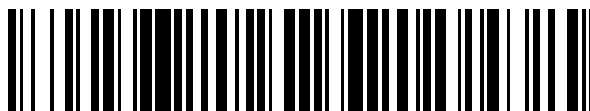


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 572**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2010 PCT/US2010/023859**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2010 WO10096323**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2010 E 10704474 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2398912**

54 Título: **Conservación de ácidos nucleicos fuera de las células**

30 Prioridad:

18.02.2009 US 153472 P

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

12.01.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

FERNANDO, M. ROHAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 649 572 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).

DESCRIPCION

Conservación de ácidos nucleicos fuera de las células

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a la conservación del ARN fuera de las células dentro de una muestra de sangre para su posterior análisis.

Antecedentes de la invención

10 Se ha reconocido que el ARNm obtenido a partir del plasma de una muestra de sangre puede ser útil como indicador de la expresión de la proteína. Por lo tanto, la presencia de ARNm extracelular o fuera de las células en el plasma sanguíneo ha desencadenado una variedad de investigaciones dirigidas a determinar la fuente y las posibles capacidades diagnósticas de estos ácidos nucleicos. Dado que la sangre de la mayoría de las personas sanas normalmente no contiene cantidades sustanciales de ARN fuera de las células, las cantidades elevadas de ácidos nucleicos libres suelen ser indicativas de un problema de salud (o embarazo, ya que se han identificado ácidos nucleicos fuera de las células fetales en sangre materna). Específicamente, se ha encontrado que la presencia

15 elevada de ARNm fuera de las células indica la existencia de diversos cánceres proporcionando de ese modo soporte para la creencia de que estos ácidos nucleicos pueden originarse a partir de células tumorales. En consecuencia, la identificación de ARN fuera de las células dentro de una muestra de sangre podría proporcionar información sobre la presencia y gravedad del cáncer o alguna otra afección (por ejemplo, diabetes, inflamación, artritis, infección o similares) y, por lo tanto, puede ser un indicador temprano de tal condición. La identificación del

20 ARN fuera de las células dentro de una muestra de sangre también puede proporcionar una guía sobre cómo tratar mejor a un paciente dependiendo de las cantidades relativas de ácidos nucleicos fuera de las células identificados dentro de la muestra de sangre del paciente. Por lo tanto, puede ser útil no solamente para el diagnóstico, sino también para el tratamiento del paciente (por ejemplo, evaluando un cambio en el estado del ARN de un paciente a medida que progresa el tratamiento).

25 El ARN está típicamente sujeto a actividad ribonucleasa (RNasa) que reduce la cantidad de ARN recuperable de una muestra de sangre. Sin embargo, se ha descubierto que a pesar de la presencia de una amplia actividad de RNasa en plasma sanguíneo, el ARNm fuera de las células es inesperadamente muy estable *in vivo* y evita cualquier degradación sustancial mediada por nucleasas. Sin embargo, después de que se adquiere una muestra de sangre de un paciente, comienza la lisis celular y los ácidos nucleicos de las células sanguíneas se mezclan con los ácidos nucleicos fuera de las células, lo que hace difícil, si no imposible, aislar y distinguir el ARNm fuera de las células.

30 Además, existe preocupación acerca de la estabilidad de los ácidos nucleicos fuera de las células y su capacidad para evitar la degradación iniciada por nucleasas *in vitro*. Consecuentemente, la capacidad de indicación de enfermedad de los ácidos nucleicos fuera de las células puede disminuirse ya que su presencia ya no se puede determinar con precisión. Idealmente, la prevención de la lisis celular y la degradación de ácidos nucleicos fuera de las células dentro de la muestra de sangre permitiría medir con precisión los ácidos nucleicos fuera de las células y detectar la presencia de cualquier riesgo de enfermedad.

Los esfuerzos para comprender mejor la estabilidad inesperada de los ácidos nucleicos fuera de las células *in vivo* han llevado a la creencia de que estos ácidos nucleicos son capaces de evitar la actividad nucleasa a través de la protección de las proteínas o mediante el empaquetamiento en cuerpos apoptóticos. En otras palabras, a medida

40 que las células experimentan muerte celular o apoptosis, se producen cuerpos apoptóticos y los ácidos nucleicos fuera de las células se encapsulan dentro de una membrana del cuerpo apoptótico, reduciendo de ese modo la susceptibilidad de los ácidos nucleicos a las nucleasas. Sin embargo, existe la preocupación de que después de la extracción de sangre, los ácidos nucleicos se desasocian de algún modo de los cuerpos apoptóticos y se vuelven vulnerables a las nucleasas. Existe por lo tanto la necesidad de procesar las muestras de sangre que contienen los

45 ácidos nucleicos fuera de las células para que los ácidos nucleicos no se vean afectados por las nucleasas en todo el procedimiento para producir recuentos precisos de ácidos nucleicos fuera de las células para fines de diagnóstico.

Los inhibidores metabólicos se han empleado previamente para inhibir el metabolismo en las células. Por ejemplo, se han usado gliceraldehído, fluoruro de sodio y ATA para inhibir el metabolismo de la glucosa en las células sanguíneas. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.614.391, y 7.390.663. El uso de

50 conservantes de donantes de formaldehído para la conservación de células o tejidos o de conservación del ARN se ha descrito en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.196.182, 5.260.048, 5.459.073, 5.811.099, 5.849.517 y 6.337.189.

Una serie de documentos de patente abordan procedimientos de estabilización y/o identificación de ácidos nucleicos localizados dentro del plasma sanguíneo y sus aplicaciones de diagnóstico. Véase, generalmente, las patentes de

55 Estados Unidos Nos. 5.614.391, 5.985.572, 6.617.170, 6.630.301, 6.759.217, 6.821.789, 6.916.634, 6.939.671, 6.939.675, 7.208.275, 7.288.380, 7.569.350 y las publicaciones de patente de Estados Unidos Nos. 2008/0057502, 2008/0096217 y 2008/0261292. A pesar de lo anterior, sigue existiendo la necesidad por procedimientos de aislamiento y conservación de ARN fuera de las células que conserven el ARN fuera de las células sustancialmente

tal como existe en el momento de extracción de sangre en un esfuerzo por maximizar la cantidad de ácido nucleico fuera de las células recuperado de plasma sanguíneo y produce aislamiento confiable y resultados de diagnóstico.

La presente invención aborda la necesidad de un procedimiento eficaz y consistente para conservar y analizar una muestra de sangre por niveles elevados de ARN fuera de las células en plasma de la muestra de sangre, lo que inesperada y sorprendentemente da como resultado una inhibición a corto plazo del metabolismo (es decir, síntesis de ARN); fijación a largo plazo de las células sanguíneas de la muestra de sangre para evitar la filtración del ARN celular en el plasma; fijar el ARN celular que está dentro de las células sanguíneas para congelar (por ejemplo, inmovilizar) el patrón de expresión de proteínas de las células sanguíneas; y estabilizar y proteger el ARN que está en el plasma de las nucleasas y proteasas.

