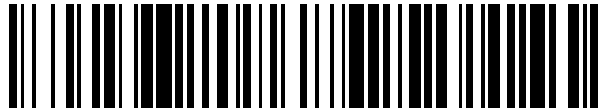


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 104**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2010 E 10782473 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2499259**

54 Título: **Estabilización del ARN y extracción del ARN presente en células intactas dentro de una muestra de sangre**

30 Prioridad:

09.11.2009 US 259363 P

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

24.05.2016

73 Titular/es:

**STRECK INC. (100.0%)
7002 South 109th Street
La Vista, NE 68128, US**

72 Inventor/es:

**RYAN, WAYNE, L. y
FERNANDO, M., ROHAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 571 104 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Estabilización del ARN y extracción del ARN presente en células intactas dentro de una muestra de sangre

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la identificación y aislamiento de ácidos nucleicos en muestras de sangre y, más en particular, a la estabilización del ARN celular dentro de una muestra de sangre.

Antecedentes de la invención

10 El ARN mensajero (ARNm) en una célula es una instantánea de la actividad a tiempo real de su genoma, que muestra los genes que se están expresando y en qué grado. La determinación del perfil de los patrones de expresión de ARNm celular generalmente se realiza mediante el uso de micromatrices, PCR a tiempo real
 15 cuantitativa con transcriptasa inversa y balizas moleculares. La determinación del perfil del ARNm celular cada vez es más importante en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades, y en ensayos clínicos para el descubrimiento de biomarcadores. Esta determinación del perfil del ARNm celular se ha basado en tumores y otros materiales de biopsia procedentes de tejidos afectados y no afectados. Sin embargo, es posible que estos tejidos de biopsia no puedan estar fácilmente disponibles, y la toma de muestras a menudo requiere procedimientos muy invasivos sobre el cuerpo humano. Por tanto, se ha explorado la sangre periférica y las células sanguíneas humanas como una fuente posible de material para determinar el perfil de expresión genético, las cuales pueden estar disponibles con facilidad a través de un procedimiento relativamente no invasivo. Algunas cuestiones inherentes al perfil genético en las células sanguíneas presentan un potencial significativo para influir en la interpretación de los datos. Una de estas cuestiones se relaciona con la manipulación de muestras sanguíneas *ex vivo* antes de la extracción del ARNm. Los niveles de expresión de muchos genes en células sanguíneas pueden verse afectados de modo adverso por la incubación *ex vivo*, debido al estrés metabólico provocado por la falta de oxígeno y fuentes de glucosa. La consecuencia de una flebotomía provoca la degradación simultánea de las moléculas de ARNm y la sobrerregulación no intencionada de ciertos genes. Otra cuestión se relaciona con el procedimiento, ampliamente utilizado, para obtener el ARN total de las células sanguíneas, que incluye una centrifugación en gradiente de densidad para aislar los leucocitos. Este procedimiento necesita un equipo que no suele estar disponible en un entorno clínico típico y puede requerir el transporte a otro emplazamiento para el necesario procesamiento. Esto provoca retrasos en el procesamiento de la muestra y puede crear cambios significativos en los perfiles de expresión génica. Las anteriores observaciones enfatizan la importancia de desarrollar dispositivos de recolección de sangre capaces de estabilizar la expresión de ARNm inmediatamente después de la extracción de sangre. Mediante la inhibición del metabolismo celular y la acción de las nucleasas (ARNasa) se puede solucionar con facilidad la degradación del ARN y los cambios en el perfil de expresión del ARNm después de una flebotomía.

25 Se han presentado varias tecnologías más recientes cuyo objetivo es estabilizar el ARN de sangre completa después de una flebotomía. Estos dispositivos son capaces de inhibir la actividad ARNasa en células sanguíneas y el metabolismo celular lisando todas las células sanguíneas en el momento de su recolección y, así, estabilizar el perfil de expresión del ARN. Sin embargo, existen algunas desventajas inherentes en estos dispositivos de recolección de sangre. Puesto que todas las células sanguíneas se lisan en el momento de la recolección, se produce una significativa introducción de ARNm de α - y β -globina que se libera desde los reticulocitos, que interfiere con las metodologías de detección de micromatrices y de PCR a tiempo real. Una cantidad excesiva de ARNm de globina procedente de la sangre completa disminuye la sensibilidad de detección del transcrito de ARNm y aumenta la variación de la señal en las micromatrices. Otra desventaja significativa de estos dispositivos es la incapacidad para utilizar la tecnología de balizas moleculares, en la que resulta imprescindible tener células intactas para poder visualizar la tinción fluorescente específica de genes mediante una histología o mediante una citometría de flujo. Para salvar estos problemas son necesarios otros procedimientos para reducir el ARNm de globina de las muestras de ARN sangre completa obtenidas utilizando estos dispositivos de recolección de sangre. Como resultado, se produce un aumento de los costes y se necesita más tiempo para la preparación de las muestras.

35 Una serie de documentos de patentes tratan sobre procedimientos para la estabilización y la identificación de ácidos nucleicos y otros materiales celulares, y sus aplicaciones diagnósticas. Véanse, en general, las patentes de EEUU n.^{os} 5.459.253; 6.043.032; 6.168.922; 6.218.531; 6.602.718; 6.645.731; 6.821.789; 7.282.371; 7.332.288; 7.445.901; y las publicaciones de patentes de EEUU n.^{os} 2006/0105372; 2006/0194192; 2008/0119645; y 2008/0318801. No obstante lo anterior, sigue siendo necesario desarrollar un dispositivo de recolección de sangre que establezca los perfiles de expresión del ARNm inmediatamente después de extraer sangre, inhibiendo completamente el metabolismo celular y estabilizando las células sanguíneas nucleadas permitiendo, al mismo tiempo, que las células sanguíneas permanezcan intactas. Este dispositivo permitiría el aislamiento de leucocitos por medio de metodologías ampliamente utilizadas sin comprometer el perfil de expresión génica original. El dispositivo proporcionaría también células intactas estabilizadas para su uso en la determinación del perfil de

expresión génica utilizando la tecnología de balizas moleculares.

El uso de conservantes donadores de formaldehído para la estabilización de células y tejidos se ha divulgado en las patentes de EEUU n.ºs 5.196.182; 5.260.048; 5.459.073; 5.811.099; 5.849.517; y 6.337.189. Aunque se conoce el uso de conservantes donadores de formaldehído para la fijación de células y tejidos, se ha demostrado que los donadores de formaldehído son menos eficaces para inhibir completamente el metabolismo celular al menos durante las primeras 24 horas después de una flebotomía. Además, el uso de conservantes donadores de formaldehído por sí solos no ha demostrado estabilizar los patrones de expresión del ARNm en las células dentro de una muestra de sangre después de una flebotomía. El documento US-A-2004/137417 divulga un tubo de ensayo para analizar ácidos nucleicos procedentes de células recolectadas en un estado conservado. El tubo comprende DU o IDU a una concentración preferida menor que 50%, y EDTA a una concentración preferida menor que 15%, y se sugiere el uso de inhibidores de ARNasa. El documento WO-A-2010/096323 divulga la determinación de ácidos nucleicos separados de células, poniendo en contacto una muestra de sangre con DU, ATA, NaF, gliceraldehído y EDTA.

La presente invención soluciona la necesidad de un procedimiento eficaz y de calidad constante para conservar una muestra de sangre que contiene ARN diagnósticamente útil, de modo que el ARN pueda aislarse y ensayarse con eficacia, que, de modo inesperado y sorprendente, da como resultado uno o más de los siguientes (en cualquier combinación): inhibición a corto plazo del metabolismo (concretamente, la síntesis de ARN); fijación del ARN celular dentro de las células sanguíneas para congelar el patrón de expresión del ARNm de las células sanguíneas; estabilización del ARN que se encuentra en el interior de las células sanguíneas frente a nucleasas y proteasas; prevención de la interferencia del ARN de globina y ARN separado de células; y fijación de las células sanguíneas para evitar la pérdida de ARN celular que se filtra desde los leucocitos durante el transporte o el almacenamiento de especímenes de sangre.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una estrategia exclusiva con respecto a la conservación, el aislamiento y el análisis de ácidos nucleicos. Un aspecto de la invención implica el uso de una composición exclusiva de un agente protector, según se define en las reivindicaciones, que incluye al menos un agente conservante que puede incluir un donador de formaldehído. El ácido nucleico es ARN. Las muestras a partir de las cuales pueden aislarse los ácidos nucleicos incluyen cualquier muestra de sangre. Los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos celulares (por ejemplo, ácidos nucleicos que están localizados dentro de células *in vivo*, en oposición los a ácidos nucleicos separados de células que se encuentran fuera de las células *in vivo*). El procedimiento descrito en la presente memoria permite la conservación y el aislamiento eficaces de ácidos nucleicos celulares, al mismo tiempo que evita la contaminación con ARNm de globina y ácidos nucleicos separados de células no deseados que se origina en localizaciones extracelulares *in vivo* (comparado con el ARN celular que se convierte en ARN separado de células debido al metabolismo celular y la lisis celular después de la extracción de sangre).

En un primer aspecto, la presente descripción contempla un procedimiento de selección para la identificación de un estado de enfermedad. El procedimiento de selección incluye la etapa de poner en contacto una muestra de sangre extraída que incluye una pluralidad de células sanguíneas, con un agente protector, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para que la síntesis de ARN se inhiba durante al menos dos horas. El tiempo de contacto con el agente protector y la cantidad de agente protector utilizada también puede ser suficiente para que las células sanguíneas de la muestra de sangre extraída se fijen para evitar sustancialmente la contaminación del ARN celular con ARN separado de células o ARNm de globina. Además, cualquier ARN celular que esté dentro de las células sanguíneas en el momento de la extracción de sangre puede conservarse sustancialmente para congelar sustancialmente el patrón de expresión del ARNm de las células sanguíneas tal como está en el momento de la extracción de sangre (por ejemplo, no más que 10 minutos después de la extracción de sangre o incluso no más que 5 minutos después de la extracción de sangre). El procedimiento de selección también puede incluir la etapa de aislar los leucocitos de la sangre completa lisando los eritrocitos y aislando los leucocitos. Los leucocitos aislados después pueden tratarse para extraer el ARN celular de los leucocitos aislados.

