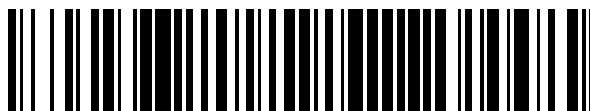


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 247**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2013 PCT/EP2013/070016**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14049022**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2013 E 13766361 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2900834**

54 Título: **Estabilización de muestras biológicas**

30 Prioridad:

25.09.2012 WO PCT/EP2012/068892
18.03.2013 EP 13159835

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2017

73 Titular/es:

QIAGEN GMBH (100.0%)
Qiagen Strasse 1
40724 Hilden, DE

72 Inventor/es:

HORLITZ, MARTIN;
SCHUBERT, ANNABELLE;
SPRENGER-HAUSSELS, MARKUS;
GÜNTHER, KALLE;
WYRICH, RALF y
OELMÜLLER, UWE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 614 247 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 de muestras biológicas

Campo de la invención

5 La tecnología descrita en la presente se refiere, entre otras cuestiones, a métodos y composiciones adecuadas para estabilizar una muestra que contiene células, en particular una muestra de sangre, y a métodos para aislar ácidos nucleicos de las muestras biológicas respectivamente estabilizadas.

Antecedentes de la invención

10 Los ácidos nucleicos son biomarcadores importantes en el campo del diagnóstico, por ejemplo, los perfiles de transcripciones del genoma (en particular ARNm y ARNm) se emplean mucho como biomarcadores en diagnósticos *in vitro* moleculares y proporcionan información acerca de los procesos biológicos normales y patológicos con la intención de predecir el resultado de una enfermedad y de indicar el desarrollo de terapias individualizadas. Por tanto, la determinación del perfil de ácidos nucleicos, en particular del ARN, es importante en el diagnóstico y la prognosis de enfermedades y en ensayos clínicos para el descubrimiento de biomarcadores. La capacidad para obtener información cuantitativa a partir del perfil transcripcional es una herramienta poderosa para explorar la biología básica, para diagnosticar enfermedades, para facilitar el desarrollo de fármacos, para diseñar productos terapéuticos contra patologías y perfiles genéticos específicos, y también para generar bases de datos con respecto a vías y procesos biológicos y terapéuticos. En los últimos años se han producido mejoras significativas en ensayos y análisis de datos (procesos analíticos) corriente abajo. Sin embargo, se ha descubierto que las etapas preanalíticas, tales como la manipulación de muestras y la estabilización de muestras, en particular para nuevas dianas biomoleculares, tienen un impacto muy importante en el perfil de expresión y pueden comprometer el posterior análisis (véase, por ejemplo, Hartel *et al.*, 2001; Pahl y Brune, 2002). Si no se toman precauciones con respecto a la estabilización de la muestra que se va a analizar, la muestra sufrirá cambios durante el transporte y la conservación que pueden alterar gravemente el perfil de expresión de las moléculas implicadas (véase, preferiblemente, Rainen *et al.*, 2002; Baechler *et al.*, 2004). Así, la expresión génica, en particular la expresión génica de células sanguíneas, es sensible a la manipulación *ex vivo* de la muestra. Si el perfil de expresión se altera debido a la manipulación de la muestra, el posterior análisis no reflejará la situación original de la muestra y, por tanto, del paciente, sino que mide un perfil artificial generado durante la manipulación, el transporte y la conservación de la muestra. Por tanto, son necesarios procesos de estabilización optimizados que estabilicen el perfil de expresión para permitir un análisis fiable. En particular, es necesario estabilizar muestras de sangre para permitir el análisis de la expresión génica de células sanguíneas.

15 La estabilización de muestras, tales como, en particular, muestras de sangre, durante un periodo más largo se ha realizado formalmente mediante la adición de disolventes orgánicos, tales como fenol y/o cloroformo, o mediante la congelación directa en nitrógeno líquido o empleando hielo seco. Estos métodos no son técnicas que puedan ponerse en práctica en hospitales, consultorios médicos o laboratorios de diagnóstico habituales. Para solucionar estos problemas, PreAnalytiX desarrolló el primer producto de investigación para la recolección de sangre humana con un tubo de recolección de sangre al vacío que contiene reactivos para la estabilización inmediata del perfil de expresión génica del ARN en el sitio de la recogida de muestras (tubos PAXgene Blood RNA Tubes). La respectiva composición de estabilización permite el transporte y la conservación a temperatura ambiente sin el riesgo de que se produzcan cambios en el perfil de ARN por la inducción de genes y la degradación de la transcripción (véanse, por ejemplo, los documentos US 6.617.170, US 7.270.953, Kruhoffer *et al.*, 2007). Otros agentes de estabilización que logran una lisis inmediata de la muestra, en este caso, sangre, son comercializados por ABI/Life Technologies con el nombre de producto de tubo Tempus Blood RNA Tube. Otro producto es el tubo Biomatrix Vacuette RNAgard Blood Tube. También en este tubo la lisis se produce inmediatamente durante la recolección y las ARNasas son inactivadas, tal como se demuestra por el ARN intacto a lo largo del tiempo de incubación de la sangre. La desventaja de los respectivos métodos es que la estabilización provoca la lisis completa de las células. La destrucción de las células provoca que los ácidos nucleicos intracelulares se mezclen con ácidos nucleicos extracelulares, lo cual evita el análisis separado de estas dos poblaciones de ácidos nucleicos. Además, no solo la calidad y la cantidad de los ácidos nucleicos aislados y, respectivamente, su perfil de expresión, son de interés analítico, sino también la presencia, la ausencia o el número de células específicas contenidas en la muestra, tal como, por ejemplo, una muestra de sangre. La destrucción de las células es una gran desventaja, porque imposibilita la clasificación de células o el enriquecimiento de células, respectivamente, en los análisis de células.

20 Por tanto, muy a menudo se proporcionan reactivos de estabilización específicos, respectivamente tubos de recogida de sangre, que están previstos de modo específico para la estabilización de las células. Los respectivos productos permiten investigar el contenido celular de la muestra después de la conservación, por ejemplo, para detectar la presencia de células tumorales, por ejemplo mediante un análisis de clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) o cambios en la proporción entre los diferentes leucocitos mediante citometría de flujo (FC) o análisis FACS. Por ejemplo, muchas tareas emplean tubos de recolección de sangre con EDTA convencionales para la citometría de flujo o los análisis FACS, aunque las células sanguíneas muestran menos lisis a lo largo del tiempo de conservación. Otro producto de Streck Inc. es un tubo de recolección de sangre al vacío de extracción directa para la conservación de muestras de sangre completa para la inmunofenotipificación mediante citometría de flujo.

Este conserva los antígenos de los leucocitos, lo cual permite distinguir subconjuntos de leucocitos mediante un análisis de citometría de flujo. La tecnología para mantener la integridad de la agrupación de marcadores de diferenciación (CD) de leucocitos se describe, por ejemplo, en los documentos US 5.460.797 y US 5.459.073.

5 Sin embargo, el empleo de diferentes reactivos de estabilización y, por consiguiente, tubos de estabilización para recoger la muestra para el análisis de ácidos nucleicos y el análisis de células resulta tedioso. Es necesario reducir el número de tubos de recolección de muestras diferentes, por ejemplo, tubos de recolección de sangre, por cada extracción en el lugar donde se encuentra el paciente, que están dedicados a diferentes ensayos corriente abajo (por ejemplo, la detección de células y el análisis del ARN). Por tanto, son necesarios procesos de recolección y estabilización de muestras que conserven la morfología de la célula y, al mismo tiempo, que estabilicen los ácidos nucleicos.

10 Para satisfacer la necesidad de una estabilización de las células y una estabilización de los ácidos nucleicos simultáneas, se han desarrollado sistemas de estabilización que están basados en el uso de liberadores de formaldehído. Los respectivos agentes de estabilización están disponibles en el mercado en Streck Inc. con el nombre de Cell-Free RNA BCT (tubo de recolección de sangre). El tubo de recolección de sangre de 10 ml está previsto para la conservación y la estabilización del ARN sin células en el plasma durante hasta 3 días a temperatura ambiente. El conservante estabiliza el ARN sin células en el plasma y evita la liberación de ARN de fondo no diana desde las células sanguíneas durante el procesamiento y la conservación de la muestra. El documento US 2011/0111410 describe el uso de componentes liberadores de formaldehído para lograr la estabilización de las células y del ARN en la misma muestra de sangre. Por tanto, este documento describe una técnica en la que el agente de estabilización estabiliza a las células sanguíneas en la sangre extraída, evitando con ello la contaminación del ARN celular por ARN sin células o ARN de globina, inhibe la síntesis de ARN durante al menos 2 horas, y el ARN celular que está dentro de las células sanguíneas se conserva para mantener el patrón de expresión de las células sanguíneas sustancialmente sin cambios con respecto al momento de la extracción de la sangre. Los leucocitos pueden aislarse de la muestra respectivamente estabilizada y después el ARN celular se extrae de los leucocitos. Sin embargo, el aislamiento de los ácidos nucleicos de las muestras respectivamente estabilizadas es muy difícil, porque el liberador de formaldehído empleado interfiere con el posterior proceso de aislamiento de los ácidos nucleicos. Por tanto, el rendimiento y/o la pureza de los ácidos nucleicos se reduce gravemente, comparado con el aislamiento de los ácidos nucleicos que han sido estabilizados empleando métodos de estabilización que se dirigen específicamente a la estabilización y el aislamiento de ácidos nucleicos, tales como ARN (por ejemplo, los tubos PAXgene Blood RNA Tubes).

25 Además, en la técnica anterior se conocen métodos para estabilizar muestras que contienen células, tales como muestras de sangre o de tejidos, que estabilizan las células, el transcriptoma, el genoma y el proteoma. Uno de estos métodos se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/145710. Dicho método se basa en el uso de compuestos estabilizantes específicos. Por contraste con los métodos de estabilización que incluyen un liberador de formaldehído, el aislamiento de los ácidos nucleicos no se ve alterado por los agentes de estabilización.

35 Otra especie de ácido nucleico presente en muestras biológicas que contienen células que tiene interés clínico son los ácidos nucleicos extracelulares. Se han identificado ácidos nucleicos extracelulares en sangre, plasma, suero y otros fluidos corporales. Los ácidos nucleicos extracelulares que se encuentran en las respectivas muestras son, en cierto grado, resistentes a la degradación debido al hecho de que están protegidos frente a las nucleasas (por ejemplo, porque son segregados en forma de un complejo de proteolípido, están asociados a proteínas o están contenidos dentro de vesículas). La presencia de niveles elevados de ácidos nucleicos extracelulares, tales como ARN y/o ADN, en muchos trastornos médicos, malignidades y procesos infecciosos resulta de interés, entre otros campos, para la selección, el diagnóstico, la prognosis, la vigilancia del avance de la enfermedad, la identificación de dianas terapéuticas potenciales y el control de la respuesta al tratamiento. Además, se está empleando la detección de una mayor cantidad de ADN/ARN fetal en la sangre materna para determinar, por ejemplo, la identidad de género, para evaluar anomalías cromosómicas y para controlar complicaciones asociadas al embarazo. Así, los ácidos nucleicos extracelulares son útiles, en particular, para el diagnóstico no invasivo y la prognosis, y pueden utilizarse, por ejemplo, como marcadores de diagnóstico en muchos campos de aplicación, tales como el ensayo genético prenatal no invasivo, la oncología, la medicina de trasplantes o muchas otras enfermedades y, por tanto, tienen una importancia diagnóstica (por ejemplo, ácidos nucleicos derivados de fetos o de tumores). Sin embargo, los ácidos nucleicos extracelulares también se encuentran en seres humanos sanos. Las aplicaciones y los métodos de análisis de ácidos nucleicos extracelulares habituales se describen, por ejemplo, en los documentos WO97/035589 y 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, volumen 25, n.º 11, pp. 635-640; Fan *et al.* (2010), Clinical Chemistry, 56:8.

40 Tradicionalmente, la primera etapa para aislar ácidos nucleicos extracelulares de una muestra biológica que contiene células, tal como sangre, ha consistido en obtener una fracción fundamentalmente exenta de células de dicha muestra, por ejemplo, suero o plasma en el caso de la sangre. Los ácidos nucleicos extracelulares después se aíslan de dicha fracción exenta de células, de modo habitual plasma, cuando se procesa una muestra de sangre. Sin embargo, la obtención de una fracción fundamentalmente exenta de células de una muestra puede resultar problemático, y con frecuencia la separación es un proceso de múltiples etapas tedioso y largo, puesto que es

importante controlar cuidadosamente las condiciones para evitar la ruptura de las células durante la centrifugación, lo cual podría contaminar a los ácidos nucleicos extracelulares con los ácidos nucleicos celulares liberados durante la ruptura. Además, a menudo es difícil eliminar todas las células. Así, muchas muestras procesadas que a menudo y de modo habitual se clasifican como "sin células", tales como plasma o suero, de hecho aún contienen cantidades residuales de células que no fueron retiradas durante el proceso de separación. Otra consideración importante es que los ácidos nucleicos celulares se liberan de las células contenidas en la muestra debido a la ruptura celular durante la incubación *ex vivo*, generalmente dentro de un periodo de tiempo relativamente corto desde el acontecimiento de extracción de la sangre. Cuando comienza la lisis celular, las células lisadas liberan más ácidos nucleicos que se mezclan con los ácidos nucleicos extracelulares, y cada vez se hace más difícil recuperar los ácidos nucleicos extracelulares para el ensayo. Estos problemas han sido analizados en la técnica anterior (véase, 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 recuperabilidad de los ácidos nucleicos extracelulares disponibles puede disminuir sustancialmente a lo largo del tiempo debido a la degradación.

En la técnica anterior se conocen métodos que se dirigen específicamente a la estabilización de los ácidos nucleicos en circulación contenidos en sangre completa. Un método emplea el formaldehído para estabilizar las membranas celulares, reduciendo con ello la lisis celular, y, además, el formaldehído inhibe a las nucleasas. Los 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 de sustancias que liberan formaldehído tiene inconvenientes, puesto que pueden comprometer la eficacia del aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares mediante la inducción de entrecruzamientos entre las moléculas de ácidos nucleicos o entre las proteínas y los ácidos nucleicos. Se describen métodos alternativos para estabilizar muestras de sangre, por ejemplo, en los documentos US 2010/0184069 y US 2010/0209930. Esto demuestra la gran necesidad de proporcionar medios para estabilizar muestras biológicas que contienen células para permitir una recuperación eficaz, por ejemplo, de los ácidos nucleicos extracelulares contenidos en dichas muestras.

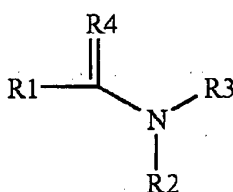
Sigue siendo necesario desarrollar técnicas de procesamiento de muestras que produzcan la estabilización del perfil de expresión génica y de la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en la muestra biológica que contiene células, tal como una muestra de sangre completa, haciendo con ello que la manipulación, respectivamente el procesamiento de dichas muestras estabilizadas sea más fácil.

Un objeto de la presente invención es superar al menos uno de los inconvenientes de los métodos de estabilización de muestras de la técnica anterior. En particular, un objeto consiste en proporcionar un método que sea capaz de estabilizar una muestra que contiene células, en particular una muestra de sangre completa. En particular, un objeto consiste en proporcionar un método de estabilización de muestras que permita estabilizar a los ácidos nucleicos contenidos en la muestra que contiene células. Además, un objeto consiste en proporcionar un método de estabilización de muestras que no se basa en la lisis celular y que estabiliza a la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en la muestra que contiene células, así como el perfil de expresión de las células contenidas.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que ciertos aditivos son sorprendentemente eficaces para 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 ha descubierto que estos aditivos son muy eficaces para 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. Además, se descubrió que estos aditivos también son capaces de estabilizar los perfiles de expresión génica de células contenidas, permitiendo con ello la determinación del perfil de expresión génica. Por contraste con los métodos de la técnica anterior, el efecto de estabilización no se basa en la lisis celular. Por tanto, las tecnologías de estabilización descritas en la presente también permiten el análisis separado de la población de ácidos nucleicos extracelulares e intracelulares si se desea. Además, la estabilización descrita en la presente permite analizar células contenidas en la muestra estabilizada, por ejemplo, la morfología celular y/o las características de la superficie celular.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para estabilizar 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

en la que R1 es un resto hidrógeno o un resto alquilo, R2 y R3 son restos hidrocarburo iguales o diferentes con una longitud de la cadena de carbonos de 1-20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un resto oxígeno, azufre o selenio, y en el que dicho compuesto según la fórmula 1 es una N,N-dialquilpropanamida.

5 Las N,N-dialquilpropanamidas, tal como la N,N-dimetilpropanamida, son agentes estabilizantes muy eficaces para muestras que contienen células, en particular muestras de sangre. Se ha descubierto que la adición de un respectivo compuesto tiene un efecto estabilizante ventajoso sobre la población de ácidos nucleicos extracelulares. Tal como se muestra en los ejemplos, los compuestos según la fórmula 1 que son N,N-dialquilpropanamidas son adecuados para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en una muestra que contiene células. Además, tal como se muestra en los ejemplos, estos compuestos son adecuados para estabilizar y, por tanto, conservar el perfil de transcripción génica de las células contenidas. Tal como se muestra en los ejemplos, después de la estabilización, los cambios en el perfil de expresión génica se reducen e incluso se evitan durante el periodo de estabilización. Así, el perfil de expresión génica básicamente se "congela" después de la estabilización con una N,N-dialquilpropanamida y, por tanto, se conserva en el estado de la recolección de la muestra, respectivamente la muestra estabilizada. Preferiblemente, la muestra que contiene células se selecciona de sangre completa, plasma o suero. Además, las propiedades de estabilización de células logradas permiten analizar y también separar células específicas contenidas en la muestra estabilizada, tales como, por ejemplo, células sanguíneas o células tumorales en circulación contenidas en una muestra de sangre.

20 Para potenciar el efecto de estabilización, un objeto de la presente invención también consiste en proporcionar combinaciones de agentes estabilizantes, por ejemplo, para estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en una muestra que contiene células y/o el perfil de transcripción génica de las células contenidas. Una respectiva combinación puede comprender al menos un compuesto según la fórmula 1 tal como se definió anteriormente, que es una N,N-dialquilpropanamida, y al menos un inhibidor de la apoptosis. De modo sorprendente, se ha descubierto que un inhibidor de la apoptosis, tal como, en particular, un inhibidor de la caspasa, reduce las contaminaciones de la población de ácidos nucleicos extracelulares por ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que se originan de las células contenidas en la muestra, por ejemplo, de células dañadas o moribundas. Así, la combinación de estabilización que incluye un inhibidor de la apoptosis es muy eficaz para conservar sustancialmente la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en la muestra en el estado que mostraba en el momento de obtener la muestra biológica, respectivamente recolectada.

30 Una respectiva combinación también puede comprender aditivos adicionales que potencian el efecto estabilizante, tales como, por ejemplo, agentes quelantes. En el caso de que la muestra sea sangre o una muestra derivada de sangre, habitualmente también se añade un anticoagulante. Los agentes quelantes, tales como, por ejemplo, EDTA, son adecuados para este fin. Las respectivas combinaciones estabilizantes pueden utilizarse de modo ventajoso en el método para estabilizar una muestra que contiene células, según el primer aspecto.

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

a) estabilizar una muestra que contiene células según el método definido en el primer aspecto de la presente invención;

b) aislar los ácidos nucleicos de la muestra estabilizada.

40 La estabilización en la etapa a) se logra según el primer aspecto según la presente invención, tal como se describió anteriormente. Tal como se analizó anteriormente, la estabilización según la presente invención, entre otras cuestiones, tiene el efecto de que la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en la muestra se conserva sustancialmente en el estado que presentaba en el momento de obtener la muestra biológica, respectivamente recolectada. Por tanto, los ácidos nucleicos extracelulares obtenidos de una muestra respectivamente estabilizada comprenden menos contaminaciones por ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que surgen, por ejemplo, de células en descomposición comprendidas en la muestra, comparado con los ácidos nucleicos extracelulares que se obtienen de una muestra no estabilizada. La conservación sustancial de la población de ácidos nucleicos extracelulares es una ventaja importante, porque esta estabilización/conservación potencia la precisión de cualquier ensayo posterior. Permite la homologación del aislamiento y los posteriores análisis de la población de ácidos nucleicos extracelulares, permitiendo con ello que las aplicaciones de diagnóstico o de prognosis que se basan en la fracción de ácidos nucleicos extracelulares sean más fiables y más independientes de las condiciones de conservación/manipulación empleadas. Con ello se mejora la aplicabilidad para el diagnóstico y la prognosis de los ácidos nucleicos extracelulares respectivamente aislados. En particular, las indicaciones de la presente invención tienen la ventaja de que la proporción de ciertas moléculas de ácidos nucleicos extracelulares puede mantenerse sustancialmente constante, comparado con la proporción en el momento en que se recolectó la muestra. La estabilización logra que los ácidos nucleicos intracelulares se mantengan sustancialmente dentro de las células y que los ácidos nucleicos extracelulares sean sustancialmente estabilizados. Además, los métodos de estabilización descritos en la presente también son adecuados para estabilizar los ácidos nucleicos intracelulares. Después de la estabilización de la muestra, el ARN intracelular resulta protegido frente a la desnaturalización y, además, los cambios en el perfil de transcripción génica de las células contenidas son inhibidos. Así, la estabilización descrita en la presente, en particular, reduce la degradación *in vitro* y

minimiza la inducción de genes. Por tanto, los ácidos nucleicos intracelulares aislados de las muestras respectivamente estabilizadas son adecuados, por ejemplo, para la determinación de los perfiles de expresión génica y otros métodos analíticos que requieran una representación precisa de los niveles de transcripciones *in vivo* en la muestra estabilizada. Además, de forma ventajosa, el método de estabilización descrito en la presente permite, si se desea, aislar ácidos nucleicos extracelulares estabilizados por separado de los ácidos nucleicos intracelulares estabilizados de la misma muestra estabilizada.

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

a) al menos un compuesto según la fórmula 1, según se definió anteriormente; y

b) al menos un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante.

Una respectiva composición estabilizante resulta particularmente eficaz para estabilizar una muestra biológica que contiene células, en particular sangre completa, plasma y/o suero mediante la estabilización de las células y la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en dicha muestra. Además, una respectiva composición estabilizante es eficaz para estabilizar el perfil de transcripción génica de las células contenidas. Además, pueden conservarse características celulares importantes, tales como, por ejemplo, las características de morfología celular y/o de la superficie celular de las células contenidas, tal como muestran los ejemplos. Una respectiva composición estabilizante permite la conservación y/o la manipulación, por ejemplo, el transporte de la muestra, por ejemplo, sangre completa, a temperatura ambiente durante al menos dos, o preferiblemente al menos tres días sin comprometer sustancialmente la calidad de la muestra, respectivamente la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en ella. Así, cuando se emplea la composición de estabilización según la presente invención, el tiempo entre la recolección de la muestra, por ejemplo, la recolección de sangre, y la extracción de los ácidos nucleicos puede variar sin que se produzca un efecto sustancial sobre la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en la muestra o el perfil de expresión génica de las células contenidas. Esta es una ventaja importante, puesto que reduce la variabilidad en la población de ácidos nucleicos extracelulares y la población de ácidos nucleicos intracelulares, en particular los niveles de transcripciones, atribuibles a diferentes procedimientos de manipulación. Según una realización, la composición comprende además al menos un inhibidor de la apoptosis, preferiblemente un inhibidor de caspasa.

Según un cuarto aspecto, se proporciona un recipiente para recolectar una muestra biológica que contiene células, preferiblemente una muestra de sangre, en el que el recipiente comprende una composición según el tercer aspecto de la presente invención. El suministro de un respectivo recipiente, por ejemplo, un tubo de recolección de muestras que comprende la composición estabilizante tiene la ventaja de que la muestra se estabiliza inmediatamente en cuanto la muestra se recolecta en el respectivo recipiente. Además, un respectivo recipiente de recolección de muestras, en particular un tubo de recolección de sangre, es capaz de estabilizar a las células sanguíneas y su perfil de transcripción génica, y es capaz de estabilizar a los ácidos nucleicos extracelulares y, opcionalmente, virus, respectivamente ácidos nucleicos víricos contenidos en una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre. Con ello se soluciona otro problema.

Según un quinto aspecto, se proporciona un método que comprende la etapa de recolectar, preferiblemente extraer, una muestra biológica, preferiblemente sangre, de un paciente directamente hacia una cámara de un recipiente según el cuarto aspecto de la presente invención.

Según un sexto aspecto, se proporciona un método para producir una composición según el tercer aspecto de la presente invención, en el que los componentes de la composición se mezclan, preferiblemente se mezclan en una disolución. El término "disolución", tal como se emplea en la presente, se refiere en particular a una composición líquida, preferiblemente una composición acuosa. Puede ser una mezcla homogénea de una sola fase, pero también se incluye dentro del alcance de la presente invención una disolución que comprenda componentes sólidos, tales como, por ejemplo, precipitados.

Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas. Sin embargo, debe entenderse que la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la solicitud, tan solo se ofrecen como ilustración.

Breve descripción de las figuras

Las figuras 1 a 4: Niveles relativos de transcripciones de FOS, IL1B, IL8 y TP53 de las muestras del ejemplo 1. Las transcripciones se analizaron empleando ensayos RT-PCR monoplex a tiempo real. Los niveles de transcripciones indicados como umbrales de ciclo (CT) de muestras individuales se muestran en forma de barras blancas, los promedios como barras negras, y las desviaciones estándar y las muestras control de un donante adicional de un experimento diferente sirven como control positivo de los cambios en la expresión génica, y la RT-PCR dentro de cada ensayo PCR (placa control) aparece como barras grises.

Fig. 5: Análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (α CD3 FACS) de partes alícuotas de muestras de

sangre recolectadas de un donante hacia tubos con EDTA. Las partes alícuotas de sangre se sometieron a FACS empleando un anticuerpo anti-CD3 conjugado con PE de muestras que no fueron incubadas después de la recolección de sangre (0 h) y muestras después de uno y tres días de incubación a TA (24 h, 72 h). Se contó el número de células marcadas con fluorescencia y se cuantificó la intensidad de la señal de fluorescencia por acontecimiento. La intensidad (eje x) y el número de señales de fluorescencia (eje y) se muestran en forma de histogramas. Se definen umbrales para diferenciar las señales de fluorescencia débiles no específicas (-) de las señales de fluorescencia específicas más intensas provocadas por el anticuerpo anti-CD3 unido específicamente a las células (+). Los umbrales se muestran como líneas verticales discontinuas en cada gráfica.

Control de FACS (-) (EDTA) = Partes alícuotas de sangre recogida en tubos con EDTA que se mantuvieron sin tratar con el estabilizante y que no fueron incubadas con anticuerpo (muestras no teñidas) para actuar como controles negativos del análisis FACS. Las señales débiles detectadas son provocadas por la autofluorescencia y los anticuerpos unidos no específicamente (tinción de fondo).

Control de FACS (+) (EDTA) = Partes alícuotas de sangre recogida en tubos con EDTA que se mantuvieron sin tratar con el estabilizante y que se incubaron anticuerpo (muestras teñidas) para actuar como controles positivos del análisis FACS. Además de las señales débiles que también aparecen en el control de FACS (-), se detectaron señales intensas que son provocadas exclusivamente por los anticuerpos que se unen específicamente a las células.

Disolución de ensayo de DMPA al 5% en v/v = Parte alícuotas de sangre recolectada en tubos con EDTA y mezclada con el estabilizante (concentración final de N,N-dimetilpropionamida al 5% en v/v, 5x tampón MOPS, pH 5,5), seguido de una incubación con anticuerpo (muestras teñidas).

Control de FACS (+)/Disolución de ensayo = Histogramas combinados de control de FACS (+) (EDTA) [área gris] y muestra de ensayo [línea negra].

Las figuras 6-7: Influencia de la N,N-dimetilpropanamida sin inhibidor de caspasa sobre el aumento en ARNr 18S (ejemplo 2).