10 Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación contempla un procedimiento de cribado para la identificación de un estado de enfermedad, que comprende las etapas de: poner en contacto una muestra de sangre extraída que incluye una pluralidad de células sanguíneas con un agente protector del ARN plasmático (por ejemplo, ARNm); aislar el ARN extracelular de la muestra de sangre; y analizar (por ejemplo, por cantidad, calidad, o ambos) el ARN aislado por la presencia, ausencia o gravedad de un estado de enfermedad. El agente protector puede estar presente en una cantidad y durante un tiempo suficiente para que la síntesis de ARN se inhiba durante al menos dos horas. El agente protector puede estar presente en una cantidad tal que las células sanguíneas de la muestra de sangre extraída se fijen para evitar sustancialmente la fuga de ARN celular en el plasma. El agente protector puede estar presente en una cantidad tal que cualquier ARN celular que esté dentro de las células sanguíneas en el momento de la extracción de sangre se conserve sustancialmente para inmovilizar el patrón de expresión de proteínas de las células sanguíneas para que el patrón de expresión de proteínas permanezca sustancialmente igual que en el momento de la extracción de sangre. El agente protector puede estar presente en una cantidad tal que el ARN que está en el plasma esté sustancialmente estabilizado contra la degradación mediada por la acción combinada de nucleasas y proteasas.

El agente protector incluye uno o más agentes conservantes, y uno o más inhibidores de enzimas, y opcionalmente uno o más inhibidores metabólicos, o cualquier combinación de los mismos. Los uno o más agentes conservantes pueden incluir un liberador de formaldehído tal como uno seleccionado del grupo que consiste en: diazolidinil urea e imidazolidinil urea. Los uno o más inhibidores enzimáticos se pueden seleccionar del grupo que consiste en: pirocarbonato de dietilo, etanol, ácido aurintricarboxílico (ATA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), formamida, complejos de vanadil-ribonucleósidos, macaloides, heparina, hidroxilamina-oxígeno-ion cúprico, bentonita, sulfato de amonio, ditiotretol (DTT), beta-mercaptoetanol, cisteína, ditiogeritrol, clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina, proteinasa K y cualquier combinación de los mismos opcionalmente junto con gliceraldehído y fluoruro de sodio. Los uno o más inhibidores metabólicos se pueden seleccionar del grupo que consiste en: gliceraldehído, fosfato de dihidroxiacetona, gliceraldehído 3-fosfato, 1,3-bisfosfoglicerato, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, piruvato y glicerato dihidroxiacetato, fluoruro de sodio, $K_2C_2O_4$ y cualquier combinación de los mismos.

La concentración del agente conservante antes de la etapa de contacto puede ser al menos aproximadamente de 50 g/L. La concentración del agente conservante antes de la etapa de contacto puede ser inferior a aproximadamente 500 g/L. La concentración del agente conservante antes de la etapa de contacto puede ser de al menos aproximadamente 200 g/L. La concentración del agente conservante antes de la etapa de contacto puede ser inferior a aproximadamente 300 g/L. La concentración del agente conservante antes de la etapa de contacto puede ser una concentración a la cual se observa el entrecruzamiento de ácidos nucleicos y proteínas, como se indica mediante electroforesis en gel de agarosa.

La etapa de aislamiento puede incluir aislar el ácido nucleico del plasma de la muestra de sangre. Una o ambas etapas de aislamiento y análisis pueden producirse al menos 2 horas, 7 días o incluso 14 días después de extraer la muestra de sangre. Una o ambas etapas de aislamiento y análisis pueden ocurrir sin congelar la muestra de sangre (por ejemplo, a una temperatura más fría que aproximadamente $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (más preferiblemente, más fría que aproximadamente $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$)). La etapa de análisis, la etapa de aislamiento o ambas pueden incluir una etapa de poner en contacto el ácido nucleico con una enzima, un amplificador o ambos.

La etapa de contacto tiene lugar en un tubo de recogida de sangre en el que se extrae la muestra de sangre. La etapa de contacto puede tener lugar a medida que se extrae la muestra de sangre. La etapa de contacto puede ser suficiente para que después de un período de al menos 7 días desde el momento en que se toma la muestra de sangre, la cantidad de ARN fuera de las células presente en la muestra de sangre sea al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 100 % de la cantidad de ARN fuera de las células presente en la muestra de sangre en el momento en que se extrae la muestra de sangre. La etapa de contacto puede ser suficiente para que después de un período de al menos aproximadamente 7 días desde el momento en que se toma la muestra de sangre, la concentración de ARN fuera de las células con respecto al ácido nucleico total en la muestra de sangre presente sea al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, o al menos aproximadamente 50 veces la cantidad de ARN fuera de las células que estaría presente en ausencia de la etapa de contacto.

El agente protector puede incluir un inhibidor metabólico seleccionado del grupo que consiste en: gliceraldehído, fosfato de dihidroxiacetona, gliceraldehído 3-fosfato, 1,3-bisfosfoglicerato, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, piruvato y glicerato dihidroxiacetato, fluoruro de sodio, $K_2C_2O_4$ y cualquier combinación de los mismos. El agente de protección puede incluir un inhibidor de proteasa seleccionado del grupo que consiste en:

5 antipaína, aprotinina, quimostatina, elastatinal, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), APMSF, TLCK, TPCK, leupeptina, inhibidor de tripsina de soja, ácido indolacético (IAA), E-64, pepstatina, VdLPFFVdL, EDTA, 1,10-fenantrolina, fosforamodona, amastatina, bestatina, diprotina A, diprotina B, alfa-2-macroglobulina, inhibidor de tripsina de haba, inhibidor de la proteasa pancreática, ovostatina de clara de huevo, cistatina de clara de huevo y cualquier combinación en los mismos. El agente protector puede incluir un inhibidor de fosfatasa seleccionado del

10 grupo que consiste en: caliculina A, nodularina, NIPP-1, microcistina LR, tautomocina, ácido ocadaico, cantaridina, microcistina LR, ácido ocadaico, fostriecina, tautomocina, cantaridina, endotal, nodularina, ciclosporina A, complejos de FK 506/inmunoflina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, bpV(fen), defostatina, mpV(pic)DMHV, ortovanadato de sodio y cualquier combinación de los mismos.

Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 es una representación gráfica que muestra la concentración de glucosa presente en muestras de sangre en contacto con seis composiciones diferentes a lo largo del tiempo.

La Figura 2 es una representación gráfica que muestra las cantidades relativas de ARN fuera de las células presentes en cuatro muestras de sangre a lo largo del tiempo usando el número de copias de ARNr 18S como marcador donde un aumento en el número de copias de ARNr 18S es indicativo de lisis celular o aumento del metabolismo celular; se observa un gráfico de "agente conservante + inhibidor de nucleasa + inhibidor metabólico 1

20 y 2" que muestra una concentración constante de ARNr 18S que es indicativa de ARNm fuera de las células (no contaminado (a partir del ARNm celular) y protegido (de la degradación mediada por nucleasas).

