

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 684 582**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029198**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14144682**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14763797 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2970878**

54 Título: **Métodos y reactivos para mantener la viabilidad de células cancerosas en tejido eliminado quirúrgicamente**

30 Prioridad:
15.03.2013 US 201361798627 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2018

73 Titular/es:
**TRUCKEE APPLIED GENOMICS, LLC (100.0%)
460 Bush Street
San Francisco, CA 94108, US**

72 Inventor/es:
BAKER, TONY K.

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 684 582 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

Métodos y reactivos para mantener la viabilidad de células cancerosas en tejido eliminado quirúrgicamente

CAMPO

5 Esta invención pertenece a métodos para generar reactivos y a la composición de reactivos para la estabilización, preservación y viabilidad de tejido canceroso que se ha extirpado quirúrgicamente.

FONDO

10 La recogida de tejido quirúrgico para el análisis de patología para detectar células cancerosas de tejido extirpado ha sido la práctica estándar en el diagnóstico de cáncer durante décadas. Los protocolos actuales para la recogida de muestras de tejido requieren que el tejido extirpado sea recogido y colocado en una solución de formalina, y luego sea transportado al laboratorio de patología para su tinción y análisis. Desgraciadamente, la formalina se fija a las células (p. ej., mata las células) y en el proceso provoca cambios significativos en la integridad celular que produce problemas con la capacidad de realizar con precisión pruebas genómicas (análisis de ARN, ARNm y de biomarcadores de proteínas y de expresión génica).

15 La tecnología molecular tal como las pruebas genómicas con tecnología de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), ha evolucionado hasta el punto de que determinados cánceres pueden combinarse con quimioterapias específicas que han demostrado responder a determinados patrones de expresión génica encontrados en el células cancerosas. Por lo tanto, el ser capaz de obtener patrones precisos de expresión génica de las células cancerosas extirpadas de un paciente permite una atención médica personalizada diseñando quimioterapia individualizada y otros tratamientos. Este es un cambio muy importante en los paradigmas de tratamiento y representará el estándar de cuidado en un futuro cercano.

20 Muestras de tejido canceroso que se han conservado en formalina no son muestras de tejido viables para completar los análisis de expresión génica. Una razón por la que la formalina no es un buen reactivo para lograr el análisis de la expresión génica en muestras de tejido es que la formalina provoca la reticulación lenta de proteínas en una red de malla, y las proteínas diana valiosas pueden destruirse mediante el proceso de formalina, ya que no están protegidas de la degradación.

25 Además, a medida que la formalina penetra en la muestra de tejido, se produce la muerte celular (apoptosis). Las células cancerosas son únicas, ya que tienen una apoptosis pre-programada metabólica, por lo que la apoptosis acelerada se produce en formalina. A medida que las células en la muestra de tejido mueren, un subconjunto de la población total de células se lisa y libera una amplia gama de enzimas reguladoras internas que, además, provocan la muerte celular acelerada. Un cierto número de estas enzimas degradará o destruirá ácidos nucleicos diana ADN, ARN, ARNm, proteínas reguladoras y biomarcadores asociados utilizados en el análisis genómico molecular. Durante el proceso de fijación, aunque que la formalina mata las células en la muestra de tejido, la expresión génica puede volverse errática y la expresión genómica de genes críticos puede volverse poco expresada o sobre-expresada, dando valores inexactos de la expresión de determinados genes de cáncer. Este es un problema importante cuando las decisiones de quimioterapia se basan en los niveles de ARNm específico de los genes seleccionados. Por lo tanto, las pruebas genómicas precisas de las células cancerosas fijadas en formalina no son posibles en la actualidad.

30 También se debe señalar que la fijación de las proteínas y las células en una muestra de tejido con formalina tarda aproximadamente 48 horas en producirse. Hacer que el proceso de formalina no sea muy exacto para determinar cuál es la expresión genética en el momento de la recogida de tejido de un paciente.

35 En general, la utilidad científica de los datos genéticos obtenidos de la fijación de tejidos está directamente relacionada con la calidad del tejido y la utilidad de ese tejido para las pruebas genómicas. Actualmente, la fijación con formalina no es muy útil para obtener información de expresión génica precisa. Por lo tanto, existe la necesidad de reactivos para fijar muestras de tejido, de modo que la muestra recogida comprenda marcadores de expresión génica precisa para pruebas genéticas.

También existe la necesidad de reactivos de fijación de muestras de tejido que no sean tan peligrosos como formalina. Desgraciadamente, formalina conlleva un riesgo significativo de cáncer para los usuarios, así como importantes regulaciones estatales y federales para el uso y la eliminación de los productos que contienen formalina.

50 La presente invención describe métodos para fabricar reactivos y la composición de reactivos que permiten la recogida de tejido canceroso extirpado quirúrgicamente de un paciente, en que la información celular genética de las células cancerosas en la muestra de tejido se mantiene en un estado viable, haciendo que la muestra de tejido sea adecuada para el análisis de expresión génica.

El documento US 2010/003748 A1 (Baker) describe composiciones y métodos para estabilizar una célula, composición que pueden incluir un quelante, un componente potenciador de un quelante, una base (p. ej., una base purina o una base pirimidina) y, opcionalmente, un inhibidor de proteasa y/o un cosmótopo. El documento US 2010/086924 (Donner et al.) describe el uso de tetraetilenglicol-dimetil-éter para adsorber ácidos nucleicos a fases sólidas tales como aquellas con superficies de sílice. El documento US 2011/165611 (Li et al.) describe pequeñas sondas permeables para la membrana que comprenden un sustrato de caspasa 3, un colorante fluorogénico y un radionucleótido, para representar en imágenes la apoptosis in vivo. La sonda de doble modalidad se puede escindir por parte de caspasa tras exposición a células apoptóticas, permitiendo la representación en imágenes de actividades de caspasa 3 y 7, utilizando técnicas de formación de imágenes tanto ópticas como nucleares. Rouet-Benzineb et al., J. Biol Chem, 279(16): 16495-502, describe que lecitina contrarresta la apoptosis inducida por butirato de sodio en células HT-29 de cáncer de colon humanas a través de señalización de NF-KB. El documento US 2011/130305 A1 (Patton et al.) describe colorantes y composiciones que son útiles en la detección y la monitorización de agregación de proteínas, estudios cinéticos de agregación de proteínas, análisis de placas neurofibrilares, evaluación de la estabilidad de formulación de proteínas, ensayo de desplazamiento de la estabilidad térmica de proteínas y análisis de la actividad de chaperona molecular. Estos colorantes y composiciones son también útiles como sondas en la detección de ácidos nucleicos y proteínas.

SUMARIO

La presente invención se refiere a un reactivo para una muestra de tejido canceroso extirpado quirúrgicamente para permitir el análisis de la expresión génica, comprendiendo el reactivo los componentes de al menos un caótopo; al menos un cosmótopo; un quelante; un tampón; un sustrato de apoptosis, y un modulador metabólico; en donde el sustrato de apoptosis es leptina; y en donde el al menos un cosmótopo es α,α -trehalosa. La presente invención se refiere, además, a un método de producir un reactivo para la estabilización, conservación y viabilidad de tejido canceroso que ha sido quirúrgicamente extirpado, comprendiendo el método proporcionar al menos un caótopo; proporcionar al menos un cosmótopo; proporcionar un quelante; proporcionar un tampón; proporcionar un sustrato de apoptosis; proporcionar un modulador metabólico; y mezclar el caótopo, cosmótopo, quelante, tampón, sustrato de apoptosis y el modulador metabólico en un orden específico para permitir el análisis de la expresión génica de la muestra de tejido canceroso extirpado quirúrgicamente dispuesta en el reactivo; en donde el sustrato de apoptosis es leptina; y en donde el al menos un cosmótopo es α,α -trehalosa.

La presente invención describe nuevos métodos para producir un reactivo de viabilidad celular para muestras de tejido tales como muestras de biopsia, que permite el análisis de la expresión génica de las células en la muestra.

En realizaciones de los métodos para producir el reactivo para muestras de tejido, el sustrato de apoptosis es un sustrato de apoptosis de células cancerosas, y la muestra de tejido es un tejido canceroso extirpado quirúrgicamente.

En la mayoría de las realizaciones de los métodos de la invención, las concentraciones finales del caótopo son de aproximadamente 0,1 molar a aproximadamente 2 molar, el cosmótopo es de aproximadamente 0,1 molar a aproximadamente 2 molar, el quelante es de aproximadamente 0,1 molar a aproximadamente 2 molar, y el sustrato de apoptosis es de aproximadamente 0,001 molar a aproximadamente 0,5 molar en el reactivo para muestras de tejido.

En determinadas realizaciones de los métodos de la invención, el caótopo se selecciona del grupo que consiste en SCN⁻ (tiocianato de sodio), H₂PO₄⁻, HCO₃⁻, I⁻, Cl⁻, NO₃⁻, NH₄⁺, Cs, K⁺, (NH₄)C⁺ guanidinio, todas las sales de guanidinio, Br o Rb.

En realizaciones del método de preparación del reactivo, el al menos un cosmótopo es α,α -trehalosa. Cosmótopos adicionales se pueden seleccionar del grupo que consiste en glicerol, trimetilamina N-óxido, ectoína, 3-dimetilsulfoniopropionato, glucosa, dextrano o D-lactosa.

En algunas realizaciones, el quelante se selecciona del grupo que consiste en EDTA, EGTA o BABTA.

En algunas realizaciones de los métodos de la invención, el tampón se selecciona del grupo que consiste en BIS-TRIS, BIS-TRIS propano, HEPES, sal sódica HEPES, MES, sal sódica MES, MOPS, sal sódica MOPS, sal sódica o tampón fosfato de sodio (monobásico, PO₄ tribásico).

En el método de la invención, el sustrato de apoptosis es leptina. Sustratos de apoptosis adicionales se pueden seleccionar del grupo que consiste en DMSO, glicina beatina, citrato de potasio, trimetilamina, prolina, NDSB 195, ML-arginina, xilitol, selenito de sodio, NDSB 201, CuCl₂ o CTAB.

En algunas realizaciones, el modulador metabólico se selecciona del grupo que consiste en disolventes apróticos polares, DMSO, acetona, N,N-dimetilformamida o acetonitrilo.

