct	37,9	28,6	29,8	32,5	28,4	30,1	33,7	28,5	30,6	34,5
	SD	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4	0,5	0,2	0,3	0,5
	ΔCt	0,0	9,3	8,1	4,4	9,5	7,8	4,2	9,4	7,3	3,4
2	Ct	37,2	28,4	30,1	32,8	28,6	30,5	33,2	28,3	31,0	33,9
	SD	0,4	0,3	0,5	0,4	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,5
	ΔCt	0,0	8,8	7,1	4,4	8,6	6,7	4	8,9	6,2	3,3
3	Ct	36,8	27,9	29,6	32,4	28,3	30,1	32,6	28,0	30,8	33,2
	SD	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5
	ΔCt	0,0	8,9	7,2	4,4	8,5	6,7	4,2	8,8	6	3,6
4	Ct	37,0	28,2	29,9	32,2	28,6	30,5	32,9	28,3	30,8	33,8
	SD	0,4	0,5	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,5	0,4	0,5
	ΔCt	0,0	8,8	7,1	4,8	8,4	6,5	4,1	8,7	6,2	3,2
5	Ct	37,4	28,0	30,1	32,5	27,8	29,8	32,7	28,5	30,8	33,4
	SD	0,4	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4
	ΔCt	0,0	9,4	7,3	4,9	9,6	7,6	4,7	8,9	6,6	4

Таблица 8. Результаты проверки сохранности внеклеточной РНК для образцов, которые были подвергнуты центрифугированию через **8 часов** после взятия крови и далее хранение которых осуществлялось в течение **15 суток** при температуре -20°C , а также образцов, хранение которых осуществлялось в течение **15 суток** после взятия крови при комнатной температуре $+(15-25)^{\circ}\text{C}$ без центрифугирования или с центрифугированием непосредственно перед отбором плазмы.

№ донора	хар-ка	0 сутки (ЭДТА)	День сравнения в течение срока хранения образца крови								
			Температура хранения образца крови: -20°C			Температура хранения образца крови: $+(15-25)^{\circ}\text{C}$					
						Без центрифугирования			С центрифугированием непосредственно перед отбором плазмы		
			0 (S21)	7 (S21)	15 (S22)	0 (S23)	7 (S23)	15 (S24)	0 (S25)	7 (S27)	15 (S29)
6	Ct	36,9	28,3	28,9	29,2	31,8	32,2	34,5	31,4	32,4	34,2
	SD	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,5	0,3	0,3	0,4	0,5
	ΔCt	0,0	8,6	8	7,7	5,1	4,7	2,4	5,5	4,5	2,7
7	Ct	37,2	28,8	28,6	29,3	31,8	32,5	35,2	31,8	32,8	35,1
	SD	0,4	0,2	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,3	0,4	0,4
	ΔCt	0,0	8,4	8,6	7,9	5,4	4,7	2	5,4	4,4	2,1
8	Ct	36,4	27,9	28,3	29,0	32,2	33,0	34,9	31,9	32,3	35,0
	SD	0,3	0,4	0,5	0,3	0,3	0,3	0,5	0,4	0,4	0,4
	ΔCt	0,0	8,5	8,1	7,4	4,2	3,4	1,5	4,5	4,1	1,4
9	Ct	36,5	28,6	28,5	29,4	31,8	32,6	35,1	32,1	33,8	34,5
	SD	0,2	0,4	0,3	0,4	0,3	0,5	0,5	0,4	0,3	0,5
	ΔCt	0,0	7,9	8	7,1	4,7	3,9	1,4	4,4	2,7	2
10	Ct	36,7	27,6	28,1	28,8	31,7	32,8	35,4	31,4	33,1	34,9
	SD	0,4	0,3	0,4	0,3	0,5	0,3	0,4	0,3	0,5	0,4
	ΔCt	0,0	9,1	8,6	7,9	5	3,9	1,3	5,3	3,6	1,8

На основании результатов амплификации участка транскрипта гена b2M в образцах кДНК, полученных с использованием одного из вариантов воплощения Среды по основному аспекту изобретения в диапазонах концентраций, указанного в таблице 1, в Устройстве для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, на разных сроках хранения в разных температурных условиях, а также на основе данных сравнительного анализа средних значений экспрессии данного гена в образцах кДНК, полученных с использованием вакуумных пробирок BD Vacutainer® Plus с ЭДТА на 0 сутки хранения при комнатной температуре, было сделано заключение об устойчивости внеклеточной РНК к воздействию всех испытанных климатических факторов в

указанных условиях применения и способности сохранения пробы до проведения анализа. Отдельно следует отметить, что на 15 сутки хранения образцов цельной крови уровень экспрессии гена b2M в предложенном в рамках настоящей заявки Устройстве по второму аспекту изобретению выше или сопоставим с экспрессией данного гена на 0 сутки хранения крови в пробирках с ЭДТА, что полностью решает задачу транспортировки внеклеточной РНК, анализ который преимущественно проводится в рамках жидкостной биопсии при онкологии, до 15 суток в широком диапазоне отрицательных и положительных температур до места проведения высокотехнологичных исследований - в центры геномных исследований мирового уровня.

Анализ возможных вариантов сред, как они описаны в п. 1 формулы изобретения, также проводился для:

- подтверждения более высокой концентрации внеклеточной ДНК и РНК, которая обнаруживается при выделении ДНК / РНК после центрифугирования из образцов крови в пробирках согласно изобретению с антикоагулянтом (например, ЭДТА), фиксатором клеточной мембраны и гелем по сравнению с пробирками с ЭДТА без / с разделительным гелем и специализированными пробирками для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот, а именно с пробирками Cell-Free DNA BCT® производства компании Streck (США) с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля;

- подтверждения более высокой концентрации внеклеточной ДНК и РНК, которая обнаруживается при выделении ДНК / РНК после центрифугирования и 1 цикла замораживания / размораживания образца крови в пробирках согласно изобретению с антикоагулянтом (например, ЭДТА), фиксатором клеточной мембраны и гелем по сравнению с пробирками с ЭДТА без / с разделительным гелем и специализированными пробирками для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот, в частности, с пробирками RNA Complete BCT® производства компании Streck (США) с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля без циклов заморозки.

Пример 3. Стабилизация внеклеточной ДНК и РНК с использованием Среды и Устройства для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов согласно настоящему изобретению и коммерчески доступных аналогов (сравнительный анализ)

Сбор крови

Взятие крови у здоровых доноров проводили на основании информированного добровольного согласия в Устройство для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов по второму аспекту изобретения, представляющее собой в данном варианте воплощения изобретения вакуумную пробирку, содержащую Среду по основному аспекту изобретения, имеющей состав как указано в таблице 1.

В рамках данного эксперимента образцы были предназначены для:

- проверки более высокой концентрации внеклеточной ДНК и РНК, которая должна обнаруживаться на 0 сроке хранения при выделении ДНК / РНК после центрифугирования из образцов крови в пробирках согласно изобретению с антикоагулянтом (например, ЭДТА), фиксатором клеточной мембраны и гелем по сравнению с пробирками с ЭДТА без / с разделительным гелем и специализированными пробирками для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот, а именно с пробирками Cell-Free DNA BCT® производства компании Streck (США) с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля;

- проверки более высокой концентрации внеклеточной ДНК и РНК, которая должна обнаруживаться на 0 сроке хранения при выделении ДНК / РНК после центрифугирования и 1 цикла замораживания / размораживания образца крови в

пробирках согласно изобретению с антикоагулянтом (например, ЭДТА), фиксатором клеточной мембраны и гелем по сравнению с пробирками с ЭДТА без / с разделительным гелем и специализированными пробирками для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот, в частности, с пробирками RNA Complete BCT® производства компании Streck (США) с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля без циклов заморозки.