La Figura 3 es una representación gráfica que muestra las cantidades relativas de ARN fuera de las células presentes en dos muestras de sangre a lo largo del tiempo utilizando el número de copias de RASSF1A como marcador.

25

Descripción detallada

En general, la descripción en este documento contempla un procedimiento de cribado para la identificación de la presencia de enfermedad que incluye la conservación y el aislamiento de ácidos nucleicos fuera de las células localizados dentro de una muestra de sangre. Una etapa de conservación única actúa para aumentar la cantidad de

30 ácidos nucleicos recuperables mejorando de este modo las capacidades de diagnóstico de los ácidos nucleicos fuera de las células.

La presente divulgación se refiere a un procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos usando un agente protector. El ácido nucleico es ARN fuera de las células, y puede estar en combinación con ADN, particularmente ADN fuera de las células. Las muestras a partir de las cuales se pueden aislar los ácidos nucleicos incluyen cualquier muestra de sangre. Los ácidos nucleicos fuera de las células pueden ser localizados dentro del plasma. El

35 procedimiento divulgado en este documento permite la conservación y el aislamiento eficiente del ARN fuera de las células (por ejemplo, extracelular) evitando la posible mezcla con ácidos nucleicos que se originan dentro de las células sanguíneas que entran en una muestra de sangre debido a lisis celular después de extracción de sangre.

El procedimiento de aislamiento mejorado de ácidos nucleicos fuera de las células a partir de una muestra de sangre comienza poniendo en contacto una muestra de sangre con un agente protector que contiene uno o más

40 ingredientes activos para mantener la integridad de los componentes dentro de la muestra. Los uno o más ingredientes activos pueden incluir un agente conservante. El agente conservante es una composición donante de formaldehído, y se selecciona del grupo que consiste en diazolidinil urea (DU), imidazolidinil urea (IDU) y cualquier combinación de los mismos.

La cantidad de agente conservante usado es generalmente de aproximadamente 50 hasta aproximadamente 500

45 gramos por litro. Por ejemplo, el agente conservante puede comprender de aproximadamente 200 hasta aproximadamente 300 gramos de DU por litro de solución salina regulada.

Como se usa a lo largo de las presentes enseñanzas, la composición del agente protector preferiblemente es sustancialmente no tóxica. Por ejemplo, los procedimientos de la presente invención (y composiciones usadas en

50 este documento) están libres de la adición y/o manejo por separado de cualquier concentración materialmente significativa (por ejemplo, menos de aproximadamente 1 % en peso, más preferiblemente menos de aproximadamente 2.000 partes por millón, más preferiblemente menos de aproximadamente 1.000 partes por millón, y aún más preferiblemente menos de aproximadamente 500 partes por millón) de formaldehído y/o paraformaldehído antes de cualquier contacto con una muestra de producto sanguíneo. Además, el agente protector

55 puede estar sustancialmente libre de sales de guanidinio, dodecilsulfato de sodio (SDS) o cualquier combinación de los mismos.

El agente protector contiene además uno o más inhibidores de nucleasa (por ejemplo, inhibidores enzimáticos) en una cantidad adecuada para evitar que la actividad de DNasa y/o RNasa disminuya la calidad y la cantidad (por ejemplo, en al menos aproximadamente 10 % en peso, y más preferiblemente al menos aproximadamente 50 % en peso) de ácidos nucleicos fuera de las células recuperables de la muestra de sangre en comparación con una muestra que no incluye un inhibidor de nucleasas. Los inhibidores de nucleasa que se seleccionan de uno o más de pirocarbonato de dietilo, etanol, ácido aurintricarboxílico (ATA), formamida, complejos de vanadil-ribonucleósidos, macaloides, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), proteinasa K, heparina, hidroxilamina-oxígeno-ion cúprico, bentonita, sulfato de amonio, ditiotreitól (DTT), beta-mercaptoetanol, cisteína, ditioeritrol, clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina, y cualquier combinación de los mismos. Más preferiblemente, los inhibidores de nucleasa que pueden usarse incluyen ácido aurintricarboxílico (ATA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), y cualquier combinación de los mismos. Los inhibidores de nucleasa preferidos se pueden unir a nucleasas (por ejemplo, RNasas) de modo que las nucleasas ya no son capaces de hacer contacto con el ARN fuera de las células, reduciendo así los efectos adversos de las nucleasas sobre la cantidad y calidad del ARN fuera de las células. Los uno o más inhibidores de nucleasas pueden estar presentes en una cantidad suficiente para evitar que la actividad nucleasa reduzca la cantidad de ARN fuera de las células recuperable en más de aproximadamente 15 %.

El agente protector también puede incluir uno o más inhibidores metabólicos en una cantidad adecuada para reducir el metabolismo celular dentro de una muestra de sangre. Los inhibidores metabólicos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a gliceraldehído, fosfato de dihidroxiacetona, gliceraldehído 3-fosfato, 1,3-difosfoglicerato, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, piruvato y glicerato dihidroxiacetato, fluoruro de sodio, $K_2C_2O_4$ y cualquier combinación de los mismos. Más preferiblemente, los uno o más inhibidores metabólicos usados pueden incluir fluoruro de sodio, gliceraldehído y cualquier combinación de los mismos. Los inhibidores metabólicos preferidos pueden reducir la degradación del ARN fuera de las células y también reducir la lisis celular de modo que el ARN celular no se entremezcle con ningún ARN fuera de las células. Este entremezclado de ARN fuera de las células y ARN celular puede reducir la precisión de cualquier medición de la cantidad de ARN fuera de las células en una muestra de sangre. Como ejemplo, en el caso de que la gravedad de un cáncer específico se pueda medir por la cantidad de ARN fuera de las células en una muestra de sangre, cualquier muestra que no se haya tratado para inhibir el metabolismo puede mostrar una cantidad inusualmente alta de ARN fuera de las células, a pesar de que gran parte de ese ARN fuera de las células se originó dentro de una o más células sanguíneas. Por lo tanto, el resultado de la prueba puede mostrar un falso positivo de aumento de la gravedad del cáncer cuando, de hecho, la cantidad real de ARN verdadero fuera de las células era baja, lo que representa un cáncer de gravedad reducida. Los uno o más inhibidores metabólicos pueden estar presentes en una cantidad suficiente para evitar que el metabolismo celular reduzca la precisión de cualquier medición de ARN fuera de las células en más de aproximadamente 15 %.

