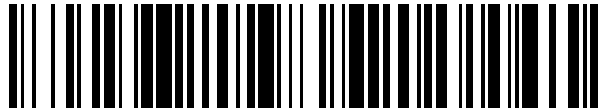


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 732**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.01.2014 E 14151082 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2765203**

54 Título: **Dispositivo de recolección de sangre para estabilizar ARN libre de células en sangre durante el transporte y almacenamiento de muestras**

30 Prioridad:

14.01.2013 US 201361751983 P

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

19.10.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RYAN, WAYNE L.;
FERNANDO, ROHAN y
QIN, JIANBING**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 686 732 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

Dispositivo de recolección de sangre para estabilizar ARN libre de células en sangre durante el transporte y almacenamiento de muestras

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la protección y regulación de materiales de ácido nucleico durante la recolección, almacenamiento y transporte.

Antecedentes de la invención

El ARN libre de células (ARNcf) se produce naturalmente en la sangre y tiene el potencial de usarse para el diagnóstico prenatal no invasivo y para la detección, el control y el análisis molecular de biomarcadores para el cáncer y otras enfermedades. Dado que los objetivos de ARNcf se presentan en la sangre en cantidades bajas, es importante minimizar la liberación de ARN celular en una muestra de sangre después de la extracción de sangre. Las condiciones pre-analíticas pueden afectar la liberación de ARN de fondo (por ejemplo, celular) en plasma, disminuyendo la proporción de objetivos específicos de ARNcf y enmascarando su detección en aplicaciones posteriores (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa, citometría de flujo y otros protocolos de análisis). Debido a la baja abundancia de los biomarcadores de ARNcf se recomienda minimizar los niveles de fondo de ARN genómico para proporcionar mediciones precisas de los niveles de ARNcf. Por lo tanto, es necesario abordar varios problemas pre-analíticos que surgen durante el tiempo que transcurre entre la extracción de sangre y el aislamiento del ARN. Estos incluyen retrasos en el procesamiento de sangre, temperatura de almacenamiento de sangre y agitación de la muestra durante el transporte y transporte de sangre. Tales condiciones pueden alterar los niveles de ARN plasmático al provocar la liberación de ARN celular de las células sanguíneas que ocultan el verdadero ARNcf. Por lo tanto, existe una clara necesidad de protocolos que estabilicen el ARNcf en la sangre, así como que mantengan la integridad del ARNcf durante el procesamiento y transporte de la muestra. *Fernando et al., 2012* (Clinical Biochemistry) divulga la estabilización del ARN libre de células en muestras de sangre. Sin embargo, esta publicación no revela la composición química que se usa para estabilizar las muestras.

Sumario de la invención

Los dispositivos de recolección de ARN libre de células que se divulgan aquí previenen aumentos en los niveles de ARN de fondo que causan fluctuaciones de temperatura o agitación que se pueden producir durante el almacenamiento y transporte de muestras de sangre. Estos dispositivos de recolección de sangre proporcionan un procedimiento para la obtención de muestras de ARNcf estabilizadas de alta calidad para la detección de objetivos de ARN raros y la determinación de concentraciones precisas de ARNcf.

En un aspecto, las presentes enseñanzas contemplan un procedimiento para manipular una muestra biológica en un sitio remoto para análisis de ARN libre de células, que comprende las etapas de: extraer directamente una muestra de sangre a un dispositivo estabilizador de recolección de sangre en un sitio de extracción de sangre, incluyendo tal dispositivo de recolección de sangre una cantidad eficaz de un agente estabilizante seleccionado de imidazolidinilurea y glicina y diazolidinilurea y glicina, incluyendo la muestra de sangre una cantidad inicial de ARN de fondo y una cantidad de ARN libre de células; tratar uno o más componentes de la muestra con el agente estabilizante para mitigar la propensión del ARN de fondo dentro de la muestra a aumentar con respecto a la cantidad inicial; transportar la muestra, mientras permanece en el dispositivo de recolección de sangre, para la entrega en el sitio en el que se va a realizar el análisis de ARN libre de células, durante el cual, la etapa de transporte, el dispositivo de recolección de sangre y la muestra contenida en él se somete a una o más temperaturas dentro un intervalo de 5 a 35 °C; realizar análisis de ARN libre de células en la muestra al menos 24 horas después de la extracción de la muestra.

