

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 956**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**B01L 3/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2012 E 12762604 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2761000**

54 Título: **Estabilización y aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares**

30 Prioridad:

**26.09.2011 EP 11182818**  
**26.09.2011 US 201161539274 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.06.2016**

73 Titular/es:

**PREANALYTIX GMBH (100.0%)**  
**Feldbachstrasse**  
**8634 Hombrechtikon, CH**

72 Inventor/es:

**HORLITZ, MARTIN;**  
**SCHUBERT, ANABELLE y**  
**SPRENGER-HAUSSELS, MARKUS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 574 956 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 y aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares

- 5 El trabajo que conduce a la presente invención ha recibido financiación del Séptimo Programa Marco de la Comunidad Europea (FP7/2007-2013) bajo el *acuerdo de subvención* N.º 222916.

**Campo de la invención**

- 10 La tecnología desvelada en el presente documento se refiere a métodos y composiciones adecuadas para estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares en una muestra que contiene células, en particular una muestra de sangre, y a un método para aislar ácidos nucleicos extracelulares de muestras biológicas respectivamente estabilizadas.

**Antecedentes**

- 15 Los ácidos nucleicos extracelulares se han identificado en sangre, plasma, suero y otros líquidos corporales. Los ácidos nucleicos extracelulares que se encuentran en muestras respectivas son, hasta un cierto grado, resistentes a la degradación debido al hecho de que se protegen de nucleasas (por ejemplo, debido a que son secretados en forma de un complejo de proteolípidos, están asociados a proteínas o están contenidos en vesículas). La presencia de niveles elevados de ácidos nucleicos extracelulares tales como ADN y/o ARN en muchas afecciones médicas, tumores malignos y procesos infecciosos es de interés, entre otras cosas, para el cribado, diagnóstico, pronóstico, vigilancia para la progresión de la enfermedad, para identificar posibles dianas terapéuticas y para monitorizar la respuesta al tratamiento. Adicionalmente, está siendo usado elevado ADN/ARN fetal en sangre materna para determinar, por ejemplo, la identidad del sexo, evaluar anomalías cromosómicas y monitorizar complicaciones asociadas con el embarazo. Así, los ácidos nucleicos extracelulares son en particular útiles en el diagnóstico y pronóstico no invasivo y pueden usarse, por ejemplo, como marcadores de diagnóstico en muchos campos de aplicación, tales como prueba genética prenatal no invasiva, oncología, medicina del trasplante o muchas otras enfermedades y, por tanto, son de relevancia diagnóstica (por ejemplo, ácidos nucleicos derivados del feto o de tumor). Sin embargo, los ácidos nucleicos extracelulares también se encuentran en seres humanos sanos. Aplicaciones comunes y métodos de análisis de ácidos nucleicos extracelulares se describen, por ejemplo, en los documentos WO97/035589, WO97/34015, Swarup et al, FEBS Letters 581 (2007) 795-799, Fleischhacker Ann. N.Y. Acad. Sci. 1075: 40-49 (2006), Fleischhacker y Schmidt, Biochimica et Biophysica Acta 1775 (2007) 191-232, Hromadnikova et al (2006) DNA and Cell biology, Volume 25, Number 11 pp 635-640; Fan et al (2010) Clinical Chemistry 56:8. El documento WO 2005/081867 describe un método de detección de ARNm extracelular como biomarcador.

- 20 Tradicionalmente, la primera etapa de aislar ácidos nucleicos extracelulares de una muestra biológica que contiene células tal como sangre es obtener una fracción esencialmente libre de células de dicha muestra, por ejemplo, tanto suero como plasma en el caso de sangre. Los ácidos nucleicos extracelulares se aíslan entonces de dicha fracción libre de células, comúnmente plasma, cuando se procesa una muestra de sangre. Sin embargo, el obtener una fracción esencialmente libre de células de una muestra puede ser problemático y la separación es frecuentemente un proceso de múltiples etapas tedioso y que requiere tiempo, ya que es importante usar condiciones cuidadosamente controladas para prevenir la rotura de las células durante la centrifugación que podría contaminar los ácidos nucleicos extracelulares con ácidos nucleicos celulares liberados durante la rotura. Además, es frecuentemente difícil eliminar todas las células. Así, muchas muestras procesadas que frecuentemente y comúnmente se clasifican como "libres de células", tales como plasma o suero, de hecho todavía contienen cantidades residuales de células que no se eliminaron durante el proceso de separación. Otra consideración importante es que el ácido nucleico celular es liberado de las células contenidas en la muestra debido a la rotura de células durante la incubación *ex vivo*, normalmente dentro de un periodo de tiempo relativamente corto de un evento de extracción de sangre. Una vez empieza la lisis de las células, las células lisadas liberan ácidos nucleicos adicionales que se mezclan con los ácidos nucleicos extracelulares y es cada vez más difícil recuperar los ácidos nucleicos extracelulares para probarlos. Estos problemas se tratan en el estado de la técnica (véanse, por ejemplo, Chiu et al (2001), Clinical Chemistry 47:9 1607-1613; Fan et al (2010) y el documento US2010/0184069). Además, la cantidad y la capacidad de recuperación de los ácidos nucleicos extracelulares disponibles pueden disminuir sustancialmente durante un periodo de tiempo debido a la degradación.

- 25 Además de los ácidos nucleicos extracelulares de mamífero que se derivan, por ejemplo, de células tumorales o el feto, las muestras que contienen células también pueden comprender otros ácidos nucleicos de interés que no están comprendidos en células. Un ejemplo no limitante importante es ácidos nucleicos de patógeno tales como ácidos nucleicos virales. La preservación de la integridad de los ácidos nucleicos virales en muestras que contienen células, tales como en particular en especímenes de sangre, durante el transporte y la manipulación también es crucial para el posterior análisis y monitorización de la carga viral.

- 30 Los problemas anteriormente tratados particularmente son un problema, si la muestra comprende una alta cantidad de células como es el caso, por ejemplo, con muestras de sangre completa. Así, con el fin de evitar,

respectivamente reducir, los problemas anteriormente descritos es común separar una fracción esencialmente libre de células de la muestra de las células contenidas en la muestra básicamente inmediatamente después de obtener la muestra. Por ejemplo, se recomienda obtener plasma sanguíneo de sangre completa básicamente directamente después de sacar la sangre y/o enfriar la sangre completa y/o el plasma o suero obtenido con el fin de preservar la integridad de los ácidos nucleicos extracelulares y evitar contaminaciones de la población de ácidos nucleicos extracelulares con ácidos nucleicos intracelulares que son liberados de las células contenidas. Sin embargo, la necesidad de separar directamente, por ejemplo, el plasma de la sangre es una desventaja importante debido a que muchas instalaciones en las que se extrae la sangre (por ejemplo, una consulta del médico) no tienen una centrifuga que permita la eficaz separación del plasma sanguíneo. Además, el plasma que se obtiene bajo condiciones regulares frecuentemente comprende cantidades residuales de células que, por consiguiente, también pueden dañarse o pueden morir durante la manipulación de la muestra, liberando así ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico, como se describe anteriormente. Estas células restantes también plantean el riesgo de llegar a dañarse durante la manipulación, de manera que se mezclaría su contenido de ácidos nucleicos, particularmente ADN genómico (nuclear) y ARN citoplásmico, y así contaminaría, respectivamente diluiría, la fracción de ácidos nucleicos extracelulares circulantes. Para eliminar estas células contaminantes restantes y para evitar/reducir los problemas anteriormente mencionados, se conocía realizar una segunda etapa de centrifugación a mayor velocidad. Sin embargo, de nuevo, tales potentes centrifugas no están frecuentemente disponibles en las instalaciones en las que se obtiene la sangre. Además, aunque el plasma se obtenga directamente después de extraerse la sangre, se recomienda congelarlo a -80 °C con el fin de preservar los ácidos nucleicos contenidos en su interior si los ácidos nucleicos no pueden aislarse directamente. Esto también impone limitaciones prácticas tras el procesamiento de las muestras ya que, por ejemplo, las muestras de plasma deben transportarse congeladas. Esto aumenta los costes y además plantea el riesgo de que la muestra se comprometa en caso de interrumpirse la cadena del frío.

Las muestras de sangre se recogen actualmente normalmente en tubos de extracción de sangre que contienen EDTA secado por pulverización o líquido (por ejemplo, BD Vacutainer K<sub>2</sub>EDTA). El EDTA se quela con magnesio, calcio y otros iones metálicos bivalentes, inhibiendo así reacciones enzimáticas, tales como, por ejemplo, la coagulación de la sangre o la degradación del ADN debido a DNAsas. Sin embargo, aún cuando el EDTA sea un anticoagulante eficaz, el EDTA no previene eficazmente la dilución, respectivamente contaminación, de la población de ácidos nucleicos extracelulares por los ácidos nucleicos intracelulares liberados. Así, la población de ácidos nucleicos extracelulares que se encuentra en la porción libre de células de la muestra cambia durante el almacenamiento. Por consiguiente, el EDTA no es capaz de estabilizar suficientemente la población de ácidos nucleicos extracelulares, en particular debido a que no puede evitar la contaminación de la población de ácidos nucleicos extracelulares con, por ejemplo, fragmentos de ADN genómico que se generan después de extraer la sangre por la degradación de células e inestabilidad de células durante el transporte y almacenamiento de muestras.

El documento WO 01/60517 describe un dispositivo de recogida de muestras que comprende una sustancia estabilizadora de ácidos nucleicos y una fase sólida de unión a ácidos nucleicos. La composición de estabilización lisa inmediatamente las células tras el contacto con la muestra, liberando así los ácidos nucleicos intracelulares. Esto produce una grave contaminación de la población de ácidos nucleicos extracelulares con ADN genómico y ARNm intracelular. El documento WO 98/41651 describe un método de preparación de cromatina a partir de células eucariotas. Para este fin, las células se lisan y, por tanto, se destruyen, que produce una liberación de ácidos nucleicos intracelulares.

Se conocen métodos en el estado de la técnica que tienen específicamente como objetivo estabilizar ácidos nucleicos circulantes contenidos en sangre completa. Un método emplea el uso de formaldehído para estabilizar las membranas celulares, reduciendo así la lisis celular y además el formaldehído inhibe las nucleasas. Métodos respectivos se describen, por ejemplo, en los documentos US 7.332.277 y US 7.442.506. Sin embargo, el uso de formaldehído o sustancias que liberan formaldehído tiene inconvenientes, ya que puede comprometer la eficacia del aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares por la inducción de reticulaciones entre moléculas de ácidos nucleicos o entre proteínas y ácidos nucleicos. Métodos alternativos para estabilizar muestras de sangre se describen, por ejemplo, en los documentos US 2010/0184069 y US 2010/0209930. La estabilización del documento US 2010/0209930 se basa en el uso de un agente protector que puede comprender un liberador de formaldehído y además un inhibidor metabólico o enzimático. Estos métodos desarrollados bastante recientemente demuestran la gran necesidad de proporcionar medios para estabilizar muestras biológicas que contienen células, para permitir la eficaz recuperación de, por ejemplo, ácidos nucleicos extracelulares contenidos en tales muestras.

Sin embargo, a pesar de estos desarrollos bastante recientes todavía hay una necesidad continua de desarrollar técnicas de procesamiento de muestras que produzcan una estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra biológica, en particular una muestra que contiene células, que incluye muestras que se sospecha que contienen células, en particular sangre completa, plasma o suero, haciendo así la manipulación, respectivamente el procesamiento de tales muestras, más fácil (por ejemplo, evitando la necesidad de separar directamente plasma de sangre completa o enfriar o incluso congelar el plasma aislado), haciendo así también el aislamiento y la prueba de ácidos nucleicos extracelulares contenidos en tales muestras más fiable y, por consiguiente, mejorándose así la capacidad de diagnóstico y de pronóstico de los ácidos nucleicos extracelulares. En particular, hay una necesidad continua de una solución para preservar ácidos nucleicos extracelulares en

muestras de sangre completa, por ejemplo, para pruebas prenatales y/o para cribar enfermedades neoplásicas, en particular premalignas o malignas.

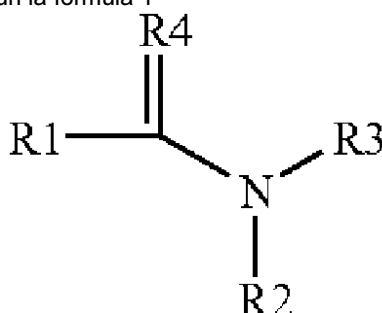
5 Es el objetivo de la presente invención vencer al menos uno de los inconvenientes de los métodos de estabilización de muestras del estado de la técnica. Así, es, entre otros, un objetivo estabilizar una muestra que contiene células, en particular sangre completa. En particular, es un objetivo de la presente invención estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en una muestra biológica y en particular evitar una contaminación de la población de ácidos nucleicos extracelulares con ADN genómico, en particular ADN genómico fragmentado. Además, es en particular un objetivo de la presente invención proporcionar una estabilización adecuada de una muestra biológica, preferentemente una muestra de sangre completa, incluso a temperatura ambiente, preferentemente durante un periodo de al menos dos, preferentemente al menos tres días. Además, es un objetivo de la presente invención proporcionar un recipiente de recogida de muestras, en particular un tubo de extracción de sangre, que sea capaz de estabilizar eficazmente una muestra biológica y en particular la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en la muestra.

15 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa en el hallazgo de que ciertos aditivos son sorprendentemente eficaces en estabilizar muestras biológicas que contienen células que comprenden ácidos nucleicos extracelulares, en particular muestras de sangre completa o muestras derivadas de sangre completa tales como, por ejemplo, plasma sanguíneo. Se encontró que estos aditivos son altamente eficaces en estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares y en particular son capaces de evitar o al menos reducir significativamente las contaminaciones con ADN genómico, en particular ADN genómico fragmentado.

25 La presente invención se define por las reivindicaciones. Según la reivindicación 1, se proporciona un recipiente adecuado para recoger una muestra que contiene células, preferentemente una muestra de sangre, plasma o de suero, que comprende

- 30 - una composición estabilizante adecuada para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en la muestra que contiene células, en el que dicha composición estabilizante comprende un inhibidor de las caspasas, y
- al menos un compuesto según la fórmula 1



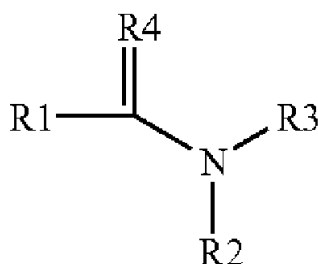
fórmula 1

35 en la que R1 es un residuo de hidrógeno o un residuo de alquilo, preferentemente un residuo de alquilo C1-C5, más preferido un residuo de metilo, R2 y R3 son residuos de hidrocarburo idénticos o diferentes con una longitud de la cadena de carbono de 1 - 20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un residuo de oxígeno, azufre o selenio.

40 La presente solicitud describe adicionalmente métodos de estabilización y tecnologías asociadas. El recipiente definido en las reivindicaciones puede usarse en el método descrito.

Según un primer aspecto, se describe un método adecuado para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra que contiene células, en el que una muestra se pone en contacto con

- 45 a) al menos un inhibidor de la apoptosis,
- b) al menos un agente hipertónico, que estabiliza las células comprendidas en la muestra, y/o
- c) al menos un compuesto según la fórmula 1



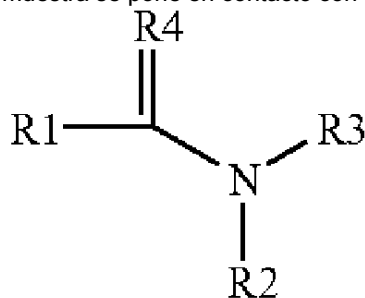
fórmula 1

5 en la que R1 es un residuo de hidrógeno o un residuo de alquilo, preferentemente un residuo de alquilo C1-C5, más preferido un residuo de metilo, R2 y R3 son residuos de hidrocarburo idénticos o diferentes con una longitud de la cadena de carbono de 1 - 20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un residuo de oxígeno, azufre o selenio.

10 Según un primer sub-aspecto, se describe un método adecuado para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra que contiene células, en el que la muestra se pone en contacto con al menos un inhibidor de la apoptosis. Preferentemente, la muestra que contiene células está seleccionada de sangre completa, plasma o suero. Sorprendentemente, se encontró que el inhibidor de la apoptosis reduce las contaminaciones de la población de ácidos nucleicos extracelulares con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que se originan a partir de células contenidas en la muestra, por ejemplo, de células dañadas o moribundas. Además, los inventores encontraron que el inhibidor de la apoptosis reduce la degradación de ácidos nucleicos presentes en la muestra. Así, la estabilización descrita en el presente documento usando un inhibidor de la apoptosis tiene el efecto de que la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en la muestra se preserva sustancialmente en el estado que había mostrado en el momento en el que se obtuvo la muestra biológica, respectivamente recogido.

20 Según un segundo sub-aspecto, se describe un método adecuado para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra que contiene células, en el que una muestra se pone en contacto con al menos un agente hipertónico, que es capaz de estabilizar las células comprendidas en la muestra. Se encontró sorprendentemente que el encogimiento de células que se induce por efectos hipertónicos débiles (osmosis) produce un aumento considerable de la estabilidad celular. Aumentando la estabilidad celular, el agente hipertónico en particular reduce la liberación de ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico, de las células contenidas en la porción extracelular o compartimento de la muestra. Así, la estabilización descrita en el presente documento usando un agente hipertónico tiene el efecto de que la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en la muestra se preserva sustancialmente en el estado que había mostrado en el momento en el que se obtuvo la muestra biológica, respectivamente recogido.

30 Según un tercer sub-aspecto descrito en el presente documento, se describe un método adecuado para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra que contiene células, en el que una muestra se pone en contacto con al menos un compuesto según la fórmula 1



fórmula 1

35 en la que R1 es un residuo de hidrógeno o un residuo de alquilo, preferentemente un residuo de alquilo C1-C5, más preferido un residuo de metilo, R2 y R3 son residuos de hidrocarburo idénticos o diferentes con una longitud de la cadena de carbono de 1 - 20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un residuo de oxígeno, azufre o selenio. Se encontró que añadir un compuesto respectivo es un efecto estabilizante ventajoso sobre la población de ácidos nucleicos extracelulares.

Según un cuarto sub-aspecto, se describe un método adecuado para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra que contiene células, en el que una muestra se pone en contacto con

- 45 a) al menos un inhibidor de la apoptosis, y  
b) al menos un agente hipertónico, que estabiliza las células comprendidas en la muestra.

Se encontró que la combinación de estos agentes estabilizantes (y opcionalmente aditivos adicionales) es sorprendentemente eficaz en inhibir la liberación de ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico, de las células contenidas en la porción extracelular de la muestra. Además, se mostró que la degradación de ácidos nucleicos presentes en la muestra se previene altamente eficazmente. En particular, menos ADN genómico fragmentado se encuentra en muestras respectivamente estabilizadas. Así, la estabilización descrita en el presente documento usando esta combinación de aditivos estabilizantes tiene el efecto de que la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en la muestra se preserva sustancialmente y eficazmente en el estado que había mostrado en el momento en el que se obtuvo la muestra biológica, respectivamente recogido (por ejemplo, extraído en el caso de sangre) y que en particular se reducen contaminaciones de la población de ácidos nucleicos extracelulares con ADN genómico fragmentado.

Con el fin de potenciar el efecto de estabilización hacia ácidos nucleicos extracelulares, adicionalmente se necesitan combinaciones de agentes estabilizantes con el fin de estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra que contiene células. Una combinación respectiva puede comprender al menos un inhibidor de la apoptosis, al menos un agente hipertónico y/o al menos un compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente, por ejemplo, (1) una combinación de al menos un inhibidor de la apoptosis y al menos un compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente, (2) una combinación de al menos un agente hipertónico y al menos un compuesto según la fórmula 1 o (3) una combinación de los tres agentes estabilizantes, es decir, al menos un inhibidor de la apoptosis, al menos un agente hipertónico y al menos un compuesto según la fórmula 1. Una combinación respectiva también puede comprender aditivos adicionales que potencian el efecto estabilizante tal como, por ejemplo, agentes quelantes. En caso de que la muestra sea sangre o una muestra derivada de sangre, normalmente también se añade un anticoagulante. Agentes quelantes tales como, por ejemplo, EDTA son adecuados para este fin. Combinaciones estabilizantes respectivas pueden usarse ventajosamente según un quinto sub-aspecto en un método adecuado para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra que contiene células según el primer aspecto.

Según un segundo aspecto, se describe un método para aislar ácidos nucleicos extracelulares de una muestra biológica, en el que dicho método comprende las etapas de:

- a) estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra según el método definido en el primer aspecto descrito en el presente documento; y
- b) aislar ácidos nucleicos extracelulares de dicha muestra.

La estabilización en la etapa a) puede lograrse, por ejemplo, según uno de los cinco sub-aspectos del primer aspecto como se ha descrito anteriormente. Como se trata anteriormente, la estabilización descrita en el presente documento tiene el efecto de que la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en la muestra se preserva sustancialmente en el estado que había mostrado en el momento en el que se obtuvo la muestra biológica, respectivamente recogido. Por tanto, los ácidos nucleicos extracelulares obtenidos de una muestra respectivamente estabilizada comprenden menos contaminaciones con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que resulta, por ejemplo, de células descompuestas comprendidas en la muestra en comparación con ácidos nucleicos extracelulares que se obtienen de una muestra no estabilizada. La sustancial preservación de la población de ácidos nucleicos extracelulares es una ventaja importante debido a que esta estabilización/preservación potencia la exactitud de cualquier prueba posterior. Permite normalizar el aislamiento y el posterior análisis de la población de ácidos nucleicos extracelulares, haciendo así las aplicaciones de diagnóstico o de pronóstico que se basan en la fracción de ácidos nucleicos extracelulares más fiable y más independiente de las condiciones de almacenamiento/manipulación usadas. Así, mejora la aplicabilidad del diagnóstico y pronóstico de los ácidos nucleicos extracelulares respectivamente aislados. En particular, las enseñanzas descritas en el presente documento tienen la ventaja de que la relación de ciertas moléculas de ácidos nucleicos extracelulares puede mantenerse sustancialmente constante en comparación con la relación en el momento en el que se recogió la muestra. La estabilización logra que los ácidos nucleicos intracelulares se mantengan sustancialmente dentro de las células y que los ácidos nucleicos extracelulares se estabilicen sustancialmente.

Según un tercer aspecto, se describe una composición adecuada para estabilizar una muestra biológica que contiene células, que comprende:

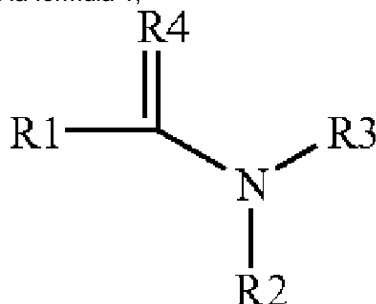
- a) al menos un inhibidor de la apoptosis, preferentemente un inhibidor de las caspasas, y/o
- b) al menos un agente hipertónico que es adecuado para estabilizar las células comprendidas en la muestra, preferentemente un compuesto orgánico hidroxilado; y/o
- c) al menos un compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente; y/o
- d) opcionalmente al menos un anticoagulante, preferentemente un agente quelante.

Una composición estabilizante respectiva es particularmente eficaz en estabilizar una muestra biológica que contiene células, en particular sangre completa, plasma y/o suero, estabilizando las células y la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en dicha muestra. Preferentemente, al menos dos de los agentes estabilizantes definidos en a) a c) más preferidos de todos los agentes estabilizantes definidos en a) a c) están presentes en la composición estabilizante. Una composición estabilizante respectiva permite el almacenamiento y/o

la manipulación, por ejemplo, transporte, de la muestra, por ejemplo, sangre completa, a temperatura ambiente durante al menos dos, o preferentemente al menos tres días sin comprometer sustancialmente la calidad de la muestra, respectivamente la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en ella. Así, si se usa la composición de estabilización descrita en el presente documento, el tiempo entre la recogida de muestras, por ejemplo, extracción de sangre, y la extracción del ácido nucleico puede variar sin efecto sustancial sobre la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en la muestra. Esto es una ventaja importante ya que reduce la variabilidad en la población de ácidos nucleicos extracelulares atribuible a diferentes procedimientos de manipulación.

Según un cuarto aspecto, se describe un recipiente para recoger una muestra biológica que contiene células, preferentemente una muestra de sangre, en el que el recipiente comprende una composición según el tercer aspecto. Según la invención como se define por las reivindicaciones, se proporciona un recipiente adecuado para recoger una muestra que contiene células, preferentemente una muestra de sangre, plasma o de suero, que comprende

- una composición estabilizante adecuada para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en la muestra que contiene células, en el que dicha composición estabilizante comprende un inhibidor de las caspasas, y
- al menos un compuesto según la fórmula 1,



fórmula 1

en la que R1 es un residuo de hidrógeno o un residuo de alquilo, preferentemente un residuo de alquilo C1-C5, más preferido un residuo de metilo, R2 y R3 son residuos de hidrocarburo idénticos o diferentes con una longitud de la cadena de carbono de 1 - 20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un residuo de oxígeno, azufre o selenio.

Proporcionando un recipiente respectivo, por ejemplo, un tubo de recogida de muestra que comprende la composición estabilizante tiene la ventaja que la muestra se estabiliza inmediatamente tan pronto como la muestra se recoge en el recipiente respectivo. Además, un recipiente de recogida de muestra respectivo, en particular un tubo de extracción de sangre, es capaz de estabilizar glóbulos sanguíneos y ácidos nucleicos extracelulares y opcionalmente virus respectivamente ácidos nucleicos virales contenidos en una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre. Así, se venció otro problema.

Según un quinto aspecto, se describe un método que comprende la etapa de recoger, preferentemente extraer, una muestra biológica, preferentemente sangre, de un paciente directamente en una cámara de un recipiente según el cuarto aspecto.

Según un sexto aspecto, se describe un método de producción de una composición según el tercer aspecto, en el que los componentes de la composición se mezclan, preferentemente se mezclan en una solución.

El término "solución", como se usa en el presente documento en particular, se refiere a una composición líquida, preferentemente una composición acuosa. Puede ser una mezcla homogénea de solo una fase, pero también está dentro del alcance de la presente invención que una solución comprenda componentes sólidos tales como, por ejemplo, precipitados.

Otros objetivos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de la siguiente descripción y reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse, sin embargo, que la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la solicitud, se facilitan a modo de ilustración solo. Diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y alcance de la invención desvelada llegarán a ser fácilmente evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de la lectura de lo siguiente.

#### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1a muestra una imagen de gel después de la electroforesis en chip de ADN aislado de muestras tratadas

con inhibidores de las caspasas (Ejemplo 1).

La FIG. 1b es un diagrama que muestra el efecto de inhibidores de las caspasas sobre el aumento de ADN ribosómico 18S en plasma (Ejemplo 1).

La Fig. 2a muestra una imagen de gel después de la electroforesis en chip de ADN aislado de muestras tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de la caspasa Q-VD-OPH en combinación (Ejemplo 2).

La Fig. 2b es un diagrama que muestra los efectos de diferentes concentraciones del inhibidor de la caspasa Q-VD-OPH en combinación con glucosa sobre el aumento de ADN ribosómico 18S en el plasma (Ejemplo 2).

La Fig. 3 muestra la integridad de los glóbulos sanguíneos medida por citometría de flujo para glóbulos sanguíneos tratados con dihidroxiacetona disuelta en diferentes tampones (Ejemplo 3).

La Fig. 4a muestra una imagen de gel después de la electroforesis en chip de ADN aislado de muestras tratadas con dihidroxiacetona disuelta en diferentes tampones (Ejemplo 3).

La Fig. 4b es un diagrama que muestra el efecto de la dihidroxiacetona sobre el aumento de ADN ribosómico 18S (Ejemplo 3).

La Fig. 5 muestra la integridad de los glóbulos sanguíneos medida por citometría de flujo para glóbulos sanguíneos tratados con diferentes concentraciones de dihidroxiacetona (Ejemplo 4).

La Fig. 6a muestra una imagen de gel después de la electroforesis en chip de ADN aislado de muestras tratadas con diferentes concentraciones de dihidroxiacetona (Ejemplo 4).

La Fig. 6b es un diagrama que muestra el efecto de diferentes concentraciones de dihidroxiacetona sobre el aumento de ADN ribosómico 18S (Ejemplo 4).

La Fig. 7a muestra la integridad de los glóbulos sanguíneos medida por citometría de flujo para glóbulos sanguíneos tratados con una combinación de  $K_2EDTA$  elevado, Q-VD-OPH y DHA (Ejemplo 5).

La Fig. 7b es un diagrama que muestra el efecto de la combinación de EDTA, DHA y Q-VD-OPH sobre el aumento de ADN 18S (Ejemplo 5).

La Fig. 8 es un diagrama que muestra el efecto de la combinación de EDTA, DHA y Q-VD-OPH sobre el nivel de transcrito de ARNm circulante libre en plasma (Ejemplo 6).

La Fig. 9 es un diagrama que muestra los efectos de diferentes concentraciones de DMAA sobre el aumento de ADN ribosómico 18S en el plasma.

La Fig. 10 es un diagrama que muestra la influencia de diferentes alcoholes de azúcar sobre el aumento de ADNr 18S (Ejemplo 8)

La Fig. 11 es un diagrama que muestra la influencia de sustancias sobre el aumento de ADNr 18S (Ejemplo 9)

La Fig. 12 es un diagrama que muestra la influencia de sustancias sobre el aumento de ADNr 18S (Ejemplo 10)

La Fig. 13 es un diagrama que muestra la influencia de sustancias sobre el aumento de ADNr 18S (Ejemplo 11)

La Fig. 14 es un diagrama que muestra la influencia de sustancias sobre el aumento de ADNr 18S (Ejemplo 11)

La Fig. 15 es un diagrama que muestra la influencia de sustancias sobre el aumento de ADNr 18S

La Fig. 16 es un diagrama que muestra el aumento de ADNclc en la fracción plasmática de sangre completa incubada durante hasta 6 días a 37 °C (Ejemplo 13)

La Fig. 17 es un diagrama que muestra el aumento de ADNclc en la fracción plasmática de sangre completa incubada durante hasta 6 días a 37 °C (Ejemplo 13)

La Fig. 18 es un diagrama que muestra el porcentaje de éxitos de fragmentos de ADN enriquecidos (Ejemplo 14)

La Fig. 19 es un diagrama que muestra las copias medias (Ejemplo 14)

La Fig. 20 es un diagrama que muestra el porcentaje de 18S en comparación con BD Vacutainer K2E (Ejemplo 14)

La Fig. 21 es un diagrama que muestra la disminución de VIH, incubado en sangre completa a 37 °C, purificado de plasma (Ejemplo 15)

La Fig. 22 es un diagrama que muestra la disminución de VHC, incubado en sangre completa a 37 °C, purificado de plasma (Ejemplo 15)

La Fig. 23 es un diagrama que muestra la influencia de propionamida sobre el aumento de ADNr 18S Donante 1 (Ejemplo 16)

La Fig. 24 es un diagrama que muestra la influencia de propionamida sobre el aumento de ADNr 18S Donante 2 (Ejemplo 16)

### Descripción detallada de la presente invención

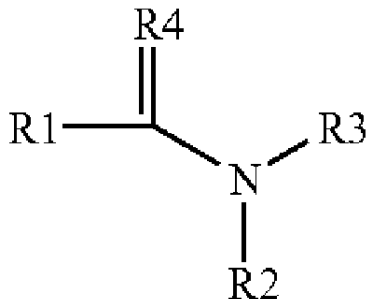
En el presente documento se describen métodos, composiciones y dispositivos y así tecnologías adecuadas para estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra biológica que contiene células. La presente invención se define por las reivindicaciones. Las tecnologías de estabilización desveladas en el presente documento reducen el riesgo de que la población de ácidos nucleicos extracelulares se contamine con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que se deriva de, por ejemplo, se libera de células dañadas y/o moribundas contenidas en la muestra. Por tanto, la presente invención logra la estabilización de la muestra y, por tanto, la estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en su interior sin la lisis de las células contenidas. Más bien, células contenidas en la muestra se estabilizan, previniendo o reduciendo así sustancialmente la liberación de ácidos nucleicos intracelulares. La sorprendente estabilización que se logra con la presente invención permite el almacenamiento y/o la manipulación de la muestra estabilizada durante un periodo prolongado de tiempo a temperatura ambiente sin comprometer la calidad de la muestra, respectivamente los ácidos nucleicos extracelulares contenidos en ella. Como la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares se estabiliza y así se preserva sustancialmente en el momento en el que la muestra



se obtiene usando las enseñanzas de la presente invención, el tiempo entre la recogida de muestras y la extracción del ácido nucleico puede variar sin efecto significativo sobre la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares. Esto permite la normalización de, por ejemplo, el diagnóstico o pronóstico del análisis de ácidos nucleicos extracelulares debido a que variaciones en la manipulación/almacenamiento de las muestras tienen menos influencia sobre la calidad, respectivamente la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares, proporcionando así una ventaja importante con respecto a los métodos del estado de la técnica. Por tanto, las muestras, respectivamente los ácidos nucleicos extracelulares obtenidos de muestras respectivamente estabilizadas, llegan a ser más comparables. Además, las enseñanzas de la presente invención obvian la necesidad de separar directamente las células contenidas en la muestra de la porción libre de células de la muestra con el fin de evitar, respectivamente reducir, contaminaciones de los ácidos nucleicos extracelulares con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que es de otro modo liberado de células descompuestas. Esta ventaja simplifica considerablemente la manipulación de las muestras, en particular la manipulación de muestras de sangre completa. Por ejemplo, las muestras de sangre completa obtenidas en una clínica y estabilizadas según las enseñanzas de la presente invención pueden transportarse a temperatura ambiente y el plasma que contiene los ácidos nucleicos extracelulares puede separarse convenientemente en el laboratorio clínico receptor. Sin embargo, las enseñanzas de la invención también son ventajosas cuando se procesan muestras biológicas agotadas en células, o muestras comúnmente denominadas "libres de células", tales como, por ejemplo, plasma sanguíneo o suero. Las muestras biológicas agotadas en células o "libres de células" respectivas todavía pueden comprender (también dependiendo del proceso de separación usado) células residuales, en particular glóbulos blancos que comprenden ADN genómico, que por consiguiente, plantean el riesgo de que la población de ácidos nucleicos extracelulares se contamine cada vez más con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, si las células (posiblemente) restantes están dañadas o mueren durante el transporte del proceso de almacenamiento. Este riesgo se reduce considerablemente. Debido a que la tecnología de la presente invención permite preservar eficazmente la población de ácidos nucleicos extracelulares de la muestra en el momento en el que la muestra se recoge y se pone en contacto con los agentes estabilizantes, dichas muestras pueden ser procesadas apropiadamente en las instalaciones receptoras con el fin de aislar los ácidos nucleicos extracelulares de dichas muestras, mientras que se evita sustancialmente, respectivamente se reducen, las contaminaciones de la población nucleica extracelular con ácidos nucleicos intracelulares. Las instalaciones que reciben las muestras tales como, por ejemplo, los laboratorios normalmente también tienen el equipo necesario tal como, por ejemplo, centrifugas de alta velocidad (u otros medios, véase también más adelante) para eliminar eficazmente células comprendidas en las muestras, que incluyen células residuales que podrían estar presentes en muestras agotadas en células tales como, por ejemplo, en plasma sanguíneo. Tal equipo no está frecuentemente presente en las instalaciones en las que se obtiene la muestra. Así, la presente invención tiene muchas ventajas cuando se estabilizan muestras biológicas que comprenden una gran cantidad de células tales como, por ejemplo, muestras de sangre completa, pero también tiene ventajas importantes cuando se estabilizan muestras biológicas que comprenden solo una pequeña cantidad de células o que puede ser que se sospecha que contienen células tales como, por ejemplo, plasma, suero, orina, saliva, fluidos sinoviales, líquido amniótico, líquido lacrimonal, ícores, líquido linfático, líquido, líquido cefalorraquídeo y similares.

Según un primer aspecto descrito en el presente documento, se proporciona un método adecuado para estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra que contiene células, preferentemente una muestra de sangre, poniendo en contacto la muestra con

- a) al menos un inhibidor de la apoptosis, y/o  
 b) al menos un agente hipertónico, que estabiliza las células comprendidas en la muestra, y/o  
 c) al menos un compuesto según la fórmula 1



en la que R1 es un residuo de hidrógeno o un residuo de alquilo, preferentemente un residuo de alquilo C1-C5, más preferido un residuo de metilo, R2 y R3 son residuos de hidrocarburo idénticos o diferentes con una longitud de la cadena de carbono de 1 - 20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un residuo de oxígeno, azufre o selenio.

Así, se reduce el riesgo de que la población de ácidos nucleicos extracelulares se contamine con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado que se origina a partir de células contenidas, por ejemplo, de células dañadas o moribundas y/o se reduce la degradación de ácidos nucleicos presentes en la muestra,

respectivamente se inhibe. Esto tiene el efecto de que la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en dicha muestra se preserva sustancialmente, respectivamente se estabiliza.

El término “ácidos nucleicos extracelulares” o “ácido nucleico extracelular”, como se usa en el presente documento, se refiere en particular a ácidos nucleicos que no están contenidos en células. Ácidos nucleicos extracelulares respectivos también se refiere frecuentemente a ácidos nucleicos libres de células. Estos términos se usan como sinónimos en el presente documento. Por tanto, los ácidos nucleicos extracelulares normalmente están presentes en el exterior de una célula o exterior de una pluralidad de células dentro de una muestra. El término “ácidos nucleicos extracelulares” se refiere, por ejemplo, a ARN extracelular, además de a ADN extracelular. Ejemplos de ácidos nucleicos extracelulares típicos que se encuentran en la fracción libre de células (respectivamente porción) de muestras biológicas tales como líquidos corporales tales como, por ejemplo, plasma sanguíneo incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos extracelulares de mamífero tales como, por ejemplo, ADN y/o ARN extracelulares asociados a tumor o derivados de tumor, otros ADN y/o ARN extracelulares relacionados con enfermedad, ADN epigenéticamente modificado, ADN y/o ARN fetales, ARN interferente pequeño tal como, por ejemplo, miARN y ARNip, y ácidos nucleicos extracelulares no de mamífero tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos virales, ácidos nucleicos de patógeno liberados en la población de ácidos nucleicos extracelulares, por ejemplo, de procariotas (por ejemplo, bacterias), virus, parásitos eucariotas u hongos. Según una realización, el ácido nucleico extracelular se obtiene de, respectivamente comprende, un líquido corporal como muestra biológica que contiene células tal como, por ejemplo, sangre, plasma, suero, saliva, orina, líquido, líquido cefalorraquídeo, esputo, líquido lacrimonal, sudor, líquido amniótico o linfático. En el presente documento, los presentes inventores se refieren a ácidos nucleicos extracelulares que se obtienen de líquidos corporales circulantes como ácidos nucleicos extracelulares circulantes o libres de células circulantes. Según una realización, el término ácido nucleico extracelular en particular se refiere a ácidos nucleicos extracelulares de mamífero, preferentemente ácidos nucleicos extracelulares asociados a enfermedad o derivados de enfermedad tales como ácidos nucleicos extracelulares asociados a tumor o derivados de tumor, ácidos nucleicos extracelulares liberados debido a inflamaciones o lesiones, en particular traumatismos, ácidos nucleicos extracelulares relacionados con y/o liberados debido a otras enfermedades, o ácidos nucleicos extracelulares derivados de un feto. El término “ácidos nucleicos extracelulares” o “ácido nucleico extracelular”, como se describe en el presente documento, también se refiere a ácidos nucleicos extracelulares obtenidos de otras muestras, en particular muestras biológicas distintas de líquidos corporales. Normalmente, más de un ácido nucleico extracelular está comprendido en una muestra. Normalmente, una muestra comprende más de una clase o tipo de ácidos nucleicos extracelulares. El término “población de ácidos nucleicos extracelulares”, como se usa en el presente documento, en particular se refiere al colectivo de diferentes ácidos nucleicos extracelulares que están comprendidos en una muestra que contiene células. Una muestra que contiene células normalmente comprende una característica y así población de ácidos nucleicos extracelulares única. Así, la clase, tipo y/o la cantidad de uno o más ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en la población de ácidos nucleicos extracelulares de una muestra específica son características importantes de la muestra. Como se trata anteriormente, es, por tanto, importante estabilizar y así preservar sustancialmente dicha población de ácidos nucleicos extracelulares, ya que su composición y/o la cantidad de uno o más ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en la población de ácidos nucleicos extracelulares de una muestra pueden proporcionar información valiosa en el campo médico, del pronóstico o del diagnóstico. En particular, es importante reducir la contaminación y, por tanto, la dilución de la población de ácidos nucleicos extracelulares por ácidos nucleicos intracelulares, en particular por ADN genómico, después de recogerse la muestra. La preservación sustancial de la población de ácidos nucleicos extracelulares que puede lograrse con las tecnologías de estabilización según la invención permite que la población de ácidos nucleicos extracelulares dentro de una muestra se mantenga sustancialmente sin cambiar durante el periodo de estabilización en comparación con la población de ácidos nucleicos extracelulares en el momento de la estabilización de la muestra. Al menos, los cambios en la población de ácidos nucleicos extracelulares con respecto a la cantidad, la calidad y/o la composición de los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos, en particular cambios atribuibles a un aumento de ADN genómico liberado, se reducen considerablemente durante el periodo de estabilización (preferentemente al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 %) en comparación con una muestra no estabilizada o una muestra correspondiente que se estabiliza, por ejemplo, por EDTA en caso de una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre.

Según un primer sub-aspecto del primer aspecto, se usa al menos un inhibidor de la apoptosis para estabilizar la muestra. Como se muestra por los ejemplos proporcionados, ya el inhibidor de la apoptosis solo es eficaz en estabilizar una muestra que contiene células y preservar sustancialmente la población de ácidos nucleicos extracelulares de cambios en su composición, en particular que surgen de las contaminaciones con ADN genómico fragmentado. La muestra puede ponerse en contacto con el inhibidor de la apoptosis, por ejemplo, añadiendo el inhibidor de la apoptosis a la muestra o viceversa. El al menos un inhibidor de la apoptosis presente en la mezcla resultante soporta la estabilización de células contenidas en la muestra e inhibe la degradación de ácidos nucleicos comprendidos en la muestra, preservando así sustancialmente la población de ácidos nucleicos extracelulares.

El término “inhibidor de la apoptosis”, como se usa en el presente documento, en particular se refiere a un compuesto cuya presencia en una muestra biológica que contiene células proporciona una reducción, prevención y/o inhibición de los procesos apoptóticos en las células y/o hace las células más resistentes a los estímulos apoptóticos. Los inhibidores de la apoptosis incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos o moléculas similares a proteína o péptido, moléculas orgánicas e inorgánicas. Los inhibidores de la apoptosis incluyen compuestos que

actúan de inhibidores metabólicos, inhibidores de la degradación de ácido nucleico, respectivamente vías de ácidos nucleicos, inhibidores enzimáticos, en particular inhibidores de las caspasas, inhibidores de la calpaína e inhibidores de otras enzimas implicadas en los procesos apoptóticos. Inhibidores de la apoptosis respectivos se enumeran en la Tabla 1. Preferentemente, el al menos un inhibidor de la apoptosis que se usa para estabilizar la muestra biológica que contiene células está seleccionado del grupo que consiste en inhibidores metabólicos, inhibidores de las caspasas e inhibidores de la calpaína. Ejemplos adecuados para cada clase se enumeran en la Tabla 1 en la categoría respectiva. Preferentemente, el inhibidor de la apoptosis es permeable a las células.

También es posible usar una combinación de diferentes inhibidores de la apoptosis, tanto de la misma clase como de una clase diferente de inhibidores de la apoptosis, respectivamente usar una combinación de diferentes inhibidores de la apoptosis que inhiben la apoptosis tanto por el mismo mecanismo de trabajo como por un mecanismo de trabajo diferente.