El agente protector analizado anteriormente incluye un agente conservante, que incluye diazolidinil urea y, opcionalmente, otros agentes seleccionados del grupo que consiste en: imidazolidinil urea, dimetolil-5,5-dimetilhidantoína, dimetilol urea, 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol, oxazolidinas, hidroximetilglicinato de sodio, 5-hidroximetoximetil-1-1-aza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, 5-hidroximetil-1-1-aza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, 5-hidroxipoli[metileno]metil-1-1-aza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, adamantina cuaternaria, y cualquiera de sus combinaciones. El agente protector también incluye los inhibidores metabólicos, fluoruro de sodio y gliceraldehído, y opcionalmente uno o más de otros inhibidores metabólicos seleccionados del grupo que consiste en: dihidroxiacetona fosfato, gliceraldehído 3-fosfato, 1,3-bisfosfoglicerato, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, piruvato y glicerato dihidroxiacetato, K₂C₂O₄ y cualquiera de sus combinaciones. El agente protector incluye también el inhibidor de nucleasas ácido aurintricarboxílico (ATA), y puede comprender

opcionalmente uno o más inhibidores de nucleasas distintos seleccionados del grupo que consiste en: ditioneitol (DTT), yodoacetamida, ácido yodoacético, heparina, quitosano, cloruro de cobalto, pirocarbonato de dietilo, etanol, gliceraldehídos, fluoruro de sodio, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), formamida, complejos de vanadil-ribonucleósido, macaloide, hidroxilamina-oxígeno-ion cúprico, bentonita, sulfato de amonio, beta-mercaptoetanol, 5 cisteína, ditioneitol, hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfeno, un catión divalente, tal como Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} y cualquiera de sus combinaciones.

El agente protector también puede incluir un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: isoleucina, leucina, lisina, valina, triptófano, treonina, fenilalanina, metionina, alanina, histidina, asparagina, aspartato, 10 cisteína, glutamato, glutamina, glicina, prolina, serina, tirosina, arginina, y cualquiera de sus combinaciones. El agente protector puede incluir una sustancia para aumentar la permeabilidad de las membranas celulares, tal como glicerol, sulfóxido de dimetilo, cloroquina, BC-30 Tx y cualquiera de sus combinaciones. El agente protector también incluye el quelante de iones metálicos ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y puede comprender además uno o más quelantes de iones metálicos seleccionados del grupo que consiste en: ácido 15 etilenglicoltetraacético (EGTA), tetraacetoximetil éster del ácido 1,2-bis-(o-aminofenoxi)-etan-N,N',-N',-tetraacético (BAPTA-AM), dietilditiocarbamato (DEDTC), y cualquiera de sus combinaciones. El agente protector también puede incluir un neutralizador del estrés oxidativo seleccionado del grupo que consiste en: N-acetil-L-cisteína, D-manitol y cualquiera de sus combinaciones. El agente protector también puede incluir glicina. El agente protector también puede incluir un inhibidor de proteasas seleccionado del grupo que consiste en: antipaina, 20 aprotinina, quimostatina, elastatinal, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), APMSF, TLCK, TPCK, leupeptina, inhibidor de tripsina de soja, ácido indolacético (IAA), E-64, pepstatina, VdLPPFVdL, EDTA, 1,10-fenantrolina, fosforamodona, amastatina, bestatina, diprotina A, diprotina B, alfa-2-macroglobulina, inhibidor de tripsina de haba, inhibidor de proteasas pancreáticas, ovostatina de la clara de huevo, cistatina de la clara de huevo, y cualquiera de sus combinaciones. El agente protector también puede incluir un inhibidor de fosfatasas 25 seleccionado del grupo que consiste en: caliculina A, nodularina, NIPP-1, microcistina LR, tautomicina, ácido okadaico, cantaridina, microcistina LR, ácido okadaico, fostriecina, tautomicina, cantaridina, endotal, nodularina, ciclosporina A, complejos de FK 506/inmunofilina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, bpV(feno), defostatina, mpV(pic) DMHV, ortovanadato de sodio y cualquiera de sus combinaciones.

Tal como se analizó anteriormente, el procedimiento de selección puede incluir las etapas de aislar los leucocitos, extraer el ARN de los leucocitos aislados, y analizar el ARN extraído. La etapa de aislamiento, la etapa de análisis, 30 o ambas, pueden producirse al menos 2 horas después de extraer la muestra de sangre. Cualquiera o ambas de las etapas de aislamiento y de análisis pueden producirse sin congelar la muestra de sangre (por ejemplo, hasta una temperatura menor que aproximadamente $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (más preferiblemente menor que aproximadamente $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$)). Cualquiera o ambas de las etapas de aislamiento y de análisis pueden producirse al menos 3 días después de extraer la muestra de sangre.

La etapa de contacto inicial puede producirse en un tubo de recolección de sangre hacia el cual se extrae la muestra de sangre. La etapa de contacto puede realizarse a medida que la muestra de sangre se extrae. La etapa de contacto puede ser suficiente para que, después de un periodo de al menos 3 días desde el momento en que se extrae la muestra de sangre, la cantidad de ARN presente en la muestra de sangre sea al menos aproximadamente 90% de la cantidad del ARN presente en la muestra de sangre en el momento en que se extrae la muestra de sangre. La etapa de contacto puede ser suficiente para que, después de un periodo de al menos 3 días desde el momento en que se extrae la muestra de sangre, la cantidad de ARN presente en la muestra de sangre sea aproximadamente 100% de la cantidad del ARN presente en la muestra de sangre en el momento en que se extrae la muestra de sangre. La etapa de contacto puede ser suficiente para que, después de un periodo de al menos 3 días desde el momento en que se extrae la muestra de sangre, la concentración de ARN con relación al ácido nucleico total en la muestra de sangre que esté presente sea al menos 10 veces la cantidad de ARN que estaría presente en ausencia de la etapa de contacto. La etapa de contacto puede ser suficiente para que, después de un periodo de al menos 3 días desde el momento en que se extrae la muestra de sangre, la concentración de ARN con relación al ácido nucleico total en la muestra de sangre que esté presente sea al menos de aproximadamente 20 a 50 veces la cantidad de ARN que estaría presente en ausencia de la etapa de contacto.

El agente conservante puede añadirse al tubo de recolección de sangre antes de extraer la sangre, y pueden añadirse uno o más componentes adicionales al tubo de recolección de sangre después de extraer la sangre. Todos los componentes del agente protector pueden añadirse a un tubo de recolección de sangre después de extraer la sangre. El agente conservante y uno o más inhibidores de nucleasas pueden colocarse dentro de un tubo de recolección de sangre en una forma sustancialmente sólida antes de extraer la sangre. Todos los componentes del agente protector pueden colocarse dentro de un tubo de recolección de sangre en una forma sustancialmente sólida antes de extraer la sangre. El agente protector puede estar formado por múltiples componentes que pueden añadirse a un tubo de recolección de sangre por separado o simultáneamente antes de la extracción de la sangre o después de la extracción de la sangre, de modo que el ARN celular dentro de las células sanguíneas de la muestra

de sangre extraída permanezca intacto.

La etapa del procedimiento de selección que consiste en el aislamiento de los leucocitos de una muestra de sangre extraída puede incluir las etapas de lisar los eritrocitos, lisar los leucocitos, o ambas. El método de selección puede incluir además una etapa de análisis (por ejemplo, en cantidad, calidad, o ambas) del ARN extraído para detectar la presencia, la ausencia o la gravedad de un estado de enfermedad.

El procedimiento de selección de la presente invención proporciona un procedimiento para conservar una muestra de sangre que contiene ARN diagnósticamente útil, de modo que el ARN puede aislarse y ensayarse de modo eficaz. La técnica de conservación produce la inhibición a corto plazo del metabolismo (concretamente, la síntesis de ARN), la fijación del ARN celular dentro de las células sanguíneas para congelar el patrón de expresión del ARNm de las células sanguíneas, la protección del ARN que se encuentre en el interior de las células sanguíneas frente a nucleasas y proteasas, la prevención de la interferencia no deseada del ARN de globina y ARN separado de células, y la fijación de las células sanguíneas para evitar la pérdida de ARN celular que se filtra desde los leucocitos durante el transporte o el almacenamiento de especímenes de sangre.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación gráfica que muestra la inhibición del metabolismo en células sanguíneas empleando la concentración de glucosa como indicador del metabolismo.

La figura 2 es una representación gráfica que muestra la eficacia de los inhibidores de nucleasas presentes en el dispositivo de recolección de sangre para inhibir la actividad ARNasa presente en una muestra de plasma.

La figura 3 es una representación gráfica que muestra la inhibición de la sobreexpresión no intencionada de ARNm de c-fos en una muestra de sangre recolectada según la presente invención, comparado con la recolección en un dispositivo de recolección de sangre con EDTA convencional. Se empleó la tecnología de PCR de transcriptasa inversa a tiempo real para detectar el número de copias del ARNm de c-fos.

La figura 4 es una representación gráfica que muestra la inhibición de la sobreexpresión no intencionada de ARNm para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) en una muestra de sangre recolectada según la presente invención, comparado con la recolección en un dispositivo de recolección de sangre con EDTA convencional. Se empleó la tecnología de PCR de transcriptasa inversa a tiempo real para detectar el número de copias del ARNm de GAPDH.

La figura 5 es una representación gráfica que muestra la inhibición de la sobreexpresión no intencionada de ARNm para RASSF1A en una muestra de sangre recolectada según la presente invención, comparado con la recolección en un dispositivo de recolección de sangre con EDTA convencional. Se empleó la tecnología de PCR de transcriptasa inversa a tiempo real para detectar el número de copias del ARNm de RASSF1A.

La figura 6 es una representación gráfica que muestra la inhibición de la sobreexpresión no intencionada de ARNm para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) en una muestra de sangre recolectada según la presente invención, comparado con la recolección en un dispositivo de recolección de sangre con EDTA convencional. Se empleó una baliza molecular para el ARNm de GAPDH para detectar el ARNm de GAPDH en células intactas empleando una citometría de flujo.

Descripción detallada

En general, la presente invención contempla una estrategia exclusiva para la estabilización, el aislamiento y el análisis de ARN celular. La etapa de estabilización actúa para inhibir la sobreexpresión y la sobreexpresión no deseada de genes después de la extracción de sangre, y para proteger la calidad de los ácidos nucleicos recuperables con relación a muestras que no están estabilizadas, y así mejorar la sensibilidad de detección analítica del ARN aislado y sus capacidades diagnósticas resultantes.