La muestra de sangre incluye una cantidad inicial de ARN de fondo y una cantidad de ARN libre de células. El procedimiento incluye la etapa de manipulación de la muestra, mientras permanece en el dispositivo de recolección de sangre, para la entrega en un sitio en el que se debe realizar el análisis de ARN libre de células, durante el cual, la etapa de transporte, el dispositivo de recolección de sangre y la muestra contenida en él se someten a una o más temperaturas dentro de un intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 °C. El procedimiento incluye realizar análisis en el ARN libre de células desde dentro de la muestra.

El dispositivo estabilizador de recolección de sangre incluye imidazolidinilurea y glicina o diazolidinilurea y glicina. El dispositivo estabilizador de recolección de sangre puede incluir también ácido aurintricarboxílico y fluoruro de sodio. El dispositivo estabilizador de recolección de sangre puede incluir alguna combinación de diazolidinilurea, imidazolidinilurea, ácido aurintricarboxílico, gliceraldehído y fluoruro de sodio, y EDTA.

Durante la etapa de manipulación de la muestra (que incluye pero no se limita al transporte de la muestra), se puede someter la muestra a una temperatura inferior a la temperatura ambiente (por ejemplo, por debajo de aproximadamente 15 °C, 10 °C o incluso 7 °C) a lo largo de al menos una parte (por ejemplo, al menos una décima, una cuarta parte o la mitad) de la duración de la etapa de manipulación. Durante la etapa de manipulación de la muestra, se puede someter la muestra a una temperatura superior a la temperatura ambiente (por ejemplo, superior

a aproximadamente 25 °C o incluso a 30 °C) a lo largo de al menos una parte (por ejemplo al menos una décima, una cuarta parte o la mitad) de la duración de la etapa de manipulación. Durante la etapa de manipulación de la muestra, se puede someter la muestra a periodos de vibración y/o agitación irregulares y/o no controlados. La duración de la etapa de manipulación es de al menos aproximadamente 24 horas. La duración de la etapa de manipulación puede ser de al menos aproximadamente 72 horas. La etapa de realizar un análisis de ARN libre de células en la muestra puede incluir la realización de una PCR de transcriptasa en tiempo real (RT-qPCR). La etapa de realizar el análisis de ARN libre de células en la muestra puede incluir la realización de PCR de transcriptasa en tiempo real (RTqPCR) para cuantificar el ARNm para c-fos, β -actina y/o ARNr 18S. La muestra que se trata con el agente estabilizante puede exhibir un aumento en los números de copias de ARNm que es menor del 50% de una muestra que se manipula en ausencia de la etapa de tratamiento. La etapa de manipulación puede incluir transportar la muestra desde un sitio de extracción de sangre a un sitio para análisis de ARN libre de células en un vehículo de transporte (por ejemplo, que se selecciona de un camión, un tren, un avión, un helicóptero, un automóvil, una embarcación o similar).

Las enseñanzas aquí contemplan además que los procedimientos que se divulgan aquí dan como resultado que el número de copias de ARNm celular por ml de plasma dentro de la muestra de sangre permanece sustancialmente igual antes del transporte y posterior al transporte. Las enseñanzas aquí contemplan además que los procedimientos que se divulgan aquí dan como resultado que el número de copias de ARNm c-fos por ml de plasma dentro de la muestra de sangre permanece sustancialmente igual antes del transporte y posterior al transporte. El número de copias de ARNm β -Actina por ml de plasma dentro de la muestra de sangre puede permanecer sustancialmente igual antes del transporte y posterior al transporte. El número de copias de ARNr 18s por ml de plasma dentro de la muestra de sangre puede permanecer sustancialmente igual antes del transporte y posterior al transporte. La cantidad de ARN de fondo en la muestra de sangre puede permanecer sustancialmente igual antes del transporte y posterior al transporte. El número de copias de ARNm c-fos por ml de plasma dentro de la muestra de sangre puede permanecer sustancialmente igual cuando se almacena a 6 °C, 22 °C y 30 °C durante 3 días. El número de copias de ARNm β -Actina por ml de plasma dentro de la muestra de sangre puede permanecer sustancialmente igual cuando se almacena a 6 °C, 22 °C y 30 °C durante 3 días. La cantidad de ARN de fondo en la muestra de sangre puede permanecer sustancialmente igual cuando se almacena a 6 °C, 22 °C y 30 °C durante 3 días.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1 - Registro de temperatura de transporte - que muestra la temperatura de las muestras de sangre que se seleccionan a lo largo del tiempo durante el transporte.

Figura 2A - Número de copias de ARNm C-fos por mililitro de plasma - que muestra el número de copias de ARNm (usando marcadores c-fos) en muestras de sangre iniciales, no transportadas y transportadas en contacto con EDTA y las mismas muestras de sangre que se localizan en el dispositivo estabilizador de recolección de sangre que se enseña aquí.