Для решения этих задач было проведено взятие следующих образцов крови с последующим центрифугированием пробирок в течение 1 часа после забора крови:

- по 2 пробирки с антикоагулянтом, фиксатором клеточной мембраны и гелем согласно настоящему изобретению типоразмера 16×100 от каждого донора с последующим хранением при комнатной температуре +(15-25)°С до проведения центрифугирования и далее выделением нуклеиновых кислот - образцы S30, S31;
- по 2 пробирки с антикоагулянтом, фиксатором клеточной мембраны и гелем согласно настоящему изобретению типоразмера 16×100 от каждого донора с последующим хранением при комнатной температуре +(15-25)°С до проведения центрифугирования и далее выделением нуклеиновых кислот после 1 цикла замораживания /размораживания - образцы S32, S33;
- по 2 пробирки BD Vacutainer® Plus с ЭДТА типоразмера 16×100 от каждого донора с последующим хранением на льду до проведения центрифугирования и далее выделением нуклеиновых кислот - образцы S34, S35;
- по 2 пробирки BD Vacutainer® PPT™ с ЭДТА и разделительным гелем типоразмера 16×100 от каждого донора с последующим хранением на льду до проведения центрифугирования и далее выделением нуклеиновых кислот - образцы S36, S37;
- по 1 пробирке Cell-Free DNA BCT® производства компании Streck (США) с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля объемом 10 мл от каждого донора с последующим хранением при комнатной температуре +(15-25)°С до проведения центрифугирования и далее выделением внеклеточной ДНК - образец S38;
- по 1 пробирке RNA Complete BCT® производства компании Streck (США) с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля объемом 10 мл от каждого донора с последующим хранением при комнатной температуре +(15-25)°С до проведения центрифугирования и далее выделением внеклеточной РНК - образец S39.

Пробы крови отбирали в вакуумные пробирки процедурой венепункции стандартными двухсторонними иглами. Заполняли вакуумные пробирки до метки, далее снимали пробирку с держателя / адаптера иглы и сразу плавно перемешивали, осторожно перевернув пробирку 8-10 раз (не встряхивая).

Подготовка плазмы

Пробы S30-S33:

В течение 1 часа после взятия венозной крови проводили центрифугирование пробирок S30-S33 при комнатной температуре +(15-25)°С в течение 15 минут при 2800g с последующим помещением пробирок на хранение в разные температурные условия:

- при комнатной температуре: S30, S31;
- в морозильной камере при температуре -20°С до полного замораживания содержимого пробирки с дальнейшим размораживанием при комнатной температуре и последующим плавным перемешиванием 4-6 раз или мягким пипетированием: S32, S33. Далее проводили подготовку плазмы для исследования следующим образом:
- осуществляли отбор ½ объема плазмы в чистую пробирку типа Эппендорф;

- выполняли центрифугирование анализируемого образца

➤ при температуре +4°C в течение 10 минут при 16000g в случае проб S30 и S32, которые были предназначены для выделения внеклеточной ДНК;

➤ при комнатной температуре в течение 15 минут при 2800g в случае проб S31 и S33, которые были предназначены для выделения внеклеточной РНК;

- осторожно отделяли супернатант, переносили его в чистую пробирку типа Эпшендорф;

- выполняли выделение внеклеточной ДНК (пробирки S30, S32) и РНК (пробирки S31, S33) из плазмы согласно соответствующим инструкциям производителей.

Пробы S34, S35:

В течение 1 часа после взятия венозной крови проводили центрифугирование пробирок S34, S35 при комнатной температуре +(15-25)°C в течение 20 минут на низких оборотах (900g), поскольку центрифугирование крови на высоких оборотах неизбежно ведет к разрушению части клеток и попаданию содержащихся в них нуклеиновых кислот в плазму.

Далее проводили отбор и подготовку плазмы с последующим выделением внеклеточной ДНК (пробирка S34) аналогично пробиркам S30, S32 и внеклеточной РНК (пробирка S35) аналогично пробиркам S31, S33 из плазмы согласно соответствующим инструкциям производителей.

Пробы S36, S37:

В течение 1 часа после взятия венозной крови проводили центрифугирование пробирок S36, S37 при комнатной температуре +(15-25)°C в течение 20 минут при 1500g, так как данное значение относительного центробежного ускорения заявлено производителем как максимально допустимое (рекомендуемый диапазон от 1100 до 1500g), при котором не происходит разрушения клеток и попадания содержащихся в них нуклеиновых кислот в плазму.

Далее проводили отбор и подготовку плазмы с последующим выделением внеклеточной ДНК (пробирка S36) аналогично пробиркам S30, S32, S34 и внеклеточной РНК (пробирка S37) аналогично пробиркам S31, S33, S35 из плазмы согласно соответствующим инструкциям производителей.

Пробы S38, S39:

В течение 1 часа после взятия венозной крови проводили центрифугирование

➤ пробирок S38, предназначенных для последующего выделения внеклеточной ДНК, при комнатной температуре +(15-25)°C в течение 10 минут при 1600g;

➤ пробирок S39, предназначенных для последующего выделения внеклеточной РНК, при комнатной температуре +(15-25)°C в течение 15 минут при 1800g. Далее проводили отбор и подготовку плазмы с последующим выделением внеклеточной ДНК (пробирка S38) аналогично пробиркам S30, S32, S34, S36 и РНК (пробирка S39) аналогично пробиркам S31, S33, S35, S37 из плазмы согласно соответствующим инструкциям производителей. Выделение внеклеточной ДНК

Выделение внеклеточной ДНК из плазмы проводили с использованием набора «MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit» (ThermoFisher Scientific, США) согласно методологии, указанной в Примере 1.

Оценку наличия пика флуоресценции в диапазоне длин фрагментов 150-250 п.н., характерных для внеклеточной ДНК, проводили методом капиллярного электрофореза на оборудовании TapeStation 2200 (Agilent, США) с использованием готовых наборов реагентов в соответствии с инструкцией производителя и согласно методологии,

указанной в Примере 1. Концентрацию внеклеточной ДНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 4.0 (ThermoFisher Scientific, США) с использованием набора High Sensitivity dsDNA по протоколу, рекомендованному производителем. Для всех образцов концентрация внеклеточной ДНК, измеренная с помощью флуориметра Qubit 4.0, соответствовала концентрации внеклеточной ДНК, вычисленной по площади основного пика флуоресценции на электрофореграмме, полученной методом капиллярного электрофореза на оборудовании TapeStation 2200, в диапазоне длин фрагментов 150-250 п.н., характерных для внеклеточной ДНК.

Результаты определения концентрации внеклеточной ДНК, выделение которой было проведено после центрифугирования на 0 сроке хранения без замораживания и с 1 циклом замораживания / размораживания из образцов крови в пробирках с антикоагулянтом, фиксатором клеточной мембраны и гелем согласно настоящему изобретению в сравнении с пробирками с ЭДТА без / с разделительным гелем и специализированными пробирками для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот Cell-Free DNA BCT® производства компании Streck (США) с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля без циклов заморозки приведены в таблице 9.

Таблица 9. Результаты определения концентрации внеклеточной ДНК, выделение которой было проведено после центрифугирования на 0 сроке хранения без замораживания и с 1 циклом замораживания / размораживания из образцов крови в пробирках с антикоагулянтом, фиксатором клеточной мембраны и гелем согласно настоящему изобретению в сравнении с пробирками с ЭДТА без / с разделительным гелем и специализированными пробирками для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот Cell-Free DNA BCT® с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля без циклов заморозки.