En un aspecto, la estrategia exclusiva emplea una composición particular que incluye un conservante, en combinación con uno o más inhibidores metabólicos, uno o más inhibidores de nucleasas, uno o más quelantes de iones metálicos, o sus combinaciones. En otro aspecto, la estrategia exclusiva de la presente memoria contempla procedimientos que incluyen una etapa de poner en contacto una muestra de sangre con las presentes composiciones. Una muestra que se ha sometido a esta etapa de toma de contacto después puede analizarse. Así, el procedimiento de la presente invención puede implicar las etapas de estabilizar una muestra de sangre, aislar una o más células sanguíneas de la muestra de sangre estabilizada, extraer los ácidos nucleicos celulares de las células sanguíneas aisladas, y analizar estos ácidos nucleicos para la identificación de un estado de enfermedad. La etapa de estabilización incluye poner en contacto la muestra de sangre con un agente protector en una cantidad y durante un tiempo suficiente para que la síntesis de ARN se inhiba al menos parcialmente, sino completamente,

durante al menos dos horas. El tiempo de contacto con el agente protector y la cantidad de agente protector utilizada también puede ser suficiente para que las células sanguíneas de la muestra de sangre se fijen para evitar sustancialmente la contaminación del ARN celular con ARN separado de células o ARNm de globina. Además, cualquier ARN celular que esté dentro de las células sanguíneas en el momento de la extracción de sangre puede conservarse sustancialmente para congelar sustancialmente el patrón de expresión del ARNm de las células sanguíneas tal como está en el momento de la extracción de sangre (por ejemplo, no más que 10 minutos después de la extracción de sangre o incluso no más que 5 minutos después de la extracción de sangre). El procedimiento de aislamiento puede incluir lisar los eritrocitos y lisar los leucocitos. Los leucocitos aislados después pueden tratarse para extraer el ARN celular de los leucocitos aislados, y el ARN extraído puede analizarse para detectar la presencia, la ausencia o la gravedad de un estado de enfermedad. Los procedimientos descritos en la presente memoria permiten la conservación, el aislamiento y el análisis eficaces de ácidos nucleicos celulares, al mismo tiempo que evitan la contaminación con ARN de globina y ácidos nucleicos separados de células no deseados que se originan en localizaciones extracelulares *in vivo* (comparado con el ARN celular que se convierte en ARN separado de células debido al metabolismo celular y la lisis celular después de la extracción de sangre).

El procedimiento para mejorar la conservación de ácidos nucleicos dentro de una muestra de sangre puede emplear una etapa de poner en contacto una muestra de sangre con un agente protector que contiene uno o más agentes conservantes para mantener la integridad de los componentes dentro de la muestra. Los ingredientes que pueden utilizarse como agentes conservantes incluyen, pero no se limitan a diazolidinil ureaimidazolidinil urea, dimetiloil- 5,5-dimetilhidantoína, dimetilol urea, 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol, oxazolidinas, hidroximetilglicinato de sodio, 6-hidroximetoximetil-1-1-aza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, 5-hidroximetil-1-1-aza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, 5-hidroxipoli[metileno]metil-1-1-aza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, adamantina cuaternaria, o cualquiera de sus combinaciones. Los ingredientes preferidos se seleccionan del grupo que consiste en diazolidinil urea (DU), imidazolidinil urea (IDU), y cualquiera de sus combinaciones. La cantidad de agente conservante utilizada en general es de aproximadamente 10 a aproximadamente 400 gramos por litro. Por ejemplo, el agente protector comprende de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 gramos de IDU por 100 ml de disolución salina tamponada y/o de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 gramos de DU por 100 de disolución salina tamponada. El agente conservante puede estar presente en el agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,01 g por 5 ml de muestra de sangre después la extracción de la sangre. El agente conservante puede estar presente en el agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 0,20 g por 5 ml de muestra de sangre después la extracción de la sangre. La concentración del agente conservante dentro del agente protector puede ser mayor que aproximadamente 5% en p/v antes de extraer la sangre. La concentración del agente conservante dentro del agente protector puede ser menor que aproximadamente 40% en p/v antes de extraer la sangre.

Tal como se emplea a través de las presentes indicaciones, la composición de agente protector que incluye el agente conservante analizado anteriormente es preferible y sustancialmente no tóxica. Por ejemplo, aunque muchas técnicas de conservación de células emplean productos de formaldehído para la fijación, en los procedimientos en la presente memoria (y las composiciones empleadas en la presente memoria) no es necesario añadir por separado y/o manipular ninguna concentración materialmente significativa (por ejemplo, menor que aproximadamente 1% en peso, más preferiblemente menor que aproximadamente 2000 partes por millón, más preferiblemente menor que aproximadamente 1000 partes por millón, y aún más preferiblemente menor que aproximadamente 500 partes por millón) de formaldehído y/o paraformaldehído antes de que se produzca ningún contacto con una muestra de un producto sanguíneo.

Para proteger aún más a los ácidos nucleicos frente a la degradación, el agente protector también incluye uno o cualquier combinación de un permeabilizador de la membrana celular, un inhibidor de ADNasa y/o ARNasa, un quelante de iones metálicos, un neutralizador del estrés oxidativo, un inhibidor metabólico, un aminoácido, un polímero catiónico o una poliamina. También es posible evitar que uno o más componentes del agente protector puedan ponerse en contacto con uno o más componentes distintos del agente protector. Esto puede lograrse añadiendo dichos uno o más componentes a una muestra de sangre en diferentes momentos, o añadiendo dichos uno o más componentes a un recipiente en fases o localizaciones que no permitan que dichos uno o más componentes se pongan en contacto entre sí antes de la extracción de sangre. Esto puede ayudar a prevenir reacciones no deseadas entre dichos uno o más componentes antes de ponerse en contacto con una muestra de sangre.

El agente protector contiene el inhibidor de nucleasas ácido aurintricarboxílico (ATA), que actúa para prevenir la actividad ADNasa y/o ARNasa dentro de una muestra de sangre. El inhibidor de nucleasas está presente preferiblemente en una cantidad suficiente para evitar una disminución en la cantidad y/o la calidad de los ácidos nucleicos que pueden recuperarse de la muestra de sangre, comparado con una muestra que no incluya un inhibidor de nucleasas. Otros inhibidores de nucleasas que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a ditiotreitil (DTT), yodoacetamida, ácido yodoacético, heparina, quitosano, cloruro de cobalto, pirocarbonato de

5 dietilo, etanol, gliceraldehídos, fluoruro de sodio, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), formamida, complejos de vanadil-ribonucleósido, macaloide, hidroxilamina-oxígeno-ion cúprico, bentonita, sulfato de amonio, beta-mercaptoetanol, cisteína, ditioeritritol, hidrocloreto de tris(2-carboxietil)fosfeno, un catión divalente, tal como Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Ca^{+2} , Cu^{+2} o cualquiera de sus combinaciones. Pueden estar presentes uno o más inhibidores de nucleasas dentro del agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,1% en peso. Un inhibidor de nucleasas puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 60% en peso. El inhibidor de nucleasas puede estar presente en el agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,00008 g por 5 ml de muestra de sangre después la extracción de la sangre. El inhibidor de nucleasas puede estar presente en el agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 0,2 g por 5 ml de muestra de sangre después la extracción de la sangre. La concentración del inhibidor de nucleasas dentro del agente protector puede ser mayor que aproximadamente 0,018% en p/v antes de extraer la sangre. La concentración del inhibidor de nucleasas dentro del agente protector puede ser menor que aproximadamente 5,0% en p/v antes de extraer la sangre. La concentración del inhibidor de nucleasas dentro del agente protector puede ser mayor que aproximadamente 0,5% en p/v antes de extraer la sangre. La concentración del inhibidor de nucleasas dentro del agente protector puede ser menor que aproximadamente 2,0% en p/v antes de extraer la sangre. La concentración del inhibidor de nucleasas dentro del agente protector puede ser de aproximadamente 0,2% en p/v a aproximadamente 2,0% en p/v antes de extraer la sangre.

20 El agente protector también incluye los inhibidores metabólicos fluoruro de sodio y gliceraldehído, en una cantidad adecuada para reducir el metabolismo celular dentro de una muestra de sangre. Otro inhibidores metabólicos que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a dihidroxiacetona fosfato, gliceraldehído 3-fosfato, 1,3-bisfosfoglicerato, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, piruvato y glicerato dihidroxiacetato, $K_2C_2O_4$ o cualquiera de sus combinaciones. Pueden estar presentes uno o más inhibidores metabólicos dentro del agente protector a una concentración mayor que aproximadamente 0,1% en p/v. Pueden estar presentes uno o más inhibidores metabólicos dentro del agente protector a una concentración menor que aproximadamente 40% en p/v. Pueden estar presentes uno o más inhibidores metabólicos dentro del agente protector a una concentración mayor que aproximadamente 1,0% en p/v. Un inhibidor metabólico puede estar presente dentro del agente protector a una concentración menor que aproximadamente 10% en p/v. La concentración de dichos uno o más inhibidores metabólicos dentro del agente protector puede ser de aproximadamente 2% en p/v a aproximadamente 6% en p/v.

30 El agente protector también incluye un quelante de iones metálicos, EDTA, y puede incluir uno o más quelantes distintos capaces de unirse con iones metálicos. El objetivo de dichos uno o más quelantes es unirse también con otros iones metálicos. El objetivo de dichos uno o más quelantes es minimizar también la actividad nucleasa y la degradación de los ácidos nucleicos resultante. La ruptura del ARN por la actividad ARNasa requiere la presencia de iones metálicos divalentes. Los quelantes de iones metálicos actúan uniéndose a los iones metálicos, inactivando con ello a los iones y reduciendo el efecto ARNasa de los iones metálicos. Los posibles quelantes de iones metálicos para su adición al agente protector incluyen, pero no se limitan a uno o cualquier combinación de ácido etilenglicoltetraacético (EGTA), tetraacetoximetil éster del ácido 1,2-bis-(o-aminofenoxi)-etan-N,N',N',N'-tetraacético (BAPTA-AM), dietilditiocarbamato (DEDTC), ácido dicarboximetilglutámico, ácido nitrilotriacético (NTA), o ácido etilendiaminodisuccínico (EDDS). Un quelante de iones metálicos puede estar presente dentro del agente protector a una concentración mayor que aproximadamente 0,1 % en p/v. Un quelante de iones metálicos puede estar presente dentro del agente protector a una concentración menor que aproximadamente 40% en p/v. Un quelante de iones metálicos puede estar presente dentro del agente protector a una concentración mayor que aproximadamente 1 % en p/v. Un quelante de iones metálicos puede estar presente dentro del agente protector a una concentración menor que aproximadamente 20% en p/v. La concentración de dichos uno o más quelantes de iones metálicos puede ser de aproximadamente 4% a aproximadamente 12% en p/v.

45 Tal como se mencionó anteriormente, es posible que la composición del agente protector emplee una sustancia para provocar la permeabilización de la membrana celular para intentar aumentar la captación de las células sanguíneas por el agente protector, mejorando con ello la fijación. Una sustancia de permeabilización seleccionada, en general, debería actuar para mejorar la capacidad de la membrana celular para permitir, de modo selectivo, el acceso al agente protector, pero manteniendo la estructura celular deseada y evitando el daño a las proteínas de la superficie celular. Los ejemplos de estas sustancias de permeabilización de células pueden incluir, pero no se limitan a uno o cualquier combinación de glicerol, cloroquina, ceteth-15 ($C_{56}H_{114}O_{21}$), Triton X-100 ($C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)$), o saponina. Una sustancia de permeabilización puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,5% en peso. Una sustancia de permeabilización puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 40% en peso. Una sustancia de permeabilización puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,001% en peso. Una sustancia de permeabilización puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 10% en peso. Una sustancia de permeabilización puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,3% en peso.