El agente protector también puede incluir uno o más compuestos inhibidores de proteasas que pueden limitar la síntesis de ARN. Tales compuestos inhibidores de la proteasa pueden incluir, pero no se limitan a antipaina, aprotinina, quimostatina, elastatinal, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), APMSF, TLCK, TPCK, leupeptina, inhibidor de la tripsina de soja, ácido indolacético (IAA), E-64, pepstatina, VdLPFFVdL, EDTA, 1,10-fenantrolina, fosforamodona, amastatina, bestatina, diprotina A, diprotina B, alfa-2-macroglobulina, inhibidor de tripsina de haba, inhibidor de la proteasa pancreática, ovostatina de clara de huevo, cistatina de clara de huevo y cualquier combinación de los mismos. Las combinaciones de inhibidores de proteasas, comúnmente denominadas "cóctel de inhibición de proteasa" por proveedores comerciales de tales inhibidores, también se pueden usar dentro del agente protector. Tales "cócteles" son generalmente ventajosos porque proporcionan estabilidad para una gama de proteínas de interés. Los inhibidores de proteasa preferidos pueden incluir aprotinina, EDTA, EGTA, PMSF y cualquier combinación de los mismos. Los uno o más compuestos inhibidores de la proteasa pueden estar presentes en una cantidad suficiente para evitar que la síntesis de ARN reduzca la precisión de cualquier medición de ARN fuera de las células en más de aproximadamente 15 %.

El agente protector puede incluir además uno o más inhibidores de fosfatasa que incluyen, pero no se limitan a, caliculina A, nodularina, NIPP-1, microcistina LR, tautomicina, ácido ocadaico, cantaridina, imidazol, microcistina LR, ácido ocadaico, fostriecina, tautomicina, cantaridina, endotal, nodularina, ciclosporina A, complejos de FK 506/inmunofilina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerato, bpV(fen), defostatina, mpV(pic)DMHV, ortovanadato de sodio y combinaciones de los mismos. Los cócteles inhibidores de fosfatasa también pueden incluirse dentro del agente de protección, ya que también proporcionan estabilidad para una amplia gama de proteínas. Los inhibidores de fosfatasa preferidos pueden incluir cantaridina, ortovanadato de sodio, imidazol y cualquier combinación de los mismos. Los uno o más compuestos inhibidores de fosfatasa pueden estar presentes en una cantidad suficiente para evitar una reducción en la precisión de cualquier medición de ARN fuera de las células en más de aproximadamente 15 %.

El agente protector puede incluir una o más poliaminas en una cantidad adecuada tal que sean capaces de unirse con cualquier ácido nucleico evitando de ese modo la degradación de los ácidos nucleicos. Las poliaminas que pueden añadirse incluyen, pero sin limitación, espermina, espermidina, putrescina, cadaverina y combinaciones de las mismas. Preferiblemente, las poliaminas usadas pueden incluir espermina y espermidina.

El contacto inicial de la muestra de sangre con el agente protector puede ser durante un tiempo suficiente para inhibir la lisis celular, la actividad nucleasa o cualquier combinación de los mismos. El contacto puede ocurrir durante

al menos aproximadamente 10 segundos, al menos aproximadamente 1 minuto, o al menos aproximadamente 2 minutos. El contacto puede ocurrir por períodos de tiempo más largos. Por ejemplo, el contacto puede comenzar sustancialmente en el mismo momento de la extracción de la sangre (por ejemplo, dentro de menos de aproximadamente 10 minutos de la extracción de la sangre) y puede durar hasta que se aislen, criben y/o prueben los ácidos nucleicos. La etapa de contacto también se puede emplear para proporcionar una muestra con una vida útil más larga. Por lo tanto, es posible que transcurra un lapso de tiempo de al menos aproximadamente 2 horas, más preferiblemente al menos aproximadamente 6 horas, al menos aproximadamente 24 horas, al menos aproximadamente 7 días o incluso al menos aproximadamente 14 días entre el momento de la extracción de la sangre (que puede ser sustancialmente al mismo tiempo con la etapa de puesta en contacto), y el tiempo de cualquier prueba o cribado de la muestra, y/o aislamiento de los ácidos nucleicos.

El agente protector puede comprender un agente activo en solución. Los disolventes adecuados incluyen agua, solución salina, dimetilsulfóxido, alcohol y cualquier mezcla de los mismos. La solución de agente protector comprende diazolidinil urea (DU) y/o imidazolidinil urea (IDU) en una solución salina regulada. La solución de agente protector comprende además EDTA y ATA. La solución de agente protector también puede incluir uno o más inhibidores metabólicos. La solución de agente protector puede contener solamente un fijador y puede estar sustancialmente libre de aditivos adicionales.

La cantidad de cualquier ingrediente activo dentro del agente protector puede ser generalmente de al menos aproximadamente 0,01 % en peso. La cantidad de cualquier ingrediente activo dentro del agente protector puede ser generalmente menor que aproximadamente 70 % en peso. El agente protector puede comprender al menos aproximadamente 10 % de diazolidinil urea. El agente protector puede comprender menos de aproximadamente 40 % de diazolidinil urea. El agente protector puede contener adicionalmente al menos aproximadamente 1 % de uno o más inhibidores enzimáticos (por ejemplo, inhibidores nucleasa) tales como EDTA y ATA. El agente protector puede contener menos de aproximadamente 30 % de uno o más inhibidores enzimáticos. El agente protector también puede contener al menos aproximadamente 1 % de uno o más inhibidores metabólicos. El agente protector puede contener menos de aproximadamente 20 % de uno o más inhibidores metabólicos.

La cantidad de agente conservante (por ejemplo, fijador) relativa a la cantidad de cualquier inhibidor enzimático (por ejemplo, EDTA y ATA) es preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 partes (más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 partes) en peso de fijador hasta aproximadamente 2 partes en peso de inhibidores enzimáticos. La cantidad de fijador (por ejemplo, el liberador de formaldehído) con respecto a la cantidad de uno o más inhibidores metabólicos es preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 partes (más preferiblemente de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 partes) en peso de fijador hasta aproximadamente 1 parte en peso de inhibidores metabólicos. La cantidad de agente protector dentro de un tubo antes de la extracción de sangre puede ser de al menos aproximadamente 200 g/litro. La cantidad de agente protector dentro de un tubo antes de la extracción de sangre puede ser inferior a aproximadamente 1.000 g/litro.

La combinación de uno o más agentes conservantes (por ejemplo, los liberadores de formaldehído), uno o más inhibidores enzimáticos y opcionalmente uno o más inhibidores de nucleasa y uno o más inhibidores metabólicos dentro del agente protector da como resultado una capacidad mejorada para mantener la cantidad y la calidad del ARN fuera de las células dentro de una muestra de sangre y se usa de una manera y cantidad tal que se obtienen dichos resultados. Estos resultados se consideran inesperados y superiores a los resultados obtenidos con el uso solamente del agente conservante, solamente el inhibidor enzimático, solamente el inhibidor de nucleasa, solamente el inhibidor metabólico o cualquier combinación que incluye dos del agente conservante, el inhibidor enzimático, el inhibidor de nucleasa, o el inhibidor metabólico. Por lo tanto, puede apreciarse que se produce un efecto sinérgico cuando se combinan un agente conservante, un inhibidor enzimático, un inhibidor nucleasa y un inhibidor metabólico.