№ донора	Характеристика	Анализируемые образцы				
		Устройство со средой согласно основному аспекту изобретения		Пробирки сравнения		
		Пробирки согласно изобретению (S30)	Пробирки согласно изобретению после 1 цикла замораживания и размораживания (S32)	Пробирки BD Vacutainer® Plus с ЭДТА (S34)	Пробирки BD Vacutainer® PPT™ с ЭДТА и разделительным гелем (S36)	Пробирки Cell-Free DNA BCT® (S38)
1	Наличие пика флуоресценции в диапазоне длин фрагментов 150-250 п.н, характерных для внеклеточной ДНК	+	+	+	+	+
	Концентрация внеклеточной ДНК, нг/мл плазмы	44	48	20	19	29
	Соотношение концентрации внеклеточной ДНК в устройстве со средой согласно основному аспекту изобретения без (S30) и с 1 циклом замораживания и размораживания (S32) к концентрации внеклеточной ДНК в соответствующей пробирке сравнения на 0 сроке хранения*	1,00 (S30/S30)	0,92 (S30/S32)	2,20 (S30/S34)	2,31 (S30/S36)	1,52 (S30/S38)
		1,09 (S32/S30)	1,00 (S32/S32)	2,40 (S32/S34)	2,53 (S32/S36)	1,65 (S32/S38)

№ донора	Характеристика	Анализируемые образцы				
		Устройство со средой согласно основному аспекту изобретения		Пробирки сравнения		
		Пробирки согласно изобретению (S30)	Пробирки согласно изобретению после 1 цикла замораживания и размораживания (S32)	Пробирки BD Vacutainer® Plus с ЭДТА (S34)	Пробирки BD Vacutainer® PPT™ с ЭДТА и разделительным гелем (S36)	Пробирки Cell-Free DNA BCT® (S38)
5 10 15	Наличие пика флуоресценции в диапазоне длин фрагментов 150-250 п.н, характерных для внеклеточной ДНК	+	+	+	+	+
	Концентрация внеклеточной ДНК, нг/мл плазмы	61	70	28	35	46
	Соотношение концентрации внеклеточной ДНК в устройстве со средой согласно основному аспекту изобретения без (S30) и с 1 циклом замораживания и размораживания (S32) к концентрации внеклеточной ДНК в соответствующей пробирке сравнения на 0 сроке хранения*	1,00 (S30/S30)	0,87 (S30/S32)	2,18 (S30/S34)	1,75 (S30/S36)	1,32 (S30/S38)
		1,15 (S32/S30)	1,00 (S32/S32)	2,50 (S32/S34)	2,00 (S32/S36)	1,52 (S32/S38)
3 20	Наличие пика флуоресценции в диапазоне длин фрагментов 150-250 п.н, характерных для внеклеточной ДНК	+	+	+	+	+
	Концентрация внеклеточной ДНК, нг/мл плазмы	55	65	25	24	41

№ донора	Характеристика	Анализируемые образцы				
		Устройство со средой согласно основному аспекту изобретения		Пробирки сравнения		
		Пробирки согласно изобретению (S30)	Пробирки согласно изобретению после 1 цикла замораживания и размораживания (S32)	Пробирки BD Vacutainer® Plus с ЭДТА (S34)	Пробирки BD Vacutainer® PPT™ с ЭДТА и разделительным гелем (S36)	Пробирки Cell-Free DNA BCT® (S38)
25 30 35 40	Соотношение концентрации внеклеточной ДНК в устройстве со средой согласно основному аспекту изобретения без (S30) и с 1 циклом замораживания и размораживания (S32) к концентрации внеклеточной ДНК в соответствующей пробирке сравнения на 0 сроке хранения*	1,00 (S30/S30)	0,85 (S30/S32)	2,20 (S30/S34)	2,29 (S30/S36)	1,34 (S30/S38)
		1,18 (S32/S30)	1,00 (S32/S32)	2,60 (S32/S34)	2,71 (S32/S36)	1,58 (S32/S38)
	Наличие пика флуоресценции в диапазоне длин фрагментов 150-250 п.н, характерных для внеклеточной ДНК	+	+	+	+	+
	4	Концентрация внеклеточной ДНК, нг/мл плазмы	85	102	35	39
	Соотношение концентрации внеклеточной ДНК в устройстве со средой согласно основному аспекту изобретения без (S30) и с 1 циклом замораживания и размораживания (S32) к концентрации внеклеточной	1,00 (S30/S30)	0,83 (S30/S32)	2,43 (S30/S34)	2,18 (S30/S36)	1,67 (S30/S38)

№ донора	Характеристика	Анализируемые образцы				
		Устройство со средой согласно основному аспекту изобретения		Пробирки сравнения		
		Пробирки согласно изобретению (S30)	Пробирки согласно изобретению после 1 цикла замораживания и размораживания (S32)	Пробирки BD Vacutainer® Plus с ЭДТА (S34)	Пробирки BD Vacutainer® PPT™ с ЭДТА и разделительным гелем (S36)	Пробирки Cell-Free DNA BCT® (S38)
	ДНК в соответствующей пробирке сравнения на 0 сроке хранения*	1,20 (S32/S30)	1,00 (S32/S32)	2,91 (S32/S34)	2,61 (S32/S36)	2,00 (S32/S38)
5	Наличие пика флуоресценции в диапазоне длин фрагментов 150-250 п.н, характерных для внеклеточной ДНК	+	+	+	+	+
10	Концентрация внеклеточной ДНК, нг/мл плазмы	38	48	17	16	32
15	Соотношение концентрации внеклеточной ДНК в устройстве со средой согласно основному аспекту изобретения без (S30) и с 1 циклом замораживания и размораживания (S32) к концентрации внеклеточной ДНК в соответствующей пробирке сравнения на 0 сроке хранения*	1,00 (S30/S30)	0,79 (S30/S32)	2,23 (S30/S34)	2,37 (S30/S36)	1,19 (S30/S38)
		1,26 (S32/S30)	1,00 (S32/S32)	2,82 (S32/S34)	3,00 (S32/S36)	1,50 (S32/S38)

*день забора венозной крови в вакуумные пробирки посредством венепункции

В результате проведенного тестирования одного из вариантов воплощения Среды по основному аспекту изобретения, содержащей стабилизирующий раствор и разделительный тиксотропный гель в Устройстве для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов в диапазонах концентраций, указанных в таблице 1, была подтверждена более высокая концентрация внеклеточной ДНК, которая обнаруживается при выделении ДНК после центрифугирования без замораживания и с 1 циклом замораживания / размораживания образца крови в пробирках согласно изобретению в сравнении с:

- пробирками с ЭДТА без геля - увеличение до 2,43 и 2,91 раз соответственно;
- пробирками с ЭДТА с разделительным гелем - увеличение до 2,37 и 3,00 раз соответственно;
- пробирками Cell-Free DNA BCT® производства компании Streck (США) с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля - увеличение до 1,67 и 2,00 раз соответственно.

Выделение РНК, получение кДНК и постановка ПЦР в реальном времени. Выделение РНК из плазмы для дальнейшей постановки реакции обратной транскрипции проводили с использованием набора «Проба-НК» (ООО «ДНК-Технология», Россия) в трех повторях согласно методологии, указанной в Примере 2.

Качественную оценку чистоты препаратов циркулирующей внеклеточной РНК проводили посредством измерения оптической плотности аликвот полученных образцов при длинах волн 260 и 280 нм на спектрофотометре NanoDrop 2000 в соответствии с инструкцией по применению предприятия-изготовителя. Отношение показателей поглощения 260/280 для всех проанализированных образцов составило 1,8-2,0.

Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием комплекта реагентов для обратной транскрипции (ООО «ДНК-Технология», Россия) согласно методологии, указанной в Примере 2. Полученные в результате обратной транскрипции образцы кДНК использовали для оценки уровня экспрессии гена домашнего хозяйства - бета-2-микроглобулина (b2M) методом ПЦР в режиме реального времени.