El inhibidor de la apoptosis puede ser un inhibidor de las caspasas. Miembros de la familia de los genes de la caspasa desempeñan una función significativa en la apoptosis. Se han explotado las preferencias de sustrato o especificidades de caspasas individuales para el desarrollo de péptidos que compiten satisfactoriamente por la unión a caspasa. Es posible generar inhibidores reversibles o irreversibles de la activación de caspasas acoplado péptidos específicos de caspasa a, por ejemplo, compuestos de aldehído, nitrilo o cetona. Por ejemplo, los péptidos derivatizados con fluorometilcetona (FMK) tales como Z-VAD-FMK actúan de inhibidores irreversibles eficaces sin efectos citotóxicos añadidos. Los inhibidores sintetizados con un grupo benciloxicarbonilo (BOC) en el extremo N y cadenas laterales de O-metilo presentan permeabilidad celular potenciada. Inhibidores de las caspasas adecuados adicionales se sintetizan con un grupo fenoxi en el extremo C. Un ejemplo es Q-VD-OPh, que es un inhibidor de las caspasas de amplio espectro irreversible permeable a las células que es incluso más eficaz en prevenir la apoptosis que Z-VAD-FMK.

El inhibidor de las caspasas puede ser un inhibidor de las pan-caspasas y así puede ser un inhibidor de las caspasas de amplio espectro. El inhibidor de las caspasas puede comprender un péptido específico de caspasa modificado. Preferentemente, dicho péptido específico de caspasa se modifica por un compuesto de aldehído, nitrilo o cetona. Se prefiere que el péptido específico de caspasa se modifique preferentemente en el extremo carboxilo con un grupo O-fenoxi o uno fluorometilcetona (FMK). El inhibidor de las caspasas puede seleccionarse del grupo que consiste en Q-VD-OPh y Z-VAD(OMe)-FMK. Puede usarse Z-VAD(OMe)-FMK, un inhibidor de las pan-caspasas, que es un inhibidor de péptido irreversible competitivo y bloquea las enzimas de la familia de la caspasa-1 y la familia de la caspasa-3. Se prefiere usar Q-VD-OPh, que es un inhibidor de amplio espectro para caspasas. Q-VD-OPh es permeable a las células e inhibe la muerte celular por apoptosis. Q-VD-OPh no es tóxico para las células incluso a concentraciones extremadamente altas y consiste en un grupo fenoxi del extremo carboxi conjugado con los aminoácidos valina y aspartato. Es igual de eficaz en prevenir la apoptosis mediada por las tres vías apoptóticas principales, caspasa-9 y caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-10 y caspasa-12 (Caserta et al, 2003). Inhibidores de las caspasas adicionales se enumeran en la Tabla 1. El inhibidor de las caspasas que se usa como inhibidor de la apoptosis para estabilizar la muestra que contiene células puede ser uno que actúa sobre una o más caspasas localizadas aguas abajo en la vía de muerte celular intracelular de la célula, tal como la caspasa-3. El inhibidor de las caspasas puede ser un inhibidor para una o más caspasas seleccionadas del grupo que consiste en caspasa-3, caspasa-8, caspasa-9, caspasa-10 y caspasa-12. También puede usarse una combinación de inhibidores de las caspasas.

La mezcla que se obtiene después de poner en contacto la muestra biológica con el al menos un inhibidor de la apoptosis puede comprender el inhibidor de la apoptosis (o combinación de inhibidores de la apoptosis) en una concentración seleccionada del grupo de al menos 0,01  $\mu\text{M}$ , al menos 0,05  $\mu\text{M}$ , al menos 0,1  $\mu\text{M}$ , al menos 0,5  $\mu\text{M}$ , al menos 1  $\mu\text{M}$ , al menos 2,5  $\mu\text{M}$  o al menos 3,5  $\mu\text{M}$ . Por supuesto, también pueden usarse concentraciones mayores. Intervalos de concentración adecuados para el (los) inhibidor(es) de la apoptosis cuando se mezcla(n) con la muestra biológica que contiene células incluyen, pero no se limitan a, 0,01  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ , 0,05  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  a 40  $\mu\text{M}$ , más preferentemente 1  $\mu\text{M}$  a 30  $\mu\text{M}$  o 2,5  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$ . Se encontró que las concentraciones más altas eran más eficaces, sin embargo, también se lograron buenos resultados estabilizantes a menores concentraciones. Por tanto, también se logra una estabilización eficaz a menores concentraciones, por ejemplo, en un intervalo seleccionado de 0,1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  a 7,5  $\mu\text{M}$  o 1  $\mu\text{M}$  a 5  $\mu\text{M}$ , en particular si el inhibidor de la apoptosis se usa en combinación con un agente hipertónico (véase más adelante). Las concentraciones anteriormente mencionadas se aplican al uso de un único inhibidor de la apoptosis, además de al uso de una combinación de inhibidores de las caspasas. Si se usa una combinación de inhibidores de las caspasas, la concentración de un inhibidor de la apoptosis individual que se usa en dicha mezcla de inhibidores de la apoptosis también puede encontrarse por debajo de las concentraciones anteriormente mencionadas, si la concentración global de la combinación de inhibidores de la apoptosis cumple las características anteriormente mencionadas. El uso de una concentración menor que todavía estabilice eficazmente las células y/o reduzca la degradación de ácidos nucleicos en la presente en la muestra tiene la ventaja de que los costes para la estabilización pueden reducirse. Pueden usarse concentraciones menores, por ejemplo, si el inhibidor de la apoptosis se usa en combinación con uno o más estabilizadores como se describe en el presente documento. Las concentraciones anteriormente mencionadas son en particular adecuadas si se usa un inhibidor de las caspasas, en particular un péptido específico de caspasa modificado tal como Q-VD-OPh y/o Z-VAD(OMe)-FMK como inhibidor de la

apoptosis. Las concentraciones anteriormente mencionadas son, por ejemplo, muy adecuadas para estabilizar sangre completa, en particular 10 ml de sangre. Los intervalos de concentración adecuados para otros inhibidores de la apoptosis y/o para otras muestras biológicas que contienen células pueden determinarse por el experto usando experimentos rutinarios, por ejemplo, probando los inhibidores de la apoptosis, respectivamente las diferentes concentraciones en los ensayos de prueba descritos en los ejemplos.

Según un ejemplo, el inhibidor de la apoptosis disminuirá o reducirá, en una cantidad eficaz, la apoptosis en una muestra biológica que contiene células al menos el 25 por ciento, al menos el 30 por ciento, al menos el 40 por ciento, al menos el 50 por ciento, preferentemente, al menos el 75 por ciento, más preferentemente, al menos el 85 por ciento en comparación con una muestra de control que no contiene un inhibidor de la apoptosis respectivo.

Según un segundo sub-aspecto del primer aspecto, se usa al menos un agente hipertónico para estabilizar la muestra, en el que el agente hipertónico usado estabiliza las células comprendidas en la muestra. Como se muestra por los ejemplos, ya el agente hipertónico solo es eficaz en estabilizar una muestra que contiene células y preservar sustancialmente la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en ella. El agente hipertónico induce el encogimiento de células por efectos hipertónicos débiles (osmosis), aumentando así la estabilidad celular. Por tanto, las células son menos propensas a, por ejemplo, daño celular mecánicamente inducido. La muestra puede ponerse en contacto con el agente hipertónico, por ejemplo, añadiendo el agente hipertónico a la muestra o viceversa. El agente hipertónico presente en la mezcla resultante en particular es adecuado para estabilizar las células contenidas en la muestra, reduciendo así la cantidad de ácidos nucleicos intracelulares, en particular el ADN genómico que es liberado de células dañadas. Así, la población de ácidos nucleicos extracelulares se preserva sustancialmente y se reduce el riesgo de contaminación, respectivamente dilución, de los ácidos nucleicos extracelulares con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico.

Según un ejemplo, el agente hipertónico es suficientemente osmóticamente activo para inducir el encogimiento de células (las células liberan agua), sin embargo, sin dañar las células, es decir, sin inducir o promover la lisis celular, respectivamente la rotura celular. Por tanto, el agente hipertónico tiene preferentemente un efecto osmótico débil. Además, se desea que las interacciones entre el agente hipertónico y la muestra se limiten predominantemente al efecto de estabilización celular básicamente con el fin de evitar efectos secundarios no deseados. Así, puede usarse un agente hipertónico no cargado. Usar un agente hipertónico no cargado tiene la ventaja de que, aún cuando las células se encojan, respectivamente se estabilicen, debido al efecto osmótico del agente hipertónico, las interacciones entre el agente hipertónico y los otros compuestos comprendidos en la muestra están limitadas en comparación con el uso de un agente hipertónico cargado.

Según un ejemplo ventajoso, el agente hipertónico es un compuesto orgánico hidroxilado y, por consiguiente, lleva al menos un grupo hidroxilo. Según un ejemplo, el compuesto orgánico hidroxilado comprende al menos dos grupos hidroxilo. Según un ejemplo, el compuesto orgánico hidroxilado es un poliol. Según un ejemplo, el poliol comprende 2 a 10 grupos hidroxilo, preferentemente 3 a 8 grupos hidroxilo. El compuesto orgánico hidroxilado puede comprender 2 a 12 átomos de carbono, preferentemente 3 a 8, y puede ser una molécula cíclica o lineal, ramificada o no ramificada; puede estar saturada o insaturada; aromática o no aromática. Según un ejemplo, el compuesto orgánico hidroxilado es un compuesto de hidroxi-carbonilo. Un compuesto de hidroxi-carbonilo es un compuesto que posee uno o más grupos hidroxilo (OH) y uno o más grupos carbonilo. Los compuestos orgánicos hidroxilados pueden incluir, pero no se limitan a, compuestos de cetona hidroxilados e hidratos de carbono, o compuestos derivados de los mismos. Según un ejemplo, el compuesto orgánico hidroxilado es un polialcohol, en particular un alcohol de azúcar. Por tanto, los compuestos orgánicos hidroxilados incluyen, pero no se limitan a, hidratos de carbono tales como glucosa, rafinosa, sucrosa, fructosa, alfa-D-lactosa monohidratada, inositol, maltitol, manitol, dihidroxiacetona, alcoholes tales como glicerol, eritritol, manitol, sorbitol, volemitol, o alcoholes de azúcar. Ejemplos adecuados también se enumeran en la tabla a continuación. También pueden usarse combinaciones de compuestos orgánicos hidroxilados respectivos.

Fórmula química	Nombre de la IUPAC	Nombre común
<i>Poliol</i> es, por ejemplo		
C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> (OH) <sub>3</sub>	Propano-1,2,3-triol	Glicerina
C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> (OH) <sub>4</sub>	Butano-1,2,3,4-tetraol	Eritritol
C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> (OH) <sub>5</sub>	Pentano-1,2,3,4,5-pentol	Xilitol, Arabitol, Ribitol
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> (OH) <sub>6</sub>	Hexano-1,2,3,4,5,6-hexol	Manitol, Sorbitol, Dulcitol, Iditol
C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> (OH) <sub>7</sub>	Heptano-1,2,3,4,5,6,7-heptol	Volemitol
<i>Alcoholes alicíclicos y de azúcar, por ejemplo</i>		
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> (OH) <sub>6</sub>	Ciclohexano-1,2,3,4,5,6-hexol	Inositol
C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	1-O-α-D-Glucopiranosil-D-manitol	Isomalt
C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	4-O-α-D-Glucopiranosil-D-glucitol	Maltitol
C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub>	4-O-α-D-Galactopiranosil-D-glucitol	Lactitol

Según un ejemplo, los poliols y alcoholes de azúcar enumerados anteriormente pueden sustituirse por alcoholes con menos grupos hidroxilo (por ejemplo, hexano-1,2,3,4,5-pentol, pentano-1,2,3,4-tetraol). Según un ejemplo, el

compuesto orgánico hidroxilado no es alcohol que tiene 1 a 5 átomos de carbono y que lleva solo un grupo hidroxilo. Según un ejemplo, alcoholes con solo un grupo hidroxilo se excluyen como compuesto orgánico hidroxilado. El compuesto orgánico hidroxilado que puede usarse como estabilizador es preferentemente soluble en agua y no tóxico para las células comprendidas en la muestra biológica que va a estabilizarse. Preferentemente, el compuesto orgánico hidroxilado no induce o soporta la lisis de las células contenidas en la muestra biológica y, por consiguiente, preferentemente no funciona como detergente o como agente de disolución de la membrana celular. Un compuesto orgánico hidroxilado adecuado logra un efecto estabilizante de la muestra que contiene células mejorando la preservación de la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares como puede probarse, por ejemplo, por los ensayos descritos en la sección de ejemplos.

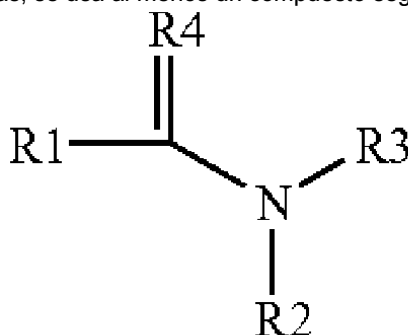
El añadir un compuesto orgánico hidroxilado a una muestra biológica que contiene células tal como, por ejemplo, sangre completa, aumenta la concentración de dicho compuesto orgánico hidroxilado en la porción libre de células, respectivamente fracción (por ejemplo, el plasma sanguíneo), y así fuerza a los glóbulos sanguíneos a liberar agua en el plasma como resultado de un efecto osmótico (hipertónico). Según un ejemplo, se usa un compuesto orgánico hidroxilado que está estrechamente relacionado con un producto del metabolismo celular, pero preferentemente no puede ser utilizado por las células.

Según un ejemplo preferido, las células contenidas en la muestra biológica son esencialmente impermeables para el agente hipertónico que se usa para la estabilización. Así, el agente hipertónico, que preferentemente es un compuesto orgánico hidroxilado como se describe en detalle anteriormente, es esencialmente impermeable a las células. Esencialmente impermeable a las células a este respecto en particular significa que la concentración del agente hipertónico, que preferentemente es un compuesto orgánico hidroxilado, es sustancialmente mayor en la porción extracelular de la muestra que dentro de las células contenidas en la muestra biológica que se estabiliza según las enseñanzas de la presente invención. Según un ejemplo preferido, el agente hipertónico, que preferentemente es un compuesto orgánico hidroxilado, no es tóxico, de manera que la viabilidad celular no está comprometida. Esto se prefiere para evitar influencias perturbadoras sobre el metabolismo celular.

Según un ejemplo, el agente hipertónico es dihidroxiacetona (DHA). La DHA es un hidrato de carbono y normalmente sirve de sustancia de bronceado en lociones auto-bronceadoras. Como se demuestra por los ejemplos, la DHA tiene sorprendentemente un efecto estabilizante sorprendente sobre muestras biológicas que contienen células, en particular muestras de sangre completa y muestras derivadas de sangre completa tales como plasma sanguíneo o suero. La DHA no se produce naturalmente en células de mamífero, excepto por el éster de ácido fosfórico de DHA, fosfato de dihidroxiacetona, un producto intermedio de la glicólisis. Así, no se espera que la DHA sea activamente transportada o difunda en glóbulos sanguíneos. Según una realización, el agente hipertónico no es fosfato de dihidroxiacetona.

La mezcla que se obtiene cuando se pone en contacto la muestra biológica que contiene células con el al menos un agente hipertónico puede comprender el agente hipertónico o mezcla de agentes hipertónicos en una concentración de al menos 0,05 M, preferentemente 0,1 M, preferentemente al menos 0,2 M, más preferido al menos 0,25 M. Por supuesto, también pueden usarse mayores concentraciones. Intervalos de concentración adecuados para el agente hipertónico pueden seleccionarse de 0,05 M a 2 M, 0,1 M a 1,5 M, 0,15 M a 0,8 M, 0,2 M a 0,7 M o 0,1 M a 0,6 M. Concentraciones respectivas son particularmente adecuadas si se usa un compuesto orgánico hidroxilado, por ejemplo, un hidrato de carbono tal como dihidroxiacetona como agente hipertónico. Las concentraciones anteriormente mencionadas son, por ejemplo, muy adecuadas para estabilizar sangre completa, en particular 10 ml de sangre. Intervalos de concentración adecuados para otros agentes hipertónicos y/u otras muestras biológicas que contienen células también pueden determinarse por el experto usando experimentos rutinarios, por ejemplo, probando los agentes hipertónicos, respectivamente diferentes concentraciones de los mismos, en los ensayos de prueba descritos en los ejemplos.

Según un tercer sub-aspecto del primer aspecto, para estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares en una muestra que contiene células, se usa al menos un compuesto según la fórmula 1



fórmula 1

en la que R1 es un residuo de hidrógeno o un residuo de alquilo, preferentemente un residuo de alquilo C1-C5, más

preferido un residuo de metilo, R2 y R3 son residuos de hidrocarburo idénticos o diferentes con una longitud de la cadena de carbono de 1 - 20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un residuo de oxígeno, azufre o selenio.

5 Como se muestra por los ejemplos proporcionados, un compuesto según la fórmula 1 descrito anteriormente es eficaz en alcanzar un efecto estabilizante sorprendente y en preservar sustancialmente la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares en la muestra estabilizada. También puede usarse una mezcla de uno o más compuestos según la fórmula 1 para la estabilización.

10 Los residuos de hidrocarburo R2 y/o R3 pueden seleccionarse independientemente entre sí del grupo que comprende alquilo, que incluye alquilo de cadena corta y alquilo de cadena larga, alqueno, alcoxi, alcoxi de cadena larga, cicloalquilo, arilo, haloalquilo, alquilsililo, alquilsililoxi, alquilenilo, alqueniilo, arileno, carboxilatos y carbonilo. Grupos generales, por ejemplo, alquilo, alcoxi, arilo, etc., se describen en la descripción. Preferentemente, los siguientes grupos se usan dentro de los grupos generalmente descritos:

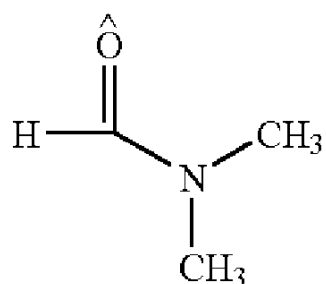
- 15 (1) alquilo: preferentemente alquilos de cadena corta, en particular alquilos C1-C5 lineales y ramificados o alquilos de cadena larga: alquilos C5-C20 lineales y ramificados;
- (2) alqueno: preferentemente alqueno C2-C6;
- 20 (3) cicloalquilo: preferentemente cicloalquilo C3-C8;
- (4) alcoxi: preferentemente alcoxi C1-C6;
- (5) alcoxi de cadena larga: preferentemente alcoxi C5-C20 lineal y ramificado;
- (6) alquilenos: preferentemente un residuo de hidrocarburo alifático, cicloalifático o aromático lineal o ramificado divalente con 2 a 18 átomos de carbono que opcionalmente contiene heteroátomos, por ejemplo, seleccionados del grupo que comprende: metileno; 1,1-etileno; 1,1-propilideno; 1,2-propileno; 1,3-propileno; 2,2-propilideno;
- 25 butan-2-ol-1,4-diilo; propan-2-ol-1,3-diilo; 1,4-butileno; 1,4-pentileno; 1,6-hexileno; 1,7-heptileno; 1,8-octileno; 1,9-nonileno; 1,10-decileno; 1,11-undecileno; 1,12-dodecileno; ciclohexano-1,1-diilo; ciclohexano-1,2-diilo; ciclohexano-1,3-diilo; ciclohexano-1,4-diilo; ciclopentano-1,1-diilo; ciclopentano-1,2-diilo; y ciclopentano-1,3-diilo;
- (7) alqueniilo: seleccionado preferentemente del grupo que comprende: 1,2-propeniilo; 1,2-buteniilo; 2,3-buteniilo; 1,2-penteniilo; 2,3-penteniilo; 1,2-hexeniilo; 2,3-hexeniilo; y 3,4-hexeniilo;
- 30 (8) alquiniilo: es igual a  $\text{—C}\equiv\text{C—}$ ;
- (9) arilo: seleccionado preferentemente de aromáticos con un peso molecular inferior a 300 Da;
- (10) arilenos: seleccionados preferentemente del grupo que comprende: 1,2-fenileno; 1,3-fenileno; 1,4-fenileno; 1,2-naftalenileno; 1,3-naftalenileno; 1,4-naftalenileno; 2,3-naftalenileno; 1-hidroxi-2,3-fenileno; 1-hidroxi-2,4-fenileno; 1-hidroxi-2,5-fenileno; 1-hidroxi-2,6-fenileno;
- 35 (11) carboxilato: preferentemente el grupo  $\text{—C(O)OR}$ , en el que R está seleccionado de: hidrógeno; alquilo C1-C6; fenilo; alquil C1-C6-C6H5; Li; Na; K; Cs; Mg; Ca;
- (12) carbonilo: preferentemente el grupo  $\text{—C(O)R}$ , en el que R está seleccionado de: hidrógeno; alquilo C1-C6; fenilo; alquilo C1-C6-C6H5 y amina (que produce una amida) seleccionada del grupo:  $\text{—NR}'_2$ , en el que cada R' está seleccionado independientemente de: hidrógeno; alquilo C1-C6; alquil C1-C6-C6H5 y fenilo, en el que, si ambos R representan alquilo C1-C6, pueden formar un anillo heterocíclico NC3 a NC5 con sustituyentes alquilo del anillo que forman la otra cadena de alquilo;
- 40 (13) alquilsililo: preferentemente el grupo  $\text{—SiR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ , en el que R1, R2 y R3 están seleccionados independientemente entre sí de: hidrógeno; alquilo; alquilo de cadena larga; fenilo; cicloalquilo; haloalquilo; alcoxi; alcoxi de cadena larga;
- 45 (14) alquilsililoxi: preferentemente el grupo  $\text{—O—SiR}_1\text{R}_2\text{R}_3$ , en el que R1, R2 y R3 están seleccionados independientemente entre sí de: hidrógeno; alquilo; alquilo de cadena larga; fenilo; cicloalquilo; haloalquilo; alcoxi; alcoxi de cadena larga.

La longitud de cadena n de R2 y/o R3 puede en particular tener los valores 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20. Preferentemente, R2 y R3 tienen una longitud de la cadena de carbono de 1-10. En este caso, la longitud de cadena n puede en particular tener los valores 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Preferentemente, R2 y R3 tienen una longitud de la cadena de carbono de 1 - 5 y en este caso la longitud de cadena puede en particular tener los valores 1, 2, 3, 4 y 5. Particularmente se prefiere una longitud de cadena de 1 o 2 para R2 y R3.

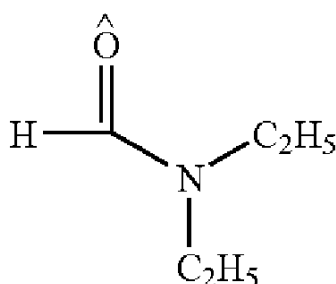
La longitud de cadena n de R1 tiene preferentemente el valor 1, 2, 3, 4 o 5. Particularmente se prefiere una longitud de cadena de 1 o 2 para R1.

R4 es preferentemente oxígeno.

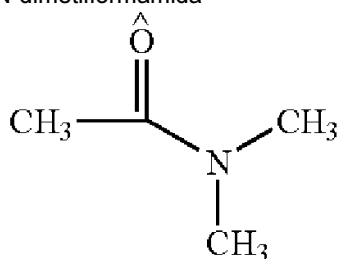
Según un ejemplo preferido, el compuesto según la fórmula 1 es una amida del ácido N,N-dialquilcarboxílico. Grupos R1, R2, R3 y R4 preferidos se describen anteriormente. Según un ejemplo, el compuesto está seleccionado del grupo que consiste en N,N-dimetilacetamida; N,N-dietilacetamida; N,N-dimetilformamida y N,N-dietilformamida. También son adecuadas N,N-dialquilpropanamidas tales como N,N-dimetilpropanamida como se muestra en los ejemplos. Preferentemente, la sustancia según la fórmula 1 es N,N-dimetilacetamida (DMAA). Las fórmulas estructurales de los compuestos preferidos son las siguientes:



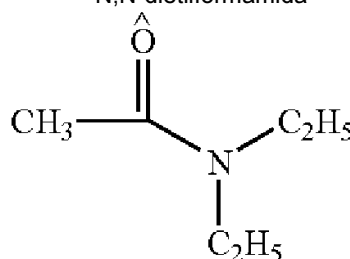
N,N-dimetilformamida



N,N-dietilformamida



N,N-dimetilacetamida



N,N-dietilacetamida

5

También son adecuados los análogos de tio respectivos, que comprenden azufre en lugar de oxígeno como R4.

La mezcla que se obtiene cuando se pone en contacto la muestra biológica que contiene células con un compuesto según la fórmula 1 o una mezcla de compuestos respectivos puede comprender dicho compuesto o mezcla de compuestos en una concentración final de al menos el 0,1 %, al menos el 0,5 %, al menos el 0,75 %, al menos el 1 %, al menos el 1,25 % o al menos el 1,5 %. Un intervalo de concentración adecuado incluye, pero no se limita a, 0,1 % hasta el 50 %. Intervalos de concentración preferidos pueden seleccionarse del grupo que consiste en 0,1 % al 30 %, 0,1 % al 20 %, 0,1 % al 15 %, 0,1 % al 10 %, 0,1 % al 7,5 %, 0,1 % al 5 %, 1 % al 30 %, 1 % al 20 %, 1 % al 15 %, 1 % al 10 %, 1 % al 7,5 %, 1 % al 5 %; 1,25 % al 30 %, 1,25 % al 20 %, 1,25 % al 15 %, 1,25 % al 10 %, 1,25 % al 7,5 %, 1,25 % al 5 %; 1,5 % al 30 %, 1,5 % al 20 %, 1,5 % al 15 %, 1,5 % al 10 %, 1,5 % al 7,5 % y 1,5 % al 5 %. Concentraciones respectivas son particularmente adecuadas si se usa una amida del ácido N,N-dialquilcarboxílico, por ejemplo, N,N-dimetilacetamida, N,N-dietilacetamida, N,N-dietilformamida o N,N-dimetilformamida o N,N-dimetilpropanamida como agente estabilizante. Las concentraciones anteriormente mencionadas son, por ejemplo, muy adecuadas para estabilizar sangre completa o hemoderivados tales como plasma. Intervalos de concentración adecuados para otros compuestos según la fórmula 1 y/u otras muestras biológicas que contienen células también pueden determinarse por el experto usando experimentos rutinarios, por ejemplo, probando el compuesto, respectivamente diferentes concentraciones del mismo, en los ensayos de prueba descritos en los ejemplos.

Preferentemente, el compuesto según la fórmula 1 se usa en combinación con un agente quelante para estabilizar la muestra que contiene células. En particular, puede usarse un agente quelante como anticoagulante cuando se estabiliza una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre tal como, por ejemplo, plasma o suero. Agentes quelantes adecuados e intervalos de concentración se proporcionan más adelante.

Según un cuarto sub-aspecto preferido, se describe un método adecuado para estabilizar una muestra que contiene células, preferentemente una muestra de sangre, en el que dicho método comprende poner en contacto la muestra con

- a) al menos un inhibidor de la apoptosis, y
- b) al menos un agente hipertónico, que estabiliza las células comprendidas en la muestra.

Así, el inhibidor de la apoptosis y el agente hipertónico, que ambos ya son eficaces en estabilizar una muestra que contiene células (véase anteriormente y ejemplos), se usan en combinación. Así, puede aumentarse el efecto de estabilización y/o también puede reducirse la concentración de los componentes individuales (el inhibidor de la apoptosis y/o el agente hipertónico), mientras que todavía se preserva eficazmente la población de ácidos nucleicos extracelulares en la muestra, y en particular se evita, respectivamente se reduce, la contaminación por ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado que es liberado de células dañadas o descompuestas contenidas en la muestra. Como se muestra en los ejemplos, el uso de una combinación respectiva es particularmente eficaz en estabilizar una muestra que contiene células, incluso muestras muy complejas tales como una muestra de sangre completa. También puede usarse una mezcla de diferentes inhibidores de la apoptosis en combinación con diferentes agentes hipertónicos. Ejemplos adecuados y preferidos del inhibidor de la apoptosis y el agente hipertónico, además de concentraciones adecuadas y preferidas de los agentes respectivos adecuados

para lograr una estabilización eficaz de la muestra, se describen en detalle anteriormente conjuntamente con los ejemplos, en los que cualquiera de un inhibidor de la apoptosis o un agente hipertónico se usa para estabilizar la muestra biológica que contiene células. Se remite a la divulgación anterior que también se aplica al ejemplo, en el que un inhibidor de la apoptosis se usa en combinación con un agente hipertónico. Preferentemente, al menos un inhibidor de las caspasas, preferentemente un péptido específico de caspasa modificado, preferentemente modificado en el extremo C con un grupo O-fenoxi tal como Q-VD-OPh, se usa en combinación con al menos un compuesto orgánico hidroxilado, por ejemplo, un hidrato de carbono, tal como dihidroxiacetona o un poliol, como agente hipertónico. Como se demuestra por los ejemplos, una combinación respectiva es sorprendentemente eficaz en estabilizar una muestra biológica que contiene células, en particular una muestra de sangre completa, a temperatura ambiente durante más de 3 días e incluso durante 6 días.

Según un ejemplo, se usa una combinación de agentes estabilizantes que comprende al menos un inhibidor de la apoptosis, al menos un agente hipertónico y/o al menos un compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente. Ejemplos de combinaciones respectivas incluyen (1) una combinación de al menos un inhibidor de la apoptosis y al menos un compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente, (2) una combinación de al menos un agente hipertónico y al menos un compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente o (3) una combinación de los tres agentes estabilizantes, es decir, al menos un inhibidor de la apoptosis, al menos un agente hipertónico y al menos un compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente. Una combinación respectiva también puede comprender aditivos adicionales que potencian el efecto estabilizante tal como, por ejemplo, anticoagulantes y agentes quelantes. Según un ejemplo, la combinación de agentes estabilizantes comprende un inhibidor de las caspasas y un anticoagulante, preferentemente un agente quelante tal como EDTA. Combinaciones respectivas pueden usarse ventajosamente según un quinto sub-aspecto en un método adecuado para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra que contiene células según el primer aspecto descrito en el presente documento. El efecto estabilizante observado con combinaciones de agentes estabilizantes es más fuerte que el efecto observado para cualquiera de los agentes estabilizantes individuales cuando se usa solo y/o permite usar concentraciones menores, haciendo así del uso combinatorio de agentes estabilizantes una opción atractiva. Ejemplos adecuados y preferidos del inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y el compuesto según la fórmula 1 se definen anteriormente, además de concentraciones adecuadas y preferidas de los agentes respectivos adecuados para lograr una estabilización eficaz de la muestra se describen en detalle anteriormente conjuntamente con los ejemplos, en los que cualquiera de un inhibidor de la apoptosis, un agente hipertónico o un compuesto según la fórmula 1 se usa para estabilizar la muestra biológica que contiene células.

Como se ha tratado en los antecedentes, los ácidos nucleicos extracelulares normalmente no están presentes "desnudos" en la muestra, sino que están, por ejemplo, estabilizados a un cierto grado por ser liberados protegidos en complejos o por estar contenidos en vesículas y similares. Esto tiene el efecto de que los ácidos nucleicos extracelulares ya están estabilizados a un cierto grado por naturaleza y así normalmente no se degradan rápidamente por nucleasas en muestras que contienen células tales como sangre completa, plasma o suero. Así, cuando se pretende estabilizar ácidos nucleicos extracelulares que están comprendidos en una muestra biológica, uno de los problemas primarios es la dilución, respectivamente la contaminación, de la población de ácidos nucleicos extracelulares por ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que se origina de células dañadas o moribundas que están contenidas en la muestra. Esto también plantea un problema cuando se procesan muestras agotadas en células tales como plasma o suero (que algunas veces también se describe como que están "libres de células" aún cuando pueden comprender cantidades menores de células). La tecnología de estabilización descrita en el presente documento es de particular ventaja a este respecto debido a que no solo preserva sustancialmente los ácidos nucleicos extracelulares presentes en la muestra y, por ejemplo, inhibe la degradación de los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos (preferentemente al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o lo más preferentemente al menos el 95 % durante el periodo de estabilización en comparación con una muestra no estabilizada o una muestra estabilizada con EDTA), sino que además reduce eficazmente la liberación de ADN genómico de células contenidas en la muestra y/o reduce la fragmentación de ADN genómico respectivo. Según un ejemplo, el usar el inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto según la fórmula 1 para estabilizar la muestra que contiene células según las enseñanzas descritas en el presente documento tiene el efecto de que el aumento de ADN que resulta de una liberación de ADN de células contenidas en la muestra se reduce en comparación con una muestra no estabilizada. Según una realización, dicha liberación de ADN genómico se reduce al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 10 veces, al menos 12 veces, al menos 15 veces, al menos 17 veces o al menos 20 veces con respecto al periodo de estabilización en comparación con la muestra no estabilizada o una muestra correspondiente que se estabiliza con EDTA (en particular en el caso de una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre tal como plasma o suero). Según un ejemplo, dicha liberación de ADN genómico se reducen al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % durante el periodo de estabilización en comparación con la muestra no estabilizada o una muestra correspondiente que se estabiliza con EDTA (en particular en el caso de una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre tal como plasma o suero). La liberación de ADN puede determinarse, por ejemplo, cuantificando el ADN ribosómico 18S como se describe en el presente documento en la sección de ejemplos. Por ejemplo, muestras de sangre estabilizadas con EDTA estándar muestran un aumento de 40 veces de ADN determinado, por ejemplo, en el día 6 de almacenamiento a temperatura ambiente en un ensayo respectivo



(véase la Fig. 2b). La estabilización que puede lograrse con las enseñanzas descritas en el presente documento reduce sorprendentemente esta liberación de ADN incluso hasta, por ejemplo, un máximo de 4 veces. Así, la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en la muestra se estabiliza considerablemente en comparación con muestras estabilizadas en tubos de EDTA estándar. Así, según un ejemplo, el efecto de estabilización que se logra con el inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto según la fórmula 1 como se enseñan en el presente documento produce que la liberación de ADN de células contenidas en la muestra se reduzca al menos a un máximo de 10 veces, preferentemente 7 veces, más preferentemente 5 veces y lo más preferentemente se reduzca al menos a un máximo de 4 veces, como es determinable, por ejemplo, en el ensayo de ADN 18S descrito en los ejemplos. Como se muestra por los ejemplos, una estabilización eficaz de la población de ácidos nucleicos extracelulares puede lograrse durante un periodo de al menos hasta 6 días. Durante un almacenamiento más corto de las muestras, por ejemplo, hasta tres días, la liberación de ADN puede reducirse al menos a un máximo de dos veces como, por ejemplo, es determinable en el ensayo de ADN 18S descrito en los ejemplos. Así, la liberación de ADN puede reducirse a 2 veces o menos hasta tres días de almacenamiento si se usan los métodos de estabilización descritos en el presente documento. Esto es una mejora sorprendente en la estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares en comparación con los métodos del estado de la técnica. Esto potencia significativamente la exactitud de cualquier prueba posterior. En ciertos casos, por ejemplo, si el material de muestra tiene que transportarse durante largas distancias o guardarse durante periodos más largos, por ejemplo, a temperatura ambiente (como puede ser, por ejemplo, el caso en ciertos países), el proceso descrito en el presente documento hace posible por primera vez que estas pruebas se lleven a cabo después de un periodo de tiempo tal. Sin embargo, por supuesto, las muestras también pueden procesarse adicionalmente antes, si se desea. No es necesario hacer uso del periodo de estabilización que puede lograrse completo. La estabilización que se logra reduce las variaciones en la población de ácidos nucleicos extracelulares que pueden resultar de una manipulación/procesamiento diferente de las muestras (por ejemplo, condiciones y periodos de almacenamiento) después de recogerse. Esto mejora enormemente la normalización de la manipulación y el análisis molecular.

Pueden usarse aditivos adicionales, además del inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente con el fin de estabilizar adicionalmente la muestra que contiene células. La selección de aditivos adecuados que también pueden contribuir al efecto de estabilización puede también depender del tipo de muestra que contiene células que va a estabilizarse. Por ejemplo, cuando se procesa sangre completa como muestra biológica que contiene células, es ventajoso y también común incluir un anticoagulante, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en heparina, ácido etilendiaminatetraacético, citrato, oxalato, y cualquier combinación de los mismos. El anticoagulante puede ser un agente quelante. Un agente quelante es un compuesto orgánico que es capaz de formar enlaces de coordinación con metales mediante dos o más átomos del compuesto orgánico. Agentes quelantes incluyen, pero no se limitan a, ácido dietiltrieminapentaacético (DTPA), ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA), ácido tetraacético de etilenglicol (EGTA) y N,N-bis(carboximetil)glicina (NTA). Según un ejemplo preferido, se usa EDTA. Como se usa en el presente documento, el término "EDTA" indica, entre otras cosas, la porción de EDTA de un compuesto de EDTA tal como, por ejemplo,  $K_2EDTA$ ,  $K_3EDTA$  o  $Na_2EDTA$ . El usar un agente quelante tal como EDTA también tiene el efecto ventajoso de que se inhiben nucleasas tales como DNAsas, previniéndose así, por ejemplo, una degradación del ADN extracelular por DNAsas. Además, se encontró por los inventores que el EDTA usado/añadido en mayores concentraciones es capaz de reducir la liberación de ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico, de las células, soportando así el efecto estabilizante que se logra por el inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el al menos un compuesto según la fórmula 1. Sin embargo, el EDTA solo no es capaz de inhibir eficazmente la fragmentación de, por ejemplo, el ADN genómico que es liberado de las células contenidas en la muestra. Así, el EDTA no logra un efecto de estabilización suficiente. Pero usado en combinación con las enseñanzas descritas en el presente documento, en particular en combinación con el inhibidor de la apoptosis, en particular el inhibidor de las caspasas, puede mejorar adicionalmente la estabilización por los motivos anteriormente tratados. Además, también parece que aumenta la estabilidad química de ARN. Según un ejemplo, la concentración del agente quelante, preferentemente EDTA, en la muestra biológica que se mezcla con uno o más de los compuestos estabilizantes descritos anteriormente está en el intervalo seleccionado del grupo que consiste en 0,05 mM a 100 mM, 0,05 mM a 50 mM, 0,1 mM a 30 mM, 1 mM a 20 mM y 2 mM a 15 mM después de la etapa de poner en contacto. Concentraciones respectivas son particularmente eficaces cuando se estabilizan muestras de sangre, plasma y/o suero, en particular muestras de sangre de 10 ml.

También pueden usarse aditivos adicionales con el fin de soportar adicionalmente la estabilización de la muestra que contiene células, respectivamente soportar la preservación de la población de ácidos nucleicos extracelulares. Ejemplos de aditivos respectivos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la nucleasa, en particular compuestos inhibidores de RNasa y DNasa. Ejemplos de inhibidores de RNasa incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-nucleasa o complejos de ribonucleósido-vanadilo. Cuando se elige un aditivo adicional respectivo, debe tenerse cuidado de no comprometer y/o contrarrestar el efecto estabilizante del inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto según la fórmula 1. Así, no deben usarse aditivos en concentraciones que produzcan o soporten la lisis y/o la degradación de las células contenidas en la muestra biológica y/o que soporten la degradación de los ácidos nucleicos contenidos en la fracción libre de células de la muestra biológica.

Es ventajoso que la muestra biológica que contiene células, que preferentemente es una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre tal como plasma o suero, se ponga en contacto con:

- a) al menos un inhibidor de las caspasas como inhibidor de la apoptosis, preferentemente con Q-VD-OPh, preferentemente en un intervalo de concentración de 1  $\mu$ M a 30  $\mu$ M;
- b) opcionalmente al menos un compuesto orgánico hidroxilado tal como dihidroxiacetona como agente hipertónico, preferentemente en un intervalo de concentración de 0,1 M a 0,6 M; y
- 5 c) opcionalmente al menos un compuesto según la fórmula 1 definido anteriormente (ejemplos preferidos y concentraciones se describen anteriormente) y/o
- d) otro aditivo, preferentemente un agente quelante, preferentemente en un intervalo de concentración de 4 mM a 50 mM, preferentemente 4 mM a 20 mM, lo más preferentemente EDTA.

10 Los componentes de la composición estabilizante pueden estar comprendidos, respectivamente disueltos, en un tampón, por ejemplo, un tampón biológico tal como MOPS, TRIS, PBS y similares.

15 El inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente, además de los aditivos adicionales opcionalmente presentes, pueden estar presentes, por ejemplo, en un dispositivo, preferentemente un recipiente, para recoger la muestra o pueden añadirse a un dispositivo de recogida respectivo inmediatamente antes de la recogida de la muestra biológica; o pueden añadirse al dispositivo de recogida inmediatamente después de recogerse la muestra. El (Los) agente(s) estabilizante(s) y opcionalmente el (los) aditivo(s) adicional(es) también pueden añadirse por separado a la muestra biológica que contiene células. Sin embargo, para facilitar la manipulación, se prefiere que el uno o más agentes estabilizantes y opcionalmente los

20 aditivos adicionales se proporcionen en una composición. Además, en un ejemplo ventajoso, el inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto según la fórmula 1 como se ha descrito anteriormente y opcionalmente el (los) aditivo(s) adicional(es) están presentes en el dispositivo de recogida antes de añadir la muestra. Esto garantiza que la muestra biológica que contiene células se estabiliza inmediatamente tras el contacto con el (los) agente(s) estabilizante(s). El (los) agente(s) de estabilización están presentes en el recipiente en una

25 cantidad eficaz para proporcionar la estabilización de la cantidad de muestra que contiene células que va a recogerse, respectivamente comprendida en dicho recipiente. Como se describe, la muestra puede mezclarse con el (los) agente(s) de estabilización directamente después de y/o durante la recogida de la muestra, proporcionando así una muestra estabilizada.

30 Preferentemente, la muestra se mezcla con el (los) agente(s) de estabilización directamente después de y/o durante la recogida de la muestra. Por tanto, preferentemente, el (los) agente(s) de estabilización y los aditivos descritos anteriormente se proporcionan en forma de una composición estabilizante. Preferentemente, dicha composición estabilizante se proporciona en forma líquida. Puede estar, por ejemplo, pre-cargada en el dispositivo de recogida de muestras de manera que la muestra se estabilice inmediatamente durante la recogida. Según un ejemplo, la

35 composición estabilizante se pone en contacto con la muestra que contiene células en una relación volumétrica seleccionada de 10:1 a 1:20, 5:1 a 1:15, 1:1 a 1:10 y 1:2 a 1:5. Es una ventaja particular de las enseñanzas descritas en el presente documento que la estabilización de un gran volumen de muestra pueda lograrse con un pequeño volumen de la composición estabilizante. Por tanto, preferentemente, la relación de composición estabilizante con respecto a la muestra se encuentra en un intervalo de 1:2 a 1:7, más preferido 1:3 a 1:5.

40 El término "muestra que contiene células", como se usa en el presente documento, en particular se refiere a una muestra que comprende al menos una célula. La muestra que contiene células puede comprender al menos dos, al menos 10, al menos 50, al menos 100, al menos 250, al menos 500, al menos 1000, al menos 1500, al menos 2000 o al menos 5000 células. Además, también muestras que contienen células que comprenden considerablemente

45 más células están englobadas por dicho término y pueden estabilizarse con las enseñanzas descritas en el presente documento. Sin embargo, el término "muestra que contiene células" también se refiere y así engloba muestras agotadas en células, que incluyen muestras agotadas en células que comúnmente se denominan "libres de células" tales como, por ejemplo, plasma sanguíneo ya que las muestras respectivas frecuentemente incluyen células residuales. Al menos, puede frecuentemente no excluirse completamente que incluso las llamadas muestras "libres de células" tales como plasma sanguíneo comprendan cantidades residuales de células que, por consiguiente,

50 plantean el riesgo de que la población de ácidos nucleicos extracelulares llegue a contaminarse con los ácidos nucleicos intracelulares liberados de dichas células residuales. Por tanto, muestras agotadas en células y "libres de células" respectivas también están englobadas según una realización por el término "muestra que contiene células". Así, la "muestra que contiene células" puede comprender grandes cantidades de células, como es el caso, por

55 ejemplo, con sangre completa, pero también pueden solo comprender simplemente cantidades menores de células. Por tanto, el término "muestra que contiene células" también engloba muestras que pueden solo ser que se sospecha que o plantean el riesgo de contener células. Como se trata anteriormente, también con respecto a muestras biológicas que solo comprenden cantidades menores, respectivamente residuales, de células tales como, por ejemplo, plasma sanguíneo (el plasma sanguíneo contiene - dependiendo del método de preparación -

60 normalmente pequeñas cantidades residuales de células, aún cuando se refiera comúnmente que está libre de células), el método descrito en el presente documento tiene ventajas considerables ya que estas células residuales también pueden producir una contaminación no deseada de los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos. El uso de la tecnología estabilizante descrita en el presente documento también garantiza que las muestras respectivas que solo comprenden cantidades residuales de células o son simplemente que se sospecha que o plantean el riesgo

65 de cantidades residuales de células, se estabilizan eficazmente como también se describe en detalle anteriormente. El usar el método de estabilización descrito en el presente documento tiene la ventaja de que, independientemente

de la composición de la muestra y el número de células contenidas en su interior, la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en su interior se preserva sustancialmente, respectivamente se estabiliza, permitiendo así normalizar el posterior aislamiento y/o el análisis de los ácidos nucleicos extracelulares contenidos.