El agente protector puede estar ubicado dentro de un dispositivo especializado, en el que el agente protector ya está presente en el dispositivo antes de la adición de la muestra de sangre, tal como el divulgado en la publicación de patente de Estados Unidos No. 2004/0137417. Más preferiblemente, el dispositivo es un tubo de recogida evacuado. El tubo puede estar hecho preferiblemente de un material transparente que también resista la adherencia de las células dentro de una muestra dada. La pared interior del tubo puede estar recubierta o bien tratada para modificar sus características superficiales, por ejemplo, para volverla más hidrófoba y/o más hidrófila, en la totalidad o en una parte de su superficie. El tubo puede tener una pared interior flameada, sometida a descarga en corona, tratada con plasma, recubierta o tratada de otra manera. El tubo puede tratarse poniendo en contacto la pared interior con una sustancia de modo que los ácidos nucleicos de interés resistan la adhesión a las paredes del tubo. La superficie del tubo se puede modificar para proporcionar una doble funcionalidad que proporcione simultáneamente un equilibrio apropiado de hidrofiliidad e hidrofobicidad deseadas, para permitir la recogida de sangre, la dispersión de los conservantes de la presente invención y la resistencia de la adhesión de ácidos nucleicos a la pared interna de un tubo de recogida de sangre. Por lo tanto, es posible que cualquier recubrimiento sea un recubrimiento polimérico con la adición de grupos funcionales que incluye un primer polímero y una o más segundas funciones monoméricas y/o poliméricas que son diferentes (por ejemplo, químicamente diferentes) del primer polímero. El recubrimiento puede incluir uno o más copolímeros (por ejemplo, copolímero de bloque, copolímero de injerto, o de otro tipo). Por ejemplo, puede incluir un copolímero que incluye una primera porción polimérica hidrófoba y una segunda porción

polimérica hidrófila. El recubrimiento puede ser un recubrimiento de base acuosa. El recubrimiento puede incluir opcionalmente un promotor de adhesión. El recubrimiento se puede aplicar de cualquier manera adecuada, se puede rociar, sumergir, esparcir con una esponja o aplicar de otro modo sobre una parte o en todo el interior del tubo de recogida de sangre. El recubrimiento también se puede aplicar en presencia de calor. Preferiblemente, cualquier recubrimiento aplicado a la pared interna de un tubo de recogida de sangre formará una unión suficientemente tenaz con el vidrio (por ejemplo, vidrio de borosilicato) u otro material (por ejemplo, material polimérico) del tubo para que no se erosione o sea removido de otro modo de la pared interior. Los ejemplos de recubrimientos poliméricos adecuados pueden incluir polímeros que contienen silicio (por ejemplo, silanos, siloxanos, o de otro tipo); poliolefinas tales como polietileno o polipropileno; tereftalato de polietileno; polímeros fluorados (por ejemplo, politetrafluoroetileno); cloruro de polivinilo, poliestireno o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de enseñanzas que se pueden emplear para recubrir un interior de un tubo de recogida de sangre se pueden encontrar en las patentes de Estados Unidos Nos. 6.551.267, 6.077.235, 5.257.633 y 5.213.765.

La composición incluida en el tubo puede estar presente en una cantidad suficiente para conservar la morfología celular y evitar la degradación celular mientras que también evita la actividad nociva de DNasa y RNasa dentro de los ácidos nucleicos fuera de las células. Sin embargo, la cantidad también puede ser lo suficientemente pequeña para que se evite sustancialmente cualquier dilución consecuente de la muestra, y los ácidos nucleicos fuera de las células en la muestra no se diluyan materialmente. Una muestra de sangre se puede fijar simultáneamente cuando se extrae en el tubo especializado. El tubo también se puede recubrir sobre una pared exterior con un recubrimiento protector (por ejemplo, una barrera de contención que ayuda a controlar la fragmentación en pedazos de vidrio) tal como el descrito en la patente de los Estados Unidos No. 7.419.832.

Además, el agente protector puede estar en un estado altamente viscoso o sustancialmente sólido, de modo que (por ejemplo) se puede usar efectivamente como un recubrimiento en estado sustancialmente sólido. Se pueden encontrar ejemplos de dichos conservantes en estado sustancialmente sólido en la publicación de patente de los Estados Unidos en trámite junto con la presente de propiedad común 2010-0167271. Se pueden llevar a cabo técnicas de eliminación de líquidos sobre el agente protector con el fin de obtener un agente protector sustancialmente en estado sólido. Las condiciones de eliminación del líquido pueden ser preferiblemente tales que den como resultado la eliminación de al menos aproximadamente 50 % en peso, más preferiblemente al menos aproximadamente 75 % en peso, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 85 % en peso de la cantidad original del líquido dispensado como agente de protección. Las condiciones de eliminación de líquido pueden ser preferiblemente tales que den como resultado la eliminación de suficiente líquido de modo que la composición resultante esté en forma de una película, gel u otra capa sustancialmente sólida o altamente viscosa; por ejemplo, puede dar como resultado un recubrimiento sustancialmente inmóvil (preferiblemente un recubrimiento que puede volver a disolverse o bien dispersarse tras el contacto con una muestra de producto sanguíneo). Por lo tanto, las condiciones de eliminación de líquido pueden ser preferiblemente tales que den como resultado un material que al contacto con la muestra considerada (por ejemplo, una muestra de sangre materna) el agente protector se dispersará en la muestra y conservará sustancialmente los componentes (por ejemplo, ácidos nucleicos fuera de las células) en la muestra. Las condiciones de eliminación de líquido pueden ser preferiblemente tales que dan como resultado una composición restante que está sustancialmente libre de cristalinidad; tiene una viscosidad que es suficientemente alta para que la composición restante sea sustancialmente inmóvil a temperatura ambiente (por ejemplo, no muestra ningún flujo detectable en forma visible a simple vista) cuando se mantiene en un dispositivo de almacenamiento a temperatura ambiente en una inclinación de al menos aproximadamente 45° durante al menos una hora); o ambos. A este respecto, como se enseña en la solicitud anterior, también se puede emplear un colorante.

Como se discutió en el presente documento, poner en contacto una muestra de sangre o plasma con el agente protector permite que la muestra se almacene durante un período de tiempo antes de aislar y analizar los ácidos nucleicos. Se puede extraer una muestra de sangre o plasma en un lugar (por ejemplo, un establecimiento de atención médica), ponerse en contacto con el agente protector y luego transportarla a un lugar remoto diferente (por ejemplo, un laboratorio, tal como uno que se encuentra a una distancia de al menos aproximadamente 1 km, 2 km, 3 km o más lejos del sitio de extracción) para el procedimiento de aislamiento y prueba de ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos pueden aislarse a partir de la muestra de sangre o plasma y probarse en la ubicación remota y la información de diagnóstico resultante puede informarse en el sitio original de extracción de sangre. El procedimiento de aislamiento de ácido nucleico puede realizarse en una ubicación remota y los datos resultantes pueden analizarse para identificar la presencia, ausencia o gravedad relativa de un estado de enfermedad en una tercera ubicación. Alternativamente, los resultados del procedimiento de aislamiento de ácidos nucleicos fuera de las células pueden enviarse nuevamente al sitio inicial de la extracción de sangre y analizarse allí. La información de diagnóstico resultante puede enviarse luego a una tercera ubicación o volver a la ubicación remota o al sitio inicial de extracción de sangre.