Анализ полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения

используемого амплификатора. Дополнительно определяли:

5 - значение $\Delta Ct^1 = Ct^{\text{образца сравнения}}$ (средний пороговый цикл образца кДНК, полученного с использованием пробирки сравнения BD Vacutainer® Plus с ЭДТА, BD Vacutainer® PPT™ с ЭДТА и разделительным гелем или RNA Complete BCT® с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля на 0 сутки хранения) - $Ct^{\text{образца}}$ (средний пороговый цикл исследуемого образца кДНК, полученного с использованием одного из вариантов воплощения Среды по основному аспекту изобретения в Устройстве для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов после центрифугирования при комнатной температуре $+(15-25)^\circ\text{C}$ на 0 сроке хранения без замораживания);

10 - значение $\Delta Ct^2 = Ct^{\text{образца сравнения}}$ (средний пороговый цикл образца кДНК, полученного с использованием пробирки сравнения BD Vacutainer® Plus с ЭДТА, BD Vacutainer® PPT™ с ЭДТА и разделительным гелем или RNA Complete BCT® с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля на 0 сутки хранения) - $Ct^{\text{образца}}$ (средний пороговый цикл исследуемого образца кДНК, полученного с использованием одного из вариантов воплощения Среды по основному аспекту изобретения в Устройстве для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов после центрифугирования при комнатной температуре $+(15-25)^\circ\text{C}$ на 0 сроке хранения с 1 циклом замораживания / размораживания);

20 - соотношение концентрации внеклеточной РНК в устройстве по основному аспекту изобретения по отношению к концентрации внеклеточной РНК в соответствующей пробирке сравнения на 0 сроке хранения без замораживания или с 1 циклом замораживания / размораживания = $1,933^{\Delta Ct^1}$ или $1,933^{\Delta Ct^2}$ соответственно, где 1,933 - коэффициент эффективности ПЦР методом титрования.

25 Примеры результатов определения концентрации внеклеточной РНК, выделение которой было проведено после центрифугирования при комнатной температуре $+(15-25)^\circ\text{C}$ на 0 сроке хранения без замораживания и с 1 циклом замораживания / размораживания из образцов крови в пробирках с антикоагулянтом, фиксатором клеточной мембраны и гелем согласно настоящему изобретению в сравнении с пробирками с ЭДТА без / с разделительным гелем и специализированными пробирками для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот RNA Complete BCT® производства компании Streck (США) с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля без циклов заморозки приведены в таблице 10.

40

45

Таблица 10. Результаты определения концентрации внеклеточной РНК, выделение которой было проведено после центрифугирования при комнатной температуре +(15-25)°С на 0 сроке хранения без замораживания и с 1 циклом замораживания / размораживания из образцов крови в пробирках с антикоагулянтом, фиксатором клеточной мембраны и гелем согласно настоящему изобретению в сравнении с пробирками с ЭДТА без / с разделительным гелем и специализированными пробирками для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот *RNA Complete BCT*[®] с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля без циклов заморозки.

№ донора	Характеристика	Анализируемые образцы				
		Устройство со средой согласно основному аспекту изобретения		Пробирки сравнения		
		Пробирки согласно изобретению (S31)	Пробирки согласно изобретению после 1 цикла замораживания и размораживания (S33)	Пробирки BD Vacutainer [®] Plus с ЭДТА (S35)	Пробирки BD Vacutainer [®] PPT™ с ЭДТА и разделительным гелем (S37)	Пробирки RNA Complete BCT [®] (S39)
1	Ct	27,2	25,4	36,8	37,0	32,4
	SD	0,4	0,5	0,6	0,7	0,6
	ΔCt^1	-	-	9,6	9,8	5,2
	$1,933^{\Delta Ct^1}$	-	-	560	638	31
	ΔCt^2	-	-	11,4	11,6	7
	$1,933^{\Delta Ct^2}$	-	-	1833	2091	101
2	Ct	28,1	27,8	36,7	37,2	33,4
	SD	0,5	0,5	0,7	0,7	0,6
	ΔCt^1	-	-	8,6	9,1	5,3
	$1,933^{\Delta Ct^1}$	-	-	290	402	33
	ΔCt^2	-	-	8,9	9,4	5,6
	$1,933^{\Delta Ct^2}$	-	-	353	490	40
3	Ct	27,8	26,3	35,9	36,5	33,1
	SD	0,5	0,3	0,7	0,6	0,6
	ΔCt^1	-	-	8,1	8,7	5,3

№ донора	Характеристика	Анализируемые образцы				
		Устройство со средой согласно основному аспекту изобретения		Пробирки сравнения		
		Пробирки согласно изобретению (S31)	Пробирки согласно изобретению после 1 цикла замораживания и размораживания (S33)	Пробирки BD Vacutainer [®] Plus с ЭДТА (S35)	Пробирки BD Vacutainer [®] PPT™ с ЭДТА и разделительным гелем (S37)	Пробирки RNA Complete BCT [®] (S39)
	$1,933^{\Delta Ct^1}$	-	-	208	309	33
	ΔCt^2	-	-	9,6	10,2	6,8
	$1,933^{\Delta Ct^2}$	-	-	559	831	88
4	Ct	28,0	26,9	37,5	37,4	33,6
	SD	0,4	0,4	0,6	0,7	0,4
	ΔCt^1	-	-	9,5	9,4	5,6
	$1,933^{\Delta Ct^1}$	-	-	533	490	40
	ΔCt^2	-	-	10,6	10,5	6,7
	$1,933^{\Delta Ct^2}$	-	-	1082	1013	83
5	Ct	26,3	25,2	37,2	37,4	32,0
	SD	0,3	0,4	0,6	0,7	0,4
	ΔCt^1	-	-	10,9	11,1	5,7
	$1,933^{\Delta Ct^1}$	-	-	1318	1504	43
	ΔCt^2	-	-	12	12,2	6,8
	$1,933^{\Delta Ct^2}$	-	-	2721	3105	88

В результате проведенного тестирования одного из вариантов воплощения Среды по основному аспекту изобретения, содержащей стабилизирующий раствор и разделительный тиксотропный гель в Устройстве для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов в диапазонах концентраций, указанных в таблице 1, были вычислены средние геометрические для значений $1,933^{\Delta Ct^1}$ и $1,933^{\Delta Ct^2}$, полученных по итогам анализа 5-ти образцов крови здоровых доноров (таблица 10), и таким образом подтверждены более высокие концентрации внеклеточной РНК, которые обнаруживаются при выделении РНК после центрифугирования без замораживания и с 1 циклом замораживания / размораживания образца крови в пробирках согласно изобретению в сравнении с:

- пробирками с ЭДТА без геля - увеличение в среднем в 464 и 1013 раз соответственно;
- пробирками с ЭДТА с разделительным гелем - увеличение в среднем в 567 и 1317

раз соответственно;

- пробирками RNA Complete BCT® производства компании Streck (США) с антикоагулянтом и фиксатором клеточной мембраны без геля - увеличение в среднем в 36 и 76 раз соответственно.

5 Краткое описание фигур

Фиг. 1. Общий вид Устройства, содержащего Среду для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, содержащая разделительный гель и стабилизирующий раствор, содержащий по крайней мере 1 фиксирующий клеточную мембрану агент.

10 Фиг. 2. Фотографии пробирок со Средой по основному аспекту изобретения и образцами цельной крови на 0 сутки хранения: пробирка S11 - после центрифугирования при комнатной температуре +(15-25)°С в течение 15 минут при 3000g; пробирки S12 и S13 - без центрифугирования.

15 Фиг. 3. Примеры электрофореграмм, полученных с использованием автоматической системы капиллярного электрофореза TapeStation 2200 для образцов внеклеточной ДНК на 0 (А) и 5 (Б) сутки хранения при комнатной температуре +(15-25)°С после центрифугирования непосредственно перед отбором плазмы (пробирки S11 и S12 соответственно).