5 Según un ejemplo, la muestra biológica que contiene células está seleccionada del grupo que consiste en sangre completa, muestras derivadas de sangre, plasma, suero, esputo, líquido lacrimal, líquido linfático, orina, sudor, líquido, líquido cefalorraquídeo, ascitis, leche, heces, lavado bronquial, saliva, líquido amniótico, secreciones nasales, secreciones vaginales, semen/líquido seminal, secreciones de heridas, y sobrenadantes de cultivo celular y sobrenadantes obtenidos de otras muestras de hisopo. Según un ejemplo, la muestra biológica que contiene células es un líquido corporal, una secreción corporal o excreción corporal, preferentemente un líquido corporal, lo más preferentemente sangre completa, plasma o suero. La muestra biológica que contiene células comprende ácidos nucleicos extracelulares. Según otro ejemplo, la muestra biológica que contiene células es una muestra no fluida derivada de un ser humano o animal, tal como, por ejemplo, heces, tejido o una muestra de biopsia. Otros ejemplos de muestras biológicas que contienen células que pueden estabilizarse con el método descrito en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, muestras biológicas, suspensiones de células, cultivos celulares, sobrenadante de cultivos celulares y similares, que comprenden ácidos nucleicos extracelulares.

Como se describe anteriormente y como se demuestra por los ejemplos, el usar los métodos descritos en el presente documento permite estabilizar la muestra que contiene células sin refrigeración o congelación durante un periodo prolongado de tiempo. Así, las muestras pueden mantenerse a temperatura ambiente o incluso a temperaturas elevadas, por ejemplo, hasta 30 °C o hasta 40 °C. Según un ejemplo, se logra un efecto de estabilización durante al menos dos días, preferentemente al menos tres días; más preferido al menos un día a seis días, lo más preferido durante al menos un día a al menos siete días a temperatura ambiente. Como se muestra en los ejemplos, las muestras que se estabilizaron según el método descrito en el presente documento no se comprometieron sustancialmente cuando se guardaron durante 3 días a temperatura ambiente. Incluso durante almacenamientos más largos durante hasta 6 o incluso 7 días a temperatura ambiente, la población de ácidos nucleicos extracelulares se estabilizó sustancialmente más en comparación con muestras no estabilizadas o, por ejemplo, en comparación con muestras que se estabilizaron usando un método convencional tal como un tratamiento con EDTA. Aún cuando el efecto de estabilización pueda disminuir con el tiempo, es todavía suficiente para preservar la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares para permitir el análisis y/o procesamiento adicional. Así, las muestras que se estabilizaron según los métodos descritos en el presente documento fueron todavía adecuadas para aislar y opcionalmente analizar los ácidos nucleicos extracelulares contenidos en su interior, incluso después de almacenamiento prolongado a temperatura ambiente. Así, como las muestras no se comprometieron en particular si se usa la combinación preferida de agentes de estabilización, son concebibles incluso tiempos de almacenamiento/transporte prolongados. Sin embargo, normalmente no son necesarios periodos prolongados, ya que el almacenamiento regular y, por ejemplo, el tiempo de transporte hasta el laboratorio, en el que se realiza el aislamiento y opcionalmente el análisis de ácidos nucleicos, normalmente no supera 6 o 7 días, sino que normalmente se completa incluso después de dos o tres días. Como se muestra en los ejemplos, la eficiencia de estabilización es particularmente buena durante este periodo de tiempo. Sin embargo, los tiempos de estabilización extraordinariamente largos y las eficiencias de estabilización que pueden alcanzarse con el método descrito en el presente documento proporcionan un factor de seguridad importante.

Los métodos y también las composiciones posteriormente descritas también permiten la estabilización de grandes volúmenes de muestras biológicas con pequeños volúmenes de sustancias añadidas debido a que los aditivos que se usan según las enseñanzas descritas en el presente documento son altamente activos. Esto es una ventaja importante debido a que el tamaño/volumen de la muestra plantea limitaciones considerables al procedimiento de aislamiento posterior, en particular cuando se pretende usar procesos automatizados para aislar los ácidos nucleicos extracelulares contenidos en las muestras. Además, tiene que considerarse que los ácidos nucleicos extracelulares solo están frecuentemente comprendidos en pequeñas cantidades en la muestra contenida. Así, el procesar volúmenes más grandes de una muestra que contiene células tal como, por ejemplo, una muestra de sangre tiene la ventaja de que pueden aislarse más ácidos nucleicos circulantes de la muestra y así están disponibles para un análisis posterior.

La estabilización de la muestra biológica puede tanto seguirse directamente por técnicas para analizar ácidos nucleicos, como los ácidos nucleicos pueden purificarse a partir de la muestra. Por tanto, la muestra que se estabilizó según el método descrito en el presente documento puede analizarse en un método analítico y/o de detección de ácidos nucleicos y o puede procesarse adicionalmente. Por ejemplo, puede aislarse ácido nucleico extracelular de la muestra estabilizada y puede entonces analizarse en un método analítico y/o de detección de ácidos nucleicos o puede procesarse adicionalmente.

Además, según un segundo aspecto, se describe un método de aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares de una muestra biológica que contiene células, en el que dicho método comprende las etapas de:

- a) estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra que contiene células según el método definido en el primer aspecto;
- b) aislar ácidos nucleicos extracelulares.

Como se trata anteriormente, la estabilización descrita en el presente documento tiene el efecto de que la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en la muestra se preserva sustancialmente en el estado que había mostrado en el momento en el que se obtuvo la muestra biológica, respectivamente extraído. En particular, el alto aumento normalmente observado en ácidos nucleicos que resulta de ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico, más específicamente ADN genómico fragmentado, liberados de células dañadas o moribundas se reduce eficazmente como se demuestra en los ejemplos. Por tanto, los ácidos nucleicos extracelulares obtenidos de una muestra respectivamente estabilizada comprenden menos contaminaciones con ácidos nucleicos intracelulares que se originan de células degradadas o moribundas comprendidas en la muestra y en particular comprenden menos cantidades de ADN genómico fragmentado en comparación con muestras no estabilizadas. Además, la única etapa de estabilización permite aumentar la cantidad de ácidos nucleicos extracelulares recuperables. El método de estabilización descrito en el presente documento puede realizarse sin la reticulación de la muestra. Esto es una ventaja importante con respecto al uso de agentes de reticulación, tales como formaldehído o liberadores de formaldehído, ya que estos reactivos podrían reducir la cantidad recuperable de ácidos nucleicos extracelulares debido a reticulación. Así, el método descrito en el presente documento mejora la capacidad de diagnóstico y de pronóstico de los ácidos nucleicos extracelulares. Además, dicha estabilización permite que la muestra se almacene y/o manipule, por ejemplo, transporte, - incluso a temperatura ambiente - durante un periodo prolongado de tiempo antes de separar las células contenidas en la muestra y/o antes de aislar los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en su interior en la etapa b). Con respecto a los detalles de la estabilización, se remite a la divulgación anterior que también se aplica aquí.

Según una realización, la muestra biológica que contiene células tal como, por ejemplo, una muestra de sangre completa se estabiliza en la etapa a) como se describe en detalle anteriormente usando al menos un inhibidor de la apoptosis, al menos un agente hipertónico y/o al menos un compuesto según la fórmula 1 como se ha descrito anteriormente, preferentemente usando al menos dos de estos agentes estabilizantes y opcionalmente aditivos adicionales. Ejemplos adecuados y preferidos se describieron anteriormente. Particularmente se prefiere el uso de un inhibidor de las caspasas en combinación con un anticoagulante, preferentemente un agente quelante como se ha descrito anteriormente, para estabilizar muestras de sangre completa.

Si la muestra comprende grandes cantidades de células como es, por ejemplo, el caso con sangre completa, las células se separan de la muestra restante con el fin de obtener una fracción libre de células, respectivamente reducida en células o agotada en células, de la muestra que comprende los ácidos nucleicos extracelulares. Así, según un ejemplo, las células se eliminan de la muestra que contiene células entre la etapa a) y la etapa b). Esta etapa intermedia solo es opcional y, por ejemplo, puede estar obsoleta si se procesan muestras que simplemente comprenden cantidades menores de células residuales tales como, por ejemplo, plasma o suero. Sin embargo, con el fin de mejorar los resultados se prefiere que también se eliminen células restantes respectivas (o posiblemente células restantes) ya que podrían contaminar la población de ácidos nucleicos extracelulares durante el aislamiento. Dependiendo del tipo de muestra, las células, que incluyen células residuales, pueden separarse y eliminarse, por ejemplo, por centrifugación, preferentemente centrifugación a alta velocidad, o usando medios distintos de centrifugación tales como, por ejemplo, filtración, sedimentación o unión a superficies sobre partículas (opcionalmente magnéticas) si va a evitarse una etapa de centrifugación. Las etapas de eliminación de células respectivas también pueden incluirse fácilmente en un protocolo de preparación de muestras automatizado. Las células respectivamente eliminadas también pueden procesarse adicionalmente. Las células pueden, por ejemplo, almacenarse y/o biomoléculas tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas pueden aislarse de las células eliminadas.

Además, pueden incluirse etapas intermedias adicionales para preparar la muestra.

Los ácidos nucleicos extracelulares se aíslan entonces en la etapa b), por ejemplo, de la fracción libre de células, respectivamente agotada en células, por ejemplo, de sobrenadantes, plasma y/o suero. Para aislar ácidos nucleicos extracelulares puede usarse cualquier método de aislamiento de ácidos nucleicos conocido que sea adecuado para aislar ácidos nucleicos de la muestra respectiva, respectivamente la muestra agotada en células. Ejemplos de métodos de purificación respectivos incluyen, pero no se limitan a, extracción, extracción en fase sólida, purificación basada en sílice, purificación basada en partículas magnéticas, extracción con fenol-cloroformo, cromatografía, cromatografía de intercambio aniónico (usando superficies de intercambio aniónico), electroforesis, filtración, precipitación, inmunoprecipitación de cromatina y combinaciones de los mismos. También es posible aislar específicamente ácidos nucleicos extracelulares diana específicos, por ejemplo, usando sondas apropiadas que permiten una unión específica de secuencia y se acoplan a un soporte sólido. También puede usarse cualquier otra técnica de aislamiento de ácidos nucleicos conocida por el experto. Según un ejemplo, los ácidos nucleicos se aíslan usando un agente caotrópico y/o alcohol. Preferentemente, los ácidos nucleicos se aíslan uniéndolos a una fase sólida, preferentemente una fase sólida que comprende sílice o grupos funcionales de intercambio aniónico. También están comercialmente disponibles métodos y kits adecuados tales como el kit de ácidos nucleicos circulantes QIAamp® (QIAGEN), el kit Chemagic Circulating NA (Chemagen), el kit NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel), el kit de purificación de ADN circulante de plasma/suero (Norgen Biotek), el kit de purificación de ARN circulante de plasma/suero (Norgen Biotek), el kit High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume (Roche) y otros kits comercialmente disponibles adecuados para extraer y purificar ácidos nucleicos circulantes.

Según un ejemplo, todos los ácidos nucleicos que están comprendidos en la muestra que se obtiene después de la etapa a), o se obtienen opcionalmente después de eliminarse las células en la etapa intermedia, se aíslan, por ejemplo, se aíslan de la fracción libre de células, respectivamente agotada en células. Por ejemplo, pueden aislarse ácidos nucleicos totales de plasma o suero y los ácidos nucleicos extracelulares estarán comprendidos como una porción en estos ácidos nucleicos extraídos. Si las células se eliminan eficazmente, los ácidos nucleicos totales aislados comprenderán predominantemente o incluso consistirán en ácidos nucleicos extracelulares. También es posible aislar al menos predominantemente un ácido nucleico diana específico. Un ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, un cierto tipo de ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN, que incluye ARNm, microRNA, otros ácidos nucleicos no codificantes, ácidos nucleicos epigenéticamente modificados y otros ácidos nucleicos. También es posible, por ejemplo, digerir el ácido nucleico no diana usando nucleasas después del aislamiento. El término ácido nucleico diana también se refiere a un tipo específico de ácido nucleico, por ejemplo, un ácido nucleico extracelular específico que se sabe que es un cierto marcador de enfermedad. Como se trata anteriormente, el aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares también puede comprender el aislamiento específico de un ácido nucleico diana respectivo, por ejemplo, usando sondas de captura apropiadas. El término un ácido nucleico diana también se refiere a un ácido nucleico que tiene una cierta longitud, por ejemplo, un ácido nucleico que tiene una longitud de 2000 nt o menos, 1000 nt o menos o 500 nt o menos. El aislamiento de ácidos nucleicos diana más pequeños respectivos puede ser ventajoso debido a que se sabe que los ácidos nucleicos extracelulares normalmente tienen un tamaño más pequeño de inferior a 2000 nt, normalmente inferior a 1000 nt y frecuentemente incluso inferior a 500 nt. Los tamaños, respectivamente intervalos de tamaño, indicados en el presente documento se refieren a la longitud de cadena. Es decir, en el caso de ADN se refiere a pb. El centrar el aislamiento, respectivamente la purificación, en ácidos nucleicos pequeños respectivos puede aumentar la porción de ácidos nucleicos extracelulares obtenidos en los ácidos nucleicos aislados. Los métodos de estabilización descritos en el presente documento permiten, en particular debido a la inhibición de la fragmentación de ADN intracelular genómico, una separación más eficaz de tal ADN genómico de alto peso molecular de la población de ácidos nucleicos extracelulares fragmentada, por ejemplo, durante el procedimiento de extracción del ácido nucleico. Como la considerable diferencia de tamaño entre ácidos nucleicos genómicos y circulantes se preserva esencialmente usando la tecnología de estabilización según la presente invención, el ADN genómico puede eliminarse, por ejemplo, por recuperación selectiva de tamaño de ADN más eficazmente que sin la estabilización respectiva. Métodos adecuados para lograr un aislamiento selectivo respectivo de la población de ácidos nucleicos extracelulares, por ejemplo, por agotamiento del ADN genómico de alto peso molecular, son muy conocidos en el estado de la técnica y así no necesitan descripción adicional aquí. Por ejemplo, sería suficiente usar un método de selección por tamaño que agotara una muestra de cualquier ácido nucleico mayor de 1.000-10.000 nucleótidos o pares de bases. Como la diferencia de tamaño entre ácidos nucleicos genómicos (normalmente mayores de >10.000 pb) y extracelulares (normalmente <1000 pb) en una muestra estabilizada según la tecnología descrita es normalmente relativamente grande debido a la eficaz estabilización (la diferencia puede encontrarse, por ejemplo, en un intervalo de 1000-10.000 pb), podrían aplicarse métodos conocidos para aislar selectivamente ácido nucleico extracelular de una muestra biológica. Esto también proporciona oportunidades adicionales con el fin de reducir la cantidad de ácidos nucleicos intracelulares en la población de ácidos nucleicos extracelulares aislada. Por ejemplo, la eliminación de ADN genómico durante el protocolo de extracción del ácido nucleico también podría complementar o incluso sustituir una centrifugación de alta fuerza g separada de una muestra de plasma antes de empezar la extracción del ácido nucleico con el fin de eliminar células residuales. Se previene que el ADN genómico que es liberado de dichas células residuales llegue a degradarse masivamente debido a la estabilización según la presente invención, y por consiguiente, puede eliminarse por protocolos de aislamiento selectivos de tamaño. Esta opción es de ventaja particular, ya que muchos laboratorios clínicos no tienen una centrifuga capaz de realizar una centrifugación de alta fuerza g u otros medios para eliminar en particular cantidades traza de células residuales.

Los ácidos nucleicos aislados pueden entonces analizarse y/o procesarse adicionalmente en una etapa c) usando métodos de ensayo y/o analíticos adecuados. Por ejemplo, pueden identificarse, modificarse, ponerse en contacto con al menos un enzima, amplificarse, transcribirse de forma inversa, clonarse, secuenciarse, ponerse en contacto con una sonda, detectarse (su presencia o ausencia) y/o cuantificarse. Métodos respectivos son muy conocidos en el estado de la técnica y comúnmente se aplican en el campo médico, del diagnóstico y/o del pronóstico con el fin de analizar ácidos nucleicos extracelulares (véase también la descripción detallada en los antecedentes de la presente invención). Así, después de aislarse ácidos nucleicos extracelulares, opcionalmente como parte de ácido nucleico total, el ARN total y/o ADN total (véase anteriormente) puede analizarse para identificar la presencia, ausencia o gravedad de un estado de enfermedad que incluye, pero que no se limita a, una multitud de enfermedades neoplásicas, en particular tumores premalignos y tumores malignos tales como diferentes formas de cánceres. Por ejemplo, pueden analizarse los ácidos nucleicos extracelulares aislados con el fin de detectar marcadores de diagnóstico y/o de pronóstico (por ejemplo, ácidos nucleicos extracelulares derivados del feto o de tumor) en muchos campos de aplicación, que incluyen, pero no se limitan a, prueba genética prenatal no invasiva, respectivamente cribado, cribado de enfermedades, cribado de patógenos, oncología, cribado de cáncer, cribado de cáncer en estadio temprano, monitorización de la terapia del cáncer, prueba genética (genotipado), prueba de enfermedad infecciosa, diagnósticos de lesión, diagnósticos de traumatismo, medicina de trasplantes o muchas otras enfermedades y, por tanto, son de relevancia para el diagnóstico y/o pronóstico. Según un ejemplo, los ácidos nucleicos extracelulares aislados se analizan para identificar y/o caracterizar una enfermedad o una característica fetal. Así, como se trata anteriormente, el método de aislamiento descrito en el presente documento puede comprender además una etapa c) de análisis y/o procesamiento de ácidos nucleicos. Por tanto, según un ejemplo,

los ácidos nucleicos extracelulares aislados se analizan en la etapa c) para identificar, detectar, cribar o monitorizar o excluir una enfermedad y/o al menos una característica fetal. El análisis/procesamiento adicional de los ácidos nucleicos puede realizarse usando cualquier método de análisis/procesamiento de ácidos nucleicos que incluye, pero no se limita a, tecnologías de amplificación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa (Q-PCR), PCR digital, electroforesis en gel, electroforesis capilar, espectrometría de masas, detección de fluorescencia, espectrometría ultravioleta, ensayos de hibridación, secuenciación de ADN o ARN, análisis de restricción, transcripción inversa, NASBA, reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo, ensamblaje cíclico de la polimerasa (PCA), reacción en cadena de la polimerasa asimétrica, lineal después de la reacción en cadena de la polimerasa exponencial (LATE-PCR), amplificación dependiente de helicasa (HDA), reacción en cadena de la polimerasa de inicio caliente, reacción en cadena de la polimerasa específica de intersecuencia (ISSR), reacción en cadena de la polimerasa inversa, reacción en cadena de la polimerasa mediada por ligación, reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación (MSP), reacción en cadena de la polimerasa múltiple, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la polimerasa en fase sólida, o cualquier combinación de los mismos. Tecnologías respectivas son muy conocidas para el experto y así no necesitan descripción adicional aquí.

Según un ejemplo, cualquiera o ambas de las etapas de aislamiento o análisis b) y c) se produce al menos un día hasta 7 días después de haberse recogido la muestra, respectivamente estabilizado, según las enseñanzas descritas en el presente documento. Periodos de tiempo adecuados durante los que la muestra, en particular una muestra de sangre, respectivamente la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en su interior, puede estabilizarse usando el método descrito en el presente documento también se describen anteriormente y también se aplican aquí. Según un ejemplo, la etapa de aislamiento se realiza al menos un día, al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días o al menos 6 días después de recogerse la muestra y estabilizarse según el método descrito en el presente documento. Según un ejemplo, cualquiera o ambas de las etapas de aislamiento o análisis se producen sin congelación de la muestra y/o sin el uso de formaldehído para preservar la muestra biológica que contiene células. La muestra biológica se estabiliza después del contacto con el inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente, preferentemente en combinación con otro aditivo tal como un anticoagulante como EDTA. Un anticoagulante se usa preferentemente cuando se estabiliza sangre o una muestra derivada de sangre. Las muestras respectivamente estabilizadas pueden manipularse, por ejemplo, guardarse y/o transportarse a temperatura ambiente.

Además, según un tercer aspecto se describe una composición adecuada para estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares en una muestra biológica, que comprende:

- a) al menos un inhibidor de la apoptosis, preferentemente un inhibidor de las caspasas, y/o
- b) al menos un agente hipertónico que estabiliza células comprendidas en la muestra, preferentemente dihidroxiacetona; y/o
- c) al menos un compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente; y
- d) opcionalmente al menos un anticoagulante, preferentemente un agente quelante.

Como se trata anteriormente, una composición estabilizante respectiva es particularmente eficaz en estabilizar una muestra biológica que contiene células, en particular sangre completa, plasma y/o suero estabilizando las células comprendidas y los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos preservando así sustancialmente, respectivamente estabilizando, la población de ácidos nucleicos extracelulares. Una composición estabilizante respectiva permite el almacenamiento y/o la manipulación, por ejemplo, transporte, de la muestra, que preferentemente es sangre completa, a temperatura ambiente durante al menos dos, preferentemente al menos tres días, sin comprometer sustancialmente la calidad de la muestra, respectivamente la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en su interior. Por supuesto, no es obligatorio hacer uso del periodo de estabilización posible completo; las muestras también pueden procesarse antes si se desea. La puesta en contacto de la muestra biológica con la composición estabilizante permite que la muestra se almacene, y o manipule, por ejemplo, transporte, incluso a temperatura ambiente antes de aislar y opcionalmente analizar y/o procesar los ácidos nucleicos circulantes contenidos. Así, el tiempo entre la recogida o la estabilización de la muestra y la extracción del ácido nucleico puede variar sin afectar sustancialmente la población, respectivamente la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en su interior. En particular, se reducen las diluciones, respectivamente contaminaciones con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado. Preferentemente, la composición de estabilización se pone en contacto con la muestra inmediatamente después de o durante la recogida de la muestra. Preferentemente, cuando se estabiliza una muestra de sangre, la composición comprende al menos un inhibidor de las caspasas y al menos un anticoagulante, preferentemente un agente quelante como se ha descrito anteriormente. También puede comprender agentes estabilizantes adicionales como se describe en el presente documento.

Ejemplos adecuados y preferidos del inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto según la fórmula 1, además de concentraciones adecuadas y preferidas de los compuestos respectivos, se describen en detalle anteriormente conjuntamente con el método de estabilización. Se remite a la divulgación anterior que también se aplica con respecto a la composición de estabilización. Preferentemente, al menos un inhibidor de las caspasas,

preferentemente un péptido específico de caspasa modificado, preferentemente modificado en el extremo C con un grupo O-fenoxi tal como Q-VD-OPh, se usa en combinación con al menos un agente hipertónico, preferentemente un compuesto orgánico hidroxilado tal como dihidroxiacetona. Otros compuestos orgánicos hidroxilados adecuados también se describen anteriormente, se remite a la divulgación respectiva. Como se demuestra por los ejemplos, una combinación respectiva es sorprendentemente eficaz en estabilizar una muestra biológica que contiene células, en particular una muestra de sangre.

Preferentemente, el al menos un compuesto según la fórmula 1 es una amida del ácido N,N-dialquilcarboxílico. Grupos R1, R2, R3 y R4 preferidos se describen anteriormente. Según un ejemplo, el compuesto está seleccionado del grupo que consiste en N,N-dimetilacetamida; N,N-dietilacetamida; N,N-dimetilformamida, N,N-dietilformamida y N,N-dimetilpropanamida. Dicho compuesto también puede usarse en combinación con un inhibidor de la apoptosis, preferentemente un inhibidor de las caspasas (ejemplos preferidos se describen anteriormente, se remite a la divulgación anterior) y/o un agente hipertónico, preferentemente un compuesto de hidrocarburo (ejemplos preferidos se describen anteriormente, se remite a la divulgación anterior).

Además, se prefiere que la composición de estabilización comprenda además aditivos, por ejemplo, un anticoagulante tal como un agente quelante en particular si la composición se usa para estabilizar sangre completa, plasma o suero.

Según un ejemplo, la composición estabilizante consiste esencialmente de los estabilizadores mencionados y aditivos opcionales y opcionalmente agentes de tamponamiento. La composición estabilizante estabiliza la muestra y así no promueve la lisis y/o rotura de las células contenidas en la muestra. La composición estabilizante puede reducir el daño de las células comprendidas en la muestra como puede determinarse, por ejemplo, por los métodos de ensayo descritos en la sección de ejemplos.

La composición puede proporcionarse en una forma sólida. Esto es, por ejemplo, una opción adecuada si la muestra biológica que va a estabilizarse contiene líquido para disolver el sólido (tal como, por ejemplo, líquidos corporales que contienen células, células en medio, orina) o si el líquido, por ejemplo, agua se añade a la misma para disolver el sólido. La ventaja de uso de una composición estabilizante sólida es que los sólidos son normalmente químicamente más estables. Sin embargo, también puede usarse una composición líquida. Las composiciones líquidas frecuentemente tienen la ventaja de que la mezcla con la muestra que va a estabilizarse puede lograrse rápidamente, proporcionando así básicamente un efecto estabilizante inmediato tan pronto como la muestra se ponga en contacto con la composición estabilizante líquida. Preferentemente, el (los) agente(s) estabilizante(s) presente(s) en la composición estabilizante líquida siguen siendo estables en solución y no requieren pre-tratamiento tal como, por ejemplo, la disolución de precipitados de solubilidad limitada, por el usuario debido a que los pre-tratamientos de este tipo plantean el riesgo de variaciones en la eficiencia de estabilización.

También se proporciona una mezcla que comprende la composición estabilizante descrita en el presente documento mezclada con una muestra biológica. Ejemplos adecuados y preferidos de muestras biológicas, además de concentraciones adecuadas del (de los) agente(s) estabilizante(s) cuando se mezclan con la muestra biológica, se describen anteriormente conjuntamente con el método de estabilización. Se remite a la divulgación anterior que también se aplica aquí. Preferentemente, la composición estabilizante se pre-carga en un dispositivo de recogida de muestras de manera que la muestra se estabilice inmediatamente durante la recogida. Según un ejemplo, la composición estabilizante se pone en contacto con la muestra biológica en una relación volumétrica seleccionada de 10:1 a 1:20, 5:1 a 1:15, 1:1 a 1:10 y 1:2 a 1:5. Es una ventaja particular de la composición estabilizante descrita en el presente documento que la estabilización de un gran volumen de muestra puede lograrse con un pequeño volumen de la composición estabilizante. Por tanto, preferentemente, la relación de composición estabilizante con respecto a muestra se encuentra en un intervalo de 1:2 a 1:7, más preferido 1:3 a 1:5.

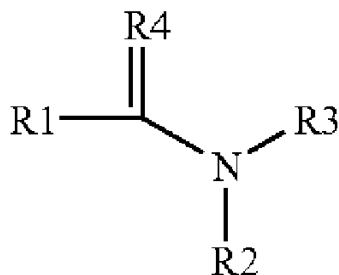
La composición estabilizante según el tercer aspecto descrito en el presente documento puede usarse para estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra que contiene células. Además, la composición estabilizante según el tercer aspecto descrito en el presente documento también puede usarse para estabilizar las células contenidas en una muestra. Como se ha descrito anteriormente, la composición estabilizante reduce, entre otras cosas, la liberación de ADN genómico de células que resulta de células descompuestas. Así, un uso respectivo también es ventajoso y se proporciona por las enseñanzas descritas en el presente documento.

También se describe un método de fabricación de una composición según el tercer aspecto descrito en el presente documento, en el que los componentes de la composición se mezclan, preferentemente en una solución acuosa.

La composición descrita en el presente documento también puede incorporarse en un dispositivo de recogida de muestras, en particular ensamblaje de extracción de sangre, proporcionando así una versión nueva y útil de un dispositivo tal. Tales dispositivos normalmente incluyen un recipiente que tiene un extremo abierto y uno cerrado. El recipiente es preferentemente un tubo de extracción de sangre. El tipo de recipiente también depende de la muestra que va a recogerse, otros formatos adecuados se describen a continuación.

Además, se describe un recipiente para recoger una muestra biológica que contiene células, preferentemente una muestra de sangre, en el que el recipiente comprende una composición estabilizante como se describe en el presente documento. Según la presente invención como se define por las reivindicaciones, se proporciona un recipiente adecuado para recoger una muestra que contiene células, preferentemente una muestra de sangre, plasma o de suero, que comprende

- 5
- una composición estabilizante adecuada para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en la muestra que contiene células, en el que dicha composición estabilizante comprende un inhibidor de las caspasas, y
  - 10 - al menos un compuesto según la fórmula 1,



fórmula 1

15 en la que R1 es un residuo de hidrógeno o un residuo de alquilo, preferentemente un residuo de alquilo C1-C5, más preferido un residuo de metilo, R2 y R3 son residuos de hidrocarburo idénticos o diferentes con una longitud de la cadena de carbono de 1 - 20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un residuo de oxígeno, azufre o selenio.

20 El proporcionar un recipiente respectivo, por ejemplo, un tubo de recogida de muestras, que comprende la composición estabilizante según la presente invención como se define en las reivindicaciones, tiene la ventaja de que la muestra se estabiliza rápidamente cuando la muestra se recoge en el recipiente respectivo. Detalles con respecto a la composición estabilizante se describieron anteriormente, se remite a la divulgación anterior que también se aplica aquí.

25 Según una realización, se proporciona un recipiente de recogida para recibir y recoger una muestra biológica en la que el recipiente comprende:

- 30 a) al menos un inhibidor de las caspasas de forma que cuando se recoja la muestra, la concentración del inhibidor de las caspasas o combinación de dos o más inhibidores de las caspasas en la mezcla resultante esté seleccionada de al menos 0,01  $\mu\text{M}$ , al menos 0,05  $\mu\text{M}$ , al menos 0,1  $\mu\text{M}$ , al menos 0,5  $\mu\text{M}$ , al menos 1  $\mu\text{M}$ , al menos 2,5  $\mu\text{M}$  o al menos 3,5  $\mu\text{M}$  y preferentemente esté presente en un intervalo de concentración seleccionado de 0,01  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ , 0,05  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  a 40  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$  a 30  $\mu\text{M}$  o 2,5  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$ ;
- 35 b) opcionalmente al menos un agente hipertónico de forma que cuando se recoja la muestra, la concentración del agente hipertónico o combinación de agentes hipertónicos en la mezcla resultante sea al menos 0,05 M, al menos 0,1 M, preferentemente al menos 0,25 M, y preferentemente esté presente en un intervalo de concentración de 0,05 M a 2M, 0,1 M a 1,5 M, 0,15 M a 0,8 M, 0,2 M a 0,7 M o 0,1 M a 0,6 M; y
- 40 c) al menos un compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente, de forma que cuando se recoja la muestra el compuesto según la fórmula 1 comprenda en una concentración de al menos el 0,1 %, al menos el 0,5 %, al menos el 0,75 %, al menos el 1 %, al menos el 1,25 % o al menos el 1,5 % o en el que dicho compuesto comprende en un intervalo de concentración seleccionado del 0,1 % hasta el 50 %, 0,1 al 30 %, 1 % al 20 %, 1 % al 10 %, 1 % al 7,5 % y 1 % al 5 %; y
- 45 d) opcionalmente al menos un aditivo adicional, preferentemente un anticoagulante tal como un agente quelante, preferentemente EDTA si el recipiente es para recoger sangre o un hemoderivado. Concentraciones adecuadas se describen anteriormente y preferentemente se encuentran en el intervalo de 4 mM a 50 mM, más preferido 4 mM a 20 mM.

50 Los componentes pre-cargados a), b), c) y/o d) pueden proporcionarse en un líquido o en una forma seca. Para estabilizar sangre completa se prefiere usar el componente d). Preferentemente, los componentes estabilizantes se proporcionan como una composición estabilizante. Una forma seca es, por ejemplo, una opción adecuada si la muestra biológica que va a estabilizarse contiene líquido para disolver el sólido (tal como, por ejemplo, líquidos corporales que contienen células, células en medio, orina) o si el líquido, por ejemplo, agua se añade a la misma para disolver el sólido. La ventaja de uso de una composición estabilizante sólida es que los sólidos son normalmente químicamente más estables que los líquidos. Según una realización, la pared interna del recipiente se



trata/cubre con una composición estabilizante según la presente invención. Dicha composición puede aplicarse a las paredes internas usando, por ejemplo, un método de secado por pulverización. Pueden realizarse técnicas de eliminación de líquido en la composición estabilizante con el fin de obtener una composición protectora sustancialmente en estado sólido. Las condiciones de eliminación de líquido pueden ser de forma que produzcan la eliminación de al menos aproximadamente el 50 % en peso, al menos aproximadamente el 75 % en peso, o al menos aproximadamente el 85 % en peso de la cantidad original de la composición estabilizante líquida dispensada. Las condiciones de eliminación de líquido pueden ser de forma que produzcan la eliminación de líquido suficiente de manera que la composición resultante esté en forma de una película, gel u otra capa sustancialmente sólida o altamente viscosa. Por ejemplo, puede producir un recubrimiento sustancialmente inmóvil (preferentemente un recubrimiento que puede re-disolverse o dispersarse de otro modo tras el contacto con la muestra que contiene células que preferentemente es una muestra de hemoderivado). Es posible que puedan emplearse liofilización u otras técnicas para realizar una forma sólida sustancialmente del agente protector (por ejemplo, en forma de una o más pellas). Así, las condiciones de eliminación de líquido pueden ser de forma que produzcan un material que tras el contacto con la muestra en consideración (por ejemplo, una muestra de sangre completa) el agente protector se disperse en la muestra, y sustancialmente preserve componentes (por ejemplo, ácidos nucleicos extracelulares) en la muestra. Las condiciones de eliminación de líquido pueden ser tales que produzcan una composición restante que está sustancialmente libre de cristalinidad, tiene una viscosidad que es suficientemente alta que manera que la composición restante sea sustancialmente inmóvil a temperatura ambiente; o ambos.

Sin embargo, también puede usarse una composición líquida. Las composiciones líquidas tienen frecuentemente la ventaja de que puede lograrse rápidamente la mezcla con la muestra que va a estabilizarse, proporcionando así básicamente un efecto estabilizante inmediato tan pronto como la muestra se pone en contacto con la composición estabilizante líquida. Preferentemente, el (los) agente(s) estabilizante(s) presente(s) en la composición estabilizante líquida siguen siendo estables en solución y no requieren pre-tratamiento tal como, por ejemplo, la disolución de precipitados de solubilidad limitada, por el usuario debido a que los pre-tratamientos de este tipo plantean el riesgo de variaciones en la eficiencia de estabilización.

La composición estabilizante está comprendida en el recipiente en una cantidad eficaz para proporcionar la estabilización de la cantidad de muestra que va a recogerse en dicho recipiente. Según una realización, la composición estabilizante líquida se pone en contacto con la muestra biológica en una relación volumétrica seleccionada de 10:1 a 1:20, 5:1 a 1:15, 1:1 a 1:10 y 1:2 a 1:5. Es una ventaja particular de la composición estabilizante de la presente invención que la estabilización de un gran volumen de muestra pueda lograrse con un pequeño volumen de la composición estabilizante. Por tanto, preferentemente, la relación de composición estabilizante con respecto a la muestra se encuentra en un intervalo de 1:2 a 1:7, más preferido 1:3 a 1:5.

Según una realización, el recipiente se evacúa. La evacuación es preferentemente eficaz para extraer un volumen específico de una muestra fluida en el interior. Así, se garantiza que la correcta cantidad de muestra se pone en contacto con la cantidad pre-cargada de la composición estabilizante comprendida en el recipiente, y por consiguiente, que la estabilización es eficaz. Según una realización, el recipiente comprende un tubo que tiene un extremo abierto sellado por un tapón. Por ejemplo, el recipiente se pre-carga con una cantidad definida de la composición estabilizante tanto en forma sólida como líquida y se provee de un vacío definido y se sella con un tapón. El tapón se construye de forma que sea compatible con los accesorios de muestreo estándar (por ejemplo, cánula, etc.). Cuando se pone en contacto con, por ejemplo, la cánula, se recoge una cantidad de muestra que está predeterminada por el vacío en el recipiente. Una realización respectiva es en particular ventajosa para recoger sangre. Un recipiente adecuado se desvela, por ejemplo, en el documento US 6.776.959.

El recipiente según la presente invención puede estar hecho de vidrio, plástico u otros materiales adecuados. Los materiales de plástico pueden ser materiales impermeables al oxígeno o pueden contener una capa impermeable al oxígeno. Alternativamente, el recipiente puede estar hecho de material de plástico permeable al agua y al aire. El recipiente según la presente invención está hecho preferentemente de un material transparente. Ejemplos de materiales termoplásticos transparentes adecuados incluyen policarbonatos, polietileno, polipropileno y poli(tereftalato de etileno). El recipiente puede tener una dimensión adecuada seleccionada según el volumen requerido de la muestra biológica que se recoge. Como se ha descrito anteriormente, preferentemente, el recipiente se evacúa a una presión interna por debajo de la presión atmosférica. Una realización tal es particularmente adecuada para recoger líquidos corporales tales como sangre completa. La presión se selecciona preferentemente para extraer un volumen predeterminado de una muestra biológica en el recipiente. Además de tales tubos de vacío también pueden usarse tubos no de vacío, tubos con separador mecánico o tubos de barrera de gel como recipientes de muestra, en particular para la recogida de muestras de sangre. Ejemplos de recipientes adecuados y dispositivos de tapa se desvelan en los documentos US 5.860.397 y US 2004/0043505. Como recipiente para recoger la muestra que contiene células también pueden usarse dispositivos de recogida adicionales, por ejemplo, una jeringa, un dispositivo de recogida de orina u otros dispositivos de recogida. El tipo del recipiente también puede depender del tipo de muestra que va a recogerse y también están disponibles recipientes adecuados para el experto.

También se describe un recipiente, respectivamente un dispositivo, que está cargado o está pre-cargado con al menos un inhibidor de la apoptosis, preferentemente un inhibidor de las caspasas, al menos un agente hipertónico,

preferentemente al menos un compuesto orgánico hidroxilado como se describe en detalle anteriormente, por ejemplo, dihidroxiacetona y opcionalmente otro aditivo tal como un anticoagulante, preferentemente un agente quelante, más preferido EDTA. La mezcla de al menos un agente hipertónico, que preferentemente es un compuesto orgánico hidroxilado, por ejemplo, un hidrato de carbono tal como dihidroxiacetona y al menos un inhibidor de las caspasas, preferentemente Q-VD-OPH, estabiliza inesperadamente los ácidos nucleicos extracelulares en sangre completa, plasma o suero y previene la liberación de ácidos nucleicos celulares en particular de glóbulos blancos que están contenidos en tales muestras. Por tanto, la población de ácidos nucleicos extracelulares se preserva en el estado que había mostrado en el momento de extraer la sangre.

Se obtienen resultados beneficiosos cuando el recipiente respectivamente el dispositivo se carga o se pre-carga con al menos un inhibidor de las caspasas y al menos un compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente como agente estabilizante. Preferentemente, está englobado un anticoagulante, además del compuesto según la fórmula 1. El anticoagulante es preferentemente un agente quelante tal como EDTA. Además, la composición estabilizante comprendida en el recipiente también puede comprender al menos un agente hipertónico, preferentemente al menos un compuesto orgánico hidroxilado como se describe en detalle anteriormente, por ejemplo, dihidroxiacetona y opcionalmente aditivos adicionales.

Según una realización, el recipiente tiene una parte superior abierta, un fondo y una pared lateral que se extiende entremedias definiendo una cámara, en el que la composición de estabilización según la presente invención está comprendida en la cámara. Puede estar comprendida en su interior en forma líquida o sólida. Según una realización, el recipiente es un tubo, el fondo es un fondo cerrado, el recipiente comprende además un cierre en la parte superior abierta y la cámara está a una presión reducida. Las ventajas de una presión reducida en la cámara se describieron anteriormente. Preferentemente, el cierre es capaz de ser perforado con una aguja o cánula, y la presión reducida se selecciona para extraer un volumen especificado de una muestra líquida en la cámara. Según una realización, la cámara está a una presión reducida seleccionada para extraer un volumen especificado de una muestra líquida en la cámara, y la composición estabilizante es un líquido y está dispuesto en la cámara de forma que la relación volumétrica de la composición estabilizante con respecto al volumen especificado de la muestra que contiene células se seleccione de 10:1 a 1:20, 5:1 a 1:15, 1:1 a 1:10 y 1:2 a 1:5. Las ventajas asociadas se describieron anteriormente.

Preferentemente, el recipiente es para extraer sangre de un paciente.

Según un quinto aspecto, se describe un método que comprende la etapa de recoger una muestra de un paciente directamente en una cámara de un recipiente según el cuarto aspecto descrito en el presente documento. Detalles con respecto al recipiente y la muestra se describieron anteriormente. Se remite a la divulgación respectiva. Según una realización, se recoge una muestra de sangre, preferentemente se extrae del paciente.

Los métodos y composiciones desvelados en el presente documento permiten la eficaz preservación y aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares, mientras que reducen la posible mezcla con ácidos nucleicos, en particular ADN genómico fragmentado, que se origina de células comprendidas en la muestra biológica y que pueden entrar en una muestra biológica debido al daño celular, respectivamente lisis celular. Los métodos descritos en el presente documento, además de las composiciones y los dispositivos desvelados (por ejemplo, los recipientes de recogida), reducen la degradación de ácidos nucleicos extracelulares y también reducen la lisis celular y/o liberación de ácidos nucleicos genómicos, en particular ADN genómico fragmentado, de manera que los ácidos nucleicos extracelulares contenidos en la muestra no llegan a contaminarse con ácidos nucleicos intracelulares, respectivamente se reduce una contaminación respectiva por las enseñanzas según la presente invención. Como se trata anteriormente, una entremezcla de ácidos nucleicos extracelulares y ácidos nucleicos celulares, en particular ADN genómico fragmentado, puede reducir la exactitud de cualquier medición de la cantidad de ácidos nucleicos extracelulares en una muestra biológica. Como se trata anteriormente, una ventaja importante de la presente invención es la posibilidad de estabilización esencialmente simultánea de tanto las células contenidas en la muestra (en particular glóbulos blancos en el caso de sangre completa, plasma o suero) como los ácidos nucleicos extracelulares. Esto ayuda a prevenir que los ácidos nucleicos celulares tales como el ADN genómico sean liberados en la porción libre de células de la muestra, y diluyan adicionalmente los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos (y biomarcadores asociados) de interés, mientras que también mantiene la integridad estructural de los ácidos nucleicos extracelulares. Como se ha tratado en el presente documento, el poner en contacto la muestra biológica que contiene células tal como sangre completa o plasma con el (los) agente(s) estabilizante(s) permite almacenar la muestra durante un periodo de tiempo antes de aislar los ácidos nucleicos extracelulares. Más preferentemente, la muestra biológica que contiene células, por ejemplo, sangre o plasma, puede extraerse en una localización (por ejemplo, un centro sanitario), ponerse en contacto con el (los) agente(s) estabilizante(s), y después transportarse a una localización remota diferente (por ejemplo, un laboratorio) para el proceso de aislamiento y prueba de ácidos nucleicos.