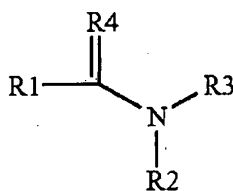
Las figuras 8-6: Influencia de diferentes concentraciones de N,N-dimetilpropanamida en combinación con un inhibidor de caspasa sobre el aumento en ARNr 18S (ejemplos 3-5).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se dirige a métodos, composiciones y dispositivos y, por tanto, a las tecnologías adecuadas para la estabilización de una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra biológica que contiene células y/o el perfil de transcripción génica de las células contenidas. Las tecnologías de estabilización descritas en la presente, por ejemplo, reducen el riesgo de que la población de ácidos nucleicos extracelulares se vea contaminada por ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que se originan, por ejemplo, son liberados por células dañadas o moribundas contenidas en la muestra. Además, las tecnologías de estabilización descritas en la presente sustancialmente conservan el perfil de transcripción génica de las células contenidas, permitiendo con ello un análisis fiable de los perfiles de expresión génica. Además, la estabilización descrita en la presente evita las contaminaciones de ácidos nucleicos extracelulares por ácidos nucleicos intracelulares y viceversa, lo cual permite un análisis separado de la población de ácidos nucleicos extracelulares y los ácidos nucleicos intracelulares de la misma muestra que contiene células estabilizadas. Por tanto, la presente invención logra la estabilización de la muestra y, por tanto, la estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en ella sin la lisis de las células contenidas. Por el contrario, las células contenidas en la muestra son estabilizadas, evitando o reduciendo con ello sustancialmente la liberación de ácidos nucleicos intracelulares. Además, tal como se muestra en los ejemplos, el perfil de transcripción génica de las células contenidas se conserva sustancialmente, mediante la inhibición de los cambios y, por tanto, de las alteraciones en los niveles de transcripciones. Además, las células pueden recuperarse de las muestras estabilizadas y resultan adecuadas para diferentes análisis, por ejemplo, pueden analizarse las características de morfología celular y/o de la superficie celular de las células contenidas si se desea. Además, la muestra estabilizada puede analizarse para la presencia o la ausencia de células específicas, tales como, por ejemplo, células tumorales, por ejemplo, células tumorales en circulación presentes en muestras de sangre completa. La notable estabilización de los ácidos nucleicos que se logra con los métodos y las composiciones de la presente invención permite la conservación y/o la manipulación de la muestra estabilizada durante un periodo de tiempo prolongado a temperatura ambiente sin poner en peligro la calidad de la muestra, respectivamente los ácidos nucleicos extracelulares contenidos en ella. Puesto que la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares y el transcriptoma intracelular están estabilizados y, por tanto, sustancialmente conservados en el momento de obtener la muestra empleando las indicaciones de la presente invención, el momento entre la recolección de la muestra y la extracción de los ácidos nucleicos puede variar sin afectar significativamente a la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares. Esto permite la homologación, por ejemplo, de análisis de ácidos nucleicos extracelulares de diagnóstico o prognosis, porque las variaciones en la manipulación/conservación de las muestras influyen menos en la calidad, respectivamente la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares, proporcionando con ello una ventaja importante frente a los métodos de la técnica anterior. Por tanto, las muestras, respectivamente los

ácidos nucleicos extracelulares obtenidos de las muestras respectivamente estabilizadas pueden compararse mejor. Además, la estabilización lograda del perfil de transcripción génica de las células contenidas permite un análisis fiable de la expresión génica incluso después de la conservación prolongada de las muestras estabilizadas. Además, de modo ventajoso, las indicaciones de la presente invención obvian la necesidad de separar directamente las células contenidas en la muestra de la porción sin células de la muestra para evitar, respectivamente reducir las contaminaciones de los ácidos nucleicos extracelulares con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que, por lo demás, se libera de las células en descomposición. Esta ventaja simplifica considerablemente la manipulación de las muestras, en particular la manipulación de las muestras de sangre completa, por ejemplo, las muestras de sangre completa obtenidas en una clínica y estabilizadas según las indicaciones de la presente invención pueden transportarse a temperatura ambiente, y el plasma que contiene los ácidos nucleicos extracelulares puede separarse de modo conveniente de las células contenidas en el laboratorio clínico de recepción. Sin embargo, las indicaciones de la invención también resultan ventajosas cuando se procesan muestras biológicas depuradas de células, o muestras que se denominan habitualmente "exentas de células", tales como, por ejemplo, plasma o suero sanguíneo. Las respectivas muestras biológicas depuradas de células o "exentas de células" todavía pueden comprender (dependiendo también del proceso de separación utilizado) células residuales, en particular leucocitos que comprenden ADN genómico que, por consiguiente, suponen un 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 (potencialmente) remanentes están dañadas o mueren durante el transporte del proceso de conservación. Este riesgo se reduce considerablemente cuando se emplea el método de estabilización indicado en la presente invención. Debido a que la tecnología de la presente invención permite conservar de modo eficaz a la población de ácidos nucleicos extracelulares de la muestra y el perfil de expresión génica de las células contenidas en el momento de recolección de la muestra y el contacto con los agentes estabilizantes, dichas muestras pueden tratarse de modo adecuado en las instalaciones receptoras para aislar los ácidos nucleicos extracelulares de dichas muestras, mientras que, al mismo tiempo, se evita sustancialmente la contaminación, respectivamente se reduce la contaminación de la población de ácidos nucleicos extracelulares con ácidos nucleicos intracelulares. Los ácidos nucleicos intracelulares pueden aislarse de las células estabilizadas y pueden utilizarse, por ejemplo, para la determinación de los perfiles de expresión génica. Las instalaciones que reciban las muestras, tales como, por ejemplo, laboratorios, generalmente también poseen el equipo necesario, tal como, por ejemplo, centrifugas de alta velocidad (u otros medios, véase también a continuación) para retirar de modo eficaz las células comprendidas en las muestras, que incluyen las células residuales que puedan estar presentes en las muestras depuradas de células, tales como, por ejemplo en el plasma sanguíneo. Este equipo a menudo no está presente en las instalaciones en las que se obtiene la muestra. Así, la presente invención presenta muchas ventajas cuando estabiliza muestras biológicas que comprenden una gran cantidad de células, tales como, por ejemplo, muestras de sangre completa, pero también presenta ventajas importantes cuando estabilizan muestras biológicas que comprenden solo una pequeña cantidad de células, o que pueden ser sospechosas de contener células, tales como, por ejemplo, plasma, suero, orina, saliva, fluidos sinoviales, fluido amniótico, fluido lagrimal, icores, fluido cerebroespinal y similares.

Según un primer aspecto, se proporciona un método para estabilizar una muestra que contiene células, preferiblemente una muestra de sangre, mediante el contacto de la muestra con al menos un compuesto según la fórmula 1



Fórmula 1

en la que R1 es un resto hidrógeno o un resto alquilo, R2 y R3 son restos hidrocarburo iguales o diferentes con una longitud de la cadena de carbonos de 1-20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un resto oxígeno, azufre o selenio, y en el que dicho compuesto según la fórmula 1 es una N,N-dialquilpropanamida.

Por consiguiente, en un primer aspecto se proporciona un método para estabilizar una muestra biológica que contiene células, poniendo en contacto la muestra con al menos una N,N-dialquilpropanamida. Una N,N-dialquilpropanamida es un compuesto según la fórmula 1, en la que R1 es un resto alquilo, R2 y R3 son restos alquilo iguales o diferentes, y R4 es oxígeno.

Tal como muestran los ejemplos proporcionados, estos compuestos son eficaces, entre otras cuestiones, para lograr un notable efecto estabilizante sobre la muestra que contiene células, por ejemplo, pueden conservar sustancialmente la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares en la muestra estabilizada. Por tanto, se reduce el riesgo de que la población de ácidos nucleicos extracelulares se vea contaminada por ácidos

nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que se originan de las células contenidas, por ejemplo, de células dañadas o moribundas y/o la degradación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra se reduce, respectivamente se inhibe. Esto provoca el efecto de que la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en dicha muestra sustancialmente se conserva, respectivamente se estabiliza. Además puede emplearse una mezcla de uno o más compuestos según la fórmula 1 para la estabilización.

Las expresiones "ácidos nucleicos extracelulares" o "ácido nucleico extracelular", tal como se emplean en la presente, se refieren en particular a los ácidos nucleicos que no están contenidos en células. Los respectivos ácidos nucleicos extracelulares a menudo se denominan ácidos nucleicos sin células o exentos de células. Estas expresiones se emplean como sinónimos en la presente. Por tanto, los ácidos nucleicos extracelulares están presentes fuera de una célula o fuera de una pluralidad de células dentro de una muestra. La expresión "ácidos nucleicos extracelulares" se refiere, por ejemplo, al ARN extracelular, así como al ADN extracelular. Los ejemplos de ácidos nucleicos extracelulares típicos que se encuentran en la fracción sin células (respectivamente, porción) de muestras biológicas, tales como fluidos 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 extracelular asociado a tumores o derivado de tumores, otros ADN y/o ARN extracelulares relacionados con enfermedades, ADN epigenéticamente modificado, ADN y/o ARN fetal, ARN interferente pequeño, tal como, por ejemplo, ARNm y ARNsi, y ácidos nucleicos extracelulares que no son de mamífero, tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos víricos, ácidos nucleicos de patógenos liberados hacia la población de ácidos nucleicos extracelulares, por ejemplo, procedentes de procariontes (por ejemplo, bacterias), virus, parásitos eucariotas u hongos. La población de ácidos nucleicos extracelulares habitualmente comprende cierta cantidad de ácidos nucleicos intracelulares que han sido liberados de células dañadas o moribundas, por ejemplo, la población de ácidos nucleicos extracelulares presente en la sangre habitualmente comprende ARNm de globina intracelular que ha sido liberado de células dañadas o moribundas. Este es un proceso natural que se produce *in vivo*. Estos ácidos nucleicos intracelulares presentes en la población de ácidos nucleicos extracelulares incluso pueden servir como control para un posterior método de detección de ácidos nucleicos. El método de estabilización descrito en la presente, en particular, reduce el riesgo de que la cantidad de ácidos nucleicos intracelulares, tales como ADN genómico, que están incluidos en la población de ácidos nucleicos extracelulares aumente significativamente después de recolectar la muestra que contiene células debido a la manipulación *ex vivo* de la muestra. Así, las alteraciones de la población de ácidos nucleicos extracelulares debido a la manipulación *ex vivo* se reducen e incluso pueden evitarse. Según una realización, el ácido nucleico extracelular se obtiene de una muestra biológica que contiene células de un fluido corporal que contiene respectivamente el ácido nucleico, tal como, por ejemplo, sangre, plasma, suero, saliva, orina, licor, fluido cerebroespinal, esputo, fluido lagrimal, sudor, fluido amniótico o linfático. En la presente, los ácidos nucleicos extracelulares que se obtienen de fluidos corporales en circulación se denominan ácidos nucleicos sin células en circulación o extracelulares en circulación. Según una realización, la expresión ácido nucleico extracelular se refiere, en particular, a ácidos nucleicos extracelulares de mamífero. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a ácidos nucleicos extracelulares asociados con enfermedades o derivados de enfermedades, tales como ácidos nucleicos extracelulares asociados a tumores o derivados de tumores, ácidos nucleicos extracelulares liberados debido a inflamaciones o lesiones, en particular, traumatismos, ácidos nucleicos extracelulares relacionados y/o liberados debido a otras enfermedades, o ácidos nucleicos extracelulares derivados de un feto. Las expresiones "ácidos nucleicos extracelulares" o "ácido nucleico extracelular", tal como se emplean en la presente, se refieren también a los ácidos nucleicos extracelulares obtenidos de otras muestras, en particular de muestras biológicas distintas de los fluidos corporales. Habitualmente en la muestra está incluido más de un ácido nucleico extracelular. Habitualmente, una muestra comprende más de un tipo de ácido nucleico extracelular. La expresión "población de ácidos nucleicos extracelulares", tal como se emplea en la presente, se refiere al colectivo de diferentes ácidos nucleicos extracelulares que están contenidos en una muestra que contiene células. Una muestra que contiene células habitualmente comprende una población de ácidos nucleicos extracelulares característica y, por tanto, exclusiva. Así, el tipo y/o la cantidad de dichos uno o más ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en la población de ácidos nucleicos extracelulares de una muestra específica son importantes características de la muestra. Tal como se analizó anteriormente, es, por tanto, importante estabilizar y así conservar sustancialmente dicha población de ácidos nucleicos extracelulares, puesto que su composición y/o la cantidad de dichos uno o más ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en la población de ácidos nucleicos extracelulares de una muestra puede proporcionar información valiosa en el campo médico, de prognosis o de diagnóstico. Por tanto, resulta ventajoso estabilizar de modo eficaz el perfil de la población de ácidos nucleicos extracelulares. 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 ADN genómico, después de recoger la muestra. La conservación sustancial de la población de ácidos nucleicos extracelulares que puede lograrse mediante las tecnologías de estabilización según la invención permite que la población de ácidos nucleicos extracelulares dentro de una muestra se mantenga sustancialmente sin cambios a lo largo de un periodo de estabilización, comparado 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 incluidos, en particular los cambios atribuibles a un aumento del ADN genómico liberado, se reducen significativamente a lo largo del periodo de estabilización (preferiblemente en al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95%), comparado con una muestra no estabilizada o una correspondiente muestra que, por ejemplo, se estabiliza con EDTA en el caso de una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre.

Además, tal como se describió anteriormente, el método de la invención también es adecuado para estabilizar ácidos nucleicos intracelulares, en particular ARN intracelular. La puesta en contacto de la muestra que contiene células con una N,N-dialquilpropanamida según la fórmula 1 da como resultado que los niveles de transcripciones génicas de las células contenidas se estabilizan. Así, la generación de nuevas transcripciones y la degradación de las transcripciones existentes en la muestra estabilizada resultan inhibidas, comparado con una muestra no estabilizada, y así se "congela" sustancialmente el perfil de transcripción génica de las células contenidas después de la estabilización. Por tanto, la estabilización también es adecuada para estabilizar el transcriptoma, manteniendo los niveles de las transcripciones en el estado en que existían en el momento de la recolección y estabilización de la muestra. El término transcriptoma se refiere, en particular, al conjunto de todas las moléculas de ARN, que incluyen ARNm, ARNr, ARNt y otros ARN no codificadores, tales como ARNmi, producidos en una célula o en una población de células. Tal como se demuestra en los ejemplos, pueden estabilizarse muestras biológicas que contienen células, tales como muestras de sangre, durante al menos tres días e incluso más tiempo sin cambios sustanciales en los niveles de las transcripciones. El perfil de transcripción génica se estabiliza, en particular, reduciendo la degradación del ARN y minimizando las alteraciones de la expresión génica, tal como, en particular, la inducción o infraregulación de genes. Sin pretender limitación alguna por la teoría, se cree que los compuestos según la fórmula 1 empleados en la presente para la estabilización inhiben los procesos celulares, con lo cual se inhibe la síntesis de nuevas transcripciones, así como la degradación de las transcripciones existentes. Se cree que entran en la célula y, por tanto, son permeables a las células para lograr estos efectos. Así, después de la recolección y la estabilización de la muestra que contiene células, se conserva el perfil de expresión génica *in vivo* que existe en el momento de la recolección, respectivamente la estabilización. Además, se mantiene la calidad y la integridad del ARN, proporcionando con ello una representación precisa de los niveles de transcripciones *in vivo* en el momento de la recolección de la muestra, respectivamente la estabilización de la muestra, y permite obtener un nivel de transcripciones real y preciso. La conservación del perfil de transcripción génica *in vivo* tras la estabilización permite realizar, por ejemplo, la determinación de los perfiles de expresión génica u otros métodos analíticos que requieran una representación precisa de los niveles de transcripción empleando las muestras respectivamente estabilizadas. Sin embargo, aunque se desee, a menudo no es necesario que todos los niveles de transcripción se estabilicen o se estabilicen igualmente bien. La estabilización y, por tanto, las características de actuación para una transcripción diana nueva o específica deben validarse, lo cual también es habitual con las tecnologías de la técnica anterior que estabilizan los perfiles de transcripción génica. El hecho de que se haya logrado la estabilización del perfil de transcripción génica o de niveles de transcripciones específicas puede determinarse, por ejemplo, basándose en genes marcadores que se establecen para analizar la estabilización del perfil de transcripción génica. Según una realización, la estabilización del perfil de transcripción génica o del nivel de transcripciones de las células contenidas lograda por el método da como resultado que uno o más, preferiblemente dos o más genes marcadores seleccionados de c-fos, IL-1beta, IL-8 y p53 están estabilizados durante al menos 48 h después de la estabilización. Se sabe que estos genes marcadores proporcionan transcripciones muy inestables durante la conservación y, por tanto, en ausencia de una estabilización apropiada, se encuentran sobre- o infrareguladas después de la recolección de la muestra. Por tanto, los niveles de transcripciones de estos genes son adecuados como marcadores para determinar si se ha logrado la estabilización del nivel de transcripción génica. El efecto de estabilización puede analizarse empleando los ensayos de RT-PCR a tiempo real descritos en los ejemplos. Según una realización, los niveles de transcripciones de uno o más de estos genes marcadores no se alteran en más de 1,5 valores CT, preferiblemente 1,25 valores CT, más preferiblemente 1 valor CT entre T₀ (punto de estabilización) y el final del periodo de estabilización. Preferiblemente, se logra un respectivo efecto de estabilización durante al menos 48 h, al menos 72 h o al menos 96 h. Preferiblemente, se logran las respectivas características de estabilización al menos con los genes marcadores c-fos, IL8 e IL-1beta, y preferiblemente con todos los genes marcadores mencionados anteriormente. Tal como se muestra en los ejemplos, la N,N-dialquilpropanamida logra una respectiva actuación de estabilización y, por tanto, es un estabilizante preferido.

Además, puesto que el método según la presente invención no se basa en la lisis celular, las células pueden separarse de la muestra estabilizada después del periodo de estabilización, y las células aisladas de la muestra estabilizada son adecuadas para el análisis. Por ejemplo, tal como se describió anteriormente, pueden aislarse ácidos nucleicos intracelulares, tales como ARN, a partir de las células comprendidas y después analizarse. Además, la conservación de las células en las muestras estabilizadas abre la posibilidad de seleccionar o capturar células, e incluso de enriquecer en células específicas, tales como, por ejemplo, células tumorales que pueden ser analizadas específicamente, por ejemplo, pueden aislarse células tumorales en circulación y analizarse su perfil de expresión génica. Además, puede analizarse la morfología celular y/o los marcadores celulares, en particular marcadores de la superficie celular, para caracterizar las células obtenidas. Además, pueden aislarse ácidos nucleicos intracelulares a partir de dichas células específicas enriquecidas, por ejemplo, puede aislarse el ARN de dichas células. Las propiedades estabilizantes del nivel de transcripciones del método estabilizante descrito en la presente permiten emplear, de modo ventajoso, el ARN aislado para la determinación del perfil de expresión génica y otros análisis importantes. El método de estabilización descrito en la presente, por tanto, resulta ventajoso, por ejemplo, para el diagnóstico molecular del cáncer u otras enfermedades, porque permite un enriquecimiento de células antes de la extracción de los ácidos nucleicos de las células enriquecidas y, por tanto, aumenta, por ejemplo, la probabilidad de detectar acontecimientos raros de células tumorales en circulación en las muestras que contienen células, por ejemplo, en una muestra de sangre. Esto también aumenta la probabilidad de que un biomarcador específico, en particular, un biomarcador raro, se identifique en la muestra.

Según una realización, la muestra que contiene células es una muestra de sangre, en la que los leucocitos son estabilizados. Esto permite separar los leucocitos de la muestra estabilizada. Los leucocitos están estabilizados si al menos un tipo de las células sanguíneas contenidas se estabiliza durante el periodo de estabilización, que preferiblemente es de al menos 48 h. Según una realización, los linfocitos y/o monocitos contenidos en la muestra de sangre son estabilizados. La estabilización descrita en la presente no induce ni estimula la lisis de células nucleadas contenidas en la muestra que contiene células. Así, la estabilización no se basa en la lisis celular. Preferiblemente, cuando la muestra que contiene células es sangre y el ácido nucleico de interés es un ácido nucleico extracelular, en particular ARN extracelular, la estabilización empleada en la presente evita la hemólisis. La mayoría de las causas de hemólisis *in vitro* están relacionadas con la recolección del espécimen. Sin embargo, la hemólisis *in vitro* habitualmente también aparece en una muestra de sangre durante la conservación *ex vivo* si no se emplea un método de estabilización adecuado. Dependiendo del ácido nucleico extracelular de interés, la hemólisis puede ser un problema importante. Si el ácido nucleico extracelular de interés es ADN, la hemólisis no es tan problemática, porque los eritrocitos no contienen núcleo y, por consiguiente, no contienen ADN genómico. Por tanto, no se libera ADN intracelular de los eritrocitos durante la hemólisis. Cuando el ácido nucleico extracelular de interés es ADN, en particular la lisis o descomposición de los leucocitos sí es un problema, porque en este caso, se libera ADN genómico además del ARN intracelular. Por tanto, cuando el ácido nucleico extracelular de interés es ADN extracelular, la lisis de los leucocitos debe evitarse en particular. Los leucocitos pueden diferenciarse entre sí por sus características de estabilidad. Así, algunos tipos de leucocitos son más estables que otros. Sin embargo, en general, los leucocitos son significativamente más estables que los eritrocitos. Por tanto, la lisis de los eritrocitos no indica necesariamente que los leucocitos se han lisado. La diferente susceptibilidad de los leucocitos y los eritrocitos a la lisis también se emplea en la técnica, por ejemplo, para lisar específicamente los eritrocitos, conservando al mismo tiempo a los leucocitos para, por ejemplo, la recolección de los leucocitos. Sin embargo, si el ácido nucleico extracelular de interés es ARN, la hemólisis y, por tanto, la lisis de los eritrocitos no constituye un problema. Aunque los eritrocitos maduros tampoco contienen ARN, sus precursores (reticulocitos) sí lo contienen. Los reticulocitos constituyen de aproximadamente 0,5% al 1% de los eritrocitos y contienen gran cantidad de ARN de globina. Por tanto, en particular, cuando el ácido nucleico extracelular de interés es ARN, debe evitarse/reducirse la lisis de los eritrocitos y, por tanto, de los reticulocitos durante la conservación para reducir la dilución de la población de ácidos nucleicos extracelulares, en particular de la población de ARN extracelular, con ARNm de globina. Además, tal como se describió anteriormente, es importante mantener la composición y, por tanto, el perfil de la población de ácidos nucleicos extracelulares, lo cual se logra empleando los métodos de estabilización descritos en la presente, puesto que esto resulta importante para muchas aplicaciones de diagnóstico. La hemólisis puede evitarse/reducirse de modo eficaz empleando el método de estabilización según la presente invención. Con ello, la población de ácidos nucleicos extracelulares se conserva sustancialmente y, además, la muestra de sangre estabilizada, en particular el plasma o el suero obtenido de la muestra de sangre estabilizada, debido a la prevención de la hemólisis y de la lisis celular en general, también es adecuada para otros análisis de laboratorio convencionales.

Según una realización, se conserva la morfología de las células durante el periodo de estabilización, que preferiblemente es de al menos 48 h. Esto permite analizar y opcionalmente caracterizar las células contenidas basándose en su morfología. Según una realización, se conserva la morfología de las células nucleadas. Según una realización, se conserva la morfología de los linfocitos contenidos en la muestra de sangre durante la estabilización.

Según una realización, se conservan los epitopos de la superficie celular. Según una realización, se conservan las proteínas de la superficie celular, tales como las proteínas CD. Tal como se muestra en los ejemplos, la estabilización empleando una N,N-dialquilpropanamida según la fórmula 1 conserva los epitopos de la superficie celular y las proteínas de la superficie celular. Esto es una ventaja, puesto que permite caracterizar y/o aislar las células contenidas basándose en estas características de la superficie celular. En particular, permite el análisis de los marcadores tumorales presentes sobre la superficie celular.

Según una realización, el método de estabilización comprende poner en contacto una muestra de sangre con una N,N-dialquilpropanamida y un anticoagulante, en el que los niveles de transcripciones en las células contenidas se estabilizan. Además, tal como se muestra en los ejemplos, la población de ácidos nucleicos extracelulares también se estabiliza. Esto es una ventaja, puesto que permite analizar a la población de ácidos nucleicos extracelulares por separado de la población de ácidos nucleicos intracelulares de la misma muestra estabilizada.

Los restos 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. Preferiblemente, se emplean los siguientes grupos dentro de los grupos descritos en general dentro del alcance de la presente invención:

alquilo: preferiblemente alquilos de cadena corta, en particular alquilos C1-C5 lineales o ramificados, o alquilos de cadena larga: alquilos C5-C20 lineales y ramificados.

La longitud de la cadena n de R2 y/o R3 puede tener, en particular, los valores 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20. R2 y R3 pueden tener una longitud de la cadena de carbonos de 1-10. En este caso, la longitud de la cadena n puede tener, en particular, los valores 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10. Preferiblemente, R2 y R3 tienen una longitud de la cadena de carbonos de 1-5 y, en este caso, la longitud de la cadena puede tener, en particular, los valores 1, 2, 3, 4 y 5. Se prefiere en particular una longitud de cadena de 1 o 2 para R2 y R3. Tal como se describió anteriormente, el compuesto según la fórmula 1 empleado en la presente invención es una N,N-

dialquilpropanamida.

Pueden emplearse N,N-dialquilpropanamidas, tales como N,N-dimetilpropanamida, para estabilizar muestras que contienen células, tales como muestras de sangre, tal como se muestra en los ejemplos.

5 La mezcla que se obtiene cuando se pone en contacto la muestra biológica que contiene células con un compuesto según la fórmula 1 y, por tanto, la N,N-dialquilpropanamida o una mezcla de los respectivos compuestos, puede comprender dicho compuesto o mezcla de compuestos en una concentración final de al menos 0,1%, al menos 0,25%, al menos 0,5%, al menos 0,75%, al menos 1%, al menos 1,25% o al menos 1,5%. Un intervalo de concentración adecuado incluye, pero no se limita a 0,1% hasta 50%. Los intervalos de concentración preferidos pueden seleccionarse del grupo que consiste en del 0,1% al 30%, del 0,1% al 20%, del 0,1% al 15%, del 0,1% al 10%, del 0,1% al 7,5%, del 0,1% al 5%, del 1% al 30%, del 0,75% al 10%, del 1% al 20%, del 1% al 15%, del 1% al 10%, del 1% al 7,5%, del 1% al 5%, del 1,25% al 30%, del 1,25% al 20%, del 1,25% al 15%, del 1,25% al 10%, del 1,25% al 7,5%, del 1,25% al 5%, del 1,5% al 30%, del 1,5% al 20%, del 1,5% al 15%, del 1,5% al 10%, del 1,5% al 7,5%, y del 1,5% al 5%. Las concentraciones respectivas son particularmente adecuadas cuando se emplea la N,N-dimetilpropanamida como agente estabilizante. Para estabilizar los niveles de las transcripciones, se prefiere emplear una concentración en la mezcla que se encuentra en el intervalo del 2,5% al 10%, preferiblemente del 3% al 8%, más preferiblemente del 4% al 7,5%. Para estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares también pueden emplearse concentraciones más bajas, tal como se muestra en los ejemplos. Las concentraciones mencionadas anteriormente son muy adecuadas, por ejemplo, para estabilizar sangre completa o productos sanguíneos, tales como plasma. Los intervalos de concentración adecuados para otros compuestos según la fórmula 1 y/u otras muestras biológicas que contienen células también pueden ser determinados por los expertos en la técnica empleando experimentos habituales, por ejemplo, ensayando el compuesto, respectivamente a diferentes concentraciones, en los ensayos descritos en los ejemplos. El uso de otros aditivos para la estabilización, por ejemplo, permite emplear concentraciones más bajas.

25 Preferiblemente, el compuesto según la fórmula 1 y, por tanto, la N,N-dialquilpropanamida, se emplea en combinación con un agente quelantes para estabilizar la muestra que contiene células. En particular, puede emplearse un agente quelantes como anticoagulante cuando se estabiliza una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre, tal como, por ejemplo, plasma o suero. A continuación se proporcionan los agentes quelantes y los intervalos de concentración adecuados.

30 Según una realización, se emplea una combinación de agentes estabilizantes que comprende al menos un compuesto según la fórmula 1 tal como se definió anteriormente, concretamente una N,N-dialquilpropanamida, y un inhibidor de la apoptosis. El inhibidor de la apoptosis ya resulta eficaz, por sí solo, para estabilizar una muestra que contiene células y para conservar sustancialmente la población de ácidos nucleicos extracelulares con respecto a los cambios en su composición, en particular los cambios que surgen de contaminaciones con ADN genómico fragmentado. Así, el efecto de estabilización que se obtiene cuando se emplea además un inhibidor de la apoptosis resulta potenciado. La muestra puede ponerse en contacto con un inhibidor de la apoptosis, por ejemplo, añadiendo el inhibidor de la apoptosis a la muestra, o viceversa. Preferiblemente, se emplea una composición de estabilización que comprende la N,N-dialquilpropanamida, preferiblemente N,N-dimetilpropanamida, y un inhibidor de la apoptosis. Dicho al menos un inhibidor de la apoptosis presente en la mezcla resultante refuerza la estabilización de las células contenidas en la muestra e inhibe la degradación de los ácidos nucleicos comprendidos en la muestra, contribuyendo con ello a conservar sustancialmente la población de ácidos nucleicos extracelulares.

45 La expresión "inhibidor de la apoptosis", tal como se emplea en la presente, se refiere, en particular, 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 que las células sean más resistentes a estímulos apoptóticos. Los inhibidores de la apoptosis incluyen, pero no se limitan a proteínas, péptidos o moléculas similares a proteínas o péptidos, moléculas orgánicas e inorgánicas. Los inhibidores de la apoptosis incluyen compuestos que actúan como inhibidores metabólicos, inhibidores de la degradación de ácidos nucleicos, respectivamente vías de ácidos nucleicos, inhibidores de enzimas, en particular inhibidores de caspasa, inhibidores de calpaína e inhibidores de otras enzimas implicadas en procesos apoptóticos. Los respectivos inhibidores de la apoptosis se listan en la tabla 1. Preferiblemente, dicho al menos un inhibidor de la apoptosis que se emplea para estabilizar la muestra biológica que contiene células se selecciona del grupo que consiste en inhibidores metabólicos, inhibidores de caspasa e inhibidores de calpaína. Los ejemplos adecuados para cada clase se listan en la tabla 1 en la respectiva categoría. Preferiblemente, el inhibidor de la apoptosis puede permear las células.

50 Dentro del alcance de la presente invención también se incluye el uso de una combinación de diferentes inhibidores de la apoptosis, de la misma clase o de clases diferentes de inhibidores de la apoptosis, respectivamente el uso de una combinación de diferentes inhibidores de la apoptosis que inhiben la apoptosis mediante el mismo mecanismo de acción o diferentes mecanismos de acción.

60 En una realización ventajosa, el inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de la caspasa. Los miembros de la familia del gen de caspasa desempeñan un papel significativo en la apoptosis. Las preferencias de sustrato o especificidades de las caspasas individuales se han aprovechado para el desarrollo de péptidos que pueden competir con éxito con la unión de la caspasa. Es posible generar inhibidores reversibles o irreversibles de la

activación de la caspasa acoplado péptidos específicos de caspasa, por ejemplo, a compuestos de aldehído, nitrilo o cetona. Por ejemplo, los péptidos derivatizados con fluorometil cetona (FMK), tales como Z-VAD-FMK, actúan como inhibidores irreversibles eficaces sin efectos citotóxicos añadidos. Los inhibidores sintetizados con un grupo benciloxicarbonilo (BOC) en el N-terminal y las cadenas laterales de O-metilo muestran una mayor permeabilidad celular. Otros inhibidores de caspasa adecuados se sintetizan con un grupo fenoxi en el C-terminal. Un ejemplo es Q-VD-OPh, que es un inhibidor de caspasa de amplio espectro irreversible permeable en células que es aún más eficaz para prevenir la apoptosis que el inhibidor de caspasa Z-VAD-FMK.