En cualquier momento después del contacto inicial de la muestra de sangre o plasma con el agente protector, la muestra puede tratarse para aislar los ácidos nucleicos fuera de las células localizados dentro de la sangre. Los ácidos nucleicos se pueden aislar usando cualquier procedimiento de aislamiento que incluya los procedimientos divulgados en la publicación de patente de Estados Unidos de propiedad común No. 2009/0081678, incorporada aquí como referencia. El agente protector puede ayudar a mantener la integridad de las membranas de las células sanguíneas (por ejemplo, las membranas celulares permanecen intactas), de modo que los ácidos nucleicos no se

liberan en la muestra desde las células sanguíneas que tienen las membranas celulares rotas. Cualquier ruptura de membrana celular puede hacer que los ácidos nucleicos celulares entren en el plasma haciendo más difícil el aislamiento de los ácidos nucleicos fuera de las células (por ejemplo, identificación y separación de los ácidos nucleicos fuera de las células de los ácidos nucleicos que se originan dentro de una célula sanguínea). El agente de fijación puede actuar para evitar la lisis celular de manera que las células sanguíneas permanezcan intactas y sustancialmente todos los ácidos nucleicos celulares permanezcan dentro de la célula para evitar la contaminación indeseada de los ácidos nucleicos fuera de las células.

Después de que se hayan aislado los ácidos nucleicos fuera de las células, se pueden analizar para identificar la presencia, ausencia o gravedad de un estado de enfermedad que incluye, pero no se limita a una multitud de cánceres. Los procedimientos de la presente memoria contemplan por lo tanto además una etapa de análisis del ácido nucleico. El análisis de los ácidos nucleicos se puede realizar usando cualquier procedimiento de análisis de ácido nucleico que incluya, pero no se limite a, reacción en cadena de polimerasa (PCR), reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (Q-PCR), electroforesis en gel, electroforesis capilar, espectrometría de masas, detección de fluorescencia, espectrometría ultravioleta, hibridación de ADN, reacción en cadena de la polimerasa específica de alelos, montaje de ciclado de polimerasa (PCA), reacción en cadena de la polimerasa asimétrica, lineal después de la reacción en cadena de la polimerasa exponencial (LATE-PCR), amplificación dependiente de helicasa (HDA), reacción en cadena de la polimerasa de inicio en caliente, reacción en cadena de polimerasa específica entre secuencias (ISSR), reacción en cadena de la polimerasa inversa, reacción en cadena de la polimerasa mediada por ligación, reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación (MSP), reacción en cadena de polimerasa múltiplex, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la polimerasa en fase sólida, o cualquier combinación de las mismas.

La presente divulgación se refiere a un procedimiento para aislar y analizar el ARN fuera de las células del plasma. El procedimiento se puede realizar en una sola muestra o en múltiples muestras simultáneamente (por ejemplo, en una placa de múltiples pozos). El procedimiento incluye poner en contacto una muestra de plasma con un agente protector. El agente protector puede incluir uno o más ingredientes activos tal como se discutió anteriormente, de modo que las células sanguíneas permanezcan intactas durante todo el procedimiento de extracción de la sangre y el aislamiento del ARN. El agente protector incluye uno o más inhibidores de RNasa o enzimáticos y puede incluir uno o más inhibidores metabólicos para mantener la integridad estructural del ARN. Después de poner en contacto la muestra de sangre con el agente protector, la muestra puede centrifugarse para separar el plasma. El sedimento celular puede entonces descartarse. Alternativamente, al poner en contacto una muestra de sangre con el agente protector, la muestra de sangre no requiere necesariamente procesamiento inmediato y puede almacenarse durante hasta aproximadamente 14 días a temperatura ambiente. Por lo tanto, las invenciones en este documento contemplan una o más etapas de almacenamiento y/o bien esperar un período relativamente prolongado desde el momento de la extracción de la sangre y/o el contacto hasta el momento de cribado, prueba u otro análisis. Una vez que se procesa la muestra, se puede agregar una concentración apropiada de sal y alcohol para precipitar el material que contiene ARN. A continuación, puede añadirse un compuesto orgánico u otro compuesto tal como un derivado de fenol o similar para eliminar cualquier contaminante de proteína restante. Cualquier contaminante de proteína que aún permanezca puede eliminarse mediante la adición de cantidades adicionales de un compuesto orgánico u otro compuesto tal como un derivado de fenol o similar. Después de la centrifugación, se puede agregar etanol y la muestra se puede centrifugar de nuevo. Cualquier líquido remanente puede eliminarse de la muestra, por lo que solamente quedará el ARN. El producto final de ARN aislado puede entonces ponerse en contacto con un regulador.

También puede ocurrir incubación. Por ejemplo, la incubación puede ocurrir en hielo o a cualquier temperatura entre -30°C y 70°C. Una muestra puede incubarse a aproximadamente -20°C. Una muestra también se puede almacenar a temperatura ambiente y, por lo tanto, sustancialmente libre de cualquier congelación tras extraer sangre.

Preferiblemente, la centrifugación ocurre a velocidades de aproximadamente 500 hasta aproximadamente 15.000 rpm. La centrifugación puede ocurrir a aproximadamente 1.000 hasta 13.000 rpm. La centrifugación se puede realizar a una temperatura de aproximadamente 1-20° C. La centrifugación se puede realizar a una temperatura de aproximadamente 4-9°C.

Ejemplo 1

Se extraen muestras de sangre del mismo donante en seis tubos de recogida de sangre separados (tubo 1 hasta el tubo 6). El tubo 1 contiene solamente EDTA. El tubo 2 contiene DU y EDTA. El tubo 3 contiene DU, EDTA y ATA. El tubo 4 contiene DU, EDTA, ATA y gliceraldehído. El tubo 5 contiene DU, EDTA, ATA y fluoruro de sodio. El tubo 6 contiene DU, EDTA, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio. Todos los tubos se almacenan a temperatura ambiente y se extraen alícuotas de 1 mL de cada tubo a las 1,5, 8, 24, 48, 72 y 96 horas. Los niveles de glucosa en sangre de cada muestra se miden utilizando un medidor de glucosa en sangre YSI disponible a través de YSI Life Sciences (Yellow Springs, OH). La concentración de glucosa en sangre de las muestras del tubo 6 mantuvo niveles de glucosa relativamente consistentes durante el período de prueba, lo que indica que la combinación de EDTA, DU, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio proporcionaron niveles reducidos de metabolismo celular. Los resultados de este ejemplo se muestran en un formato gráfico en la Figura 1.