- 5 En la mayoría de las realizaciones, los métodos para producir el reactivo comprenden, además, añadir los diversos componentes del reactivo a una parte alícuota de agua purificada en el orden secuencial de añadir al menos un caótropro, seguido de la adición del quelante, seguido de la adición del modulador metabólico, seguido de la adición de un primer cosmótropro, seguido de la adición del tampón, seguido de la adición de un segundo cosmótropro que es diferente del primer cosmótropro, y finalmente seguido de la adición del sustrato de apoptosis.
- En muchas realizaciones de la invención, el caótropro es SCN⁻ (tiocianato de sodio), el primer cosmótropro es glicerol y el segundo cosmótropro es α,α -trehalosa, el quelante es EDTA, el tampón es tampón fosfato de sodio (monobásico, PO₄ tribásico), el sustrato de apoptosis celular es leptina y el modulador metabólico es DMSO.
- 10 En otra realización, el método de fabricar un reactivo para analizar muestras de tejido comprende proporcionar una parte alícuota de agua purificada, añadir componentes del reactivo al agua purificada en el siguiente orden: añadir tiocianato de sodio, EDTA, DMSO, glicerol, tampón fosfato de potasio y α,α -trehalosa, seguido de la adición de leptina humana y mezclar los componentes entre cada adición de los diversos componentes de una manera que permita un análisis de expresión génica preciso de la muestra de tejido o la biopsia.
- 15 En algunas realizaciones, el método de fabricar un reactivo para analizar muestras de tejido comprende proporcionar una parte alícuota de agua purificada, añadir componentes del reactivo al agua purificada en el siguiente orden: añadir al menos un caótropro, seguido de la adición de un quelante, seguido de la adición de un modulador metabólico, luego añadir un primer cosmótropro, después añadir un tampón, seguido de añadir un segundo y diferente cosmótropro, seguido de añadir un sustrato de apoptosis, y mezclar los componentes entre cada adición de componentes de una manera que permita el análisis preciso de la expresión génica de la muestra de tejido.
- 20 El reactivo para preparar muestras de tejido que permite el análisis de expresión génica comprende al menos un caótropro, al menos un cosmótropro, un quelante, un tampón, un sustrato de apoptosis y un modulador metabólico; en donde el sustrato de apoptosis es leptina; y en donde el al menos un cosmótropro es α,α -trehalosa.
- 25 Para la mayoría de las realizaciones del reactivo, las concentraciones finales para el caótropro son de aproximadamente 0,1 molar a aproximadamente 2 molar, los al menos dos cosmótropros son de aproximadamente 0,1 molar a aproximadamente 2 molar para cada uno de los cosmótropros, el quelante es de aproximadamente 0,1 molar a aproximadamente 2 molar, y el sustrato de apoptosis es de aproximadamente 0,001 molar a aproximadamente 0,5 molar.
- 30 En realizaciones específicas del reactivo, el caótropro es SCN⁻ (tiocianato de sodio), los cosmótropros son glicerol y α,α -trehalosa, el quelante es EDTA, el tampón es tampón fosfato de sodio (monobásico, PO₄ tribásico), el sustrato de apoptosis celular es leptina, y el modulador metabólico es DMSO.
- En algunas realizaciones del reactivo, el caótropro se selecciona del grupo que consiste en SCN⁻ (tiocianato de sodio), H₂PO₄, HCO₃⁻, I⁻, Cl⁻, NO₃⁻, NH₄⁺, Cs, K⁺, (NH₄)C⁺ guanidinio, todas las sales de guanidinio, Br o Rb.
- En el reactivo, el cosmótropro es α,α -trehalosa. Cosmótropros adicionales se pueden seleccionar del grupo que consiste en glicerol, N-óxido de trimetilamina, ectoína, 3-dimetilsulfoniopropionato, glucosa, dextrano o D-lactosa.
- 35 En algunas realizaciones del reactivo, el quelante se selecciona del grupo que consiste en EDTA, EGTA o BABTA.
- El reactivo conservante en algunas realizaciones comprende un tampón que se selecciona del grupo que consiste en BIS-TRIS, BIS-TRIS propano, HEPES, sal sódica HEPES, MES, sal sódica MES, MOPS, sal sódica MOPS, sal sódica o tampón fosfato de sodio (monobásico, PO₄ tribásico).
- 40 En el reactivo, el sustrato de apoptosis es leptina. Sustratos de apoptosis adicionales se pueden seleccionar del grupo que consiste en DMSO, glicina beatina, citrato de potasio, trimetilamina, prolina, NDSB 195, ML-arginina, xilitol, selenito de sodio, NDSB 201, CuCl₂ o CTAB.
- En algunas realizaciones del reactivo, el modulador metabólico se selecciona del grupo que consiste en disolventes apróticos polares, DMSO, acetona, N,N-dimetilformamida o acetonitrilo.
- BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**
- 45 La Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra una realización del método para producir un reactivo para tejido extirpado quirúrgicamente, que permite el análisis de expresión génica de la muestra de tejido de acuerdo con la invención.
- La Figura 2 es un diagrama de flujo que muestra una realización del método de fabricar un reactivo para tejido extirpado quirúrgicamente, que es tejido canceroso, que permite el análisis de expresión génica de la muestra de tejido de acuerdo con la invención.
- 50

Las Figuras 3A y 3B son una hoja de formulación que muestra una realización de los componentes de un reactivo utilizado para preservar muestras de tejido y la adición secuencial de cada uno de los componentes de acuerdo con la invención.

- 5 La Figura 4 es un gráfico de los resultados de rtPCR del gen PGK de células LNCa-FGC envejecidas, que compara el uso de una realización del reactivo conservante de células de acuerdo con la invención con reactivos conservantes convencionales.

La Figura 5 es un gráfico de copias de ARNm del gen PBGD de células cancerosas PC3 envejecidas, que compara los resultados de rtPCR de una realización del reactivo conservante de células de acuerdo con la invención con reactivos convencionales.

- 10 La Figura 6 es un gráfico de copias de ARNm de G6PDH de diversas células de cáncer renal envejecidas, que compara el uso de una realización del reactivo conservante con soluciones de conservación convencionales.

La Figura 7 es un gráfico que compara tres realizaciones diferentes del reactivo conservante utilizado en células de cáncer renal envejecidas.

DESCRIPCIÓN

- 15 "Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o la circunstancia posteriormente descrito puede pero no es necesario que se produzca, y que la descripción incluye casos, en donde se produce el evento o la circunstancia y casos en los que no se produce.

El término "caótopo" se refiere a compuestos que interactúan débilmente con moléculas de agua e interrumpen la molécula de agua enlazada a la red de hidrógeno alrededor de las moléculas de proteína.

- 20 El término cosmótopo se refiere a compuestos que interactúan fuertemente con las moléculas de agua, y organizan las moléculas de agua de una manera típicamente favorable alrededor de las moléculas de proteína. Una composición estabilizante de biomaterial puede incluir un cosmótopo en algunas realizaciones. Sin limitarse a mecanismo(s) de acción específico(s), un cosmótopo, en algunas realizaciones, puede estabilizar y/o mejorar las interacciones agua-agua en una composición acuosa. En la presente invención, el cosmótopo es α,α -trehalosa. Ejemplos adicionales de cosmótopos pueden incluir, sin limitación, glicerol, prolina (p. ej., L-prolina), D-(+) trehalosa, D-(+) trehalosa dihidrato), glicina betaína, glucosa, dextrosa, ácido glutámico y/o ácido aspártico. Ejemplos de un cosmótopo, en algunas realizaciones, pueden incluir SO_4 , HPO_4 , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Li^+ , Na^+ , OH^- y/o PO_4^{-2} .

- El término tampón se refiere a un compuesto que da una mezcla con un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8,5. En algunas realizaciones, se puede seleccionar un tampón adecuado de tampones buenos (p. ej., HEPES), acetato de potasio, fosfato de sodio, bicarbonato de potasio, tris(hidroxiamino)metano (Tris) y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un tampón puede incluir acetato de potasio, acetato de sodio, fosfato de potasio (mono, tribásico), fosfato de sodio, tampón Tris, N-(2-hidroxietil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (HEPES), tampón ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS), tampón ácido 2-[(2-amino-2-oxoetil)amino]etanosulfónico (ACES), tampón ácido N-(2-acetamido)-2-iminodiacético (ADA), tampón ácido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxietil)amino]-2-propanosulfónico (AMPPO), tampón ácido N,N-bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfónico (BES), tampón bicina (N,N-bis(2-hidroxietil)glicina), tampón bis-(2-hidroxietil)imino-tris(hidroximetil)metano (Bis-Tris), tampón ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico (CAPS), tampón ácido 3-(ciclohexilamino)-2-hidroxil-1-propanosulfónico (CAPSO), tampón ácido 2-(N-ciclohexilamino)etanosulfónico (CHES), tampón ácido 3-[N,N-bis(2-hidroxietil)amino]-2-hidroxil-propanosulfónico (DIPSO), tampón N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(3-propanosulfónico) (HEPPS), tampón N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-hidroxipropanosulfónico) (HEPPSO), tampón ácido 2-(N-morfolina)etanosulfónico (MES), tampón trietanolamina, tampón imidazol, tampón glicina, tampón etanolamina, tampón fosfato, tampón ácido 3-(N-morfolina)-2-hidroxipropanosulfónico (MOPSO), tampón piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfónico) (PIPES), tampón piperazina-N,N'-bis(ácido 2-hidroxipropanosulfónico) (POPSO), tampón, N-tris[(hidroximetil)metil]-3-aminopropanosulfónico (TAPS), tampón ácido 2-hidroxil-3-[tris(hidroximetil)metilamino]-1-propanosulfónico (TAPSO), tampón N-[Tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico (TES), tampón N-[Tris(hidroximetil)metil]glicina (tricina), tampón 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol, tampón 2-amino-2-metil-1-propanol, y combinaciones de los mismos.

- El término quelante se refiere a un compuesto que puede unir metales disponibles (p. ej., Mg^{2+} y Ca^{2+}) de tal manera que los metales que permanecen disponibles para las enzimas dependientes del metal (p. ej., desoxirribonucleasas) son insuficientes para apoyar la catálisis (es decir, degradación de ácido nucleico). Por ejemplo, una enzima independiente del metal puede incluir una ADN ligasa (p. ej., ADN ligasa D4), una ADN polimerasa (p. ej., ADN polimerasa T7), una exonucleasa (p. ej., exonucleasa 2, lambda-exonucleasa), una quinasa (p. ej., T4 polinucleótido quinasa), una fosfatasa (p. ej., BAP y CIP fosfatasa), una nucleasa (p. ej., nucleasa BL31 y nucleasa XO) y una enzima modificadora de ARN (p. ej., ARN polimerasa, SP6, T7, ARN polimerasa T3 y ARN ligasa T4).

Un quelante puede incluir, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido [etilenbis(oxietilenonitrilo)]tetraacético (EGTA) y ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi)etano-N,N',N'-tetraacético (BAPTA), y/o sus sales. Un quelante puede estar presente en cualquier concentración deseable. En los casos en los que se incluyan dos o más quelantes en un único reactivo, la concentración de cada uno de los quelantes o la concentración total de los quelantes combinados pueden caer dentro de cualquiera de los intervalos proporcionados. En algunas realizaciones, un quelante puede incluir EDTA, EGTA, BAPTA, imidazol, iminodiacetato (IDA), bis(5-amidino-2-bencimidazolil)metano (BABIM) y/o sus sales.

La expresión modulador metabólico se refiere a penetrantes/ moduladores metabólicos que actúan para optimizar la penetración de la membrana de las químicas dentro de la formulación del reactivo, así como para estabilizar la expresión génica de las células y, en particular, las células cancerosas hipóxicas.

El término apoptosis es el proceso de muerte celular programada (PCD) que puede producirse en organismos multicelulares. Eventos bioquímicos conducen a cambios celulares característicos (morfología) y a la muerte. Estos cambios incluyen la formación de burbujas, la contracción celular, la fragmentación nuclear, la condensación de cromatina y la fragmentación de ADN cromosómico. (Véase también fragmentación apoptótica del ADN).

La expresión "sustrato de apoptosis" es un compuesto o molécula que es un componente clave en la reducción de la apoptosis. Un sustrato de apoptosis funciona sinérgicamente con otros componentes de la formulación del reactivo para prevenir la apoptosis y favorecer la estabilidad celular y el crecimiento celular.

La expresión "análisis de expresión génica" se refiere a análisis que se ocupa de detectar la sobreexpresión, la expresión insuficiente o los genes expresados diferencialmente de una célula, particularmente en células cancerosas.

Los términos "sobreexpresar", "sobreexpresión" o "sobreexpresado" se refieren indistintamente a una proteína o ácido nucleico (ARN) que se traduce o transcribe a un nivel detectablemente mayor, habitualmente en una célula cancerosa, en comparación con una célula normal. El término incluye sobreexpresión debido a la transcripción, procesamiento post-transcripcional, traducción, procesamiento post-traducción, localización celular (p. ej., organelas, citoplasma, núcleo, superficie celular) y estabilidad de ARN y proteínas, en comparación con una célula normal. La sobreexpresión puede detectarse utilizando técnicas convencionales para detectar ARNm (es decir, RT-PCR, PCR, hibridación) o proteínas (es decir, ELISA, técnicas inmunohistoquímicas). La sobreexpresión puede ser del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en comparación con una célula normal. En determinados casos, la sobreexpresión es 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, o niveles superiores de transcripción o traducción en comparación con una célula normal.