Según una realización, el inhibidor de caspasa empleado además de una N,N-dialquilpropanamida, que preferiblemente es la N,N-dimetilpropanamida, es un inhibidor de pancaspasas y, por tanto, es un inhibidor de caspasa de amplio espectro. Según una realización, el inhibidor de caspasa comprende un péptido específico de caspasa modificado. Preferiblemente, dicho péptido específico de caspasa está modificado con un compuesto de aldehído, nitrilo o cetona. Según una realización preferida, el péptido específico de caspasa se modifica preferiblemente en el carboxilo terminal con un O-fenoxi o un grupo fluorometil cetona (FMK). Según una realización, el inhibidor de caspasa se selecciona del grupo que consiste en Q-VD-OPh y Z-VAD(OMe)-FMK. En una realización, se emplea Z-VAD(OMe)-FMK, un inhibidor de pancaspasas, que es un inhibidor peptídico irreversible competitivo y bloquea enzimas de la familia 1 de caspasa y familia 3 de caspasa. En una realización preferida, se emplea Q-VD-OPh, que es un inhibidor de amplio espectro de caspasas. Q-VD-OPh es permeable a 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 carboxi-terminal conjugado con los aminoácidos valina y aspartato. Es igualmente eficaz para prevenir la apoptosis mediada por las tres principales vías apoptóticas, caspasa-9 y caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-10, y caspasa-12 (Caserta *et al.*, 2003). Otros inhibidores de caspasa se listan en la tabla 1. Según una realización, el inhibidor de caspasa que se emplea como inhibidor de la apoptosis para estabilizar la muestra que contiene células es un inhibidor que actúa sobre una o más caspasas localizadas corriente abajo en la vía de la muerte celular intracelular de la célula, tal como caspasa-3. En una realización, el inhibidor de caspasa es un inhibidor de una o más caspasas seleccionadas del grupo que consiste en caspasa-3, caspasa-8, caspasa-9, caspasa-10 y caspasa-12. Dentro del alcance de la presente invención también se encuentra el uso de una combinación de inhibidores de caspasa.

Cuando se emplea un inhibidor de caspasa además de la N,N-dialquilpropanamida, la mezcla que se obtiene después de poner en contacto la muestra biológica con dicho al menos un inhibidor de la apoptosis puede comprender el inhibidor de la apoptosis (o una combinación de inhibidores de la apoptosis) en una concentración seleccionada del grupo de al menos 0,01 μM , al menos 0,05 μM , al menos 0,1 μM , al menos 0,5 μM , al menos 1 μM , al menos 2,5 μM o al menos 3,5 μM . Por supuesto, también pueden emplearse concentraciones mayores. Los intervalos de concentración adecuados para el inhibidor o inhibidores de la apoptosis cuando se mezclan con la muestra biológica que contiene células incluyen, pero no se limitan a de 0,01 μM a 100 μM , de 0,05 μM a 100 μM , de 0,1 μM a 50 μM , de 0,5 μM a 50 μM , de 1 μM a 40 μM , más preferiblemente de 1 μM a 30 μM o de 2,5 μM a 25 μM . Se ha descubierto que las concentraciones más altas son más eficaces, aunque también se lograron unos resultados estabilizantes buenos a concentraciones más bajas. Por tanto, también se logra una estabilización eficaz a concentraciones más bajas, por ejemplo, en el intervalo seleccionado de 0,1 μM a 10 μM , de 0,5 μM a 7,5 μM o de 1 μM a 5 μM , en particular si el inhibidor de la apoptosis se emplea en combinación. Las concentraciones mencionadas anteriormente son aplicables al uso de un único inhibidor de la apoptosis, así como al uso de una combinación de inhibidores de caspasa. Si se emplea una combinación de inhibidores de caspasa, la concentración de un inhibidor de la apoptosis individual que se emplee en dicha mezcla de inhibidores de la apoptosis también puede encontrarse por debajo de las concentraciones mencionadas anteriormente, si la concentración global de la combinación de inhibidores de la apoptosis cumple con las características mencionadas anteriormente. El empleo de una concentración menor que siga estabilizando de modo eficaz las células y/o reduzca la degradación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra tiene la ventaja de que se pueden disminuir los costes de la estabilización. Pueden emplearse unas concentraciones menores porque el inhibidor de la apoptosis se emplea en combinación con uno o más estabilizantes, según se describe en la presente. Las concentraciones mencionadas anteriormente son adecuadas, en particular, cuando se emplea un inhibidor de la caspasa, 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 mencionadas anteriormente son muy adecuadas, por ejemplo, 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 ser determinados por los expertos en la técnica empleando experimentos habituales, por ejemplo, ensayando los inhibidores de la apoptosis, respectivamente a diferentes concentraciones, en los ensayos descritos en los ejemplos.

Según una realización, el inhibidor de la apoptosis, en una cantidad eficaz, disminuirá o reducirá la apoptosis en una muestra biológica que contiene células en al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, preferiblemente en al menos 75%, más preferiblemente en al menos 85%, comparado con una muestra control que no contiene un respectivo inhibidor de la apoptosis.

Así, según una realización, se emplea una combinación de agentes estabilizantes que comprende al menos un inhibidor de la apoptosis y al menos un compuesto según la fórmula 1, tal como se definió anteriormente, que es una N,N-dialquilpropanamida, preferiblemente N,N-dimetilpropanamida. Una respectiva combinación también puede comprender aditivos adicionales que potencian el efecto estabilizante, tales como, por ejemplo, anticoagulantes y

agentes quelantes. Según una realización, la combinación de agentes estabilizantes comprende un inhibidor de caspasa y un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante, tal como EDTA. Las respectivas combinaciones pueden utilizarse de modo ventajoso en un método para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en una muestra que contiene células, según el primer aspecto. 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 emplean solos y/o permite emplear concentraciones más bajas, haciendo con ello que el uso combinado de agentes estabilizantes sea una opción atractiva. Las realizaciones adecuadas y preferidas del inhibidor de la apoptosis y el compuesto según la fórmula 1 definido anteriormente, en particular N,N-dimetilpropanamida, así como las concentraciones adecuadas y preferidas de los respectivos agentes adecuados para lograr una estabilización eficaz de la muestra se describieron con detalle anteriormente en conjunción.

Tal como se ha analizado en los antecedentes de la invención, los ácidos nucleicos extracelulares habitualmente no están presentes de forma "desnuda" en la muestra sino que, por ejemplo, están estabilizados hasta cierto punto al ser liberados en forma protegida en complejos o al estar contenidos en vesículas y similares. Esto tiene el efecto de que los ácidos nucleicos extracelulares ya están estabilizados hasta cierto punto en la naturaleza y, por tanto, habitualmente no son degradados con rapidez por las nucleasas en las muestras que contienen células, tales como sangre completa, plasma o suero. Así, cuando se quieren estabilizar ácidos nucleicos extracelulares que están comprendidos en una muestra biológica, uno de los principales problemas es la dilución, respectivamente la contaminación de la población de ácidos nucleicos extracelulares por ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que se originan de las células dañadas o moribundas que están contenidas en la muestra. Esto también supone un problema cuando se procesan muestras depuradas de células, tales como plasma o suero (que a veces también se describen como "exentas de células", aunque puedan comprender cantidades pequeñas de células). La tecnología de estabilización según la presente invención resulta particularmente ventajosa a este respecto, porque no solo conserva sustancialmente los ácidos nucleicos extracelulares presentes en la muestra y, por ejemplo, inhibe la degradación de los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos (preferiblemente al menos en 60%, al menos en 70%, al menos en 75%, al menos en 80%, al menos en 85%, al menos en 90% o lo más preferiblemente al menos en 95% a lo largo del periodo de estabilización, comparado con una muestra no estabilizada o una muestra estabilizada con EDTA), sino que, además, reduce de modo eficaz la liberación de ADN genómico de las células contenidas en la muestra y/o reduce la fragmentación del respectivo ADN genómico. Según una realización, el uso del compuesto según la fórmula 1, según se definió anteriormente, y opcionalmente un inhibidor de la apoptosis para estabilizar la muestra que contiene células según las indicaciones de la presente invención tiene el efecto de que se reduce el aumento en el ADN que resulta de la liberación de ADN de las células contenidas en la muestra, comparado con una muestra no estabilizada. Según una realización, dicha liberación de ADN genómico se reduce en 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 a lo largo del periodo de estabilización, comparado con la muestra no estabilizada o una correspondiente muestra 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 una realización, dicha liberación de ADN genómico se reduce en al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% a lo largo del periodo de estabilización, comparado con la muestra no estabilizada o una correspondiente muestra 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, tal como se describe en la presente en la sección de ejemplos. Así, la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en la muestra se estabiliza considerablemente, comparada con muestras estabilizadas en tubos de EDTA convencionales. Así, según una realización, el efecto de estabilización que logra el compuesto según la fórmula 1, según indica la presente invención, que puede utilizarse en combinación con un inhibidor de la apoptosis, da como resultado que la liberación de ADN de las células contenidas en la muestra se reduce al menos hasta un máximo de 10 veces, preferiblemente 7 veces, más preferiblemente 5 veces, y lo más preferiblemente se reduce al menos hasta un máximo de 4 veces, tal como puede determinarse, por ejemplo, con el ensayo de ADN 18S descrito en los ejemplos. Tal como se muestra en los ejemplos, puede lograrse una estabilización eficaz de la población de ácidos nucleicos extracelulares durante un periodo de al menos hasta 6 días. Durante una conservación más corta de las muestras, por ejemplo, hasta tres días, la liberación de ADN puede reducirse al menos hasta un máximo de dos veces, tal como puede determinarse, por ejemplo, con el ensayo de ADN 18S descrito en los ejemplos. Así, la liberación de ADN puede reducirse en 2 o menos veces durante hasta tres días de conservación cuando se emplean los métodos estabilizantes según la presente invención. Esto constituye una mejora notable en la estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares, comparado con los métodos de la técnica anterior. Esto aumenta significativamente la precisión de cualquier ensayo posterior. En ciertos casos, por ejemplo, si el material de muestra debe transportarse a larga distancia o conservarse durante periodos largos, por ejemplo, a temperatura ambiente (tal como puede ser el caso, por ejemplo, de ciertos países), el proceso según la invención permite, por primera vez, que puedan realizarse ensayos después de este periodo de tiempo. Sin embargo, por supuesto, las muestras también pueden procesarse antes, si se desea. No es necesario esperar el periodo de estabilización más largo que se puede conseguir. La estabilización que se logra con la presente invención reduce las variaciones en la población de ácidos nucleicos extracelulares que puedan producirse por una manipulación/procesamiento diferente de las muestras (por ejemplo, condiciones y periodos de conservación) después de ser recolectadas. Esto mejora en gran medida la homologación de la manipulación y los análisis moleculares.

Pueden emplearse otros aditivos además del compuesto según la fórmula 1, tal como se definió anteriormente, para estabilizar aún más la muestra que contiene células. Esto puede emplearse además o como alternativa al inhibidor de la apoptosis. La selección de aditivos adecuados que también puedan contribuir al efecto de estabilización también puede depender del tipo de muestra que contiene células que se va a estabilizar, por ejemplo, cuando se procesa sangre completa como la muestra biológica que contiene células, resulta ventajoso, y también habitual, incluir un anticoagulante, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en heparina, ácido etilendiaminotetraacético, citrato, oxalato, y cualquiera de sus combinaciones. En una realización ventajosa, el anticoagulante es un agente quelantes. Un agente quelante es un compuesto orgánico que es capaz de formar enlaces coordinados con metales a través de dos o más átomos del compuesto orgánico. Los agentes quelantes según la presente invención incluyen, pero no se limitan a ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido etilendinitrilotetraacético (EDTA), ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) y N,N-bis(carboximetil)glicina (NTA). Según una realización preferida, se emplea EDTA. Tal como se emplea en la presente, el término "EDTA" indica, entre otros, la porción de EDTA de un compuesto de EDTA, tal como, por ejemplo, K₂EDTA, K₃EDTA o Na₂EDTA. El empleo de un agente quelante, tal como EDTA, también tiene el efecto ventajoso de que se inhiben las nucleasas, tales como las ADNasas, evitando con ello, por ejemplo la degradación del ADN extracelular por las ADNasas. Además, se ha descubierto que el EDTA utilizado/añadido a concentraciones más altas es capaz de reducir la liberación de los ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico, de las células, reforzando con ello el efecto estabilizante que se logra con dicho al menos un compuesto según la fórmula 1. Sin embargo, el EDTA solo no es capaz de inhibir de modo eficaz la fragmentación, por ejemplo, del ADN genómico que es liberado de las células contenidas en la muestra. Así, el EDTA no logra un efecto de estabilización suficiente, pero empleado en combinación con las indicaciones de la presente invención, en particular en combinación con el inhibidor de la apoptosis, en particular el inhibidor de caspasa, puede mejorar aún más la estabilización por las razones analizadas anteriormente. Además, también parece aumentar la estabilidad química del ARN. Según una realización, la concentración del agente quelante, preferiblemente 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 contacto. Las respectivas concentraciones son particularmente eficaces cuando se estabilizan muestras de sangre, plasma y/o suero, en particular muestras de 10 ml de sangre.

También pueden emplearse otros aditivos para reforzar aún más la estabilización de la muestra que contiene células, respectivamente para reforzar la conservación de la población de ácidos nucleicos extracelulares. Los ejemplos de los respectivos aditivos incluyen, pero no se limitan a inhibidores de nucleasas, en particular compuestos inhibidores de ARNasas y ADNasas. Los ejemplos de inhibidores de ARNasas incluyen, pero no se limitan a anticuerpos antinucleasa o complejos de ribonucleósido-vanadilo. Cuando se elige un respectivo aditivo adicional, se debe tener cuidado de no comprometer y/o contrarrestar el efecto estabilizante del compuesto según la fórmula 1 que es una N,N-dialquilpropanamida. Así, no deben emplearse aditivos en concentraciones que produzcan o refuercen la lisis y/o la degradación de las células contenidas en la muestra biológica y/o que refuercen la degradación de los ácidos nucleicos contenidos en la fracción sin células de la muestra biológica. Además, tampoco deben utilizarse los aditivos a una concentración que contrarreste y anule el efecto estabilizante del transcriptoma de la N,N-dialquilpropanamida que se emplea para la estabilización.

En una realización ventajosa de la presente invención, la muestra biológica que contiene células, que preferiblemente es una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre, tal como, por ejemplo, plasma o suero, se pone en contacto con:

- a) al menos un compuesto según la fórmula 1, según se definió anteriormente, que es una N,N-dialquilpropanamida, preferiblemente N,N-dimetilpropanamida (las concentraciones preferidas se describieron anteriormente); y
- b) al menos un inhibidor de caspasa como inhibidor de la apoptosis, preferiblemente con Q-VD-OPh, preferiblemente en un intervalo de concentración de 1 μ M a 30 μ M; y
- c) otro aditivo, preferiblemente un agente quelante preferiblemente en un intervalo de concentración de 4 mM a 50 mM, preferiblemente de 4 mM a 20 mM, lo más preferiblemente EDTA.

Los componentes de la composición estabilizante pueden comprender, respectivamente pueden estar disueltos en un tampón, por ejemplo un tampón biológico, tal como MOPS, TRIS, PBS y similares. Además, pueden disolverse en agua o cualquier otro disolvente adecuado. Según una realización, la composición estabilizante comprende un disolvente aprótico, tal como DMSO.

El compuesto según la fórmula 1, tal como se definió anteriormente, concretamente la N,N-dialquilpropanamida que preferiblemente es N,N-dimetilpropanamida, así como los otros aditivos opcionalmente presentes, pueden estar presentes, por ejemplo, en un dispositivo, preferiblemente un recipiente, para recolectar la muestra, o pueden añadirse a un respectivo dispositivo de recolección inmediatamente antes de la recolección de la muestra biológica, o pueden añadirse al dispositivo de recolección inmediatamente después de que la muestra haya sido recolectada en su interior. Dentro del alcance de la presente invención también se puede añadir el agente o agentes estabilizantes y, opcionalmente, el otro u otros aditivos por separado a la muestra biológica que contiene células. Sin embargo, para facilitar la manipulación, se prefiere que dichos uno o más agentes estabilizantes y, opcionalmente,

- dichos otros aditivos se proporcionen en una composición. Además, en una realización ventajosa, el compuesto según la fórmula 1, tal como se definió anteriormente, y, opcionalmente, dichos uno o más aditivos están presentes en el dispositivo de recolección antes de añadir la muestra. Esto asegura que la muestra biológica que contiene células se estabilice inmediatamente después del contacto con el agente o agentes estabilizantes. El agente o agentes de estabilización están presentes en el recipiente en una cantidad suficiente para proporcionar la estabilización de la cantidad de la muestra que contiene células que se va a recolectar, respectivamente comprendida en dicho recipiente. Tal como se describió, la mezcla puede mezclarse con el agente o agentes de estabilización directamente después y/o durante la recolección de la muestra, proporcionando con ello una muestra estabilizada.
- Preferiblemente, la muestra se mezcla con el agente o agentes de estabilización directamente después y/o durante la recolección de la muestra. Por tanto, preferiblemente, el agente o agentes de estabilización y los aditivos descritos anteriormente se proporcionan en forma de una composición estabilizante. Preferiblemente, dicha composición estabilizante se proporciona en forma líquida. Puede ser precargada, por ejemplo, en el dispositivo de recolección de muestras de modo que la muestra se estabilice inmediatamente durante la recolección. Según una realización, la composición estabilizante se pone en contacto con la muestra que contiene células en una proporción volumétrica seleccionada 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. Una ventaja concreta de las indicaciones de la presente invención es que puede lograrse la estabilización de un gran volumen de muestra con un pequeño volumen de composición estabilizante. Por tanto, preferiblemente, la proporción de composición estabilizante a muestra se encuentra en el intervalo de 1:2 a 1:7, más preferiblemente de 1:3 a 1:5.
- La expresión "muestra que contiene células", tal como se emplea en la presente, se refiere, en particular, 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, en esta expresión también se incluyen las muestras que contienen células que comprenden considerablemente más células, y estas pueden estabilizarse por medio de las indicaciones según la presente invención. Sin embargo, la expresión "muestra que contiene células" también se refiere y, por tanto, incluye, muestras depuradas de células, que incluyen muestras que se denominan habitualmente "exentas de células", tales como, por ejemplo, plasma sanguíneo, puesto que las respectivas muestras a menudo incluyen células residuales. Al menos, a menudo no puede excluirse totalmente que, incluso las muestras denominadas "sin células", tales como plasma sanguíneo, comprendan cantidades residuales de células que, por consiguiente, representan un riesgo de que la población de ácidos nucleicos extracelulares se contamine con ácidos nucleicos intracelulares liberados de dichas células residuales. Por tanto, las respectivas muestras depuradas de células y "sin células" se incluyen, según una realización, en la expresión "muestra que contiene células". Así, la "muestra que contiene células" puede comprender grandes cantidades de células, como es el caso, por ejemplo, de la sangre completa, pero también puede comprender solo cantidades muy pequeñas de células. Por tanto, la expresión "muestra que contiene células" también incluye muestras que pueden ser sospechosas o representar un riesgo de contener células. Tal como se analizó anteriormente, también con respecto a las muestras biológicas que solo contienen cantidades pequeñas, respectivamente cantidades residuales de células, tal como, por ejemplo, plasma sanguíneo (el plasma sanguíneo habitualmente contiene, dependiendo del método de preparación, pequeñas cantidades residuales de células, aunque normalmente se indique que no contiene células), el método según la presente invención tiene ventajas considerables, puesto que estas células residuales también pueden producir la contaminación no deseada de los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos. El empleo de la tecnología estabilizante de la presente invención también asegura que las respectivas muestras que solo comprenden cantidades residuales de células o que simplemente son sospechosas o que representan un riesgo de contener cantidades residuales de células, se estabilicen de modo eficaz, tal como también se describió en detalle anteriormente. Según una realización, la porción celular constituye hasta al menos 1%, al menos 2%, al menos 2,5%, al menos 5%, preferiblemente al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, más preferiblemente al menos 25%, al menos 30%, al menos 35% o al menos 40% de la muestra biológica que contiene células. Las muestras que contienen células en la que la fracción celular constituye más del 40% también pueden estabilizarse empleando las indicaciones descritas en la presente. El empleo del método estabilizante según la presente invención tiene la ventaja de que, independientemente de la composición de la muestra y del número de células contenido en ella, la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en ella sustancialmente se conserva, respectivamente se estabiliza, permitiendo con ello la homologación del posterior aislamiento y/o análisis de los ácidos nucleicos extracelulares contenidos.
- Según una realización, la muestra biológica que contiene células se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, muestras derivadas de sangre, plasma, suero, esputo, fluido lagrimal, fluido linfático, orina, sudor, licor, fluido cerebroespinal, fluido de ascitis, leche, deposiciones, lavado bronquial, saliva, fluido amniótico, secreciones nasales, secreciones vaginales, semen/fluido seminal, secreciones de heridas y sobrenadantes de cultivos celulares y sobrenadantes obtenidos de otras muestras recogidas con torunda. Según una realización, la muestra biológica que contiene células es un fluido corporal, una secreción corporal o una excreción corporal, preferiblemente un fluido corporal, lo más preferiblemente sangre completa, plasma o suero. La muestra biológica que contiene células comprende ácidos nucleicos extracelulares. Según otra realización, la muestra biológica que contiene células es una muestra que no es un fluido derivado de un ser humano o un animal, tal como, por ejemplo, deposiciones, tejidos o una muestra de biopsia. Otros ejemplos de muestras biológicas que contienen células que pueden estabilizarse con

el método según la presente invención incluyen, pero no se limitan a muestras biológicas de suspensiones celulares, cultivos celulares, sobrenadantes de cultivos celulares y similares, que comprendan ácidos nucleicos extracelulares.

5 Tal como se describió anteriormente y se demuestra en los ejemplos, el empleo de los métodos de la presente invención permite estabilizar la muestra que contiene células sin refrigeración ni congelación durante un periodo de tiempo prolongado. Así, las muestras pueden mantenerse a temperatura ambiente o incluso a temperaturas elevadas, por ejemplo, de hasta 30 °C o hasta 40 °C. Según una realización, se logra un efecto de estabilización durante al menos dos días, preferiblemente al menos tres días, más preferiblemente de al menos un día a seis días, lo más preferiblemente durante al menos un día hasta al menos siete días a temperatura ambiente. Tal como se muestra en los ejemplos, las muestras que se estabilizaron según el método de la presente invención no resultaron sustancialmente comprometidas cuando se conservaron durante 3 días a temperatura ambiente. Incluso durante una conservación más larga de hasta 6 o incluso 7 días a temperatura ambiente, la población de ácidos nucleicos extracelulares resultó sustancialmente más estabilizada cuando se comparó con muestras no estabilizadas o, por ejemplo, cuando se comparó con muestras que se estabilizaron empleando un método convencional, tal como un tratamiento con EDTA. Aunque el efecto de estabilización pueda disminuir a lo largo del tiempo, aún es suficiente para conservar la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares para permitir el análisis y/o el posterior procesamiento. Así, las muestras que se estabilizaron según los métodos de la presente invención aún fueron adecuadas para aislar y opcionalmente analizar los ácidos nucleicos extracelulares contenidos en ellas incluso después de un periodo de conservación más largo a temperatura ambiente. Además, el transcriptoma fue estabilizado de modo eficaz. Así, puesto que las muestras no están comprometidas, en particular cuando se emplea la combinación preferida de agentes de estabilización, pueden considerarse unos tiempos de conservación/transporte aún más largos. Sin embargo, normalmente no son necesarios unos periodos de tiempo más largos, puesto que la conservación habitual y, por ejemplo, el tiempo de transporte hasta el laboratorio en el que se realiza el aislamiento y opcionalmente el análisis de los ácidos nucleicos normalmente no excede de 6 o 7 días, e incluso habitualmente se completa después de dos o tres días. Tal como se muestra en los ejemplos, la eficacia de estabilización es particularmente buena durante este periodo de tiempo. Sin embargo, los tiempos de estabilización extraordinariamente largos y las eficacias de estabilización que pueden conseguirse con el método según la presente invención proporcionan un importante factor de seguridad.

Los métodos y también las composiciones posteriormente descritas según la presente invención permiten además la estabilización de grandes volúmenes de muestras biológicas con pequeños volúmenes de sustancias añadidas, porque los aditivos que se emplean según las indicaciones de la presente invención son muy activos. Esto constituye una ventaja importante, porque el tamaño/volumen de la muestra plantea considerables restricciones sobre el posterior procedimiento de aislamiento, en particular cuando se quieren emplear procesos automáticos para aislar los ácidos nucleicos extracelulares contenidos en las muestras. Además, se ha de considerar que los ácidos nucleicos extracelulares a menudo están contenidos solo en pequeñas cantidades en la muestra. Así, el procesamiento de 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 en circulación de la muestra y, por tanto, que estén disponibles para un posterior análisis.

A la estabilización de la muestra biológica le puede seguir directamente la aplicación de técnicas para analizar ácidos nucleicos, o los ácidos nucleicos pueden purificarse de la muestra. Por tanto, la muestra que se estabilice según el método de la presente invención puede analizarse con un método de detección y/o analítico de ácidos nucleicos o puede procesarse aún más, por ejemplo, el ácido nucleico extracelular puede aislarse a partir de la muestra estabilizada y después puede analizarse con un método de detección y/o analítico de ácidos nucleicos o puede procesarse aún más. Además, las células pueden retirarse de la muestra estabilizada y analizarse y/o los ácidos nucleicos pueden aislarse de las células obtenidas. Además, las células pueden analizarse para su morfología o características de la superficie celular. Esto permite, por ejemplo, identificar células tumorales. Según una realización, se aísla y analiza el ARN intracelular. Según una realización, el método comprende realizar un análisis cualitativo o cuantitativo de una o más transcripciones génicas.

Además, según un segundo aspecto, se proporciona un método para aislar ácidos nucleicos de una muestra biológica, que comprende las etapas de:

- 50 a) estabilizar una muestra que contiene células según el método según el primer aspecto;
- b) aislar ácidos nucleicos de la muestra estabilizada.

Según una realización, dicho método comprende:

- a) estabilizar una muestra que contiene células según el método según el primer aspecto;
- b) aislar los ácidos nucleicos intracelulares de la muestra estabilizada.

55 Según una realización, se proporciona que dicho método sea para aislar 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 comprendidos en una muestra que contiene células,

según el método definido en el primer aspecto de la presente invención;

b) aislar los ácidos nucleicos extracelulares.

Tal como se analizó anteriormente, la estabilización según la presente invención tiene el efecto de que la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en la muestra se conserve sustancialmente en el estado que presentaba en el momento de obtener la muestra biológica, respectivamente extraída. En particular, el gran aumento que se observa habitualmente en los ácidos nucleicos que resulta de los ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico, más específicamente ADN genómico fragmentado, liberados de células dañadas o moribundas se reduce de modo eficaz, según se demuestra en los ejemplos. Por tanto, los ácidos nucleicos extracelulares obtenidos de una muestra respectivamente estabilizada comprenden menos contaminaciones por ácidos nucleicos intracelulares que se originan de células degradadas o moribundas comprendidas en la muestra y, en particular, comprenden menos cantidad de ADN genómico fragmentado, comparado con muestras no estabilizadas. Además, la etapa de estabilización exclusiva permite aumentar la cantidad de ácidos nucleicos extracelulares recuperables. El método de estabilización según la invención puede realizarse sin el entrecruzamiento de la muestra. Esta es una ventaja importante frente al uso de agentes de entrecruzamiento, tales como formaldehído o liberadores de formaldehído, puesto que estos reactivos podrían reducir la cantidad recuperable de ácidos nucleicos extracelulares debido al entrecruzamiento. Así, el método según la presente invención mejora la capacidad de diagnóstico y pronóstico de los ácidos nucleicos extracelulares. Además, dicha estabilización permite conservar y/o manipular la muestra, por ejemplo, transportarse (incluso a temperatura ambiente) durante un periodo de tiempo prolongado antes de separar las células contenidas en la muestra y/o antes de aislar los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en ella en la etapa b). Con respecto a los detalles de la estabilización, se remite a la anterior descripción, que también se aplica en este punto.

Según una realización, la muestra biológica que contiene células, tal como, por ejemplo, una muestra de sangre completa, se estabiliza en la etapa a) según se describió con detalle anteriormente empleando al menos un compuesto según la fórmula 1, tal como se describió anteriormente, concretamente una N,N-dialquilpropanamida y, opcionalmente, otros aditivos. Las realizaciones adecuadas y preferidas se describieron anteriormente. Se prefiere en particular el uso adicional de un inhibidor de la caspasa en combinación con un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante tal como se describió anteriormente, para estabilizar muestras de sangre completa.