20 Фиг. 4. Примеры электрофореграмм, полученных с использованием автоматической системы капиллярного электрофореза TapeStation 2200 для образцов внеклеточной ДНК на 10 (А) и 15 (Б) сутки хранения при комнатной температуре +(15-25)°С после центрифугирования непосредственно перед отбором плазмы (пробирки S13 и S14 соответственно).

25 Фиг. 5. Результаты сравнительного анализа сохранности внеклеточной ДНК для образцов, хранение которых осуществлялось без предварительного центрифугирования в течение 0, 5, 10 и 15 суток при комнатной температуре +(15-25)°С и которые были подвергнуты центрифугированию непосредственно перед отбором плазмы (пробирки S11, S12, S13 и S14 соответственно).

Список использованных источников

30 1 La Verde M., De Falco L., Torella A., Savarese G, Savarese P, Ruggiero R, Conte A, Fico V, Torella M, Fico A. Performance of cell-free DNA sequencing-based non-invasive prenatal testing: experience on 36,456 singleton and multiple pregnancies // BMC Med. Genomics. - 2021. - Vol. 14, №1. - P. 93.

35 2 Oellerich M., Schütz E., Beck J., Walson P.D. Circulating cell-free DNA-diagnostic and prognostic applications in personalized cancer therapy // Ther. Drug Monit - 2019 - Vol. 41, №2. - P. 115-120.

3 Jaikaransingh V., Kadambi P.V. Donor-derived cell-free DNA (ddcf-DNA) and acute antibody-mediated rejection in kidney transplantation // Medicina (Kaunas). - 2021 - Vol. 57, №5 - P. 436.

40 4 Haller N., Helmig S., Taenny P., Petty J., Schmidt S., Simon P. Circulating, cell-free DNA as a marker for exercise load in intermittent sports // PLoS One. - 2018 - Vol. 13, №1. - e0191915.

5 Hammad R., Eldosoky M.A.E.R., Fouad S.H., Elgendy A., Tawfeik A.M., Alborai M., Abdelmaksoud M.F. Circulating cell-free DNA, peripheral lymphocyte subsets alterations and neutrophil lymphocyte ratio in assessment of COVID-19 severity // Innate Immun. - 2021. - Vol. 27, №3. - P. 240-250.

45 6 Lis J.T., Schleif R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol //Nucleic Acids Res. - 1975. - Vol. 2, №3. - P. 383-389).

7 Gerald Litwack. Human Biochemistry /1st Edition, 2018 / Chapter 14. Metabolism of Fat, Carbohydrate, and Nucleic Acids: Nucleic Acid Metabolism - P. 415-420 // Imprint: Academic

Press - 778 p.

8 Горохова С.Г., Атьков О.Ю., Горбачев А.Ю., Генерозов Э.В., Алчинова И.Б., Полякова М.В., Карганов М.Ю. Изменение уровня транскрипции фоторецептор-специфичного гена CRX у участников арктического кругосветного перелета // Вестник офтальмологии. - 2021. - Т. 137, №2. - Стр. 5-11.

(57) Формула изобретения

1. Среда для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов,
 - где биологический образец, содержащий внеклеточные нуклеиновые кислоты,
 - 10 которые необходимо сохранить, представляет собой кровь или плазму;
 - где внеклеточные нуклеиновые кислоты представляют собой внеклеточную ДНК или РНК;
 - содержащая разделительный гель,
 - где в качестве разделительного геля используется тиксотропный гель;
 - 15 - где тиксотропный гель имеет плотность в диапазоне от 1,025 до 1,065 и химически инертен по отношению к биологическим образцам;
 - где тиксотропный гель обладает достаточной вязкостью, так что при центробежных силах в диапазоне от 2000 до 3600 g он будет течь и образовывать барьер между плазмой и клетками крови;
 - 20 и стабилизирующий раствор, содержащий по крайней мере 1 фиксирующий клеточную мембрану агент,
 - где в качестве фиксирующего клеточную мембрану агента, входящего в состав стабилизирующего раствора, используются 2-бром-2-нитропропан-1,3-диол, диметилоч мочевины, гидроксиметилглицинат натрия, диазолидинилмочевины, диметил-
 - 25 диметил-гидантоин, имидазолидинилмочевины, 1,3,5-трис(гидроксиэтил)-s-триазин, 1,3-бис(гидроксиметил)-5,5-диметилимидазолидин-2,4-дион, диметил-5,5-диметилгидантоин или комбинации из них;
 - где фиксирующий агент высвобождает свободный альдегид и обладает свойствами консерванта,
 - 30 и по крайней мере 1 антикоагулянт,
 - где в качестве антикоагулянта, входящего в состав стабилизирующего раствора, используются этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА) и ее соли, цитрат натрия, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) и ее соли, фторид натрия или комбинации из них;
 - 35 - где антикоагулянт может выполнять функцию ионного стабилизирующего и/или хелатирующего агента.
2. Среда по п. 1, где содержание фиксирующего агента преимущественно может составлять от 0,2 до 63,4% от веса всей композиции.
3. Среда по п. 1, где содержание антикоагулянта преимущественно может составлять
 - 40 от 0,1 до 28,3% по массе от всей композиции.
4. Среда по п. 1, где в состав стабилизирующего раствора необязательно может входить гасящий агент в количестве, достаточном для реакции с любым свободным альдегидом, который может присутствовать до или после взятия образца и который
 - 45 образуется из фиксирующего агента с образованием продукта реакции, который не будет оказывать денатурирующее действие на белки в биологических образцах, при этом содержание гасящего агента преимущественно может составлять от 0 до 7,8% от веса всей композиции,
 - где в качестве гасящего агента может использоваться соединение, которое включает

по крайней мере одну функциональную группу, способную реагировать с электрон-дефицитной функциональной группой альдегида;

- где в качестве гасящего агента могут использоваться этилендиамин, аминокусусная кислота, лизин, аргинин, аденин, гуанин, цитозин, тимин, триптофан, тирозин, фенилаланин, орнитин, S-аденозилметионин, аланин, аргинин, цистеин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, гистидин, лейцин, лизин, пролин, серии, треонин, гомоцистеин, никотинамид или комбинации из них.

5. Среда по п. 1, где в состав стабилизирующего раствора необязательно могут входить дополнительные неионогенные стабилизирующие агенты в концентрации от 0 до 18,5% от веса всей композиции, которые растворяются в водном растворе без образования ионов и могут быть выбраны из группы полиолов (многоатомных спиртов), таких как сахароза, лактоза, трегалоза, мелибиоза, маннитол или комбинации из них.