Los términos "subexpresar", "subexpresión" o "subexpresado" o "regulación negativa" se refieren indistintamente a una proteína o ácido nucleico que se traduce o transcribe a un nivel detectablemente inferior en una célula cancerosa en comparación con una célula normal. El término incluye subexpresión debida a transcripción, procesamiento post-transcripcional, traducción, procesamiento post-traducción, localización celular (p. ej., organelas, citoplasma, núcleo, superficie celular) y estabilidad de ARN y proteínas, en comparación con un control. La subexpresión se puede detectar utilizando técnicas convencionales para detectar ARNm (es decir, RT-PCR, PCR, hibridación) o proteínas (es decir, ELISA, técnicas inmunohistoquímicas). La subexpresión puede ser del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o menos en comparación con un control. En determinados casos, la subexpresión es 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, o niveles inferiores de transcripción o traducción en comparación con un control.

La expresión "expresado diferencialmente" o "regulado diferencialmente" se refiere generalmente a una proteína o ácido nucleico que está sobreexpresado (regulado positivamente) o subexpresado (regulado negativamente) en una muestra en comparación con al menos otra muestra, generalmente en un paciente con cáncer en comparación con una muestra de tejido no canceroso en el contexto de la presente invención.

El término "tumor", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a todo el crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que típicamente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de las vías urinarias, cáncer de tiroides, cáncer renal, carcinoma, melanoma y cáncer cerebral.

La muestra biológica o de tejido incluye secciones de tejidos tales como muestras de biopsias y autopsias. Típicamente, se obtiene una muestra biológica de un organismo eucariótico, lo más preferiblemente un mamífero tal como un primate (p. ej., chimpancé o ser humano), vaca, perro, gato, un roedor (p. ej., cobaya, rata o ratón), conejo o un ave, reptil o pez.

Una biopsia se refiere al proceso de extraer una muestra de tejido para la evaluación diagnóstica o pronóstica, y para la muestra de tejido en sí. Cualquier técnica de biopsia conocida en la técnica se puede aplicar a los métodos de diagnóstico y pronóstico de la presente invención. La técnica de biopsia aplicada dependerá del tipo de tejido a evaluar (p. ej., pulmón), el tamaño y el tipo de tumor, entre otros factores. Técnicas de biopsia representativas incluyen, pero no se limitan a biopsia por escisión, biopsia por incisión, biopsia con aguja, biopsia quirúrgica y biopsia de médula ósea. Una biopsia por escisión se refiere a la extirpación de una masa tumoral completa con un pequeño margen de tejido normal que la rodea. Una biopsia por incisión se refiere a la extirpación de una cuña de tejido del interior del tumor. Un diagnóstico o pronóstico hecho por endoscopia o guía radiográfica puede requerir una "biopsia de núcleo-aguja" o una "biopsia por aspiración de aguja fina" que generalmente obtiene una suspensión de células dentro de un tejido diana.

El tratamiento terapéutico y las terapias contra el cáncer se refieren a la quimioterapia, la terapia hormonal, la radioterapia, la inmunoterapia y la terapia biológica (dirigida).

El término PCR se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa. Esto se refiere a cualquier tecnología en la que un nucleótido se amplifica mediante técnicas de ciclación bajo temperatura en presencia de una nucleótido polimerasa, preferiblemente una ADN polimerasa. Esto incluye, entre otros, la tecnología de PCR en tiempo real, la PCR de transcriptasa inversa y métodos de PCR estándar.

La presente invención describe métodos para fabricar un reactivo para mantener la viabilidad celular de muestras de tejido que permite el análisis de la expresión génica de las células en la muestra de tejido. La presente invención también se refiere a composiciones de reactivos que permiten la prueba de la expresión génica precisa de células viables en muestras de tejido, particularmente células cancerosas. Los métodos para fabricar el reactivo de viabilidad celular, en general, tienen una adición secuencial de compuestos/moléculas para lograr la formulación óptima del reactivo de la invención.

Con referencia a la Figura 1, hay un diagrama de flujo de una realización de los métodos de fabricar un reactivo de viabilidad celular de acuerdo con la invención. El método 100 para generar un reactivo de viabilidad celular comprende proporcionar un caótropro en el evento 110. El caótropro se añade a una parte alícuota de agua purificada. El caótropro es una molécula que tiene actividad contra enzimas que degradan ácidos nucleicos tales como ADNasas y ARNasas, proteasas y enzimas reguladoras responsables de la destrucción de proteínas y la apoptosis. Un caótropro también tiene efectos significativos sobre la distribución del agua en las células y la atenuación metabólica asociada.

En la mayoría de las realizaciones, el caótropro es al menos uno de los siguientes compuestos; SCN^- (tiocianato de sodio), H_2PO_4^- , HCO_3^- , I^- , Cl^- , NO_3^- , NH_4^+ , Cs^+ , K^+ , $(\text{NH}_4)^+$ guanidinio, todas las sales de guanidinio, Br^- o Rb^- . Se sabe que todos estos compuestos tienen efectos en la distribución del agua alrededor de una célula y ayudan a mantener la viabilidad celular.

En algunas realizaciones, el caótropro tiene una concentración final en el reactivo de viabilidad celular de concentraciones que varían de aproximadamente 0,1 molar a aproximadamente 2 molar, más preferiblemente de al menos aproximadamente 1 mM, al menos aproximadamente 10 mM, al menos 0,05 M, al menos aproximadamente 0,1 M al menos 0,5 M, al menos aproximadamente 1 M, al menos aproximadamente 1,75 M, al menos aproximadamente 2 M, hasta un máximo de al menos aproximadamente 3 M.

En el evento 120, el método 100 comprende proporcionar al menos un quelante. El quelante se añade a la formulación de viabilidad celular para ayudar en la inactivación de sistemas de enzimas impulsados por Ca^{2+} , Mg^{2+} que degradan ácidos nucleicos. En esta realización, el quelante se selecciona del siguiente grupo de compuestos: EDTA, EGTA o BABTA.

En la mayoría de las realizaciones del método de formular el reactivo de viabilidad celular, el quelante se encuentra a una concentración final de aproximadamente 0,1 molar a aproximadamente 2 molar, más preferiblemente de aproximadamente al menos aproximadamente 0,1 M, al menos aproximadamente 0,005 M, al menos aproximadamente 0,01 M, al menos aproximadamente 0,05 M y/o al menos aproximadamente 0,1 M.

En el evento 130, el método 100 comprende, además, proporcionar un compuesto modulador metabólico/penetrante. El modulador metabólico actúa para optimizar la penetración en la membrana de las sustancias químicas, así como para actuar como un soporte de moléculas grandes tales como glicerol. Adicionalmente, actúa como un modulador profundo de la diferenciación y función celular. El modulador metabólico es un componente clave en la estabilización de la expresión génica de células cancerosas hipóxicas.

En el método 100, el modulador metabólico/penetrante se selecciona del grupo que consiste en disolventes apróticos polares, DMSO, acetona, N,N-dimetilformamida o acetonitrilo. La concentración final del modulador metabólico en las formulaciones es de al menos 0,25 M, al menos aproximadamente 0,5 M, al menos aproximadamente 0,75 M, al menos aproximadamente 1 M, al menos aproximadamente 1,5 M, hasta un máximo de aproximadamente 2 M.

- 5 El método 100 comprende, además, proporcionar al menos un cosmótopo para fabricar el reactivo de viabilidad celular en el evento 140. En esta realización, el o los cosmótopos se añaden a la mezcla después de la adición del caótopo. El cosmótopo es α,α -trehalosa. Cosmótopos adicionales pueden ser uno de los siguientes compuestos: glicerol, trimetilamina N-óxido, ectoína, 3-dimetilsulfoniopropionato, glucosa, dextrano o D-lactosa. El o los cosmótopos tienen efectos protectores para los ácidos nucleicos, las proteínas y el plegamiento de proteínas, y son un componente necesario del reactivo que sinergia con caótopos para la estabilidad celular y de la membrana y la modulación metabólica para la estabilización de la expresión génica cuando las células están estresadas.
- 10 En algunas realizaciones, ese cosmótopo se encuentra en una concentración final del reactivo de viabilidad celular en concentraciones que varían de aproximadamente 0,1 molar a aproximadamente 2 molar, o de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 1,0 M a aproximadamente 2,0 M, de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 5,0 M.
- 15 En el evento 150, el método 100 comprende proporcionar al menos un tampón que se añade a la formulación para ajustar el pH del reactivo de viabilidad celular. El tampón en la mayoría de las realizaciones se selecciona del grupo que consiste en BIS-TRIS, BIS-TRIS propano, HEPES, sal sódica HEPES, MES, sal sódica MES, MOPS, sal sódica MOPS, sal sódica o tampón fosfato sódico (monobásico, PO_4 tribásico).
- 20 En la mayoría de las realizaciones, el pH final del reactivo de viabilidad celular es de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8, más preferiblemente de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5 a aproximadamente 5,5 a 6,0, a aproximadamente 6,5, a aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,5.
- 25 El método 100 comprende, además, proporcionar un segundo cosmótopo para fabricar el reactivo de viabilidad celular en el evento 160. En esta realización, el o los cosmótopos se añaden a la mezcla después de la adición del tampón. El cosmótopo es α,α -trehalosa. Cosmótopos adicionales pueden ser uno de los siguientes compuestos: glicerol, trimetilamina N-óxido, ectoína, 3-dimetilsulfoniopropionato, glucosa, dextrano o D-lactosa. El o los cosmótopos tienen efectos protectores para los ácidos nucleicos, las proteínas y el plegamiento de proteínas, y son un componente necesario del reactivo que sinergia con caótopos para la estabilidad celular y de la membrana y la modulación metabólica para la estabilización de la expresión génica cuando las células están estresadas.
- 30 En algunas realizaciones, ese cosmótopo se encuentra en una concentración final del reactivo de viabilidad celular en concentraciones que varían de aproximadamente 0,1 molar a aproximadamente 2 molar, más preferiblemente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 1,0 M a aproximadamente 2,0 M, de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 5,0 M.
- 35 El método 100 comprende, además, proporcionar un sustrato de apoptosis en el evento 170. Un sustrato de apoptosis ayuda a la prevención de la apoptosis de células y, en particular, células cancerosas. El sustrato de apoptosis es leptina. Sustratos de apoptosis adicionales se pueden seleccionar del grupo que consiste en DMSO, glicina beatina, citrato de potasio, trimetilamina, prolina, NDSB 195, ML-arginina, xilitol, selenito de sodio, NDSB 201, CuCl_2 o CTAB.
- 40 La concentración final del sustrato de apoptosis en el reactivo de viabilidad celular es de aproximadamente 0,001 M a aproximadamente 0,5 M, o de aproximadamente 0,1 mM hasta aproximadamente 1 mM, hasta aproximadamente 10 mM, hasta aproximadamente 0,1 M, hasta aproximadamente 0,25 M, hasta aproximadamente 1 M, hasta 1,5 M hasta un máximo de aproximadamente 2 M.
- 45 En el evento 180, el método 100 proporciona, además, mezclar el caótopo, cosmótopo, quelante, tampón, sustrato de apoptosis y el modulador metabólico para permitir el análisis de expresión génica de la muestra de tejido. La mezcladura de las muestras puede ocurrir a través del método de formular el reactivo de la invención. Cada uno de los componentes individuales se trata y se mezcla para obtener el reactivo de viabilidad celular óptimo. La adición de los componentes de la formulación puede ser aleatoria; sin embargo, en la mayoría de las realizaciones, la adición de los componentes es secuencial en el orden mostrado en el método 100.
- 50 El tiempo de preparación para producir el reactivo varía debido al tamaño del lote, la temperatura, etc. En general, lleva aproximadamente una hora completar la formulación del reactivo de viabilidad celular. El reactivo puede almacenarse en condiciones ambientales durante hasta 12 meses antes de su uso en muestras de tejido. El reactivo también puede congelarse para un almacenamiento más prolongado.
- 55 Una vez que se ha añadido una muestra de tejido al reactivo de viabilidad celular, el tejido se estabiliza y mantiene los componentes de expresión génica viables durante hasta 72 horas a una temperatura de 30°C. En general, el tiempo en el que las células son viables es de aproximadamente 30 horas a aproximadamente 50 horas, y más particularmente de aproximadamente dos días. Este marco de tiempo es suficiente para el análisis detallado de la expresión génica de los tejidos a partir de biopsias (muestras de tejido) que pueden dar una visión significativa de los tipos y el progreso de enfermedades tales como el cáncer.