El agente protector también puede incluir una sustancia que actúa para prevenir el estrés oxidativo. Se ha descubierto que los ácidos nucleicos, y el ARN en particular, son muy susceptibles al estrés oxidativo. Así, la adición de antioxidantes y/o captadores de especies de oxígeno reactivo (ROS) al agente protector puede ayudar a proteger al ARN celular frente a los efectos perjudiciales del daño oxidativo. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión "captador de especies de oxígeno reactivo (ROS)" se refiere a un grupo capaz de actuar como captador, o de reaccionar con el superóxido (O_2) u otras especies de oxígeno reactivo (ROS), que incluyen radicales hidroxilo, peroxinitrito, ácido hipocloroso y peróxido de hidrógeno. Otros ejemplos de dichos antioxidantes y captadores de especies de oxígeno reactivo incluyen, pero no se limitan a uno o cualquier combinación de polifenoles, tales como flavonoides, ácidos fenólicos, D-manitol, N-acetil-L-cisteína, antioxidantes fenólicos naturales (alfa-hidroxitirosol, tirosol, ácido cafeico, alfa-tocoferol), así como antioxidantes fenólicos naturales (BHT y BHA) o carotenoides. Un captador de ROS puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,1% en peso. Un captador de ROS puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 40% en peso. Un captador de ROS puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 2% en peso. Un captador de ROS puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 15% en peso.

El agente protector también puede incluir uno o más policaciones (preferiblemente poliaminas) en una cantidad adecuada de modo que sean capaces de unirse con cualquier de los ácidos nucleicos, evitando así la degradación de los ácidos nucleicos. Aunque los policaciones en general se unen a los ácidos nucleicos, muchos policaciones también alteran la estructura de la membrana celular, lo cual puede estar asociado con la pérdida de marcadores celulares localizados sobre la membrana celular. Las poliaminas son cationes que se sintetizan en la naturaleza que no comprometen la estructura de la membrana celular y, así, son muy preferidos por su capacidad de unirse específicamente al ARN celular, basándose en la naturaleza polianiónica del ARN. Cuando se unen al ARN, las poliaminas son capaces de proteger a los ácidos nucleicos frente a la actividad ARNasa. Las poliaminas que pueden añadirse incluyen, pero no se limitan a protamina, espermina, espermidina, putrescina, cadaverina, o cualquiera de sus combinaciones. Las poliaminas pueden estar presentes en el agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,003 g por 5 ml de muestra de sangre después la extracción de la sangre. Las poliaminas pueden estar presentes en el agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 0,1 g por 5 ml de muestra de sangre después la extracción de la sangre. La concentración de las poliaminas dentro del agente protector puede ser mayor que aproximadamente 77,5 mM antes de extraer la sangre. La concentración de las poliaminas dentro del agente protector puede ser menor que aproximadamente 1562,5 mM antes de extraer la sangre. La concentración de las poliaminas dentro del agente protector puede ser mayor que aproximadamente 5% en p/v antes de extraer la sangre. La concentración de las poliaminas dentro del agente protector puede ser menor que aproximadamente 50% en p/v antes de extraer la sangre.

También pueden incluirse otras clases de composiciones catiónicas (incluidas en las poliaminas analizadas anteriormente) en el agente protector. Ciertos polímeros catiónicos se emplean en procedimientos de transfección de ADN, tales como los descritos en la patente de EEUU n.º 6.013.240. La afinidad de estos polímeros catiónicos para unirse con los ácidos nucleicos puede ayudar a proteger a los ácidos nucleicos de la actividad nucleasa. Los polímeros catiónicos que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a polilisina, dendrímero de poliamidoamina, polietilenimina, poli(metacrilato de (dimetilamino)etileno) (pDMAEMA), polipropilenimina, o cualquiera de sus combinaciones. La PEI puede ser una PEI de bajo peso molecular, tal como de aproximadamente 400 g/mol a aproximadamente 1000 g/mol. Los polímeros catiónicos (poliaminas) pueden estar presentes en el agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,01 g por 5 ml de muestra de sangre después la extracción de la sangre. Las poliaminas pueden estar presentes en el agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 0,1 g por 5 ml de muestra de sangre después la extracción de la sangre. La concentración de las poliaminas dentro del agente protector puede ser mayor que aproximadamente 5% en p/v antes de extraer la sangre. La concentración de las poliaminas dentro del agente protector puede ser menor que aproximadamente 50% en p/v antes de extraer la sangre.

El agente protector también puede incluir uno o más aminoácidos que reaccionan de una manera similar a dichas una o más poliaminas analizadas anteriormente. Cuando se unen a los ácidos nucleicos celulares, los aminoácidos pueden proteger a los ácidos nucleicos frente a una actividad nucleasa perjudicial. Los aminoácidos pueden incluir, pero no se limitan a isoleucina, leucina, lisina, valina, triptófano, treonina, fenilalanina, metionina, alanina, histidina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, prolina, serina, tirosina, arginina, o cualquiera de sus combinaciones. Pueden estar presentes uno o más aminoácidos dentro del agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,001% en peso. Pueden estar presentes uno o más aminoácidos dentro del agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 30% en peso. Pueden estar presentes uno o más aminoácidos dentro del agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,1% en peso. Pueden estar presentes uno o más aminoácidos dentro del agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 10% en peso.

El agente protector también puede incluir uno o más compuestos inhibidores de proteasas para inhibir la actividad enzimática que pueda tener efectos perjudiciales sobre la integridad de cualquier ácido nucleico presente en una muestra de sangre. Estos compuestos inhibidores de proteasas pueden incluir, pero no se limitan a antipaina, aprotinina, quimostatina, elastatinal, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), APMSF, TLCK, TPCK, leupeptina, 5 inhibidor de tripsina de soja, ácido indolacético (IAA), E-64, pepstatina, VdLPPFVdL, EDTA, 1,10-fenantrolina, fosforamodona, amastatina, bestatina, diprotina A, diprotina B, alfa-2-macroglobulina, inhibidor de tripsina de haba, inhibidor de proteasas pancreáticas, ovostatina de la clara de huevo, cistatina de la clara de huevo, o cualquiera de sus combinaciones. Las combinaciones de inhibidores de proteasas, denominadas habitualmente "cóctel de inhibición de proteasas" por los suministradores comerciales de dichos inhibidores, también pueden 10 utilizarse como agente estabilizante. Estos "cócteles" pueden ser en general ventajosos, porque proporcionan estabilización a una gama de proteínas de interés. Un inhibidor de proteasas puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,1% en peso. Un inhibidor de proteasas puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 40% en peso. Un inhibidor de proteasas puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,001% en peso. Un inhibidor de proteasas puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 10% en peso. Un inhibidor de proteasas puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,1% en peso.

El agente protector también puede incluir uno o más inhibidores de fosfatasas para inhibir la actividad enzimática que pueda tener efectos perjudiciales sobre la integridad de cualquier ácido nucleico presente en una muestra de 20 sangre. Estos compuestos inhibidores de fosfatasas pueden incluir, pero no se limitan a caliculina A, nodularina, NIPP-1, microcistina LR, tautomicina, ácido okadaico, cantaridina, caliculin A, miorocistina LR, ácido okadaico, fostriecina, tautomicina, cantaridina, endotal, nodularina, ciclosporina A, complejos de FK 506/inmunofilina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, bpV(feno), defostatina, mpV(pic) DMHV, ortovanadato de sodio o cualquiera de sus combinaciones. Un inhibidor de fosfatasas puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 0,1% en peso. Un inhibidor de fosfatasas puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 40% en peso. Un inhibidor de fosfatasas puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad mayor que aproximadamente 1% en peso. Un inhibidor de fosfatasas puede estar presente dentro del agente protector en una cantidad menor que aproximadamente 20% en peso.

30 El agente protector o cualquiera de las composición globales también pueden estar sustancialmente libres de sales de guanidino, dodecilsulfato de sodio (SDS), o cualquiera de sus combinaciones.

El contacto inicial de la muestra de sangre será durante un tiempo suficiente para inhibir una o ambas de la lisis celular y la actividad nucleasa, o cualquiera de sus combinaciones. El contacto puede producirse durante al menos aproximadamente 10 segundos, más preferiblemente al menos aproximadamente 1 minuto, aún más 35 preferiblemente al menos aproximadamente 2 minutos. El contacto también puede producirse durante periodos de tiempo más largos. Por ejemplo, el contacto puede comenzar sustancialmente al mismo tiempo que el momento de la extracción de sangre (por ejemplo, dentro de menos de aproximadamente 10 minutos de la extracción de sangre) y puede durar hasta que los ácidos nucleicos se hayan aislado, seleccionado y/o ensayado. La etapa de contacto también puede emplearse para proporcionar una muestra con una mayor caducidad. Así, es posible que 40 pueda transcurrir un lapso de tiempo de al menos aproximadamente 2 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 7 días, o incluso al menos aproximadamente 14 días entre el momento de la extracción de sangre (que puede realizarse sustancialmente al mismo tiempo que la etapa de contacto), y el momento de ensayar o seleccionar la muestra y/o del aislamiento de los ácido nucleicos. El agente protector puede comprender un agente activo en disolución. Los 45 disolventes adecuados incluyen agua, disolución salina, dimetilsulfóxido, alcohol o cualquiera de sus mezclas.

Los agentes protectores del ARN empleados en la presente invención incluyen uno o más agentes conservantes, uno o más inhibidores metabólicos, uno o más inhibidores de nucleasas, y uno o más quelantes de iones metálicos. La cantidad de cualquier agente conservante dentro del agente protector en general es al menos aproximadamente 10% en peso. La cantidad de cualquier agente conservante dentro del agente protector puede 50 ser en general menor que aproximadamente 70% en peso. El agente conservante puede comprender al menos aproximadamente 20% de IDU en peso, y en general menos de 40% de IDU en peso. El agente conservante puede comprender al menos aproximadamente 20% de DU en peso, y en general menos de 40% de DU en peso. El agente protector también puede incluir un quelante de iones metálicos, tal como al menos aproximadamente 5% de EDTA en peso. Por ejemplo, el agente protector puede contener aproximadamente 8% de EDTA en peso. El agente protector puede contener menos de aproximadamente 50% de EDTA en peso. El agente protector puede 55 incluir de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 30% en peso de uno o más inhibidores metabólicos. Por ejemplo, el agente protector puede incluir al menos aproximadamente 3% de gliceraldehído en peso, y al menos aproximadamente 0,1% de fluoruro de sodio en peso. El agente protector puede incluir de aproximadamente

0,001% a aproximadamente 20% en peso de uno o más inhibidores de nucleasas. Por ejemplo, el agente protector puede contener al menos aproximadamente 0,5% de ácido aurintricarboxílico (ATA) en peso. El agente protector puede contener menos de aproximadamente 5% de ácido aurintricarboxílico (ATA) en peso.