Además, los reactivos de estabilización, como se desvela en el presente documento, proporcionan una ventaja con respecto a los reactivos de estabilización del estado de la técnica conocidos que implican el uso de reactivos de reticulación, tales como formaldehído, liberadores de formaldehído y similares, ya que la estabilización de muestras según la presente invención no implica el uso de tales reactivos de reticulación. Los reactivos de reticulación

- 5 producen enlaces covalentes inter- o intra-moleculares entre moléculas de ácidos nucleicos o entre ácidos nucleicos y proteínas. Este efecto puede conducir a una recuperación reducida de tales ácidos nucleicos estabilizados y parcialmente reticulados después de una purificación o extracción de una muestra biológica compleja. Como, por ejemplo, la concentración de ácidos nucleicos circulantes en una muestra de sangre completa es ya relativamente baja, debe evitarse cualquier medida que reduzca adicionalmente el rendimiento de tales ácidos nucleicos. Esto puede ser de importancia particular cuando se detectan y analizan moléculas de ácidos nucleicos muy raras derivadas de tumores malignos o de un feto en desarrollo en el primer trimestre de embarazo. Por tanto, según una realización, ningún liberador de formaldehído está comprendido en la composición estabilizante, respectivamente no se usa adicionalmente para la estabilización. Según una realización, el inhibidor de la apoptosis que se usa en las composiciones según la presente invención no está seleccionado del grupo que consiste en ácido aurintricarboxílico, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), leupeptina y clorhidrato de N $\alpha$ -Tosil-Lys clorometil cetona (TLCK). Según una realización, el inhibidor de la apoptosis no está seleccionado de dicho grupo en particular si el inhibidor de la apoptosis no se usa en combinación con un agente hipertónico como estabilizador adicional.
- 10
- 15 Los intervalos numéricos son incluyentes de los números que definen el intervalo. Los encabezamientos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la presente invención que pueden leerse por referencia a la memoria descriptiva en conjunto.
- 20 El término "solución" como se usa en el presente documento en particular se refiere a una composición líquida, preferentemente una composición acuosa. Puede ser una mezcla homogénea de solo una fase, pero también está dentro del alcance de la presente invención que una solución comprenda aditivos sólidos tales como, por ejemplo, precipitados.
- 25 Los tamaños, respectivamente intervalos de tamaño, indicados en el presente documento con referencia a nucleótidos nt, se refieren a la longitud de cadena y así se usan con el fin de describir la longitud de moléculas monocatenarias, además de bicatenarias. En moléculas bicatenarias dichos nucleótidos están emparejados.
- 30 Según una realización, la materia descrita en el presente documento como que comprende ciertas etapas en el caso de métodos o como que comprende ciertos componentes en el caso de composiciones, soluciones y/o tampones se refiere a materia que consiste en las etapas o componentes respectivos. Se prefiere seleccionar y combinar realizaciones preferidas descritas en el presente documento y la materia específica de una combinación respectiva de realizaciones preferidas también pertenece a la presente divulgación.

**Tabla 1: Visión general de inhibidores de la apoptosis**

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
<b>1. Inhibidores metabólicos</b>	
AICA-ribósido, acadesina, AICAr, 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- $\beta$ -ribósido, Z-ribósido	Ofrece protección contra la muerte celular inducida por la privación de glucosa
Inhibidor II de la apoptosis, compuesto de diarilurea	Previene la formación de complejos de apoptosoma activo de ~700 kDa
Bloqueante del canal Bax, ( $\pm$ )-1-(3,6-dibromocarbazol-9-il)-3-piperazin-1-il-propan-2-ol, bis TFA, iMAC1	Un derivado de dibromocarbazolo-piperazinilo permeable a las células que muestra propiedades antiapoptóticas. Bloquea eficazmente la liberación de citocromo c inducida por Bid de mitocondrias de células HeLa (~80 % de inhibición a 5 $\mu$ M), inhibiendo la actividad de formación de canales Bax (CI50 = 520 nM en un ensayo de canales de liposomas).
Péptido inhibidor de Bax, V5 Secuencia de péptidos: H-Val-Pro-Met-Leu-Lys-OH	Un pentapéptido permeable a las células basado en el dominio inhibidor de Ku70-Bax que ofrece citoprotección. Funciona tan eficazmente como el inhibidor de la caspasa VI (Z-VAD-FMK; Cat. N.º 219007) para la apoptosis mediada por Bax (~50-200 $\mu$ M). También bloquea eficazmente la muerte celular necrótica independiente de caspasas. Se muestra que son competitivos para Ku70, interaccionan con Bax, previenen su cambio conformacional y translocación mitocondrial. Muestra estabilidad prolongada en medio de cultivo (~3 días). También está disponible péptido de control negativo

Bcl-xL BH44-23, humano, permeable a las células	Un péptido permeable a las células que previene la muerte de células apoptóticas uniéndose directamente al canal de aniones dependiente de tensión (VDAC) y bloqueando su actividad. Conduce a la inhibición de la liberación de citocromo c y pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ). Contiene el dominio de homología del extremo N conservado (BH4) de Bcl-xL (aminoácidos 4 - 23), que se ha mostrado que es esencial para inhibir la actividad de VDAC en liposomas y en mitocondrias aisladas. El dominio BH4 está asociado a un péptido portador, una secuencia de VIH-TAT48-57 de 10 aminoácidos con un residuo de $\beta$ -alanina como espaciador para flexibilidad máxima. Tras su captación, se localiza principalmente en las mitocondrias
Ácido bongkrékico, sal de triamonio	Actúa de ligando del translocador del nucleótido adenina. Un potente inhibidor del megacanal mitocondrial (poro de transición de permeabilidad). Reduce significativamente los signos de apoptosis inducida por óxido nítrico. Previene la rotura apoptótica del potencial transmembranario mitocondrial interno ( $\Delta\psi_m$ ), además de varios otros fenómenos asociados a la apoptosis
Daunorubicina, clorhidrato	Potente agente antineoplásico permeable a las células cuyo posible sitio diana puede ser citocromo c oxidasa mitocondrial. Se ha mostrado que inhibe la síntesis de ARN y ADN. Inhibe las topoisomerasas I y II eucariotas. Induce roturas monocatenarias de ADN. También induce la apoptosis en células tumorales HeLa S3. Según una realización, dicho compuesto no se usa como estabilizador según la presente invención.
Humanina, humana, sintética	Un péptido antiapoptótico de 24 residuos que, cuando se expresa intracelularmente, ofrece protección contra la apoptosis neuronal inducida por presenilina y mutantes de APP (proteína precursora de amiloide) asociados a la enfermedad de Alzheimer (AD) familiar. Se muestra que reduce la liberación de citocromo c <i>in vitro</i> uniéndose directamente a Bax (proteína X asociada a Bcl-2; Kid ~ 2 nM) y previniendo su asociación con mitocondrias aisladas
Forbol-12-miristato-13-acetato	El éster de forbol más comúnmente usado. Promotor de tumores de piel de ratón extremadamente potente. Activa a la proteína cinasa C <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> , incluso a concentraciones nM. Promueve la expresión de NOS inducible en hepatocitos cultivados. Activa $Ca^{2+}$ -ATPasa y potencia la formación AMPc inducida por forskolina. Inhibe la apoptosis inducida por el antígeno Fas, pero induce la apoptosis en células de leucemia promielocítica HL-60. Su unión es reversible
Pifitrina- $\alpha$	Un inhibidor químico permeable a las células de p53. Inhibe reversiblemente la transactivación dependiente de p53 de genes sensibles a p53 y bloquea reversiblemente la apoptosis mediada por p53. Inhibe la detención del crecimiento dependiente de p53 de fibroblastos diploides humanos en respuesta a daño del ADN, pero no tiene efecto sobre fibroblastos deficientes en p53. Protege tejidos normales de los efectos secundarios perjudiciales de la quimioterapia. Se ha informado que protege neuronas contra el péptido $\beta$ -amiloide y la apoptosis inducida por glutamato.
Pifitrina- $\mu$	Una sulfonamida permeable a las células que bloquea la interacción de p53 con Bcl-xL y proteínas Bcl-2 e inhibe selectivamente la translocación de p53 a mitocondrias sin afectar la función de transactivación de p53. Protege eficazmente contra la muerte de células inducida por radiación $\gamma$ <i>in vitro</i> y la letalidad animal <i>in vivo</i> . Debido a que la pifitrina- $\mu$ se dirige solo a la rama mitocondrial de la vía de p53 sin afectar las importantes funciones transcripcionales de p53, es superior a la pifitrina- $\alpha$ (Cat. N.º 506132) en estudios <i>in vivo</i> . Se muestra que interacciona selectivamente con HSP70 inducible y altera sus funciones
Pifitrina- $\alpha$ , cíclica-	Un análogo permeable a las células y muy estable de pifitrina- $\alpha$ (Cat. N.º 506132), con función biológica similar, pero con citotoxicidad reducida. Un inhibidor químico de p53. Inhibe reversiblemente la transactivación dependiente de p53 de genes sensibles a p53; también bloquea reversiblemente la apoptosis mediada por p53. Actúa de modulador de P-gp cambiando la especificidad de sustrato relativa del transportador. Se ha informado que este compuesto es un potente inhibidor transcripcional de STAT6

Pifitrina- $\alpha$ , p-Nitro	Un inhibidor de p53 permeable a las células que sirve de forma de profármaco de pifitrina- $\alpha$ , p-nitro, cíclica (Cat. N.º 506154). Aunque su eficacia <i>in vitro</i> (DE50 = 0,3 $\mu$ M en proteger la muerte de neuronas corticales inducida por etopósido) es similar a la de la pifitrina- $\alpha$ (Cat. N.º 506132), es 100 veces más potente que la pifitrina- $\alpha$ cuando se administra en ratas <i>in vivo</i> debido a su conversión estacionaria de larga duración en la forma cíclica correspondiente del compuesto activo en sistemas biológicos (t1/2 = 8 h en medio de cultivo de neuronas a 37 °C).
Pifitrina- $\alpha$ , p-nitro, cíclica	Un inhibidor de p53 permeable a las células que presenta 10 veces mayor potencia (DE50 = 30 nM en proteger la muerte de neuronas corticales inducida por etopósido) y 50 % de semivida más larga (t1/2 = 6 h en medio de cultivo de neuronas a 37 °C) que la pifitrina- $\alpha$ (Cat. N.º 506132). Sin embargo, a pesar de su eficacia <i>in vitro</i> , este inhibidor no es eficaz cuando se administra en ratas <i>in vivo</i> . Para aplicaciones <i>in vivo</i> , por favor, considérese pifitrina- $\alpha$ , p-nitro (Cat. N.º 506152).
Péptido inhibidor de STAT3 Secuencia de péptidos: Ac-Pro-Tyr(P03H2)-Leu-Lys-Thr-Lys-OH	Un fosfopéptido de unión al dominio Stat3-SH2 que actúa de inhibidor selectivo de la señalización de Stat3 (transductores de señal y activadores de la transcripción 3) con una DB50 de 235 $\mu$ M (concentración de péptido a la que la actividad de unión a ADN se inhibe el 50 %). Reduce significativamente la actividad de unión a ADN de Stat3 formando un complejo de Stat3:péptido inactivo y reduce los niveles de dímeros Stat3:Stat3 activos que pueden unirse a ADN. Muestra mayor afinidad por Stat3, y a un menor grado Stat1, con respecto a Stat5. Se suministra como una sal de trifluoroacetato.
Péptido inhibidor de STAT3, permeable a las células Secuencia de péptidos: Ac-Pro-Tyr(P03H2)-Leu-Lys-Thr-Lys-OH	Un análogo permeable a las células del fosfopéptido de unión al dominio Stat3-SH2 (Cat. N.º 573095) que contiene una mts (secuencia de translocación de membrana) del extremo C y actúa de potente bloqueante altamente selectivo de la activación de Stat3. También suprime la transformación constitutiva de Src dependiente de Stat-3 sin efecto sobre la transformación de Ras independiente de Stat-3. El péptido de control inactivo no fosforilado también está disponible bajo Cat. N.º 573105. Se suministra como una sal de trifluoroacetato.
CAY10500, 6,7-dimetil-3-[[metil-[1-(3-trifluorometil-fenil)-1H-indol-3-ilmetil]-amino]-etil]-amino]-metil]-cromon-4-ona	Inhibidor del factor de necrosis tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ ) que previene la unión al receptor 1 de TNF (TNFR1). <sup>6</sup> Se une al trímero de TNF $\alpha$ biológicamente activo y promueve el desplazamiento acelerado de una única subunidad para inactivar rápidamente la citocina. En un ensayo basado en células, el compuesto inhibió la estimulación mediada por TNF $\alpha$ de la degradación de IKB.
Amida gambógica	Un agonista selectivo para TrkA que imita las acciones de NGF. Este compuesto posee robusta actividad neurotrófica, mientras que previene la muerte celular 1 neuronal.
Ácido maslínico	Un triterpeno pentacíclico con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Se muestra que bloquea la generación de óxido nítrico e inhibe la secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$ inducida por lipopolisacáridos
Hidrato de naringina	Un bioflavonoide de cítrico que se encuentra que inhibe la actividad de citocromo P450 monooxigenasa en hígado de ratón. Previene la rotura citoesquelética inducida por toxina y la muerte apoptótica de células del hígado.
Necrostatina-1	Un inhibidor de la necroptosis, una vía de muerte apoptótica no de células. No afecta la apoptosis desencadenada por Fas/TNFR. Según una realización, dicho compuesto no se usa como estabilizador según la presente invención.
NSC348884 hidratado, N1,N2-bis((3-imino-6-metil-3H-indol-2-il)metil)-N1,N2-bis((6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)etano-1,2-diamina hidratada	Este producto es una fosfoproteína nucleolar que muestra varias actividades biológicas en la biogénesis de ribosomas, proliferación celular, transporte lanzadera citoplásmico/nuclear, unión a ácido nucleico, escisión ribonucleica, duplicación de centrosomas y acompañamiento molecular, y se encuentra en mayores niveles en células tumorales. Se ha mostrado que la expresión en exceso conduce a la inhibición de la apoptosis. NSC34884 regula por incremento p53.
Ácido orselínico	Ácido benzoico. Bloquea la apoptosis neuronal mediada por PAF. Muestra actividad secuestrante de radicales libres.

Ácido tetrametilnordihidroguaiarético	Un derivado sintético de NDGA y un inhibidor no selectivo de lipoxigenasa. Inhibe la unión del factor de transcripción Sp1 en el promotor de repetición terminal largo del VIH y en el promotor de $\alpha$ -ICP4 (un gen esencial para la replicación del VHS).
GW 4869, 3,3'-(1,4-fenilen)bis[N-[4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)fenil]-clorhidrato-2-propenamida	Un compuesto de dihidroimidazolo-amida simétrico permeable a las células que actúa de potente inhibidor no competitivo específico de N-SMasa (esfingomielinasa neutra) [CI50 = ~ $\mu$ M, cerebro de rata; Km para esfingomielina ~13 $\mu$ M]. No inhibe la A-SMasa (esfingomielinasa ácida) incluso a 150 $\mu$ M. Inhibe débilmente las actividades de la proteína fosfatasa bovina 2A y liso-PAF PLC de mamífero, mientras que no se observa inhibición para PLC específica de fosfatidilcolina bacteriana. Se informó que ofrecía protección completa contra muerte celular inducida por TNF- $\alpha$ o diamina en células de cáncer de mama MCF7 a 20 $\mu$ M. No modifica los niveles de glutatión intracelular o interfiere con los efectos de señalización mediada por TNF- $\alpha$ o diamina.
SP 600125, 1,9-pirazoloantrona, antrapirazolona	SP600125 es un inhibidor de JNK (CI50 = 40 nM para JNK-1 y JNK-2 y 90 nM para JNK-3). Este agente presenta selectividad superior a 300 veces para JNK contra las MAP cinasas relacionadas ERK1 y p38-2, y la serina treonina cinasa PKA. [1] SP600125 es un inhibidor competitivo de ATP reversible. En células, la dosis de SP600125 inhibió dependientemente la fosforilación de c-Jun, la expresión de genes inflamatorios COX-2, IL-2, IFN- $\gamma$ y TNF- $\alpha$ , y previno la activación y diferenciación de cultivos de células CD4 humanas primarias
Mdivi-1, 3-(2,4-dicloro-5-metoxifenil)-2,3-dihidro-2-tioxo-4(1H)-quinazolinona, 3-(2,4-dicloro-5-metoxifenil)-2-sulfanil-4(3H)-quinazolinona	Mdivi-1 es un inhibidor selectivo de la división mitocondrial en levadura y células de mamífero que actúa mediante la inhibición de la dinamina de división mitocondrial. En células, Mdivi-1 inhibe la apoptosis inhibiendo la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Mdivi-1 produce la rápida formación (<5 min) reversible y dependiente de la dosis de mitocondrias tipo red en células no mutantes con una CI50= ~10 $\mu$ M. En levadura, la microscopía de fluorescencia de lapso de tiempo no reveló división mitocondrial detectable después del tratamiento con Mdivi-1
Minociclina, clorhidrato	Derivado de tetraciclina con actividad antimicrobiana. Inhibidor de la angiogénesis, apoptosis y poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1). Antiinflamatorio y neuroprotector
Ro 08-2750 (C13H10N4O3)	Inhibidor de la apoptosis inducida por NGF.
RKTS-33 (C7H8O4)	Inhibición selectiva de la vía dependiente del ligando Fas sola
<b>2. Ácidos nucleicos</b>	
3,4-Dicloroisocumarina	Inhibidor de serina proteasas -> granzima B y bloquea la escisión de ADN internucleosómica apoptótica en timocitos sin la participación de endonucleasas. No afecta las tiol proteasas y metaloproteasas
Actinomicina D, Streptomyces sp.	También actúa de inhibidor competitivo de serina proteasas; fármaco antineoplásico clásico. Inductor citotóxico de la apoptosis contra células tumorales. Un inhibidor dependiente de ADN de la síntesis de ARN, la actinomicina promueve la inducción de la apoptosis por algunos estímulos específicos, por ejemplo, TRAIL y Fas (CD95). La actinomicina D también puede aliviar o bloquear el proceso apoptótico y disminuir la citotoxicidad inducida por varios estímulos tales como el inhibidor de dihidrofolato reductasa aminopterina y el derivado de prostaglandina 15-desoxi-D12,14-prostaglandina J2, así puede tener tanto actividades pro como antiapoptóticas en algunos sistemas. Según una realización, dicho compuesto no se usa como estabilizador según la presente invención.
Ácido aurintricarboxílico	Inhibidor de la ADN topoisomerasa II
Baicaleína	Una flavona permeable a las células que inhibe la actividad de 12-lipoxigenasa (CI50 = 120 nM) y transcriptasa inversa. Protege a las neuronas corticales de la toxicidad inducida por $\beta$ -amiloide. Reduce la biosíntesis de leucotrienos e inhibe la liberación de enzimas lisosómicas. También inhibe la captación y movilización de Ca <sup>2+</sup> celular, y la artritis inducida por adyuvante. Se informó que inhibía la peroxidación de lípidos microsómicos formando un complejo de hierro-baicaleína. Inhibe la topoisomerasa II e induce muerte celular en líneas celulares de carcinoma hepatocelular. Potencia respuestas contráctiles a la estimulación nerviosa. Inhibe la proteína tirosina cinasa y la proteína cinasa C estimulada por PMA

Camptotecina, acuminata	Camptotheca	Un inhibidor de la ADN topoisomerasa I permeable a las células. Presenta propiedades antileucémicas y antitumorales. Induce la apoptosis en células HL-60 y timocitos de ratón. Detiene células en la fase G2/M
Diisopropilfluorofosfato		Inhibidor de serina proteasas
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)		Inhibidor irreversible de serina proteasas. Su mecanismo de acción es análogo al del diisopropilfluorofosfato. PMSF produce la sulfonilación de los residuos de serina de sitio activo. También se informó que inhibía la fragmentación internucleosómica de ADN en timocitos inmaduros. Para un inhibidor más estable relacionado, véase AEBSF
(-)-Huperzina A		Un inhibidor de AChE. Antagonista de receptores de NMDA. Protege contra la excitotoxicidad mediada por glutamato.
Razoxano		Inhibe la topoisomerasa II sin inducir roturas de cadenas de ADN (inhibidor catalítico de topo II).
Suptopina-2		Supresor de la inhibición de topoisomerasa II. Invierte la detención del ciclo celular; evita la función del punto de regulación. Tiene fluorescencia inherente y una ventaja distinta en la identificación de dianas de molécula; concentración eficaz en el intervalo de $\mu\text{M}$ .
<b>3. Enzimas</b>		
<b>3.1. Caspasas</b>		
Inhibidor de la apoptosis; 2-(p-metoxibencil)-3,4-pirrolidindiol-3-acetato		Efectos atribuibles a la inhibición de la activación de caspasa-3
clAP-1, humano, recombinante, E. coli		clAP-1 humano recombinante (aminoácidos 1-618) fusionado con la secuencia de péptidos MATVIDH10SSNG en el extremo N y expresado en E. coli. clAP es un miembro del inhibidor de la familia de apoptosis de proteínas que inhibe la actividad proteolítica de caspasas maduras por interacción del dominio de BIR con la caspasa activa
CrmA, recombinante		CrmA (modificador A de la respuesta de serpina citocinas virales de la viruela vacuna) se purifica de E. coli transformado con una construcción que contiene la región codificante de longitud completa del gen CrmA y 7 aminoácidos adicionales que no afectan la actividad. CrmA es un inhibidor natural de caspasa-1 humana y granzima B, enzimas que participan en la apoptosis
Inhibidor de la caspasa I del grupo III Secuencia de péptidos: Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-CHO, Ac-IEPD-CHO, Inhibidor III de la caspasa-8		Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de caspasas del grupo III (caspasa-6, -8, -9 y -10), aunque más eficaz hacia las caspasas-6 y -8. También inhibe la caspasa-1 y la caspasa-3. Si se usa con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa.
Campferol		Un fitoestrógeno permeable a las células que inhibe la religación de ADN catalizada por topoisomerasa I en células HL-60. Ofrece protección contra la muerte celular inducida por A $\beta$ 25-35 en neuronas corticales neonatales. Sus efectos protectores son comparables a los del estradiol. Bloquea la activación inducida por A $\beta$ de caspasa-2, -3, -8 y -9, y reduce la apoptosis neuronal inducida por NMDA. Se informó que era un potente inhibidor de monoamina oxidasas. Actúa de inhibidor de la actividad de COX-1 (CI50 = 180 $\mu\text{M}$ ), y de la activación transcripcional de COX-2 (CI50<15 $\mu\text{M}$ )
Q-VD-OPH		General, Pancaspasa
Boc-D(OMe)-FMK		General, Pancaspasa
Z-D(OMe)E(OMe)VD(OMe)-FMK		Caspasa 3, 7
Z-LE(OMe)TD(OMe)-FMK		Caspasa 8
Z-YVAD(OMe)-FMK		Caspasa 1, 4
Z-FA-FMK		Inhibe catepsina B
Z-FF-FMK		Catepsina B, L
Mu-PheHphe-FMK		Catepsina B, L
Z-AE(OMe)VD(OMe)-FMK		Caspasa 10
Z-ATAD(OMe)-FMK		Caspasa 12
Z-VK(Biotina)-D(OMe)-FM K		Caspasa general
Z-LE(OMe)VD(OMe)-FMK		Caspasa 4
Z-VAM-FMK		Inhibidor de péptidos antivirales, inhibe HRV2 y HRV14
4'-Azidocitidina		Inhibidor del VHC

Inhibidor I de la caspasa-13 Secuencia de péptidos: Ac-Leu-Glu-Glu-Asp-CHO	Un potente inhibidor reversible de la caspasa-13 (ERICE).
Inhibidor II de la caspasa-13 Secuencia de péptidos: Z-Leu-Glu(OMe)-Glu(OMe)-Asp(OMe)-FMK	Un inhibidor irreversible permeable a las células de caspasa-13. Si se usa con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa.
Inhibidor I de la caspasa-1 Secuencia de péptidos: Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-CHO	Un inhibidor potente, específico y reversible de la caspasa-1 ( $K_i = 200$ pM para caspasa-1 recombinante humana), caspasa-4 y caspasa-5. Inhibe fuertemente la apoptosis inducida por anti-APO-1 en células L929-APO-1.
Inhibidor I de la caspasa-1, permeable a las células Secuencia de péptidos: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Tyr-Val-Ala-Asp-CHO	Un inhibidor permeable a las células de la caspasa-1 (ICE; enzima convertora de interleucina-1 $\beta$ ), caspasa-4 y caspasa-5. La secuencia YVAD-CHO del extremo C de este péptido es un inhibidor altamente específico, potente y reversible de la caspasa-1 ( $K_i = 1$ nM). La secuencia del extremo N (residuos de aminoácidos 1-16) se corresponde con la región hidrófoba (región h) del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi (K-FGF) y confiere permeabilidad celular al péptido
Inhibidor II de la caspasa-1 Secuencia de péptidos: Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-CMK	Un inhibidor permeable a las células e irreversible de la caspasa-1 ( $K_i = 760$ pM), caspasa-4 y caspasa-5. Inhibe la apoptosis mediada por Fas y la activación de esfingomielinasa ácida
Inhibidor IV de la caspasa-1 Secuencia de péptidos: Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-AOM (AOM = 2,6-dimetilbenzoiloximetilcetona)	Un inhibidor altamente selectivo, competitivo, permeable a las células e irreversible de la caspasa-1, caspasa-4 y caspasa-5. Inactiva la enzima con una tasa limitada por difusión y es relativamente inerte hacia otros bionucleófilos tales como glutatión, haciéndolo un candidato excelente para estudios <i>in vivo</i> de inhibición de enzimas
Inhibidor V de la caspasa-1 Secuencia de péptidos: Z-Asp-CH2-DCB	Un potente inhibidor de proteasas del tipo caspasa-1. Bloquea la muerte celular apoptósica en células U937 de leucemia mieloide humana y bloquea la fragmentación de ADN inducida por etopósido
Inhibidor VI de la caspasa-1 Secuencia de péptidos: Z-Tyr-Val-Ala-Asp(OMe)-CH2F*	Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de la caspasa-1 (ICE), caspasa-4 y caspasa-5
Inhibidor de la caspasa-2 Secuencia de péptidos: Z-Val-Asp(OMe)-Val-Ala-Asp(OMe)-CH2F*	Un inhibidor permeable a las células e irreversible de la caspasa-2 (ICH-1)
Inhibidor II de la caspasa-2 Secuencia de péptidos: Ac-Leu-Asp-Glu-Ser-Asp-CHO	Un inhibidor reversible de caspasa-2 y caspasa-3
Inhibidor I de caspasa-3/7 Secuencia de péptidos: 5-[(S)(+)-2-(Metoximetil)pirrolidino]sulfonilistatina	Un inhibidor reversible potente, permeable a las células y específico de la caspasa-3 ( $K_i = 60$ nM) y caspasa-7 ( $K_i = 170$ nM).
Inhibidor I de la caspasa-3 Secuencia de péptidos: Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO	Un inhibidor muy potente, específico e reversible de la caspasa-3 ( $CI_{50} = 200$ pM), caspasa-6, caspasa-7, caspasa-8 y caspasa-10.
Inhibidor I de la caspasa-3, permeable a las células Secuencia de péptidos: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Asp-Glu-Val-Asp-CHO	Un inhibidor permeable a las células de la caspasa-3, además de caspasa-6, caspasa-7, caspasa-8 y caspasa-10. La secuencia DEVD-CHO del extremo C de este péptido es un inhibidor altamente específico, potente y reversible de la caspasa-3 ( $K_i < 1$ nM) que también se ha mostrado que inhibe fuertemente la escisión de PARP en extractos de células de osteosarcoma humano cultivado ( $CI_{50} = 200$ pM). La secuencia del extremo N (residuos de aminoácidos 1-16) se corresponde con la región hidrófoba (región h) del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi (K-FGF) y confiere permeabilidad celular al péptido. También está disponible una solución 5 mM (1 mg/100 $\mu$ l) de inhibidor I de la caspasa-3, permeable a las células (Cat. N.º 235427) en DMSO.
Inhibidor II de la caspasa-3 Secuencia de péptidos: Z-Asp(OCH3)-Glu(OCH3)-Val-Asp(OCH3)-FMK	Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de la caspasa-3, además de caspasa-6, caspasa-7, caspasa-8 y caspasa-10. Si se usa con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa. También está disponible una solución 5 mM (250 $\mu$ g/75 $\mu$ l) de Z-DEVD-FMK (Cat. N.º 264156) en DMSO



Inhibidor III de la caspasa-3 Secuencia de péptidos: Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CMK	Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de la caspasa-3, además de caspasa-6, caspasa-7, caspasa-8 y caspasa-10
Inhibidor IV de la caspasa-3 Secuencia de péptidos: Ac-Asp-Met-Gln-Asp-CHO	Un inhibidor específico de la caspasa-3. Este inhibidor de tetrapéptido se ha usado con el inhibidor de la caspasa-6 Ac-VEID-CHO para analizar minuciosamente la vía de activación de la caspasa en células de Jurkat estimuladas por Fas
Inhibidor V de la caspasa-3 Secuencia de péptidos: Z-Asp(OMe)-Gln-Met-Asp(OMe)-CH <sub>2</sub> F*	Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de la caspasa-3, también reconoce caspasa-1. Si se usa con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa.
Inhibidor VII de la caspasa-3 Secuencia de péptidos: Acetato de 2-(4-metil-8-(morfolin-4-ilsulfonil)-1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-pirrolol[3,4-c]quinolin-2-il)etilo	Un compuesto de pirroloquinolina no de peptidilo permeable a las células que actúa de inhibidor potente, reversible y no competitivo de la caspasa-3 (CI <sub>50</sub> = 23 nM) con selectividad 10-100 veces mayor. Se muestra que presenta mayor actividad antiapoptósica que Z-VAD-FMK (Cat. N.º 627610) en un modelo de apoptosis inducida por estaurosporina (Cat. N.º 569397) en linfocitos T de Jurkat humanos.
Inhibidor I de la caspasa-4 Secuencia de péptidos: Ac-Leu-Glu-Val-Asp-CHO	Un inhibidor reversible de la caspasa-4
Inhibidor I de la caspasa-4, permeable a las células Secuencia de péptidos: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Leu-Glu-Val-Asp-CHO	Un inhibidor potente, permeable a las células y reversible de la caspasa-4. La secuencia del extremo N (residuos de aminoácidos 1-16) se corresponde con la región hidrófoba del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi y confiere permeabilidad celular al péptido.
Inhibidor I de la caspasa-5 Secuencia de péptidos: Z-Trp-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-CH <sub>2</sub> F*	Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de la caspasa-5. Inhibe fuertemente la caspasa-1. También inhibe la caspasa-4 y la caspasa-8
Inhibidor I de la caspasa-6 Secuencia de péptidos: Z-Val-Glu(OMe)-Ile-Asp(OMe)-CH <sub>2</sub> F*	Un inhibidor irreversible permeable a las células de la caspasa-6. Si se usa con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa
Inhibidor II de la caspasa-6, permeable a las células Secuencia de péptidos: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Val-Glu-Ile-Asp-CHO	Un inhibidor potente, permeable a las células y reversible de la caspasa-6. La secuencia del extremo N (aminoácidos 1-16) se corresponde con la región hidrófoba del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi y confiere permeabilidad celular al péptido
Inhibidor I de la caspasa-8, permeable a las células Secuencia de péptidos: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Ile-Glu-Thr-Asp-CHO	Un inhibidor potente, permeable a las células y reversible de la caspasa-8 y la granzima B. La secuencia del extremo N (aminoácidos 1-16) se corresponde con la región hidrófoba del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi y confiere permeabilidad celular al péptido
Inhibidor II de la caspasa-8 Secuencia de péptidos: Z-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)-CH <sub>2</sub> F*	Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de la caspasa-8 y la granzima B. Inhibe eficazmente la apoptosis inducida por el virus de la gripe en células HeLa. También inhibe la granzima B. Si se usa con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa. También está disponible una solución 5 mM (250 µg/76 µl) de Z-IETD-FMK (Cat. N.º 218840) en DMSO.
Inhibidor I de la caspasa-9 Secuencia de péptidos: Z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-CH <sub>2</sub> F*	Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de la caspasa-9. También puede inhibir la caspasa-4 y la caspasa-5. Si se usa con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa. También está disponible una solución 5 mM (250 µg/72 µl) de Z-LEHD-FMK (Cat. N.º 218841) en DMSO
Inhibidor II de la caspasa-9, permeable a las células Secuencia de péptidos: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Leu-Glu-His-Asp-CHO	Un inhibidor potente, permeable a las células y reversible de la caspasa-9. También puede inhibir la caspasa-4 y la caspasa-5. La secuencia del extremo N (aminoácidos 1-16) se corresponde con la región hidrófoba del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi y confiere permeabilidad celular al péptido
Inhibidor III de la caspasa-9 Secuencia de péptidos: Ac-Leu-Glu-His-Asp-CMK	Un potente inhibidor irreversible de la caspasa-9. Se informó que reducía el tamaño del infarto de miocardio durante la reperfusión (~70 nM).

Inhibidor de la caspasa I Secuencia de péptidos: Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH <sub>2</sub> F*	Un inhibidor irreversible permeable a las células de la pan-caspasa. Inhibe la apoptosis mediada por Fas en células de Jurkat y muerte celular inducida por estaurosporina en células epiteliales de la córnea. Si se usa con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa.
Inhibidor de la caspasa II Secuencia de péptidos: Ac-Val-Ala-Asp-CHO	Un inhibidor potente y reversible de la pan-caspasa.
Inhibidor de la caspasa II, permeable a las células Secuencia de péptidos: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Val-Ala-Asp-CHO	Un inhibidor reversible permeable a las células de la pan-caspasa producido uniendo la secuencia del extremo N (aminoácidos 1-16) del péptido de señalización del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi, que confiere permeabilidad celular al péptido VAD.
Inhibidor de la caspasa III Secuencia de péptidos: Boc-Asp(OMe)-CH <sub>2</sub> F*	Un inhibidor permeable a las células, irreversible, de amplio espectro de la caspasa.
Inhibidor de la caspasa IV Secuencia de péptidos: Boc-Asp(OBzl)-CMK	Un inhibidor irreversible general de la caspasa.
Inhibidor de la caspasa VI Secuencia de péptidos: Z-Val-Ala-Asp-CH <sub>2</sub> F*	Un inhibidor general irreversible de la caspasa. Útil para estudios que implican enzimas caspasas recombinantes, aisladas y purificadas. A diferencia del inhibidor de la caspasa I (Cat. N.º 627610), este inhibidor no requiere pretratamiento con esterasa para estudios <i>in vitro</i> . También está disponible una solución 10 mM (1 mg/221 µl) de inhibidor de la caspasa VI (Cat. N.º 219011) en DMSO
Inhibidor de la caspasa VIII Secuencia de péptidos: Ac-Val-Asp-Val-Ala-Asp-CHO	Un inhibidor reversible potente de la caspasa-2 (K <sub>i</sub> = 3,5 nM), caspasa-3 (K <sub>i</sub> = 1 nM) y caspasa-7 (K <sub>i</sub> = 7,5 nM). También sirve de inhibidor de DRONC (caspasa de <i>Drosophila</i> ), una glutamato/aspartato proteasa.
Inhibidor de la caspasa X Secuencia de péptidos: BI-9B12	Un compuesto de tiazolo 2,4-disustituido que contiene benzodioxano que actúa de inhibidor selectivo, reversible y competitivo de caspasas (K <sub>i</sub> = 4,3 µM, 6,2 µM y 2,7 µM para caspasa-3, -7 y -8, respectivamente). Se muestra que el resto de benzodioxano se ajusta en el 'orificio de aspartato' de las caspasas y posiblemente rompe la escisión asistida por caspasa-8 de BID, una proteína proapoptósica. Afecta débilmente la actividad del factor letal del carbunco, una metaloproteasa, a ~20 µM
Inhibidores de la caspasa-1	Que incluyen, pero no se limitan a Ac-N-Me-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehído (pseudo ácido) Ac-Trp-Glu-His-Asp-aldehído (pseudo ácido) Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehído (pseudo ácido) Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-clorometilcetona Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-2,6-dimetilbenzoiloximetilcetona Ac-Tyr-Val-Ala-Asp(OtBu)-aldehído-dimetilacetil Ac-Tyr-Val-Lys-Asp-aldehído (pseudo ácido) Ac-Tyr-Val-Lys(biotinil)-Asp-2,6-dimetilbenzoiloximetilcetona Biotinil-Tyr-Val-Ala-Asp-clorometilcetona Biotinil-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona Fluoresceína-6-carbonil-Tyr-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona Fluoresceína-6-carbonil-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona Z-Asp-2,6-diclorobenzoiloximetilcetona Z-Tyr-Val-Ala-Asp-clorometilcetona Z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona Z-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona
Inhibidores de la caspasa-2	Que incluyen, pero no se limitan a Ac-Val-Asp-Val-Ala-Asp-aldehído (pseudo ácido) Fluoresceína-6-carbonil-Val-Asp(OMe)-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona Z-Val-Asp(OMe)-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona
Inhibidores de proteasas del precursor de la caspasa-3	Que incluyen, pero no se limitan a Ac-Glu-Ser-Met-Asp-aldehído (pseudo ácido) Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-aldehído (pseudo ácido)

Inhibidores de la caspasa-3	Que incluyen, pero no se limitan a Ac-Asp-Glu-Val-Asp-aldehído (pseudo ácido) Ac-Asp-Met-Gln-Asp-aldehído (pseudo ácido) Biotinil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehído (pseudo ácido) Inhibidor II de la caspasa-3/7 Fluoresceína-6-carbonil-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona Z-Asp(OMe)-Gln-Met-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona Z-Asp-Glu-Val-Asp-clorometilcetona Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona
Inhibidores de la caspasa-4	Que incluyen, pero no se limitan a Ac-Leu-Glu-Val-Asp-aldehído (pseudo ácido) Z-Tyr-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona
Inhibidores de la caspasa-6	Que incluyen, pero no se limitan a Ac-Val-Glu-Ile-Asp-aldehído (pseudo ácido) Fluoresceína-6-carbonil-Val-Glu(OMe)-Ile-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona Z-Val-Glu(OMe)-Ile-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona
Inhibidores de la caspasa-8	Que incluyen, pero no se limitan a Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-aldehído (pseudo ácido) Boc-Ala-Glu-Val-Asp-aldehído (pseudo ácido) Fluoresceína-6-carbonil-Ile-Glu(OMe)-Thr-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona Fluoresceína-6-carbonil-Leu-Glu(OMe)-Thr-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona Z-Ile-Glu(OMe)-Thr-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona Z-Leu-Glu(OMe)-Thr-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona Z-LE(OMe)TD(OMe)-FMK
Inhibidores de la caspasa-9	Que incluyen, pero no se limitan a Ac-Leu-Glu-His-Asp-aldehído (pseudo ácido) Ac-Leu-Glu-His-Asp-clorometilcetona Fluoresceína-6-carbonil-Leu-Glu(OMe)-His-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona
Inhibidores de la caspasa-10	Que incluyen, pero no se limitan a Fluoresceína-6-carbonil-Ala-Glu(OMe)-Val-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona Z-Ala-Glu-Val-DL-Asp-fluorometilcetona
<b>3.2. Calpaína</b>	
Inhibidor III de la calpaína Secuencia de péptidos: Z-Val-Phe-CHO	Un potente inhibidor permeable a las células de la calpaína I y II ( $K_i = 8$ nM). Reduce la muerte celular mediada por capsaicina en ganglios de la raíz dorsal cultivados. Se informa se bloquea la supresión inducida por A23187 del crecimiento hacia afuera de axones en neuronas piramidales hipocámpicas aisladas. Presenta efecto neuroprotector en toxicidad inducida por glutamato.
Inhibidor IV de la calpaína Secuencia de péptidos: Z-Leu-Leu-Tyr-CH <sub>2</sub> F	Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de la calpaína II ( $k_2 = 28.900$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ). También actúa de inhibidor de la catepsina L ( $k_2 = 680.000$ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ).
Inhibidor V de la calpaína Secuencia de péptidos: Mu-Val-HPh-CH <sub>2</sub> F (Mu = morfolinoureidilo; HPh = homofenilalanilo)	Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de la calpaína

Ac-Leu-Leu-Nle-al	Inhibidor del péptido aldehído permeable a las células de la calpaína I (Ki=190nM), calpaína II (Ki=150nM), cathepsina L (Ki=0,5nM) y otras cisteína proteasas neutras. Inhibe la progresión del ciclo celular en G1/S y la metafase/anafase en células CHO, inhibiendo la degradación de ciclina B. También estimula la transcripción de HMG-CoA sintasa, inhibiendo la degradación de SREBP-1 activo (proteína 1 de unión al regulador del elemento de estero). Protege contra el daño neuronal producido por hipoxia e isquemia. Inhibe la apoptosis en timocitos y metamielocitos. También previene la producción de óxido nítrico por macrófagos activados, interfiriendo con la transcripción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS; NOS II). Inhibe la degradación proteolítica de IκBα e IκBβ en macrófagos RAW inducida con LPS. También prolonga la asociación de moléculas de MHC clase I con los transportadores asociados al procesamiento de antígenos
Z-LLY-FMK	Calpaína
N-Acetil-Leu-Leu-Met	Calpaína I
N-Acetil-Leu-Leu-Nle-CHO	Calpaína I
<b>3.3. Otros</b>	
BAPTA/AM	Forma permeable a la membrana de BAPTA. Puede cargarse en una amplia variedad de células, en las que se hidroliza por esterasas citosólicas y se atrapa intracelularmente como el quelante activo BAPTA. Previene las fibrilaciones ventriculares inducidas por la cocaína. Abole el aumento inducido por vitamina D3 en Ca <sup>2+</sup> intracelular. Induce la inactivación de proteína cinasa C. También inhibe la apoptosis inducida por taspigargina en timocitos de rata.
Inhibidor I de la granzima B Secuencia de péptidos: Z-Ala-Ala-Asp-CH <sub>2</sub> Cl	Un inhibidor débil de la granzima B humana y murina. También inhibe la fragmentación de ADN relacionada con la apoptosis en linfocitos por fragmentina 2, una proteasa de gránulos de linfocitos de rata homóloga a la granzima B (ID <sub>50</sub> = 300 nM).
Inhibidor II de la granzima B Secuencia de péptidos: Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-CHO	Un potente inhibidor reversible de la granzima B y caspasa-8 (Ki = 1 nM). También inhibe caspasa-1 (<6 nM), caspasa-6 (5,6 nM) y caspasa-10 (27 nM).
Inhibidor IV de la granzima B Secuencia de péptidos: Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-CHO	Un inhibidor reversible de la granzima B y la caspasa-8
Leupeptin, hemisulfato, microbiano	Un inhibidor reversible de proteasas del tipo tripsina y cisteína proteasas. También se sabe que inhibe la muerte celular programada inducida por la activación y restaura respuestas inmunitarias defectuosas de donantes VIH+
N-Etilmaleimida	Reactivo alquilante de sulfhidrilo que inhibe H <sup>+</sup> -ATPasa y suprime la corriente de cortocircuito (CI <sub>50</sub> = 22 μM) en células del conducto pancreático. Inactiva la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP. También un potente inhibidor de la fragmentación de ADN estimulada tanto con Mg <sup>2+</sup> como Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> en núcleos de hígado de rata. Estimula la liberación de ácido araquidónico mediante la activación de PLA2 en células endoteliales
Clorhidrato de Nα-tosil-Lys clorometil cetona, (TLCK)	Inhibe serina proteinasas del tipo tripsina. Inactiva irreversiblemente la tripsina sin afectar la quimotripsina. Previene la producción de óxido nítrico por macrófagos activados interfiriendo con la transcripción del gen iNOS. Bloquea la adhesión célula-célula y la unión del virus del VIH-1 a las células diana. En macrófagos, bloquea la óxido nítrico sintasa inducida por interferón-γ y lipopolisacáridos (EC <sub>50</sub> = 80 μM). Previene la endonucleólisis que acompaña a la muerte apoptótica de células de leucemia HL-60 y timocitos normales
Inhibidor de la proteasa Omi/HtrA2, Ucf-101	Un compuesto de ácido furfurilidin-tiobarbitúrico permeable a las células que actúa de inhibidor potente, específico, competitivo y reversible de la serina proteasa mitocondrial inducible por calor pro-apoptótica Omi/HtrA2 (CI <sub>50</sub> = 9,5 μM para His-Omi134-458). Muestra muy poca actividad contra diversas otras serina proteasas probadas (CI <sub>50</sub> ≥ 200 μM). Se informa que bloquea la muerte celular inducida por Omi/HtrA2 en fibroblastos nulos para caspasa-9 (-/-).