5 Con referencia a la Figura 2, hay un diagrama de flujo que muestra una realización de los métodos para generar el reactivo de viabilidad celular de acuerdo con la invención. El método 200 comprende proporcionar tiocianato de sodio en el evento 210. El tiocianato de sodio es un caótropro y se añade al agua purificada y se mezcla a fondo antes de añadir el quelante EDTA en el evento 220. Después de la mezcladura del EDTA en la solución, el modulador metabólico/penetrante DMSO (dimetilsulfóxido) se añade a la mezcla en el evento 230.

10 En el evento 240 se añade un primer cosmótropro, glicerol, a la formulación del reactivo. La formulación se mezcla hasta que la solución sea transparente y luego se añade el componente tampón de los reactivos en el evento 250. El tampón del método mostrando en la Figura 2 es tampón fosfato sódico (monobásico, PO₄ tribásico). Este tampón asegura que el pH del reactivo de viabilidad celular final será de alrededor de aproximadamente 7,0 a 7,6 y más probablemente de alrededor de 7,2.

En el evento 260 se añade a la formulación un segundo cosmótropro, diferente del primer cosmótropro. El segundo cosmótropro en el método 200 es α,α-trehalosa.

En el evento 270, el método 200 comprende, además, la adición de leptina, un sustrato de apoptosis que ayuda en la prevención de la apoptosis celular, particularmente de células cancerosas.

15 En el evento 280, el método 200 proporciona, además, mezclar los componentes de la formulación de reactivo. Después de cada adición de componente, se completa la mezcladura para asegurar que cada uno de los componentes se solubilice dentro de la solución de reactivo.

TABLA I

Estudio Viabilidad Celular 1 día (24 horas)	Grupos Celulares	Viabilidad Azul Tripano	Viabilidad/Proliferación MTT
TAG-1	Sin Grupos de Células	Sin Células Muertas	100%
TAG-2	Pocos Grupos de Células	Muchas Células Muertas	53%
Formalina	Células Destruídas	Todas las Células Muertas	0%

20 La Tabla I anterior muestra la viabilidad de células cancerosas de Ishikawa después de un día de exposición a una realización del reactivo conservante con y sin leptina añadida al reactivo, TAG-1 y TAG-2, respectivamente. TAG-1 y TAG-2, en la Tabla 1, se comparan con la viabilidad de las células cancerosas de Ishikawa cuando se colocan en una solución de formalina tamponada al 20%. TAG-1 en la Tabla I comprende tiocianato de sodio, EDTA, tampones, trehalosa, DMSO, glicerol y leptina. La solución de TAG-2 que se muestra en la Tabla 1 comprende los mismos componentes de TAG-1, pero sin la presencia de leptina.

25 La Tabla 1 muestra la viabilidad de las células cancerosas midiendo la presencia de grupos celulares en las soluciones, resultados de azul tripano para la indicación de la presencia de células muertas y la viabilidad/proliferación de las células utilizando MTT. El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico para evaluar la viabilidad celular de las enzimas oxidorreductasa celulares dependientes de NAD(P)H en condiciones definidas que reflejan el número de células viables presentes. Estas enzimas son capaces de reducir el colorante de tetrazolio a su formazan insoluble que tiene un color púrpura. Las células muertas no provocan este color. El colorante MTT se añade a las suspensiones celulares y se lee en un ajuste espectrofotométrico de 570 nm y una longitud de onda de fondo de 630/690 nm. La densidad de células viables y la proliferación de células en crecimiento se calculan utilizando una relación de células muertas (color amarillo) a células vivas (color púrpura) en una cuadrícula definida.

30 Los resultados mostrados en la Tabla I indican que a las 24 horas de exposición a los reactivos conservantes, TAG-1 tiene un 100% de viabilidad, TAG-2 tiene un 53% de viabilidad y la solución de formalina tiene un 0% de viabilidad celular.

TABLA II

Estudio Viabilidad Celular 8 días (192 horas)	Grupos Celulares	Viabilidad Azul Tripano	Viabilidad/Proliferación MTT
TAG-1	Pocos Grupos de Células	Pocas Células Muertas	88,94%
TAG-2	Grupos de Células Difusos	> 95% de Células Muertas	5%
Formalina	Células Destruídas	Todas las Células Muertas	0%

La Tabla II anterior muestra la viabilidad de las células cancerosas de Ishikawa después de ser expuestas a TAG-1, TAG-2 o las soluciones conservantes de formalina durante ocho días. Los reactivos conservantes de la invención, TAG-1 y TAG-2, son los mismos que los utilizados en el experimento mostrado en la Tabla I. Después de ocho días de exposición a los reactivos conservantes a temperatura ambiente, TAG-1 tiene una viabilidad de 88,94%, TAG-2 tiene una viabilidad celular de 5%, y en la solución de formalina todas las células estaban muertas. Estos resultados indican que el o los reactivos conservantes de la invención son mucho mejores para preservar la viabilidad celular a lo largo del tiempo que la formalina. Estos resultados también demuestran la importancia de añadir leptina como un componente de apoptosis.

Quando el reactivo se prepara correctamente, actúa como conservante del tejido canceroso, manteniendo la viabilidad celular en el tejido con una viabilidad del 95% durante hasta 24 horas. Se puede lograr una viabilidad de uno a cinco días con una viabilidad media de aproximadamente tres días. El reactivo también ayuda en la inhibición o supresión significativa de la apoptosis de células cancerosas en el tejido, controla factores celulares tales como la hipoxia y ayuda a la inactivación rápida de enzimas degradantes para proteger la integridad de los tejidos y los ácidos nucleicos.

Además, en el espacio de dos horas se observa aproximadamente el 90% de la penetración del tejido y el rápido tamponamiento de los componentes químicos a un pH de 7,2 permite una actividad metabólica celular máxima de los componentes reactivos. El reactivo de la invención permite la modulación del estrés metabólico celular mediante mecanismos bioquímicos que utilizan químicas caotrópicas, cosmotrópicas, sistemas de tamponamiento, y una nueva hormona estimulante del cáncer leptina que ha demostrado que aumenta el crecimiento de cáncer en pacientes obesos. Al añadir un crioprotector tal como glicerol a la formulación de reactivo, el crioprotector actúa como un cosmótropo para la conservación de proteínas y también imparte estabilidad térmica a la muestra de tejido.

Otro beneficio del reactivo es que el reactivo estabiliza la expresión génica del ARN diana, ARNm, medido por PCR en tiempo real, y métodos de micro-matrices. También se ha observado una rápida penetración de los componentes reactivos en las células y el tejido.

TABLA III

Química de Formulación	Control de RIN 0 horas	RIN 24 horas	RIN 72 horas	RIN 120 horas	RIN 170 horas
TAG-1	8,7	8,2	7,9	7,4	6,0
TAG-2	5,1	2,7	1,5	1,1	0
TAG-3	6,7	3,1	1,6	1,3	0
TAG-4	7,2	2,5	2,4	1,8	0
TAG-5	5,8	4,2	1,3	0	0

La Tabla III muestra los resultados de un estudio de integridad de ARN que compara cinco formulaciones diferentes del reactivo conservante celular de la invención. Las células cancerosas de Ishikawa se expusieron o envejecieron en las diversas formulaciones durante hasta 170 horas antes de extraer el ARN de las células. La formulación de TAG-1 comprende leptina y trehalosa, tiocianato de sodio, EDTA, tampones, DMSO, así como glicerol. La formulación de TAG-2 no tenía trehalosa ni leptina presente. La formulación de TAG-3 no tenía añadido glicerol, leptina o trehalosa. La formulación de TAG-4 no tenía DMSO, tampones o leptina. La formulación TAG-5 no tenía leptina, trehalosa, tiocianato de sodio ni EDTA.

5 Las células de cáncer de Ishikawa utilizadas en el estudio que se muestra en la Tabla III son células de adenocarcinoma endometrial que se cultivaron en medio DMEM, complementado con suero bovino al 5%. Las células se sembraron a una densidad de 1×10^6 en una placa de cultivo tisular de 100 mm. Las células se recogieron utilizando métodos tradicionales y luego se resuspendieron en diversas formulaciones del reactivo conservante de células de la invención y se dejaron a temperatura ambiente durante varias cantidades de tiempo. En diversos puntos, el ARN celular se extrajo utilizando un mini-kit RNeasy y el ARN se analizó en cuanto a calidad y cantidad utilizando el Bioanalizador Agilent 2000 utilizando los protocolos estándares del fabricante. Los controles para este estudio fueron archivos de ARN celular purificado.

10 Los resultados mostrados en la Tabla III indican que la realización preferida de la invención comprende todos los elementos que se muestran en la Figura 2. La necesidad de trehalosa y leptina en la formulación conservante de células de la invención se muestra claramente en la Tabla III. El Número de integridad de ARN (RIN) medido por el analizador de ARN Agilent 2000 tiene una escala de 1 a 10. Se considera que cualquier número por debajo de 6 muestra ARN degradado y no fiable que no es útil para estudios de expresión génica. TAG-1 es la única formulación que tiene un número RIN que se mantiene por encima de 6,0, incluso en el instante de 170 horas. Las concentraciones finales de la realización de la formulación de TAG-1 de la invención fueron; tiocianato de sodio 0,01 M, EDTA 0,01 M, Glicerol 0,25 M, Tampones 0,001 M, Leptina 0,001 M, Trehalosa 0,20 M.

20 El reactivo de la invención también es compatible con métodos de patología de tinción estándar. Las células se trataron en el reactivo TAG-1 durante 24 horas y se tiñeron con tinción con hematoxilina y eosina utilizando protocolos estándares. Las células teñidas se compararon con células no tratadas que también se tiñeron con tinción de hematoxilina eosina utilizando los mismos protocolos estándares. Las células se examinaron al microscopio en busca de características de la matriz citoplásmica, nuclear y extracelular. En ambos conjuntos de células, los núcleos se tiñeron de azul, mientras que el citoplasma y la matriz extracelular tenían una tinción rosa uniforme. En resumen, no hubo diferencias significativas con la tinción de las células tratadas con TAG-1 y las células no tratadas con la química de TAG-1.