5 La cantidad de agente conservante con relación a la cantidad de EDTA es preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 partes (más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 partes) en peso de agente conservante a aproximadamente 1 parte en peso de EDTA. La cantidad de agente conservante con relación a la cantidad de inhibidores metabólicos puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 partes (más preferiblemente de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 partes) en peso de agente conservante a aproximadamente 1 parte en peso de inhibidores metabólicos. La cantidad de agente conservante con relación a la cantidad de inhibidores de nucleasas puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 30 partes (más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 22 partes) en peso de agente conservante a aproximadamente 1 parte en peso de inhibidores de nucleasas. La cantidad de agente protector dentro de un tubo u otro receptáculo para recibir un espécimen biológico antes de la extracción de sangre es preferiblemente de aproximadamente 300 a 1000 g/litro, y más preferiblemente de aproximadamente 400 a aproximadamente 700 g/litro.

20 La combinación de uno o más agentes conservantes, uno o más inhibidores metabólicos, uno o más inhibidores de nucleasas, y uno o más quelantes dentro del agente protector da como resultado una mayor capacidad para mantener la cantidad y la calidad del ARN dentro de una muestra de sangre. Se cree que estos resultados son inesperados y mejores que los resultados obtenidos mediante el uso de solo dichos uno o más agentes conservantes, solo dichos uno o más inhibidores metabólicos, solo dichos uno o más inhibidores de nucleasas, solo dichos uno o más quelantes o cualquier combinación que incluya al menos dos, pero menos de todos dichos uno o más agentes conservantes, dichos uno o más inhibidores metabólicos, dichos uno o más inhibidores de nucleasas, o dichos uno o más quelantes. Por tanto, se contempla que se produce un efecto sinérgico cuando uno o más agentes conservantes, uno o más inhibidores metabólicos, uno o más inhibidores de nucleasas, y uno o más quelantes de iones metálicos se combinan.

30 Además, múltiples componentes del agente protector pueden sufrir un proceso de liofilización, de modo que cada componente se añade antes o después de extraer la sangre en una forma sustancialmente sólida para evitar reacciones no deseadas entre uno o más componentes del agente protector. Se describen agentes similares en forma sustancialmente sólida y los dispositivos de selección de sangre asociados en la publicación de EEUU n.º 2010/0167271. Pueden realizarse técnicas de eliminación de líquidos sobre el agente protector para obtener un agente protector en estado sustancialmente sólido. Las condiciones de eliminación de líquidos pueden ser preferiblemente de tal modo que se obtenga la eliminación de al menos preferiblemente 50% en peso, más preferiblemente al menos preferiblemente 75% en peso, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 85% en peso de la cantidad original del agente protector líquido dispensado. Las condiciones de eliminación de líquidos pueden ser preferiblemente de tal modo que se obtenga la eliminación del líquido suficiente para que la composición resultante esté en forma de una película, gel u otra capa sustancialmente sólida o altamente viscosa; por ejemplo, puede obtenerse un revestimiento sustancialmente inmóvil (preferiblemente un revestimiento que pueda redisolverse o dispersarse de otro modo tras ponerlo en contacto con una muestra de producto sanguíneo). Por tanto, las condiciones de eliminación de líquidos pueden ser preferiblemente de tal forma que se obtenga un material en el que, tras el contacto con la muestra concreta (por ejemplo, una muestra de sangre), el agente protector se dispersará en la muestra y sustancialmente conserve los componentes (por ejemplo, ácidos nucleicos celulares) en la muestra. Las condiciones de eliminación de líquidos pueden ser preferiblemente de tal forma que el resto de la composición esté sustancialmente libre de cristalinidad; tenga una viscosidad que sea lo suficientemente alta para que el resto de la composición sea sustancialmente inmóvil a temperatura ambiente (por ejemplo, no muestre un flujo detectable visiblemente (que pueda detectar el ojo) cuando se conserva en un dispositivo de almacenamiento a temperatura ambiente con una inclinación de al menos aproximadamente 45° durante al menos una hora); o ambos. A este respecto, tal como se indicó en la anterior solicitud, también puede emplearse un colorante. En una realización, una o más poliaminas pueden combinarse antes de la liofilización y después liofilizarse. También pueden combinarse uno o más agentes conservantes con uno o más inhibidores de enzimas antes de la liofilización, y después los agentes conservantes y los inhibidores de enzimas combinados pueden liofilizarse. La liofilización de una o más poliaminas y uno o más agentes conservantes antes de cualquier contacto entre dichas una o más poliaminas y dichos uno o más agentes conservantes puede evitar cualquier efecto no deseado (por ejemplo, la pérdida de la función catiónica) que pueda producirse durante el contacto en cualquier forma sustancialmente líquida.

55 Un dispositivo de selección de sangre (por ejemplo, un recipiente de especímenes) puede incluir también una estructura para separar físicamente cualquier componente del agente protector que no deba ponerse en contacto con otro antes de la extracción de sangre. Este medio puede requerir la retirada después de la extracción de sangre o simplemente la ruptura después de que la muestra de sangre se coloque en el recipiente de especímenes.

- 5 El dispositivo de selección de sangre puede incluir un receptáculo que reciba una muestra de sangre y que sea sustancialmente transparente al menos en una porción de su área. El dispositivo puede incluir un primer extremo, un segundo extremo, una porción de base localizada a distancia entre el primer extremo y el segundo extremo que divide el receptáculo en una porción receptora y una porción de canal alargada, en el que el primer y el segundo extremo están ambos abiertos. El dispositivo puede incluir también la composición del agente protector colocada dentro del receptáculo, que es visible a través de la ventana sustancialmente transparente, y la composición del agente protector está en una forma sólida y localizada en la porción superior del receptáculo y con una concentración suficiente de modo que, tras el contacto con la muestra de sangre, la composición del agente protector se dispersa en la muestra y conserva sustancialmente los componentes de leucocitos en la muestra.
- 10 El agente protector puede localizarse dentro de un dispositivo especializado, en el que el agente protector ya está presente en el dispositivo antes de la adición de la muestra de sangre, tal como se describe en la publicación de patente de EEUU n.º 2004/0137417. El dispositivo también puede ser un recipiente de recolección al vacío, tal como un tubo. El tubo puede estar fabricado preferiblemente de un material transparente que también resista la adherencia de las células en una muestra dada. La pared interior del tubo puede estar revestida o estar tratada de otro modo para modificar sus características de superficie, como para que sea más hidrófoba y/o más hidrófila, a través de toda la superficie o de parte de esta. El tubo puede tener una pared interior pulverizada a la llama, que se haya sometido a una descarga de corona, que haya sido tratada con plasma, revestida o tratada de otra forma. El tubo puede tratarse poniendo en contacto la pared interior con una sustancia de modo que los ácidos nucleicos de interés resistan la adhesión a las paredes del tubo. La superficie del tubo puede modificarse para proporcionar una funcionalidad dual que proporcione simultáneamente un equilibrio apropiado de hidrofiliidad e hidrofobicidad deseado para permitir la recolección de sangre, la dispersión de los conservantes en su interior, y la resistencia a la adhesión de los ácidos nucleicos a la pared interior de un tubo de recolección de sangre. Así, es posible que cualquier revestimiento pueda ser un revestimiento polimérico funcionalizado que incluye un primer polímero y una o más segundas funcionalidades monoméricas y/o poliméricas que sean diferentes (por ejemplo, químicamente diferentes) del primer polímero. El revestimiento puede incluir uno o más copolímeros (por ejemplo, copolímeros en bloque, copolímero injertado u otros). Por ejemplo, puede incluir un copolímero que incluya una primera porción polimérica hidrófoba, y una segunda porción polimérica hidrófila. El revestimiento puede ser un revestimiento con una base acuosa. El revestimiento puede incluir opcionalmente un estimulante de la adhesión. El revestimiento puede aplicarse de cualquier manera adecuada, puede pulverizarse, sumergirse, extenderse o aplicarse de otra forma sobre todo el interior o parte del interior del tubo de recolección de sangre. El revestimiento también puede aplicarse en presencia de calor. Preferiblemente, cualquier revestimiento aplicado a la pared interna de un tubo de recolección de sangre formará un enlace lo suficientemente tenaz con el vidrio (por ejemplo, vidrio de borosilicato) u otro material (por ejemplo, un material polimérico) del tubo, de modo que no se erosione ni sea eliminado de otra manera de la pared interior. Los ejemplos de revestimientos poliméricos adecuados pueden incluir polímeros que contienen silicio (por ejemplo, silanos, siloxanos, u otros); poliolefinas, tales como polietileno o polipropileno; poli(tereftalato de etileno); polímeros fluorados (por ejemplo, politetrafluoroetileno); poli(cloruro de vinilo), poliestireno o cualquiera de sus combinaciones. Pueden encontrarse ejemplos de indicaciones que pueden emplearse para revestir el interior de un tubo de recolección de sangre en las patentes de EEUU n.ºs 6.551.267; 6.077.235; 5.257.633; y 5.213.765.
- 20 El agente protector también puede colocarse antes o después de la extracción de sangre en un receptáculo empleando un sistema de identificación de muestras de sangre. El sistema de identificación incluye un dispositivo de manipulación para un espécimen biológico dentro de un receptáculo que comprende un sustrato inicialmente plano que incluye al menos un pliegue que divide el sustrato en una porción de mango que tiene al menos una porción de borde periférico y una porción de recepción que incluye al menos una porción de una abertura que tiene un perímetro que está configurado de modo que recibe un recipiente que tiene una cubierta que incluye un espécimen biológico para ensayar, y que resiste la introducción en el recipiente con relación al sustrato. El sustrato puede incluir también información de identificación acerca de la muestra contenida dentro del receptáculo y/o su fuente.
- 25 Tal como se analizó anteriormente, el tubo puede incluir un quelante de iones metálicos (que también puede ser un agente anticoagulante), uno o más inhibidores metabólicos y/o de nucleasas, y un agente conservante, tal como un agente fijador que incluye, pero no se limita a los descritos anteriormente. El tubo también puede incluir una o cualquier combinación de una o más poliaminas, un permeabilizador de la membrana celular, y un antioxidante o un captador de especies reactivas de oxígeno. Preferiblemente, los compuestos incluidos en el tubo están en una cantidad suficiente para conservar la morfología celular y evitar la degradación celular, al mismo tiempo que evitan la actividad ADNasa y ARNasa perjudicial dentro de los ácidos nucleicos. En realizaciones preferidas, la sangre puede fijarse simultáneamente a medida que se extrae hacia el tubo especializado. El tubo también puede estar revestido en la pared exterior con un revestimiento protector (por ejemplo, una barrera de contención que ayuda a controlar la fragmentación del vidrio), tal como se describe en la patente de EEUU n.º 7.419.832.