Fenilarsina óxido	Un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa permeable a la membrana (CI50 = 18 $\mu$ M). Estimula el transporte de 2-desoxiglucosa en músculo esquelético humano resistente a insulina y activa la proteína tirosina cinasa p56lck. Bloquea la activación dependiente de TNF- $\alpha$ de NF- $\kappa$ B en células ML-1a mieloides humanas. La PAO inhibe las actividades de proteasas de caspasas humanas recombinantes, además de caspasas endógenas que son activas en extractos de células DU249 de pollo pre-apoptósicas (extractos S/M).
Forbol-12,13-dibutirato	Fuerte irritante para la piel de ratón, pero solo moderadamente activo como promotor tumoral. Activa la proteína cinasa C. Estimula la fosforilación de Na <sup>+</sup> ,K <sup>+</sup> -ATPasa, inhibiendo así su actividad. Promueve la expresión de NOS inducible en hepatocitos cultivados. Se usa comúnmente en estudios de unión o en aplicaciones que requieren altas concentraciones de compuestos de forbol.
Hipericina	Inhibe PKC, CKII, MAP cinasa, insulina R, EGFR, PI-3 cinasa y también se observa que posee actividad antiviral.
Butirolactona I	Un inhibidor permeable a las células y altamente selectivo de proteínas cinasas dependientes de ciclina (Cdks) que inhibe la progresión del ciclo celular en las transiciones G1/S y G2/M. Inhibe p34cdk1/ciclina B (Cdk1; CI50 = 680 nM). También inhibe selectivamente Cdk2 y Cdk5 cinasas. Tiene poco efecto sobre la caseína cinasa I, caseína cinasa II, cinasa de receptor de EGF, MAP cinasa, PKA y PKC. Se muestra que previene la fosforilación de proteína del retinoblastoma e histona H1. También bloquea la apoptosis inducida por Fas en células HL-60 y muestra efectos antitumorales sobre líneas celulares de cáncer de pulmón humano
Nilotinib	Inhibidor específico de BCR-ABL-tirosina cinasa
Quercetina (sofofetina)	La quercetina es un inhibidor de PI3K y PKC con CI50 de 3,8 $\mu$ M y 15 $\mu$ g/ml. Abolió fuertemente las cinasas PI3K y Src, inhibió moderadamente Akt1/2 y afectó ligeramente PKC, p38 y ERK1/2. [1][2] La quercetina es un inhibidor del transporte de auxina polar que existe de forma natural con CI50 de 0,8, 16,7, 6,1, 11,36 $\mu$ M para la inhibición de la liberación en % de LDH, la inhibición de la adhesión PMN-EC inducida por TNF, inhibición inducida por TNF de la síntesis y proliferación de ADN. Es un tipo de producto químico basado en planta, o fitoquímico, conocido como flavonol y un flavonoide derivado de planta encontrado en frutas, verduras, hojas y granos. También puede usarse como componente en suplementos, bebidas o alimentos. En varios estudios, puede tener propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, y está siendo investigada para una amplia variedad de posibles beneficios para la salud.

### Ejemplos

Los ejemplos describen realizaciones, en tanto que estén englobadas por las reivindicaciones. Los restantes ejemplos ilustran la tecnología. Debe entenderse que estos ejemplos son para fin ilustrativo solo y no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes de la presente invención.

5

#### I. Materiales y métodos

Se diseñó un sistema de prueba, en el que muestras biológicas que contienen células, aquí muestras de sangre completa, se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante hasta 6 o 7 días. En este respecto, las propiedades estabilizantes de la muestra de los aditivos de la presente invención se probaron en el día 0, día 3 y día 6/7 en las muestras. Las muestras se procesaron según los siguientes protocolos, si procede (para detalles véanse también los ejemplos específicos en la sección de resultados):

10

#### 1. Medición de la integridad de los glóbulos sanguíneos por citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS)

15

##### 1.1. Lisis de glóbulos rojos

20

- Transferir 2 ml de muestra de sangre a un tubo Falcon de 15 ml nuevo
- Adición de 5 veces tampón EL (QIAGEN)
- Invertir la muestra (10 X)
- Incubación sobre hielo (10 min)
- Centrifugación durante 10 min a 400 x g y 4 °C

- Desechar el sobrenadante
- Adición de 2 veces tampón EL (QIAGEN) al sedimento de glóbulos blancos
- Resolución del sedimento en tampón EL (QIAGEN) por ligera agitación con vórtex
- Centrifugación durante 10 min a 400 x g

- 5
- Desechar el sobrenadante
  - Adición de 500 µl de FACS Flow (Becton, Dickinson Plymouth, RU) al sedimento de glóbulos blancos
  - Resolución del sedimento en FACS Flow por ligera agitación con vórtex
  - Transferir 1 ml de FACS Flow a un tubo de FACS nuevo
  - Transferir 100 µl del sedimento resuelto a un tubo de FACS

10 Se lisan los glóbulos rojos debido a que, de otro modo, las poblaciones de células decisivas (que pueden liberar, por ejemplo, ADN genómico) no son distinguibles en el análisis de FACS debido a la alta cantidad de glóbulos rojos.

15 **1.2. Medición de la integridad de células por citometría de flujo**

La medición se realizó según las instrucciones del fabricante (FACSCalibur; Becton, Dickinson Plymouth, RU).

**2. Separación de plasma sanguíneo**

20 Para separar el plasma sanguíneo de la sangre completa, las muestras de sangre se centrifugaron durante 15 min a 5000 rpm, y las muestras de plasma obtenidas se centrifugaron de nuevo durante 10 min a 16.000 x g a 4 °C.

El plasma sanguíneo resultante se usó para aislar los ácidos nucleicos contenidos en su interior.

25 **3. Purificación de ácidos nucleicos**

Los ácidos nucleicos extracelulares circulantes se purificaron a partir de las muestras de plasma obtenidas usando el kit QIAamp® Circulating NA (según el manual). En resumen:

- 30
- 10 ml de salida de muestra;
  - lisis: 1 ml de proteinasa K y 8 ml de tampón ACL (QIAGEN)
  - unión: 18 ml de tampón ACB (QIAGEN)
  - etapas de lavado: invariables y según el manual
  - Elución en 60 µl de tampón AVE (QIAGEN)

35 **4. Análisis de los eluatos**

Los eluatos obtenidos según 3. se almacenaron a -20 °C hasta que se purificaron todas las muestras (incluyendo las muestras del día 6/7). Después, se reunieron los eluatos de la misma condición y se trataron del siguiente modo:

40 4.1. Medición de la estabilidad de glóbulos sanguíneos/liberación de ADN por la determinación de la distribución de tamaño de ADN usando una electroforesis en gel en chip (2100 Bioanalyser; Agilent Technologies; Inc., EE.UU.) según las instrucciones del fabricante (véase el manual Agilent DNA 7500 y DNA 12000 Kit Guide), pero se transfirieron 1,5 µl en lugar de 1 µl de muestra a los pocillos.

45 4.2. Cuantificación de ADN con un ensayo de PCR en tiempo real, sensible para la degradación de ADN (diana: secuencias codificantes de ADN ribosómico 18S de 500 y 66 pb de longitud). El ensayo de dúplex de ADN se llevó a cabo según el manual de QuantiTect® Multiplex PCR (Qiagen) con las siguientes adaptaciones:

- 50
- La concentración de cebador se aumentó de 8 µM a 16 µM.
  - La etapa de hibridación/extensión se prolongó de 1 a 2 min.

(las muestras se diluyeron 1:10 antes de la amplificación)

55 4.3. Detección de ARN usando ensayos de PCR en tiempo real, sensible para variaciones en niveles de ARN libre de células circulante (diana: ARNr 18S, IL8, c-fos y p53). Los ensayos de ARN se llevaron a cabo según las condiciones descritas en las Tablas 2 a 4.

60 **Tabla 2:** Composiciones de muestras de reactivos de PCR y condiciones de los ciclos de la PCR en tiempo real de una etapa de ARNm de p53.

TaqMan MasterMix (MM)					
componente	reacción única	mastermix veces)	(x	c	p53 FAM-BHQ+HEX-BHQ
x veces	1 x	182		1 x	20,00 mastermix / reacción

ES 2 574 956 T3

ARN	5.000	/	var.	5 µl de ARN 25,00 µl de volumen de reacción
A. dest (calidad para PCR)	3,813	693,9	/	
2x QuantiTect Probe RT-PCR MasterMix (tampón)	12.500	2275,0	1 x	
cebador directo (20 µM)	0,500	91,0	400 nM	
cebador inverso (20 µM)	0,500	91,0	400 nM	
sonda (20 µM)	0,313	56,9	250 nM	
RNasin (40 U/µl; Promega)	0,125	22,8	0,2 U/µl	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM) Mezcla de RT-PCR QuantiTect (Enzym Mix)	2.000 0,250	364,0 45,5	6 mM U/µl	
Volumen de reacción [µl]	25.000	3640,0		

Ciclos:

- 5            30 min 50 °C  
              15 min 95 °C  
              40 ciclos  
              15 s 95 °C

**Tabla 3:** Composiciones de muestras de reactivos de PCR y condiciones de los ciclos de la PCR en tiempo real de una etapa de ARNm de IL8.

componente	reacción única	mastermix (x veces)	conc. final	IL8	FAM-BHQ
x veces	1 x	106	1 x		20,00 µl de mastermix / reacción 5 µl de ARN 25,00 µl de volumen de reacción
ARN	5.000	/	var.		
A. dest (calidad para PCR)	3,751	397,6	/		
2x QuantiTect Probe RT-PCR MasterMix (Puffer)	12.500	1325,0	1 x		
cebador directo (40 µM)	0,562	59,6	900 nM		
cebador inverso (40 µM)	0,562	59,6	900 nM		
sonda (20 µM)	0,250	26,5	200 nM		
RNasin (40 U/µl; Promega)	0,125	13,3	0,2 U/µl		
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.000	212,0	6 mM		
Mezcla de RT-PCR QuantiTect (Enzym Mix)	0,250	26,5	U/µl		
Volumen de reacción [µl]	25.000	2120,0			

Ciclos:

- 15            30 min 50 °C  
              15 min 95 °C  
              40 ciclos  
              15 s 95 °C  
              1 min 60 °C

**Tabla 4:** Composiciones de muestras de reactivos de PCR y condiciones de los ciclos de la PCR en tiempo real del dúplex de ARNm/ARNr 18S de c-fos.

Productos químicos c-fos	para una única reacción	MM x veces	FAM-JOE
x veces	1x	220	17,6 µl de mastermix/reacción 2,4 µl de ARN 20 µl de volumen de reacción
Molde	2,4	/	
A. dest	1,00	220	
2x QuantiTect Mastermix	10	2200	
cebador directo (20 µM); c-fos	0,900	198	
cebador inverso (20 µM); c-fos	0,900	198	
sonda (10 µM); c-fos	0,500	110	
cebador directo (10 µM); 18S	0,800	176	

cebador inverso (10 µM); 18S	0,800	176	
sonda (10 µM); 18S	0,800	176	
RNasin (40 U/µl; Promega)	0,100	22	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6	352	
Mezcla de RT-PCR QuantiTect (Enzym Mix)	0,2	44	
volumen de reacción [µl]	20,0	3872	

Ciclos:

- 5            30 min 50 °C  
               15 min 95 °C  
               40 ciclos  
               15 s 95 °C  
               1,30 min 60 °C

10            **Tabla 5:** Resume la información de las secuencias diana de ADN usadas detectadas en 4.2 y 4.3

diana	descripción	posición	tamaño del amplicón [pb]	posición	secuencia 5' - 3'	longitud [nt]	colorante
18S	ADN ribosómico humano	p12 - región del cromosoma 13, 14, 15, 21, 22	66	directa	GCCGCTAGAGGT GAAATTCTTG	22	5' Cy5 - BHQ 3'
				inversa	CATTCTTGGCAA ATGCTTTTCG	21	
				sonda	ACCGGCGCAAGA CGGACCAGA	21	
18S	ADN ribosómico humano	p12 - región del cromosoma 13, 14, 15, 21, 22	500	directa	GTCGCTCGCTCC TCTCCTACTT	22	5' FAM - BHQ 3'
				inversa	GGCTGCTGGCAC CAGACTT	19	
				sonda	CTAATACATGCC GACGGGCGCTGA C	25	

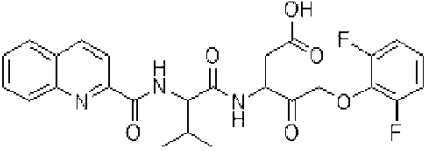
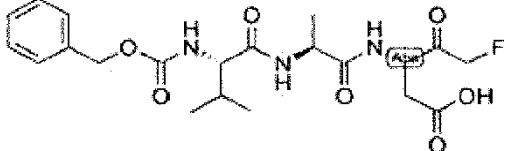
**II. Experimentos realizados y resultados**

15            Posteriormente, se explican los detalles sobre los experimentos realizados. Los detalles a los métodos usados en los ejemplos se describieron anteriormente bajo I.

**Ejemplo 1:** Estabilización mediante la adición de un inhibidor de las caspasas

20            Se probaron dos oligopéptidos diferentes, Q-VD-OPh y Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK, que actúan como inhibidores de caspasas de amplio espectro:

*Tabla 6:* Inhibidores de caspasas probados

nombre del inhibidor	peso molecular	solubilidad	estructura
Q-VD-OPh	513,49	20 mM, añadir 97 µl de DMSO	
		10 mM, añadir 194 µl de DMSO	
		5 mM, añadir 388 µl de DMSO	
Z-Val-Ala-Asp(Ome)-FMK	467,49	20 mM, añadir 107 µl de DMSO	
		10 mM, añadir 214 µl de DMSO	
		5 mM, añadir 428 µl de DMSO	



Cada inhibidor de caspasas probado se añadió a muestras de sangre completa (concentración final 20  $\mu\text{M}$  en 10 ml de sangre; la sangre se recogió en tubos Vacutainer K2E; BD). La muestra de sangre completa se procesó como se describe en la Sección I, véase 2. (preparación de plasma) y 3. (aislamiento de ácidos nucleicos).

## 5 **Resultados de la electroforesis en gel en chip**

Se separó por tamaño el ADN libre de células circulante eluido usando la electroforesis en gel en chip (para detalles sobre el método véase anteriormente, I, 4.1). La Fig. 1a muestra los resultados obtenidos. El control de DMSO y la sangre en K2E (no tratada según las enseñanzas de la presente invención) muestran el mismo patrón similar a escalera de las bandas. Este patrón se produce en muestras en las que tiene lugar la apoptosis. Durante la apoptosis, las endonucleasas degradan ADN genómico en regiones de conector inter-nucleosómico y producen fragmentos de ADN de aproximadamente 180 pb o múltiplos de 180 pb. Así, la apoptosis se produce en muestras que muestran un claro patrón similar a escalera. Además, la intensidad (oscuridad) del patrón es decisiva. Cuanto más oscuras son las bandas, más ADN genómico se liberó de las células y así contamina la población de ácidos nucleicos extracelulares.

La Fig. 1 a) muestra que el control de DMSO y las muestras de sangre en K2E muestran un fuerte patrón similar a escalera ya en el día 3, que llega a ser incluso más fuerte en el día 7. Así, el ADN genómico se liberó de las células contenidas en la muestra y también se degradó. Este ADN liberado y degradado contamina los ácidos nucleicos libres de células contenidos en la muestra. Por tanto, no se logra estabilización aceptable con estas muestras.

A diferencia, muestras de sangre completa tratadas con Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK muestran un patrón similar a escalera reducido en particular en el día 7 en comparación con los controles, que indica una inhibición de la liberación de ADN genómico, respectivamente fragmentación de ADN genómico producida por apoptosis. Este efecto se confirma por los resultados mostrados en la Fig. 1 b) (véase más adelante). El efecto es incluso más notorio en las muestras de sangre tratadas con Q-VD-OPh, que muestran patrones similares a escalera significativamente reducidos ya en el día 3 y día 7. Así, la liberación y degradación de ADN genómico se previene eficazmente, respectivamente se reduce, mediante la adición del inhibidor de la caspasa Q-VD-OPh.

## 30 **Resultados de la cuantificación del ADN**

El ADN libre de células circulante eluido también se cuantificó con el ensayo de PCR en tiempo real que es sensible para la degradación de ADN (para detalles sobre el método véase anteriormente, I, 4.2). La Fig. 1 b) muestra el efecto de los inhibidores de caspasas probados sobre la estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares (ensayo de dúplex de ADN 18S) en el plazo de 7 días desde el almacenamiento a TA, aquí el aumento en ADN.

La detección de ADN ribosómico 18S por PCR cuantitativa en tiempo real hace posible calcular el aumento de x veces de ADN desde el día 0 hasta el día 3 o 7 (cálculo: división de las copias del día 3 (o 7) entre las copias del día 0). Sorprendentemente, los resultados mostrados en la Fig. 1 b) demuestran un aumento reducido del ADN cuando se añadió un inhibidor de las caspasas, especialmente Q-VD-OPh, a muestras de sangre completa. El efecto estabilizante de Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK en comparación con las muestras patrón fue más notorio en el día 7, confirmando así los resultados mostrados en la Fig. 1 a).

## 45 **Resumen**

Resumiendo los resultados de PCR en tiempo real y la electroforesis en gel, se demostró que la adición de Q-VD-OPh o Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK inhibe la fragmentación de ADN y además reduce la liberación de ADN genómico en plasma sanguíneo. Así, el añadir un inhibidor de las caspasas a sangre completa es eficaz en estabilizar la muestra y en particular la población de ácidos nucleicos extracelulares incluso a temperatura ambiente. Así, el usar el método de estabilización descrito en el presente documento permite transportar muestras de sangre completa incluso a temperatura ambiente sin arriesgar la calidad de la muestra. Para prevenir completamente la liberación de ADN genómico también durante periodos de almacenamiento más largos, también puede aumentarse la concentración de Q-VD-OPh.

**Ejemplo 2:** Influencia de menores concentraciones del inhibidor de la caspasa Q-VD-OPh sobre la estabilidad en sangre

En este ejemplo, se probaron menores concentraciones del inhibidor de la caspasa Q-VD-OPh en combinación con glucosa, en el que la glucosa se añadió como componente de combinación para soportar que los glóbulos sanguíneos permanecieran vivos (previniendo el daño celular). Se añadieron glucosa 21,4 mM y Q-VD-OPh 4  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  o sin Q-VD-OPh a 10 ml de sangre extraída en tubos BD Vacutainer y se guardaron durante hasta 7 días a temperatura ambiente. La muestra de sangre completa se procesó como se describe en la Sección I, véase 2. (preparación de plasma) y 3. (aislamiento de ácidos nucleicos).

65

**Resultados de la electroforesis en gel en chip**

Se separó por tamaño el ADN eluido usando la electroforesis en gel en chip (para detalles sobre el método véase anteriormente, I, 4.1). La Fig. 2a muestra que, en comparación con las muestras de control, en las que no se añadió inhibidor de las caspasas, ya el inhibidor de las caspasas 1  $\mu\text{M}$  redujo significativamente la liberación/fragmentación de ADN genómico en el día 7. El efecto mejora si se usa inhibidor de las caspasas 4  $\mu\text{M}$ . Así, concentraciones ya muy bajas del inhibidor de las caspasas son eficaces en estabilizar la muestra de sangre, en particular cuando se combinan con un hidrato de carbono.

**Resultados de la cuantificación del ADN**

La Fig. 2b muestra los efectos de las concentraciones probadas del inhibidor de la caspasa Q-VD-OPh en combinación con glucosa 21 mM sobre el aumento de ADN genómico en el plasma (ensayo de dúplex de ADN 18S) en el plazo de 7 días desde el almacenamiento a TA. La adición de Q-VD-OPh en combinación con glucosa reduce significativamente la liberación de ADN genómico en plasma. La Fig. 2b muestra solo un aumento menor de ADN genómico en el plazo de 7 días desde el almacenamiento, aunque solo se añadió Q-VD-OPH 1  $\mu\text{M}$  a la muestra de sangre completa para la estabilización. La adición de Q-VD-OPh 4  $\mu\text{M}$  inhibe la liberación de ADN genómico al plasma a un máximo de un aumento de 4 veces. A diferencia, el extraer sangre completa en tubos K2E sin estabilización como se describe en el presente documento conduce a un aumento de aproximadamente 40 veces del ADN en plasma.

Así, también la Fig. 2 b) confirma que el inhibidor de las caspasas tiene un efecto de estabilización sobre la sangre completa incluso a bajas concentraciones.

**Ejemplo 3: Estabilización de glóbulos sanguíneos por efectos osmóticos**

Sorprendentemente también se encontró por los inventores que los glóbulos sanguíneos pueden estabilizarse añadiendo un reactivo que actúa de medio hipertónico en sangre completa. Generar un medio hipertónico mediante la adición de, por ejemplo, compuesto(s) orgánico(s) hidroxilado(s) a sangre completa produce una ligera liberación de agua de los glóbulos sanguíneos contenidos y produce elevada estabilidad por encogimiento de células. Se supone que dicho encogimiento de células estabiliza las células contra fuerzas mecánicas.

La dihidroxiacetona (DHA) es un producto intermedio del metabolismo de la fructosa y su forma de fosfato, fosfato de dihidroxiacetona (DHAP), es parte de la glicólisis. Se probó DHA como agente hipertónico. La adición de este reactivo fuerza sensiblemente a los glóbulos sanguíneos a encogerse sin dañarlos. En primer lugar se disolvió DHA en PBS (comprado de SIGMA-Aldrich Cat. N.º: D8537) o 3 x MOPS (diluido de 1 litro de 10 x MOPS: MOPS 200 mM; NaAc 50 mM, EDTA 10 mM; pH 5; suponiendo que un medio ácido también estabiliza ARNcl) obteniendo DHA 4,2 M disuelta. Entonces se añadieron 2 ml de DHA 4,2 M disuelta en tampón PBS o tampón 3 x MOPS a 10 ml de sangre para obtener una concentración final de DHA 0,7 M en sangre completa. Los dos disolventes diferentes de DHA se compararon con tubos PAXgene® Blood DNA (QIAGEN), un tubo del estado de la técnica de la extracción de sangre para la estabilización de ADN.

**Resultados del análisis de FACS**

La integridad de los glóbulos sanguíneos se analizó usando FACS (para detalles sobre el método véase anteriormente, I, 1). La Fig. 3 muestra la integridad de los glóbulos sanguíneos medida por citometría de flujo. Las representaciones de puntos visualizan tres poblaciones de células diferentes: granulocitos (1), monocitos (2) y linfocitos (3). La nube (4) en el campo izquierdo inferior de la representación representa el residuo, principalmente generado por la lisis de eritrocitos.

Los resultados en la Fig. 3 muestran que los glóbulos sanguíneos recogidos y guardados en tubos PAXgene® Blood DNA no son distinguibles entre sí y el residuo en el día 6 de almacenamiento. La adición de DHA permite una diferenciación de las subpoblaciones de glóbulos sanguíneos en el día 6 de almacenamiento aún cuando estas células llegan a ser más pequeñas como resultado del encogimiento de células. Esto indica que las células contenidas en la muestra se estabilizaron mediante la adición de DHA.

**Resultados de la electroforesis en gel en chip**

Los resultados presentados en la Fig. 4a también muestran una estabilización de las muestras de sangre mediante la adición de DHA, debido a que la liberación de ADN genómico es significativamente menor con las muestras tratadas con DHA que en muestras guardadas en los tubos PAXgene® Blood DNA. Además, como es evidente de la Fig. 4a, las muestras estabilizadas con DHA no muestran patrón de degradación similar a escalera, sugiriendo que se previene eficazmente la apoptosis, respectivamente una degradación de ADN.

**Resultados de la cuantificación del ADN**

La Fig. 4b muestra el efecto de DHA sobre el aumento de ADN (ensayo de dúplex de ADN 18S) en el plazo de 6 días desde el almacenamiento a TA. La DHA disuelta en 3 x MOPS proporcionó los mejores resultados, debido a que el nivel de ADN ribosómico 18S parece permanecer constante hasta el día 3 de almacenamiento.

La división del número de copias de amplicón corto por número de copias de amplicón largo (66 pb / 500 pb) indica si la cantidad de amplicones cortos o largos detectados cambia con el tiempo de un modo similar. Una disminución de esta relación implica una liberación más fuerte de moléculas de ADN más largas en vez de más cortas y puede interpretarse como liberación de ADN genómico de alto peso molecular de glóbulos sanguíneos. El diagrama mostrado en la Fig. 4b indica la liberación de ADN genómico para las tres condiciones. Los resultados muestran que la presencia de DHA ralentiza este proceso. Así, este experimento también muestra que la adición de DHA a sangre completa en EDTA estabiliza los glóbulos sanguíneos y, por tanto, preserva la población de ADNncl en la fracción plasmática libre de células y evita contaminaciones con ADN liberados de las células contenidas en la muestra, por ejemplo, debido a rotura mecánica.

**Ejemplo 4: Prueba de diferentes concentraciones de dihidroxiacetona**

En este ejemplo, se probó el efecto estabilizante de diferentes concentraciones de DHA (0,7 M, 0,5 M y 0,2 M).

**Resultados del análisis de FACS**

La Fig. 5 muestra la integridad de los glóbulos sanguíneos medida por citometría de flujo. Las representaciones de puntos visualizan tres poblaciones de células diferentes: granulocitos (1), monocitos (2) y linfocitos (3). La nube en el campo izquierdo inferior de la representación representa el residuo, principalmente producido por la lisis de eritrocitos.

Debido a la adición de DHA a la sangre completa, las diferentes poblaciones de células pueden distinguirse incluso en el día 6 de almacenamiento independientemente de la concentración de DHA. Aunque los resultados del análisis de citometría de flujo (Fig. 5) no muestran diferencias en la integridad de las células entre las diferentes concentraciones de DHA

**Resultados de la electroforesis en gel en chip**

Los resultados presentados en la Fig. 6a también muestran una estabilización de las muestras de sangre mediante la adición de las diferentes concentraciones de DHA, debido a que se previene eficazmente la liberación de ADN genómico y la degradación del ADN.

**Resultados de la cuantificación del ADN**

La Fig. 6b muestra el efecto de diferentes concentraciones de DHA sobre el aumento de ADN (ensayo de dúplex de ADN 18S) en el plazo de 6 días desde el almacenamiento a TA. Como se muestra en la Fig. 6b, DHA 0,5 M en la sangre completa previene lo más eficazmente la liberación de ADN genómico. Además, la relación de números de copias de amplicones cortos con respecto a largos permanece constante durante hasta 3 días y solo disminuye ligeramente hasta el día 6. Estos resultados demuestran el sorprendente efecto del agente hipertónico DHA sobre la estabilización de sangre completa.

**Ejemplo 5: Combinación de un inhibidor de la apoptosis, un compuesto osmóticamente activo y un anticoagulante**

Un aumento de EDTA en los tubos de extracción de sangre inhibe la micro- y macrocoagulación como se conoce para los tubos PAXgene® Blood DNA. Por tanto, mayores concentraciones de EDTA pueden soportar la estabilización de glóbulos sanguíneos y ácidos nucleicos extracelulares en plasma. Además, los experimentos presentados anteriormente muestran un efecto inhibitorio del inhibidor de las caspasas, en particular Q-VD-OPh, y el compuesto osmóticamente activo DHA sobre el daño de glóbulos sanguíneos, y en particular muestran que un aumento de ADN genómico, en particular ADN genómico fragmentado, en la población de ácidos nucleicos extracelulares se reduce eficazmente. Sorprendentemente, los inhibidores de las caspasas probados también previnieron/inhibieron la fuga de ADN genómico en la fracción libre de células (plasma). Por tanto, la combinación de estos reactivos produce una estabilización mejorada de ácidos nucleicos extracelulares, en particular ADN extracelular, en sangre completa que dura al menos durante 6 días, y además, produce una estabilización eficaz de glóbulos sanguíneos, previniendo así la liberación de ADN genómico, que de otro modo produciría una dilución del nivel de ácidos nucleicos extracelulares natural en plasma.

En este ejemplo se disolvió DHA en 2 ml 3 x MOPS (DHA 3 M en 2 ml 3 x MOPS), se añadieron 50 mg de K<sub>2</sub>EDTA y 2,4 µl de Q-VD-OPh 5 nM y a continuación se transfirieron a 10 ml de sangre completa, que se recogió en tubos K2E. Las muestras de plasma se centrifugaron durante 10 min a 16.000 x g, 4 °C y a continuación se purificaron usando el kit QIAamp® Circulating NA (Qiagen) (los detalles se describen anteriormente en la Sección I).

**Resultados del análisis de FACS**

La Fig. 7a muestra la integridad de los glóbulos sanguíneos medida por citometría de flujo. Las representaciones de puntos visualizan tres poblaciones de células diferentes: granulocitos (1), monocitos (2) y linfocitos (3). La nube en el campo izquierdo inferior de la representación representa el residuo, principalmente producido por la lisis de los eritrocitos restantes.

La adición del inhibidor de las caspasas, el agente hipertónico y el agente complejante a la sangre completa produjo un patrón distinguible de poblaciones de glóbulos sanguíneos después de 6 días de almacenamiento. Así, las células contenidas en la muestra de sangre se estabilizaron eficazmente.

**Resultados de la cuantificación del ADN**

La Fig. 7b muestra el efecto de la combinación de EDTA, DHA y el inhibidor de la caspasa Q-VD-OPH sobre el aumento de ADN (ensayo de dúplex de ADN 18S) en el plazo de 6 días desde el almacenamiento a TA. Los resultados indican que la combinación de EDTA, DHA y Q-VD-OPH conduce a una estabilización sorprendentemente fuerte del ADN extracelular en plasma (el nivel de ADN<sub>r</sub> 18S medido sigue constante hasta el día 6) y a una fuerte prevención de la liberación de ADN genómico de glóbulos sanguíneos (la relación de números de copias de amplicones cortos con respecto a largos sigue constante) hasta el día 3 de almacenamiento. Solo un ligero aumento del ADN genómico en plasma llega a ser visible entre el día 3 y el día 6 de almacenamiento.

Así, la combinación probada de agentes estabilizantes es particularmente eficaz en estabilizar muestras de sangre completa.

Ejemplo 6: Efecto de un inhibidor de la apoptosis, un compuesto osmóticamente activo y un agente de prevención sobre el ARN circulante libre en sangre completa

Como una combinación de K<sub>2</sub>EDTA, Q-VD-OPH y DHA mostró efectos estabilizantes sorprendentes sobre el ADN circulante libre y la integridad de glóbulos sanguíneos en sangre completa, también se analizaron las capacidades estabilizantes de estos agentes sobre el ARN circulante libre. Para preservar un nivel constante de ARN circulante libre en plasma (como está presente cuando se recoge la sangre), el (los) reactivo(s) estabilizante(s) no solo deben proteger los ARN de la degradación y prevenir la liberación de ARN de glóbulos sanguíneos descompuestos, sino que también deben inhibir las vías metabólicas, respectivamente tener el efecto de que cambios en la vía metabólica no afectan el nivel en plasma de ARN extracelular, respectivamente deben reducir los efectos respectivos. Por tanto, se repitió el experimento 5 y se midió el nivel de ARNm por RT-PCR en tiempo real.

La Fig. 8 muestra el efecto de la combinación de EDTA, DHA y el inhibidor de las caspasas probado sobre el nivel de transcrito en plasma en el plazo de 6 días desde el almacenamiento. Con el fin de medir variaciones en los niveles de ARN, los ARNm diana se refirieron a la diana de referencia (ARN<sub>r</sub> 18S) calculando un  $\Delta\text{Ct}$  entre p53, IL8 o c-fos y el patrón interno (ARN<sub>r</sub> 18S). El restar  $\Delta\text{Ct}$  de muestras del día 3 o 6 de  $\Delta\text{Ct}$  de muestras del día 0 define  $\Delta\Delta\text{Ct}$  que visualiza una disminución relativa (valores -) o aumento (valores +) de niveles de transcrito de ARNm. IL8 y c-fos son genes cuya transcripción se induce después de la extracción de sangre. Por tanto, los niveles de transcritos de estas dianas aumentarían espectacularmente cuando las células liberaran sus contenidos; la adición de la solución estabilizante descrita en el presente documento (combinación de EDTA elevado, dihidroxiacetona, inhibidor de la caspasa Q-VD-OPh) previene fuertemente la liberación de ácido nucleico de glóbulos sanguíneos hasta el día 3 de almacenamiento. Pero los datos en el diagrama anterior no muestran -sorprendentemente- un aumento significativo de ARNm de c-fos e IL8 hasta el día 6 de almacenamiento. Así, aparentemente la estabilización previene la degradación de ARN (p53) y la liberación de ARNm (IL8/c-fos)

La transcripción de p53 se reprime durante el metabolismo continuado después de la extracción de sangre y, por tanto, una degradación o regulación por disminución de ARNm de p53 produciría una disminución de (-)  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . Sin embargo, los resultados muestran que la solución de estabilización de QGN probada previene que el nivel de ARNm de p53 se degrade durante el almacenamiento de la sangre completa durante hasta 6 días.

Este experimento demostró que la adición de una combinación de EDTA elevado, dihidroxiacetona, inhibidor de la caspasa Q-VD-OPh a sangre completa recién extraída actúa preservando la población de ARNm en plasma circulante que estaba presente en el momento de la extracción de sangre, reduciendo los cambios específicos de ARNm en la concentración de ARNm. Esto es de particular importancia para el análisis de ARNm circulante en plasma, por ejemplo, para la identificación y caracterización de posibles especies de ARNm específico de tumor. Tales estudios requieren que la población de ARNm en plasma permanezca sustancialmente invariable entre la extracción de sangre y la extracción y el análisis del ácido nucleico.

**Ejemplo 7: Estabilización mediante la adición de dimetilacetamida (DMAA)**

Se probaron dos concentraciones diferentes de DMAA junto con K<sub>2</sub>EDTA y en comparación con EDTA solo (K<sub>2</sub>EDTA; 18 mg de K<sub>2</sub>EDTA).

Se añadió DMAA a duplicados de muestras de sangre completa (0,75 % y 1,5 % de concentración final en 10 ml de sangre; la sangre se recogió en tubos Vacutainer K2E; BD).

5 Las muestras de sangre se incubaron durante hasta 6 días a temperatura ambiente. En el día 0, 3 y 6, las muestras de sangre completa se centrifugaron a 1912 x g durante 15 min a temperatura ambiente, seguido de una centrifugación de las muestras de plasma a 16.000 x g durante 10 min a 4 °C. Se usó 1 ml de la entrada de muestra para el aislamiento de ADN siguiendo el protocolo descrito en la sección de Materiales y métodos. El ADN se eluyó en 80 µl de tampón EB y se cuantificó con el ensayo de RT-PCR descrito en I, 4.2.

10 **Resultados de la cuantificación del ADN**

15 La Figura 11 muestra los efectos de las concentraciones probadas de DMAA sobre el aumento de ADN genómico en el plasma. La adición de DMAA reduce significativamente la liberación de ADN genómico en plasma. Cuanto más DMAA se añade a la sangre completa, menos ADN se libera. Solo se observó un aumento menor de ADN libre de células en el plazo de 6 días desde el almacenamiento si se añadió 1,5 % de DMAA a la muestra de sangre completa. Además, como la adición de 1,5 % de DMAA estabiliza los niveles de ADN libre de células en muestras de sangre completa más eficazmente que el 0,75 % y la relación de copias de ADN 18S medidas cortas con respecto a largas disminuye del día 0 al día 6, concentraciones de DMAA mayores del 1,5 % pueden producir efectos de estabilización más eficaces.

20 En resumen, la adición de DMAA reduce la liberación de ADN genómico en plasma sanguíneo. Así, el añadir DMAA a una muestra de sangre es eficaz en estabilizar la muestra incluso a temperatura ambiente.

25 **Ejemplo 8:** Influencia de alcoholes de azúcar sobre la preservación del estado de ADNclic en sangre completa.

Se recogieron en primer lugar muestras de sangre completa de 10 ml de dos donantes en BD Vacutainer K2E-EDTA (EDTA 4,45 mM = Referencia). Después, se añadieron 2 ml de las siguientes soluciones de estabilización (las concentraciones dadas representan la concentración final en solución de sangre estabilizada):

Solución de estabilización	Inositol (M)	Maltitol (M)	Manitol (M)	Sorbitol (M)	DHA (M)	Ninguna (K2E)
1	0,1					
2	0,05					
3	0,01					
4		0,1				
5		0,05				
6		0,01				
7			0,1			
8			0,05			
9			0,01			
10				0,1		
11				0,05		
12				0,01		
13					0,5	
14						x

30 Las muestras respectivamente estabilizadas se incubaron a temperatura ambiente durante hasta seis días. En el día 0, día 3 y día 6 se procesaron duplicados del siguiente modo. Las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente con el fin de recoger el plasma. El plasma recogido se centrifugó a 16.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se recogió la fracción plasmática depurada y los ácidos nucleicos extracelulares se aislaron usando el kit de ácidos nucleicos circulantes QIAamp (1 ml de material de entrada, volumen de elución 60 µl). Los resultados se muestran en cambio relativo en comparación con el momento de tiempo de prueba 0 días (copias del día X / copias del día 0) en la Fig. 10. Los valores que son próximos a 1 implican niveles preservados de ADNclic. Cuanto mayor sea el valor, menos estabilización se logra. A partir de los alcoholes de azúcar probados se lograron muy buenos resultados con DHA (0,5 M). Aquí se observó el aumento más bajo de niveles de ADNclic en la fracción plasmática. Otras alternativas adecuadas son inositol en concentraciones de, por ejemplo, 0,05 M y maltitol en concentraciones ≤ 0,01 M. Además, también se observaron efectos de estabilización durante 3 días con manitol.

40 **Ejemplo 9:** Influencia de DMAA, DHA y glicina sobre el nivel de ADNclic

45 En primer lugar se recogieron muestras de sangre completa de 10 ml de tres donantes en BD Vacutainer K2E-EDTA (EDTA 4,45 mM = referencia). Después se añadieron 2 ml de las siguientes soluciones (las concentraciones dadas representan la concentración final en solución de sangre estabilizada):

Solución de estabilización	DHA (M)	DMAA (%)	EDTA	OPH (inhibidor de las caspasas)	Ninguna (K2E)
1	0,5				
2	0,1				
3	0,05				
4 (mezcla de QGN)	0,5		14 mM	1 µM	
5		1 %	14 mM	1 µM	
6		3 %	14 mM	1 µM	
7		5 %	14 mM	1 µM	
8					X

Las muestras se procesaron como se describe en el Ejemplo 8. Los resultados, además de las condiciones de prueba, se muestran en la Figura 11. Como puede apreciarse, la DHA solo estabiliza el nivel de ADNclc durante hasta tres días (véase el donante 1). Se obtuvieron niveles de ADNclc particularmente estables si se usa la mezcla de QGN. Podrían obtenerse resultados comparables a la mezcla de QGN cuando se añade DMAA a la muestra en combinación con, por ejemplo, aumentar las concentraciones de EDTA y añadir un inhibidor de las caspasas.

**Ejemplo 10:** Influencia del alcohol de azúcar en combinación con inhibidor de las caspasas y concentraciones de EDTA elevadas al nivel de ADNclc

En primer lugar se recogieron muestras de sangre completa de 10 ml de dos donantes en BD Vacutainer K2E-EDTA (EDTA 4,45 mM = referencia). Entonces, se añadieron 2 ml de las siguientes soluciones (las concentraciones dadas representan la concentración final en solución de sangre estabilizada):

- 1: DHA 0,5 M, OPH 1 µM, EDTA 14 mM (mezcla de QGN);
- 2: Inositol 0,5 M en mezcla de QGN (sin DHA);
- 3: Maltitol 0,01 M en mezcla de QGN (sin DHA).

Las muestras se procesaron entonces como se describe en el Ejemplo 8. Los resultados se muestran en la Figura 12. Los mejores resultados se obtuvieron para la mezcla de QGN. Las combinaciones de alcohol de azúcar con la mezcla de QGN también mostraron efectos estabilizantes cuando se compara con las muestras estabilizadas con EDTA.

**Ejemplo 11:** Influencia de combinaciones de concentraciones de DMAA y OPH (inhibidor de las caspasas) sobre los niveles de ADNclc.

En primer lugar se recogieron muestras de sangre completa de 10 ml en BD Vacutainer K2E-EDTA (EDTA 4,45 mM = referencia). Entonces, se añadieron 2 ml de las siguientes soluciones (las concentraciones dadas representan concentración final en solución de sangre estabilizada). Cada condición se probó con seis tubos de diferentes donantes.

- 1: Referencia de EDTA (BD Vacutainer K2E);
- 2: Mezcla de QGN;
- 3: 50 mg de EDTA, OPH 1 µM;
- 4: 50 mg de EDTA, OPH 2 µM;
- 5: 50 mg de EDTA, OPH 1 µM, 5 % de DMAA;
- 6: 50 mg de EDTA, OPH 1 µM, 10 % de DMAA;
- 7: 50 mg de EDTA, OPH 2 µM, 5 % de DMAA;
- 8: 50 mg de EDTA; OPH 2 µM y 10 % de DMAA.

La incubación de muestras, aislamiento de plasma y aislamiento de ácidos nucleicos de la fracción plasmática depurada se realizaron como se describen en el Ejemplo 8. Sin embargo, después de la primera etapa de centrifugación a 3.000 rpm, las muestras de plasma de condiciones de estabilización idénticas se reunieron antes de la segunda etapa de centrifugación para llevar a cabo la depuración del plasma (16.000 x g). Los resultados se muestran en la Figura 13. Como puede apreciarse, diferentes concentraciones de DMAA en combinación con diferentes concentraciones de OPH muestran resultados comparables a la mezcla de QGN. La Figura 14 muestra la influencia de las combinaciones de concentraciones de DMAA y OPH sobre los niveles de ADNclc (diferente escala debido a la exclusión de datos de referencia).

**Ejemplo 12:** Influencia de la combinación de mezcla de QGN con alcoholes de azúcar sobre el nivel de ADNclc

Se recogieron muestras de sangre completa de 10 ml en BD Vacutainer K2E-EDTA (EDTA 4,45 mM = referencia). Después, se añadieron 2 ml de las siguientes soluciones (las concentraciones dadas representan concentración final en solución de sangre estabilizada). Cada condición se probó con seis tubos y así seis donantes diferentes.

- 1: Referencia de EDTA (BD Vacutainer K2E);
- 2: Mezcla de QGN (0,01 M DHA, EDTA 14 mM, OPH 1 µM);
- 3: DHA 0,01 M;
- 4: 5 % de DMAA, EDTA 14 mM, OPH 1 µM;
- 5: DHA 0,01 M, 3 % de DMAA, OPH 1 µM, EDTA 14 mM;
- 6: OPH 1 µM, EDTA 14 mM, DHA 0,01 M, maltitol 0,01 M;
- 7: OPH 1 µM, EDTA 14 mM, DHA 0,01 M, inositol 0,05 M;
- 8: OPH 1 µM, EDTA 14 mM, DHA 0,01 M, inositol 0,05 M, maltitol 0,01 M.

Las muestras se procesaron como se describe en el Ejemplo 11. Sin embargo, las muestras no se almacenaron a temperatura ambiente, sino en su lugar a 37 °C. Los resultados se muestran en la Figura 15. Como puede apreciarse, se alcanzaron niveles estables de ADNcl, especialmente cuando se añadió 5 % de DMAA en combinación con EDTA 14 mM y OPH 1 µM. Por tanto, inesperadamente, podría lograrse una estabilización muy buena de ADNcl en sangre completa, aunque a temperaturas elevadas (37 °C).