25 El reactivo de viabilidad celular comprende un caótopo, al menos un cosmótopo, un quelante, un tampón, un modulador metabólico y un sustrato de apoptosis, en donde el sustrato de apoptosis es leptina y en donde el al menos un cosmótopo es α,α -trehalosa. Estos componentes del reactivo se encuentran en bajas concentraciones molares en comparación con otros conservantes tisulares. Las bajas concentraciones molares de caótopos actúan de manera muy diferente y demuestran un efecto muy protector sobre la estabilidad y conservación de ácidos nucleicos, además de tener un impacto importante sobre el metabolismo celular al modificar la distribución del agua y el metabolismo si las células se describen aquí. Base para la patente de EE.UU. N° 6.458.546 B1 (Baker). Las concentraciones finales para el caótopo son de aproximadamente 0,1 molar a aproximadamente 2 molar, para los al menos dos cosmótopos son de aproximadamente 0,1 molar a aproximadamente 2 molar para cada los cosmótopos, el quelante es de aproximadamente 0,1 M aproximadamente 2 molar, y el sustrato de apoptosis es de aproximadamente 0,001 molar a aproximadamente 0,5 molar. A diferencia de las altas concentraciones molares de caótopos, que destruyen las células y desnaturalizan proteínas y ácidos nucleicos, se ha demostrado que la baja concentración de caótopos es beneficiosa para preservar las muestras de tejido. Además, las bajas concentraciones molares de cosmótopos son muy sinérgicas con bajas concentraciones de caótopos en la modificación del metabolismo celular, protegiendo proteínas y ácidos nucleicos. La estabilización óptima de macromoléculas biológicas (p. ej., células cancerosas) requiere una mezcla de uno o más aniones cosmótopos y una acción caotrópica de los siguientes grupos y uno de cada grupo.

40 En determinadas realizaciones, el caótopo es SCN⁻ (tiocianato de sodio), los cosmótopos son glicerol y α,α -trehalosa, el quelante es EDTA, el tampón es tampón fosfato de sodio (monobásico, PO₄ tribásico), el sustrato de apoptosis celular es leptina y el modulador metabólico es DMSO.

45 La invención también describe kits para muestras de biopsia que comprenden un recipiente, el recipiente configurado para contener un reactivo de viabilidad celular, en el que el reactivo de viabilidad celular permite el análisis de expresión génica de la muestra de biopsia.

50 En la mayoría de las realizaciones, el recipiente en el kit es una copa o tubo de amplio tamaño para contener una muestra de tejido de biopsia, así como una parte alícuota del reactivo de la invención. El tubo puede ser un tubo eppendorf o más grande, dependiendo del tamaño de la muestra de tejido a analizar. El reactivo en el kit comprende al menos un caótopo, al menos un cosmótopo, un quelante, un tampón, un sustrato de apoptosis y un modulador metabólico.

En otras realizaciones, la copa comprende una tapa para sellar el reactivo de viabilidad celular en la copa.

55 En los siguientes ejemplos se proporcionan métodos preferidos para fabricar un reactivo de viabilidad celular para muestras de tejido, que son muestras de tejido canceroso.

EJEMPLOS

Las siguientes preparaciones y ejemplos se dan para permitir a los expertos en la técnica comprender y poner en práctica más claramente la presente invención.

EJEMPLO I

5 Este ejemplo es una demostración de una realización de los métodos para producir el reactivo para mantener la viabilidad celular de una muestra de tejido. Las Figuras 3A y 3B son imágenes de una hoja de formulación que enumera los componentes del reactivo e instrucciones sobre cómo preparar el reactivo de viabilidad celular para muestras de biopsia de tejido. En este ejemplo, se está haciendo un litro de reactivo. Los componentes en la hoja de formulación se enumeran en el orden en que se han de añadir, a excepción del agua purificada que se mide inicialmente (50 ml). El caótropro, 8,1 g de tiocianato de sodio, se añade al agua para dar una concentración final de tiocianato de sodio de 10% en peso. El tiocianato de sodio se mezcla hasta que la solución sea transparente. Después de la adición del caótropro, EDTA, se añade a la solución el quelante a una concentración de reserva de 0,1 M. Se añaden 100 ml de EDTA 0,1 M para dar una concentración final de EDTA 0,01 M en el reactivo. El EDTA se mezcla hasta que la solución sea homogénea. El siguiente componente añadido a la solución es el modulador metabólico, DMSO. Se añaden 20 ml de DMSO a la solución para dar el porcentaje final de 2% de DMSO en el reactivo. Después de añadir el DMSO, la solución se mezcla hasta que sea homogénea. Luego se añade el primer cosmótropro, glicerol (25 ml) a la solución, dando el porcentaje final de glicerol en el reactivo de 2,5%. La solución se mezcla de nuevo hasta que sea homogénea. Los componentes de tamponamiento se añaden luego a la solución. 3,93 g de K_3PO_4 , fosfato de potasio monobásico, se añaden primero y se mezclan hasta la homogeneidad, seguido de la adición de 5,02 g de K_3PO_4 , fosfato de potasio tribásico. Una vez que la solución es homogénea, se añade a la solución el segundo cosmótropro, α,α -trehalosa dihidrato. Se añaden 7,56 g de trehalosa dihidrato al reactivo. La solución se mezcla hasta que sea transparente. El componente final añadido a la solución es el sustrato de apoptosis, leptina humana. Se añaden 50 microlitros o 0,001 M de leptina a la solución que luego se mezcla hasta que sea transparente.

15 Luego se añade agua purificada para aumentar el volumen a un litro. Todas las etapas anteriores se llevan a cabo a temperatura ambiente. El reactivo de viabilidad celular se puede almacenar hasta durante un año bajo condiciones ambientales.

La hoja de formulación de las Figuras 3A y 3B, así como este ejemplo, es una excelente representación de una realización de los métodos para producir el reactivo de tejido celular viable, así como un buen ejemplo de los componentes que comprenden reactivo de tejido celular viable de acuerdo con la invención.

EJEMPLO II

El Ejemplo II es un estudio de una realización de la eficacia del reactivo conservante de células de tejido en la conservación de células LNCa-FGC y células PC-3. Los resultados para conservar células LNCa-FGC en reactivo TAG-1 en comparación con soluciones de resuspensión celular estándar se muestran en la Figura 4. Los resultados para la conservación de células PC-3 en reactivo TAG-1 en comparación con soluciones de resuspensión celular estándar se muestran en la Figura 5.

Las líneas celulares de próstata humana DU145, PC-3 y LNCaP-FGC se adquirieron de American Type Collection (Manassas Virginia, EE.UU.). Las células DU145 se cultivaron en medio DMEM complementado con PBS al 10% más penicilina (100 unidades/ml) y estreptomocina (100 ul/ml). Las células PC-3 y LNCaP-FGC se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y penicilina (100 unidades/ml) y estreptomocina (100 ul/ml). Las células se cultivaron en placas de cultivo tisular hasta una confluencia de aproximadamente 70%. Las células se recogieron a continuación por métodos tradicionales y se resuspendieron en una realización del reactivo conservante de células, TAG-1, o una solución control, tal como K_2EDTA , 20% de formalina, o solución salina con timerosal.

El estudio utilizando células LNCa-FGC comparó la efectividad de conservación de TAG-1, una solución de solución salina de timerosal y solución de K_2EDTA . Las células se resuspendieron en TAG-1 o en las soluciones de control y se dejaron envejecer durante hasta 100 horas. La solución de TAG-1 se dejó a 25°C, mientras que la solución de K_2EDTA se mantuvo a 4°C. En varios instantes, 0 h, 24 h, 48 h, 72 h y 100 h, el ARN fue extraído de las células envejecidas para determinar la integridad del ARNm de cada muestra. La Figura 4 es un gráfico que muestra la comparación de las células cancerosas envejecidas en el reactivo TAG-1 o las dos soluciones de control. Las copias de ARNm de G6PDH se detectaron para cada uno de los instantes utilizando rtPCR. La Figura 4 muestra que la solución de TAG-1 mantuvo el ARNm/células viables mejor que las soluciones de control. Las soluciones de control no mostraron copias de G6PDH en el instante de 48 h o incluso antes. La solución de TAG-1 todavía podía tener células viables con ARNm intacto incluso a las 100 horas.

El estudio utilizando células PC-3 (Figura 5) comparado con la eficacia de conservación de TAG-1, una solución salina/timerosal, y solución de K_2EDTA . Las células se resuspendieron en TAG-1 o en las soluciones de control y se dejaron envejecer durante hasta 100 horas. La solución de TAG-1 se dejó a 25°C, mientras que la solución de K_2EDTA se mantuvo a 4°C. En varios instantes, 0 h, 24 h, 48 h, 72 h y 100 h, el ARN fue extraído de las células

envejecidas para determinar la integridad del ARNm de cada muestra. La Figura 5 es un gráfico que muestra la comparación de las células cancerosas envejecidas en el reactivo TAG-1 o las dos soluciones de control. Las copias del ARNm de PBGD se detectaron para cada instante utilizando rtPCR. La Figura 5 muestra que la solución de TAG-1 mantuvo el ARNm/células viables mejor que las soluciones de control. Las soluciones de control mostraron casi ninguna copia de PBGD en el instante de 48 h. La solución de TAG-1 todavía podía tener células viables con ARNm intacto, incluso a las 100 horas.

El estudio utilizando células de cáncer renal compara una de las realizaciones del reactivo de conservación de la invención con otras dos soluciones, siendo una de ellas 20% de formalina y siendo la otra una K₂EDTA con una solución de tiocianato de sodio. Las células de cáncer renal se cultivaron y se recogieron de una manera similar a las líneas celulares de cáncer de próstata arriba utilizadas. Las células se envejecieron después durante hasta 100 horas en cualquiera de TAG-1, 20% de formalina o K₂EDTA con una solución de tiocianato de sodio.

La Figura 6 muestra un gráfico de las copias del ARNm de G6PDH en las células cancerosas renales envejecidas detectadas por rtPCR a lo largo del tiempo (0 h, 24 h, 48 h, 72 h y 100 h). Las células envejecidas en la solución de formalina no tienen copias detectables de G6PDH a las 48 horas y las células envejecidas en K₂EDTA más tiocianato de sodio no tienen ARNm detectable de G6PDH a las 72 horas. Las células envejecidas en la formulación de TAG-1 todavía tienen ARNm detectable a las 100 horas.

La formulación de TAG-1 para estos experimentos comprendía leptina, trehalosa, tiocianato de sodio, EDTA, tampones, DMSO y glicerol. Las concentraciones finales de la formulación fueron tiocianato de sodio 0,01 M, EDTA 0,01 M, glicerol 0,25 M, tampones 0,001 M, leptina 0,001 M, trehalosa 0,20 M.

EJEMPLO III

El Ejemplo III es un estudio que muestra la eficacia de conservación celular de tener trehalosa y leptina en una de las realizaciones del reactivo conservante de células de tejido de acuerdo con la invención. Se utilizaron células de cáncer renal para comparar las copias del ARNm de G6PDH presentes a lo largo del tiempo (0 h, 24 h, 48 h, 72 h y 100 h) para tres formulaciones, TAG-1, TAG-1 sin trehalosa y TAG-1 sin trehalosa y leptina. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente antes de extraer el ARNm de las células renales. La Figura 7 muestra un gráfico de la comparación de las tres formulaciones del número de copias de ARNm de G6PDH presente después de que las células cancerosas renales hayan sido envejecidas (resuspendidas en la solución conservante) en una de las tres soluciones de reactivo conservantes de células. La Figura 7 muestra claramente la efectividad de tener tanto trehalosa como leptina en la formulación conservante de células. TAG-1 sin trehalosa y TAG-1 sin trehalosa y leptina no muestran copias de ARNm de G6PDH en el instante de 48 horas, mientras que las copias de ARNm de G6PDH se detectan en las células resuspendidas en la formulación de TAG-1 incluso en el instante de 100 horas.

La formulación de TAG-1 para estos experimentos comprendía leptina, trehalosa, tiocianato de sodio, EDTA, tampones, DMSO y glicerol. Las concentraciones finales de la formulación fueron tiocianato de sodio 0,01 M, EDTA 0,01 M, glicerol 0,25 M, tampones 0,001 M, leptina 0,001 M, trehalosa 0,20 M.