Figura 2B - Número de copias de ARNm β -Actina por mililitro de plasma - que muestra el número de copias de ARNm (usando marcadores de β -Actina) en muestras de sangre iniciales, no transportadas y transportadas en contacto con EDTA y las mismas muestras de sangre que se localizan en dispositivos estabilizadores de recolección de sangre que se enseñan aquí.

Figura 2C - Número de copias de ARNr 18s por mililitro de plasma - que muestra el número de copias de ARNr (usando marcadores de ARNr 18s) en muestras de sangre iniciales, no transportadas y transportadas en contacto con EDTA y las mismas muestras de sangre que se localizan en los dispositivos estabilizadores de recolección de sangre.

Figura 3A - Número de copias de ARNm C-fos por mililitro de plasma - que muestra el número de copias de ARNm (usando marcadores de ARNm C-fos) en la extracción inicial, temperatura de almacenamiento de 6°C, temperatura de almacenamiento de 22°C y muestras de sangre a temperatura de almacenamiento de 30°C en contacto con EDTA y lo mismo para muestras de sangre que se localizan en los dispositivos estabilizadores de recolección de sangre que se enseñan aquí.

Figura 3B - Número de copias de ARNm β -Actina por mililitro de plasma - que muestra el número de copias de ARNm (usando marcadores de ARNm β -Actina) en la extracción inicial, temperatura de almacenamiento de 6°C, temperatura de almacenamiento de 22°C y muestras de sangre a temperatura de almacenamiento de 30°C en contacto con EDTA y lo mismo para muestras de sangre que se localizan en los dispositivos estabilizadores de recolección de sangre que se enseñan aquí.

Descripción detallada

Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de prioridad del Serial de Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61 / 751.983, presentada el 14 de enero de 2013. Esta solicitud se relaciona también con la patente de Estados Unidos N° 8.304.187, presentada el 11 de febrero de 2010.

Las explicaciones e ilustraciones que se presentan aquí se destinan a familiarizar a otros expertos en la materia con las enseñanzas, sus principios y su aplicación práctica. Los expertos en la técnica pueden adaptar y aplicar las enseñanzas en sus numerosas formas, según sea más adecuado para los requisitos de un uso particular. En consecuencia, las realizaciones específicas de las presentes enseñanzas tal como se exponen no pretenden ser exhaustivas o limitativas de las enseñanzas. El alcance de las enseñanzas se debería determinar, por lo tanto, no con referencia a la descripción anterior, sino que se debería determinar con referencia a las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de los equivalentes a los que tienen derecho tales reivindicaciones.

Estudios recientes han demostrado que el plasma sanguíneo contiene objetivos de baja abundancia de ARNcf, un ejemplo de ello es el ARN derivado de células tumorales circulantes. La detección de la reacción en cadena de la polimerasa de estos objetivos libres de células dentro de una gran cantidad de ARN de fondo celular es un desafío, que requiere protocolos especializados y/o grandes volúmenes de material de partida. Como resultado, la minimización de la liberación de ARN celular a partir de células nucleadas (por ejemplo, ARN de fondo) es esencial para un análisis preciso del ARNcf verdadero.

En la práctica actual, se recomienda que las muestras de sangre se centrifuguen inmediatamente para aislar y congelar el plasma para prevenir la contaminación por ARN de fondo del ARNcf durante el procesamiento, transporte y almacenamiento de la muestra. Sin embargo, los ejemplos que se discuten aquí demuestran que el procedimiento de recolección de sangre estabilizante de la presente invención previene la liberación de ARN de fondo en la flebotomía posterior de plasma durante hasta 3 días, evitando así estos requisitos intensivos de mano de obra (por ejemplo, centrifugación y congelación). Usar el procedimiento estabilizador de recolección de sangre que se describe aquí, vuelve posible el almacenamiento ex vivo a temperatura ambiente, permitiendo flexibilidad para transportar extracciones de sangre fuera del sitio a laboratorios centrales para el análisis más adelante del ARNcf sin centrifugaciones preliminares o crioconservación.