#### **Ejemplo 13:** Incubación a 37 °C - análisis de muestras de donantes individuales

Se recogieron muestras de sangre completa de seis donantes diferentes en BD Vacutainers K2E, y entonces se añadieron 2 ml de las siguientes soluciones de estabilización por 10 ml de sangre completa (las concentraciones dadas representan la concentración final en solución de sangre estabilizada):

- 1: OPH 2 µM, EDTA 14 mM, 5 % de DMAA;
- 2: OPH 1 µM, EDTA 14 mM, 3 % de DMAA;
- 3: OPH 1 µM, EDTA 14 mM, DHA 0,01 M, 3 % de DMAA.

Las muestras se incubaron a 37 °C durante hasta seis días. De otro modo, se siguió el mismo procedimiento que en el Ejemplo 8. Los resultados se muestran en la Figura 16 y 17. Como puede apreciarse, para los seis donantes, se preservó el nivel de ADNcl cuando se añadieron diferentes concentraciones de DMAA en combinación con OPH y EDTA a las muestras de sangre. Por tanto, puede lograrse una estabilización eficaz con el método descrito en el presente documento.

#### **Ejemplo 14:** Límite de detección (LoD)

Los ácidos nucleicos extracelulares están frecuentemente comprendidos en cantidades muy pequeñas en la muestra. Por tanto, es importante tener un procedimiento de estabilización que no solo preserve eficazmente los ácidos nucleicos extracelulares dentro de la muestra estabilizada, sino que adicionalmente permita aislar posteriormente los ácidos nucleicos extracelulares con alto rendimiento de la muestra estabilizada. El Ejemplo 14 demuestra que el método de estabilización descrito en el presente documento es superior a los métodos de estabilización del estado de la técnica en los que los ácidos nucleicos extracelulares pueden aislarse con mayor rendimiento de las muestras estabilizadas. Esto reduce ventajosamente el límite de detección y así permite determinar de forma fiable también ácidos nucleicos diana raros dentro de la población de ácidos nucleicos extracelulares.

Se compararon las siguientes soluciones de estabilización/tubos:

1. RNA BCT libre de células (Streck Inc, cat. N.º: 218976 - comprende un liberador de formaldehído como estabilizador)
2. BD Vacutainer K2E (BD, Cat. N.º: 367525 - comprende EDTA) = referencia
3. Estabilización de QGN (5 % de DMAA, EDTA 14 mM, OPH 2 µM (inhibidor de las caspasas))

Se recogieron muestras de sangre completa en tubos RNA BCT libres de células y BD Vacutainer K2E. A la mitad de la sangre recogida en tubos BD se añadió la solución de estabilización de QGN. Así, la muestra estabilizada según la invención comprende una cantidad adicional de EDTA que es contribuida por la estabilización de BD Vacutainer. Las muestras se centrifugaron a 3.000 x rpm durante 10 minutos, y el plasma obtenido se tomó en alícuotas a duplicados de 1,5 ml. Después, se añadieron las siguientes cantidades de control de adición conocida de ADN (1.000 pb) por muestra: 1.000 copias, 5000 copias, 100 copias, 50 copias y 10 copias.

Se prepararon 8 duplicados de 500 a 10 copias / muestra, 4 duplicados de 1.000 copias / muestra y 5 copias / muestra. Las muestras se incubaron durante 3 días a temperatura ambiente. La preparación de muestras se hizo sobre el sistema automatizado QIASymphony SP, usando la aplicación QIASymphony virus / bacteria Cell-free 1000 que permite aislar ácidos nucleicos extracelulares de muestras de plasma. Los ácidos nucleicos se eluyeron en 60 µl; la PCR posterior se realizó por triplicado.

Los resultados se muestran en la Figura 18. Como puede apreciarse, se obtuvo 100 % de éxito  $\geq$  1.000 copias por muestra si se usa cualquiera de los tubos BD EDTA o la solución de estabilización según la presente invención. Esto muestra que el aislamiento de ácidos nucleicos no se altera si se usa la solución de estabilización según la presente

invención. A diferencia, la estabilización que se basa en el uso de un liberador de formaldehído (Streck) muestra una fuerte inhibición del aislamiento de ácidos nucleicos. Como puede apreciarse, podrían aislarse significativamente menos ácidos nucleicos de las muestras respectivas, incluso con aquellas muestras en las que se añadieron 500 o incluso 1.000 copias. Además, la Figura 18 muestra que la mejor sensibilidad se obtuvo con una muestra estabilizada según la presente invención. Incluso para aquellas realizaciones en las que solo se añadieron 10 copias por muestra, todavía se obtuvo el 13 % de éxitos de PCR positivos. Así, el método descrito en el presente documento no solo estabiliza eficazmente las muestras tales como muestras de sangre, sino que además permite la posterior recuperación de incluso ácidos nucleicos extracelulares muy bajos-abundantes. Esto es una ventaja importante debido a que hace de este método particularmente adecuado para las aplicaciones de diagnóstico y, por ejemplo, la detección de ácidos nucleicos extracelulares diana raros tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos extracelulares derivados de tumor o ácidos nucleicos fetales. En particular, en los números de copias más bajos, la solución de estabilización que se basa en el uso de liberadores de formaldehído tuvo un rendimiento muy bajo y mostró el mayor límite de detección.

Esto también se confirma por la siguiente tabla:

Fragmento de ADN	Tubo/estabilizante	Dosis por centil 95 [copias]	intervalo de confianza del 95 %	
			mín [copias]	máx [copias]
1000 pb	BD K2E	386	230	995
	Streck ARN	9902	2909	164606
	QGN	599	319	1749

Como puede apreciarse de dicha tabla, para el fragmento de 1.000 pb, los resultados logrados con muestra de EDTA y la solución de estabilización de la presente invención son comparables. Así, la estabilización según la invención no altera el posterior aislamiento de ácidos nucleicos. La estabilización usando un liberador de formaldehído mostró el mayor límite de detección y así demuestra que el posterior aislamiento del ácido nucleico estuvo fuertemente alterado. Por tanto, la estabilización según la presente invención es adecuada para la detección sensible de dianas de ADNlc raras, que no se logra usando los métodos del estado de la técnica.

Esto también se confirma por los resultados mostrados en las Figuras 19 y 20. Como puede apreciarse, se obtienen rendimientos de ADNlc comparables para las muestras estabilizadas con EDTA y muestras estabilizadas usando el método descrito en el presente documento (medido por qPCR de ADNr 18S). Sin embargo, se obtuvieron reducidos rendimientos de ADNlc para la estabilización, que implica el uso de liberadores de formaldehído (tubos Streck). El rendimiento de muestras estabilizadas con formaldehído se redujo aproximadamente el 50 % en comparación con las muestras estabilizadas con EDTA. A diferencia, el reactivo de estabilización según la presente invención no tiene efecto adverso sobre el rendimiento de ADNlc, si se usan métodos de aislamiento de ácidos nucleicos convencionales. Esto es una ventaja importante, ya que permite integrar el método de estabilización descrito en el presente documento en procedimientos de aislamiento y diagramas de flujo de ácidos nucleicos existentes.

**Ejemplo 15:** Adición conocida de  $10^4$  UI/ml de VIH, VHC a muestras de sangre completa de 3 donantes

Se recogieron muestras de sangre completa en tubos BD Vacutainer 2KE. Después se añadieron 2 ml de la siguiente solución de estabilización (las concentraciones dadas representan la concentración final en solución de sangre estabilizada). Entonces, se añadieron VIH y VHC a las muestras de sangre completa a  $10^4$  UI/ml.

- 1: 5 % de DMAA, 50 mg de EDTA, OPH 1  $\mu$ M, inositol 0,05 M;
- 2: 5 % de DMAA, 50 mg de EDTA, OPH 1  $\mu$ M, maltitol 0,01 M;
- 3: 5 % de DMAA, 50 mg de EDTA, OPH 1  $\mu$ M, inositol 0,05 M; maltitol 0,01 M;
- 4: 2 % de inositol, 4 % de sorbitol.

Muestras estabilizadas en BD Vacutainer K2E sirvieron de nuevo de referencia.

Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante hasta seis días a 37 °C. En el día 0 y día 3, los duplicados se procesaron del siguiente modo: las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm, durante 15 minutos a temperatura ambiente para recoger el plasma. El plasma obtenido se centrifugó entonces de nuevo a 16.000 x g durante 10 minutos, a 4 °C. Los ácidos nucleicos extracelulares obtenidos del sobrenadante de plasma purificado se purificaron usando el protocolo QIAAsymphony virus / bacteria Cell-free 1000. Se usó 1 ml de plasma como material de entrada, se usaron 60  $\mu$ l de volumen para la elución. Los resultados se muestran en la Figura 21. Como puede apreciarse, el combinar DMAA, EDTA y OPH con alcoholes de azúcar permite estabilizar los niveles de ácidos nucleicos virales durante hasta tres días a 37 °C. Por tanto, el método descrito en el presente documento es particularmente adecuado para aplicaciones de diagnóstico y también es adecuado para estabilizar las muestras en entornos en los que posiblemente no están disponibles instalaciones de refrigeración. Se reducen  $\Delta$ Ct entre el día 0 y el día 3 ( $\Delta$ Ct de aproximadamente 2,5 a  $\Delta$ Ct de aproximadamente 1) en comparación con la referencia de sangre con EDTA. Además, se observaron efectos de estabilización con una combinación de sorbitol en combinación con inositol ( $\Delta$ Ct de aproximadamente 1 a 1,4).



La Figura 22 muestra la disminución de VHC en sangre completa que se incubó a 37 °C. De nuevo, se muestra que cuando se combina DMAA, EDTA y OPH con alcoholes de azúcar, el nivel de ácidos nucleicos del VHC se estabiliza, indicado por una disminución ralentizada en los niveles de ARN viral, durante tres días a 37 °C. Se reducen  $\Delta C_t$  entre el día 0 y el día 3 ( $\Delta C_t$  de aproximadamente 1) en comparación con la referencia de sangre de EDTA ( $\Delta C_t$  de aproximadamente 2 - 3). Además, se lograron buenos efectos estabilizantes para sorbitol en combinación con inositol.

**Ejemplo 16:** Estabilización con N,N-dimetilpropanamida e inhibidor de las caspasas

Se recogió sangre de dos donantes diferentes en tubos de 10 ml de K2 EDTA (BD). Se mezclaron 4,5 ml de la sangre respectivamente recogida con 0,9 ml de solución de estabilización que contenía (por ml de solución de estabilización): 34,2 mg de K2 EDTA, 1,2 ml de solución de quinolina-Val-Asp-CH2-OPH (inhibidor de las caspasas) (1 mg disuelto en 388  $\mu$ l de DMSO) y 0,15 g o 0,3 g, o 0,45 g de N,N-dimetilpropanamida o 0,3 ml de DMAA, respectivamente. Así, se obtuvo la siguiente concentración final en la sangre / mezcla de estabilización que es del siguiente modo:

5,7 mg de K2 EDTA, quinolina-Val-Asp-CH2-OPH 1  $\mu$ M (inhibidor de las caspasas) y 2,5, 5 o 7,5 % (peso/volumen) de N,N-dimetilpropanamida o 5 % (v/v) de DMAA, respectivamente.

Todas las muestras de sangre estabilizadas se montaron por triplicado por condición y momento de tiempo de prueba. En el momento de tiempo 0 (referencia), inmediatamente después de mezclar la solución de estabilización y sangre, se generó plasma y se extrajo el ADNcl. La muestra de sangre residual se almacenó durante tres días y seis días a temperatura ambiente. Como control, la muestra de sangre estabilizada con EDTA también se almacenó durante 3 y 6 días. El plasma se generó de las muestras de sangre estabilizadas y no estabilizadas (EDTA) invirtiendo los tubos que contenían la sangre durante cuatro veces. Entonces, los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 3.000 rpm/1912 x g. Se transfirieron 2,5 ml de la fracción plasmática a un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó durante 10 minutos a 16.000 x g. Se usaron 2 ml del plasma respectivamente purificado para aislar el ácido nucleico extracelular usando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp.

Los resultados se muestran en las Figuras 23 y 24. Se muestra el aumento de ADN con respecto al momento de tiempo 0 con 2,5 %, 5 % y 7,5 % de N,N-dimetilpropanamida o 5 % de DMAA (cambio en veces) usando diferentes longitudes de amplicón del gen ARNr 18S. Las barras indican la media de las muestras triplicadas por condición y el momento de tiempo de prueba. Todas las soluciones según la presente invenciones muestran cantidades significativamente menores de ADN liberado después del almacenamiento durante 3 y 6 días a temperatura ambiente en comparación con la sangre en EDTA no estabilizada.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> PreAnalytix GmbH

<120> Estabilización y aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares

<130> 53 888 K

<150> EP 11 182 818.2  
<151> 26-09-2011

<150> US 61/539.274  
<151> 26-09-2011

<160> 72

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Desconocido

<220>  
<223> Péptido inhibidor de Bax, V5

<400> 1

ES 2 574 956 T3

Val Pro Met Leu Lys  
1 5

5 <210> 2  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Desconocido

10 <220>  
<223> Péptido inhibidor de STAT3

15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

20 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> FOSFORILACIÓN

<400> 2

Pro Tyr Leu Lys Thr Lys  
1 5

25 <210> 3  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Inhibidor de la caspasa I del grupo III

35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

40 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

<400> 3

Ile Glu Pro Asp  
1

45 <210> 4  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 3, 7

55 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> BLOQUEADO

60 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> METILACIÓN

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> METILACIÓN

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> METILACIÓN

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO

20 <400> 4

**Asp Glu Val Asp  
 1**

25 <210> 5  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Inhibidor de la caspasa 8

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> BLOQUEADO

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> METILACIÓN

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> METILACIÓN

<400> 5

**Leu Glu Thr Asp  
 1**

55 <210> 6  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> Inhibidor de la caspasa 1, 4

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> BLOQUEADO

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> METILACIÓN

<400> 6

**Tyr Val Ala Asp**  
**1**

20 <210> 7  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Inhibidor de la caspasa 10

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> BLOQUEADO

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> METILACIÓN

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> METILACIÓN

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO

50 <400> 7

**Ala Glu Val Asp**  
**1**

55 <210> 8  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> Inhibidor de la caspasa 12

<220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)  
<223> BLOQUEADO

5 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> METILACIÓN

10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

15 <400> 8

**Ala Thr Ala Asp**  
**1**

20 <210> 9  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 4

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> BLOQUEADO

35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> METILACIÓN

40 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> METILACIÓN

45 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

<400> 9

**Leu Glu Val Asp**  
**1**

50 <210> 10  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

55 <220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 13, reversible

60 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO  
 <400> 10

**Leu Glu Glu Asp**  
**1**

10 <210> 11  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Inhibidor de la caspasa 13, irreversible

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> BLOQUEADO

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> METILACIÓN

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> METILACIÓN

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> METILACIÓN

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO  
 <400> 11

**Leu Glu Glu Asp**  
**1**

45 <210> 12  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> Inhibidor de apoptosis inducida por anti-APO-1 en células L929-APO-1.

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)

<223> BLOQUEADO

<400> 12

**Tyr Val Ala Asp**  
**1**

5

<210> 13  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Inhibidor I de la caspasa-1, permeable a las células

15

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

20

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)..(20)  
<223> BLOQUEADO

25

<400> 13

**Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro**  
**1 5 10 15**

**Tyr Val Ala Asp**  
**20**

30

<210> 14  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> Inhibidor II de la caspasa-1, permeable a las células

40

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

45

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

<400> 14

**Tyr Val Ala Asp**  
**1**

50

<210> 15  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

55

<220>

<223> Inhibidor IV de la caspasa-1, permeable a las células  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 5 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 10 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO  
 <400> 15  
 Tyr Val Ala Asp  
 15 1  
 <210> 16  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 20 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Inhibidor VI de la caspasa-1, permeable a las células  
 25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> BLOQUEADO  
 30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> METILACIÓN  
 40 <400> 16  
 Tyr Val Ala Asp  
 1  
 <210> 17  
 45 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 50 <223> Inhibidor I de la caspasa 2  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 55 <223> BLOQUEADO  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 60 <223> METILACIÓN  
 <220>



<221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> METILACIÓN

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> BLOQUEADO

10 <400> 17

**Val Asp Val Ala Asp**  
 1 5

15 <210> 18  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Inhibidor II de la caspasa 2

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 <223> BLOQUEADO

<400> 18

**Leu Asp Glu Ser Asp**  
 1 5

35 <210> 19  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Inhibidor I de la caspasa 3

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO

55 <400> 19

**Asp Glu Val Asp**  
 1

60 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> PRT

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> Inhibidor I de la caspasa 3, permeable a las células  
 5  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN  
 10  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> BLOQUEADO  
 15  
 <400> 20  
  
**Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro**  
**1 5 10 15**  
  
**Asp Glu Val Asp**  
**20**  
 20 <210> 21  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Inhibidor II de la caspasa 3  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> BLOQUEADO  
 30  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> METILACIÓN  
 35  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> METILACIÓN  
 40  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> METILACIÓN  
 45  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO  
 50  
  
 <400> 21  
  
  
**Asp Glu Val Asp**  
**1**  
 55  
  
 <210> 22  
 <211> 4

<212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Inhibidor III de la caspasa 3  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 10 <223> ACETILACIÓN  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 15 <223> BLOQUEADO  
  
 <400> 22

**Asp Glu Val Asp**  
**1**

20  
 <210> 23  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Inhibidor IV de la caspasa 3  
  
 <220>  
 30 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN  
  
 <220>  
 35 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO  
  
 <400> 23  
 40

**Asp Met Gln Asp**  
**1**

<210> 24  
 <211> 4  
 45 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 50 <223> Inhibidor V de la caspasa 3  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 55 <223> BLOQUEADO  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 60 <223> METILACIÓN  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (4)..(4)  
 <223> METILACIÓN

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO

10 <400> 24

**Asp Gln Met Asp**  
**1**

15 <210> 25  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Inhibidor I de la caspasa 4

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO

<400> 25

**Leu Glu Val Asp**  
**1**

35 <210> 26  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Inhibidor I de la caspasa 4, permeable a las células

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> BLOQUEADO

<400> 26

**Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro**  
**1 5 10 15**

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

**Leu Glu Val Asp**  
**20**

5  
<210> 27  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> Inhibidor I de la caspasa 5  
  
10  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> BLOQUEADO  
  
15  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> METILACIÓN  
  
20  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> METILACIÓN  
  
25  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO  
  
30  
<400> 27

**Trp Glu His Asp**  
**1**

35  
<210> 28  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> Inhibidor I de la caspasa 6  
  
40  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> BLOQUEADO  
  
45  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> METILACIÓN  
  
50  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> METILACIÓN  
  
55  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO  
  
60  
<400> 28

**Val Glu Ile Asp**  
**1**

5 <210> 29  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Inhibidor II de la caspasa 6, permeable a las células

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> BLOQUEADO

<400> 29

**Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro**  
**1 5 10 15**

**Val Glu Ile Asp**  
**20**

25 <210> 30  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Inhibidor I de la caspasa 8, permeable a las células

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> BLOQUEADO

<400> 30

**Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro**  
**1 5 10 15**

**Ile Glu Thr Asp**  
**20**

45 <210> 31  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50 <220>

<223> Inhibidor II de la caspasa 8

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> BLOQUEADO

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> METILACIÓN

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> METILACIÓN

<400> 31

25 **Ile Glu Thr Asp**  
**1**

30 <210> 32  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inhibidor I de la caspasa 9

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> BLOQUEADO

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> METILACIÓN

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> METILACIÓN

55 <400> 32

**Leu Glu His Asp**  
**1**

60 <210> 33  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Inhibidor II de la caspasa 9, permeable a las células

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> BLOQUEADO

15 <400> 33

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro  
 1 5 10 15

Leu Glu His Asp  
 20

20 <210> 34  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Inhibidor III de la caspasa 9

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO

<400> 34

Leu Glu His Asp  
 1

40 <210> 35  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Inhibidor II de la Pan-caspasa, permeable a las células

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)..(19)  
 <223> BLOQUEADO



ES 2 574 956 T3

<400> 35

Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro  
1 5 10 15

Val Ala Asp

5

<210> 36  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Inhibidor VIII de la caspasa

15

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

20

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> BLOQUEADO

25

<400> 36

Val Asp Val Ala Asp  
1 5

30

<210> 37  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

35

<220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 1

40

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

45

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> METILACIÓN

50

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

<400> 37

Tyr Val Ala Asp  
1

55

<210> 38  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 1

5 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

15 <400> 38

**Trp Glu His Asp**  
**1**

20 <210> 39  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 1

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

<400> 39

**Tyr Val Ala Asp**  
**1**

40 <210> 40  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 1

50 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

55 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

60 <400> 40

**Tyr Val Ala Asp**  
**1**

5 <210> 41  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 1  
  
10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN  
  
15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO  
  
20 <400> 41

**Tyr Val Ala Asp  
1**

25 <210> 42  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
<220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 1  
  
30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN  
  
35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO  
  
40 <400> 42

**Tyr Val Lys Asp  
1**

45 <210> 43  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial  
  
50 <220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 1  
  
55 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> BLOQUEADO  
  
60 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

	<400> 43			
			<b>Tyr Val Ala Asp</b>	
			<b>1</b>	
5	<210> 44			
	<211> 5			
	<212> PRT			
	<213> Artificial			
10	<220>			
	<223> Inhibidor de la caspasa 2			
15	<220>			
	<221> MOD_RES			
	<222> (1)..(1)			
	<223> ACETILACIÓN			
20	<220>			
	<221> MOD_RES			
	<222> (5)..(5)			
	<223> BLOQUEADO			
25	<400> 44			
			<b>Val Asp Val Ala Asp</b>	
			<b>1</b>	<b>5</b>
30	<210> 45			
	<211> 5			
	<212> PRT			
	<213> Artificial			
35	<220>			
	<223> Inhibidor de la caspasa 2			
40	<220>			
	<221> MOD_RES			
	<222> (1)..(1)			
	<223> BLOQUEADO			
45	<220>			
	<221> MOD_RES			
	<222> (2)..(2)			
	<223> METILACIÓN			
50	<220>			
	<221> MOD_RES			
	<222> (5)..(5)			
	<223> BLOQUEADO			
55	<220>			
	<221> MOD_RES			
	<222> (5)..(5)			
	<223> METILACIÓN			
60	<400> 45			
			<b>Val Asp Val Ala Asp</b>	
			<b>1</b>	<b>5</b>
60	<210> 46			

<211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> Inhibidor del precursor de la caspasa 3  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 10 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 15 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO  
 <400> 46  
 Glu Ser Met Asp  
 20 1  
 <210> 47  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Inhibidor del precursor de la caspasa 3  
 30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO  
 40 <400> 47  
 Ile Glu Thr Asp  
 45 1  
 <210> 48  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 50 <223> Inhibidor de la caspasa 3  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 55 <223> ACETILACIÓN  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 60 <223> BLOQUEADO  
 <400> 48

**Asp Glu Val Asp**  
**1**

5 <210> 49  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 3

15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

20 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

<400> 49

**Asp Met Gln Asp**  
**1**

25 <210> 50  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Inhibidor II de la caspasa 3/7

35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> BLOQUEADO

40 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> METILACIÓN

45 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> METILACIÓN

50 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

55 <400> 50

**Asp Gln Met Asp**  
**1**

60 <210> 51  
<211> 4  
<212> PRT

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> Inhibidor II de la caspasa 3/7  
 5  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> BLOQUEADO  
 10  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO  
 15  
 <400> 51

**Asp Glu Val Asp**  
**1**

20 <210> 52  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Inhibidor II de la caspasa 3/7  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> BLOQUEADO  
 30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> METILACIÓN  
 35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> METILACIÓN  
 40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> METILACIÓN  
 45  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO  
 50  
 <400> 52

**Asp Glu Val Asp**  
**1**

55 <210> 53  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Inhibidor de la caspasa 4

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO

<400> 53

**Leu Glu Val Asp**  
**1**

15 <210> 54  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Inhibidor de la caspasa 4

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> BLOQUEADO

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO

35 <400> 54

**Tyr Val Ala Asp**  
**1**

40 <210> 55  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> Inhibidor de la caspasa 6

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETILACIÓN

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 <223> BLOQUEADO

<400> 55

**Val Glu Ile Asp**  
**1**

60 <210> 56  
 <211> 4



<212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Inhibidor de la caspasa 6  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 10 <223> BLOQUEADO  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 15 <223> METILACIÓN  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 20 <223> METILACIÓN  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 25 <223> BLOQUEADO  
  
 <400> 56

**Val Glu Ile Asp  
1**

30  
 <210> 57  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Inhibidor de la caspasa 8  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 40 <223> ACETILACIÓN  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)..(4)  
 45 <223> BLOQUEADO  
  
 <400> 57  
 50

**Ile Glu Pro Asp  
1**

<210> 58  
 <211> 4  
 55 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Inhibidor de la caspasa 8  
 60  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)  
<223> BLOQUEADO

5 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

10 <400> 58

15 <210> 59  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 8

25 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> BLOQUEADO

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> METILACIÓN

35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> METILACIÓN

40 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

<400> 59

**Ala Glu Val Asp**  
**1**

45 <210> 60  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

50 <220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 8

55 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> BLOQUEADO

60 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> METILACIÓN

<220>

**Ile Glu Thr Asp**  
**1**

<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> METILACIÓN

5 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

10 <400> 60

**Leu Glu Thr Asp  
1**

15 <210> 61  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 9

25 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

<400> 61

**Leu Glu His Asp  
1**

35 <210> 62  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

40 <220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 9

45 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

50 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

55 <400> 62

**Leu Glu His Asp  
1**

60 <210> 63  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Inhibidor de la caspasa 10

5 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> BLOQUEADO

10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

15 <400> 63

**Ala Glu Val Asp**

**1**

20 <210> 64  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Inhibidor II de la granzima B

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

<400> 64

**Ile Glu Thr Asp**

**1**

40 <210> 65  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

45 <220>  
<223> Inhibidor IV de la granzima B

50 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> ACETILACIÓN

55 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (4)..(4)  
<223> BLOQUEADO

<400> 65

# ES 2 574 956 T3

## Ile Glu Pro Asp 1

5 <210> 66  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Cebador directo de ADN ribosómico humano

<400> 66  
gccgctagag gtgaaattct tg 22

15 <210> 67  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Cebador inverso de ADN ribosómico humano

<400> 67  
cattcttggc aaatgctttc g 21

25 <210> 68  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> sonda de ADN ribosómico humano

<400> 68  
35 accggcgcaa gacggaccag a 21

<210> 69  
<211> 22  
<212> ADN  
40 <213> Artificial

<220>  
<223> Cebador directo de ADN ribosómico humano

<400> 69  
45 gtcgctcgct cctctctac tt 22

<210> 70  
<211> 19  
50 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador inverso de ADN ribosómico humano

<400> 70  
55 ggctgctggc accagactt 19

<210> 71  
<211> 25  
60 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>

# ES 2 574 956 T3

<223> sonda de ADN ribosómico humano

<400> 71

ctaatacatg cgcacgggcg ctgac 25

5

<210> 72

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Cebador directo de ADN ribosómico humano

<400> 72

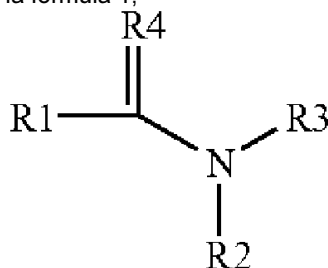
gaattgacgg aaggcac 18

15

## REIVINDICACIONES

1. Un recipiente adecuado para recoger una muestra que contiene células, preferentemente una muestra de sangre, plasma o suero, que comprende

- 5
- una composición estabilizante adecuada para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en la muestra que contiene células, en donde dicha composición estabilizante comprende un inhibidor de las caspasas, y
  - al menos un compuesto según la fórmula 1,



10 fórmula 1

en la que R1 es un residuo de hidrógeno o un residuo de alquilo, preferentemente un residuo de alquilo C1-C5, más preferido un residuo de metilo, R2 y R3 son residuos de hidrocarburo idénticos o diferentes con una longitud de la cadena de carbono de 1 - 20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un residuo de oxígeno, azufre o selenio.

2. El recipiente según la reivindicación 1, **en el que** la composición estabilizante comprende

- 20
- a) el al menos un inhibidor de las caspasas;
  - b) opcionalmente al menos un agente hipertónico adecuado para estabilizar las células comprendidas en la muestra; y
  - c) el al menos un compuesto según la fórmula 1.

3. El recipiente según las reivindicaciones 1 o 2, **en donde** el recipiente se evacúa.

25 4. El recipiente según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, **en el que** la composición estabilizante efectúa que se reduzca la liberación de ADN genómico de las células contenidas en la muestra en la porción libre de células de la muestra y/o se reduzca la degradación de ácidos nucleicos presentes en la muestra debido a la estabilización.

30 5. El recipiente según una o más de las reivindicaciones 1 a 4, **en el que**

a) el inhibidor de las caspasas tiene una o más de las siguientes características:

- 35
- i) es un inhibidor de las pan-caspasas; y/o
  - ii) está seleccionado del grupo que consiste en Q-VD-OPh y Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK

y/o

b) el agente hipertónico tiene una o más, preferentemente dos o más, de las siguientes características:

- 40
- i) no está cargado;
  - ii) estabiliza las células comprendidas en la muestra induciendo encogimiento de células;
  - iii) es impermeable a las células;
  - iv) es soluble en agua;
  - 45 v) es un compuesto orgánico hidroxilado;
  - vi) es un poliol;
  - vii) es un compuesto de hidroxí-carbonilo;
  - viii) es un hidrato de carbono o un alcohol de azúcar; y/o
  - ix) es dihidroxiacetona

50 y/o

c) en el que el compuesto según la fórmula 1 tiene una o más de las siguientes características:

- i) R1, R2 y R3 comprenden 1 a 5 átomos de carbono;
- ii) R1, R2 y R3 comprenden 1 o 2 átomos de carbono;

- iii) R4 es oxígeno;
- iv) es una amida del ácido N,N-dialquilcarboxílico; y/o
- v) está seleccionado del grupo que consiste en N,N-dimetilacetamida, N,N-dietilacetamida, N,N-dimetilformamida y N,N-dietilformamida; y/o
- vi) es N,N-dimetilpropanamida.

6. El recipiente según una o más de las reivindicaciones 1 a 5, **en el que** la composición estabilizante comprende adicionalmente al menos un anticoagulante, preferentemente un agente quelante tal como EDTA.

7. El recipiente según una o más de las reivindicaciones 1 a 6, **en el que** la composición estabilizante comprende el inhibidor de las caspasas, el agente hipertónico, el compuesto según la fórmula 1 y/o el anticoagulante en una concentración que cuando la muestra se añade a la composición de estabilización, la mezcla resultante tiene una o más de las siguientes características:

- a) comprende el inhibidor de las caspasas en una concentración seleccionada de al menos 0,01  $\mu\text{M}$ , al menos 0,05  $\mu\text{M}$ , al menos 0,1  $\mu\text{M}$ , al menos 0,5  $\mu\text{M}$ , al menos 1  $\mu\text{M}$ , al menos 2,5  $\mu\text{M}$  o al menos 3,5  $\mu\text{M}$ ;
- b) comprende el inhibidor de las caspasas en un intervalo de concentración seleccionado de 0,01  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ , 0,05  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  a 40  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  a 30  $\mu\text{M}$  o 2,5  $\mu\text{M}$  a 25  $\mu\text{M}$ ;
- c) comprende el agente hipertónico en una concentración de al menos 0,05 M, al menos 0,1 M, preferentemente al menos 0,25 M, más preferentemente al menos 0,5 M;
- d) comprende el agente hipertónico en un intervalo de concentración seleccionado de 0,05 M a 2 M, 0,1 a 1,5 M, 0,15 M a 0,8 M, 0,2 M a 0,7 M o 0,1 M a 0,6 M;
- e) comprende el compuesto según la fórmula 1 en una concentración de al menos el 0,1 %, al menos el 0,5 %, al menos el 1 %, al menos el 0,75 %, al menos el 1 %, al menos el 1,25 % o al menos el 1,5 %;
- f) comprende el compuesto según la fórmula 1 en un intervalo de concentración seleccionado del 0,1 % al 50 %, del 0,5 % al 25 %, del 0,75 % al 20 %, del 1 % al 15 % o del 1 % al 10 %; y/o
- g) comprende el anticoagulante, preferentemente un agente quelante, en un intervalo de concentración seleccionado de 0,05 mM a 100 mM, de 0,05 mM a 50 mM, de 0,1 mM a 30 mM, de 1 mM a 20 mM o de 2 mM a 15 mM.

8. El recipiente según una o más de las reivindicaciones 1 a 7, **en el que** la composición estabilizante comprende:

- a) al menos un inhibidor de las pan-caspasas como inhibidor de las caspasas,
- b) al menos un agente hipertónico, preferentemente un compuesto orgánico hidroxilado y
- c) al menos un compuesto según la fórmula 1, preferentemente una amida del ácido N,N-dialquilcarboxílico, y
- d) opcionalmente un agente quelante, preferentemente EDTA, como anticoagulante.

9. El recipiente según una o más de las reivindicaciones 1 a 8, **en el que** la estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares puede lograrse sin refrigeración, preferentemente a temperatura ambiente, durante un periodo de tiempo seleccionado de

- a) al menos dos días;
- b) al menos tres días;
- c) al menos un día a tres días;
- d) al menos un día a seis días; y/o
- e) al menos un día a siete días.

10. El recipiente según una o más de las reivindicaciones 1 a 9, **en donde** el recipiente tiene una parte superior abierta, un fondo y una pared lateral que se extiende entremedias definiendo una cámara, en donde la composición de estabilización está comprendida en la cámara.

11. El recipiente según la reivindicación 10, **en donde** el recipiente es un tubo, el fondo es un fondo cerrado, el recipiente comprende además un cierre en la parte superior abierta y la cámara está a una presión reducida y en el que opcionalmente el cierre es capaz de ser perforado con una aguja o cánula, y en el que la presión reducida está seleccionada para extraer un volumen especificado de una muestra líquida en la cámara.

12. El recipiente de la reivindicación 11, **en el que** la cámara está a una presión reducida seleccionada para extraer un volumen especificado de una muestra líquida en la cámara, y en el que la composición estabilizante es un líquido y está dispuesto en la cámara de forma que la relación volumétrica de la composición estabilizante con respecto al volumen especificado de la muestra que contiene células se seleccione de 10:1 a 1:20, de 5:1 a 1:15, de 1:1 a 1:10 y de 1:2 a 1:5.

13. El recipiente según una o más de las reivindicaciones 1 a 12, adecuado para recoger una muestra de sangre, **en donde** la composición estabilizante adecuada para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en la muestra de sangre hace que se reduzca la liberación de ADN genómico de las células contenidas en la muestra en la porción libre de células de la muestra y se reduzca la degradación de ácidos nucleicos presentes



en la muestra debido a la estabilización, en donde dicha composición estabilizante comprende además un anticoagulante.

5 14. El recipiente según una o más de las reivindicaciones 1 a 13, **en el que** la composición estabilizante tiene una o más de las siguientes características:

- a) es capaz de reducir la liberación de ADN genómico de células contenidas en la muestra en la porción libre de células de la muestra;
- b) es capaz de reducir la degradación de ácidos nucleicos, en particular ADN genómico, presente en la muestra;
- 10 c) se proporciona en una forma sólida;
- d) se proporciona en una forma líquida; y/o
- e) es capaz de estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en dicha muestra a temperatura ambiente durante al menos 3 días, preferentemente al menos 6 días.

15 15. El recipiente según una o más de las reivindicaciones 1 a 14, **en donde** el recipiente comprende adicionalmente la muestra que contiene células en el que dicha muestra que contiene células tiene una o más de las siguientes características:

- a) comprende ácidos nucleicos extracelulares;
- 20 b) está seleccionada del grupo que consiste en sangre completa, plasma, suero, líquido linfático, orina, líquido, líquido cefalorraquídeo, ascitis, leche, heces, lavado bronquial, saliva, líquido amniótico, semen/líquido seminal, hisopos/frotis, líquidos corporales, secreciones corporales, secreciones nasales, secreciones vaginales, secreciones de heridas y excreciones y sobrenadantes de cultivo celular;
- c) es un líquido corporal agotado de células o que contiene células;
- 25 d) está seleccionada de sangre completa, plasma y/o suero; y/o
- e) es sangre completa.