Si la muestra comprende una gran cantidad de células, como es el caso, por ejemplo, de la sangre completa, las células se separan del resto de la muestra para obtener una fracción sin células, respectivamente una fracción con menor cantidad de células o depurada de células, de la muestra, que comprende los ácidos nucleicos extracelulares. Así, según una realización, las células se retiran de la muestra que contiene células entre la etapa a) y la etapa b). Esta etapa intermedia solo es opcional y, por ejemplo, puede resultar obsoleta si las muestras que se procesan solamente comprenden cantidades muy pequeñas de células residuales, tales como, por ejemplo, plasma o suero. Sin embargo, para mejorar los resultados se prefiere que también se retiren las respectivas células remanentes (o células potencialmente remanentes), puesto que podrían contaminar a la población de ácidos nucleicos extracelulares durante el aislamiento. Dependiendo del tipo de muestra, las células, incluyendo las células residuales, pueden separarse y retirarse, por ejemplo, mediante centrifugación, preferiblemente centrifugación a alta velocidad, o empleando medios distintos de la centrifugación, tales como, por ejemplo, filtración, sedimentación o unión a superficies de partículas (opcionalmente magnéticas), si se quiere evitar una etapa de centrifugación. Las respectivas etapas de retirada de células también pueden incluirse con facilidad en un protocolo de preparación de muestras automático. Las células respectivamente retiradas también pueden procesarse después. Las células, por ejemplo, pueden conservarse y/o pueden aislarse biomoléculas, tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas, de las células retiradas. Además, también se incluyen dentro del alcance de la presente invención otras etapas intermedias para tratar la muestra.

Los ácidos nucleicos extracelulares después se aíslan en la etapa b), por ejemplo, a partir de la fracción sin células, respectivamente depurada de células, por ejemplo, a partir de los sobrenadantes, de plasma y/o de suero. Para aislar los ácidos nucleicos extracelulares puede emplearse cualquier método para el aislamiento de ácidos nucleicos que sea adecuado para aislar ácidos nucleicos de la respectiva muestra, respectivamente la muestra depurada de células. Los ejemplos de los respectivos métodos de purificación 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 (empleado superficies de intercambio aniónico), electroforesis, filtración, precipitación, inmunoprecipitación con cromatina y sus combinaciones. También se incluye dentro del alcance de la presente invención el aislamiento específico de ácidos nucleicos extracelulares diana específicos, por ejemplo, empleando sondas apropiadas que permitan la unión de una secuencia específica y que están acopladas a un soporte sólido. Además también puede utilizarse cualquier otra técnica de aislamiento de ácidos nucleicos conocida por los expertos en la técnica. Según una realización, los ácidos nucleicos se aíslan empleando un agente caotrópico y/o alcohol. Preferiblemente, los ácidos nucleicos se aíslan uniéndolos a una fase sólida, preferiblemente una fase sólida que comprende sílice o grupos funcionales de intercambio aniónico. Los métodos y kits adecuados también están disponibles en el mercado, tales como QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN), Chemagic Circulating NA Kit (Chemagen), NucleoSpin Plasma XS Kit (Macherey-Nagel), Plasma/Serum Circulating DNA Purification Kit (Norgen Biotek), Plasma/Serum Circulating RNA Purification Kit (Norgen Biotek), High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume Kit (Roche) y otros kits disponibles en el mercado

adecuados para extraer y purificar los ácidos nucleicos en circulación.

Según una realización, todos los ácidos nucleicos que están comprendidos en la muestra que se obtiene después de la etapa a) u opcionalmente obtenidos después de que las células se hayan retirado en la etapa intermedia, se aíslan, por ejemplo, se aíslan de la fracción sin células, respectivamente depurada de células, por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden aislarse de plasma o suero, y los ácidos nucleicos extracelulares estarán comprendidos como una porción en estos ácidos nucleicos extraídos. Si las células se retiran de modo eficaz, los ácidos nucleicos totales aislados comprenderán predominantemente o incluso consistirán en ácidos nucleicos extracelulares. También se incluye dentro del alcance de la presente invención el aislamiento de un ácido nucleico diana específico al menos predominantemente. Un ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, cierto tipo de ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN, que incluye ARNm, microARN, otros ácidos nucleicos no codificadores, ácidos nucleicos modificados epigenéticamente y otros ácidos nucleicos. También se incluye dentro del alcance de la presente invención la digestión del ácido nucleico no diana empleando nucleasas después del aislamiento. La expresión 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 marcador de enfermedad concreto.

Tal como se analizó anteriormente, el aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares también puede comprender el aislamiento específico de un respectivo ácido nucleico diana, por ejemplo, empleando sondas de captura apropiadas. La expresión 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 respectivos ácidos nucleicos diana más pequeños puede ser ventajoso, porque se sabe que los ácidos nucleicos extracelulares habitualmente tienen un tamaño menor que 2000 nt, habitualmente menor que 1000 nt, y a menudo incluso menor que 500 nt. Los tamaños, respectivamente los intervalos de tamaño indicados en la presente se refieren a la longitud de la cadena, es decir, en el caso del ADN se refieren a las pb. Centrando el aislamiento, respectivamente la purificación, en los respectivos ácidos nucleicos pequeños puede aumentar la porción de ácidos nucleicos extracelulares obtenida en los ácidos nucleicos aislados. Los métodos de estabilización según la presente invención permiten, en particular debido a la inhibición de la fragmentación del ADN genómico intracelular, una separación más eficaz de dicho ADN genómico de alto peso molecular, de la población de ácidos nucleicos extracelulares fragmentados, por ejemplo, durante el procedimiento de extracción de los ácidos nucleicos. Puesto que la diferencia de tamaño sustancial entre los ácidos nucleicos genómicos y los ácidos nucleicos en circulación se conserva fundamentalmente empleando la tecnología de estabilización según la presente invención, el ADN genómico puede retirarse, por ejemplo, mediante una recuperación de ADN de exclusión por tamaño, de una manera más eficaz que sin la respectiva estabilización. Los métodos adecuados para lograr un respectivo aislamiento selectivo de la población de ácidos nucleicos extracelulares, por ejemplo, depurando el ADN genómico de alto peso molecular, son muy conocidos en la técnica y, por tanto, no necesitan de una descripción más a fondo en la presente. Por ejemplo, sería suficiente emplear un método de exclusión por tamaño que depure una muestra de cualquier ácido nucleico mayor que 1.000-10.000 nucleótidos o pares de bases. Puesto que la diferencia de tamaño entre los ácidos nucleicos genómicos (habitualmente mayores que >10.000 pb) y los ácidos nucleicos extracelulares (habitualmente <1000 pb) en una muestra estabilizada según la presente invención con frecuencia es relativamente grande debido a la estabilización eficaz (la diferencia puede encontrarse en un intervalo, por ejemplo, de 1000-10.000 pb), pueden aplicarse métodos conocidos para aislar selectivamente los ácidos nucleicos extracelulares de una muestra biológica. Esto proporciona más oportunidades para reducir la cantidad de ácidos nucleicos intracelulares en la población de ácidos nucleicos extracelulares. Por ejemplo, la eliminación del ADN genómico durante el protocolo de extracción de ácidos nucleicos también puede suplementar o incluso reemplazar a una centrifugación de alta potencia de g separada de una muestra de plasma antes de comenzar la extracción de ácidos nucleicos para eliminar las células residuales. Se evita que el ADN genómico que se libera de dichas células residuales se degrade notablemente debido a la estabilización según la presente invención y, por tanto, puede retirarse mediante protocolos de aislamiento de exclusión por tamaño. Esta opción es particularmente ventajosa, puesto que muchos laboratorios clínicos no poseen una centrífuga capaz de realizar esta centrifugación de alta potencia de g u otros medios para retirar, en particular, cantidades traza de células residuales.

Además, los ácidos nucleicos intracelulares pueden aislarse a partir de dichas células contenidas, por ejemplo, después de que las células se separen del resto de la muestra. Por ejemplo, el ARN puede aislarse y emplearse para el análisis de la expresión génica.

Los ácidos nucleicos aislados después pueden analizarse y/o procesarse aún más en la etapa c) empleando métodos de ensayo y/o analíticos adecuados, por ejemplo, pueden identificarse, modificarse, ponerse en contacto con al menos una enzima, amplificarse, someterse a transcripción inversa, clonarse, secuenciarse, ponerse en contacto con una sonda, detectarse (su presencia o su ausencia) y/o cuantificarse. Los respectivos métodos son muy conocidos en la técnica anterior y se aplican habitualmente en el campo médico, de diagnóstico y/o de pronóstico para analizar ácidos nucleicos extracelulares (véase también la descripción detallada en los antecedentes de la presente invención). Así, después de aislar los ácidos nucleicos extracelulares, opcionalmente como parte del ácido nucleico total, el ARN total y/o el ADN total (véase anteriormente), estos pueden analizarse para la presencia, la ausencia o la gravedad de un estado de enfermedad que incluye, pero no se limita a multitud de enfermedades neoplásicas, en particular premalignidades y malignidades, tales como diferentes formas de cánceres. Por ejemplo, los ácidos nucleicos extracelulares aislados pueden analizarse para detectar marcadores de diagnóstico y/o pronóstico (por ejemplo, ácidos nucleicos extracelulares fetales o derivados de tumores) en muchos

campos de aplicación, que incluyen, pero no se limitan a ensayos genéticos prenatales no invasivos, respectivamente de selección, selección de enfermedades, selección de patógenos, oncología, selección de cánceres, selección de cánceres en estadio temprano, control de la terapia del cáncer, ensayo genético (genotipificación), ensayo de enfermedades infecciosas, diagnóstico de lesiones, diagnóstico de traumatismos, medicina de trasplante o muchas otras enfermedades y, por tanto, tienen importancia diagnóstica y/o de pronóstico. Según una realización, los ácidos nucleicos extracelulares se analizan para identificar y/o caracterizar una enfermedad o una característica fetal. Así, tal como se analizó anteriormente, el método de aislamiento descrito en la presente puede comprender también una etapa c) de ensayo y/o procesamiento de los ácidos nucleicos. Por tanto, según una realización, los ácidos nucleicos extracelulares aislados se analizan en la etapa c) para identificar, detectar, seleccionar, controlar o excluir una enfermedad y/o al menos una característica fetal.

El análisis/procesamiento posterior de los ácidos nucleicos puede realizarse empleando cualquier método de análisis/procesamiento de ácidos nucleicos que incluye, pero no se limita a las tecnologías de amplificación, reacción en cadena con polimerasa (PCR), amplificación isotérmica, reacción en cadena con polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), reacción en cadena con polimerasa a tiempo real cuantitativa (Q-PCR), PCR digital, electroforesis en gel, electroforesis capilar, espectrometría de masas, detección con fluorescencia, espectrometría ultravioleta, ensayos de hibridación, secuenciación de ADN o ARN, análisis de restricción, transcripción inversa, NASBA, reacción en cadena con polimerasa específica de alelos, ensamblaje cíclico con polimerasa (PCA), reacción en cadena con polimerasa asimétrica, lineal después de la reacción en cadena con polimerasa exponencial (LATE-PCR), amplificación dependiente de helicasa (HDA), reacción en cadena con polimerasa de inicio en caliente, reacción en cadena con polimerasa específica de intersecuencia (ISSR), reacción en cadena con polimerasa inversa, reacción en cadena con polimerasa mediada por acoplamiento, reacción en cadena con polimerasa específica de metilación (MSP), reacción en cadena con polimerasa de múltiplex, reacción en cadena con polimerasa anidada, reacción en cadena con polimerasa en fase sólida, o cualquiera de sus combinaciones. Las respectivas tecnologías son muy conocidas por los expertos en la técnica y, por tanto, no se necesita una descripción más a fondo en la presente.

Según una realización, cualquiera o ambas etapas de aislamiento o análisis de las etapas b) y c) se produce al menos 1 día hasta 7 días después de haber recolectado la muestra, respectivamente de haberla estabilizado según las indicaciones de la presente invención. Los periodos de tiempo adecuados en los que la muestra, en particular una muestra de sangre, respectivamente la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en ella, puede estabilizarse empleando el método según la presente invención también han sido descritos anteriormente y también son aplicables a este punto. Según una realización, 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 recolectar y estabilizar la muestra según el método de la presente invención. Según una realización, cualquiera o ambas etapas de aislamiento o análisis se produce sin congelar la muestra y/o sin el uso de formaldehído para conservar la muestra biológica que contiene células. La muestra biológica se estabiliza después del contacto con el compuesto según la fórmula 1, tal como se definió anteriormente, preferiblemente en combinación con otro aditivo, tal como un anticoagulante como EDTA. Se emplea preferiblemente un anticoagulante cuando se estabiliza sangre o una muestra derivada de sangre. Las muestras respectivamente estabilizadas pueden manipularse, por ejemplo, conservarse y/o trasladarse a temperatura ambiente. Tal como se describió anteriormente, según una realización, además se emplea un inhibidor de la apoptosis, preferiblemente un inhibidor de la caspasa, para la estabilización.

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

a) al menos un compuesto según la fórmula 1, según se definió anteriormente; y

b) al menos un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante.

Tal como se analizó anteriormente, una respectiva composición estabilizante resulta particularmente eficaz para estabilizar una muestra biológica que contiene células, en particular sangre completa, plasma y/o suero mediante la estabilización de las células comprendidas, los niveles de transcripciones y los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en dicha muestra, con lo que se conserva sustancialmente, respectivamente se estabiliza la población de ácidos nucleicos extracelulares. Una respectiva composición estabilizante permite la conservación y/o la manipulación, por ejemplo, el transporte de la muestra, que preferiblemente es sangre completa, a temperatura ambiente durante al menos dos, o preferiblemente al menos tres días sin comprometer sustancialmente la calidad de la muestra, respectivamente la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en ella. Además, el perfil de transcripción génica del transcriptoma de las células contenidas se conserva. Por supuesto, no es necesario esperar el periodo de estabilización más largo que se puede conseguir; las muestras también pueden procesarse antes, si se desea. El contacto de la muestra biológica con la composición estabilizante permite que la muestra se conserve y/o se manipule, por ejemplo, se transporte, incluso a temperatura ambiente antes de aislar y, opcionalmente, analizar y/o procesar los ácidos nucleicos contenidos. Así, el tiempo entre la recolección o la estabilización de la muestra y la extracción de los ácidos nucleicos puede variar sin afectar sustancialmente a la población, respectivamente la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en ella. En particular, se reducen las diluciones, respectivamente las contaminaciones con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado. Además, puesto que el perfil de transcripción génica de las células contenidas se estabiliza, el ARN

intracelular puede aislarse y, por ejemplo, emplearse en métodos que analizan la expresión génica y puede utilizarse para la determinación de los perfiles de expresión génica. Preferiblemente, la composición de estabilización se pone en contacto con la muestra inmediatamente después o durante la recolección de la muestra. La composición de estabilización puede comprender además otros agentes estabilizantes, tal como se describió en la presente, por ejemplo, un inhibidor de la apoptosis, que preferiblemente es un inhibidor de caspasa.

Las realizaciones adecuadas y preferidas del compuesto según la fórmula 1 y el inhibidor de la apoptosis, así como las concentraciones adecuadas y preferidas de los respectivos compuestos se han descrito en detalle anteriormente, junto con el método de estabilización. Se indica en la anterior descripción, lo cual también se aplica con respecto a la composición de estabilización. Según una realización, el compuesto según la fórmula 1 es N,N-dimetilpropanamida. Dicho compuesto también se puede utilizar en combinación con un inhibidor de la apoptosis, preferiblemente un inhibidor de la caspasa (las realizaciones preferidas se describieron anteriormente, indicadas en la anterior descripción).

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

Según una realización, la composición estabilizante consiste fundamentalmente en los estabilizantes y aditivos opcionales mencionados y, opcionalmente, agentes tamponantes. La composición estabilizante estabiliza la muestra y, por tanto, no estimula la lisis y/o la alteración de las células contenidas en la muestra. La composición estabilizante puede reducir el daño a las células comprendidas en la muestra, tal como puede determinarse, por ejemplo, por medio de los métodos de ensayo descritos en la sección de ejemplos.

La composición puede proporcionarse en forma sólida. Esta es una opción adecuada, por ejemplo, si la muestra biológica que se va a estabilizar contiene un líquido para disolver el sólido (tal como, por ejemplo, fluidos corporales que contienen células, células en un medio, orina), o si se añade un líquido, por ejemplo, agua a la muestra para disolver el sólido. La ventaja de utilizar una composición estabilizante sólida es que los sólidos habitualmente son más estables desde el punto de vista químico. Sin embargo, también puede emplearse una composición líquida. Las composiciones líquidas a menudo tienen la ventaja de que la mezcla con la muestra que se va a estabilizar puede lograrse rápidamente, proporcionando básicamente con ello un efecto estabilizante inmediato en cuanto la muestra se pone en contacto con la composición estabilizante líquida. Preferiblemente, el agente o agentes estabilizantes presentes en la composición estabilizante líquida permanecen estables en la disolución y no son necesarios pretratamientos (tales como, por ejemplo, la disolución de los precipitados de solubilidad limitada) por parte del usuario, puesto que los pretratamientos de este tipo suponen el riesgo de introducir variaciones en la eficacia estabilizante.

También se proporciona una mezcla que comprende la composición estabilizante según la presente invención mezclada con una muestra biológica. Los ejemplos adecuados y preferidos de muestras biológicas, así como las concentraciones adecuadas de agente o agentes estabilizantes cuando se mezclan con la muestra biológica se describieron anteriormente junto con el método de estabilización. Se indica en la anterior descripción, lo cual también se aplica en este punto. Preferiblemente, la composición estabilizante se precarga en un dispositivo de recolección de muestras de modo que la muestra se estabiliza inmediatamente durante la recolección. Según una realización, la composición estabilizante se pone en contacto con la muestra biológica en una proporción volumétrica seleccionada 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. Una ventaja particular de la composición estabilizante de la presente invención es que puede lograrse la estabilización de un gran volumen de muestra con un pequeño volumen de composición estabilizante. Por tanto, preferiblemente, la proporción de composición estabilizante a muestra se encuentra en el intervalo de 1:2 a 1:7, más preferiblemente de 1:3 a 1:5.

La composición estabilizante según el tercer aspecto de la presente invención puede emplearse para estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en una muestra que contiene células. Además, la composición estabilizante según el tercer aspecto de la presente invención puede emplearse también para estabilizar las células contenidas en una muestra. Tal como se describió anteriormente, la composición estabilizante, entre otras cuestiones, reduce la liberación de ADN genómico de las células que surge de las células en descomposición. Así, este respectivo uso también es ventajoso y es proporcionado por las indicaciones según la presente invención. Además, la composición estabilizante según el tercer aspecto de la presente invención puede emplearse también para estabilizar los niveles de transcripciones en las células contenidas.

También se proporciona un método para fabricar una composición según el tercer aspecto de la presente invención, en el que los componentes de la composición se mezclan, preferiblemente se mezclan en una disolución acuosa.

La composición de la presente invención también puede incorporarse en un dispositivo de recolección de muestras, en particular un instrumento de recolección de sangre, proporcionando con ello una versión nueva y útil de dicho dispositivo. Estos dispositivos generalmente incluyen un recipiente que tiene un extremo abierto y otro cerrado. El recipiente es preferiblemente un tubo de recolección de sangre. El tipo de recipiente depende también de la muestra que se va a recolectar; otros formatos adecuados se describen a continuación.

Además, la presente invención proporciona un recipiente para recolectar una muestra biológica que contiene células, preferiblemente una muestra de sangre, en el que el recipiente comprende una composición estabilizante según la presente invención. El suministro de un respectivo recipiente, por ejemplo, un tubo de recolección de muestras que comprende la composición estabilizante según la presente invención, tiene la ventaja de que la muestra se estabiliza con rapidez cuando la muestra se recolecta en el respectivo recipiente. Los detalles con respecto a la composición estabilizante se describieron anteriormente, se indican en la anterior descripción y también se aplican en este punto.

Según una realización, se proporciona un recipiente de recolección para recibir y recolectar una muestra biológica, en el que el recipiente comprende:

a) al menos un compuesto según la fórmula 1, según se definió anteriormente, de modo que cuando la muestra se recolecta, el compuesto según la fórmula 1 está comprendido en una concentración de al menos al 0,1%, al menos 0,5%, al menos 0,75%, al menos 1%, al menos 1,25% o al menos 1,5%, o en el que dicho compuesto está comprendido en un intervalo de concentración seleccionado de 0,1% hasta 50%, de 0,1% hasta 30%, de 1% hasta 20%, de 1% hasta 10%, de 1% hasta 7,5%, y de 1% hasta 5%; y/o

b) opcionalmente al menos otro aditivo, preferiblemente un agente anticoagulante, tal como un agente quelante, preferiblemente EDTA si el recipiente es para recolectar sangre o un producto sanguíneo. Las concentraciones adecuadas se describieron anteriormente y se encuentran preferiblemente en el intervalo de 4 mM a 50 mM, más preferiblemente de 4 mM a 20 mM.

Las concentraciones adecuadas también se describieron anteriormente junto con el método, y se indican en la anterior descripción. Según una realización, el recipiente comprende además al menos un inhibidor de la apoptosis, de modo que cuando la muestra se recolecta, la concentración del inhibidor de la apoptosis o de una combinación de dos o más inhibidores de la apoptosis en la mezcla resultante se selecciona de al menos 0,01 μM , al menos 0,05 μM , al menos 0,1 μM , al menos 0,5 μM , al menos 1 μM , al menos 2,5 μM o al menos 3,5 μM , y preferiblemente está presente en un intervalo de concentración seleccionado de 0,01 μM a 100 μM , de 0,05 μM a 100 μM , de 0,1 μM a 50 μM , de 1 μM a 40 μM , de 1,0 μM a 30 μM , o de 2,5 μM a 25 μM .

Los componentes precargados pueden proporcionarse en un líquido o en una forma seca. Preferiblemente, los componentes estabilizantes se proporcionan como una composición estabilizante. Una forma seca es, por ejemplo, una opción adecuada si la muestra biológica que se va a estabilizar contiene un líquido para disolver el sólido (tal como, por ejemplo, fluidos corporales que contienen células, células en un medio, orina), o si se añade un líquido, por ejemplo, agua a la muestra para disolver el sólido. La ventaja de utilizar una composición estabilizante sólida es que los sólidos habitualmente son más estables desde el punto de vista químico. 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 empleando, por ejemplo, un método de pulverización en seco. Pueden aplicarse técnicas de eliminación de líquidos a la composición estabilizante para obtener una composición protectora sustancialmente en estado sólido. Las condiciones de eliminación de líquidos pueden ser tales que se obtenga la eliminación de al menos aproximadamente 50% en peso, al menos aproximadamente 75% en peso, y al menos aproximadamente 85% en peso de la cantidad original de la composición estabilizante líquida dispensada. Las condiciones de eliminación de líquidos pueden ser tales que se obtenga la eliminación del líquido suficiente para que la composición resultante esté en forma de una película, gel u otra capa sustancialmente sólida o altamente viscosa. Por ejemplo, puede obtenerse un revestimiento sustancialmente inmóvil (preferiblemente un revestimiento que pueda redisolverse o dispersarse de otro modo tras ponerlo en contacto con la muestra que contiene células, que preferiblemente es una muestra de producto sanguíneo). Es posible emplear la liofilización u otras técnicas para obtener una forma sustancialmente sólida del agente protector (por ejemplo, en forma de uno o más gránulos). Por tanto, las condiciones de eliminación de líquidos pueden ser de tal forma que se obtenga un material en el que, tras el contacto con la muestra concreta (por ejemplo, una muestra de sangre completa), el agente protector se dispersará en la muestra y sustancialmente conservará a los componentes (por ejemplo, ácidos nucleicos extracelulares) en la muestra. Las condiciones de eliminación de líquidos pueden ser de tal forma que el resto de la composición esté sustancialmente libre de cristalinidad, tenga una viscosidad que sea lo suficientemente alta para que el resto de la composición sea sustancialmente inmóvil a temperatura ambiente, o ambas.

Sin embargo, también puede emplearse una composición líquida. Las composiciones líquidas a menudo tienen la ventaja de que la mezcla con la muestra que se va a estabilizar puede lograrse rápidamente, proporcionando básicamente con ello un efecto estabilizante inmediato en cuanto la muestra se pone en contacto con la composición estabilizante líquida. Preferiblemente, el agente o agentes estabilizantes presentes en la composición estabilizante líquida permanecen estables en la disolución y no son necesarios pretratamientos (tales como, por ejemplo, la disolución de los precipitados de solubilidad limitada) por parte del usuario, puesto que los pretratamientos de este tipo suponen el riesgo de introducir variaciones en la eficacia estabilizante.

La composición estabilizante está comprendida en el recipiente en una cantidad eficaz para proporcionar la estabilización de la cantidad de la muestra que se va a recolectar en dicho recipiente. Según una realización, la composición estabilizante líquida se pone en contacto con la muestra biológica en una proporción volumétrica seleccionada 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. Una ventaja particular de la composición estabilizante de la presente invención es que puede lograrse la estabilización de un gran volumen de muestra con un

pequeño volumen de composición estabilizante. Por tanto, preferiblemente, la proporción de composición estabilizante a muestra se encuentra en el intervalo de 1:2 a 1:7, más preferiblemente de 1:3 a 1:5.

Según una realización, el recipiente se somete al vacío. El vacío es particularmente eficaz para extraer un volumen específico de muestra fluida hacia el interior. Con ello, se asegura que la cantidad correcta de muestra se pone en contacto con la cantidad precargada de la composición estabilizante comprendida en el recipiente y, por consiguiente, que la estabilización sea eficaz. Según una realización, el recipiente comprende un tubo que tiene un extremo abierto sellado por un septo. Por ejemplo, el recipiente se precarga con una cantidad definida de la composición estabilizante en forma sólida o líquida, y se proporciona con un vacío definido y sellado con un septo. El septo se construye de modo que sea compatible con los accesorios de toma de muestras convencionales (por ejemplo, cánulas, etc.). Cuando se pone en contacto, por ejemplo, con la cánula, una cantidad de muestra que viene predeterminada por el vacío se introduce en el recipiente. Esta respectiva realización es ventajosa, en particular, para recolectar sangre. Un recipiente adecuado se describe, por ejemplo, en el documento US 6.776.959.

El recipiente según la presente invención puede estar fabricado 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. Como alternativa, el recipiente puede estar fabricado de un material de plástico permeable al agua y al aire. El recipiente según la presente invención preferiblemente está fabricado de un material transparente. Los 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 está recolectando. Tal como se describió anteriormente, el recipiente preferiblemente se somete al vacío hasta una presión interna por debajo de la presión atmosférica. Esta realización en particularmente adecuada para recolectar fluidos corporales, tales como sangre completa. La presión se selecciona preferiblemente para extraer un volumen predeterminado de una muestra biológica hacia el recipiente. Además de dichos tubos de vacío también pueden utilizarse tubos que no son de vacío, tubos separadores mecánicos o tubos de barrera de gel como recipientes para muestras, en particular para la recolección de muestras de sangre. Los ejemplos de recipientes adecuados y de dispositivos de cierre se describen en los documentos US 5.860.397 y US 2004/0043505. Como recipiente para recoger la muestra que contiene células también pueden utilizarse otros dispositivos de recolección, por ejemplo, una jeringa, un dispositivo de recolección de orina u otros dispositivos de recolección. El tipo de recipiente también puede depender del tipo de muestra que se va a recolectar, y los expertos en la técnica también disponen de recipientes adecuados.

Se obtienen resultados beneficiosos cuando el recipiente, respectivamente el dispositivo, se carga o se precarga con al menos un compuesto según la fórmula 1, según se definió anteriormente, como agente estabilizante. Preferiblemente, se incluye un anticoagulante además del compuesto según la fórmula 1. El anticoagulante es preferiblemente un agente quelante, tal como EDTA. Además, la composición estabilizante incluida en el recipiente puede comprender además un inhibidor de la apoptosis, preferiblemente un inhibidor de caspasa, y opcionalmente otros aditivos. Según una realización, la composición estabilizante incluida en el recipiente comprende un inhibidor de caspasa y un anticoagulante.

Según una realización, el recipiente tiene un extremo superior abierto, un extremo inferior y una pared lateral que se extiende entre ambos para definir una cámara, en el que la composición de estabilización según la invención está incluida en la cámara. Puede estar incluida en su interior en forma líquida o sólida. Según una realización, el recipiente es un tubo, el extremo inferior está cerrado, el recipiente comprende además un cierre en el extremo superior abierto, y la cámara está a presión reducida. Las ventajas de una presión reducida en la cámara se describieron anteriormente. Preferiblemente, el cierre es capaz de ser perforado con una aguja o una cánula, y la presión reducida se selecciona para extraer un volumen especificado de una muestra líquida hacia la cámara. Según una realización, la cámara está a una presión reducida seleccionada para extraer un volumen especificado de una muestra líquida hacia la cámara, y la composición estabilizante es líquida y está dispuesta en la cámara de tal forma que la proporción volumétrica de la composición estabilizante al volumen especificado de la muestra que contiene células se selecciona 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. Las ventajas asociadas se describieron anteriormente.

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

Según un quinto aspecto, se proporciona un método que comprende la etapa de recolectar una muestra de un paciente directamente hacia una cámara de un recipiente según el cuarto aspecto de la presente invención. Los detalles con respecto al recipiente y la muestra se describieron anteriormente. Se indican en la respectiva descripción. Según una realización, se recolecta una muestra de sangre, preferiblemente se extrae del paciente.