Como se mencionó anteriormente, se requiere comúnmente el transporte de muestras de sangre desde el sitio de flebotomía a otra instalación para las pruebas de diagnóstico molecular. A este respecto, varios estudios se han centrado en variables pre-analíticas que podrían comprometer la precisión de las mediciones de ARNcf, incluida la selección de dispositivos de recolección de sangre, almacenamiento de muestras y condiciones de transporte. Cada uno de estos parámetros afecta la cantidad de lisis de células sanguíneas nucleadas que se produce después de la flebotomía. Dicha lisis de células nucleadas conduce a la liberación de ARN celular, elevando los ARN de fondo y suprimiendo la medición de ARNcf verdadero y exacto. En consecuencia, la medición inexacta de ARNcf reduce o incluso elimina la utilidad de tales mediciones para el diagnóstico de enfermedades, pruebas genéticas u otros fines. El procedimiento que se divulga aquí permite minimizar los aumentos de ARN de fondo usando un procedimiento estabilizador de recolección de sangre con la capacidad de estabilizar las células sanguíneas nucleadas durante el movimiento de transporte y las fluctuaciones de temperatura. Los ejemplos que se discuten aquí evalúan la capacidad del procedimiento estabilizador de recolección de sangre que se enseña aquí y los tubos EDTAK₃ tradicionales para conservar el ARNcf y prevenir la liberación de ARN de fondo cuando se somete a condiciones que pueden ocurrir durante el almacenamiento y transporte de la muestra.

Durante el transporte de las muestras, la agitación puede alterar la integridad de las células sanguíneas nucleadas y comprometer la precisión de la prueba de muestra, como se describió anteriormente. Para los ejemplos que se describen aquí, se transportaron las muestras de sangre en tubos EDTAK₃ o en el dispositivo estabilizador de recolección de sangre que se enseña aquí. Los números de copia de ARNm o ARNr resultantes (que se miden por marcadores de ARN c-fos, β -Actina o ARN 18s) mostraron un aumento de ARN de fondo para las muestras que se transportaron en los tubos EDTAK₃ en comparación con aquellas muestras en el dispositivo estabilizador de recolección de sangre que se enseña aquí. Las muestras del dispositivo estabilizador de recolección de sangre mostraron números de copia de ARNm o ARNr estables antes y después del transporte. Esto sugiere que se produjo una ruptura de células nucleadas en muestras de sangre que se transportaron en EDTAK₃ que conduce a la liberación de ARN celular, ya que esto no se produjo en las muestras que se sometieron al procedimiento de esta invención dentro del dispositivo estabilizador de recolección de sangre.

La variación en la temperatura de almacenamiento de la muestra es otra condición posterior a la flebotomía que puede causar cambios indeseables en la concentración de ARN de fondo. Aquí, se estudió el efecto de tres temperaturas de almacenamiento diferentes en los números de copias de ARNm de sangre que se extrae en EDTAK₃ y el dispositivo estabilizador de recolección de sangre que se describe aquí. Tras la extracción de sangre, se incubaron las muestras a 6 °C, 22 °C o 30 °C durante 3 días. Se observaron aumentos significativos en las concentraciones de ARN de fondo de la muestra de sangre EDTAK₃ a 6 °, 22 °C y 30 °C para el día 3 (medido por los marcadores c-fos y β -Actina) (Figuras 3A-3B). Como se muestra, la sangre que se somete al procedimiento de esta invención que se extrae en el dispositivo estabilizador de recolección de sangre no mostró un aumento significativo en el número de copias de ARNm a cualquier temperatura en el día 3.

El dispositivo estabilizador de recolección de sangre que se usa en el procedimiento de esta invención puede incluir imidazolidinilurea y glicina o diazolidinilurea y glicina. El dispositivo estabilizador de recolección de sangre puede incluir también ácido aurintricarboxílico y fluoruro de sodio. El dispositivo estabilizador de recolección de sangre puede incluir también alguna combinación de diazolidinilurea, imidazolidinilurea, ácido aurintricarboxílico, gliceraldehído y fluoruro de sodio, y EDTA. La imidazolidinilurea puede estar presente en una cantidad de

- aproximadamente 100 g/l a aproximadamente 1000 g/l. La imidazolidinilurea puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 300 g/l a aproximadamente 600 g/l. La diazolidinilurea puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 800 g/l. La diazolidinilurea puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 100 g/l a aproximadamente 400 g/l. El EDTA puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 20 g/l a aproximadamente 150 g/l. El EDTA puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 100 g/l. La glicina puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 150 g/l. La glicina puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 35 g/l a aproximadamente 100 g/l. El gliceraldehído puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 150 g/l. El gliceraldehído puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 35 g/l a aproximadamente 100 g/l. El ácido aurintricarboxílico puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 40 g/l. El ácido aurintricarboxílico puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l. El fluoruro de sodio puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 30 g/l. El fluoruro de sodio puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,5 g/l a aproximadamente 10 g/l.
- 15 Para los ejemplos a continuación, se reclutaron donantes de sangre con el consentimiento informado de Streck, Inc. en Omaha, NE. Los donantes fueron tanto hombres como mujeres y se presume que están sanos. Todas las extracciones se realizaron mediante venopunción.