Figura 1a

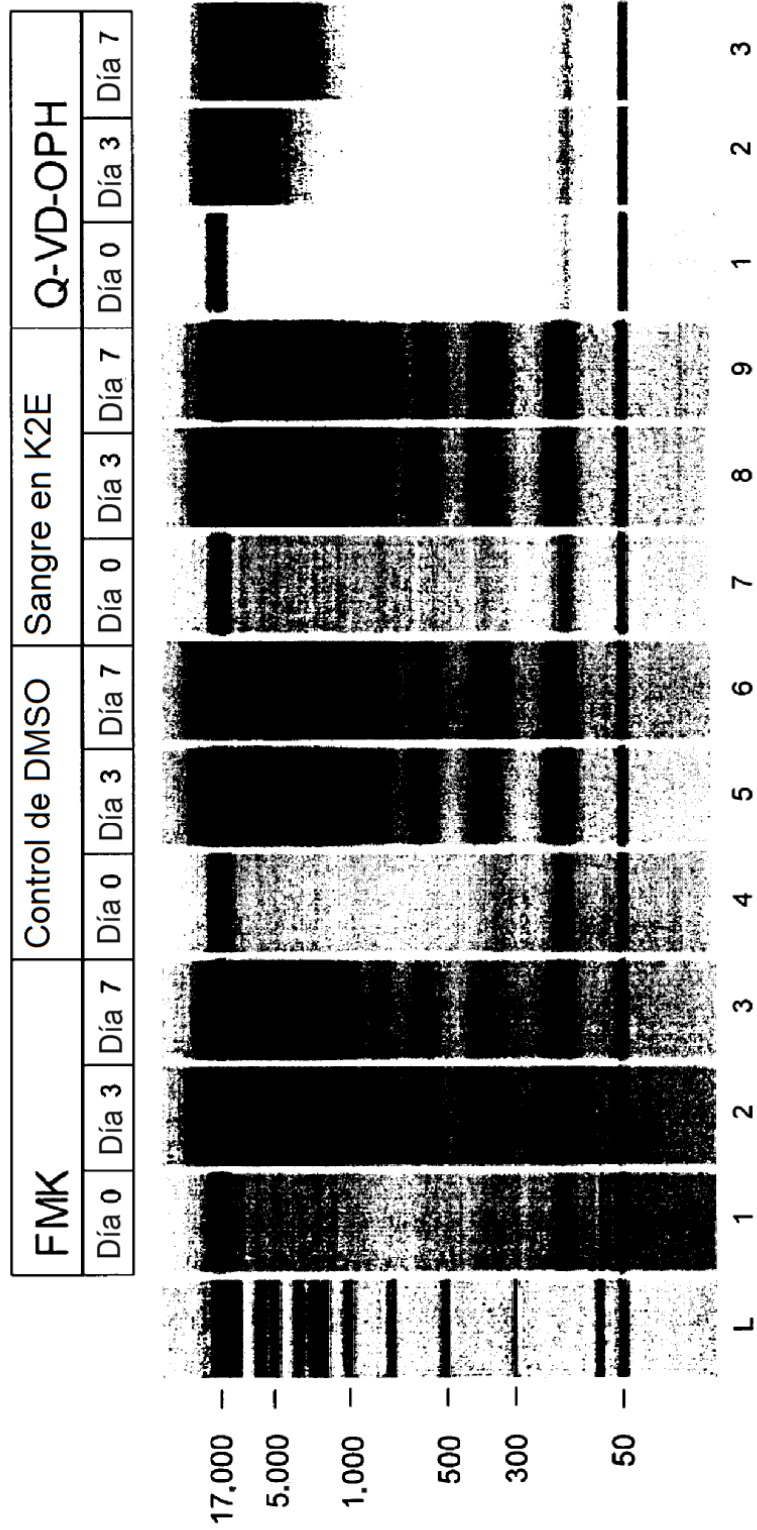


Figura 1b

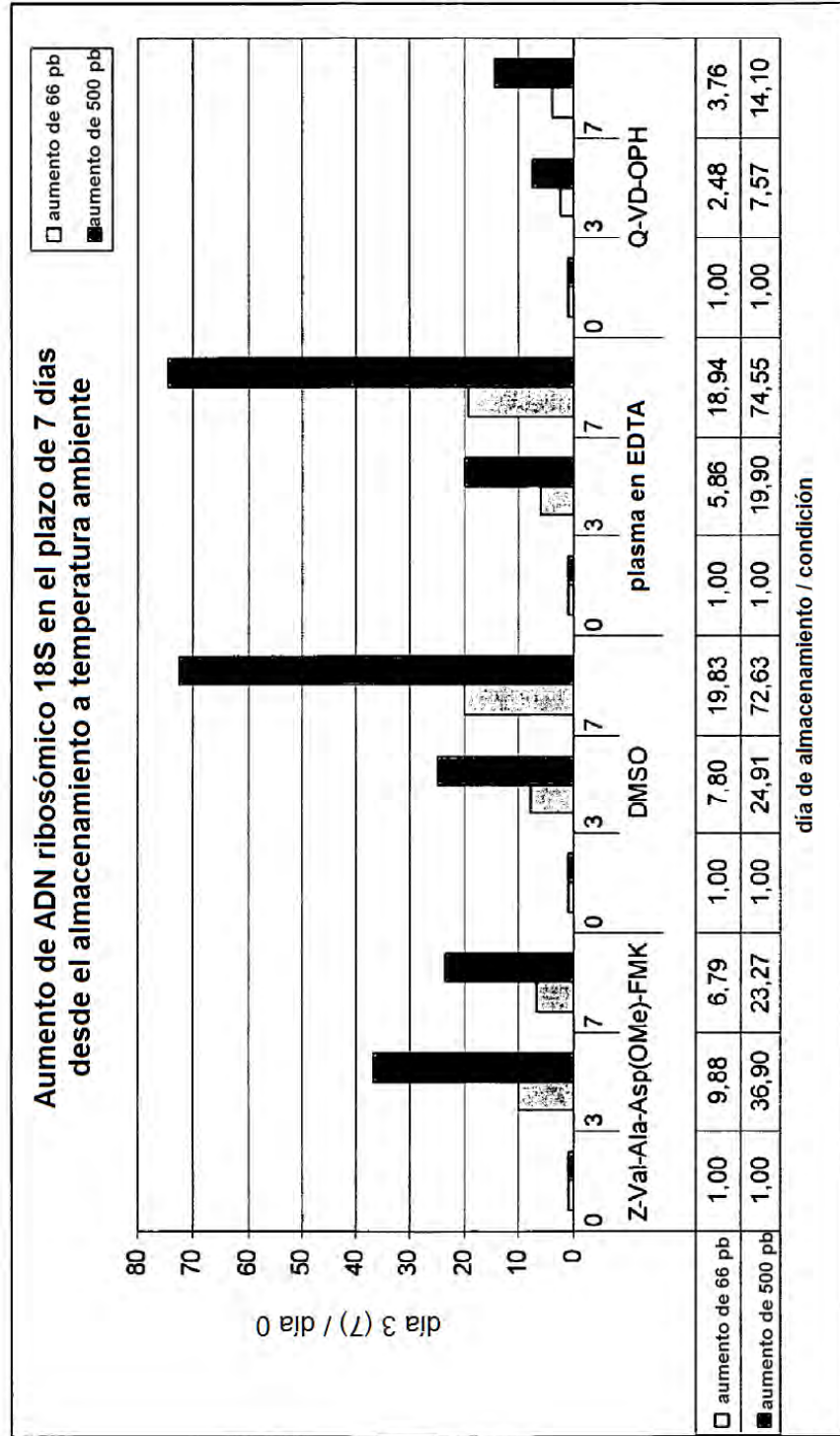


Figura 2a

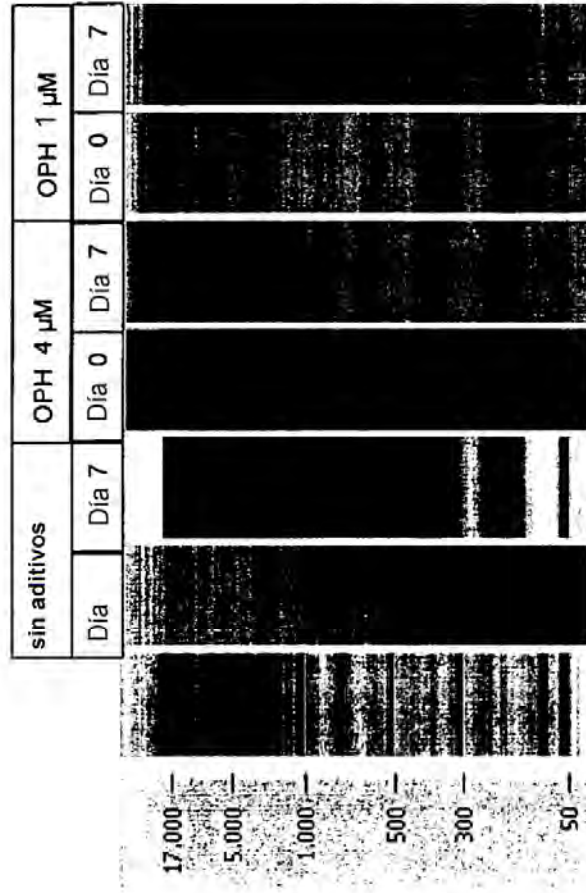


Figura 2b

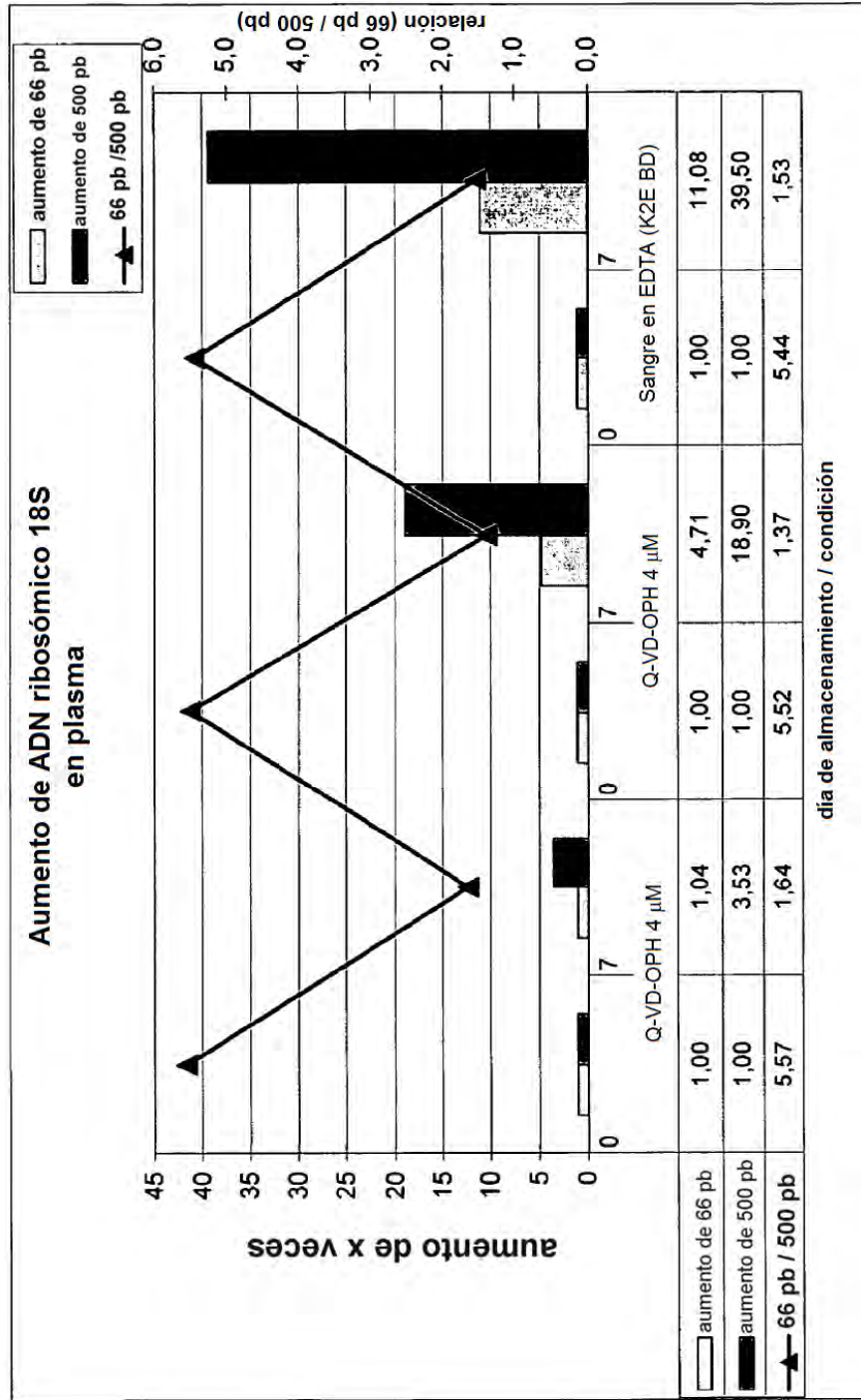


Figura 3

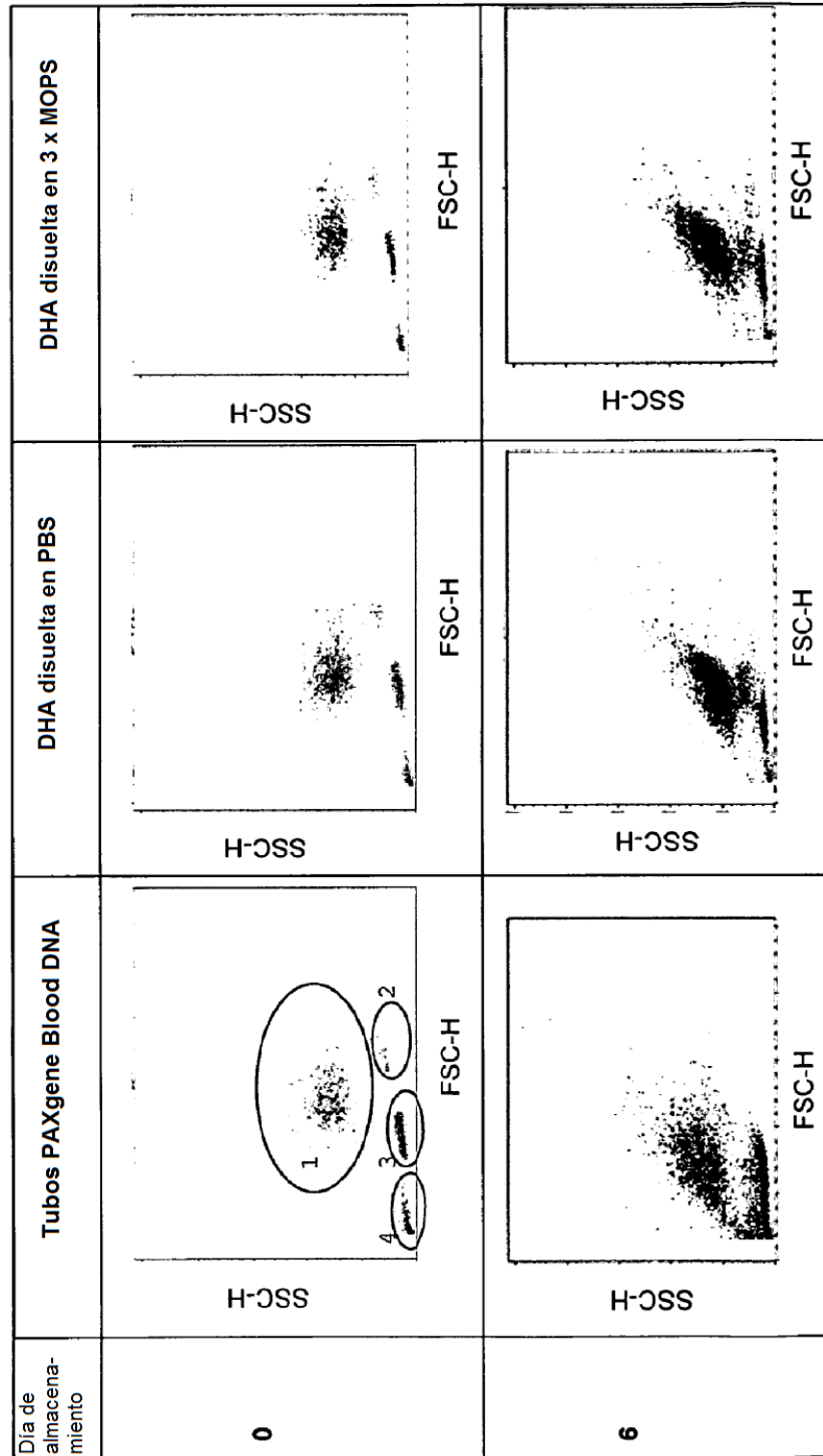


Figura 4a

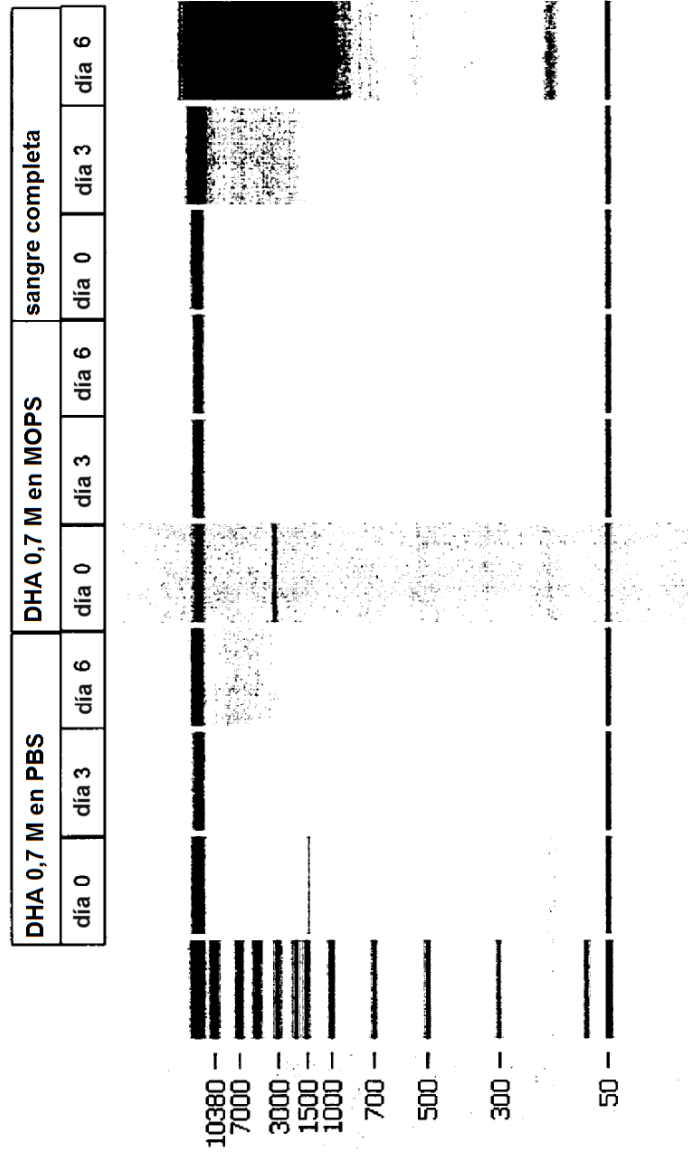


Figura 4b

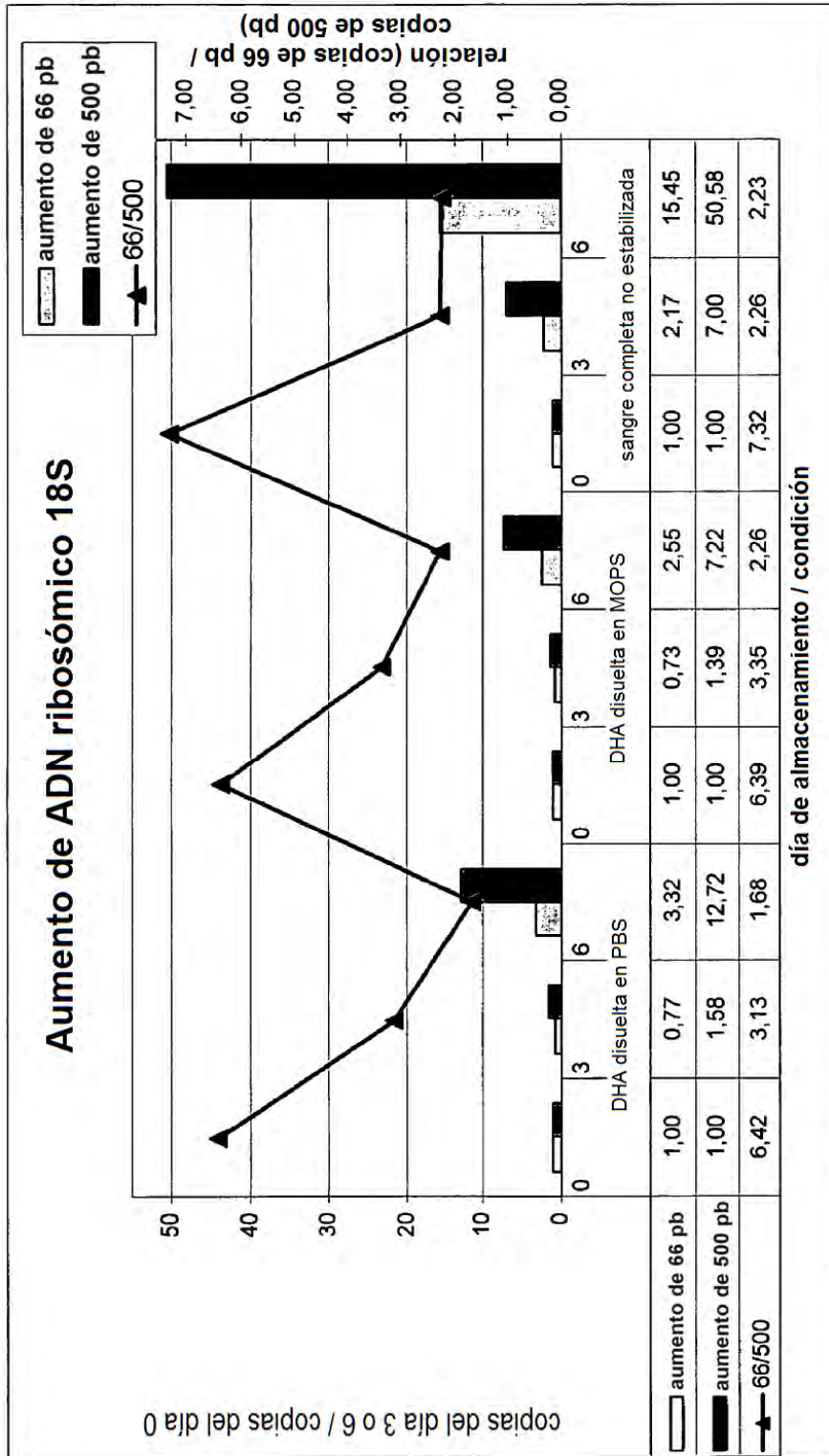




Figura 5

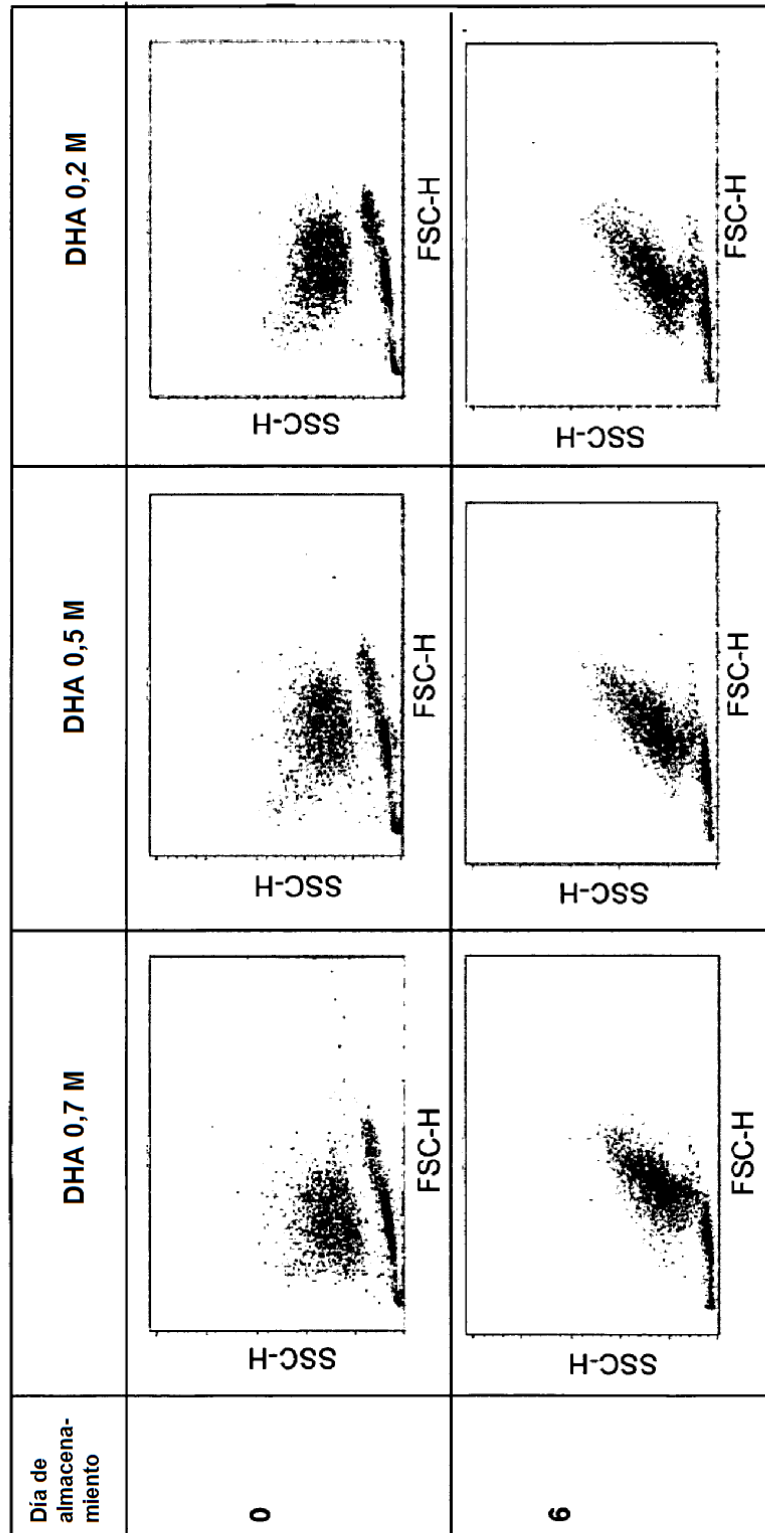


Figura 6a

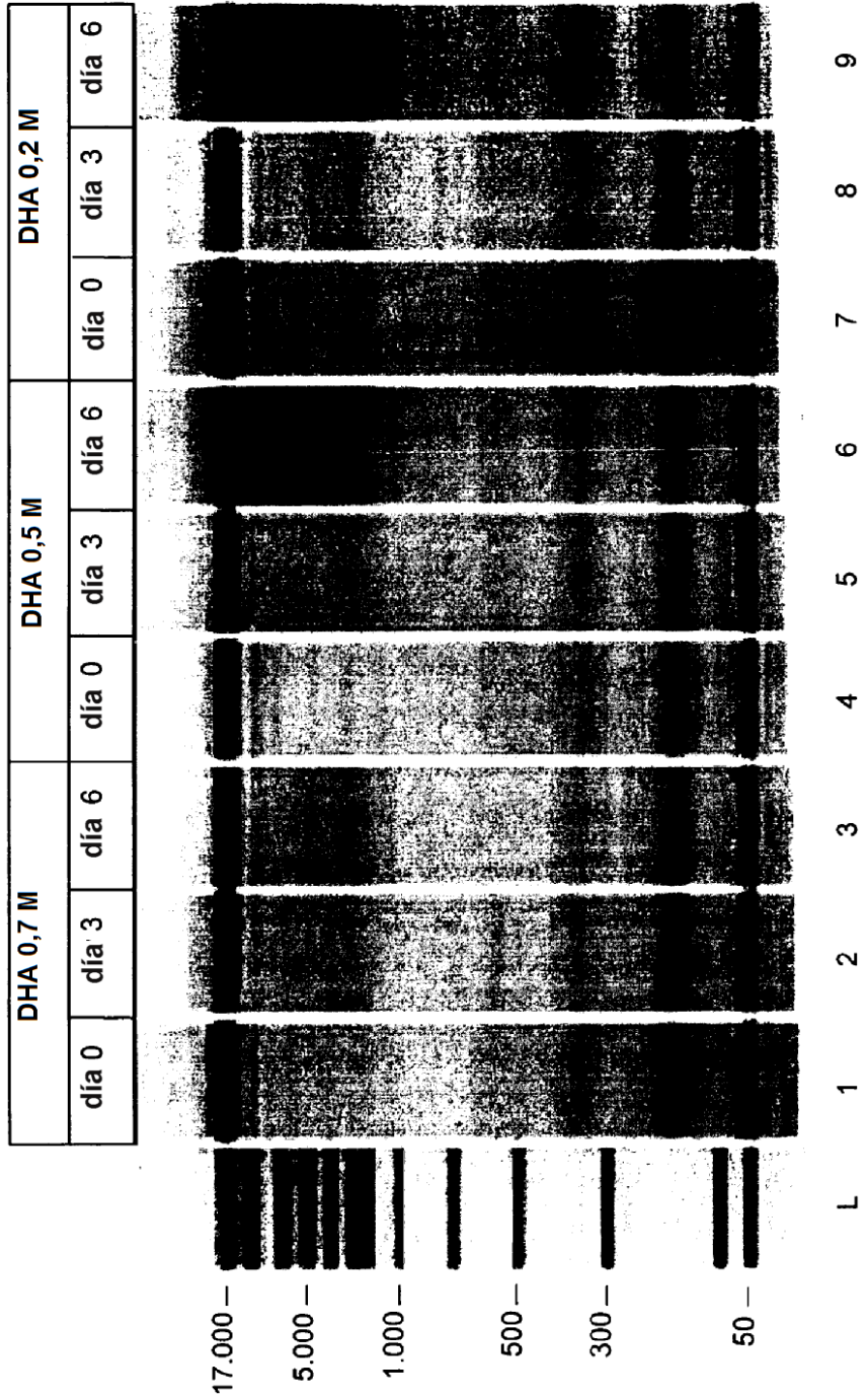
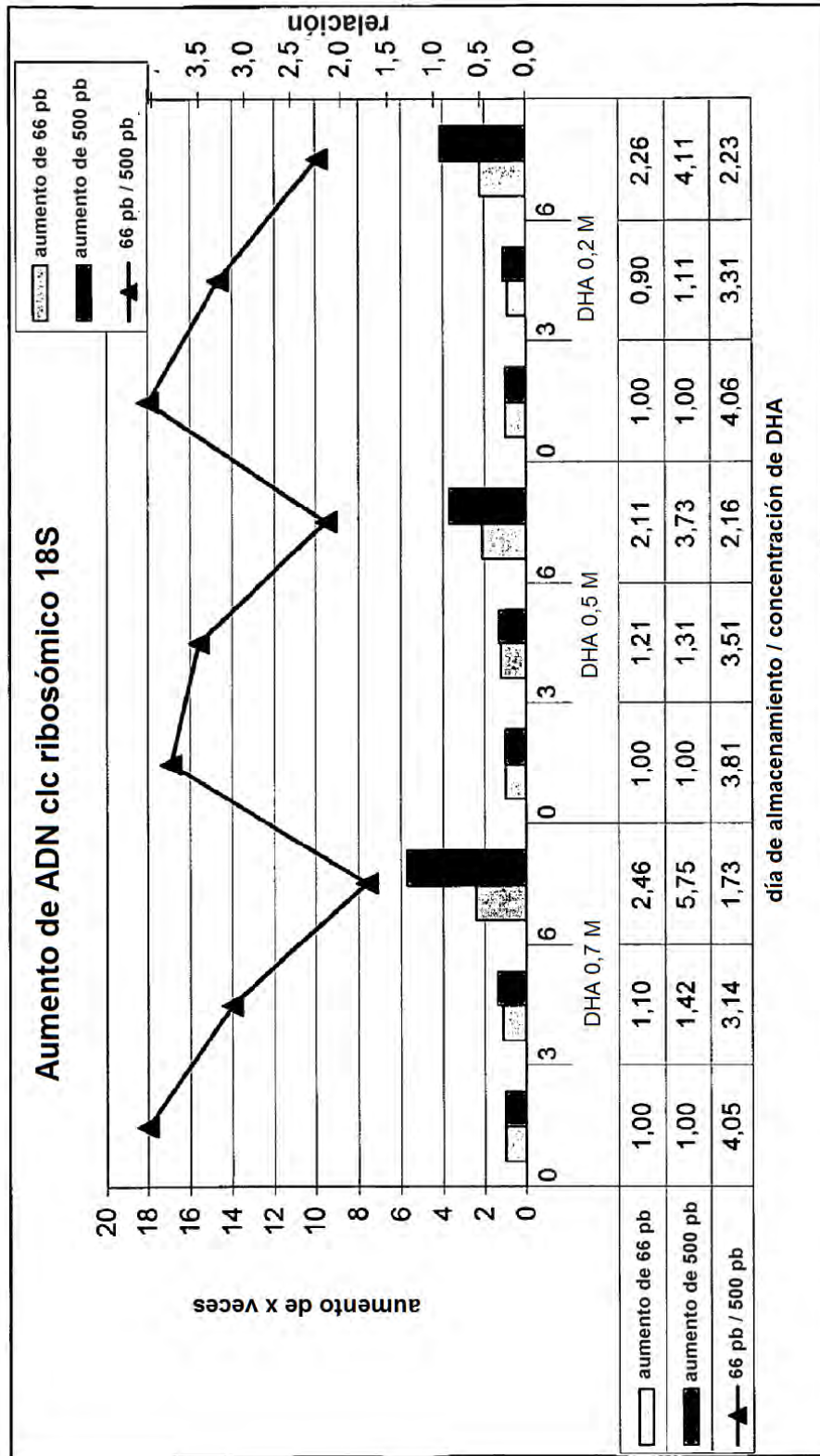


Figura 6b



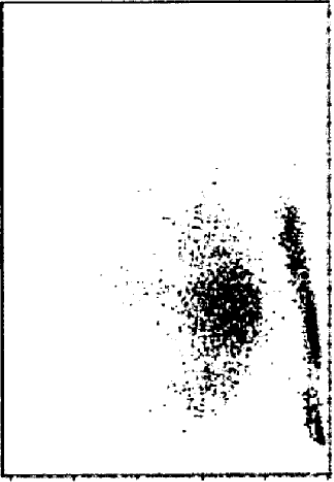
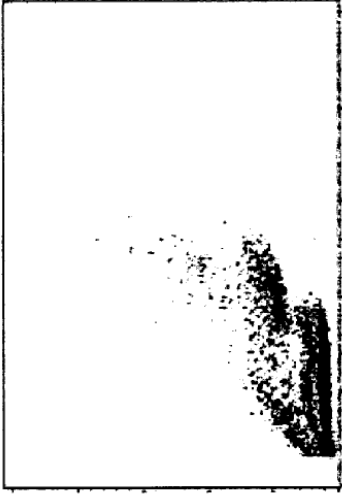

Día de almacenamiento	Sangre completa (recogida en K2E BD)	Mezcla de reactivos
0		<p>n/a</p>
6		