Los métodos y las composiciones descritos en la presente permiten la conservación y el aislamiento eficaces de ácidos nucleicos extracelulares, al mismo tiempo que se reduce la posible mezcla con ácidos nucleicos, en particular ADN genómico fragmentado, que se originan de las células contenidas en la muestra biológica y que pueden introducirse en una muestra biológica debido a los daños en las células, respectivamente la lisis de células. Los métodos según la presente invención, así como las composiciones y los dispositivos descritos (por ejemplo, los recipientes de recolección) reducen la degradación de los ácidos nucleicos extracelulares y también reducen la lisis celular y/o la liberación de ácidos nucleicos genómicos, en particular ADN genómico fragmentado, de modo que los

ácidos nucleicos extracelulares contenidos en la muestra no se contaminan con ácidos nucleicos intracelulares, respectivamente se reduce la respectiva contaminación a través de las indicaciones según la presente invención. Tal como se analizó anteriormente, el entremezclado de ácidos nucleicos extracelulares y ácidos nucleicos celulares, en particular ADN genómico fragmentado, puede reducir la precisión de cualquier medición de la cantidad de ácidos nucleicos extracelulares en una muestra biológica. Tal como se analizó anteriormente, una ventaja importante de la presente invención es la posibilidad de estabilizar, de modo fundamentalmente simultáneo, las células contenidas en la muestra (en particular leucocitos o tipos de leucocitos en el caso de sangre completa, plasma o suero) y los ácidos nucleicos extracelulares. Esto ayuda a prevenir la liberación de ácidos nucleicos celulares, tales como ADN genómico, hacia la porción sin células de la muestra, y diluye aún más los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos (y los biomarcadores asociados) de interés, al mismo tiempo que mantiene la integridad estructural de los ácidos nucleicos extracelulares. Tal como se analiza en la presente, el poner en contacto la muestra biológica que contiene células, tal como sangre completa o plasma, con el agente o agentes estabilizantes permite conservar la muestra durante un periodo de tiempo antes de aislar los ácidos nucleicos extracelulares. Más preferiblemente, la muestra biológica que contiene células, por ejemplo, sangre o plasma, puede extraerse en un emplazamiento (por ejemplo, unas instalaciones sanitarias), ponerse en contacto con el agente o agentes estabilizantes, y después transportarse hacia un emplazamiento remoto diferente (por ejemplo, un laboratorio) para el proceso de aislamiento y ensayo de los ácidos nucleicos.

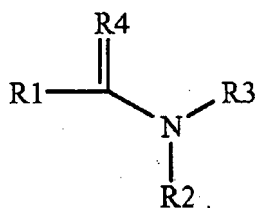
Además, las tecnologías de estabilización descritas en la presente permiten estabilizar los ácidos nucleicos intracelulares y, en particular, los niveles de transcripciones, tal como se describió en detalle anteriormente. Además, las células pueden aislarse de la muestra, con lo cual se pueden analizar las poblaciones de células específicas, tales como, por ejemplo, células tumorales, por ejemplo, células tumorales en circulación en muestras de sangre. Las ventajas y los efectos técnicos se describieron en detalle anteriormente y se indican en la anterior descripción.

Además, los reactivos de estabilización, tal como se describe en la presente, proporcionan una ventaja frente a los reactivos de estabilización de la técnica actual, que implican el uso de reactivos de entrecruzamiento, tales como formaldehído, liberadores de formaldehído y similares, ya que la estabilización de muestras según la presente invención no implica el uso de dichos reactivos de entrecruzamiento. Los reactivos de entrecruzamiento provocan la formación de enlaces covalentes inter- o intramoleculares entre las moléculas de ácidos nucleicos o entre los ácidos nucleicos y proteínas. Este efecto puede conducir a una menor recuperación de dichos ácidos nucleicos estabilizados y parcialmente entrecruzados después de la purificación o la extracción de una muestra biológica compleja. Puesto que, por ejemplo, la concentración de los ácidos nucleicos en circulación en las muestras de sangre completa ya es relativamente baja, debería evitarse cualquier medida que redujera aún más el rendimiento de dichos ácidos nucleicos. Esto puede resultar de particular importancia 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, no se incluye ningún liberador de formaldehído en la composición estabilizante, respectivamente no se emplea adicionalmente para la estabilización.

Por tanto, según una realización, no se incluyen agentes de entrecruzamiento, tales como formaldehído o liberadores de formaldehído, en la composición estabilizante, respectivamente no se emplean adicionalmente para la estabilización. Así, en la presente, la composición de estabilización no comprende un agente de entrecruzamiento que induzca entrecruzamientos de ácido nucleico-ácido nucleico, ácido nucleico-proteína, en particular proteína-ADN y/o proteína-proteína. En particular, la composición de estabilización no comprende formaldehído, formalina, paraformaldehído o un liberador de formaldehído. Además, tal como se describió, la composición estabilizante preferiblemente no comprende ningún aditivo que induzca la lisis de células, tales como, por ejemplo, sales caotrópicas.

Las realizaciones particularmente preferidas se describen de nuevo a continuación.

En un primer aspecto, la presente invención se dirige, en particular, a un método para estabilizar una muestra biológica que contiene células, poniendo en contacto la muestra con al menos un compuesto según la fórmula 1



Fórmula 1

en la que R1 es un resto hidrógeno o un resto alquilo, R2 y R3 son restos hidrocarburo iguales o diferentes con una longitud de la cadena de carbonos de 1-20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un resto oxígeno, azufre o selenio, y en el que dicho compuesto según la fórmula 1 es una N,N-dialquilpropanamida.

- Según una realización, el compuesto según la fórmula 1 es N,N-dimetilpropanamida. Según una realización, dicho al menos un compuesto de fórmula 1 está comprendido en una composición estabilizante, que comprende opcionalmente aditivos adicionales y en la que dicha composición estabilizante se pone en contacto con la muestra.
- 5 Según una realización, la muestra que contiene células se selecciona de fluidos corporales, sangre, capa leucocítica, leucocitos, plasma, suero y orina, y preferiblemente la muestra es una muestra de sangre. Según una realización, la muestra que contiene células es una muestra de sangre, y además se pone en contacto con un anticoagulante. Según una realización, se reduce la degradación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra debido a la estabilización.
- 10 Según una realización, se estabiliza el ARN intracelular. Según una realización, se estabiliza el transcriptoma, en particular el perfil de expresión de ARNm y/o los niveles de transcripciones en las células contenidas. En particular, el nivel de transcripciones de uno o más genes marcadores seleccionados de c-fos, IL-1beta, IL-8 y p53 se estabiliza durante al menos 48 h después de la estabilización.
- 15 Según una realización, el método es adecuado para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en una muestra que contiene células. Preferiblemente, se reduce la liberación del ADN genómico de las células contenidas en la muestra hacia la porción sin células de la muestra.
- Según una realización, se estabilizan las células comprendidas en la muestra biológica que contiene células. Preferiblemente la estabilización permite el aislamiento de células de la muestra estabilizada. Preferiblemente, la muestra que contiene células es una muestra de sangre, en la que los leucocitos están estabilizados. En particular, el método presenta una o más de las siguientes características:
- 20 a) se conserva la morfología de las células;
- b) se conserva la morfología de las células nucleadas;
- c) la muestra es una muestra de sangre y los linfocitos y/o monocitos contenidos están estabilizados;
- d) se conservan los epitopos de la superficie celular; y/o
- e) se conservan las proteínas de la superficie celular.
- 25 Según una realización, el método es para estabilizar una muestra de sangre, que comprende poner en contacto la muestra de sangre con una N,N-dialquilpropanamida y un anticoagulante, en el que los niveles de transcripciones en las células contenidas se estabilizan.
- Según una realización, el método presenta una o más de las siguientes características:
- 30 a) la estabilización no estimula la lisis de las células nucleadas contenidas en la muestra que contiene células;
- b) el método de estabilización se realiza sin el entrecruzamiento de la muestra; y/o
- c) la estabilización no implica el uso de un agente de entrecruzamiento que induzca entrecruzamientos de ácido nucleico-ácido nucleico, ácido nucleico-proteína y/o proteína-proteína.
- Según una realización, la muestra que contiene células se pone en contacto además con un inhibidor de la apoptosis. El inhibidor de la apoptosis preferiblemente es un inhibidor de la caspasa, más preferiblemente un inhibidor de pancaspasas.
- 35 Según una realización, los ácidos nucleicos se aíslan de la muestra estabilizada. En particular, el método presenta una o más de las siguientes características:
- 40 a) se incluyen una N,N-dialquilpropanamida y opcionalmente otros aditivos en una composición estabilizante, en la que la proporción volumétrica de la composición estabilizante al volumen especificado de la muestra que contiene células se selecciona 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;
- b) la muestra que contiene células estabilizada se somete a un método de análisis y/o de detección de ácidos nucleicos;
- c) se aíslan los ácidos nucleicos intra- y/o extracelulares de la muestra estabilizada, y los ácidos nucleicos aislados se analizan y/o detectan;
- 45 d) las células comprendidas en la muestra estabilizada se retiran; y/o
- e) se conserva (i) la muestra biológica que contiene células estabilizada, (ii) la muestra estabilizada de la cual se han retirado las células y/o (iii) las células retiradas de la muestra.
- Según una realización, las células se retiran de la muestra estabilizada. En particular, las células retiradas se analizan y/o se aíslan biomoléculas, tales como ácidos nucleicos o proteínas, de las células retiradas. Según una

realización, el ARN se aísla de las células contenidas en la muestra estabilizada.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para aislar ácidos nucleicos de una muestra biológica, que comprende las etapas de:

- a) estabilizar una muestra que contiene células según el método según el primer aspecto de la presente invención;
- 5 b) aislar ácidos nucleicos de la muestra estabilizada.

Según una realización, la etapa b) comprende aislar los ácidos nucleicos intracelulares, preferiblemente el ARN intracelular. En particular, el método comprende retirar las células de la muestra estabilizada y aislar los ácidos nucleicos de las células retiradas. Según una realización, la etapa b) comprende aislar los ácidos nucleicos extracelulares.

- 10 Según una realización, las células se separan del resto de la muestra, y los ácidos nucleicos extracelulares se aíslan del resto de la muestra.

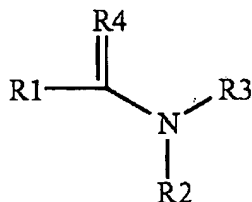
Según una realización, la muestra es sangre.

Según una realización, los ácidos nucleicos aislados, en una posterior etapa c), se procesan y/o se analizan, y preferiblemente:

- 15 i) son modificados;
- ii) se ponen en contacto con al menos una enzima;
- iii) son amplificados;
- iv) se someten a una transcripción inversa;
- v) son clonados;
- 20 vi) son secuenciados;
- vii) se ponen en contacto con una sonda;
- viii) son detectados;
- ix) son cuantificados;
- ix) son identificados; y/o
- 25 x) son analizados para la determinación del perfil de expresión génica.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere en particular a una composición adecuada para estabilizar una muestra biológica que contiene células, que comprende:

- a) al menos un compuesto según la fórmula 1



- 30 Fórmula 1

en la que R1 es un resto hidrógeno o un resto alquilo, R2 y R3 son restos hidrocarburo iguales o diferentes con una longitud de la cadena de carbonos de 1-20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un resto oxígeno, azufre o selenio, y en el que dicho compuesto según la fórmula 1 es una N,N-dialquilpropanamida; y

- b) al menos un anticoagulante.

- 35 Según una realización, la N,N-dialquilpropanamida es N,N-dimetilpropanamida.

Según una realización, el anticoagulante es un agente quelante. Según una realización, la muestra que contiene

en la que R1 es un resto hidrógeno o un resto alquilo, R2 y R3 son restos hidrocarburo iguales o diferentes con una longitud de la cadena de carbonos de 1-20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un resto oxígeno, azufre o selenio, y en el que dicho compuesto según la fórmula 1 es una N,N-dialquilpropanamida.

- 5 Según una realización, el compuesto según la fórmula 1 es N,N-dimetilpropanamida. Según una realización, la composición estabilizante comprende además un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante. Según una realización, la composición estabilizante comprende además un inhibidor de la apoptosis, preferiblemente un inhibidor de la caspasa, más preferiblemente un inhibidor de pancaspasas. Según una realización, la composición estabilizante no comprende un agente de entrecruzamiento que induzca entrecruzamientos de ácido nucleico-ácido nucleico, ácido nucleico-proteína y/o proteína-proteína.
- 10 Según una realización, la composición estabilizante es una composición según el tercer aspecto de la invención.
- Según una realización, el recipiente tiene una o más de las características definidas en la presente para los otros aspectos de la invención.
- En un quinto aspecto, la invención se dirige a un método que comprende la etapa de recolectar una muestra de un paciente hacia una cámara del recipiente según el cuarto aspecto de la presente invención.
- 15 Esta invención no está limitada a los ejemplos de métodos y materiales descritos en la presente, y puede utilizarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente en la práctica o el ensayo de las realizaciones de esta invención. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Los encabezados proporcionados en la presente no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta invención, y pueden leerse como referencia a la memoria descriptiva como un todo.
- 20 El término "disolución", tal como se emplea en la presente, se refiere en particular a una composición líquida, preferiblemente una composición acuosa. Puede ser una mezcla homogénea de una sola fase, pero también se incluye dentro del alcance de la presente invención una disolución que comprenda aditivos sólidos, tales como, por ejemplo, precipitados, por ejemplo, de los agentes químicos comprendidos.
- 25 Los tamaños, respectivamente los intervalos de tamaño indicados en la presente con referencia a nucleótidos nt, se refieren a la longitud de la cadena y, por tanto, se emplean para describir la longitud de moléculas monocatenarias y bicatenarias. En las moléculas bicatenarias, dichos nucleótidos están apareados.
- Según una realización, la materia descrita en la presente, que comprende ciertas etapas en el caso de los métodos o que comprende ciertos ingredientes en el caso de composiciones, disoluciones y/o tampones, se refiere a la materia que consiste en las respectivas etapas o ingredientes. Se prefiere seleccionar y combinar las realizaciones preferidas descritas en la presente, y la materia específica que surge de una respectiva combinación de las realizaciones preferidas también pertenece a la presente descripción.
- 30

Tabla 1: Resumen de los inhibidores de la apoptosis

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
1. Inhibidores metabólicos	
AICA-ribósido, acadesina, AICAr, 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-ribósido, Z-ribósido	Ofrece protección frente a la muerte celular inducida por la privación de glucosa.
Inhibidor de la apoptosis II, compuesto de diarilurea	Evita la formación del complejo del apoptosoma de aprox. 700 kDa.
Bloqueante del canal Bax, (±)-1-(3,6-dibromocarbazol-9-il)-3-piperazin-1-il-propan-2-ol, bis TFA, iMAC1	Un derivado de dibromocarbazolo-piperazinilo permeable a células que muestra propiedades antiapoptóticas. Bloquea de modo eficaz la liberación de citocromo c inducida por Bid de las mitocondrias de células HeLa (aprox. 80% de inhibición a 5 μM) mediante la inhibición de la actividad formadora del canal Bax (IC50 = 520 nM en un ensayo de canal de liposoma).

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
<p>Péptido inhibidor de Bax, V5 Secuencia peptídica: H-Val-Pro-Met-Leu-Lys-OH</p>	<p>Un pentapéptido permeable a células basado en el dominio inhibidor de Bax-Ku70 que ofrece citoprotección. Actúa con tanta eficacia como el inhibidor de caspasa VI (Z-VAD-FMK; n.º de catálogo 219007) para la apoptosis mediada por Bax (aprox. 50-200 μM). También bloquea de modo eficaz la muerte celular necrótica independiente de caspasa. Se ha demostrado que es competitivo con Ku70, interacciona con Bax, evita su cambio conformacional y la translocación mitocondrial. Muestra una estabilidad duradera en medio de cultivo (aprox. 3 días).</p>
<p>Bcl-xL BH44-23, humano, permeable a células</p>	<p>Un péptido permeable a células que evita la muestra celular apoptótica uniéndose directamente al canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) y bloqueando su actividad. Conduce a la inhibición de la liberación de citocromo c y a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Contiene el dominio de homología N-terminal conservado (BH4) de Bcl-xL (aminoácidos 4-23), que se ha demostrado que es fundamental para inhibir la actividad VDAC en liposomas y en mitocondrias aisladas. El dominio BH4 está unido a un péptido vehículo, una secuencia HIV-TAT48-57 de 10 aminoácidos con un resto β-alanina como espaciador para una flexibilidad máxima. Después de su captación, fundamentalmente se localiza en las mitocondrias.</p>
<p>Ácido bongkréquico, sal de triamonio</p>	<p>Actúa como ligando del translocador del nucleótido adenina. Un potente inhibidor del megacanal mitocondrial (poro de transición de permeabilidad). Reduce significativamente las señales de la apoptosis inducida por el óxido nítrico. Evita la alteración apoptótica del potencia transmembrana mitocondrial interno ($\Delta\Psi_m$), así como una serie de otros fenómenos relacionados con la apoptosis.</p>
<p>Daunorubicina, clorhidrato</p>	<p>Potente agente anticáncer permeable a células cuyo sitio diana potencial puede ser la citocromo c oxidasa mitocondrial. Se ha demostrado que inhibe la síntesis de ARN y ADN. Inhibe las topoisomerasas I y II de eucariotas. Induce la ruptura de ADN monocatenario. También induce la apoptosis en células tumorales HeLa S3. Según una realización, dicho compuesto no se emplea como estabilizante según la presente invención.</p>
<p>Humanina, humana, sintética</p>	<p>Un péptido antiapoptótico de 24 restos que, cuando se expresa de modo intracelular, ofrece protección frente a la apoptosis neuronal inducida por presenilina y mutantes de APP (proteína precursora de amiloide) asociados con la enfermedad de Alzheimer familiar (AD). Se ha demostrado que reduce la liberación del citocromo c <i>in vitro</i> uniéndose directamente a Bax (proteína X asociada a Bcl-2; Kd aprox. 2 nM) y evitando su asociación con mitocondrias aisladas.</p>
<p>Forbol-12-miristato-13-acetato</p>	<p>El éster de forbol que se emplea con más frecuencia. Activa la proteína quinasa C <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>, incluso a concentraciones nM. Activa la Ca²⁺-ATPasa y potencia la formación de AMPc inducida por forskolina. Inhibe la apoptosis inducida por el antígeno Fas, pero induce la apoptosis en células de leucemia promielocítica HL-60.</p>

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
Pifitrina- α	Un inhibidor químico permeable a células de p53. Inhibe de modo reversible la transactivación dependiente de p53 de genes que responden a p53 y bloquea de modo reversible la apoptosis mediada por p53. Inhibe la detención del crecimiento dependiente de p53 de fibroblastos diploides humanos en respuesta a daños en el ADN, pero no afecta a los fibroblastos deficientes en p53. Protege a los tejidos normales frente a los efectos secundarios perjudiciales de la quimioterapia. Se ha indicado que protege a las neuronas frente al péptido β -amiloide y a la apoptosis inducida por glutamato.
Pifitrina- μ	Una sulfonamida permeable a células que bloquea la interacción de p53 con las proteínas Bcl-xL y Bcl-2 e inhibe selectivamente la translocación de p53 a las mitocondrias sin afectar a la función de transactivación de p53. Protege de modo eficaz frente a la muerte celular inducida por radiación y <i>in vitro</i> y a la letalidad animal <i>in vivo</i> . Debido a que la pifitrina- μ se dirige solo a la rama mitocondrial de la vía de p53 sin afectar a las importantes funciones transcripcionales de p53, es mejor que la pifitrina- α en estudios <i>in vivo</i> . Se ha demostrado que interacciona selectivamente con HSP70 inducible y altera sus funciones.
Pifitrina- α , cíclica	Un análogo permeable a células y muy estable de la pifitrina- α , con una función biológica similar, pero con citotoxicidad reducida. Un inhibidor químico de p53. Inhibe de modo reversible la transactivación dependiente de p53 de genes que responden a p53; también bloquea de modo reversible la apoptosis mediada por p53. Actúa como un modulador de P-gp cambiando la especificidad de sustrato relativa del transportador. Se ha indicado que este compuesto es un potente inhibidor transcripcional de STAT6.
Pifitrina- α , p-nitro	Un inhibidor de p53 permeable a células que actúa como la forma de profármaco de la pifitrina- α , p-nitro, cíclica. Aunque su eficacia <i>in vitro</i> (ED50 = 0,3 μ M para proteger frente a la muerte de neuronas corticales inducida por etopósido) es similar a la de la pifitrina- α , es 100 veces más potente que la pifitrina- α cuando se administra a ratas <i>in vivo</i> debido a su conversión continua a largo plazo a la correspondiente forma cíclica del compuesto activo en sistemas biológicos ($t_{1/2}$ = 8 h en un medio de cultivo de neuronas a 37 °C).
Pifitrina- α , p-nitro, cíclica	Un inhibidor de p53 permeable a células que muestra una potencia 10 veces mayor (ED50 = 30 nM para proteger frente a la muerte de neuronas corticales inducida por etopósido) y una semivida 50% más larga ($t_{1/2}$ = 6 h en un medio de cultivo de neuronas a 37 °C) que la pifitrina- α . Ha demostrado eficacia <i>in vitro</i> .

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
<p>Péptido inhibidor de STAT3</p> <p>Secuencia peptídica: Ac-Pro-Tyr(PO3H2)-Leu-Lys-Thr-Lys-OH</p>	<p>Un fosfopéptido de unión al dominio Stat3-SH2 que actúa como inhibidor selectivo de Stat3 (transductores de señales y activadores de la transcripción 3) que señalizan con una DB50 de 235 μM (concentración de péptido en la que la actividad de unión a ADN se inhibe en 50%). Disminuye significativamente la actividad de unión a ADN de Stat3 formando un complejo de Stat3:péptido inactivo y reduce los niveles de los dímeros Stat3:Stat3 activos que pueden unirse al ADN. Muestra una mayor afinidad por Stat3, y en menor grado por Stat1, frente a Stat5. Se suministra como una sal trifluoroacetato.</p>
<p>Péptido inhibidor de STAT3, permeable a células</p> <p>Secuencia peptídica: Ac-Pro-Tyr(PO3H2)-Leu-Lys-Thr-Lys-OH</p>	<p>Un análogo permeable a células del fosfopéptido de unión al dominio Stat3-SH2 que contiene una mts ("membrane translocating sequence", secuencia de translocación de membrana) C-terminal y actúa como un bloqueante potente y muy selectivo de la activación de Stat3. También reprime la Stat-3 constitutiva dependiente de la transformación de Src y no afecta a la transformación de Ras independiente de Stat-3. También está disponible el péptido control inactivo no fosforilado. Se suministra como una sal trifluoroacetato.</p>
<p>CAY10500, 6,7-dimetil-3-[[metil-[1-(3-trifluorometilfenil)-1H-indol-3-ilmetil]amino]etil]amino]metil]-cromen-4-ona</p>	<p>Inhibidor del factor de necrosis tumoral α (TNFα) que evita la unión al receptor 1 de TNF (TNFR1). Se une al trímero de TNFα biológicamente activo y estimula el desplazamiento acelerado de una única subunidad para inactivar con rapidez la citoquina. En un ensayo basado en células, el compuesto inhibe la estimulación mediada por TNFα de la degradación de 1KB.</p>
<p>Amida gambógica</p>	<p>Un agonista selectivo para TrkA que imita las acciones de NGF. Este compuesto posee una robusta actividad neurotrófica, al mismo tiempo que evita la muerte celular neuronal 1.</p>
<p>Ácido maslínico</p>	<p>Un triterpeno pentacíclico con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Se ha demostrado que bloquea la generación de óxido nítrico e inhibe la secreción de IL-6 y TNF-α inducida por lipopolisacáridos.</p>
<p>Hidrato de naringina</p>	<p>Un bioflavonoide cítrico que se ha descubierto que inhibe la actividad citocromo P450 monooxigenasa en hígado de ratón. Evita la alteración del citoesqueleto inducida por toxinas y la muerte de hepatocitos apoptótica.</p>
<p>Necrostatina-1</p>	<p>Un inhibidor de la necroptosis, una vía de muerte celular no apoptótica. No afecta a la apoptosis desencadenada por Fas/TNFR. Según una realización, dicho compuesto no se emplea como estabilizante según la presente invención.</p>
<p>Hidrato de NSC348884, hidrato de N1,N2-bis((3-imino-6-metil-3H-indol-2-il)metil)-N1,N2-bis((6-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)etan-1,2-diamina</p>	<p>Este producto es una fosfoproteína nucleolar que muestra diversas actividades biológicas en la biogénesis de ribosomas, la proliferación celular, el transporte de lanzaderas citoplásmicas/nucleares, la unión de ácidos nucleicos, la ruptura ribonucleica, la duplicación del centrosoma y la actividad de chaperona molecular, y se ha descubierto en niveles mayores en células tumorales. Se ha demostrado que la sobreexpresión conduce a la inhibición de la apoptosis. NSC34884 sobrerregula a p53.</p>

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
Ácido orselínico	Ácido benzoico. Bloquea la apoptosis neuronal mediada por PAF. Demuestra una actividad captadora de radicales libres.
Ácido tetrametilnordihidroguaiarético	Un derivado sintético de NDGA y un inhibidor de lipoxigenasa no selectivo. Inhibe la unión del factor de transcripción Sp1 en el promotor de repetición terminal larga de HIV y en el promotor de α -ICP4 (un gen fundamental para la replicación del HSV).
GW 4869, 3,3'-(1,4-fenilen)bis[N-[4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)fenil]clorhidrato-2-propenamida	Un compuesto de dihidroimidazoloamida simétrico permeable a células que actúa como un potente inhibidor específico no competitivo de la N-SMasa (esfingomielinasa neutra) [IC50 = aprox. 1 μ M, cerebro de rata; Km para la esfingomielina de aprox. 13 μ M]. No inhibe la A-SMasa humana (esfingomielinasa ácida) incluso a 150 μ M. Inhibe débilmente la actividad de la proteína fosfatasa 2A bovina y la liso-PAF PLC de mamífero, mientras que no se observa inhibición para la PLC específica de fosfatidilcolina bacteriana. Se ha indicado que ofrece una protección completa frente a la muestra celular inducida por TNF- α o diamina en células de cáncer de mama MCF7 a 20 μ M. No modifica los niveles de glutatión intracelular ni interfiere con los efectos de señalización mediados por TNF- α o diamina.
SP 600125, 1,9-pirazoloantrona, antrapirazolona	SP600125 es un inhibidor de JNK (IC50 = 40 nM para JNK-1 y JNK-2, y 90 nM para JNK-3). Este agente muestra una selectividad mayor que 300 veces por el JNK frente a las MAP quinasas relacionadas ERK1 y p38-2, y la serina treonina quinasa PKA. SP600125 es un inhibidor competitivo de ATP reversible.
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 levaduras y en células de mamífero, que actúa inhibiendo la dinamina de la división mitocondrial. En las células, Mdivi-1 inhibe la apoptosis inhibiendo la permeabilización de la membrana externa mitocondrial.
Minociclina, clorhidrato	Un derivado de la tetraciclina con actividad antimicrobiana. Es un inhibidor de la angiogénesis, la apoptosis y la poli(ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1). Es antiinflamatorio y neuroprotector.
Ro 08-2750 (C13H10N4O3)	Inhibidor de la apoptosis inducida por NGF.
RKTS-33 (C7H8O4)	Inhibición selectiva solo de la vía dependiente de ligando de Fas.
2. Ácidos nucleicos	
3,4-dicloroisocumarina	Inhibidor de serina proteasas -> granzima B y bloquea la ruptura del ADN internucleosómico apoptótico en timocitos sin la implicación de endonucleasas. No afecta a las tiol proteasas ni metaloproteasas.

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
Actinomicina D, <i>Streptomyces</i> sp.	También actúa como un inhibidor competitivo de las serina proteasas; fármaco antineoplásico clásico. Inductor citotóxico de la apoptosis frente a células tumorales. Un inhibidor dependiente de ADN de la síntesis de ARN, la actinomicina estimula 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 diversos estímulos, tales como el inhibidor de la dihidrofolato reductasa aminopterina y el derivado de prostaglandina 15-desoxi-D12,14-prostaglandina J2 y, por tanto, puede tener actividades pro- y antiapoptóticas en algunos sistemas. Según una realización, dicho compuesto no se emplea como estabilizante según la presente invención.
Ácido aurintricarboxílico	Inhibidor de la ADN topoisomerasa II.
Baicaleína	Una flavona permeable a células que inhibe la actividad de la 12-lipoxigenasa (IC50 = 120 nM) y la transcriptasa inversa. Protege a las neuronas corticales frente a la toxicidad inducida por el β-amiloide. Reduce la biosíntesis de leucotrienos e inhibe la liberación de enzimas lisosómicas. También inhibe la captación y la movilización de Ca ²⁺ celular y la artritis inducida por adyuvantes. Se ha indicado que inhibe la peroxidación de lípidos microsómicos mediante la formación de un complejo de hierro-baicaleína. Inhibe la topoisomerasa II e induce la muerte celular en líneas de células de carcinoma hepatocelular. Potencia las respuestas contráctiles a la estimulación nerviosa. Inhibe la proteína tirosina quinasa y la proteína quinasa C estimulada por PMA.
Camptotecina, <i>Camptotheca acuminata</i>	Un inhibidor de la ADN topoisomerasa I permeable a células. Muestra propiedades antileucémicas y antitumorales. Induce la apoptosis en células HL-60 y en timocitos de ratón. Detiene a las células en la fase G2/M. Según una realización, dicho compuesto no se emplea.
Diisopropilfluorofosfato	Inhibidor de serina proteasas.
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	Inhibidor irreversible de serina proteasas. Su mecanismo de acción es análogo al del diisopropilfluorofosfato. El PMSF provoca la sulfonilación de restos serina en sitios activos. También se ha indicado que inhibe la fragmentación del ADN internucleosómico en timocitos inmaduros. Para un inhibidor relacionado más estable, véase AEBSF.
(-)-Huperzina A	Un inhibidor de AChE. Antagonista de los receptores de NMDA. Protege frente a la excitotoxicidad mediada por glutamato.
Razoxano	Inhibe la topoisomerasa II sin inducir rupturas en la cadena de ADN (inhibidor catalítico de topo II).
Suptopina-2	Supresor de la inhibición de la topoisomerasa II. Revierte la detención del ciclo celular; sortea la función de punto de control. Tiene fluorescencia inherente y una ventaja diferenciada para la identificación de dianas moleculares; concentración eficaz en el intervalo de μM.