EJEMPLO IV

El Ejemplo IV es un estudio de micromatrices que compara patrones de expresión génica de tejido congelado instantáneamente bajo nitrógeno líquido (LN₂) con tejido mantenido en una realización de la invención, la formulación conservante de células TAG-1. La expresión del gen de ARNm se completó en una matriz 4-plex de Roche, genes 19K. La hibridación y el rastreo se realizó a través del servicio interno de expresión génica de Roche utilizando ARNm de células cancerosas de Ishikawa proporcionadas por Truckee Applied Genomics. Los resultados se analizaron extrayendo fluorescencia de la matriz después del alineamiento utilizando la normalización de cuartiles. Las llamadas al gen se generaron utilizando el algoritmo Robust Multichip Average (RMA). Las comparaciones por pares se visualizaron en gráficos de dispersión, y todos los tratamientos se compararon mediante agrupamiento jerárquico, ambos métodos estándar para la visualización de datos en matriz. El control de calidad de la matriz se logró comparando las distribuciones de expresión en 10 matrices sin valores atípicos aparentes.

La Tabla IV que figura a continuación muestra el diseño experimental de micromatrices. El tejido se envejeció en TAG-1 o se almacenó durante el tiempo especificado en LN₂.

TABLA IV

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
TAG-1	N=1	N=1	N=1	N=1	N=1
LN₂	N=1	N=1	N=1	N=1	N=1

ES 2 684 582 T3

La matriz de correlación por pares se muestra a continuación en la Tabla V en forma tabular y gráfica. Los grupos experimentales se agruparon entre sí y, en general, mostraron una buena correlación interna.

TABLA V

	LN2 0 h	LN2 24 h	LN2 48 h	LN2 72 h	LN2 96 h	TAG 0 h	TAG 24 h	TAG 48 h	TAG 72 h	TAG 96 h
LN2 0 h	1	0,987	0,984	0,981	0,975	0,971	0,94	0,922	0,873	0,89
LN2 24 h	0,987	1	0,99	0,991	0,982	0,974	0,951	0,929	0,881	0,895
LN2 48 h	0,984	0,99	1	0,992	0,984	0,97	0,947	0,925	0,876	0,891
LN2 72 h	0,981	0,991	0,992	1	0,986	0,966	0,946	0,926	0,877	0,892
LN2 96 h	0,975	0,982	0,984	0,986	1	0,954	0,94	0,918	0,886	0,897
TAG 0 h	0,971	0,974	0,97	0,966	0,954	1	0,96	0,934	0,871	0,885
TAG 24 h	0,94	0,951	0,947	0,946	0,94	0,96	1	0,97	0,918	0,926
TAG 48 h	0,922	0,929	0,925	0,926	0,918	0,934	0,97	1	0,951	0,965
TAG 72 h	0,873	0,881	0,876	0,877	0,886	0,871	0,918	0,951	1	0,982
TAG 96 h	0,89	0,895	0,891	0,892	0,897	0,885	0,926	0,965	0,982	1

5 Modelos de regresión- Para cada uno de los 24.000 genes y cada uno de los dos grupos experimentales, se ajustó un modelo de regresión lineal, con el tiempo como la variable independiente y la expresión como la variable dependiente. El modelo proporcionó una pendiente y un valor p asociado para cada uno de los genes. Las pendientes y los valores p se resumen en la Tabla VI que figura a continuación.

TABLA VI

	Genes P< 0,05	Genes P< 0,01	Genes P< 0,001
TAG-1	5811	1696	197
LN2	3101	786	85
Intersección	825	66	0

	Genes P< 0,05 Pendiente > 0	Genes P< 0,05 Pendiente < 0	Genes P<0,05 Total
TAG-1	2597	3214	5811
LN2	1541	1560	3101

	Pendiente Absoluta, Todos los Genes (Mediano, Cuartil Primero a Tercero)
TAG-1	0,13 (0,009 a 0,23)
LN2	0,09 (0,04 a 0,15)

	Unidades para la pendiente = log2 unidades de expresión al día
TAG-1	7% (6% a 13,1%)
LN2	6% (3% a 11%)

Unidades para la pendiente = porcentaje de cambio al día

10 Variación a Través del Tiempo - Para cada uno de los 24.000 genes y cada uno de los dos grupos experimentales, se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación a lo largo de los cinco instantes, véase la TABLA VII que figura a continuación. Estos resultados fueron consistentes con los resultados del modelo de regresión que se muestran en la TABLA VI anterior.

TABLA VII

	Mediana de Desviación Estándar en el Tiempo del Gen (Primer a Tercer Cuartil)	Mediana del Coeficiente de Variación en el Tiempo del Gen (Primer a Tercer Cuartil)
TAG-1	0,484 (0,210 a 0,421)	32,8% (15,0% a 28,1%)
LN2	0,277 (0,199 a 0,376)	19,0% (13,7% a 25,7%)

5 Las diferencias medias de los dos conjuntos se muestran en la TABLA VIII que figura a continuación. En general, aunque hubo una diferencia de medias significativa entre los grupos, LN2 y TAG-1, las diferencias estuvieron bien equilibradas entre las diferencias positivas y negativas.

10 La congelación de los tejidos en nitrógeno líquido es el patrón de oro para mantener el tejido celular intacto. Los experimentos anteriores comparan la efectividad del almacenamiento de tejido en TAG-1 frente a nitrógeno líquido. Los resultados anteriores indican que la expresión del gen no se excede por arriba o por abajo en las células almacenadas en TAG-1 en comparación con las almacenadas en nitrógeno líquido, lo que indica que TAG-1, a lo largo del período de prueba era equiparable al almacenamiento de nitrógeno líquido para conservar la integridad celular en el nivel de expresión génica.

15 La formulación de TAG-1 para estos experimentos comprendía leptina, trehalosa, tiocianato de sodio, EDTA, tampones, DMSO y glicerol. Las concentraciones finales de la formulación fueron tiocianato de sodio 0,01 M, EDTA 0,01 M, glicerol 0,25 M, tampones 0,001 M, leptina 0,001 M, trehalosa 0,20 M.

EJEMPLO V

20 El Ejemplo V es un estudio para evaluar el comportamiento de los medios en cultivos en rodajas de tejidos de vejiga y cáncer de próstata ex vivo. Tejidos de tumor de vejiga y próstata se almacenan durante diversos períodos de tiempo a temperatura ambiente en una realización de la invención, TAG-1. La viabilidad de corte a lo largo del tiempo se evalúa mediante el examen de la morfología del tejido con microscopía estándar, ensayo de MTT para la viabilidad celular, ensayo TUNEL para la apoptosis y evaluación de proliferación Ki67 utilizando la inmunotinción. Los experimentos de matriz de expresión génica también se incluirán en la evaluación de la viabilidad de los tejidos cancerosos.

25 Se realizarán comparaciones de cultivos en rodajas utilizando un sistema de membrana en el que se mantendrán rodajas de tejido (400-800 micras de espesor) mediante el acceso a TAG-1 a través de una membrana que cubre un pocillo. El protocolo optimizado con TAG-1 se probará con medicamentos de quimioterapia y muestras clínicas.

30 La metodología general comprende obtener muestras de tejido de cáncer de vejiga y de próstata de ratones NSG-PDX JAX o núcleos de biopsia de cáncer de pacientes. El tejido se procesará como rodajas o como bloques cortados, y se cultivará en placas de cultivo en una matriz tridimensional o en una membrana. Las rodajas normales de tejido de los mismos pacientes servirán como controles para determinar las diferencias en el comportamiento del cáncer y el tejido normal. Además, se analizarán células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aisladas para determinar su correlación con el comportamiento de células tumorales. Las muestras de tejido se ensayan a diversos intervalos de tiempo de hasta ocho días en soluciones de solución salina/timerosal estándar, solución de K₂EDTA y TAG-1 para la comparación de TAG-1 a los protocolos de almacenamiento estándar.

35 La formulación de TAG-1 para estos experimentos comprendía leptina, trehalosa, tiocianato de sodio, EDTA, tampones, DMSO y glicerol. Las concentraciones finales de la formulación fueron tiocianato de sodio 0,01 M, EDTA 0,01 M, glicerol 0,25 M, tampones 0,001 M, leptina 0,001 M, trehalosa 0,20 M.

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo para una muestra de tejido canceroso extirpado quirúrgicamente para permitir el análisis de la expresión génica, comprendiendo el reactivo los componentes de:
al menos un caótropro;
- 5 al menos un cosmótropro;
un quelante;
un tampón;
un sustrato de apoptosis, y
un modulador metabólico;
- 10 en donde el sustrato de apoptosis es leptina; y
en donde el al menos un cosmótropro es α,α -trehalosa.
2. El reactivo de la reivindicación 1, en donde la concentración final para el al menos un caótropro es de 0,1 molar a 2 molar, la concentración final para el al menos un cosmótropro es de 0,1 molar a 2 molar, la concentración final para el quelante es de 0,1 molar a 2 molar, y la concentración final para el sustrato de la apoptosis es de 0,001 molar a 0,5 molar.
- 15 3. El reactivo de la reivindicación 1, en donde el quelante se encuentra en una concentración final de al menos 0,01 M.
4. El reactivo de la reivindicación 2, en donde el al menos un caótropro es tiocianato de sodio, el al menos un cosmótropro es una combinación de glicerol y α,α -trehalosa, el quelante es EDTA, el tampón es fosfato de sodio y el modulador metabólico es DMSO.
- 20 5. El reactivo de la reivindicación 1, en donde el caótropro se selecciona del grupo que consiste en tiocianato de sodio, H_2PO_4^- , HCO_3^- , I^- , Cl^- , NO_3^- , NH_4^+ , Cs, K^+ , $(\text{NH}_4)\text{C}^+$ guanidinio, todas las sales de guanidinio, Br y Rb.
6. El reactivo de la reivindicación 1, en donde un cosmótropro adicional se selecciona del grupo que consiste en glicerol, trimetilamina N-óxido, ectoína, 3-dimetilsulfoniopropionato, glucosa, dextrano y D-lactosa.
- 25 7. El reactivo de la reivindicación 1, en donde el quelante se selecciona del grupo que consiste en EDTA, EGTA y BABTA.
8. El reactivo de la reivindicación 1, en donde el tampón se selecciona del grupo que consiste en fosfato de potasio monobásico y fosfato de potasio tribásico, BIS-TRIS, BIS-TRIS propano, HEPES, sal sódica HEPES, MES, sal sódica MES, MOPS, sal sódica MOPS, sal sódica y tampón fosfato de sodio.
- 30 9. El reactivo de la reivindicación 1, en donde el modulador metabólico se selecciona del grupo que consiste en disolventes apróticos polares, DMSO, acetona, N,N-dimetilformamida y acetonitrilo.
10. Un método de producir un reactivo para la estabilización, conservación y viabilidad de tejido canceroso que ha sido quirúrgicamente extirpado, comprendiendo el método:
- proporcionar al menos un caótropro;
- 35 proporcionar al menos un cosmótropro;
proporcionar un quelante;
proporcionar un tampón;
proporcionar un sustrato de apoptosis;
proporcionar un modulador metabólico; y
- 40 mezclar el caótropro, cosmótropro, quelante, tampón, sustrato de apoptosis y el modulador metabólico en un orden específico para permitir el análisis de la expresión génica de la muestra de tejido canceroso extirpado quirúrgicamente dispuesta en el reactivo;
en el que el sustrato de apoptosis es leptina; y
en el que el al menos un cosmótropro es α,α -trehalosa.
- 45 11. El método de la reivindicación 10, en el que la concentración final del caótropro es de 0,1 molar a 2 molar, la concentración final para el cosmótropro es de 0,1 molar a 2 molar, la concentración final del quelante es de 0,1 M a 2 molar, y la concentración final para el sustrato de la apoptosis es de 0,001 molar a 0,5 molar.