6. Среда по п. 1, где в состав стабилизирующего раствора необязательно могут входить ингибиторы ферментов - нуклеаз и/или протеаз, в том числе ингибиторы ферментов метаболизма и ингибиторы фосфатаз, которые предотвращают деградацию нуклеиновых кислот и обеспечивают их стабилизацию, а также ингибиторы апоптоза, включая ингибиторы каспаз, в том числе в сочетании с N,N-диалкилпропанамидом, например с N,N-диметилпропанамидом (DMPA), или бутанамидом, которые предотвращают апоптоз клеток по каспаззависимому пути, и ингибиторы транскрипции, которые предназначены для сохранения базового уровня экспрессии РНК на момент забора крови посредством ингибирования синтеза новых РНК-транскриптов, включая мРНК, микроРНК, IncRNA, piRNA, YRNA, circRNA и других ncRNA:

- ингибиторы ферментов могут быть выбраны из следующих групп соединений: диэтилпирокарбоната, этанола, ауриINTRикарбоновой кислоты (АТА), глицеральдегидов, формамида, бентонита, сульфата аммония, дитиотреитола (ДТТ), бета-меркаптоэтанола, цистеина, дитиоэритрита, трис(2-карбоксиитил)фосфин гидрохлорида или комбинаций из них, но не ограничиваясь этим;

- ингибиторы ферментов метаболизма могут быть выбраны из следующих групп соединений: глицеральдегида, дигидроксиацетонфосфата, глицеральдегид-3-фосфата, 1,3-бисфосфоглицерата, 3-фосфоглицерата, 2-фосфоглицерата, фосфоенолпирувата, пируват и глицератдигидроксиацетата, оксалата калия или комбинаций из них, но не ограничиваясь этим;

- ингибиторы протеаз могут быть выбраны из следующих групп соединений: антипаина, химостатина, эластатиналя, фенилметилсульфонилфторида (PMSF), APMSF, TLCK, TPCK, лейпептина, соевого ингибитора трипсина, индолуксусной кислоты (IAA), E64, пепстатина, 1,10-фенантролина, фосфорамодона, амастатина, бестатина, дипротина А, дипротина В, альфа-2-макроглобулина, ингибитора панкреатической протеазы, овостатина, цистатина, ингибитора протеаз или комбинаций из них, но не ограничиваясь этим;

- ингибиторы фосфатаз могут быть выбраны из следующих групп соединений: каликулина А, нодуларина, NIPP-1, микроцистина LR, таутомицина, окадаевой (окадаиковой) кислоты, кантаридина, фостриецина, эндоталла, циклоспорина А, FK 506/иммунофилиновые комплексы, циперметрина, дельтаметрина, фенвалерата, дефостатина, mpV (pic) DMHV, ортованадата натрия или комбинаций из них, но не ограничиваясь этим;

- содержание ингибиторов ферментов - нуклеаз и/или протеаз, в том числе ингибиторов ферментов метаболизма и ингибиторов фосфатаз, преимущественно может составлять от 0 до 25,8% по массе от всей композиции.

7. Среда по п. 1, где в состав стабилизирующего раствора необязательно могут входить в концентрации от 0 до 5,4% один или несколько агентов, повышающих проницаемость клеток, которые могут быть выбраны из следующих соединений или их комбинаций: ДМСО (диметилсульфоксида), этиленгликоля, глицерина, целлозольвов, диметилового эфира этиленгликоля, феноксиэтанола, Тритона X 100, Тритона X 705 (неионогенный детергент), 1-метил-2-пирролидинона, Tween 20, Tween 40 (неионогенный детергент), Vrij 35 (неионогенный детергент), полиоксиэтиленового эфира (Polyox), монензина, монактина, пентахлорфенола, 2,4-динитрофенола, сапонины, SDS (додецилсульфата натрия).

8. Среда по п. 1, где в состав стабилизирующего раствора необязательно могут входить следующие вещества или их комбинации в концентрации от 0 до 6,2%:

- белки, такие как: биотин, альбумины: яичный, бычий, включая бычий сывороточный альбумин - BSA, желатин и подобные им соединения;

- дополнительные стабилизаторы нуклеиновых кислот, такие как: гуанидина гидрохлорид, поликатионы, такие как полиэтиленимин, и подобные им соединения;

- антиоксиданты/восстановители, такие как Тролокс, α -токоферол, никотинамид и подобные им соединения;

- красители нуклеиновых кислот, такие как: DAPI (диамидино-2-фенилиндол), пропидий йодид, флуоресцеиндиацетат и подобные соединения;

- антибиотики и другие дополнительные компоненты, такие как: доксициклин, сульфасалазин, куркумин, 6-аминокапроновая кислота, миноциклин, хитозан, фитиновая кислота, β -ситостерол, ц-АМФ, полилизин, биоханин А, демеклоциклин, хлортетрациклин, окситетрациклин, циклогексамид, рифампицин, соевое молоко, сурамин, N-масляная кислота, пеницилламин, N-ацетилцистеин, бензамидин, 2-аминоэтилбензилсульфонилфторид (AEBSF), включая, но не ограничиваясь этим.

9. Среда по п. 1, где pH стабилизирующего раствора может быть, в зависимости от сочетания входящих в его состав агентов и дополнительных компонентов, от 4 до 10, преимущественно от 6 до 8.

10. Устройство для сбора, хранения и транспортировки биологических образцов, содержащее среду по п. 1, которое представляет собой пробирки со средой по п. 1, причем стабилизирующий раствор, содержащий фиксирующий клеточную мембрану агент, входящий в состав среды по п. 1, расположен над тиксотропным гелем и/или указанный тиксотропный гель расположен под указанным стабилизирующим раствором.

11. Устройство по п. 10, представляющее собой вакуумные пробирки, в том числе стерильные, которое может содержать вакуум, предназначенный для аспирации биологического образца, при этом вакуумные пробирки предпочтительно могут обладать номинальной вместимостью 9,0 мл, 8,5 мл, 8,0 мл, 7,5 мл, 7,0 мл (типоразмер 16×100 мм), 6,0 мл, 5,5 мл, 5,0 мл (типоразмер 13×100 мм), 2,0 мл, 2,5 мл, 3,0 мл, 3,5 мл, 4,0 мл, 4,5 мл (13×75 мм), но не ограничиваясь этим.

12. Устройство по п. 10, в котором содержание разделительного геля преимущественно составляет от 0,3 до 2,5 г на пробирку, но не ограничиваясь этим.

13. Применение устройства по п. 10, содержащего среду по п. 1, для стабилизации внеклеточных нуклеиновых кислот до 15 суток при температуре от -20 до +37°C и до 12 месяцев при температуре от -86 до -20°C.

14. Применение по п. 13, где применение осуществляется посредством взаимодействия биологического образца, находящегося в устройстве по п. 10, с фиксирующим клеточную мембрану агентом, входящим в состав стабилизирующего раствора среды по п. 1, и разделительным гелем, который после центрифугирования в течение 10-30 мин при

2000-3600g создает разделительный барьер между надосадочной жидкостью и клетками, преимущественно плазмой и клетками крови, благодаря чему нуклеиновые кислоты в образце плазмы подходят для выделения и последующего анализа, включая, но не ограничиваясь, использованием ПЦР и проведением секвенирования.

5 15. Применение по п. 13, где применение включает в себя взятие биологического образца с возможностью хранения и транспортировки без центрифугирования до 24 ч после взятия при температуре от +4 до +37°C с последующим центрифугированием и далее хранением и транспортировкой от 5 до 15 суток при температуре от -20 до +37°C с возможностью после центрифугирования многократного замораживания/
10 размораживания образца с хранением при температуре от -86 до -20°C до 12 месяцев.

16. Применение по п. 13, где применение включает возможность хранения и транспортировки биологического образца без центрифугирования от 5 до 15 суток после взятия при температуре от +4 до +37°C и центрифугирование непосредственно перед отбором надосадочной жидкости, преимущественно плазмы, для удаления клеток,
15 внеклеточных структур и клеточного дэбриса с получением бесклеточной плазмы.

17. Применение по п. 13, где применение включает возможность хранения и транспортировки биологического образца без центрифугирования от 5 до 15 суток после взятия при температуре от +4 до +37°C с сохранением внеклеточных нуклеиновых кислот, а также циркулирующих клеток и/или внеклеточных структур в случае
20 необходимости.