Ejemplo 2

Se extraen cuatro muestras de sangre del mismo donante en cuatro tubos de recogida de sangre separados, el tubo A al tubo D. El tubo A contiene DU, EDTA, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio. El tubo B contiene DU, EDTA y ATA. El tubo C contiene DU y EDTA. El tubo D contiene solamente EDTA. Todos los tubos se almacenan a temperatura ambiente y se extraen alícuotas de 1 mL de sangre de cada tubo el día 0, día 1, día 2 y día 3 y se separa el plasma. Todas las muestras se centrifugan a 800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente para separar el plasma. El plasma se transfiere luego a tubos nuevos y se centrifuga a 1.500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El ARN circulante libre se purifica usando el kit QIAamp MinElute Virus Spin disponible de Qiagen, Inc. (Valencia, CA). El ARN se extrae de cada muestra de plasma. Las muestras luego se amplifican por PCR en tiempo real (usando reactivos de RT-PCR TaqMan® disponibles en Applied Biosystems, Foster City, California) para identificar el número de copias de ARNr 18S por mL de plasma. Los resultados mostraron un porcentaje relativo consistente del número de copias de ARNr 18S por mL de plasma (aproximadamente 0 %) en cada medición, indicando poca o ninguna presencia de ARN celular como resultado de lisis celular o aumento del metabolismo celular en las muestras de plasma que se originan en el tubo A (que contiene DU, EDTA, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio). El número de copias de ARNr 18S por mL de plasma mostró niveles elevados en cada medición en aquellas muestras originadas en los tubos B, C y D, lo que indica un aumento en la cantidad de ARN celular presente como resultado de la lisis celular o aumento del metabolismo celular. Los resultados de este ejemplo se muestran en un formato gráfico en la Figura 2.

Ejemplo 3

Se extraen muestras de sangre del mismo donante en dos tubos de recogida de sangre separados. El primer tubo contiene DU, EDTA, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio. El segundo tubo contiene solamente EDTA. Ambos tubos se almacenan a temperatura ambiente y se extraen alícuotas de 1 mL de sangre de cada tubo el día 0, el día 1, el día 2, el día 7 y el día 8, y se separa el plasma. Todas las muestras se centrifugan a 800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente para separar el plasma. El plasma se transfiere a tubos nuevos y se centrifuga a 1.500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El ARN circulante libre se purifica usando el kit QIAamp MinElute Virus Spin disponible de Qiagen Inc. (Valencia, CA). El ARN se extrae de cada muestra de plasma. Las muestras se amplifican luego mediante PCR en tiempo real (usando reactivos de RT-PCR TaqMan® disponibles en Applied Biosystems, Foster City, California) para identificar fragmentos de genes de β -globina y RASSF1A dentro del plasma. Los resultados mostraron un porcentaje relativo consistente de genes RASSF1A por mL de plasma en cada medición, lo que indica una pequeña disminución de la presencia de ARN en las muestras de plasma originadas en el primer tubo (que contiene DU, EDTA, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio). Los genes RASSF1A por mL de plasma mostraron niveles disminuidos en cada medición en aquellas muestras que se originaron en el tubo que contenía solamente EDTA, lo que indica una disminución en la cantidad de ARN fuera de las células presente a lo largo del tiempo. Los resultados de este ejemplo se muestran en un formato gráfico en la Figura 3.

Los ejemplos 1, 2 y 3 anteriores demuestran un efecto sinérgico inesperado que ocurre solamente en muestras de sangre en contacto con un fijador, uno o más inhibidores enzimáticos (por ejemplo, inhibidores de nucleasa) y uno o más inhibidores metabólicos o más específicamente, por un agente protector que incluye DU, EDTA, ATA, gliceraldehído y fluoruro de sodio. Las muestras de sangre puestas en contacto solamente con un fijador, solamente un inhibidor enzimático, solamente un inhibidor metabólico o cualquier combinación que incluya menos que todos los componentes anteriores no demuestran la capacidad de mantener la integridad de las células sanguíneas o la integridad de los ácidos nucleicos. El efecto combinado del DU, EDTA, ATA, gliceraldehídos y fluoruro de sodio excede con creces cualquier expectativa basada en el efecto, o la falta de éste, del DU, EDTA, ATA, gliceraldehídos o fluoruro de sodio utilizados solos.

Se apreciará que pueden emplearse concentrados o diluciones de las cantidades aquí citadas. En general, las proporciones relativas de los ingredientes enumerados seguirán siendo los mismos. Así, a modo de ejemplo, si las enseñanzas requieren 30 partes en peso de un Componente A, y 10 partes en peso de un Componente B, el experto en la materia reconocerá que tales enseñanzas también constituyen una enseñanza del uso del Componente A y Componente B en una relación relativa de 3:1. Las enseñanzas de concentraciones en los ejemplos pueden variarse dentro de aproximadamente el 25 % (o más) de los valores establecidos y se esperan resultados similares. Además, tales composiciones de los ejemplos se pueden emplear con éxito en los presentes procedimientos para aislar ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN fuera de las células).

Se apreciará que lo anterior es solamente a modo de ilustración. Se pueden emplear otros ingredientes en cualquiera de las composiciones descritas aquí, según se desee, para lograr las características resultantes deseadas. Los ejemplos de otros ingredientes que se pueden emplear incluyen antibióticos, anestésicos, antihistamínicos, conservantes, tensoactivos, antioxidantes, ácidos biliares no conjugados, inhibidores de moho, ácidos nucleicos, ajustadores de pH, ajustadores de la osmolaridad o cualquier combinación de los mismos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de estabilización de ARN fuera de las células dentro de una muestra de sangre extraída para el análisis que comprende extraer la muestra de sangre en un tubo de recogida de sangre que comprende:
 - a. de 0,5 % a 20 % en peso de un inhibidor de nucleasa seleccionado de uno o más de pirocarbonato de dietilo, etanol, ácido aurintricarboxílico (ATA), formamida, complejos de vanadil-ribonucleósidos, macaloides, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), proteinasa K, heparina, hidroxilamina-oxígeno-ion cúprico, bentonita, sulfato de amonio, ditioneitol (DTT), beta-mercaptoetanol, cisteína, ditioeritrol, y clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina;
 - b. de 20 % a 30 % en peso de un agente conservante, en el que el agente conservante se selecciona de diazolidinil urea y/o imidazolidinil urea.
- 5 2. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la composición incluye uno o más inhibidores enzimáticos.
- 10 3. Un procedimiento según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la composición incluye EDTA.
4. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición incluye gliceraldehído.
- 15 5. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición incluye fluoruro de sodio.
6. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición incluye de 20 % a 30 % en peso de diazolidinil urea.
- 20 7. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición incluye de 20 % a 30 % en peso de diazolidinil urea, 0,05 a 1,5 % en peso de fluoruro de sodio, 1 a 8 % en peso de gliceraldehído, 5 a 15 % en peso de EDTA y 0,5 % a 2,5 % en peso de ácido aurintricarboxílico.
- 25 8. Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se extrae una muestra de sangre y se pone en contacto con la composición mediante lo cual después de un período de al menos 7 días, la cantidad de ácido nucleico fuera de las células presente en la muestra de sangre es al menos el 90 % de la cantidad de ácido nucleico fuera de las células presente en la muestra de sangre en el momento en que se extrae la muestra de sangre.