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
3. Enzimas	
3.1. Caspasas	
Inhibidor de la apoptosis; 2-(p-metoxibencil)-3,4-pirrolidindiol-3-acetato	Los efectos son atribuibles a la inhibición de la activación de la caspasa-3.
clAP-1, humana, recombinante, <i>E. coli</i>	clAP-1 humana recombinante (aminoácidos 1-618) condensada con la secuencia peptídica MATVIDH10SSNG en el N-terminal y expresada en <i>E. coli</i> . clAP es un miembro de la familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis que inhibe la actividad proteolítica de las caspasas maduras mediante la interacción del dominio BIR con la caspasa activa.
CrmA, recombinante	El CrmA (modificador A de la respuesta de citoquina serpina del virus de la viruela bovina) se purifica de <i>E. coli</i> transformado con una construcción que contiene la región codificadora de longitud completa del gen CrmA y 7 aminoácidos adicionales que no afectan a la actividad. CrmA es un inhibidor natural de la caspasa-1 humana y la granzima B, enzimas que están implicadas en la apoptosis.
Inhibidor I de caspasas del grupo III Secuencia peptídica: Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-CHO, Ac-IEPD-CHO, inhibidor III de caspasa-8	Un potente inhibidor irreversible, permeable a células, de caspasas del grupo III (caspasas-6, -8, -9, y -10), aunque es más eficaz hacia las caspasas-6 y -8. También inhibe la caspasa-1 y la caspasa-3. Cuando se emplea con una enzima nativa o recombinante, se requiere un pretratamiento con una esterasa.
Campferol	Un fitoestrógeno permeable a células que inhibe el reacoplamiento del ADN catalizado por la topoisomerasa-I en células HL-60. Ofrece protección frente a la muerte celular inducida por A β 25-35 en neuronas corticales neonatales. Sus efectos protectores son comparables a los del estradiol. Bloquea la activación inducida por A β de la caspasa-2, -3, -8, y -9, y reduce la apoptosis neuronal inducida por NMDA. Se ha indicado que es un potente inhibidor de las monoamina oxidasas. Actúa como un inhibidor de la actividad COX-1 (IC ₅₀ = 180 μ M), y de la activación transcripcional de COX-2 (IC ₅₀ < 15 μ M).
Q-VD-OPH	General, pancaspasas
Boc-D(OMe)-FMK	General, pancaspasas
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 la 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)-FMK	Caspasas en general
Z-LE(OMe)VD(OMe)-FMK	Caspasa 4
Z-VAM-FMK	Inhibidor de péptidos antivíricos, inhibe HRV2 y HRV14

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
4'-azidocitidina	Inhibidor de HCV
Inhibidor I de caspasa-13 Secuencia peptídica: Ac-Leu-Glu-Glu-Asp-CHO	Un potente inhibidor reversible de la caspasa-13 (ERICE).
Inhibidor II de caspasa-13 Secuencia peptídica: Z-Leu-Glu(OMe)-Glu(OMe)-Asp(OMe)-FMK	Un inhibidor irreversible permeable a células de la caspasa-13. Cuando se emplea con una enzima nativa o recombinante, se requiere un pretratamiento con una esterasa.
Inhibidor I de caspasa-1 Secuencia peptídica: Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-CHO	Un potente inhibidor reversible específico de la caspasa-1 (Ki = 200 pM para la caspasa-1 humana recombinante), la caspasa-4, y la caspasa-5. Inhibe fuertemente la apoptosis inducida por anti-APO-1 en células L929-APO-1.
Inhibidor I de caspasa-1, permeable a células Secuencia peptídica: 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 células de la caspasa-1 (ICE; enzima convertidora de interleuquina-1 β), la caspasa-4, y la caspasa-5. La secuencia YVAD-CHO C-terminal de este péptido es un potente inhibidor reversible y muy específico de la caspasa-1 (Ki = 1 nM). La secuencia N-terminal (restos 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 a las células frente al péptido.
Inhibidor II de caspasa-1 Secuencia peptídica: Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-CMK	Un inhibidor irreversible y permeable a células de la caspasa-1 (Ki = 760 pM), la caspasa-4, y la caspasa-5. Inhibe la apoptosis mediada por Fas y la activación de la esfingomielinasa ácida.
Inhibidor IV de caspasa-1 Secuencia peptídica: Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-AOM (AOM = 2,6-dimetilbenzoiloximetil cetona)	Un inhibidor irreversible, permeable a células, competitivo y muy selectivo de la caspasa-1, la caspasa-4, y la caspasa-5. Inactiva la enzima con una velocidad limitada por la difusión y es relativamente inerte hacia otros bionucleófilos, tales como el glutatión, haciendo que sea un candidato excelente para los estudios <i>in vivo</i> de la inhibición enzimática.
Inhibidor V de caspasa-1 Secuencia peptídica: ZAsp-CH2-DCB	Un potente inhibidor de las proteasas similares a la caspasa-1. Bloquea la muerte celular apoptótica en células U937 de leucemia mieloide humana y bloquea la fragmentación del ADN inducida por etopósido.
Inhibidor VI de caspasa-1 Secuencia peptídica: Z-Tyr-Val-Ala-Asp(OMe)-CH2F*	Un potente inhibidor irreversible, permeable a células de la caspasa-1 (ICE), la caspasa-4, y la caspasa-5.
Inhibidor I de caspasa-2 Secuencia peptídica: Z-Val-Asp(OMe)-Val-Ala-Asp(OMe)-CH2F*	Un inhibidor irreversible, permeable a células de la caspasa-2 (ICH-1).
Inhibidor II de caspasa-2 Secuencia peptídica: Ac-Leu-Asp-Glu-Ser-Asp-CHO	Un inhibidor reversible de la caspasa-2 y la caspasa-3.
Inhibidor I de caspasa-3/7 Secuencia peptídica: 5-[(S)-(+)-2-(metoximetil)pirrolidino]sulfonilistatina	Un potente inhibidor reversible, permeable a células y específico de la caspasa-3 (Ki = 60 nM) y la caspasa-7 (Ki = 170 nM).
Inhibidor I de caspasa-3 Secuencia peptídica: Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO	Un inhibidor muy potente, específico y reversible de la caspasa-3 (IC50 = 200 pM), la caspasa-6, la caspasa-7, la caspasa-8, y la caspasa-10.

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
Inhibidor I de caspasa-3, permeable a células Secuencia peptídica: 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 células de la caspasa-3, así como de la caspasa-6, la caspasa-7, la caspasa-8, y la caspasa-10. La secuencia DEVD-CHO C-terminal de este péptido es un potente inhibidor muy específico, reversible y potente de la caspasa-3 ($K_i < 1$ nM) que también ha demostrado inhibir fuertemente la ruptura de PARP en extractos de células de osteosarcoma humano cultivadas ($IC_{50} = 200$ pM). La secuencia N-terminal (restos aminoácidos 1-16) se corresponde con la región hidrófoba (h-región) del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi (K-FGF) y confiere permeabilidad a las células frente al péptido. También está disponible una disolución 5 mM (1 mg/100 μ l) del inhibidor I de caspasa-3, permeable a células (n.º de catálogo 235427), en DMSO.
Inhibidor II de caspasa-3 Secuencia peptídica: 2-Asp(OCH ₃)-Glu(OCH ₃)-Val-Asp(OCH ₃)-FMK	Un potente inhibidor irreversible, permeable a células, de la caspasa-3, así como de la caspasa-6, la caspasa-7, la caspasa-8, y la caspasa-10. Cuando se emplea con una enzima nativa o recombinante, se requiere un pretratamiento con una esterasa. También está disponible una disolución 5 mM (250 μ g/75 μ l) de Z-DEVDFMK (n.º de catálogo 264156) en DMSO.
Inhibidor III de caspasa-3 Secuencia peptídica: Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CMK	Un potente inhibidor irreversible, permeable a células, de la caspasa-3, así como de la caspasa-6, la caspasa-7, la caspasa-8, y la caspasa-10.
Inhibidor IV de caspasa-3 Secuencia peptídica: Ac-Asp-Met-Gln-Asp-CHO	Un inhibidor específico de la caspasa-3. Este tetrapéptido inhibidor se ha empleado con el inhibidor de caspasa-6 Ac-VEID-CHO para analizar la vía de activación de la caspasa en células Jurkat estimuladas con Fas.
Inhibidor V de caspasa-3 Secuencia peptídica: Z-Asp(OMe)-Gln-Met-Asp(OMe)-CH ₂ F*	Un potente inhibidor irreversible, permeable a células, de la caspasa-3, también reconoce a la caspasa-1. Cuando se emplea con una enzima nativa o recombinante, se requiere un pretratamiento con una esterasa.
Inhibidor VII de caspasa-3 Secuencia peptídica: 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 peptidílico, permeable a células, que actúa como un potente inhibidor reversible y no competitivo de la caspasa-3 ($IC_{50} = 23$ nM) con una selectividad de 10-100 veces mayor. Se ha demostrado que muestra una mayor actividad antiapoptótica que Z-VAD-FMK (n.º de catálogo. 627610) en un modelo de apoptosis inducida por estaurosporina (n.º de catálogo. 569397) en células T de Jurkat humanas.
Inhibidor I de caspasa-4 Secuencia peptídica: Ac-Leu-Glu-Val-Asp-CHO	Un inhibidor reversible de la caspasa-4.
Inhibidor I de caspasa-4, permeable a células Secuencia peptídica: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Leu-Glu-Val-Asp-CHO	Un potente inhibidor reversible, permeable a células, de la caspasa-4. La secuencia N-terminal (restos aminoácidos 1-16) se corresponde con la región hidrófoba del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi y confiere permeabilidad a las células frente al péptido.
Inhibidor I de caspasa-5 Secuencia peptídica: Z-Trp-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-CH ₂ F*	Un potente inhibidor irreversible, permeable a células, de la caspasa-5. Inhibe fuertemente a la caspasa-1. También inhibe a la caspasa-4 y la caspasa-8.

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
Inhibidor I de caspasa-6 Secuencia peptídica: Z-Val-Glu(OMe)-Ile-Asp(OMe)-CH ₂ F ⁺	Un inhibidor irreversible, permeable a células, de la caspasa-6. Cuando se emplea con una enzima recombinante o nativa purificada, se requiere un pretratamiento con esterasa.
Inhibidor II de caspasa-6, permeable a células Secuencia peptídica: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Val-Glu-Ile-Asp-CHO	Un potente inhibidor reversible, permeable a células, de la caspasa-6. La secuencia N-terminal permeable (aminoácidos 1-16) se corresponde con la región hidrófoba del péptido señal del factor del crecimiento de fibroblastos de Kaposi y confiere permeabilidad a la células hacia el péptido.
Inhibidor I de caspasa-8, permeable a células Secuencia peptídica: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Ile-Glu-Thr-Asp-CHO	Un potente inhibidor reversible, permeable a células, de la caspasa-8 y granzima B. La secuencia N-terminal (aminoácidos 1-16) se corresponde con la región hidrófoba del péptido señal del factor del crecimiento de fibroblastos de Kaposi y confiere permeabilidad a la células hacia el péptido.
Inhibidor II de caspasa-8 Secuencia peptídica: Z-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)-CH ₂ F ⁺	Un potente inhibidor irreversible, permeable a células, de la caspasa-8 y granzima B. Inhibe de modo eficaz la apoptosis inducida por el virus de la gripe en células HeLa. También inhibe la granzima B. Cuando se emplea con una enzima recombinante o nativa, se requiere un pretratamiento con esterasa. También está disponible una disolución 5 mM (250 µg/76 µl) de Z-IETD-FMK (n.º de catálogo 218840) en DMSO.
Inhibidor I de caspasa-9 Secuencia peptídica: Z-Leu-Glu(OMe)-His-Asp(OMe)-CH ₂ F ⁺	Un potente inhibidor irreversible, permeable a células, de la caspasa-9. También puede inhibir la caspasa-4 y la caspasa-5. Cuando se emplea con una enzima recombinante o nativa, se requiere un pretratamiento con esterasa. También está disponible una disolución 5 mM (250 µg/72 µl) de Z-LEHD-FMK (n.º de catálogo 218841) en DMSO.
Inhibidor II de caspasa-9, permeable a células Secuencia peptídica: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Leu-Glu-His-Asp-CHO	Un potente inhibidor reversible, permeable a células, de la caspasa-9. También puede inhibir la caspasa-4 y la caspasa-5. La secuencia N-terminal (aminoácidos 1-16) se corresponde con la región hidrófoba del péptido señal del factor del crecimiento de fibroblastos de Kaposi y confiere permeabilidad a la células hacia el péptido.
Inhibidor III de caspasa-9 Secuencia peptídica: Ac-Leu-Glu-His-Asp-CMK	Un potente inhibidor irreversible de la caspasa-9. Se ha indicado que reduce el tamaño del infarto de miocardio durante la reperfusión (aprox. 70 nM).
Inhibidor I de caspasa Secuencia peptídica: Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH ₂ F ⁺	Un inhibidor de pancaspasas irreversible, permeable a células. Inhibe la apoptosis mediada por Fas en células Jurkat y la muerte celular inducida por estaurosporina en células epiteliales corneales. Cuando se emplea con una enzima recombinante o nativa purificada, se requiere un pretratamiento con esterasa.
Inhibidor II de caspasa Secuencia peptídica: Ac-Val-Ala-Asp-CHO	Un inhibidor de pancaspasas potente y reversible.
Inhibidor II de caspasa, permeable a células Secuencia peptídica: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Val-Ata-Asp-CHO	Un inhibidor de pancaspasas reversible, permeable a células, producido por la unión de la secuencia N-terminal (aminoácidos 1-16) del péptido señal del factor del crecimiento de fibroblastos de Kaposi y confiere permeabilidad a la células hacia el péptido VAD.
Inhibidor III de caspasa Secuencia peptídica: Boc-Asp(OMe)-CH ₂ F ⁺	Un inhibidor de caspasa irreversible, permeable a células, de amplio espectro.

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
Inhibidor IV de caspasa Secuencia peptídica: Boc-Asp(OBzl)-CMK	Un inhibidor de caspasa irreversible general.
Inhibidor VI de caspasa Secuencia peptídica: Z-Val-Ala-Asp-CH ₂ F*	Un inhibidor de caspasa irreversible general. Es útil para estudios que implican a enzimas caspasas recombinantes, aisladas y purificadas. A diferencia del inhibidor I de caspasa (n.º de catálogo 627610), este inhibidor no requiere un pretratamiento con esterasa para los estudios <i>in vitro</i> . También está disponible una disolución 10 mM (1 mg/221 µl) del inhibidor VI de caspasa (n.º de catálogo 219011) en DMSO.
Inhibidor VIII de caspasa Secuencia peptídica: Ac-Val-Asp-Val-Ala-Asp-CHO	Un potente inhibidor reversible de la caspasa-2 (K _i = 3,5 nM), la caspasa-3 (K _i = 1 nM) y la caspasa-7 (K _i = 7,5 nM). También actúa como inhibidor de DRONC (caspasa de <i>Drosophila</i>), una glutamato/aspartato proteasa.
Inhibidor X de caspasa Secuencia peptídica: BI-9B12	Un compuesto de tiazolo 2,4-disustituido que contiene benzodioxano que actúa como un inhibidor selectivo, reversible y competitivo de caspasas (K _i = 4,3 µM, 6,2 µM y 2,7 µM para las caspasas-3, -7 y -8, respectivamente). Se ha demostrado que el resto benzodioxano se ajusta en el "orificio de aspartato" de las caspasas y probablemente altere la ruptura apoyada por la caspasa-8 de BID, una proteína proapoptótica. Afecta débilmente a la actividad del factor letal del ántrax, una metaloproteasa, a aprox. 20 µM.
Inhibidores de caspasa-1	Incluyen pero no se limitan a Ac-N-Me-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehído (seudoácido), Ac-Trp-Glu-His-Asp-aldehído (seudoácido), Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehído (seudoácido) Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-clorometilcetona, Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-2,6-dimetilbenzoximetilcetona, Ac-Tyr-Val-Ala-Asp(OtBu)-aldehído dimetil acetal, Ac-Tyr-Val-Lys-Asp-aldehído (seudoácido), Ac-Tyr-Val-Lys(biotinil)-Asp-2,6-dimetilbenzoximetilcetona, biotinil-Tyr-Val-Ala-Asp-clorometilcetona, biotinil-Val-Ala-DLAsp-fluorometilcetona, fluoresceín-6-carbonil-Tyr-Val-Ala-DLAsp(OMe)-fluorometilcetona, fluoresceín-6-carbonil-Val-Ala-DLAsp(OMe)-fluorometilcetona, Z-Asp-2,6-diclorobenzoximetilcetona, Z-Tyr-Val-Ala-Asp-clorometilcetona, Z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona, Z-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona.
Inhibidores de caspasa-2	Incluyen pero no se limitan a Ac-Val-Asp-Val-Ala-Asp-aldehído (seudoácido), fluoresceín-6-carbonil-Val-Asp(OMe)-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona, Z-Val-Asp(OMe)-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona.
Inhibidores de proteasas precursoras de caspasa-3	Incluyen pero no se limitan a Ac-Glu-Ser-Met-Asp-aldehído (seudoácido), Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-aldehído (seudoácido).
Inhibidores de caspasa-3	Incluyen pero no se limitan a Ac-Asp-Glu-Val-Asp-aldehído (seudoácido), Ac-Asp-Met-Gln-Asp-aldehído (seudoácido), biotinil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehído (seudoácido), inhibidor II de caspasa-3/7, fluoresceín-6-carbonil-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona, ZAsp(OMe)-Gln-Met-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona, Z-Asp-Glu-Val-Asp-clorometilcetona, Z-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-DLAsp(OMe)-fluorometilcetona.

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
Inhibidores de caspasa-4	Incluyen pero no se limitan a Ac-Leu-Glu-Val-Asp-aldehído (seudoácido), Z-Tyr-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona.
Inhibidores de caspasa-6	Incluyen pero no se limitan a Ac-Val-Glu-Ile-Asp-aldehído (seudoácido), fluoresceín-6-carbonil-Val-Glu(OMe)-Ile-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona, Z-Val-Glu(OMe)-Ile-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona.
Inhibidores de caspasa-8	Incluyen pero no se limitan a Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-aldehído (seudoácido), Boc-Ala-Glu-Val-Asp-aldehído (seudoácido), fluoresceín-6-carbonil-Ile-Glu(OMe)-Thr-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona, fluoresceín-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, ZLE(OMe)TD(OMe)-FMK.
Inhibidores de caspasa-9	Incluyen pero no se limitan a Ac-Leu-Glu-His-Asp-aldehído (seudoácido), Ac-Leu-Glu-His-Asp-clorometilcetona, fluoresceín-6-carbonil-Leu-Glu(OMe)-His-DLAsp(OMe)-fluorometilcetona.
Inhibidores de caspasa-10	Incluyen pero no se limitan a fluoresceín-6-carbonil-Ala-Glu(OMe)-Val-DLAsp(OMe)-fluorometilcetona, Z-Ala-Glu-Val-DL-Asp-fluorometilcetona.
3.2. Calpaína	
Inhibidor III de calpaína Secuencia peptídica: Z-Val-Phe-CHO	Un potente inhibidor, permeable a células, de la calpaína I y II ($K_i = 8 \text{ nM}$). Reduce la muerte celular mediada por capsaicina en ganglios de la raíz dorsal cultivados. Se ha indicado que bloquea la supresión, inducida por A23187, del crecimiento de las neuritas en neuronas piramidales de hipocampo aisladas. Muestra un efecto neuroprotector en la toxicidad inducida por glutamato.
Inhibidor IV de calpaína Secuencia peptídica: Z-Leu-Leu-Tyr-CH ₂ F	Un potente inhibidor irreversible, permeable a células, de la calpaína II ($k_2 = 28.900 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). También actúa como inhibidor de la catepsina L ($k_2 = 680.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).
Inhibidor V de calpaína Secuencia peptídica: Mu-Val-HPh-CH ₂ F (Mu = morfolinoureidilo; HPh = homofenilalanilo)	Un potente inhibidor irreversible, permeable a células, de la calpaína.
Ac-Leu-Leu-Nle-al	Un inhibidor de aldehído peptídico, permeable a células, de la calpaína I ($K_i = 190 \text{ nM}$), la calpaína II ($K_i = 150 \text{ nM}$), la catepsina L ($K_i = 0,5 \text{ nM}$) y otras cisteína proteasas neutras. Inhibe el avance del ciclo celular en G1/S y la metafase/anafase en células CHO mediante la inhibición de la degradación de la ciclina B. También estimula la transcripción de la HMG-CoA sintasa mediante la inhibición de la degradación de la SREBP-1 (proteína 1 de unión al elemento regulador de estero) activa. Protege frente a los daños provocados por la hipoxia y la isquemia. Inhibe la apoptosis en timocitos y metamielocitos. También evita la producción de óxido nítrico por los macrófagos activados interfiriendo con la transcripción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS; NOS II). Inhibe la degradación proteolítica de I κ B α and I κ B β en macrófagos RAW inducida con LPS. También prolonga la asociación de las moléculas de MHC de clase I con los transportadores asociados con el procesamiento de antígenos.
Z-LLY-FMK	Calpaína

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
N-acetil-Leu-Leu-Met	Calpaína I
N-acetil-Leu-Leu-Nle-CHO	Calpaína I
3.3. Otros	
BAPTA/AM	Forma permeable a membrana de BAPTA. Puede cargarse en una amplia diversidad de células, en donde es hidrolizada por las esterasas citosólicas y es atrapada de modo intracelular como el quelante activo de BAPTA. Evita las fibrilaciones ventriculares inducidas por la cocaína. Abole el aumento, inducido por vitamina D3, del Ca ²⁺ intracelular. Induce la inactivación de la proteína quinasa C. También inhibe la apoptosis inducida por taspigargina en timocitos de rata.
Inhibidor I de granzima B Secuencia peptídica: Z-Ala-Ala-Asp-CH ₂ Cl	Un inhibidor débil de la granzima B humana y murina. También inhibe la fragmentación del ADN relacionada con la apoptosis en linfocitos por la fragmentina 2, una proteasa de gránulos de linfocitos de rata homóloga con la granzima B (ID ₅₀ = 300 nM).
Inhibidor II de granzima B Secuencia peptídica: Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-CHO	Un potente inhibidor reversible de la granzima B y la caspasa-8 (K _i = 1 nM). También inhibe la caspasa-1 (<6 nM), la caspasa-6 (5,6 nM), y la caspasa-10 (27 nM).
Inhibidor IV de granzima B Secuencia peptídica: Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-CHO	Un inhibidor reversible de la granzima B y la caspasa-8.
Leupeptina, hemisulfato, microbiana	Un inhibidor reversible de proteasas similares a tripsina y cisteína proteasas. También se sabe que inhibe la muerte celular programada inducida por activación para restablecer las respuestas inmunológicas defectuosas de donantes of HIV+.
N-etilmaleimida	Reactivo alquilante de sulfhidrilo que inhibe la H ⁺ -ATPasa y reprime la corriente de cortocircuito (IC ₅₀ = 22 μM) en células del conducto pancreático. Inactiva la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP. También es un potente inhibidor de la fragmentación del ADN estimulada por Mg ²⁺ y por Ca ²⁺ /Mg ²⁺ en núcleos de hígado de rata. Estimula la liberación del ácido araquidónico a través de la activación de PLA2 en células endoteliales.
Nα-tosil-Lys clorometil cetona, clorhidrato (TLCK)	Inhibe las serina proteinasas similares a tripsina. Inactiva de modo irreversible la tripsina sin afectar a la quimotripsina. Evita la producción de óxido nítrico por los macrófagos activados mediante su interferencia con la transcripción del gen iNOS. Bloquea la adhesión célula-célula y la unión del virus HIV-1 a las células diana. En macrófagos, bloquea la óxido nítrico sintasa inducida por el interferón-γ y lipopolisacáridos (EC ₅₀ = 80 μM). Evita la endonucleolisis que acompaña a la muerte apoptótica de células de leucemia HL-60 y timocitos normales.

Inhibidor de la apoptosis	Descripción
Inhibidor de Omi/HtrA2 proteasa, Ucf-101	Un compuesto de ácido furfuralidin-tiobarbitúrico permeable a células que actúa como un potente inhibidor específico, competitivo y reversible de la serina proteasa proapoptótica termoinducible mitocondrial Omi/HtrA2 (IC50 = 9,5 μ M para His-Omi134-458). Muestra muy poca actividad contra diversas otras serina proteasas ensayadas (IC50 \geq 200 μ M). Se ha indicado que bloquea la muerte celular inducida por Omi/HtrA2 en fibroblastos sin caspasa-9 (-/-).
Óxido de fenilarsina	Un inhibidor de proteína tirosina fosfatasa permeable a membranas (IC50 = 18 μ M). Estimula el transporte de 2-desoxiglucosa en el músculo esquelético humano resistente a la insulina y activa la proteína tirosina quinasa p56lck. Bloquea la activación dependiente de TNF- α de NF- κ B en células ML-1a mieloides humanas. PAO inhibe las actividades proteasa de las caspasas humanas recombinantes, así como de las caspasas endógenas que son activas en extractos de células DU249 de pollo preapoptóticas (extractos S/M).
Forbol-12,13-dibutirato	Activa la proteína quinasa C. Estimula la fosforilación de Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa, inhibiendo con ello su actividad. Estimula la expresión de NOS inducible en hepatocitos cultivados.
Hipericina	Inhibe PKC, CKII, MAP quinasa, insulina R, EGFR, PI-3 quinasa y también se ha indicado que posee actividad antivírica.
Butirolactona I	Un inhibidor permeable a células y muy selectivo de las proteína quinasas dependientes de ciclina (Cdk) que inhibe el avance del ciclo celular en las transiciones G1/S y G2/M. Inhibe la p34cdk1/ciclina B (Cdk1; IC50 = 680 nM). También inhibe selectivamente las Cdk2 y Cdk5 quinasas. Tiene poco efecto sobre la caseína quinasa I, caseína quinasa II, receptor de EGF quinasa, MAP quinasa, PKA, y PKC. Se ha demostrado que evita la fosforilación de la proteína de retinoblastoma y la histona H1. También bloquea la apoptosis mediada por Fas en células HL-60 y muestra efectos antitumorales en líneas de células de cáncer de pulmón.
Nilotinib	Inhibidor de BCR-ABL-tirosin quinasa específico.
Quercetina (soforetina)	La quercetina es un inhibidor de PI3K y PKC con una IC50 de 3,8 μ M y 15 μ g/ml. Abroga potentemente las PI3K y Src quinasas, inhibe suavemente la Akt1/2, y afecta ligeramente a PKC, p38 y ERK1/2. [1][2] La quercetina es un inhibidor del transporte de auxina polar natural con una IC50 de 0,8, 16,7, 6,1, 11,36 μ M para la inhibición de la liberación de LDH%, la inhibición de la adhesión de PMN-EC inducida por TNF, la inhibición inducida por TNF de la síntesis de ADN y la proliferación.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos se proporcionan materiales y métodos de la presente invención. Debe entenderse que estos ejemplos solo tienen un fin ilustrativo y no deben considerarse limitantes de esta invención de ninguna manera.

5 I. Propiedades estabilizantes de células y del nivel de transcripciones de la N,N-dialquilpropanamidas

Ejemplo 1: Uso de la N,N-dimetilpropanamida para estabilizar muestras de sangre

Se estableció un conjunto de sistema de ensayo y estudio que permite la identificación de composiciones de reactivos que tienen capacidades de estabilización de transcripciones de genes, según se indica por los niveles constantes de transcripciones de genes seleccionados (c-fos, IL-1beta, IL-8, p53). Estas transcripciones fueron identificadas en estudios anteriores como transcripciones muy inestables durante la conservación, que fueron inducidas o infrarreguladas (ganancias y pérdidas de transcripciones) a los pocos minutos después de la recolección de la sangre y, por tanto, se eligieron como los marcadores del "peor caso" con el objetivo de la selección.

Además, para excluir cualquier posible influencia del protocolo de preparación del ARN sobre el análisis de los niveles de transcripciones, la misma tecnología de preparación de ARN utilizada para el control [+] de la estabilización de la muestra se empleó también para el control [-] de la estabilización de las muestras y para las muestras de ensayo.

Se recolectó sangre de múltiples donantes hacia tubos de sangre EDTA por duplicado (BD, estabilización de la muestra control [-]) y tubos PAXgene Blood RNA Tubes (PreAnalytiX) que actúan como control [+] de la estabilización de la muestra. Los tubos PAXgene Blood RNA Tubes contienen una composición (véanse también los antecedentes de la invención) que lisa las células y, por tanto, "congela" el perfil de transcripción génico. Los tubos PAXgene Blood RNA Tubes son para estabilizar la sangre para el análisis de la expresión génica. Un objetivo fue descubrir un método de estabilización que no se base en la lisis celular, sino que logre la misma actuación o una actuación similar que los tubos PAXgene Blood RNA Tubes en la estabilización del nivel de transcripciones. Por tanto, las muestras recolectadas en los tubos PAXgene Blood RNA Tubes y tratadas por tanto con la composición de estabilización contenida en ellos se emplean como control positivo en el conjunto experimental. Inmediatamente después de la recolección de la sangre, la mitad de las muestras de sangre EDTA se trataron con la disolución de ensayo de estabilización de células y de transcripciones, dando como resultado las muestras de sangre. Se añadió 1 ml de aditivo de estabilización a 9 ml de sangre EDTA. La sangre y la disolución de estabilizante se mezclaron mediante la inversión del tubo 8-10 veces. Todos los tubos de sangre se incubaron a TA durante 0, 24 y 72 horas. Los tubos PAXgene Blood RNA Tubes que se definieron como sin incubación (momento de ensayo 0 h) se incubaron durante 2 h, puesto que este es el tiempo mínimo de lisis celular y precipitación de ARN requerido para aislar el ARN de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes. Después de la incubación, las muestras de los tubos PAXgene Blood RNA Tubes se congelaron a -20 °C, mientras que parte alícuotas de 2,5 ml por sangre EDTA y muestras de sangre EDTA mezcladas con el estabilizante se trasladaron al momento de ensayo 0 h o, después del periodo de estabilización, a los tubos PAXgene Blood RNA Tube Tubes, se mezclaron mediante inversión de los tubos según se describió anteriormente, y se incubaron durante 6 h en tubos PAXgene Blood RNA Tubes para la lisis, seguido de una conservación a -20 °C.