25

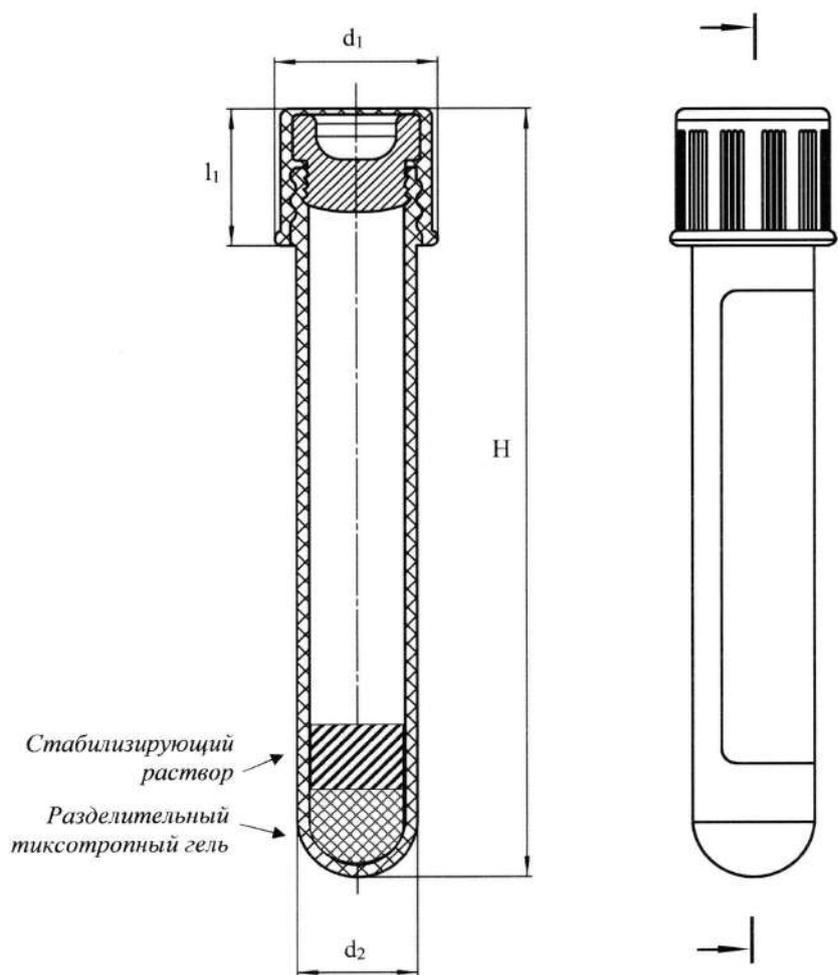
30

35

40

45

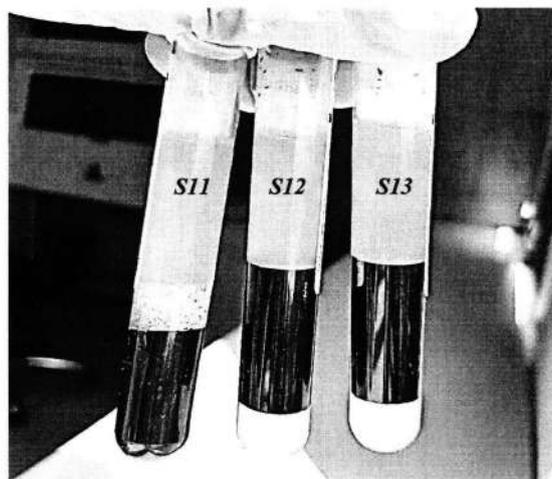
1



Типоразмер пробирок	Геометрические размеры, мм			
	d_1	d_2	l_1	H
13 × 75	17,00±4,00	12,00±3,00	14,45±5,10	81,15±11,50
13 × 100	17,00±4,00	12,00±3,00	14,45±5,10	106,15±13,80
16 × 100	18,00±4,50	14,32±3,45	15,09±6,20	106,09±13,80