Ejemplos

- 20 Para estudiar el efecto de la temperatura de almacenamiento en la concentración de ARNcf, se almacenaron las muestras a 6 °, 22 ° y 30 °C durante 3 días. Para cada experimento, se separó el plasma en varios puntos de tiempo por centrifugación a 300 x g durante 20 minutos, seguido por la transferencia a un nuevo tubo de la capa superior de plasma, y luego se volvió a centrifugar a 5.000 x g durante 10 minutos. Se extrajo el plasma total del ARNcf y se utilizó la PCR de transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR) para cuantificar los ARNm para c-fos, β-actina y ARNr 18S.
- 25 Para estudiar el efecto del transporte, se extrajo sangre de 10 donantes. Se extrajo sangre de cada donante en tres tubos EDTAK₃ de 10 ml y tres dispositivos estabilizadores de recolección de sangre de 10 ml de acuerdo con las enseñanzas aquí. Se procesaron un tubo EDTAK₃ y un dispositivo estabilizador de recolección de sangre de cada donante en un lapso de dos horas (2 h) de extracción de sangre. Se transportaron otro tubo EDTAK₃ y un dispositivo estabilizador de recolección de sangre de cada donante con un dispositivo de seguimiento de temperatura a un laboratorio en Springfield, MA y de regreso a Nebraska durante el transcurso de tres días. Se mantuvieron el tubo EDTAK₃ restante y el dispositivo estabilizador de recolección de sangre de cada donante a 22 °C durante tres días y se procesaron con los tubos de sangre transportada que se devolvieron.

Resultados

- 35 El dispositivo de seguimiento de temperatura que se mantuvo dentro del contenedor de transporte mostró un intervalo de temperatura de 15 ° - 29 °C (véase la Fig. 1). Como se demuestra en las Figs. 2A-2C, las muestras de sangre que se transportaron en los tubos EDTAK₃ mostraron un aumento significativo en los números de copias de ARNm o ARNr para β-actina, c-fos y ARNr 18S. Por el contrario, las muestras de sangre transportadas que se extrajeron en dispositivos estabilizadores de recolección de sangre mostraron solo un ligero cambio en los números de copias de ARNm o ARNr para β-actina, c-fos y ARNr 18S. Como se muestra en las Figs. 3A-3B, la sangre que se almacena en tubos EDTAK₃ a 6, 22 y 30 °C durante 3 días mostró un aumento significativo en los números de copias de ARNm para β-actina o c-fos. En comparación con los tubos EDTAK₃, la sangre que se almacena en dispositivos estabilizadores de recolección de sangre a 6, 22 y 30 °C durante 3 días mostró aumentos leves a moderados en los números de copias de ARNm para β-actina y c-fos.

- 45 Los resultados anteriores demuestran que el uso de los dispositivos estabilizadores de recolección de sangre que se enseñan aquí tiene un efecto dramático y previamente no reconocido sobre la cantidad de ARN de fondo que resulta de las temperaturas de transporte y almacenamiento por encima de la congelación. Se puede apreciar que los dispositivos estabilizadores de recolección de sangre no solo protegen los ácidos nucleicos objetivo de la degradación, sino que también mantienen la cantidad de tales ácidos nucleicos objetivo. Como resultado, estas cantidades permanecen sustancialmente estables sin la intrusión de ácidos nucleicos de fondo, de modo que las cantidades relativas se pueden usar de manera efectiva para mediciones que pueden ayudar al diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

- 55 Se apreciará que se pueden emplear concentrados o diluciones de las cantidades que se citan aquí. En general, las proporciones relativas de los ingredientes que se enumeran seguirán siendo las mismas. 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 constituyen también una enseñanza del uso del Componente A y Componente B en una proporción relativa de 3:1. Las enseñanzas de concentraciones en los ejemplos se pueden variar 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 fetales (por ejemplo, ARN libre de células).