Tal como se analiza en la presente, una etapa de poner en contacto una muestra de sangre con el agente protector permite que la muestra pueda almacenarse durante un periodo de tiempo antes de aislar y ensayar los ácidos nucleicos. Puede extraerse una muestra de sangre en una localización, ponerse en contacto con el agente protector y después transportarse a una localización remota diferente o fuera del sitio para el procedimiento de aislamiento y ensayo de los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos pueden aislarse de la muestra de sangre y ensayarse en la localización remota, y la información de diagnóstico resultante después se envía al sitio de la extracción de sangre original. El procedimiento de aislamiento de los ácidos nucleicos puede realizarse en una localización remota y los datos resultantes pueden analizarse para identificar la presencia, la ausencia o la gravedad relativa de un estado de enfermedad en una tercera localización. Como alternativa, los resultados del procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos pueden volverse a enviar al sitio de la extracción de sangre inicial y analizarse allí. La información de diagnóstico resultante después puede enviarse a una tercera localización o de nuevo a la localización remota o al sitio de la extracción de sangre inicial. La localización de la extracción de sangre y el sitio de ensayo y/o el sitio de análisis están separados entre sí por al menos aproximadamente 0,5 km, 1 km, 100 km, o más.

En cualquier momento después del contacto inicial de la muestra de sangre con el agente protector, la muestra puede tratarse para aislar una o más células sanguíneas de la muestra y extraer los ácidos nucleicos celulares localizados dentro de las células sanguíneas aisladas. Los ácidos nucleicos pueden extraerse y aislarse empleando cualquier procedimiento, que incluyen los procedimientos descritos en la publicación de EEUU de propiedad de los solicitantes n.º 2009/0081678. El agente conservante actúa para evitar la lisis celular, de modo que las células sanguíneas permanecen intactas y sustancialmente todos los ácidos nucleicos celulares siguen estando dentro de la célula para evitar la contaminación no deseada con ARN separado de células y ARN de globina.

Después de haber extraído el ARN celular puede realizarse un ensayo para identificar la presencia, la ausencia o la gravedad de un estado de enfermedad. Así, los procedimientos de la presente memoria contemplan también una etapa de ensayo de los ácidos nucleicos. El ensayo de los ácidos nucleicos puede realizarse empleando cualquier procedimiento de ensayo de ácidos nucleicos que incluye, pero no se limita a la reacción en cadena con polimerasa (PCR), la reacción en cadena con polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), la reacción en cadena con polimerasa a tiempo real cuantitativa (Q-PCR), la electroforesis en gel, la electroforesis capilar, la espectrometría de masas, la detección con fluorescencia, la espectrometría ultravioleta, la hibridación de ADN, la reacción en cadena con polimerasa específica de alelos, el ensamblaje cíclico con polimerasa (PCA), la reacción en cadena con polimerasa asimétrica, lineal después de la reacción en cadena con polimerasa exponencial (LATE-PCR), la amplificación dependiente de helicasa (HDA), la reacción en cadena con polimerasa de inicio en caliente, la reacción en cadena con polimerasa específica de intersecuencia (ISSR), la reacción en cadena con polimerasa inversa, la reacción en cadena con polimerasa mediada por acoplamiento, la reacción en cadena con polimerasa específica de metilación (MSP), la reacción en cadena con polimerasa de múltiplex, la reacción en cadena con polimerasa anidada, la reacción en cadena con polimerasa en fase sólida, o cualquiera de sus combinaciones.

La presente invención contempla un procedimiento para aislar y ensayar ARN celular. El procedimiento puede realizarse en una única muestra o en una multitud de muestras (por ejemplo, en una placa de múltiples pocillos). El procedimiento incluye poner en contacto una muestra de sangre con un agente protector. El agente protector incluye un agente conservante, tal como se analizó previamente, para que las células sanguíneas permanezcan intactas durante la extracción de la sangre y el procedimiento de aislamiento del ARN. El agente protector incluye también un componente para proteger el ARN frente a la actividad ARNasa o para inhibir totalmente la actividad ARNasa. Después de la extracción de la sangre, la muestra de sangre puede ponerse en contacto con un tampón de lisis de eritrocitos que puede incluir NH_4Cl , KHCO_3 , y EDTA en agua. La muestra de sangre después puede colocarse en agua helada durante aproximadamente 15 a aproximadamente 20 minutos. La muestra después puede centrifugarse a aproximadamente 1000 rpm de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C durante aproximadamente 10 minutos. El sobrenadante después puede eliminarse y puede añadirse un tampón de lisis de eritrocitos para la eliminación de los eritrocitos. El sedimento de leucocitos resultante después puede resuspenderse y centrifugarse a aproximadamente 1000 rpm de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C durante aproximadamente 10 minutos. El sobrenadante después puede retirarse mediante aspiración para evitar cualquier alteración del sedimento de leucocitos. Después el ARN puede aislarse empleando cualquier procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos. Como ejemplo, puede emplearse el kit AllPrep DNA/RNA Mini Kit, fabricado por QIAGEN, Inc. de Valencia, California. El sedimento de leucocitos puede ponerse en contacto inicialmente con un tampón de lisis celular que puede contener hidrócloruro de guanidina y β -mercaptoetanol. El sedimento celular después puede agitarse en vórtice para estimular la lisis celular. Después de la lisis celular, el lisado celular se introduce en un dispositivo de homogeneización y se microcentrifuga a aproximadamente 13000 rpm a la temperatura ambiente durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 4 minutos para asegurar la ruptura y la homogeneización del lisado celular. El lisado celular homogeneizado después puede aplicarse a una columna de unión a ADN y microcentrifugarse a aproximadamente 8000 g a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 minuto para eliminar la mayoría del ADN. La corriente después puede recogerse y mezclarse

con etanol para ajustar la concentración salina y el pH para la unión apropiada en la columna de ARN. La mezcla después puede aplicarse a una columna de ARN y ponerse en contacto con uno o más tampones para eliminar cualquier impureza, que incluye proteínas y sales. El ARN después puede eluirse con agua sin ARNasa y almacenarse a aproximadamente -80 °C para la conservación a largo plazo, o a aproximadamente 0 °C para la conservación a corto plazo. Para su uso en un espectrofotómetro de UV, las muestras de ARN pueden mantenerse a 0 °C, pero analizarse a temperatura ambiente. Para su uso en un bioanalizador, las muestras de ARN primero pueden desnaturalizarse a aproximadamente 70 °C durante aproximadamente 2 minutos, y después enfriarse inmediatamente a aproximadamente 0 °C en hielo para mantener al ARN desnaturalizado y exento de cualquier estructura terciaria. Las muestras de ARN pueden permanecer en hielo hasta que se carguen en los chips bioanalizadores para el análisis a temperatura ambiente.

Ejemplo 1

Se extraen muestras de sangre del mismo donante hacia dos tubos de recolección de sangre distintos (tubo 1 (tubo de EDTA) y tubo 2 (tubo de BCT ARN)). El tubo 1 solo contiene EDTA. El tubo 2 contiene DU, EDTA, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio. Ambos tubos se conservan a temperatura ambiente y se retiran partes alícuotas de 1 ml de sangre de cada tubo en las horas 1,5, 8, 24, 48, 72 y 96. Se miden los niveles de glucosa sanguínea de cada muestra utilizando un medidor de glucosa sanguínea YSI, disponible en YSI Life Sciences (Yellow Springs, OH). La concentración de glucosa sanguínea de las muestras del tubo 2 fue la única que mantuvo unos niveles de glucosa relativamente constantes a lo largo del periodo de ensayo, lo cual indica que la combinación de EDTA, DU, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio proporciona unos niveles reducidos de metabolismo celular. Los resultados de este ejemplo se muestran en formato gráfico en la figura 1.

Ejemplo 2

Se extraen muestras de sangre del mismo donante hacia dos tubos de recolección de sangre distintos (tubo 1 y 2). El tubo 1 contiene EDTA. El tubo 2 contiene DU, EDTA, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio. Ambos tubos se conservan durante 2 h a temperatura ambiente antes de la separación del plasma. Se midió la actividad ARNasa del plasma del tubo 1 y del tubo 2 empleando un kit de detección de actividad ARNasa disponible en el mercado, RNaseAlert@Lab Test Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). También se realizaron dos experimentos de control más con la enzima ARNasa A purificada sola y con ARNasa tratada con la mezcla química presente en el tubo 2. La actividad ARNasa se presenta como la fluorescencia relativa. Los resultados de este ejemplo se muestran en formato gráfico en la figura 2.

Ejemplo 3

Se extraen dos muestras de sangre del mismo donante hacia dos tubos de recolección de sangre distintos (tubo A (BCT ARN) y tubo B (EDTA)). El tubo A contiene DU, EDTA, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio. El tubo B solo contiene EDTA. Ambos tubos se conservan a temperatura ambiente y se retiran partes alícuotas de 5 ml de sangre de cada tubo en el día 0, día 1, día 2, y día 3, y se separa el plasma. Todas las muestras se centrifugan a 800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente para separar el plasma. El plasma después se traslada a tubos nuevos y se centrifuga a 1500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se purifica el ARN libre en circulación empleando el kit de ácidos nucleicos en circulación QIAamp disponible en Qiagen Inc. (Valencia, CA). Se extrae el ARN de cada muestra de plasma. Las muestras después se amplifican mediante una PCR a tiempo real (empleando los reactivos de RT PCR TaqMan® disponibles en Applied Biosystems, Foster City, California) para identificar el número de copias de ARNm de c-fos por ml de plasma. Los resultados muestran un número de copias constante de ARNm de c-fos por ml de plasma en las muestras procedentes del A en cada medición, lo cual indica que no se han producido cambios o se han producido muy pocos cambios en el nivel de ARNm de c-fos en el tubo A a lo largo del periodo de 3 días. El número de copias de ARNm de c-fos por ml de plasma muestra unos niveles elevados en cada medición en las muestras procedentes del tubo B, lo cual indica un aumento en el ARNm de c-fos presente como resultado de un mayor metabolismo celular. Los resultados de este ejemplo se muestran en formato gráfico en la figura 3.