12. El método de la reivindicación 10, en el que la concentración final del quelante es de al menos 0,01 M.
13. El método de la reivindicación 10, en el que el caótropro se selecciona del grupo que consiste en tiocianato de sodio, H_2PO_4^- , HCO_3^- , I^- , Cl^- , NO_3^- , NH_4^- , Cs, K^+ , $(\text{NH}_4)\text{C}^+$ guanidinio, todas las sales de guanidinio, Br y Rb.
- 5 14. El método de la reivindicación 10, en el que un cosmótropro adicional se selecciona del grupo que consiste en glicerol, trimetilamina N-óxido, ectoína, 3-dimetilsulfoniopropionato, glucosa, dextrano y D-lactosa.
15. El método de la reivindicación 10, en el que el quelante se selecciona del grupo que consiste en EDTA, EGTA y BABTA.
- 10 16. El método de la reivindicación 10, en el que el tampón se selecciona del grupo que consiste en fosfato de potasio monobásico y fosfato de potasio tribásico, BIS-TRIS, BIS-TRIS propano, HEPES, sal sódica HEPES, MES, sal sódica MES, MOPS, sal sódica MOPS, sal sódica y tampón fosfato de sodio.
17. El método de la reivindicación 10, en el que el modulador metabólico se selecciona del grupo que consiste en disolventes apróticos polares, DMSO, acetona, N,N-dimetilformamida y acetonitrilo.

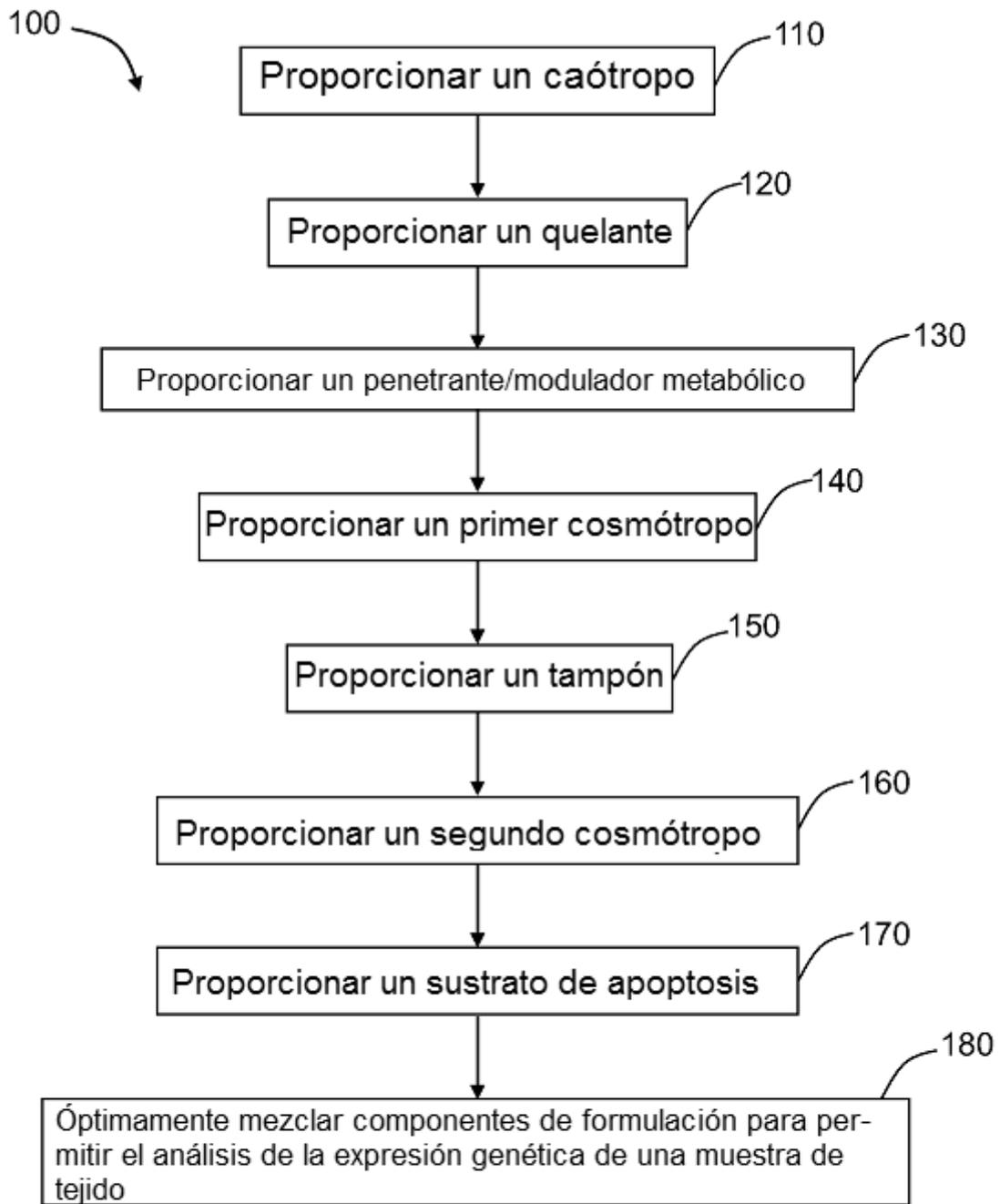


Figura 1

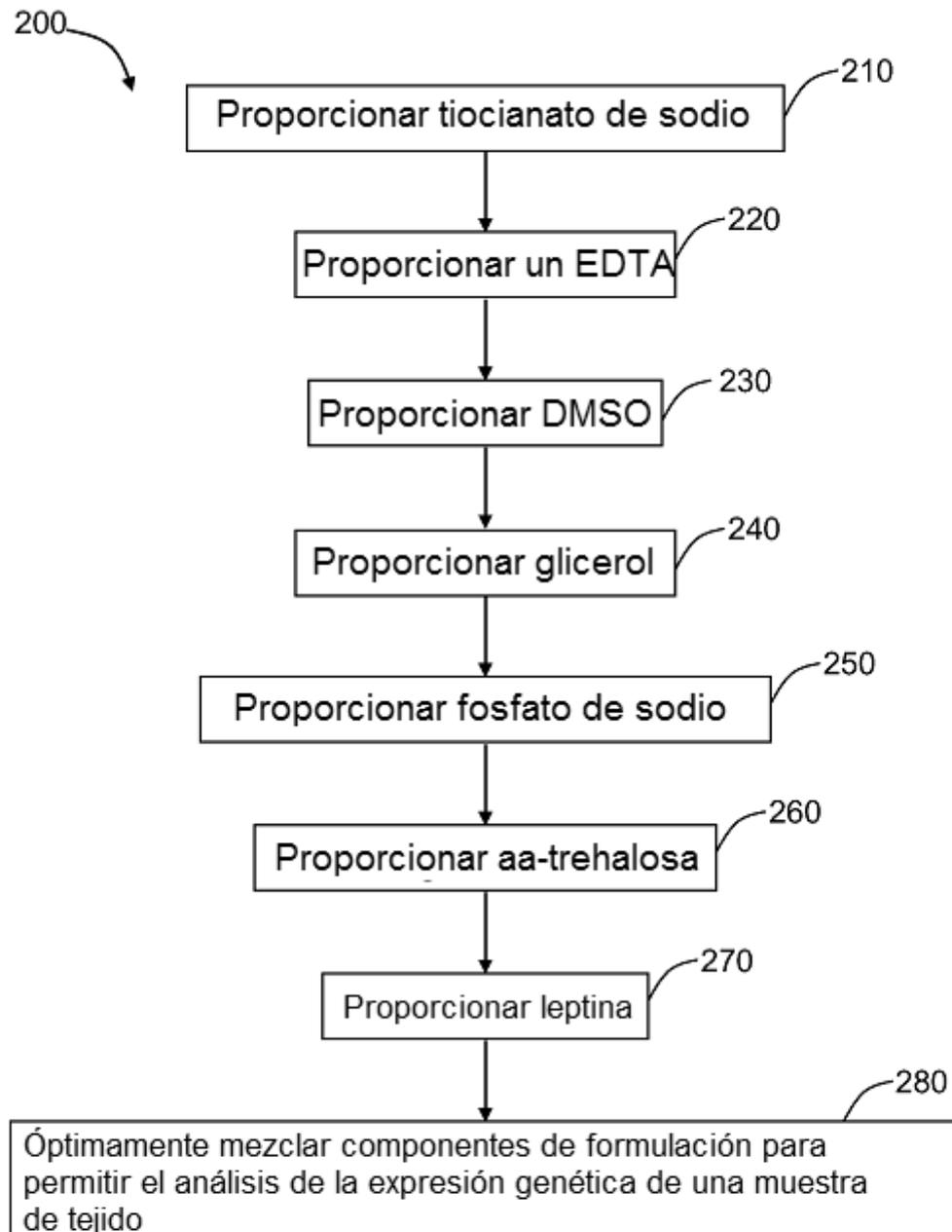


Figura 2

Agua

Lista de Materiales

Artículo	Lote Número	Parte Número	Fecha Exp.	Cantidad por 1000 ml	Cantidad Utilizada	Operario	Verificado
Tiocianato de Sodio				8.3 gm			
EDTA 0.1 M				100 ml			
Agua Purificada USP (Introducir Fecha Lote N°)				CS 1000 ml			
DMSO				20 ml			
Glicerol				25 ml			
K1PO4 Fosfato de Potasio Monobásico				3.93 gm			
K3PO4 Fosfato de Potasio Tribásico				5.02 gm			
Trehalosa dihidrato				7.56 gm			
Lepina				50µl			

Cálculos realizados por Cálculos verificados por

Texto	Fecha	Operario
1. Asignar una fecha de expiración de 1 año desde fecha de inicio Fecha expiración
Registrar el volumen preparado
Fecha de inicio

Expedido por
 Fecha
 Todas las Páginas Aduntas SI No
 Lote N° Correctas todas las Páginas SI No
 Fecha expiración Correcta SI No
 Documentación Verificada por Fecha Verificada