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

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para manipular una muestra biológica en un sitio remoto para el análisis de ARN libre de células, que comprende las etapas de:
 - 5 a. extraer una muestra de sangre directamente en un dispositivo estabilizador de recolección de sangre en un sitio de extracción de sangre, incluyendo tal dispositivo de recolección de sangre una cantidad efectiva de un agente estabilizante que se selecciona de imidazolidinilurea y glicina y diazolidinilurea y glicina, incluyendo la muestra de sangre una cantidad inicial de ARN de fondo y una cantidad de ARN libre de células;
 - b. tratar uno o más componentes de la muestra con el agente estabilizante para mitigar dentro de la muestra la propensión del ARN de fondo a aumentar con respecto a la cantidad inicial;
 - 10 c. transportar la muestra, mientras permanece en el dispositivo de recolección de sangre, para la entrega en el sitio en el que se va a realizar el análisis de ARN libre de células, durante el cual se somete a la etapa de transporte, el dispositivo de recolección de sangre y la muestra contenida en él a una o más temperaturas dentro un intervalo de 5 a 35 °C;
 - d. realizar análisis de ARN libre de células en la muestra al menos 24 horas después de la extracción de la muestra.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el análisis de ARN libre de células se realiza al menos 72 horas después de la extracción de la muestra.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la etapa de realizar el análisis de ARN libre de células en la muestra incluye llevar a cabo una PCR de transcriptasa en tiempo real (RT-qPCR).
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la etapa de realizar análisis de ARN libre de células en la muestra incluye llevar a cabo una PCR de transcriptasa en tiempo real (RT-qPCR) para cuantificar los ARNm para c-fos, β -actina y/o ARNr 18S.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el número de copias de ARNm c-fos por ml de plasma dentro de la muestra de sangre permanece sustancialmente igual antes del transporte y posterior al transporte.
- 25 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el número de copias de ARNm β -Actina por ml de plasma dentro de la muestra de sangre permanece sustancialmente igual antes del transporte y posterior al transporte.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que el número de copias de ARNr 18s por ml de plasma dentro de la muestra de sangre permanece sustancialmente igual antes del transporte y posterior al transporte.
- 30 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes en el que la cantidad de ARN de fondo en la muestra de sangre permanece sustancialmente igual antes del transporte y posterior al transporte.