Ejemplo 4

Se extraen dos muestras de sangre del mismo donante hacia dos tubos de recolección de sangre distintos (tubo A (BCT ARN) y tubo B (EDTA)). El tubo A contiene DU, EDTA, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio. El tubo B solo contiene EDTA. Ambos tubos se conservan a temperatura ambiente y se retiran partes alícuotas de 5 ml de sangre de cada tubo en el día 0, día 1, día 2, y día 3, y se separa el plasma. Todas las muestras se centrifugan a 800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente para separar el plasma. El plasma después se traslada a tubos nuevos y se centrifuga a 1500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se purifica el ARN libre en circulación empleando el kit de ácidos nucleicos en circulación QIAamp disponible en Qiagen Inc. (Valencia, CA). Se extrae el ARN de cada muestra de plasma. Las muestras después se amplifican mediante una PCR a tiempo

real (empleando los reactivos de RT PCR TaqMan® disponibles en Applied Biosystems, Foster City, California) para identificar el número de copias de ARNm de GAPDH por ml de plasma. Los resultados muestran un número de copias constante de ARNm de GAPDH por ml de plasma en las muestras procedentes del A en cada medición, lo cual indica que no se han producido cambios o se han producido muy pocos cambios en el nivel de ARNm de GAPDH en el tubo A a lo largo del periodo de 3 días. El número de copias de ARNm de GAPDH por ml de plasma muestra unos niveles elevados en cada medición en las muestras procedentes del tubo B, lo cual indica un aumento en el ARNm de GAPDH presente como resultado de un mayor metabolismo celular. Los resultados de este ejemplo se muestran en formato gráfico en la figura 4.

Ejemplo 5

Se extraen dos muestras de sangre del mismo donante hacia dos tubos de recolección de sangre distintos (tubo A (BCT ARN) y tubo B (EDTA)). El tubo A contiene DU, EDTA, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio. El tubo B solo contiene EDTA. Ambos tubos se conservan a temperatura ambiente y se retiran partes alícuotas de 5 ml de sangre de cada tubo en el día 0, día 1, día 2, y día 3, y se separa el plasma. Todas las muestras se centrifugan a 800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente para separar el plasma. El plasma después se traslada a tubos nuevos y se centrifuga a 1500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se purifica el ARN libre en circulación empleando el kit de ácidos nucleicos en circulación QIAamp disponible en Qiagen Inc. (Valencia, CA). Se extrae el ARN de cada muestra de plasma. Las muestras después se amplifican mediante una PCR a tiempo real (empleando los reactivos de RT PCR TaqMan® disponibles en Applied Biosystems, Foster City, California) para identificar el número de copias de ARNm de RASSF1A por ml de plasma. Los resultados muestran un número de copias constante de ARNm de RASSF1A por ml de plasma en cada medición, lo cual indica que no se han producido cambios o se han producido muy pocos cambios en el nivel de ARNm de RASSF1A en el tubo A a lo largo del periodo de 3 días. El número de copias de ARNm de RASSF1A por ml de plasma muestra una disminución en cada medición de las muestras procedentes del tubo B, lo cual indica una disminución en la cantidad de ARNm de RASSF1A presente como resultado de la infrarregulación del ARNm de RASSF1A. Los resultados de este ejemplo se muestran en formato gráfico en la figura 5.

Ejemplo 6

Se extraen dos muestras de sangre del mismo donante hacia dos tubos de recolección de sangre distintos (tubo A (BCT ARN) y tubo B (EDTA)). El tubo A contiene DU, EDTA, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio. El tubo B solo contiene EDTA. Ambos tubos se conservan a temperatura ambiente y se retiran partes alícuotas de 5 ml de sangre de cada tubo en el día 0, día 1, día 2, y día 3, y se aíslan los leucocitos mediante una centrifugación en gradiente de densidad o eliminando los eritrocitos empleando una disolución de lisis de eritrocitos. Los leucocitos aislados del tubo A y del tubo B se tratan con metanol al 100% enfriado en hielo durante 10 min por separado. Después las células de ambos tubos se lavaron con PBS dos veces y se suspendieron en PBS y se incubaron con una baliza molecular para detectar el ARNm de GAPDH durante 1 h a temperatura ambiente. Después de este periodo de incubación, las células del tubo A y del tubo B se analizaron mediante citometría de flujo para cuantificar el nivel de ARNm de GAPDH en los leucocitos intactos. Los resultados demuestran un nivel constante de ARNm de GAPDH, lo cual indica que no se han producido cambios o se han producido muy pocos cambios en el nivel de ARNm de GAPDH en el tubo A a lo largo del periodo de 3 días. El nivel de ARNm de GAPDH está elevado en cada medición en las muestras procedentes del tubo B, lo cual indica un aumento en el ARNm de GAPDH presente como resultado de un mayor metabolismo celular. Los resultados de este ejemplo se muestran en formato gráfico en la figura 6.

Los anteriores ejemplos 1 a 6 demuestran que se produce un efecto sinérgico inesperado en las muestras de sangre que se pusieron en contacto con un conservante, uno o más inhibidores metabólicos y/o inhibidores de nucleasa, y uno o más quelantes. Las muestras de sangre que se pusieron en contacto solo con un conservante, solo con uno o más inhibidores metabólicos y/o inhibidores de nucleasas, solo uno o más quelantes, o cualquier combinación de solo algunos, pero no todos, no muestran la capacidad para mantener la integridad de las células sanguíneas o la integridad de los ácidos nucleicos. El efecto combinado de DU y uno o más inhibidores metabólicos y/o inhibidores de nucleasas excede con mucho cualquier expectativa basada en el efecto, o la falta de efecto, de DU o uno o más inhibidores metabólicos y/o de nucleasas empleados solos.

50

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento de selección para la identificación de un estado de enfermedad, que comprende las etapas de:

5 poner en contacto una muestra de sangre extraída que incluye una pluralidad de células sanguíneas, con un agente protector del ARN celular, que comprende:

- i. uno o más agentes conservantes, que incluyen diazolidinil urea;
- ii. uno o más inhibidores de nucleasas, que incluyen ácido aurintricarboxílico;
- iii. un inhibidor metabólico que comprende fluoruro de sodio y gliceraldehído;
- iv. uno o más quelantes de iones metálicos, que incluyen EDTA;

10 aislar los leucocitos de la muestra de sangre extraída;
y extraer el ARN celular de los leucocitos aislados.

2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la totalidad de dichos uno o más agentes conservantes tiene una concentración del 15% en p/v al 35% en p/v antes de la etapa de contacto.

15 3.- El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la concentración de la totalidad del inhibidor metabólico antes de la etapa de contacto es del 0,1% en p/v al 15% en p/v.

4.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la concentración de la totalidad de dichos uno o más inhibidores de nucleasas antes de la etapa de contacto es del 0,1% en p/v al 15% en p/v.

20 5.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la concentración de la totalidad de dichos uno o más quelantes de iones metálicos antes de la etapa de contacto es del 1% en p/v al 25% en p/v.

6.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que:

- i. cualquiera o ambas etapas de aislamiento o análisis se producen al menos 1 día después de extraer la muestra de sangre;
 - ii. cualquiera o ambas etapas de aislamiento o análisis se producen sin congelar la muestra de sangre (por ejemplo, hasta una temperatura menor que -30 °C (más preferiblemente menor que -70 °C)); o ambos i. e ii.
- 25