Figura 3A

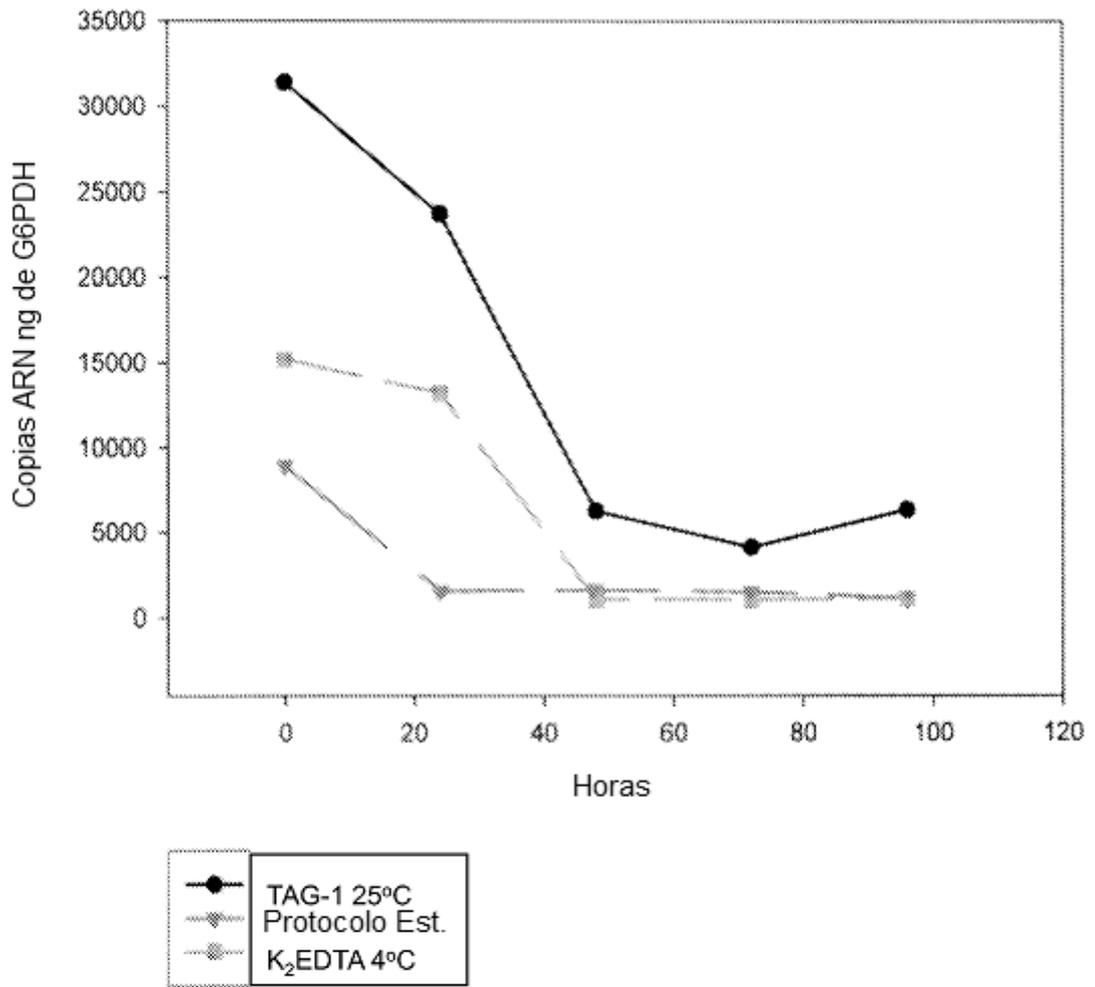


Figura 4

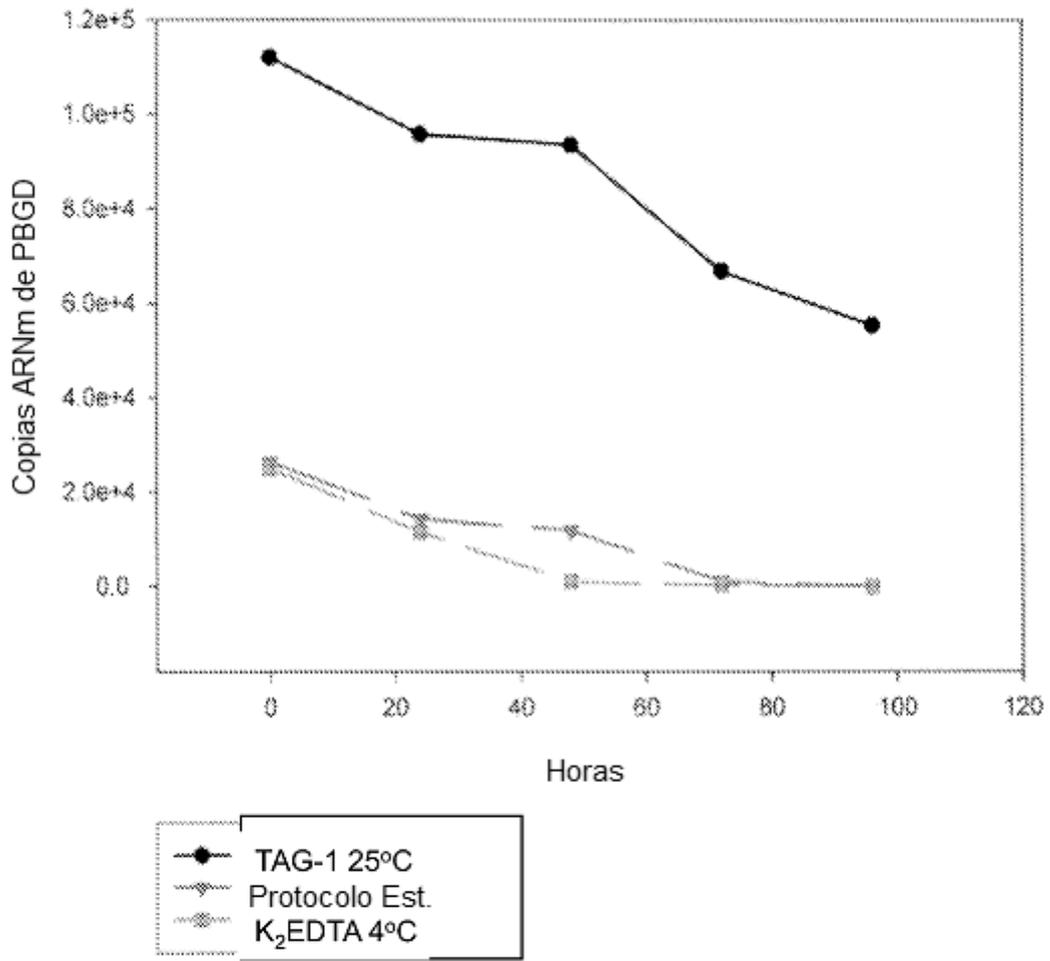


Figura 5

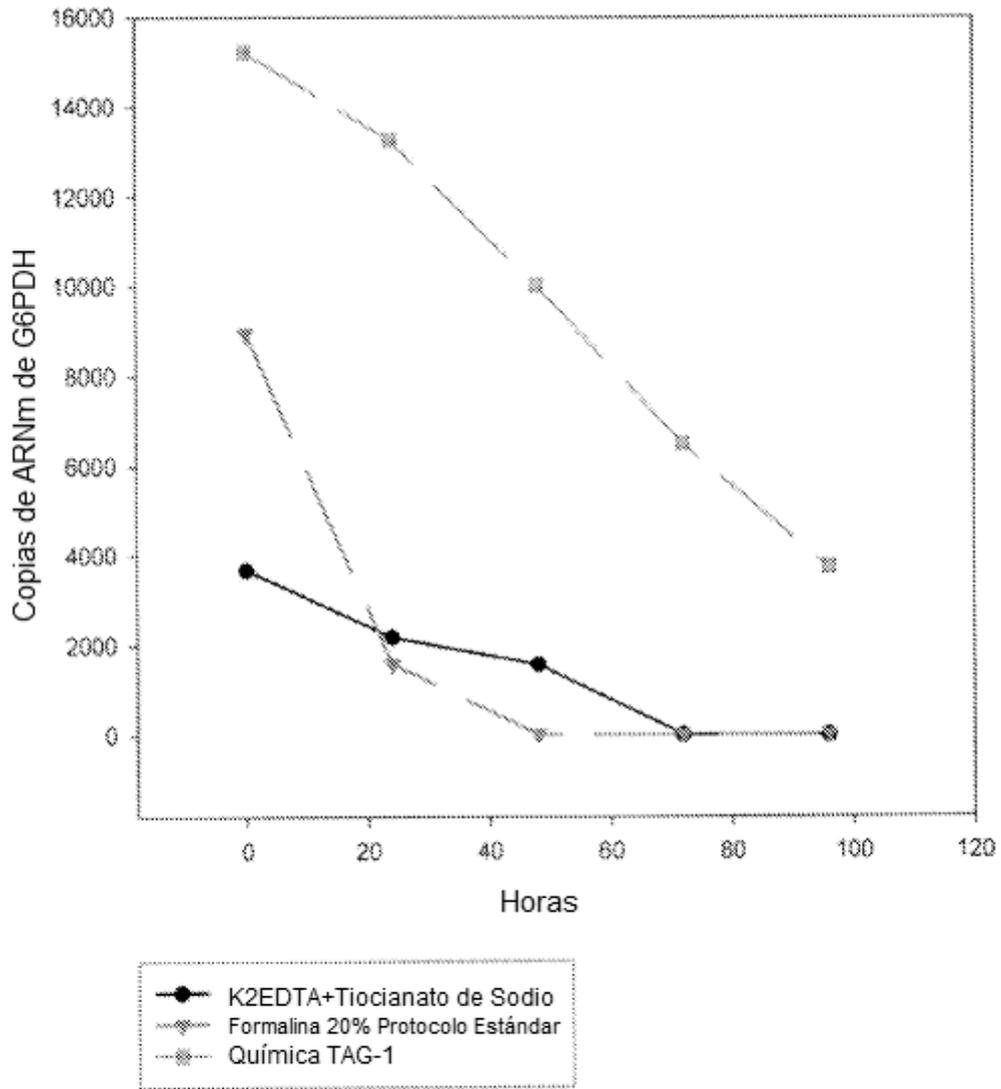


Figura 6

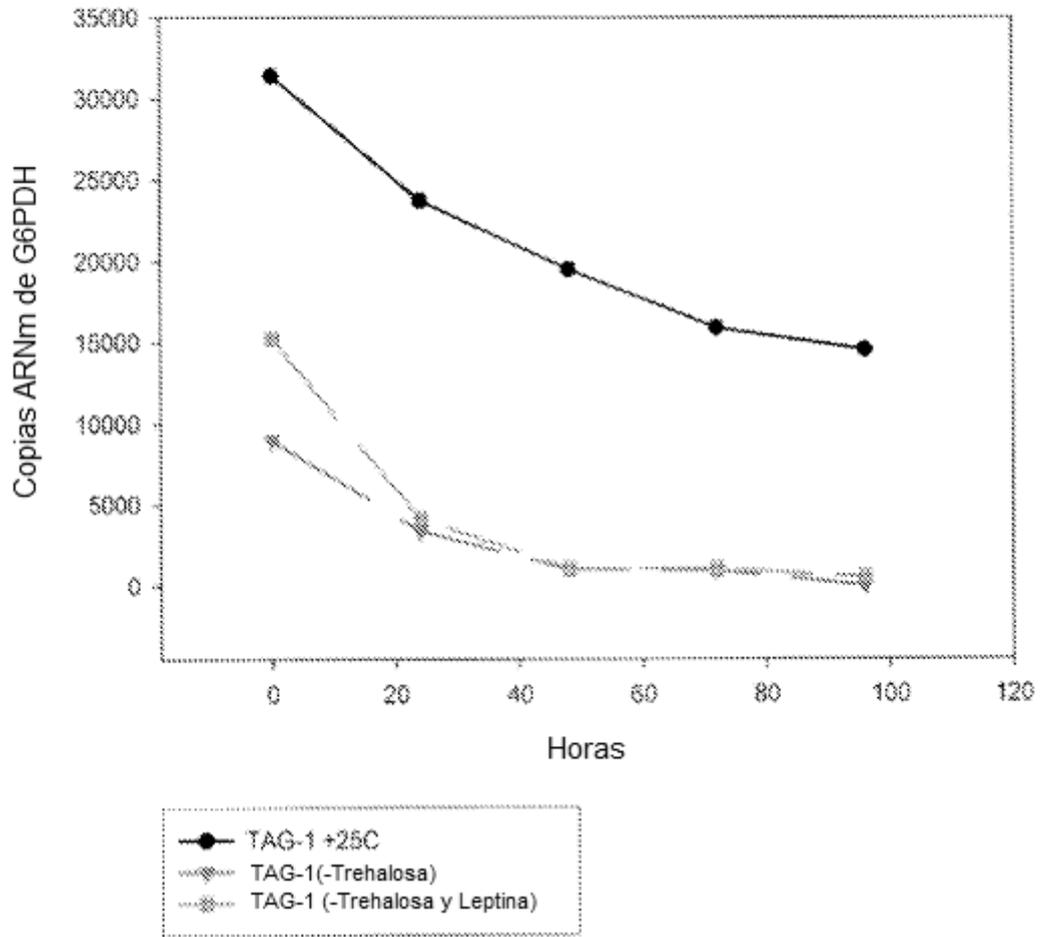


Figura 7