Figura 1: Registro de temperatura de envío

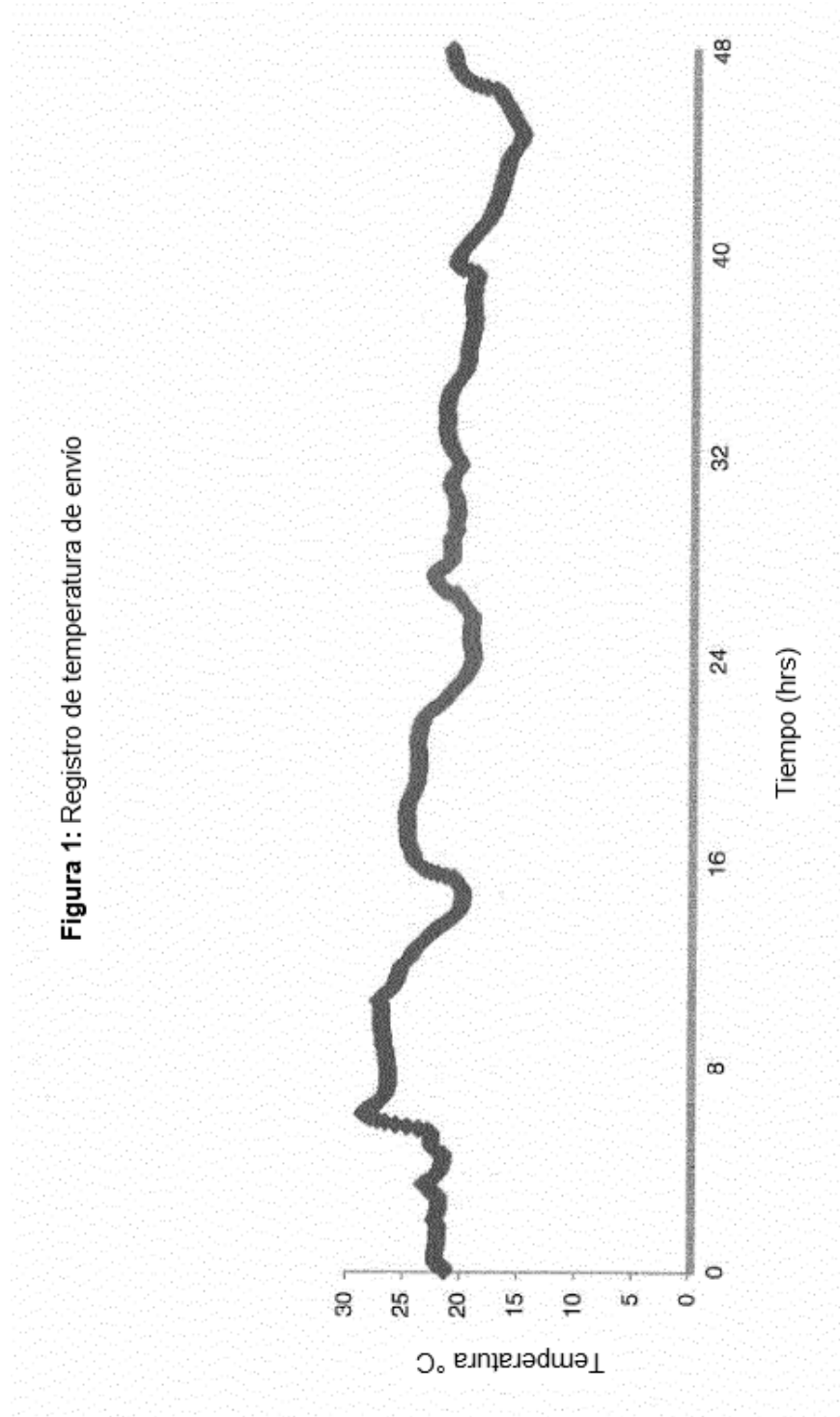
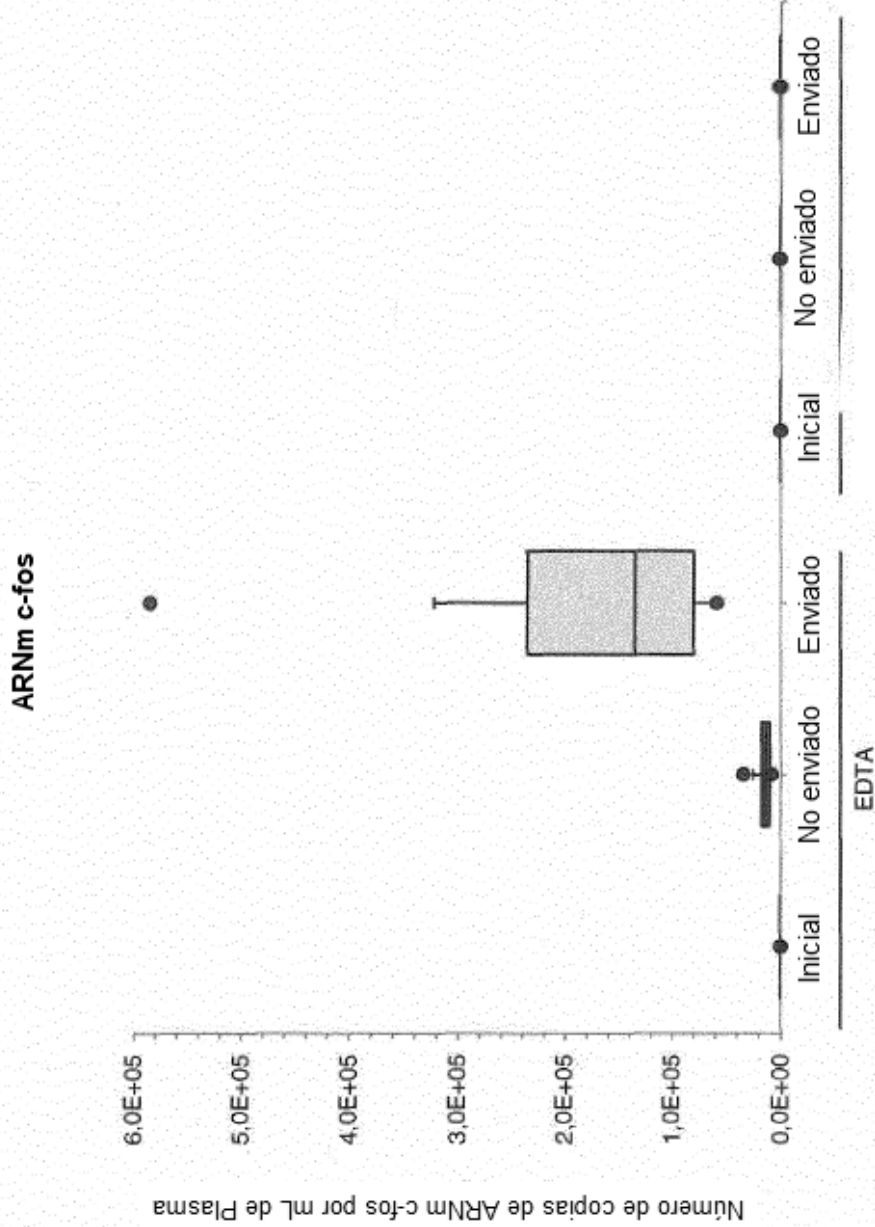