La preparación del ARN se realizó en todas las muestras de sangre que se encontraban finalmente en los tubos PAXgene Blood RNA Tubes con el kit PAXgene 96 Blood RNA Kit (QIAGEN) según el protocolo descrito en el manual después de la descongelación y el equilibrado de los tubos hasta la temperatura ambiente.

Se midió la cantidad (rendimiento de ARN) y la calidad (pureza de ARN, integridad de ARN) del ARN mediante espectroscopía de UV y electroforesis en gel capilar miniaturizada con cálculo de RIN (nanochips en el Agilent Bioanalyzer).

Se analizaron los niveles de transcripciones de todas las muestras de ARN mediante una RT-PCR a tiempo real empleando ensayos de monoplex para FOS, IL1B, IL8 y TP53, normalizados a la cantidad de molde introducido en la reacción. Los valores de CT resultantes que reflejan la cantidad de transcripciones se compararon directamente. Los niveles relativos de transcripciones que no se vieron afectadas por la incubación de la muestra de sangre a TA fueron determinados por medio de unos valores de CT constantes, mientras que las ganancias de transcripciones (por ejemplo, por inducción de genes) fueron determinadas por medio de un CT más bajo, y la pérdida de transcripciones (por ejemplo, por represión de genes) por medio de unos valores de CT más altos.

Se analizó la integridad de las células y los epitopos de la superficie celular mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) empleando un anticuerpo anti-CD3 conjugado con fluorescencia.

Se ensayó la N,N-dimetilpropanamida (DMPA) como ejemplo de un compuesto según la fórmula 1 que es una N,N-dialquilpropanamida, para su potencial para estabilizar transcripciones y leucocitos, según se describe en la sección de materiales y métodos. Se recolectó sangre de ocho donantes hacia diferentes tubos y se mantuvieron sin tratar como controles o se trataron mediante la adición de 1 ml de aditivo de estabilización (N,N-dimetilpropanamida al 50% en v/v, 5x tampón MOPS, pH 5,5) a 9 ml de sangre EDTA. Se realizó el mezclado de la sangre, la incubación, la transferencia de partes alícuotas de la muestra de sangre a tubos PAXgene Blood RNA Tubes, la congelación, la conservación y la preparación del ARN como se describió anteriormente. El ARN se sometió a un análisis del nivel de transcripciones como se describió anteriormente.

Además, se analizó la integridad de las células y los epitopos de la superficie celular en las muestras estabilizadas mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Con más detalle, se analizó la presencia y la accesibilidad de las proteínas de la superficie celular mediante la unión del anticuerpo conjugado con fluorescencia (anti-CD3 marcado con PE) dirigido contra el epitopo celular CD3 que es específico de linfocitos, mientras que otros subtipos de leucocitos (monocitos, granulocitos neutrófilos) son negativos a CD3. Todos los resultados obtenidos en

este ejemplo se muestran en la figura 1 a la figura 5.

Tal como se esperaba, los niveles relativos de transcripciones de los cuatros genes seleccionados se mantuvieron estables en los tubos PAXgene Blood RNA Tubes y resultaron alterados en los tubos con EDTA que no recibieron el estabilizador (inducción de genes *ex vivo*/ganancia de transcripciones de FOS, IL8 y represión de genes/pérdida de transcripciones de IL1B, TP53). Las muestras de sangre con EDTA mezcladas con el estabilizador DMPA mostraron unos niveles de expresión estabilizados, tal como se indica por la ausencia de cambios o unos cambios mínimos en los valores de CT a lo largo del tiempo de conservación de la muestra de sangre (véanse las figuras 1 a 4). Así, el perfil de expresión génica se "congeló" tras la estabilización con DMPA, un efecto similar al observado con los tubos PAXgene RNA Tubes. Sin embargo, en las muestras tratadas con DMPA, las células se conservaron, permitiendo con ello un análisis separado de las células.

En la sangre con EDTA sin tratar (control FACS [+] [EDTA]), se detectaron linfocitos hasta el último momento del tiempo de ensayo de incubación de esta serie de ensayo, que es la incubación de la sangre durante tres días a temperatura ambiente. Los linfocitos en la sangre con EDTA tratados con el aditivo de estabilización (disolución de ensayo DMPA al 5% en v/v) también pudieron detectarse durante hasta tres días (véase la figura 5). No se detectaron señales de fluorescencia específicas en las muestras control FACS (-) (EDTA), mientras que el resto de las muestras de sangre fresca e incubada recolectada hacia tubos con EDTA que se mantuvieron sin tratar y las tratadas con el estabilizante DMPA mostraron la presencia específicamente de linfocitos. Así, la estabilización con DMPA permite el análisis de las células contenidas en la muestra estabilizada.

Por tanto, el ejemplo 1 demuestra que el ARN puede aislarse de modo eficaz a partir de muestras de sangre tratadas con N,N-dimetilpropanamida (DMPA) como estabilizante. El ARN extraído resultó adecuado para el análisis de RT-PCR y los niveles de las transcripciones fueron estabilizados de modo eficaz a lo largo de un periodo de tiempo prolongado a temperatura ambiente en sangre mezclada con DMPA. Además, las células de los linfocitos permanecieron intactas y pudieron detectarse epítomos de la superficie celular (proteínas de la membrana celular) en la sangre tratada con N,N-dimetilpropanamida (DMPA). Por tanto, las N,N-dialquilpropanamidas según la fórmula 1, tal como N,N-dimetilpropanamida, son agentes estabilizantes eficaces que estabilizan los niveles de transcripciones y, por tanto, el perfil de transcripción génica mediante la inhibición de las alteraciones en los niveles de transcripciones y, además, son capaces de estabilizar las células, de modo que las células pueden aislarse de la muestra estabilizada para su análisis.

II. Estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares en muestras de sangre empleando N,N-dialquilpropanamidas por sí solas o en combinación con un inhibidor de caspasa

Materiales y métodos

La N,N-dimetilpropanamida (DMPA) se ensayó para su capacidad para estabilizar una muestra biológica que contiene células, en este caso una muestra de sangre completa, por sí sola o en combinación con un inhibidor de caspasa. Tal como puede observarse a partir de los siguientes ejemplos, la DMPA estabiliza de modo eficaz las muestras de sangre y, en particular, se descubrió que inhibía la liberación de ADN genómico de las células comprendidas en la muestra de sangre estabilizada. Así, las N,N-dialquilpropanamidas son capaces de estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares. Además, se descubrió que la N,N-dialquilpropanamida, en combinación con un inhibidor de la caspasa, mejora de modo ventajoso el efecto de estabilización logrado. Una respectiva combinación produjo un prolongado efecto de estabilización y, además, mostró menos variación en el efecto de estabilización logrado con muestras de sangre obtenidas de diferentes donantes. Esta es una ventaja importante, puesto que proporciona un método de estabilización uniforme y fiable para muestras de sangre, que conserva la población de ácidos nucleicos extracelulares.

Recolección de sangre y estabilización

La sangre obtenida de los donantes se recolectó hacia tubos de K2 EDTA de 10 ml (BD). Se mezclaron 4,5 ml de la sangre respectivamente recolectada con 0,9 ml de diferentes disoluciones de estabilización (véanse los siguientes ejemplos para los detalles de las disoluciones de estabilización ensayadas).

Todas las muestras de sangre estabilizadas se realizaron por triplicado para cada condición y momento de ensayo. En el momento 0 (referencia), inmediatamente después de mezclar la disolución de estabilización y la sangre, se generó plasma y se extrajo el ADN extracelular en circulación. La muestra de sangre estabilizada residual se conservó durante tres días y seis días a temperatura ambiente.

Como control de referencia, la muestra de sangre estabilizada con EDTA (recolectada hacia tubos de K2 EDTA sin más aditivos) también se conservó durante 3 y 6 días. Además, cuando se indica en los ejemplos, se incluyó una disolución de estabilización que comprendía un inhibidor de caspasa y N,N-dimetilacetamida (DMAA) en la comparación (concentración final en la mezcla que se obtiene cuando se añade dicha disolución de estabilización a la muestra de sangre: 7,2 mg de K2 EDTA/ml, quinolina-Val-Asp-CH₂-OPH 1 µM (inhibidor de caspasa) y DMAA al 5%) (véanse los documentos sin publicar PCT/EP2012/070211 y PCT/EP2012/068850). Las muestras estabilizadas con DMAA ensayadas en la presente siempre incluyeron además un inhibidor de caspasa. No se ensayaron disoluciones estabilizantes que contenían DMAA sin inhibidor de caspasa en los posteriores ejemplos.

Aislamiento y análisis de los ácidos nucleicos extracelulares

5 Se generó plasma de las muestras de sangre estabilizadas y no estabilizadas (EDTA) invirtiendo los tubos que contenían sangre cuatro veces. Después, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 1900 x g a 4 °C. Se trasladaron 2,5 ml de la fracción de plasma hacia un tubo Falcon nuevo de 15 ml y se centrifugaron durante 10 minutos a 16.000 x g a 4 °C. Se emplearon 2 ml del plasma respectivamente aclarado para el aislamiento de los ácidos nucleicos extracelulares empleando el kit de ácidos nucleicos en circulación QIAamp (QIAGEN) según las instrucciones del fabricante.

El ADN extracelular aislado se analizó empleando dos ensayos de qPCR diferentes, que se dirigen a diferentes longitudes de fragmentos del ADN ribosómico 18S:

10 ADN ribosómico 18S: amplicón de 66 pb

ADN ribosómico 18S: amplicón de 500 pb

Tabla 2: Resumen de la información de las secuencias diana de ADN empleadas detectadas mediante qPCR

Descripción de la diana	Posición	Posición	Secuencia 5'-3'	Tinte
ADNr h18S amplicón de 66 pb	p12 - región del cromosoma 13, 14, 15, 21, 22	directo	GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG	5' Cy5 - BHQ 3'
		inverso	CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG	
		sonda	ACCGGCGCAAGACGGACCAGA	
ADNr h18S amplicón de 500 pb	p12 - región del cromosoma 13, 14, 15, 21, 22	directo	GTCGCTCGCTCCTCTCCTACTT	5' FAM - BHQ 3'
		inverso	GGCTGCTGGCACCAGACTT	
		sonda	CTAATACATGCCGACGGGCGCTGAC	

15 Los umbrales de ciclo de las muestras individuales se tradujeron en cantidad de ADN_g en el eluato, según una curva patrón de ADN_g. La cantidad de ADN_g de los momentos del tiempo de conservación se comparó con el nivel de ADN_g en el momento cero del mismo donante, y se muestra en las figuras como aumento en número de veces. En especial, el aumento en el fragmento de 500 pb en la fracción plasmática de la muestra de sangre después de la conservación es una indicación de la lisis/destrucción de leucocitos. Así, cuanto más baja sea la cantidad de ADN de 500 pb liberado, mejor será la actuación del método de estabilización.

Resultados

20 Las figuras que muestran los resultados correspondientes a los ejemplos descritos a continuación demuestran el aumento en el ADN con respecto al momento 0 con las diferentes disoluciones de estabilización (cambio en número de veces) empleando diferentes longitudes de amplicón del gen de ARNr 18S. Las barras indican el promedio de las muestras por triplicado para cada condición y momento de ensayo.

Ejemplo 2: Estabilización empleando N,N-dimetilpropanamida sin inhibidor de caspasa

25 En el ejemplo 2 se emplearon diferentes concentraciones de N,N-dimetilpropanamida (DMPA) para estabilizar muestras de sangre obtenidas de diferentes donantes. El objetivo del análisis fue la estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares, según se determina analizando el aumento en ADNr 18S. La estabilización y el procesamiento de las muestras se realizaron como se describió en la sección de materiales y métodos, en el apartado II.

30 Las disoluciones de estabilización sin inhibidor de caspasa comprendían N,N-dimetilpropanamida en diferentes concentraciones y EDTA. Cuando se añaden estas disoluciones de estabilización a la muestra de sangre, se obtienen las siguientes concentraciones finales en la mezcla de sangre/disolución de estabilización: 7,2 mg de K2 EDTA/ml y diferentes concentraciones de N,N-dimetilpropanamida (1,5%, 2% o 2,5%). También se incluyeron muestras estabilizadas con DMAA (5%) como referencia.

35 Las figuras 6 y 7 muestran los resultados de estabilización obtenidos cuando la sangre se estabiliza con DMPA a diferentes concentraciones. Tal como puede observarse, las composiciones de estabilización ensayadas que comprenden DMPA como estabilizante fueron eficaces, en diferentes concentraciones, para estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares, tal como puede observarse por el aumento significativamente reducido en el ADNr 18S en las muestras estabilizadas con N-metilformamida. El efecto de estabilización fue observado a través de todo el periodo de estabilización ensayado (hasta 6 días), aunque DMPA fuera el único agente estabilizante y se emplearan concentraciones más bien bajas.

Ejemplo 3: Estabilización con N,N-dimetilpropanamida e inhibidor de caspasa

Se recolectó sangre de dos donantes diferentes hacia tubos de K2 EDTA de 10 ml (BD). Se mezclaron 4,5 ml de la sangre respectivamente recolectada con 0,9 ml de la disolución de estabilización que comprende N,N-dimetilpropanamida, EDTA y un inhibidor de caspasa. Tras ello, se obtiene la siguiente concentración final en la mezcla de sangre/estabilizador:

7,2 mg de K2 EDTA, quinolina-Val-Asp-CH₂-OPH 1 µM (inhibidor de caspasa) y N,N-dimetilpropanamida al 2,5%, 5% o 7,5% (en v/v) o DMAA al 5% (en v/v), respectivamente.

Todas las muestras de sangre estabilizadas se realizaron por triplicado para cada condición y momento de ensayo. En el momento 0 (referencia), inmediatamente después de mezclar la disolución de estabilización y la sangre, se generó plasma y se extrajo el ADNccf. La muestra de sangre residual se conservó durante tres días y seis días a temperatura ambiente. Como control, la muestra de sangre estabilizada con EDTA también se conservó durante 3 y 6 días. Se generó plasma de las muestras de sangre estabilizadas y no estabilizadas (EDTA) invirtiendo los tubos que contenían sangre cuatro veces. Después, los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 3.000 rpm/1912 x g. Se trasladaron 2,5 ml de la fracción de plasma hacia un tubo Falcon nuevo de 15 ml y se centrifugaron durante 10 minutos a 16.000 x g. Se emplearon 2 ml del plasma respectivamente aclarado para el aislamiento de los ácidos nucleicos extracelulares empleando el kit de ácidos nucleicos en circulación QIAamp.

Los resultados se muestran en las figuras 8 y 9. Se muestra el aumento en ADN con respecto al momento 0 con N,N-dimetilpropanamida al 2,5%, 5% y 7,5% o DMAA al 5% (cambio en número de veces) empleando diferentes longitudes de amplicón del gen de ARNr 18S. Las barras indican el promedio de las muestras por triplicado para cada condición y momento de ensayo. Todas las disoluciones según la presente invención muestran unas cantidades significativamente menores de ADN liberado después de una conservación durante 3 y 6 días a temperatura ambiente, comparado con la sangre con EDTA no estabilizada, y muestran unos resultados comparables a la DMAA.

Ejemplo 4: Estabilización con N,N-dimetilpropanamida e inhibidor de caspasa

Se recolectó sangre de dos donantes diferentes hacia tubos de K2 EDTA de 10 ml (BD). Se mezclaron 4,5 ml de la sangre respectivamente recolectada con 0,9 ml de la disolución de estabilización que contiene K2 EDTA, quinolina-Val-Asp-CH₂-OPH (inhibidor de caspasa, disuelto en DMSO), y diferentes concentraciones de N,N-dimetilpropanamida (DMPA) o DMAA. La estabilización y el procesamiento de las muestras se realizaron como se describió en la sección de materiales y métodos, en el apartado II.

Se obtuvo a siguiente concentración final en la mezcla de sangre/estabilizador:

7,2 mg de K2 EDTA/ml, quinolina-Val-Asp-CH₂-OPH 1 µM (inhibidor de caspasa) y diferentes concentraciones de N,N-dimetilpropanamida (2,5%, 5% o 7,5%) o DMAA al 5%

Los resultados se muestran en las figuras 10 y 11. El objetivo del análisis fue la estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares, según se determina analizando el aumento en ADNr 18S. Se muestra el aumento en ADN con respecto al momento 0 con N,N-dimetilpropanamida (DMPA) al 2,5%, 5% y 7,5% o DMAA al 5% con el inhibidor de caspasa (cambio en número de veces) empleando diferentes longitudes de amplicón del gen de ARNr 18S. Las barras indican el promedio de las muestras por triplicado para cada condición y momento de ensayo. Tal como puede observarse, las disoluciones según la presente invención muestran unas cantidades significativamente menores de ADN liberado después de una conservación durante 3 y 6 días a temperatura ambiente, comparado con la sangre con EDTA no estabilizada, y muestran unos resultados comparables a la estabilización con DMAA + inhibidor de caspasa. Por tanto, se logró la estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares. Además, el plasma obtenido se inspeccionó para analizar si se había producido hemólisis. En particular, las muestras de plasma obtenidas a partir de muestras de sangre estabilizada con DMPA al 2,5% y 5% no mostraron señales de hemólisis.

Ejemplo 5: Estabilización con N,N-dimetilpropanamida e inhibidor de caspasa

En el ejemplo 5 se emplearon diferentes concentraciones de DMPA en combinación con un inhibidor de caspasa para estabilizar muestras de sangre. El objetivo del análisis fue la estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares, según se determina analizando el aumento en ADNr 18S. La estabilización y el procesamiento de las muestras se realizaron como se describió en la sección de materiales y métodos, en el apartado II.

Las disoluciones de estabilización comprendían DMPA en diferentes concentraciones, un inhibidor de caspasa y EDTA. Cuando se añaden estas disoluciones de estabilización a la muestra de sangre, se obtienen las siguientes concentraciones finales en la mezcla de sangre/disolución de estabilización:

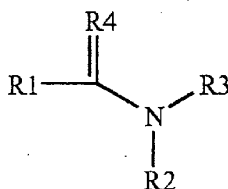
7,2 mg de K2 EDTA/ml, quinolina-Val-Asp-CH₂-OPH 1 µM (inhibidor de caspasa) y diferentes concentraciones de DMPA (véanse las figuras para los detalles).

5 Las figuras 12 a 16 muestran los resultados de estabilización obtenidos de sangre de diferentes donantes cuando las muestras de sangre se estabilizan con DMPA a diferentes concentraciones (véanse las figuras para los detalles) y un inhibidor de caspasa. Tal como puede observarse, las composiciones de estabilización ensayadas que comprenden DMPA en diferentes concentraciones fueron eficaces para estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares, tal como puede observarse por el aumento significativamente reducido en el ADNr 18S en las muestras estabilizadas con DMPA. Por tanto, la DMPA es muy eficaz en diferentes concentraciones para estabilizar muestras de sangre en combinación con un inhibidor de caspasa.

- d) las células comprendidas en la muestra estabilizada se retiran; y/o
- e) se conserva (i) la muestra biológica que contiene células estabilizada, (ii) la muestra estabilizada de la cual se han retirado las células y/o (iii) las células retiradas de la muestra;
- f) los ácidos nucleicos se aíslan de la muestra estabilizada;
- 5 en el que, opcionalmente, las células retiradas se analizan y/o en el que, opcionalmente, se aíslan biomoléculas, tales como ácidos nucleicos o proteínas, de las células retiradas.
- 8.- Un método para aislar ácidos nucleicos a partir de una muestra biológica, que comprende las etapas de:
- a) estabilizar una muestra que contiene células según el método definido en una o más de las reivindicaciones 1 a 7;
- b) aislar ácidos nucleicos de la muestra estabilizada.
- 10 9.- El método según la reivindicación 8, en el que la etapa b) comprende aislar los ácidos nucleicos intracelulares, preferiblemente el ARN intracelular; y/o
- en el que la etapa b) comprende aislar los ácidos nucleicos extracelulares.
- 10.- El método según la reivindicación 8 o 9, en el que la muestra es sangre y en el que las células se separan del resto de la muestra, y los ácidos nucleicos extracelulares se aíslan del resto de la muestra.
- 15 11.- El método según una o más de las reivindicaciones 8 a 10, en el que los ácidos nucleicos aislados, en una posterior etapa c), se procesan y/o se analizan, y preferiblemente:
- i) son modificados;
- ii) se ponen en contacto con al menos una enzima;
- iii) son amplificados;
- 20 iv) se someten a una transcripción inversa;
- v) son clonados;
- vi) son secuenciados;
- vii) se ponen en contacto con una sonda;
- viii) son detectados;
- 25 ix) son cuantificados;
- ix) son identificados; y/o
- x) son analizados para la determinación del perfil de expresión génica.

12.- Una composición adecuada para estabilizar una muestra biológica que contiene células, que comprende:

a) al menos un compuesto según la fórmula 1



30

Fórmula 1

en la que R1 es un resto hidrógeno o un resto alquilo, R2 y R3 son restos hidrocarburo iguales o diferentes con una longitud de la cadena de carbonos de 1-20 átomos dispuestos de una manera lineal o ramificada, y R4 es un resto oxígeno, azufre o selenio, y en el que dicho compuesto según la fórmula 1 es una N,N-dialquilpropanamida; y

35 b) al menos un anticoagulante.

13.- La composición según la reivindicación 12, en la que la N,N-dialquilpropanamida es N,N-dimetilpropanamida, y

en la que el anticoagulante es un agente quelante.

14.- La composición según la reivindicación 12 o 13, en la que la composición comprende un inhibidor de la apoptosis.

5 15.- La composición según una o más de las reivindicaciones 12 a 14, que tiene una o más de las siguientes características:

a) es capaz de estabilizar células y reducir la liberación del ADN genómico de las células contenidas en la muestra biológica que contiene células hacia la porción sin células de la muestra;

b) es capaz de reducir la dilución de la población de ADN extracelular comprendido en la muestra biológica por el ADN genómico que se origina de las células contenidas en la muestra estabilizada;

10 c) es capaz de reducir la dilución de la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en la muestra biológica por los ácidos nucleicos intracelulares que se originan de las células contenidas en la muestra estabilizada;

d) la composición de estabilización no comprende aditivos en una concentración en la que dichos aditivos inducirían o estimularían la lisis celular;

15 e) la composición de estabilización no comprende un agente de entrecruzamiento que induzca entrecruzamientos de proteína-ADN y/o proteína-proteína;

f) la composición de estabilización no comprende formaldehído, formalina, paraformaldehído o un liberador de formaldehído;

g) la composición de estabilización no comprende un agente tóxico; y/o

20 h) la composición de estabilización es capaz de estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en la muestra biológica que contiene células sin refrigeración, preferiblemente a temperatura ambiente, durante un periodo de tiempo seleccionado de al menos dos días, al menos tres días, de al menos dos días hasta tres días, de al menos dos días hasta seis días y/o de al menos dos días hasta siete días;

i) la composición es capaz de estabilizar el perfil de transcripción génica de las células contenidas y/o es capaz de estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en una muestra que contiene células; y/o

25 j) en la que la composición estabilizante se proporciona como una mezcla con una muestra de sangre.