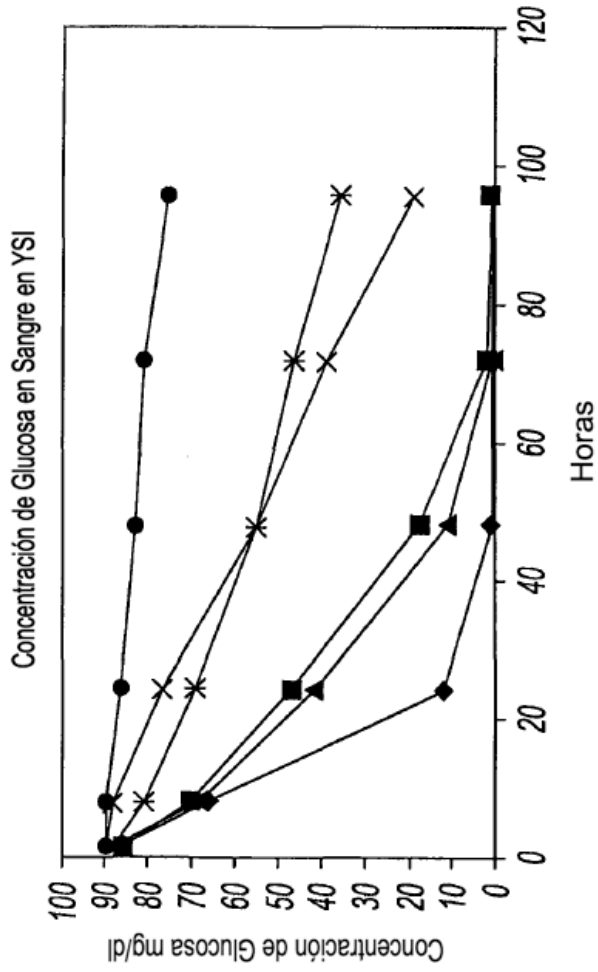
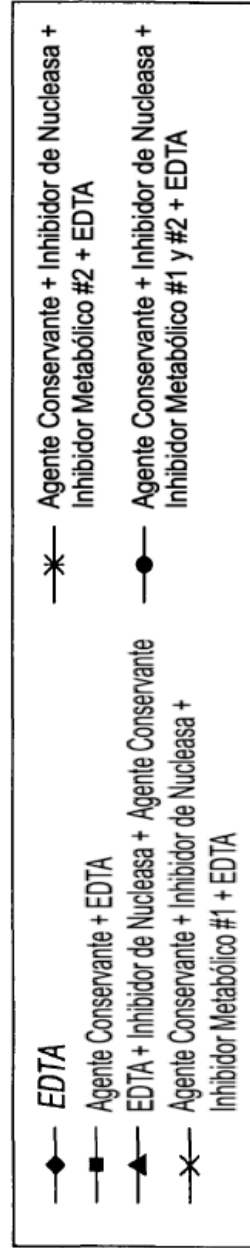


Fig-1



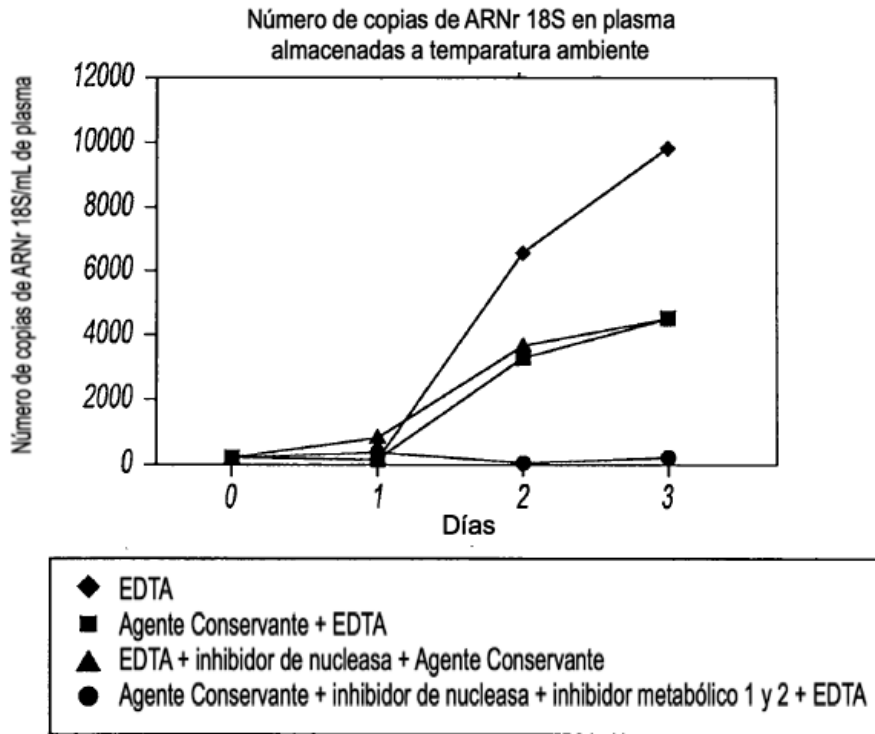


Fig -2

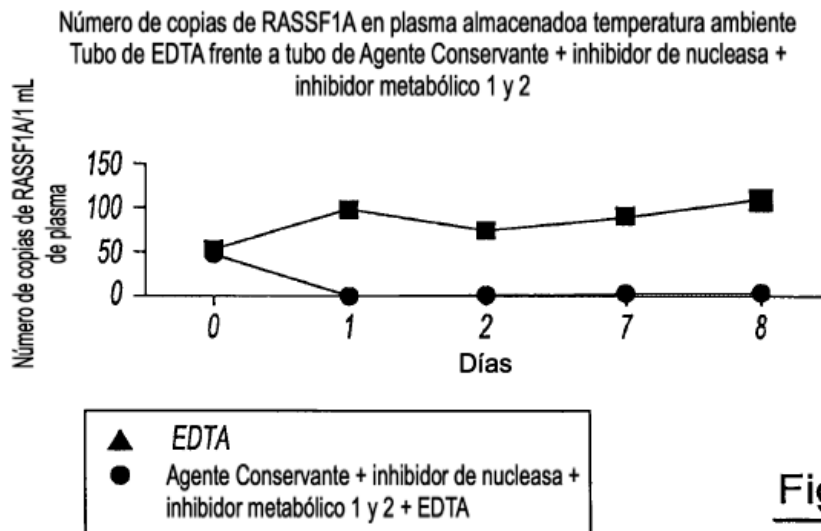


Fig -3