Figura 7a

Figura 7b

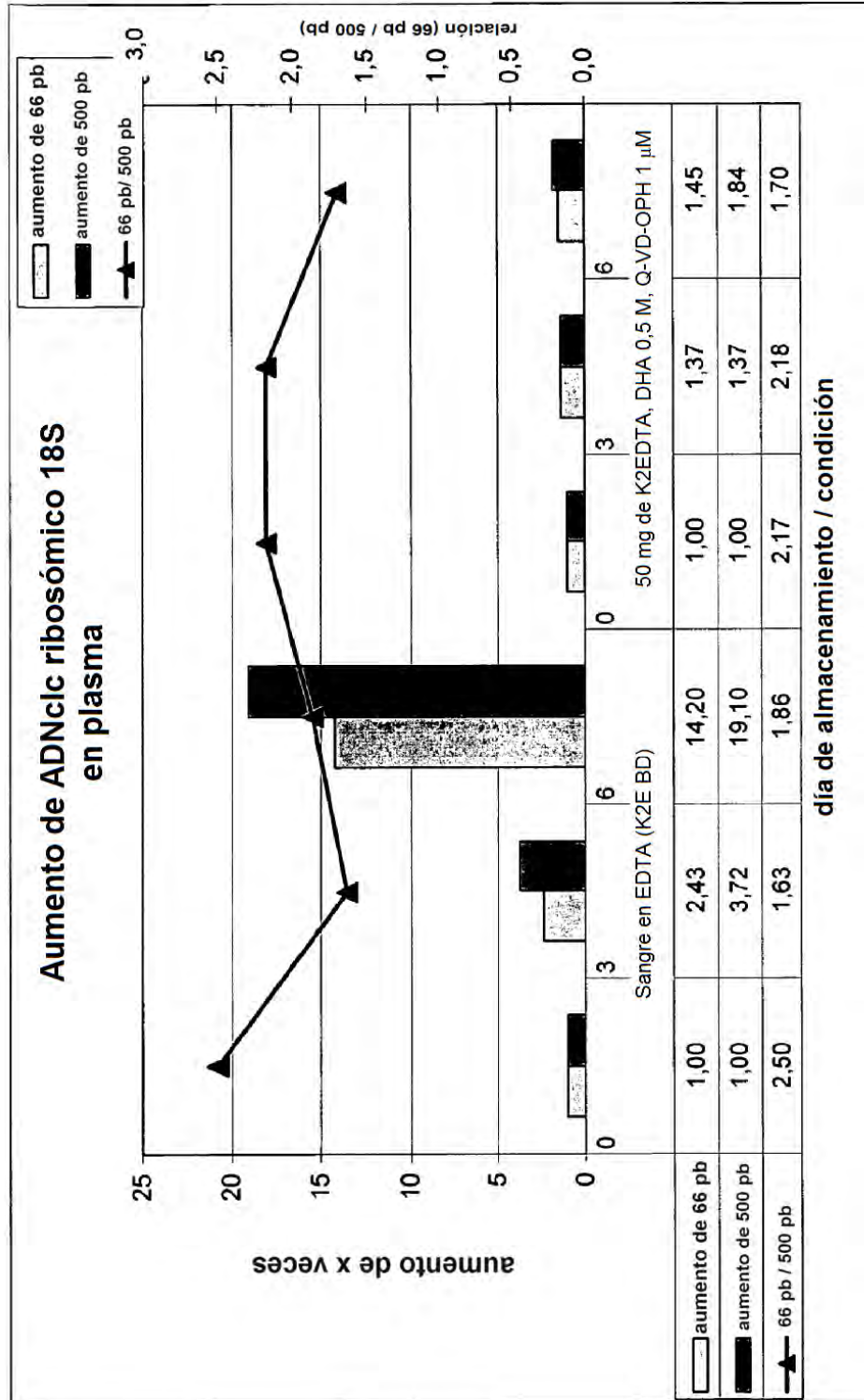


Figura 8

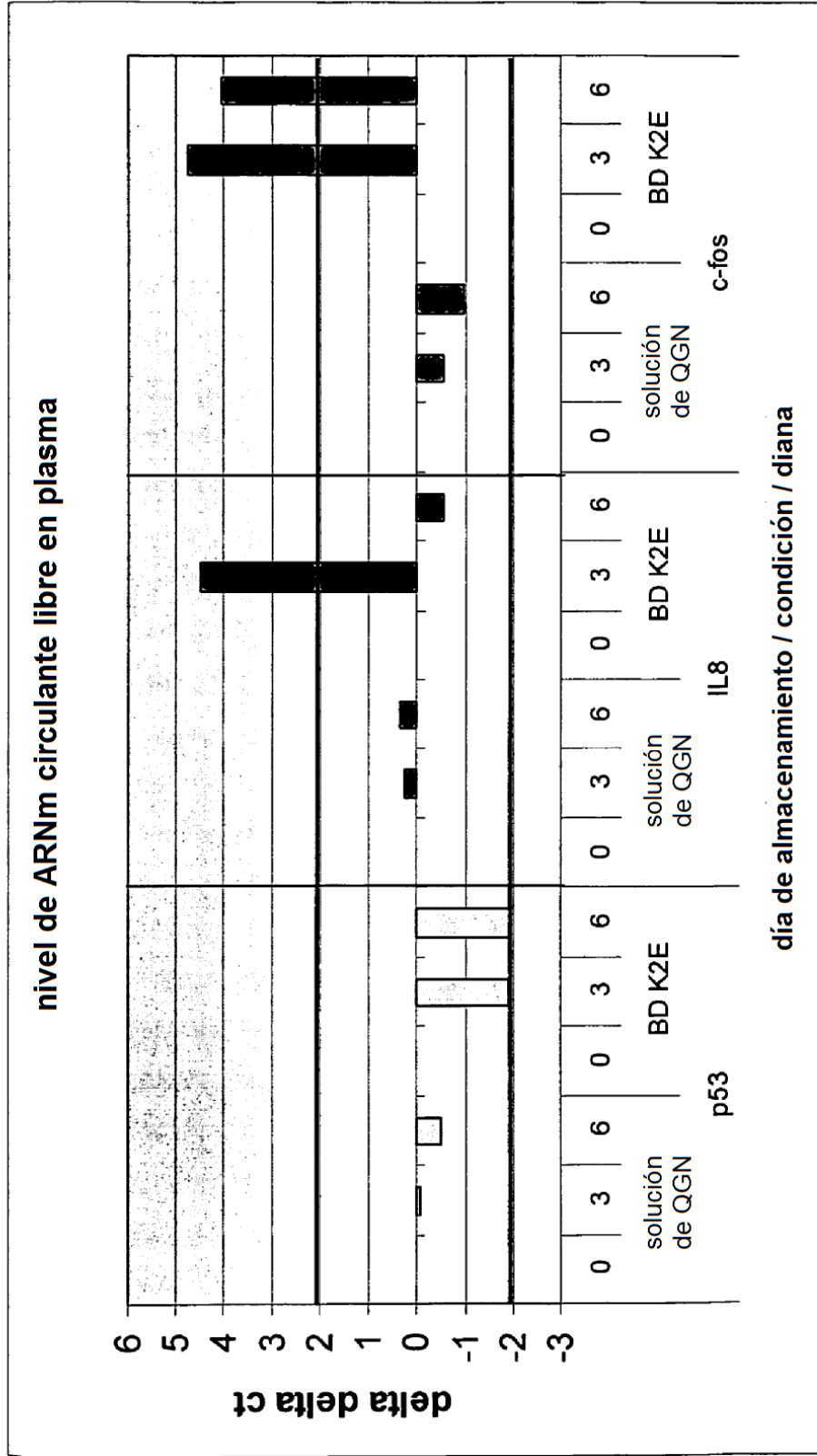




Figura 9

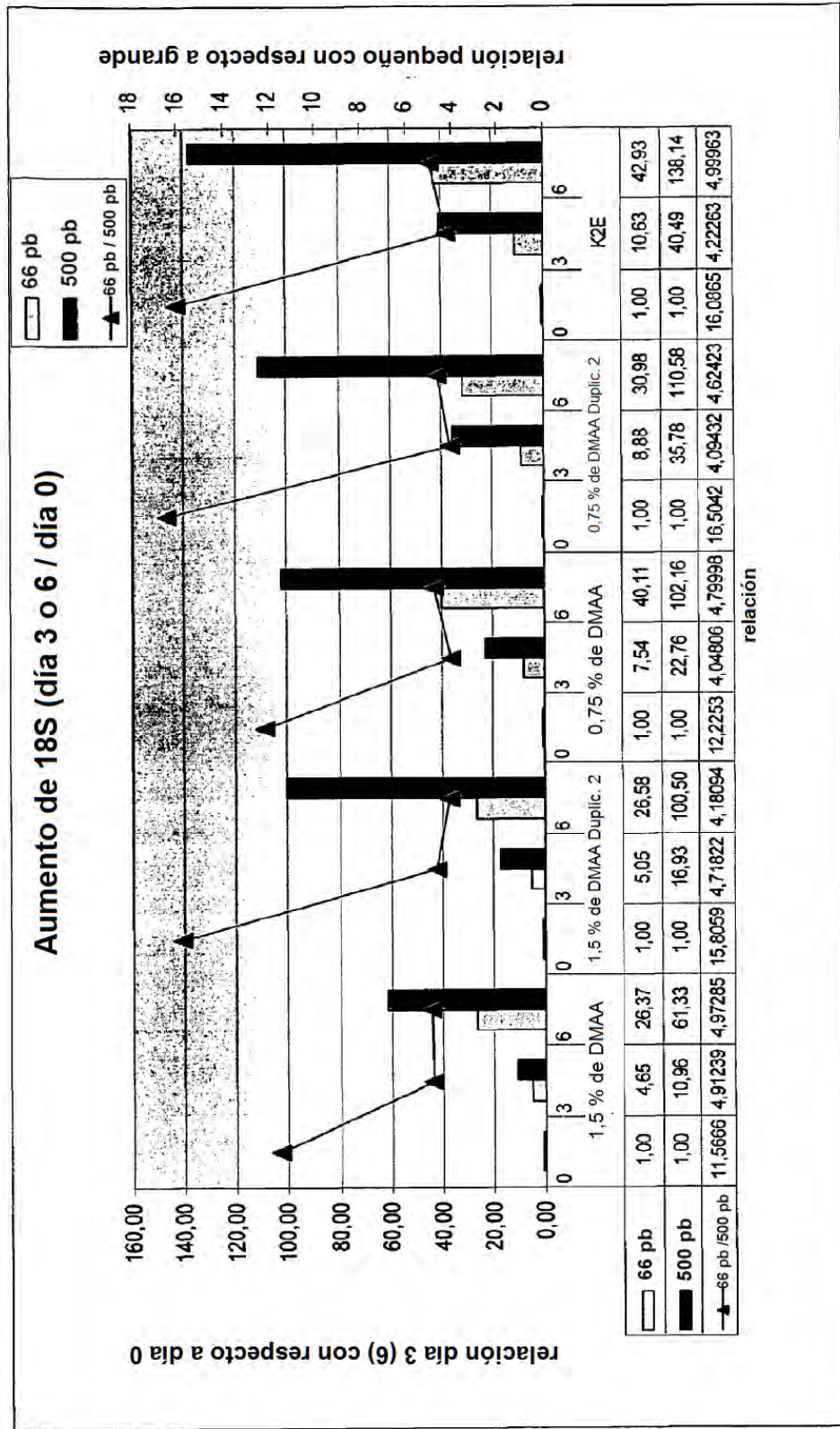


Figura 10

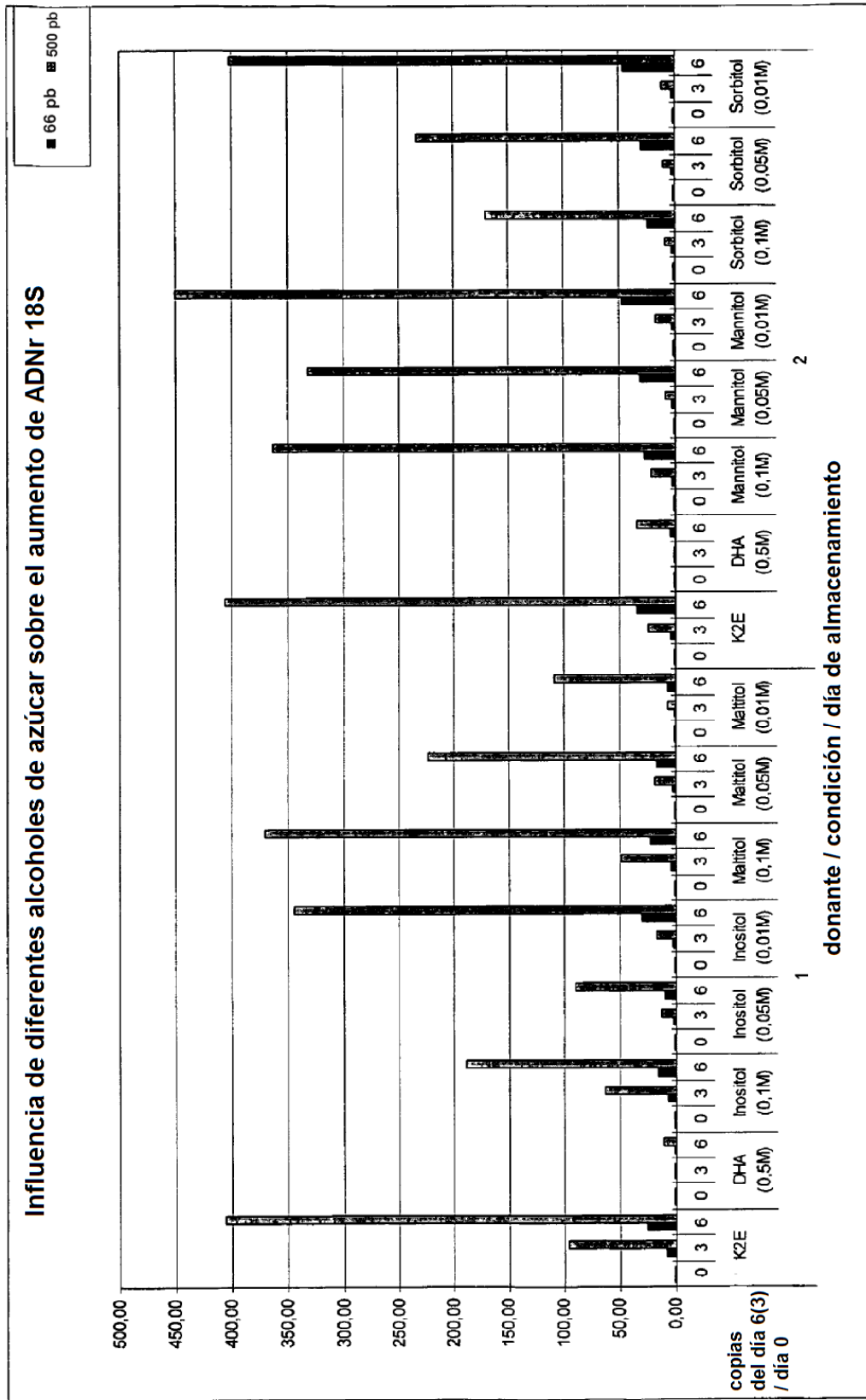




Figura 11

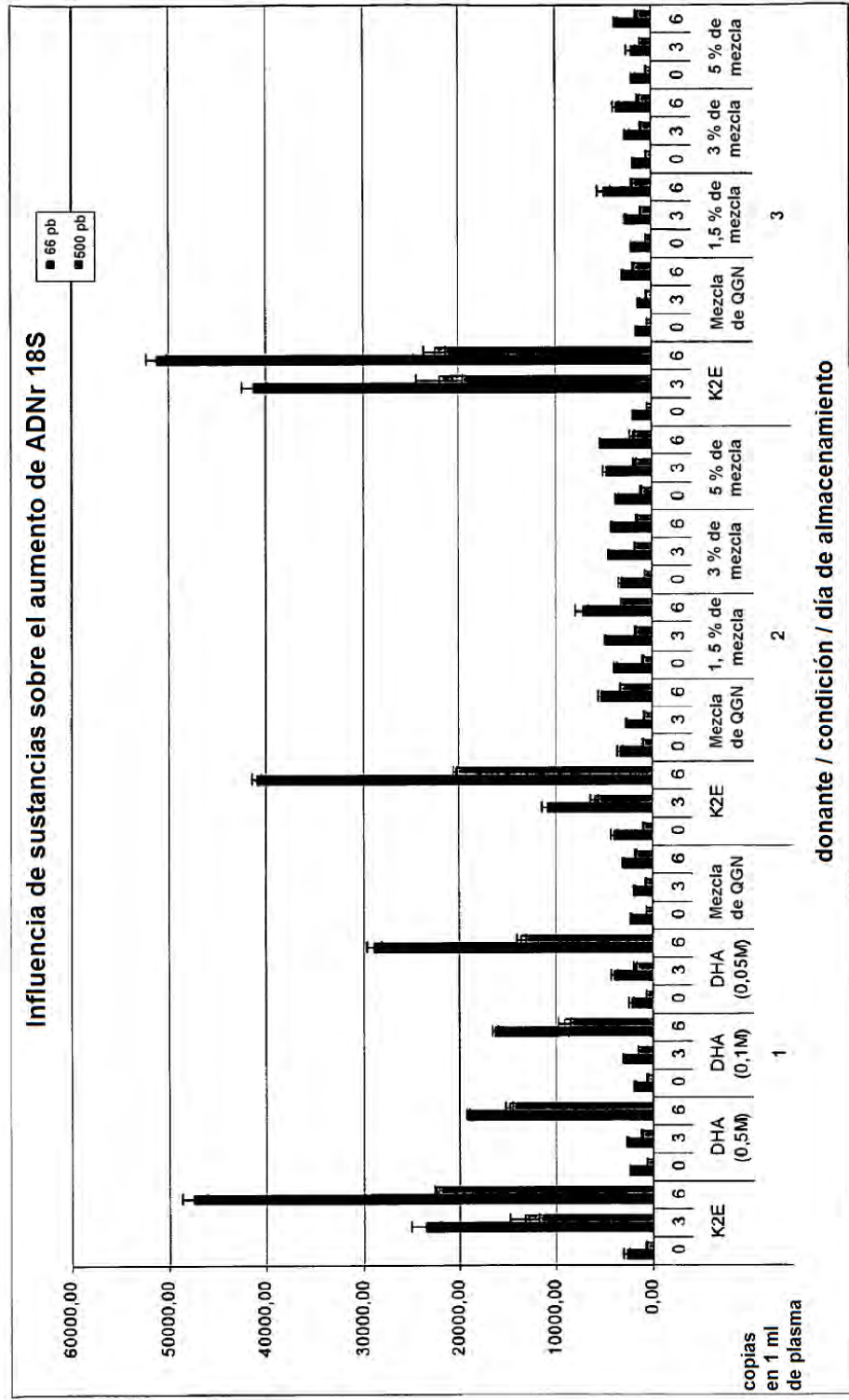




Figura 13

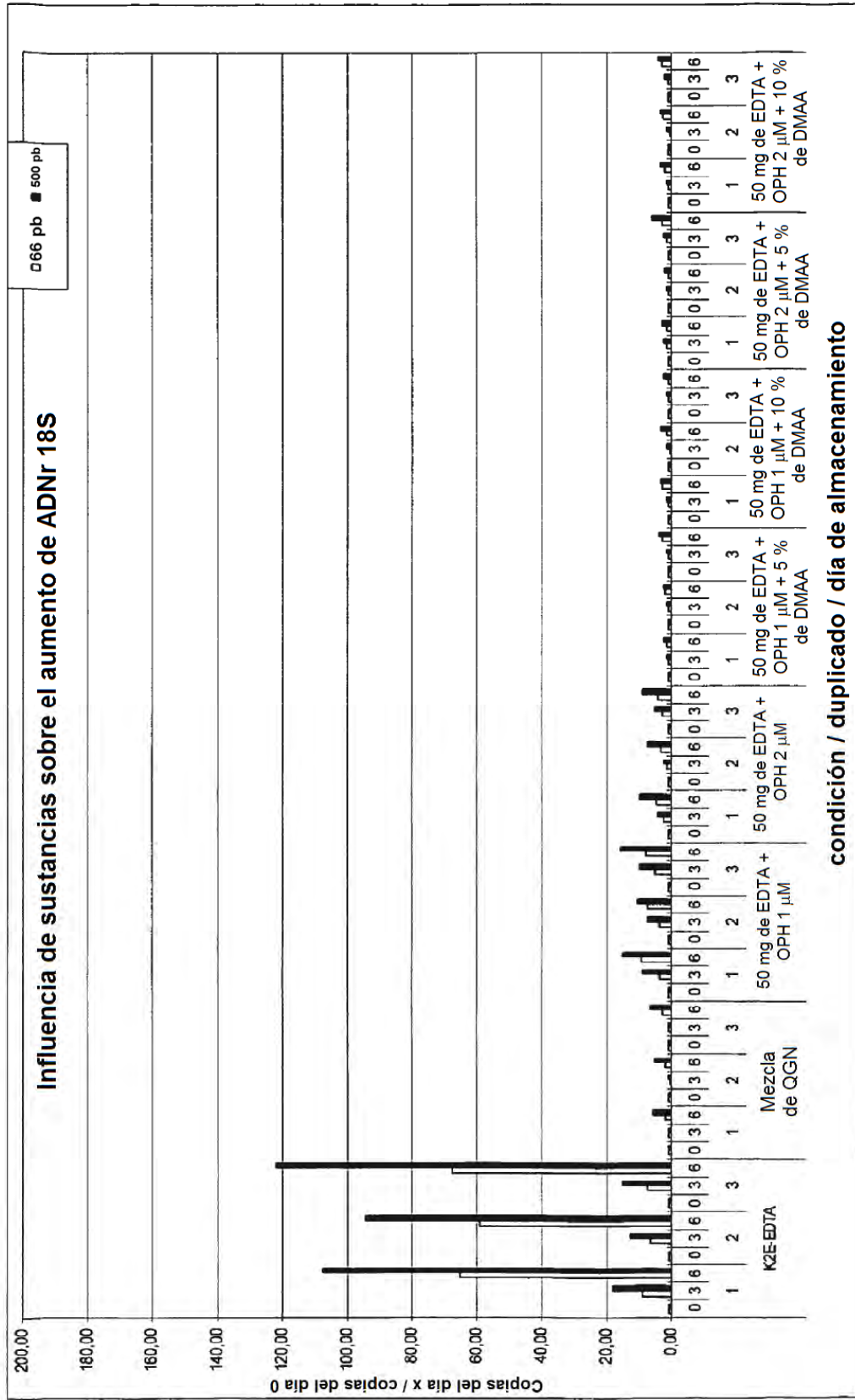


Figura 14

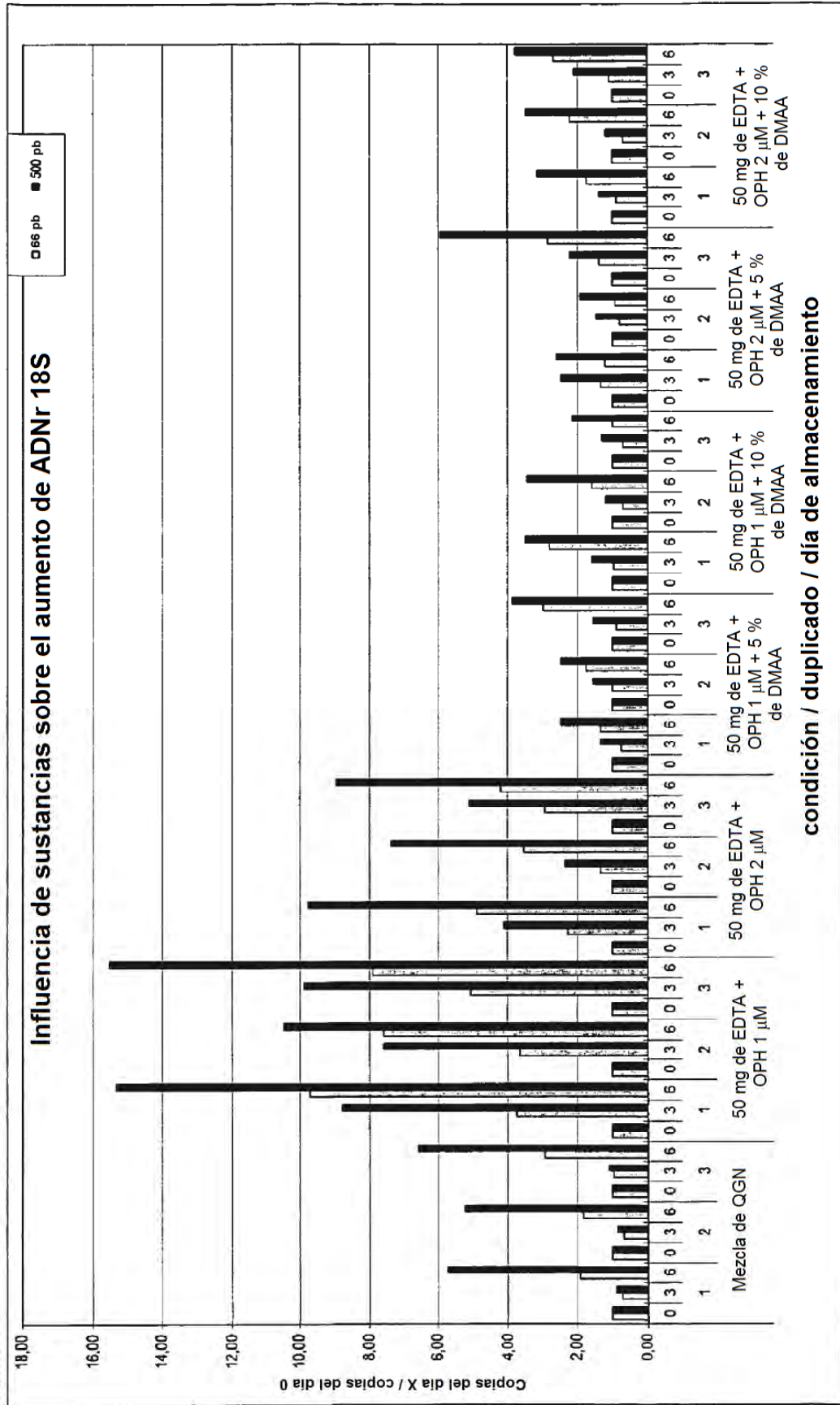


Figura 15

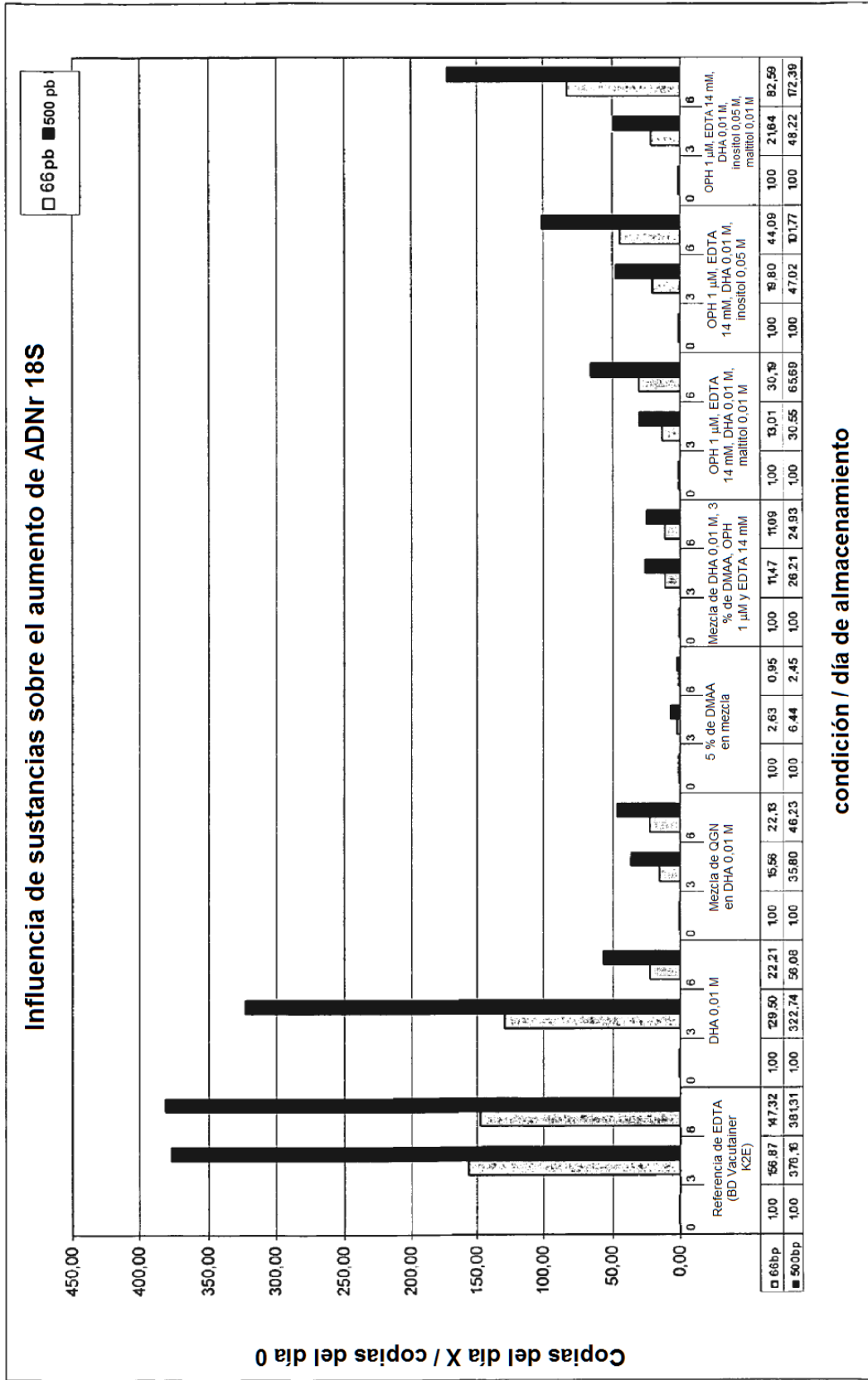


Figura 16

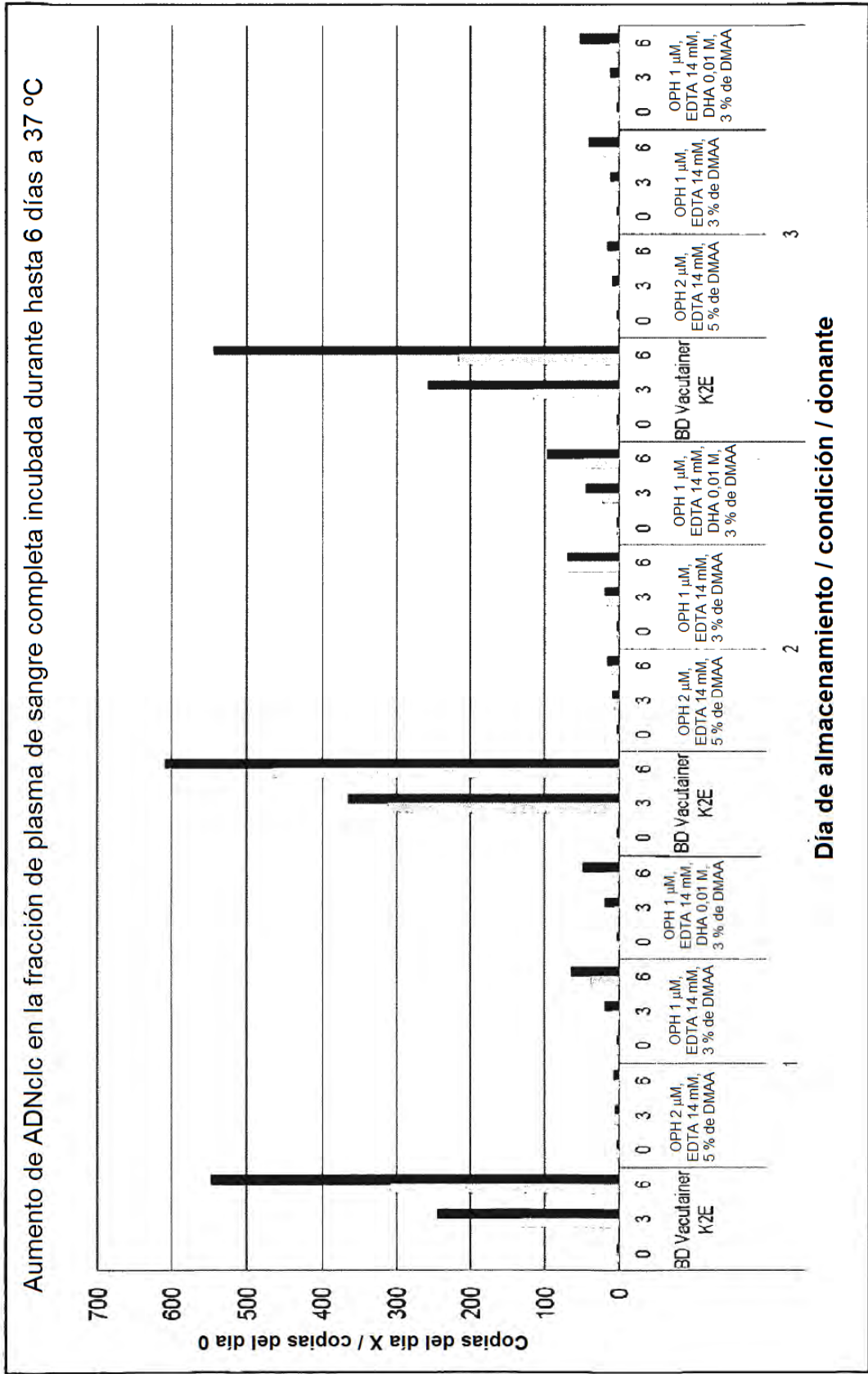




Figura 17

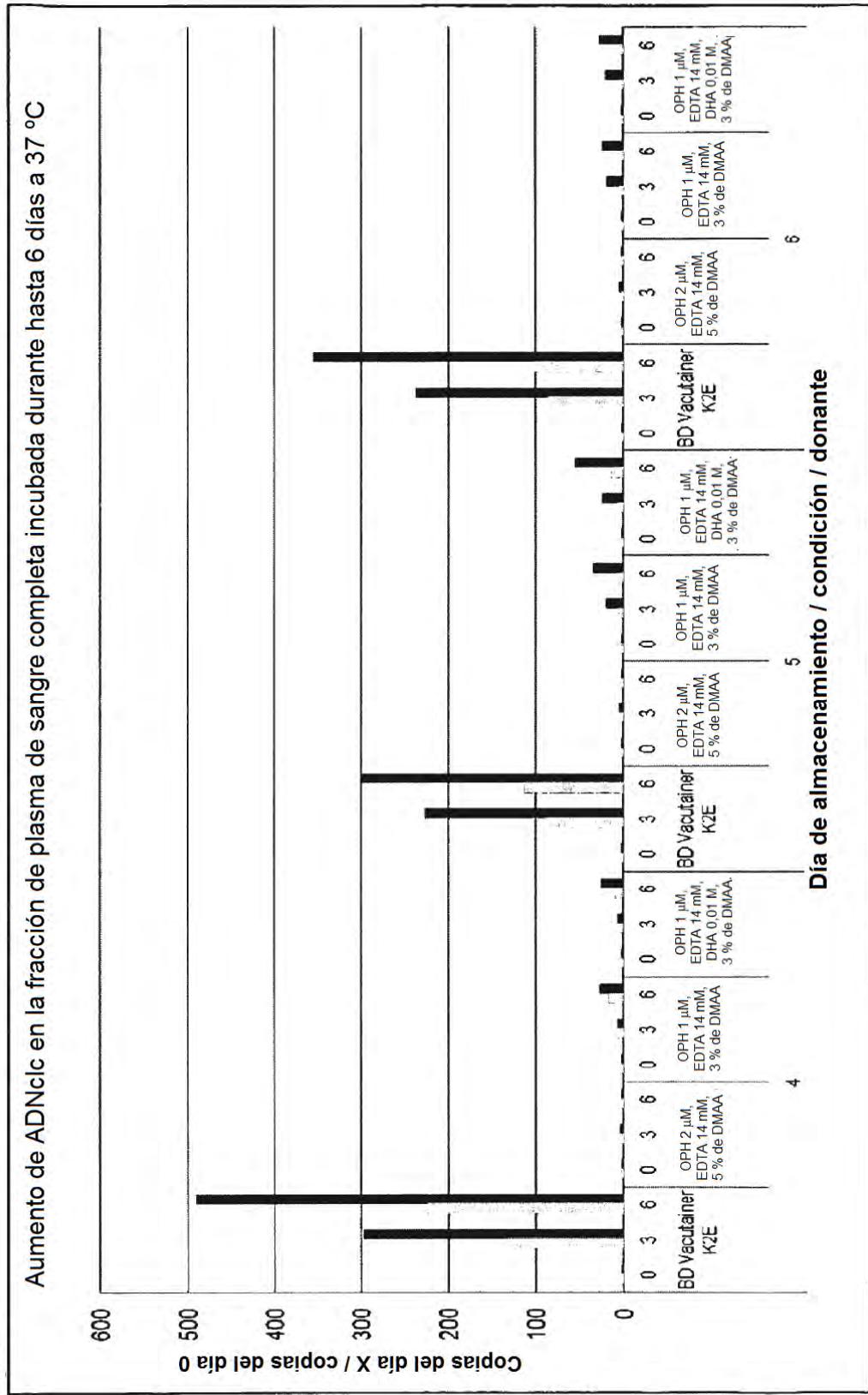


Figura 18

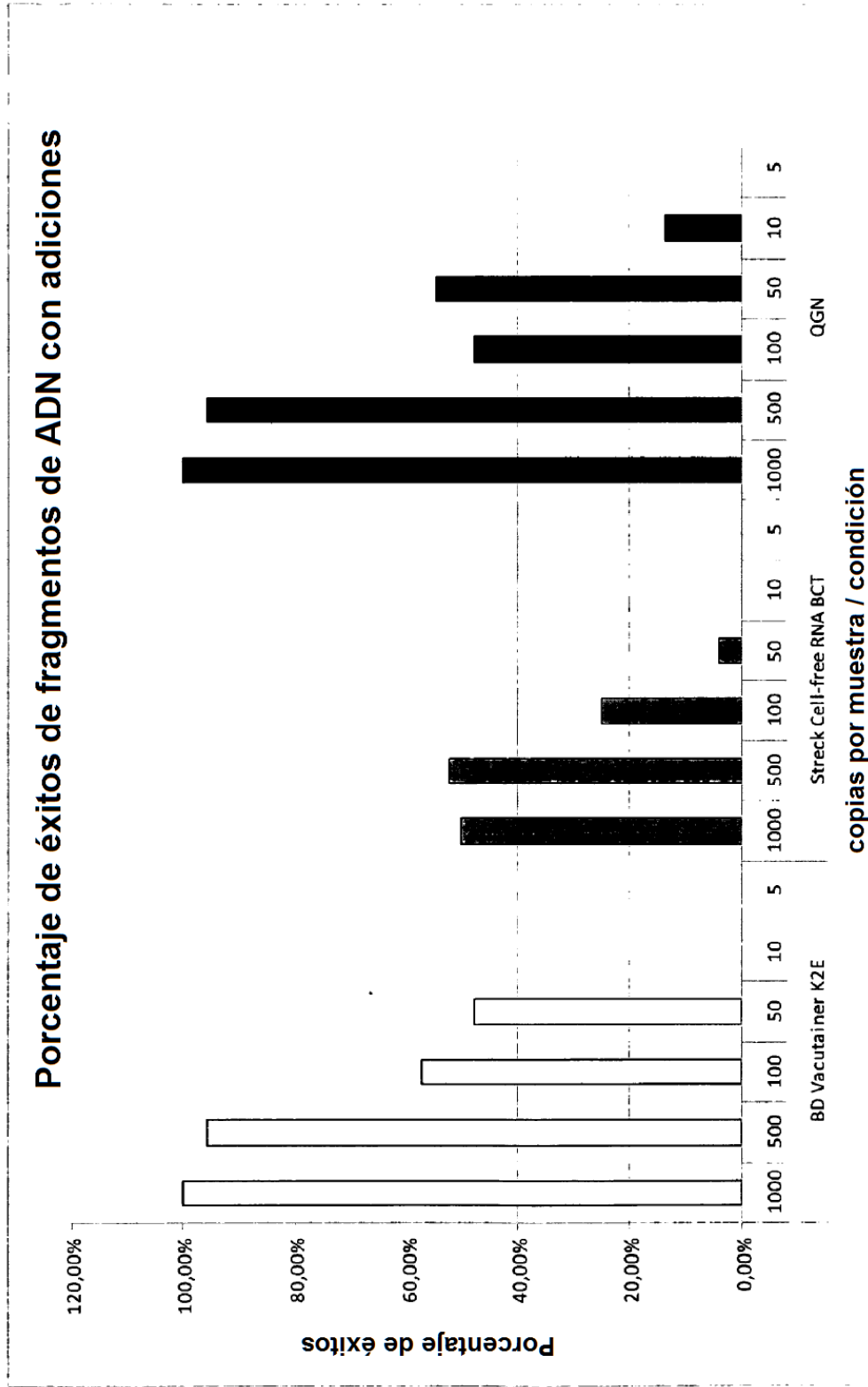




Figura 19

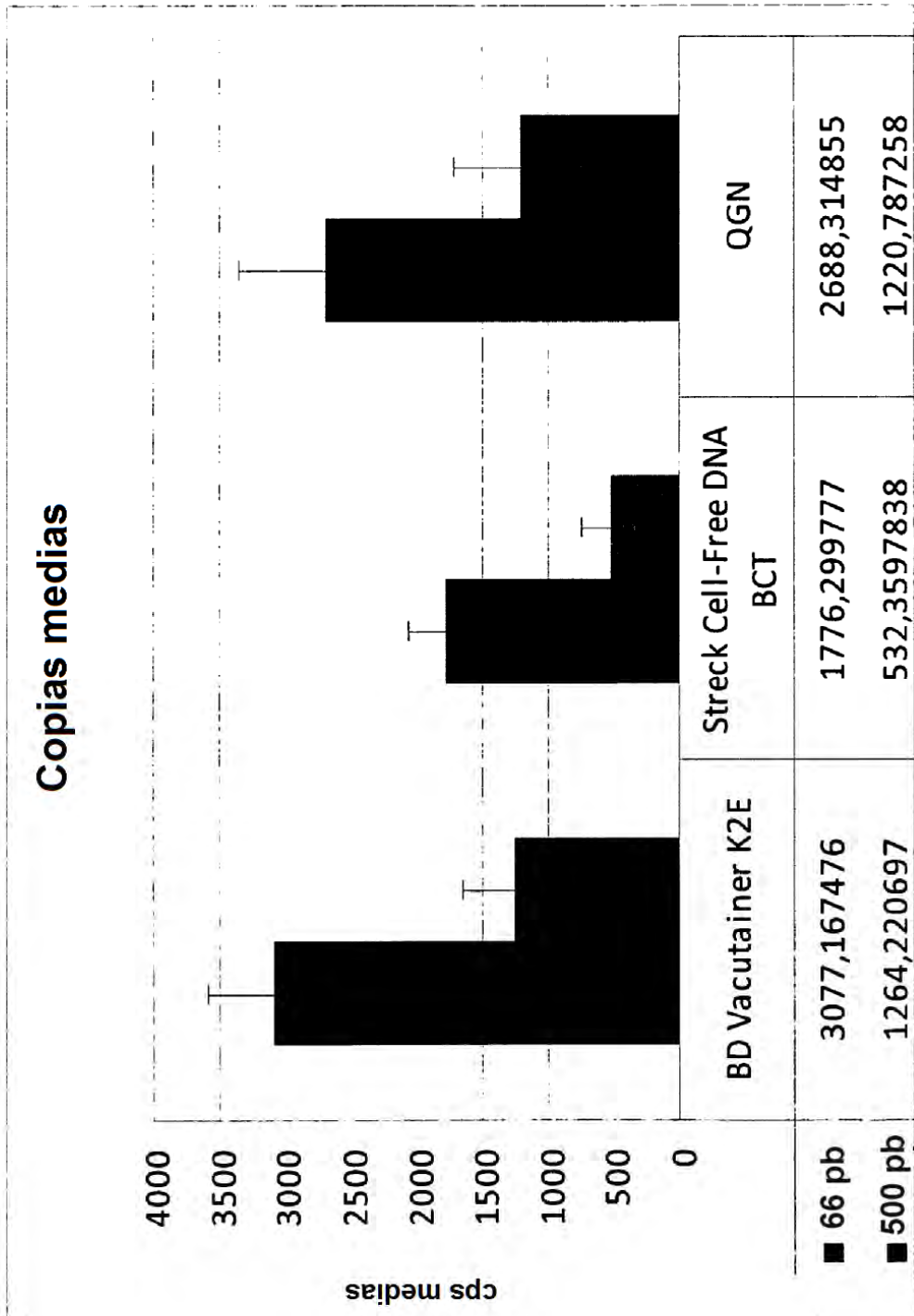


Figura 20

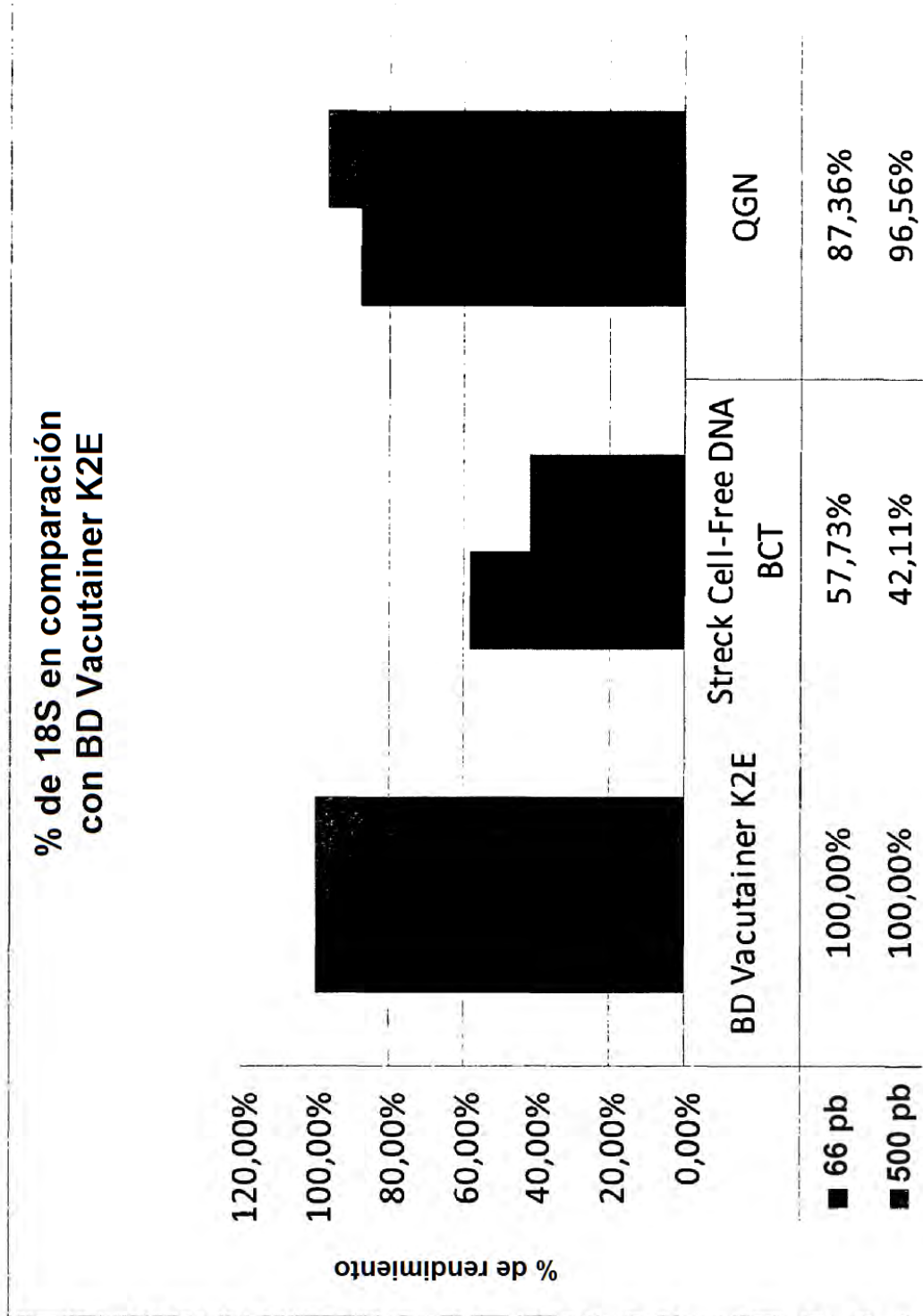


Figura 21

Disminución de VIH en sangre completa incubada a 37 °C

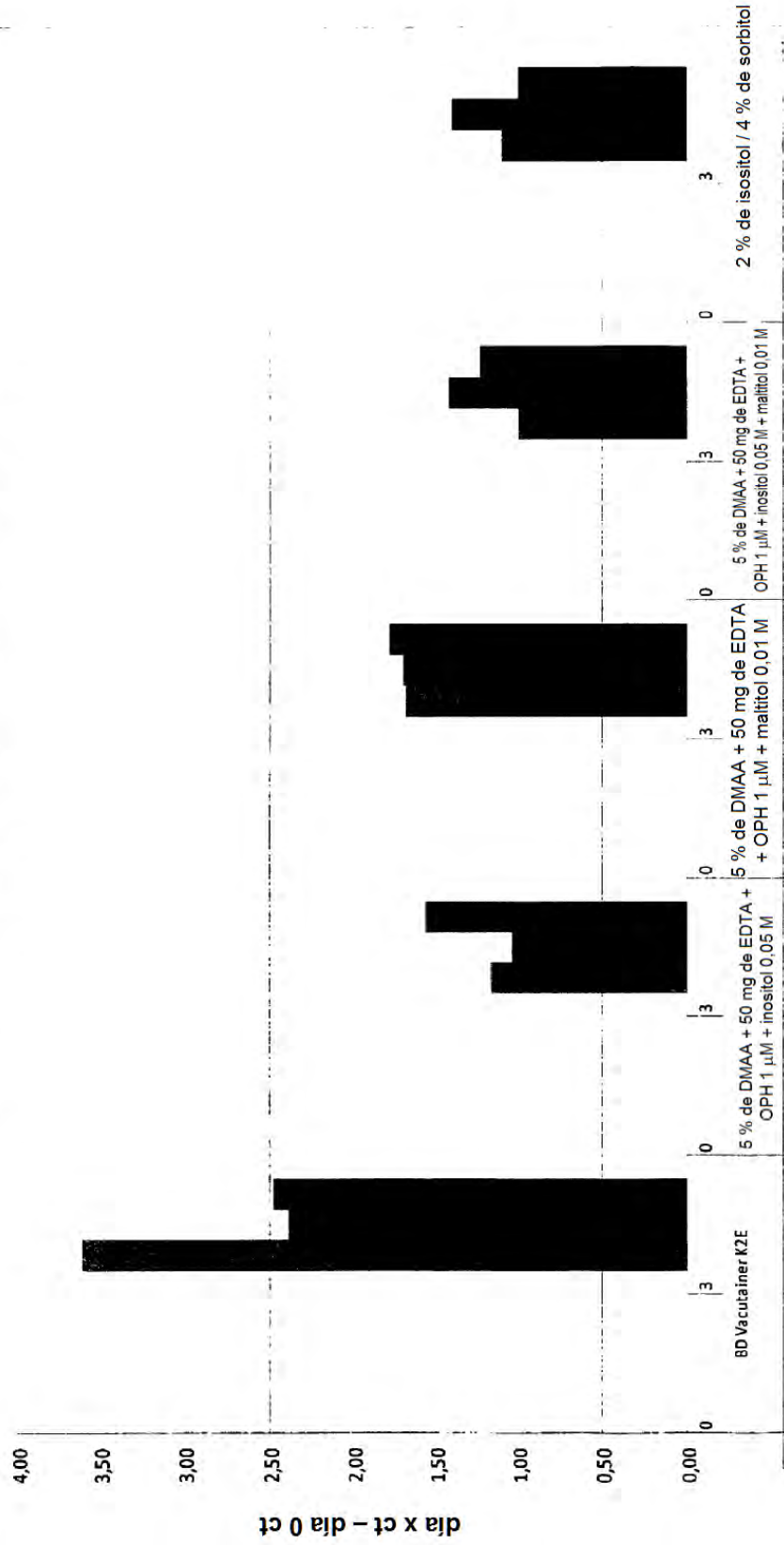


Figura 22

Disminución de VHC en sangre completa incubada a 37 °C

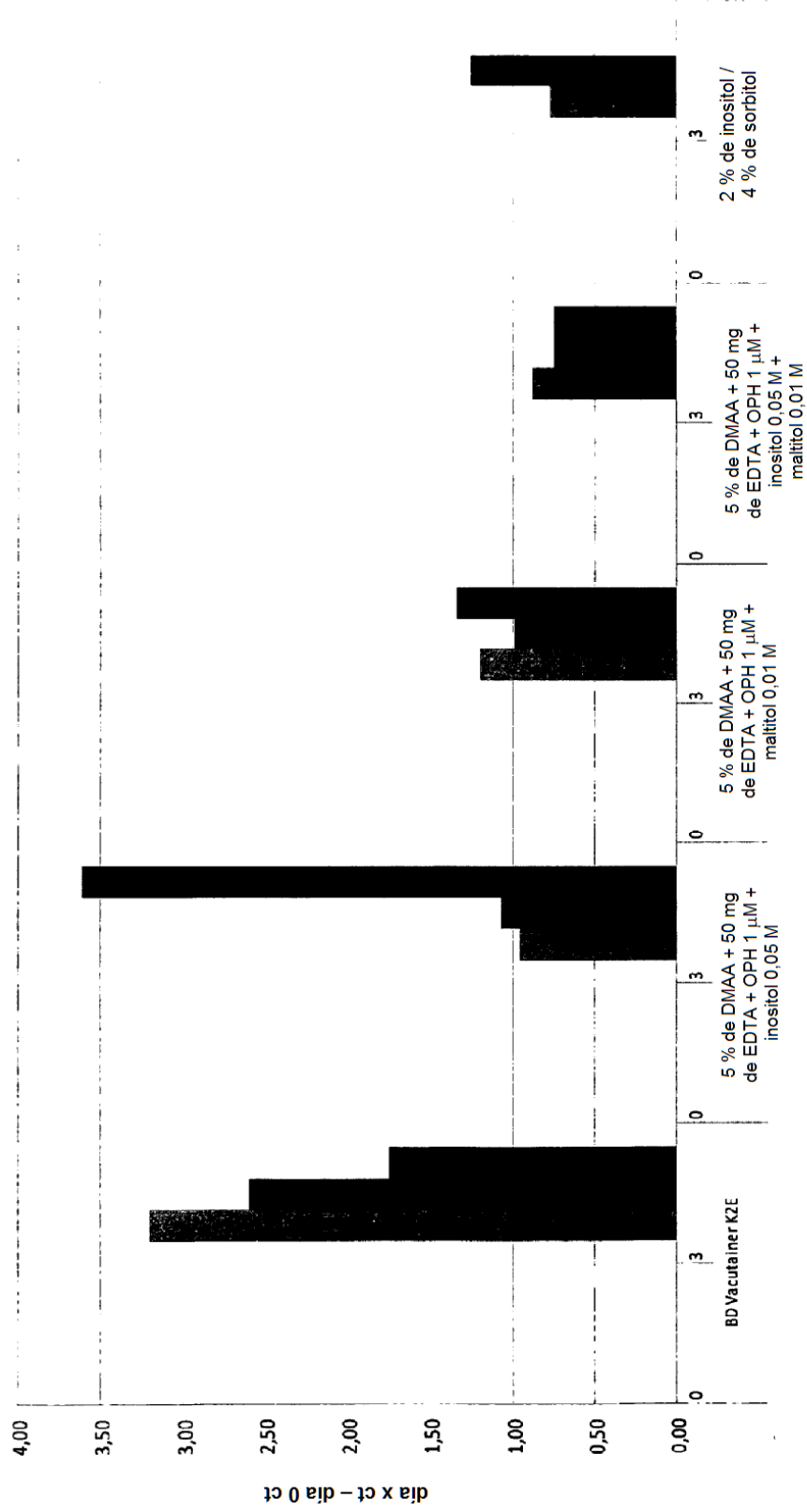


Figura 23

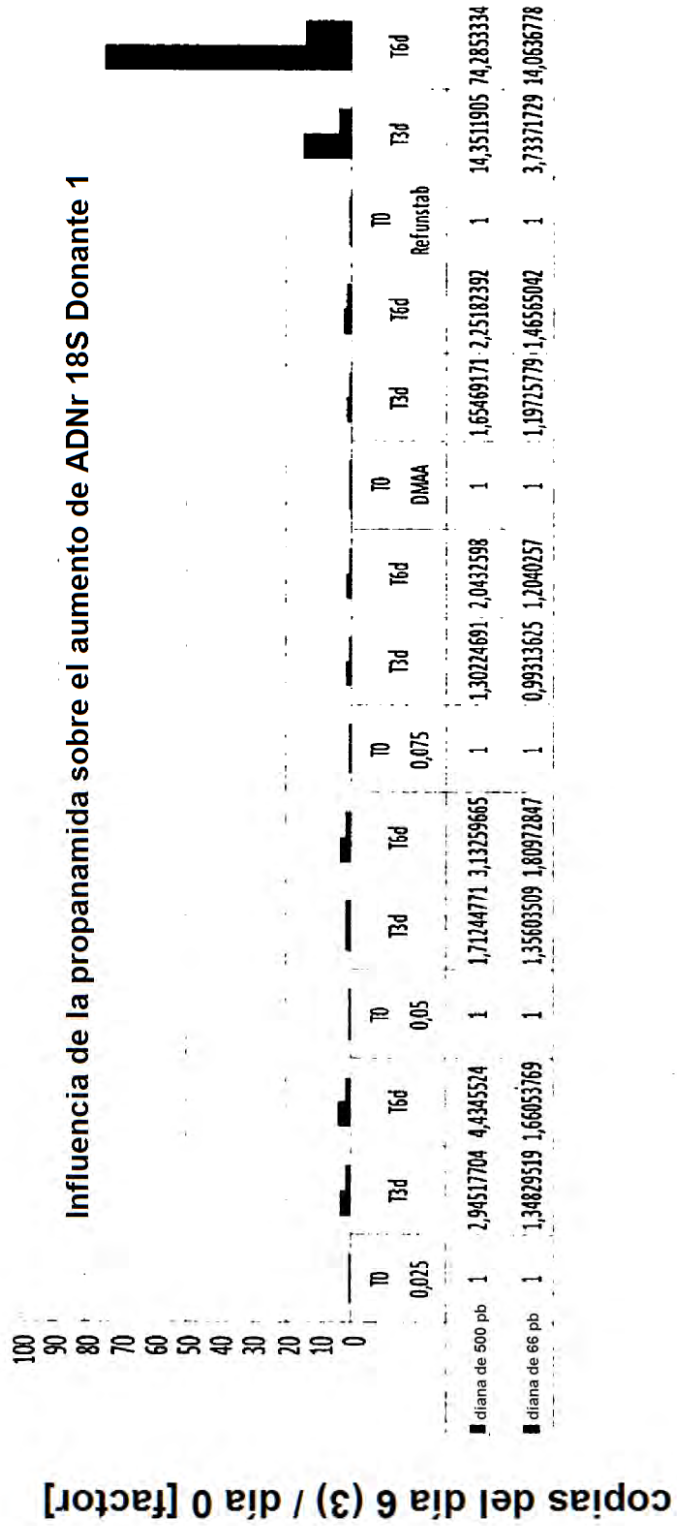


Figura 24