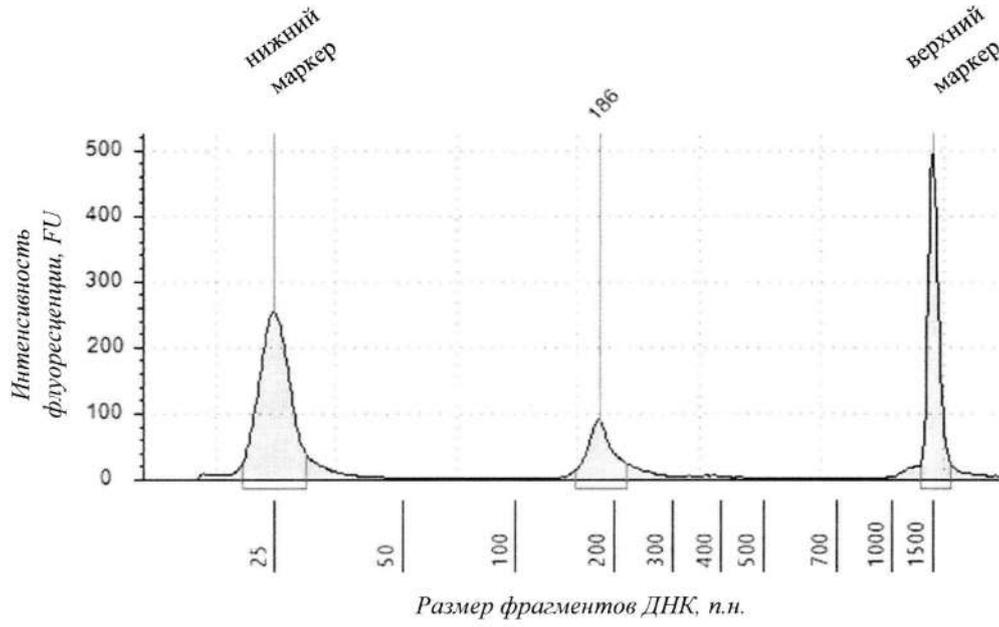
Фиг. 1

2

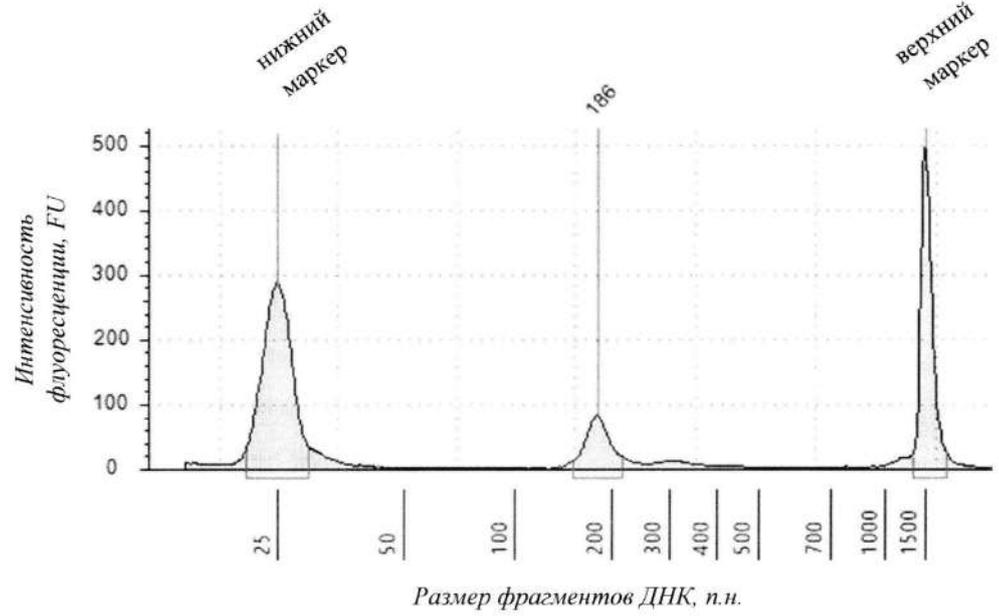


Фиг. 2

А. Пробирка S11, 0 сутки хранения

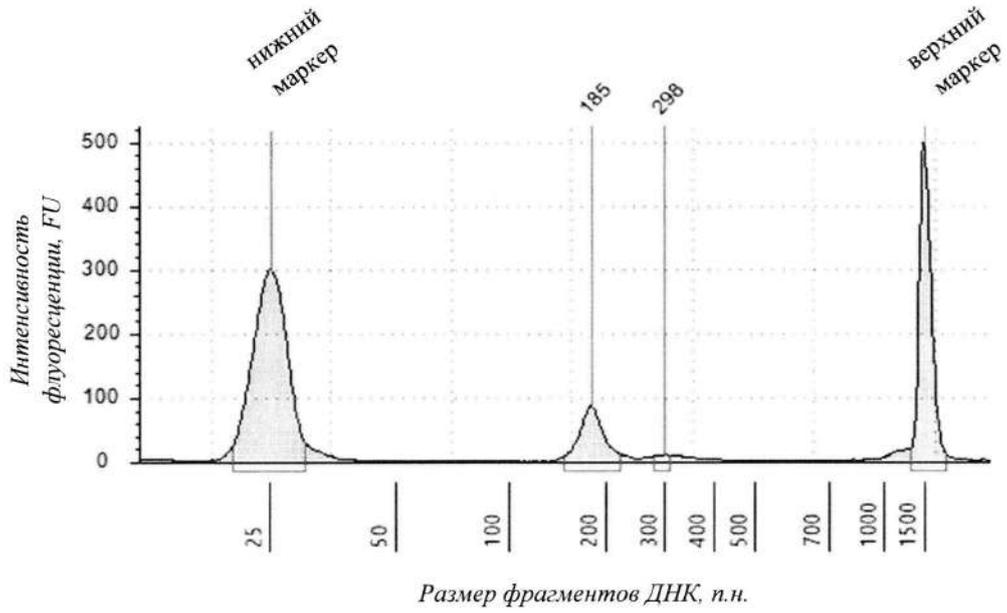


Б. Пробирка S12, 5 сутки хранения

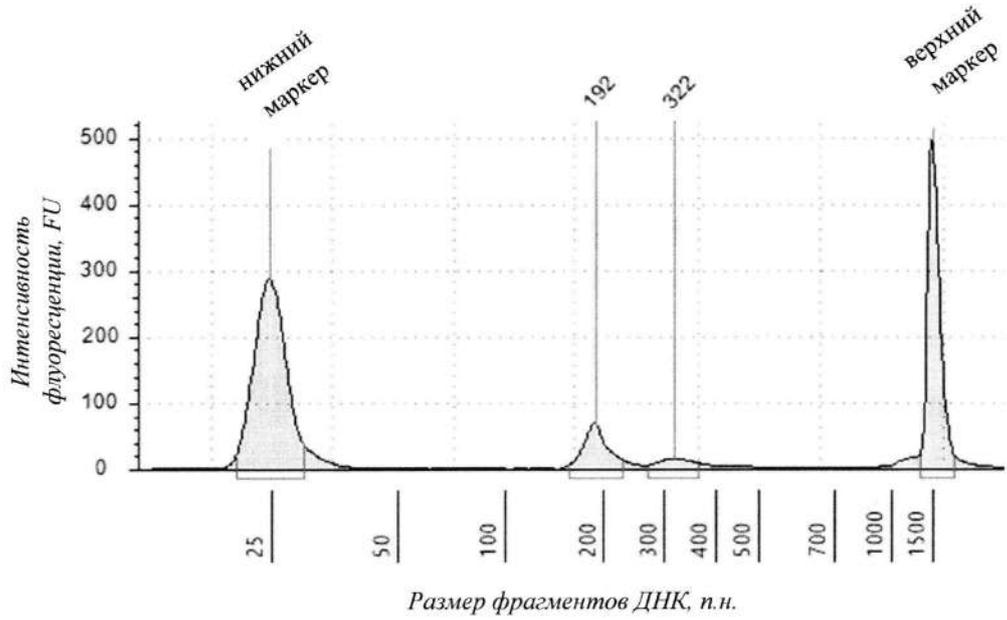


Фиг. 3

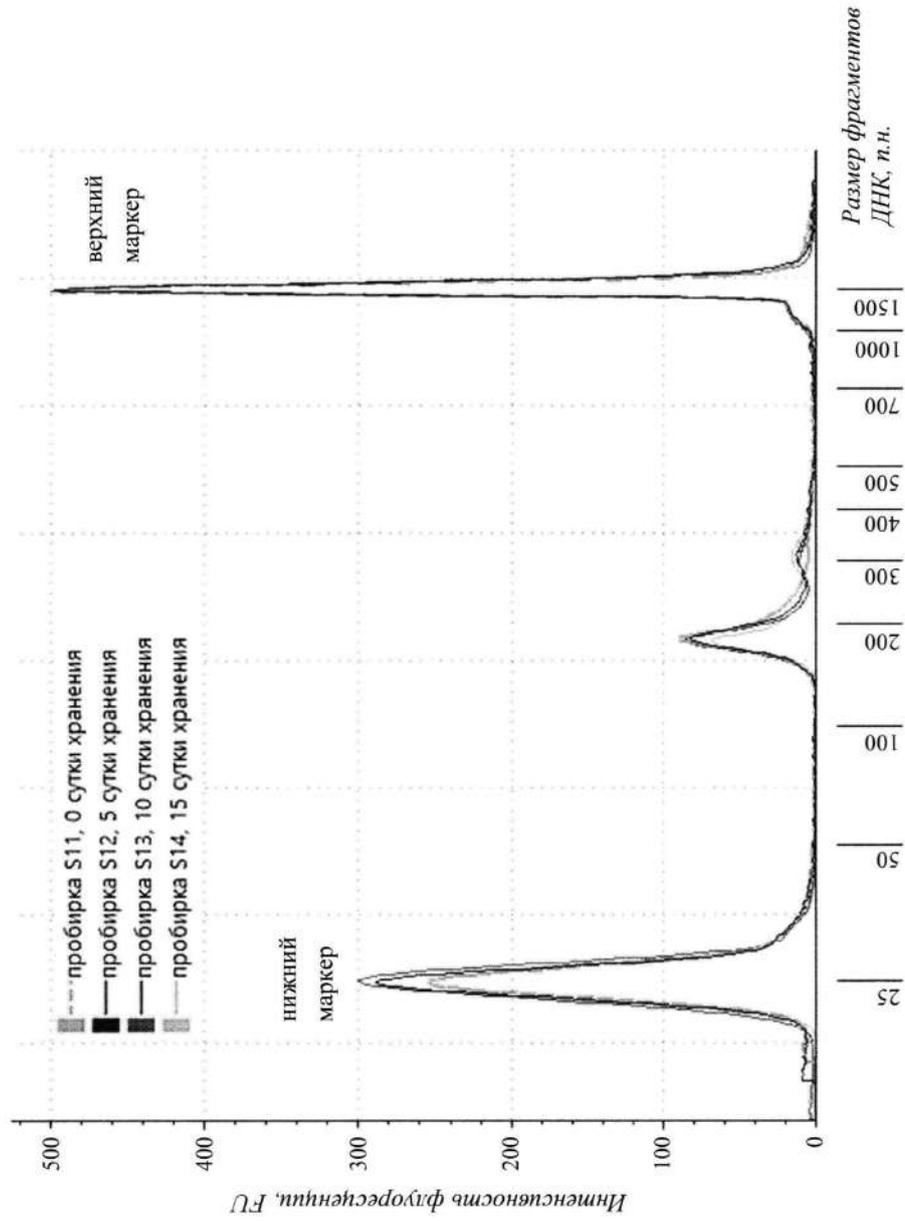
А. Пробирка S13, 10 сутки хранения



Б. Пробирка S14, 15 сутки хранения



Фиг. 4.



Фиг. 5