Fig. 1

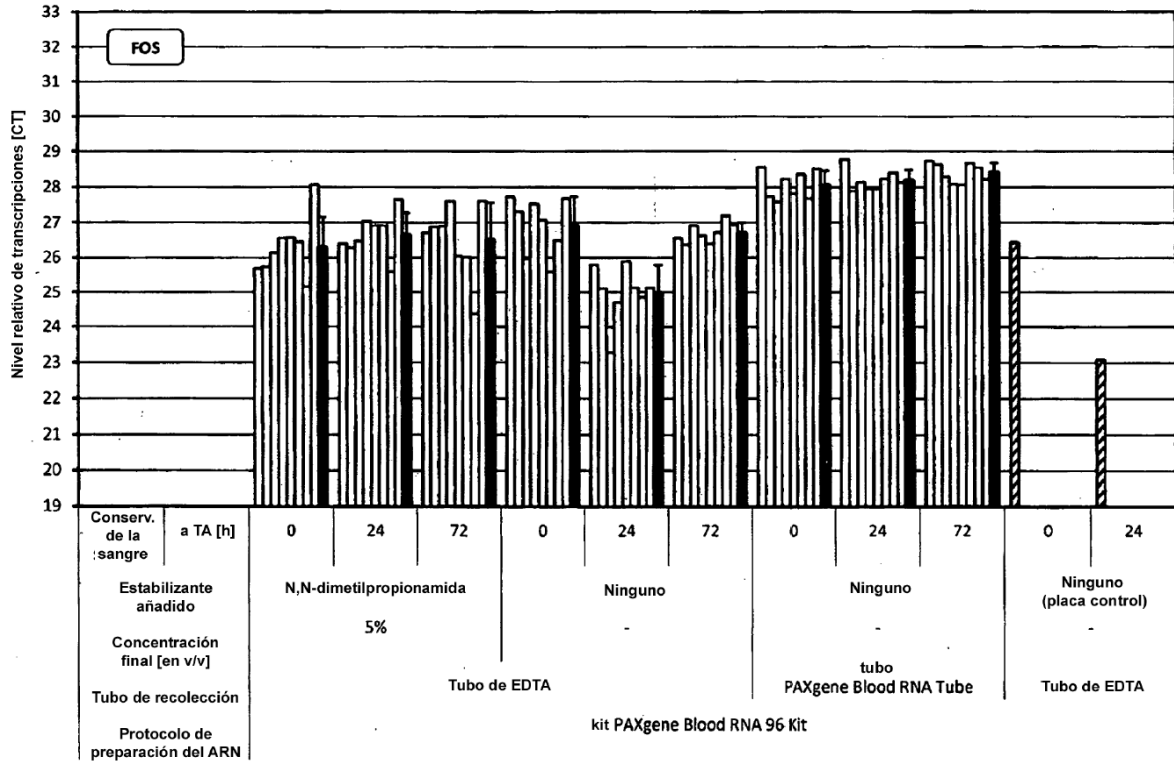


Fig. 2

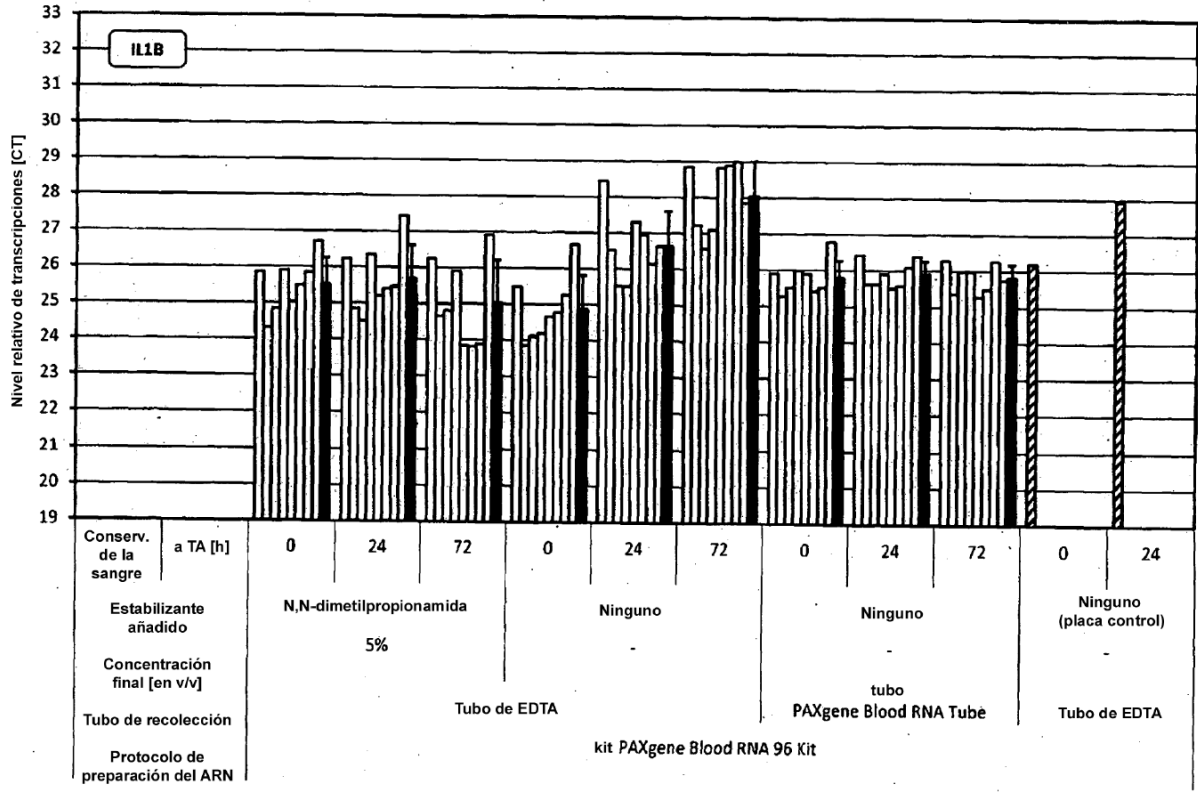


Fig. 3

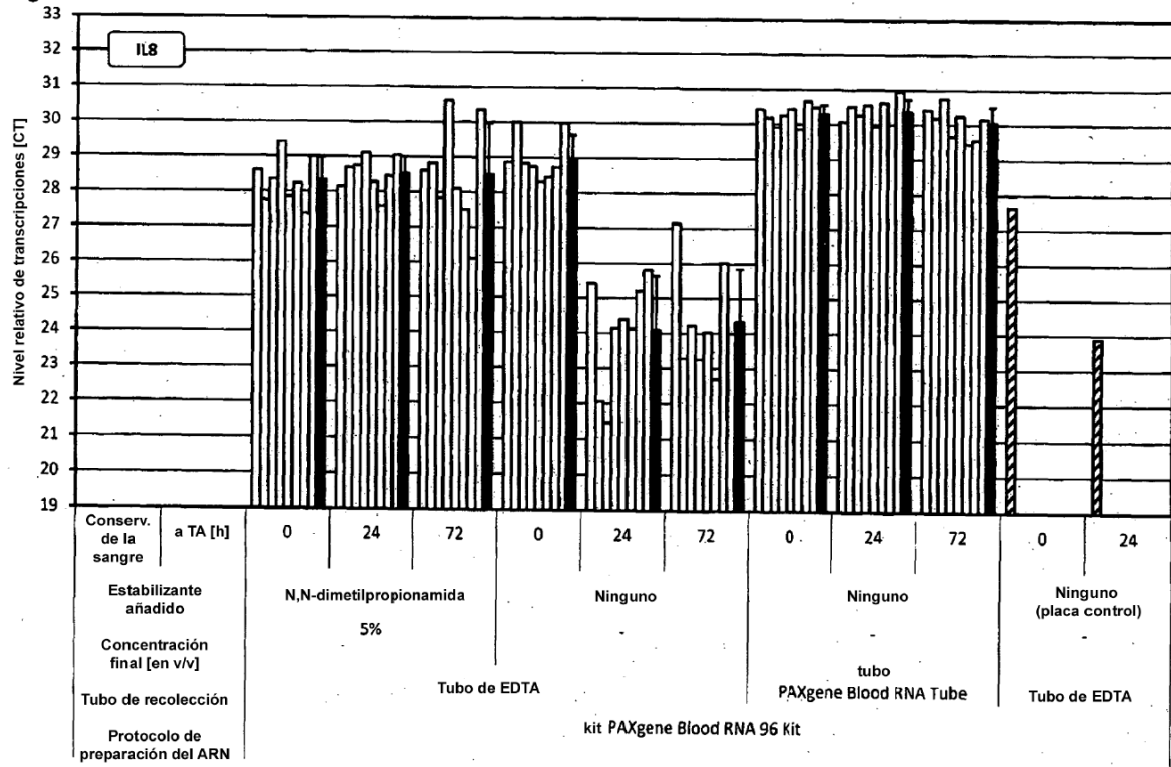


Fig. 4

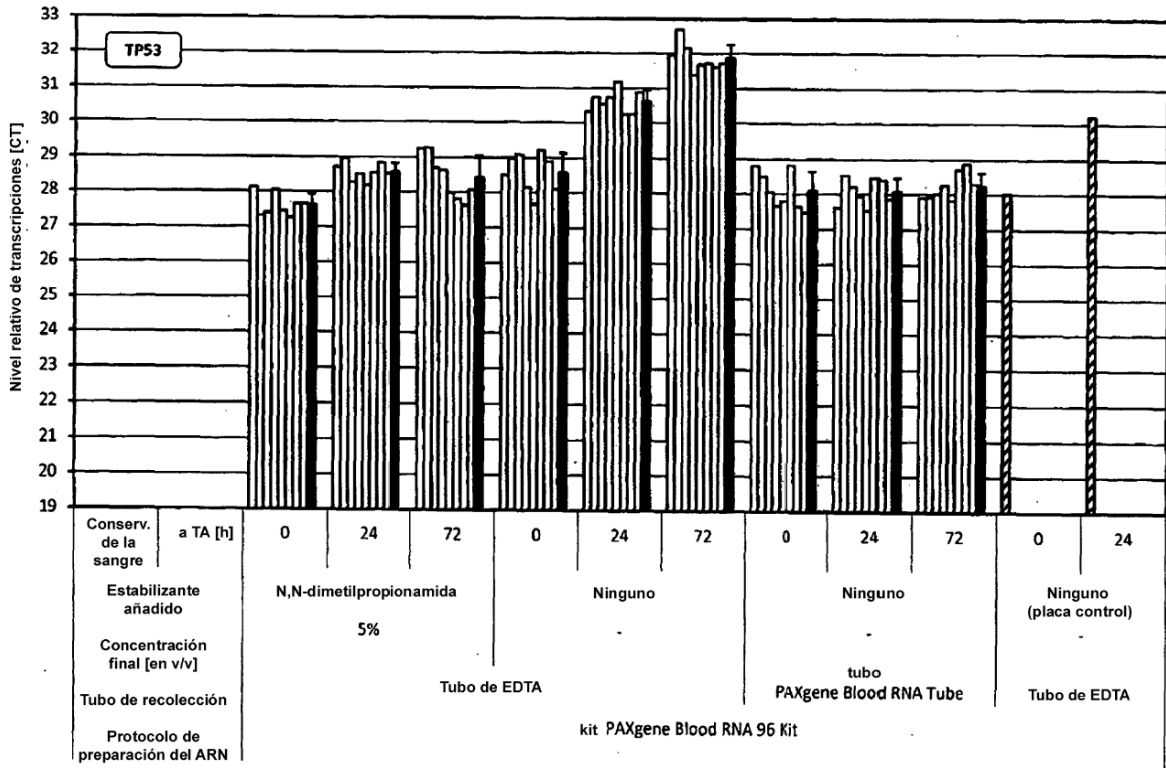


Fig. 5

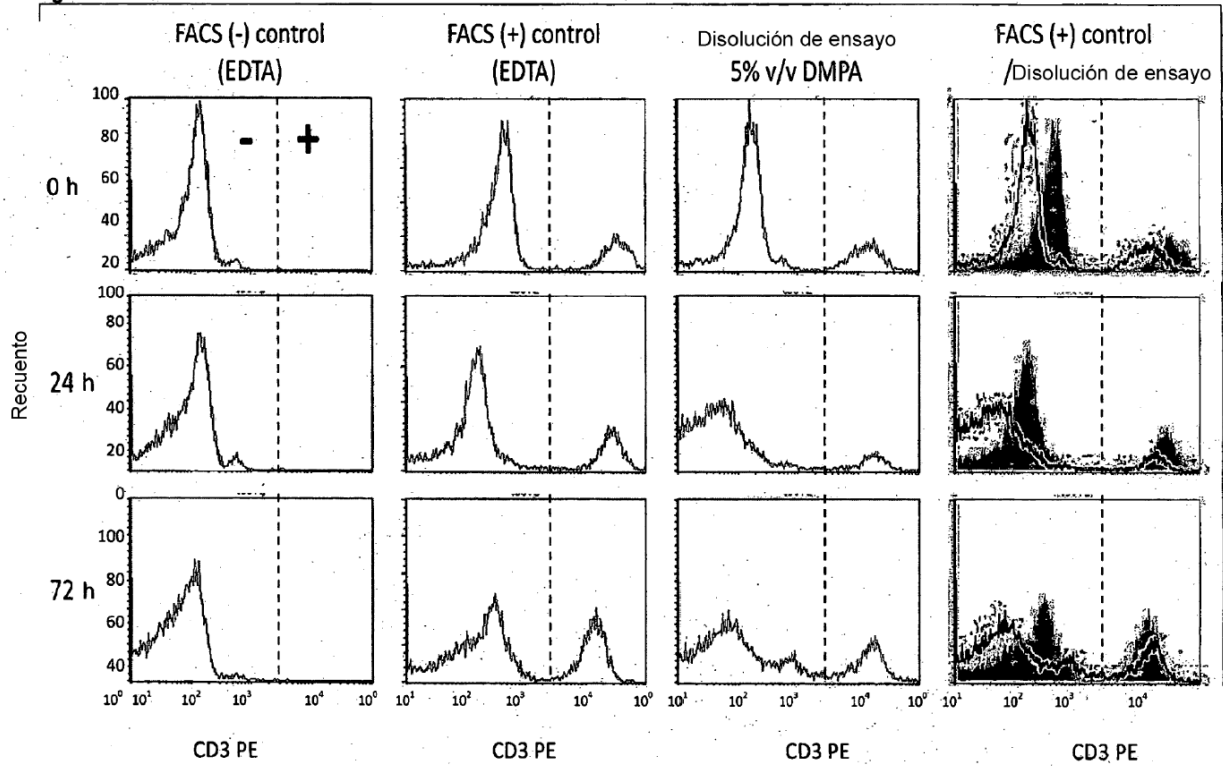


Fig. 6

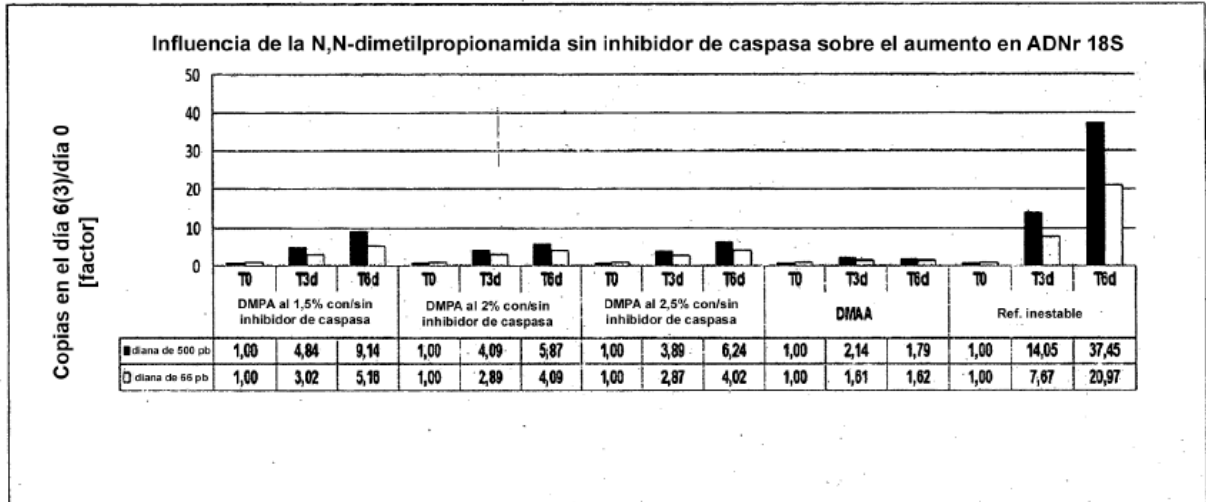


Fig. 7

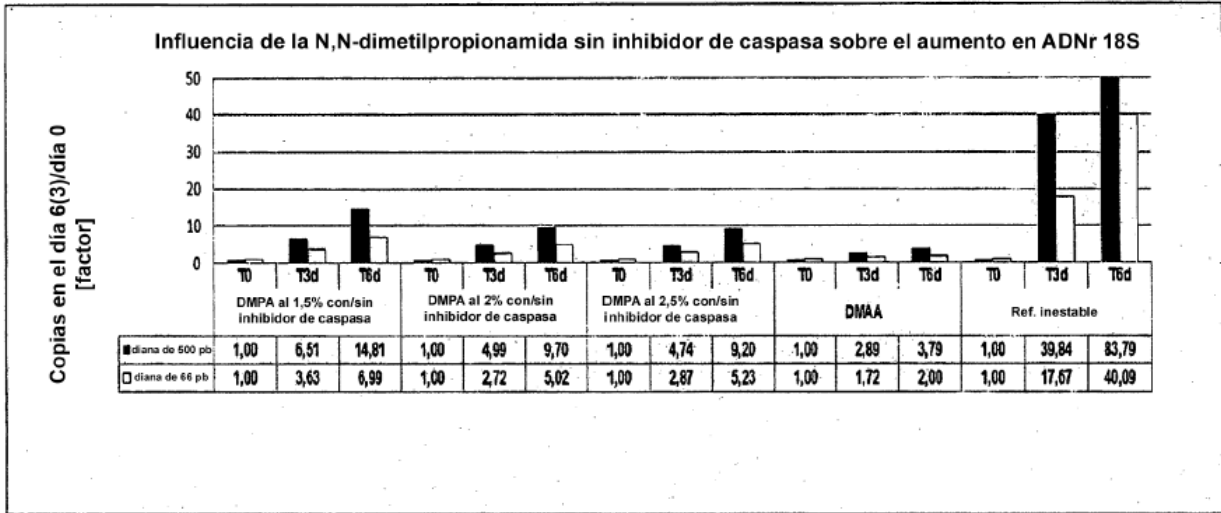


Fig. 8

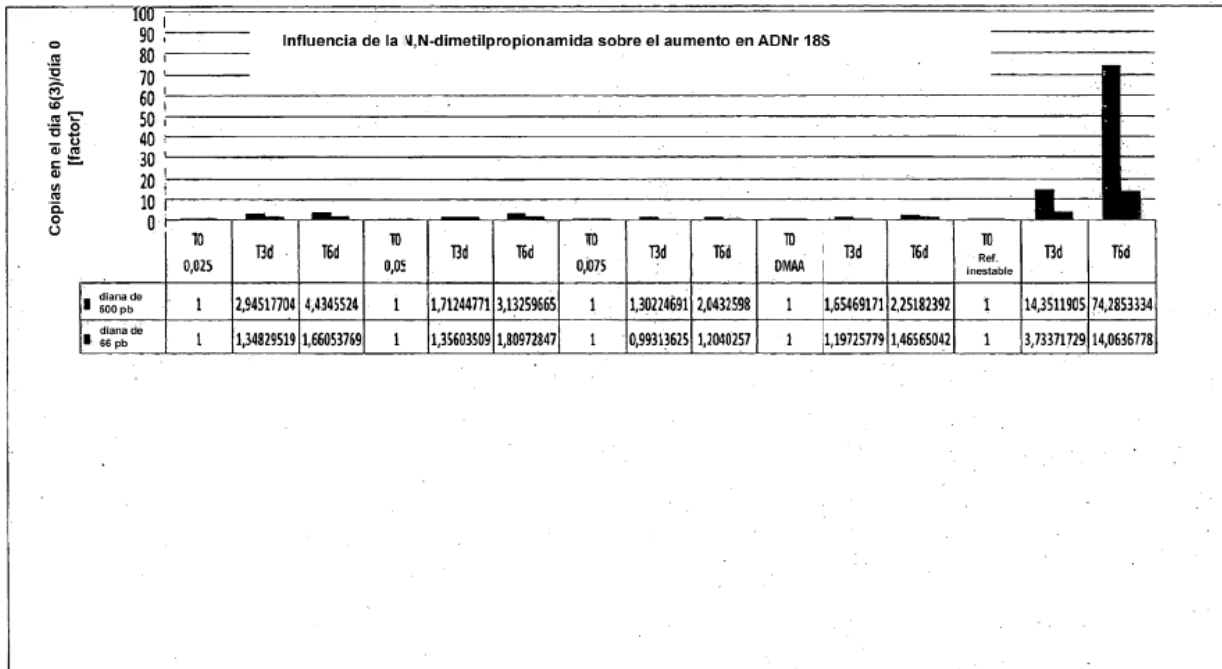


Fig. 9

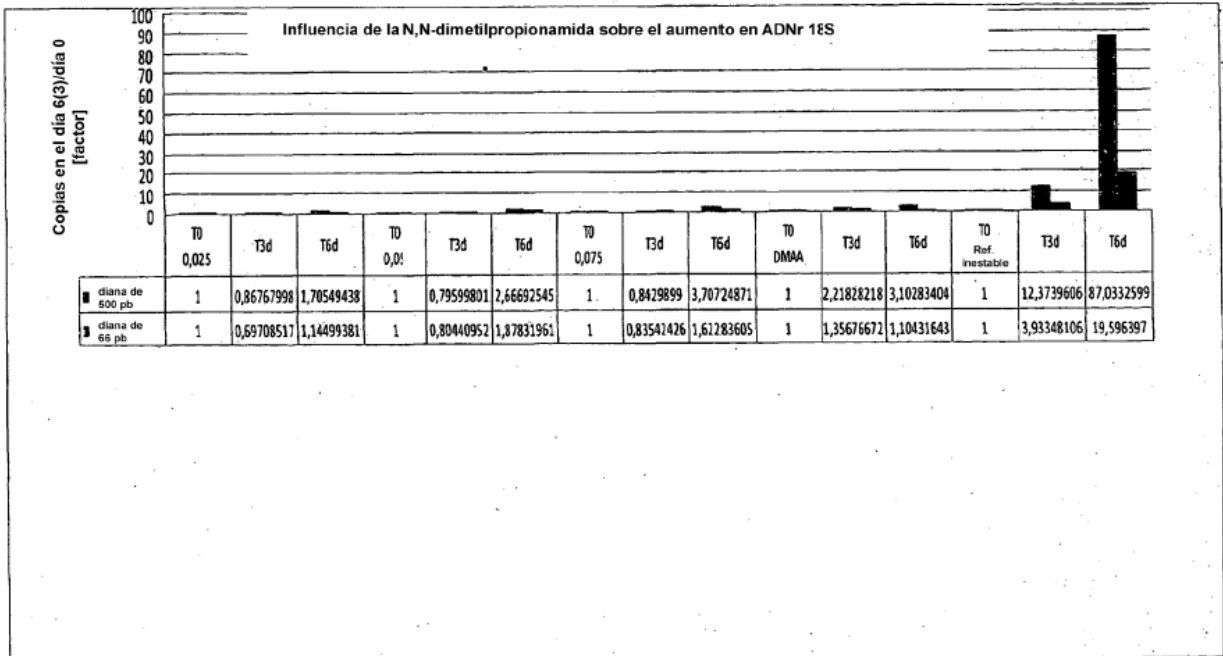


Fig. 10

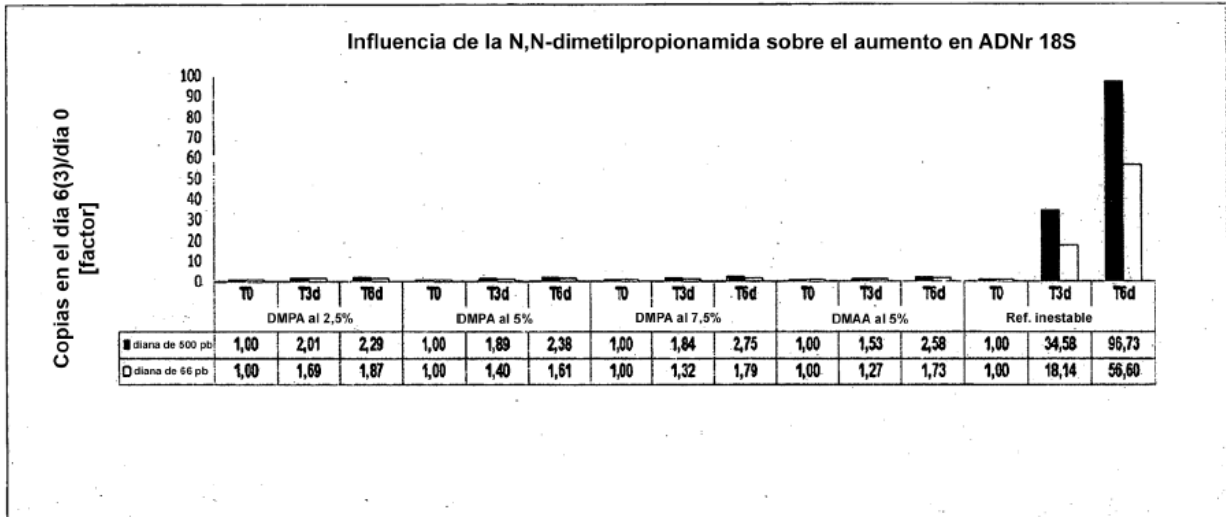


Fig. 11

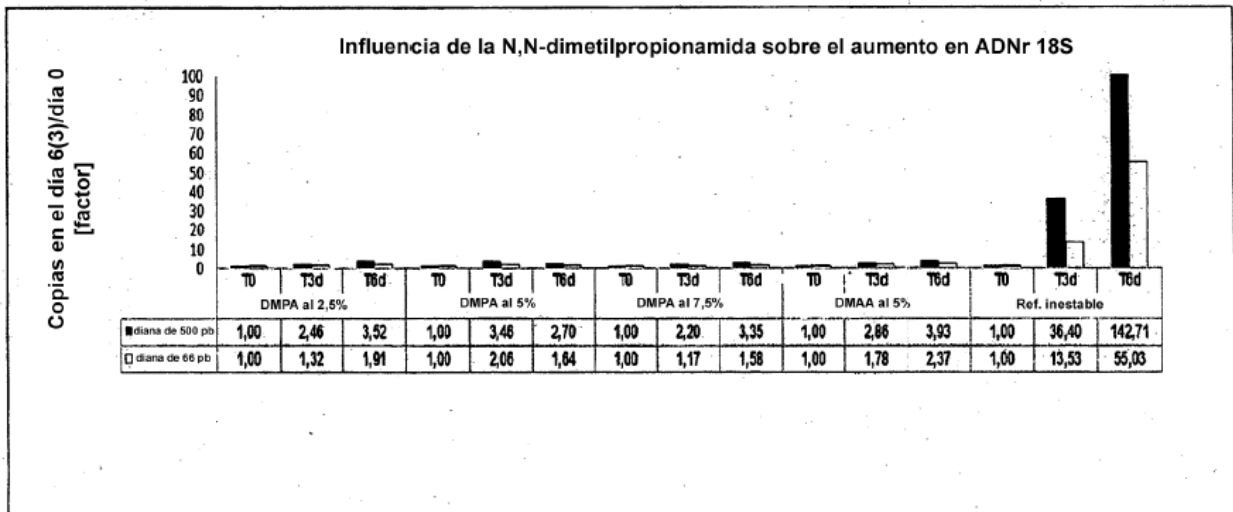


FIG. 12

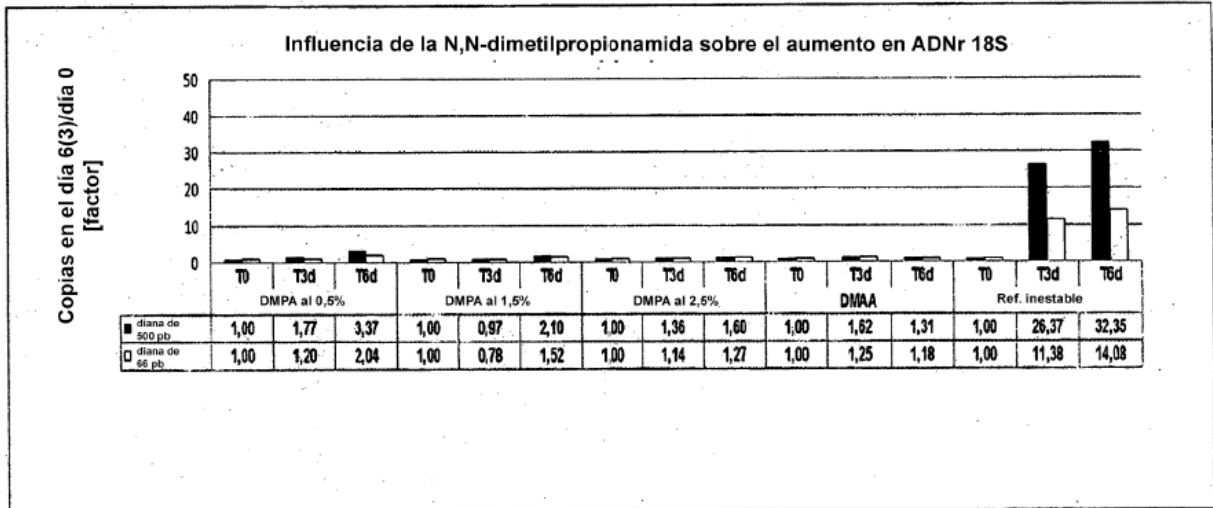


Fig. 13

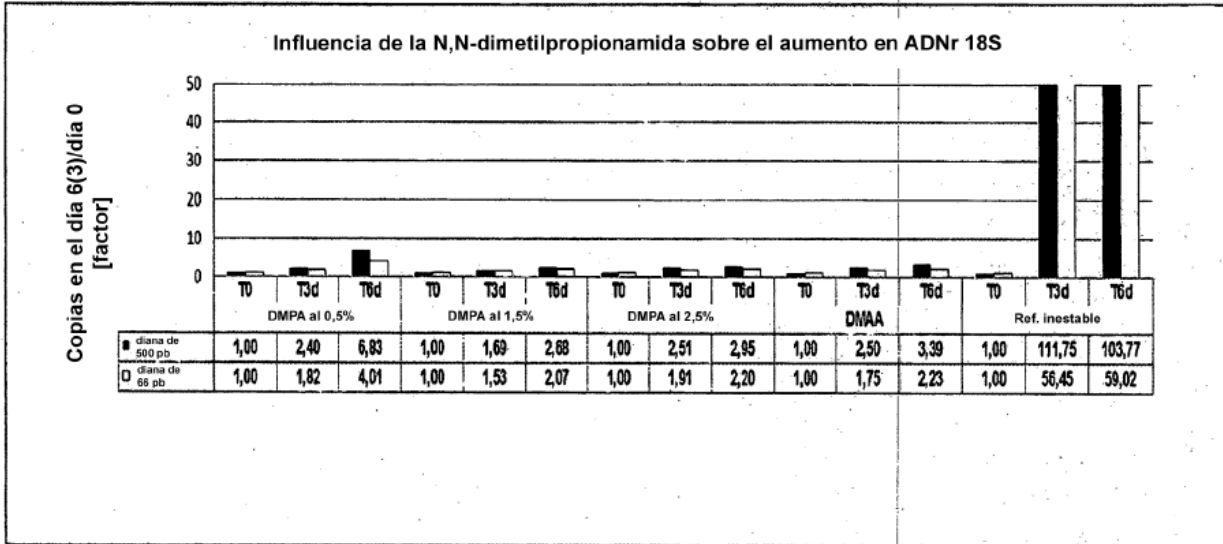


Fig. 14

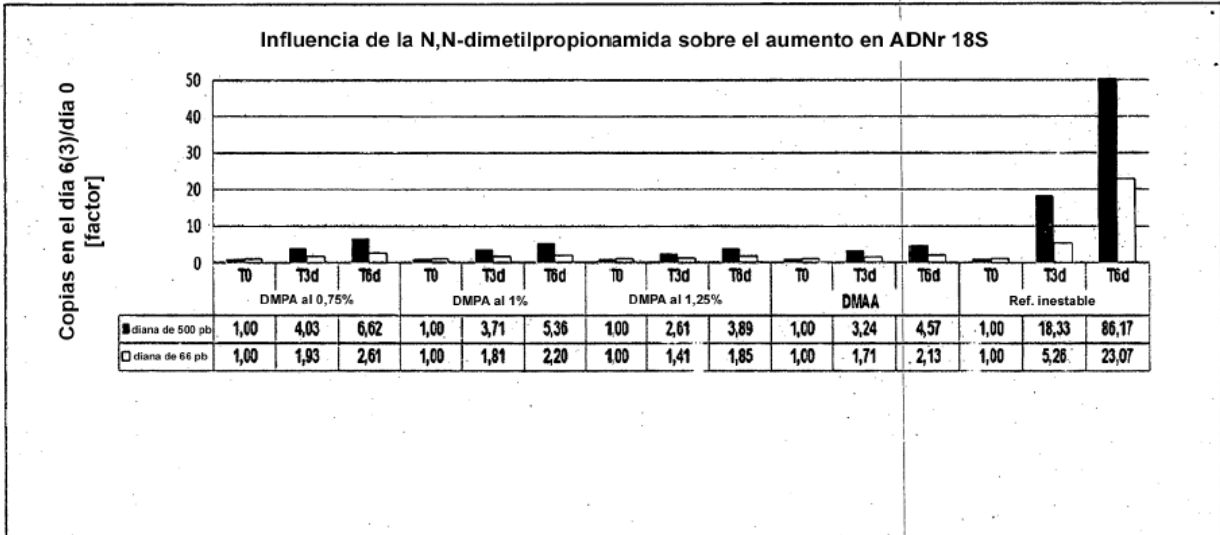


Fig. 15

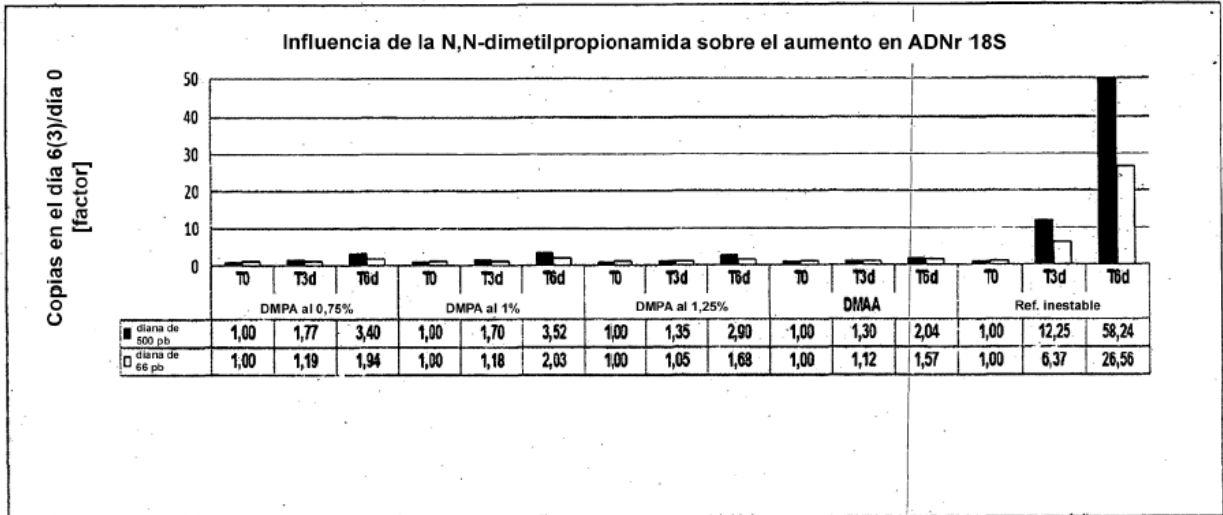


Fig. 16