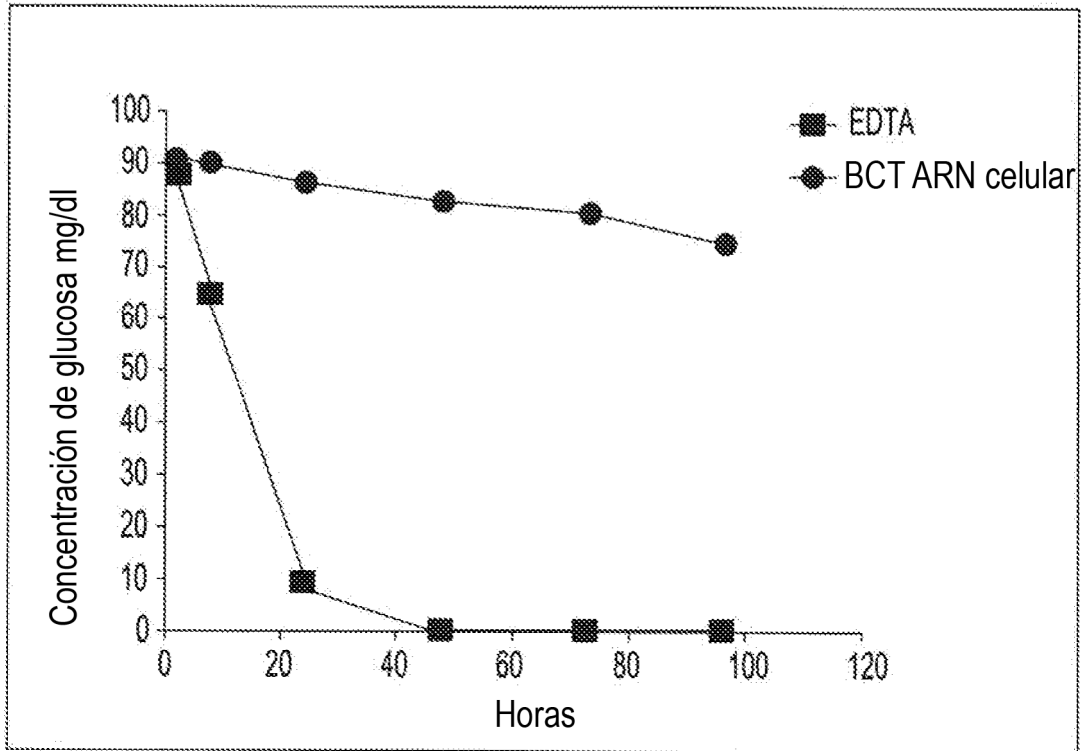


Fig-1

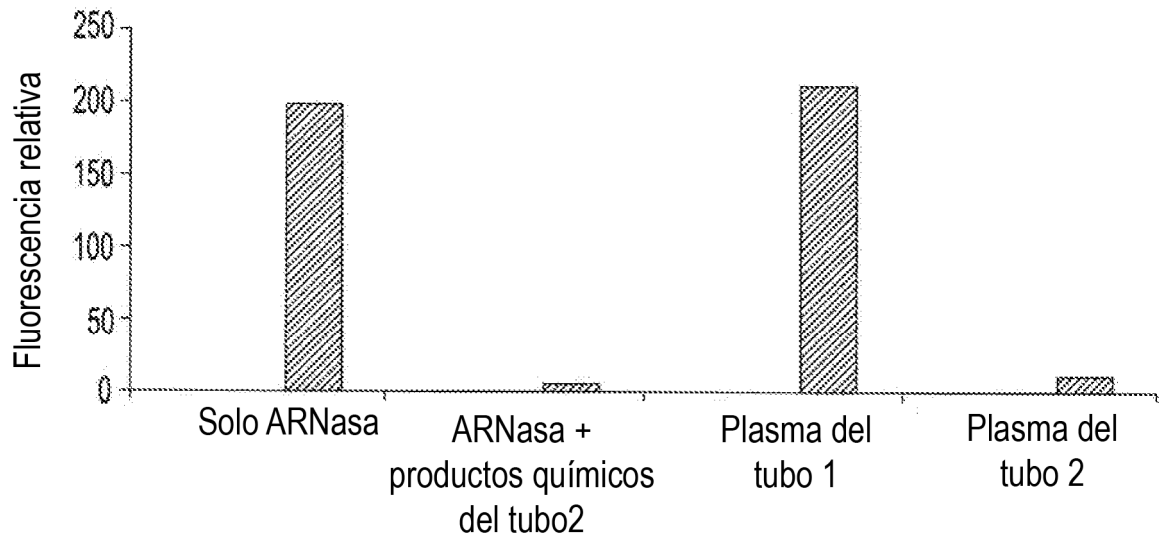


Fig-2

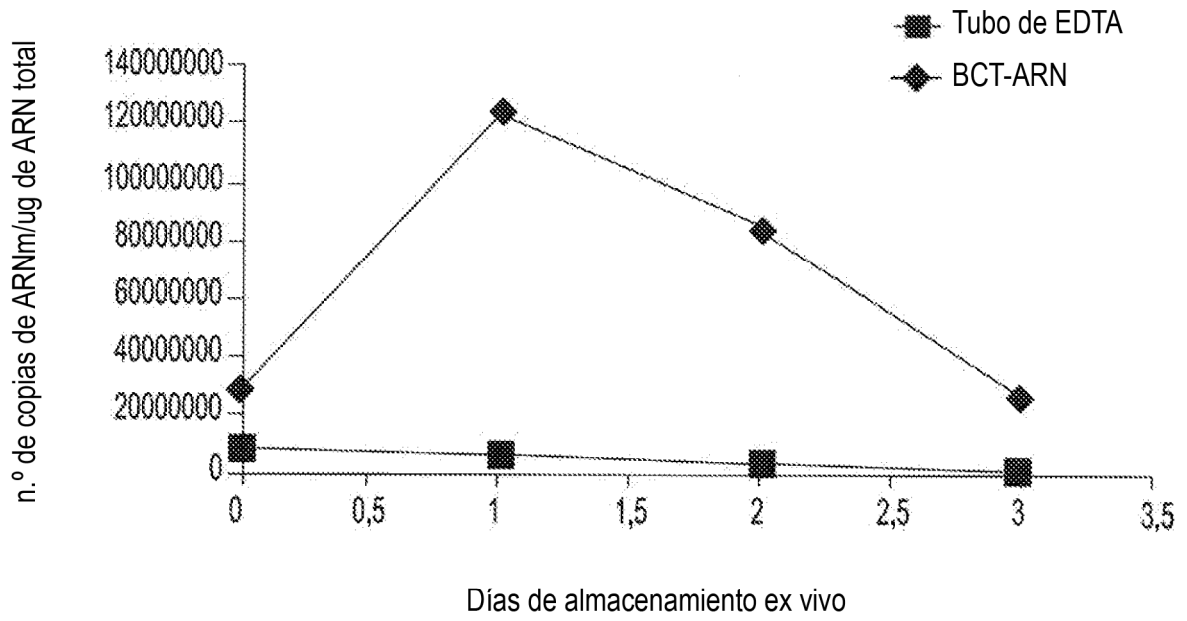


Fig-3

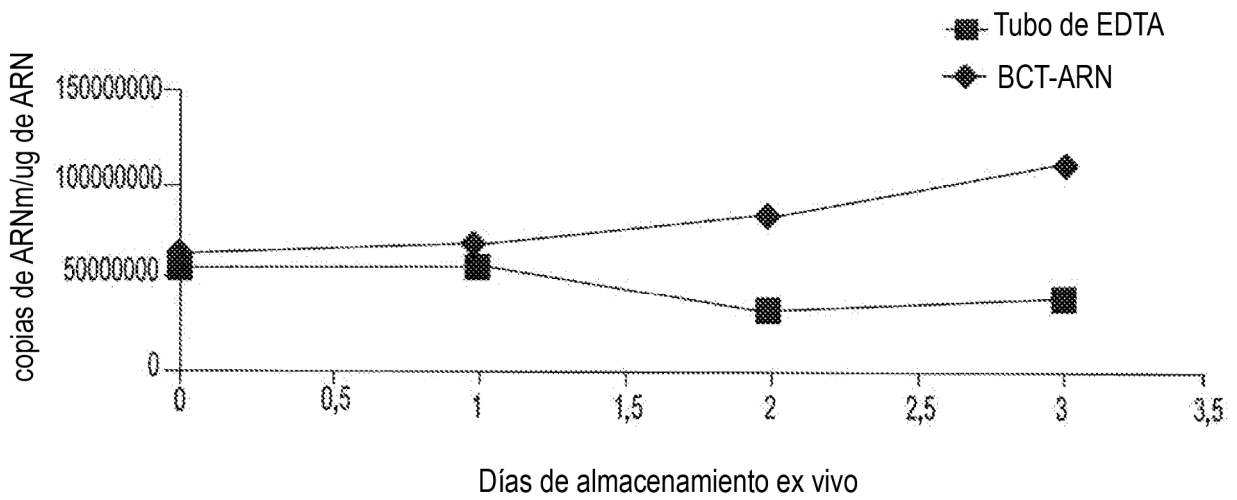


Fig-4

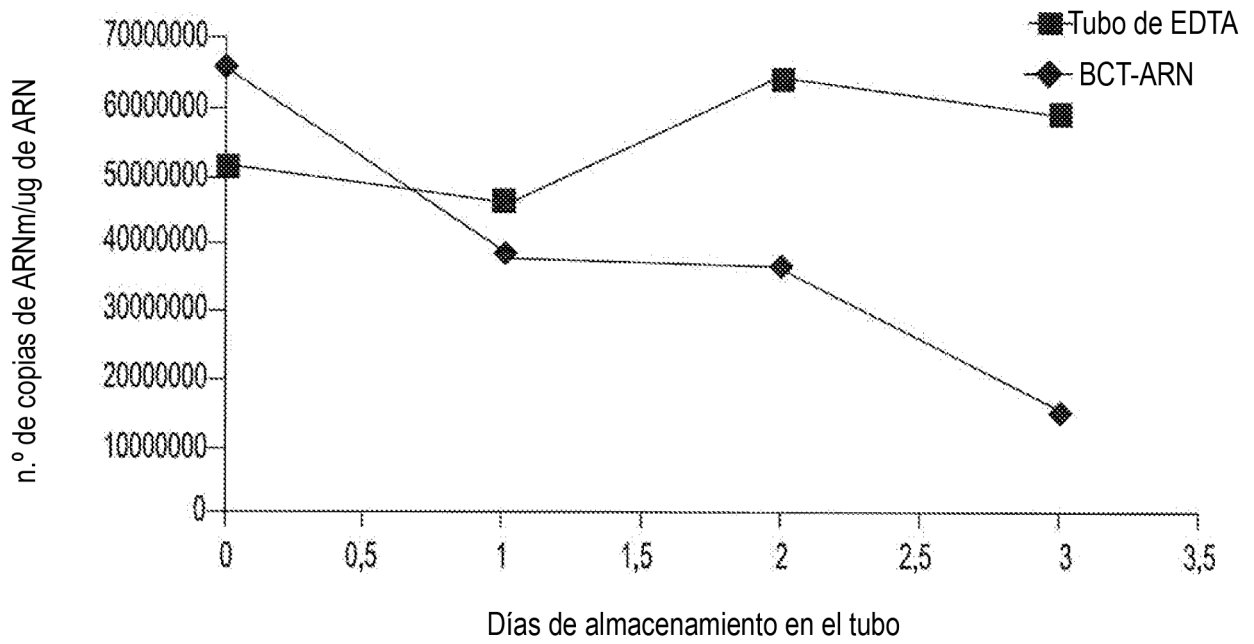


Fig-5

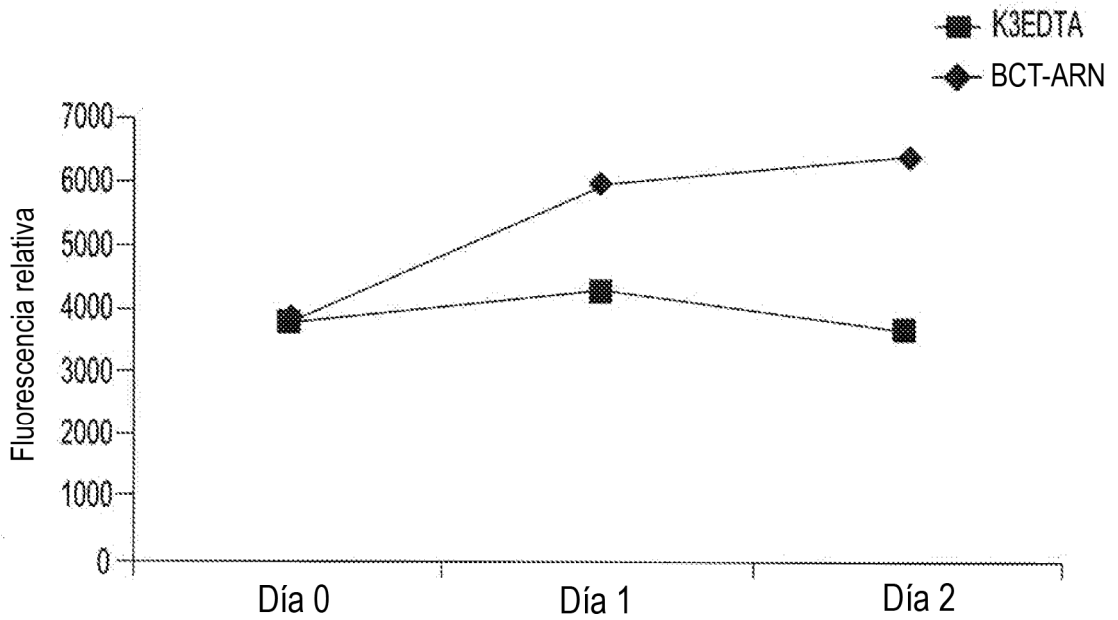


Fig-6