Figura 2A: Efecto del envío en las concentraciones de ARN libre de células en muestras de sangre



Clave: Los diagramas muestran la media (línea dentro del cuadro) y los percentiles 75 y 25 (límites del cuadro). Las barras de error superior e inferior indican los percentiles 90 y 100, respectivamente. Los puntos superior e inferior indican los valores máximos y mínimos.

Figura 2B: Efecto de envío en las concentraciones de ARN libre de células en muestras de sangre

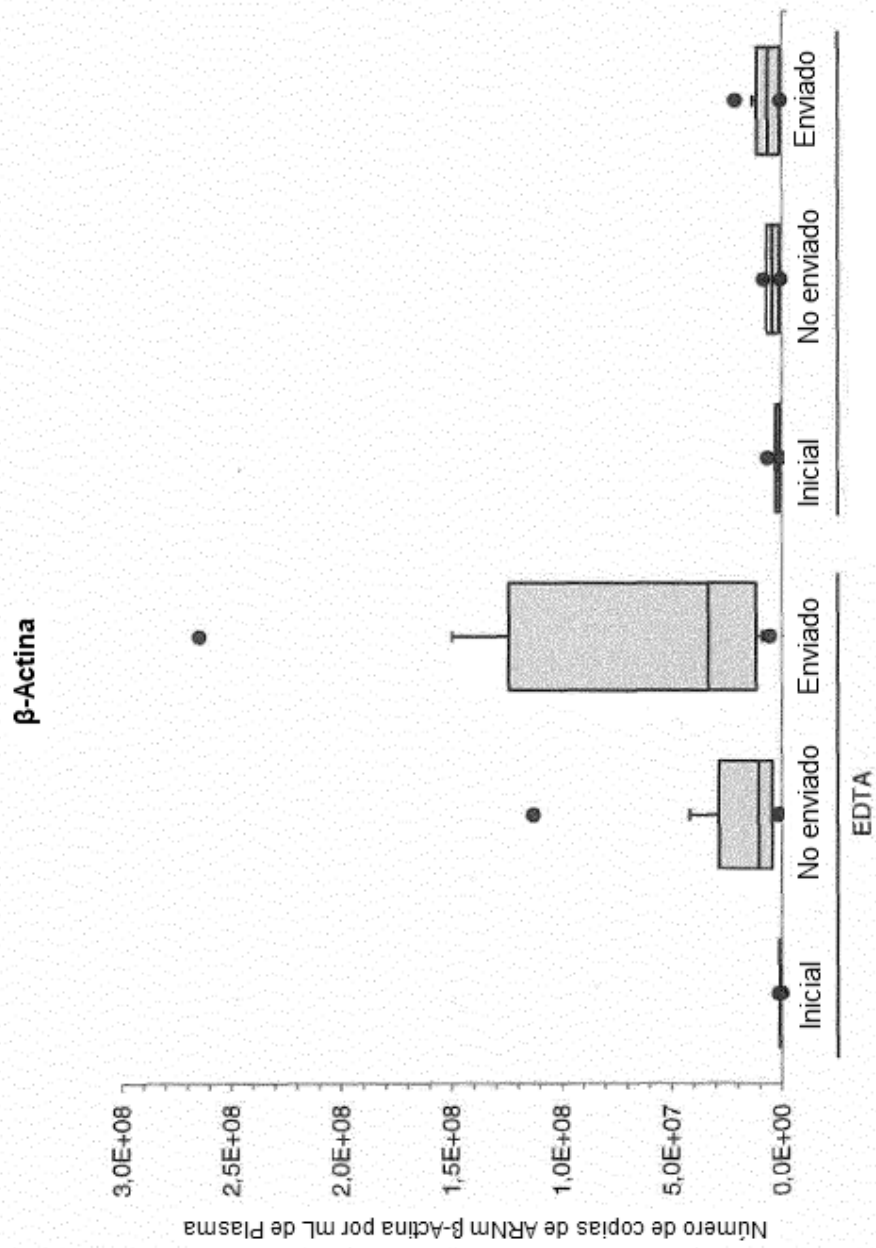


Figura 2C: Efecto del envío en las concentraciones de ARN libre de células en muestras de sangre

· ARNr 18s

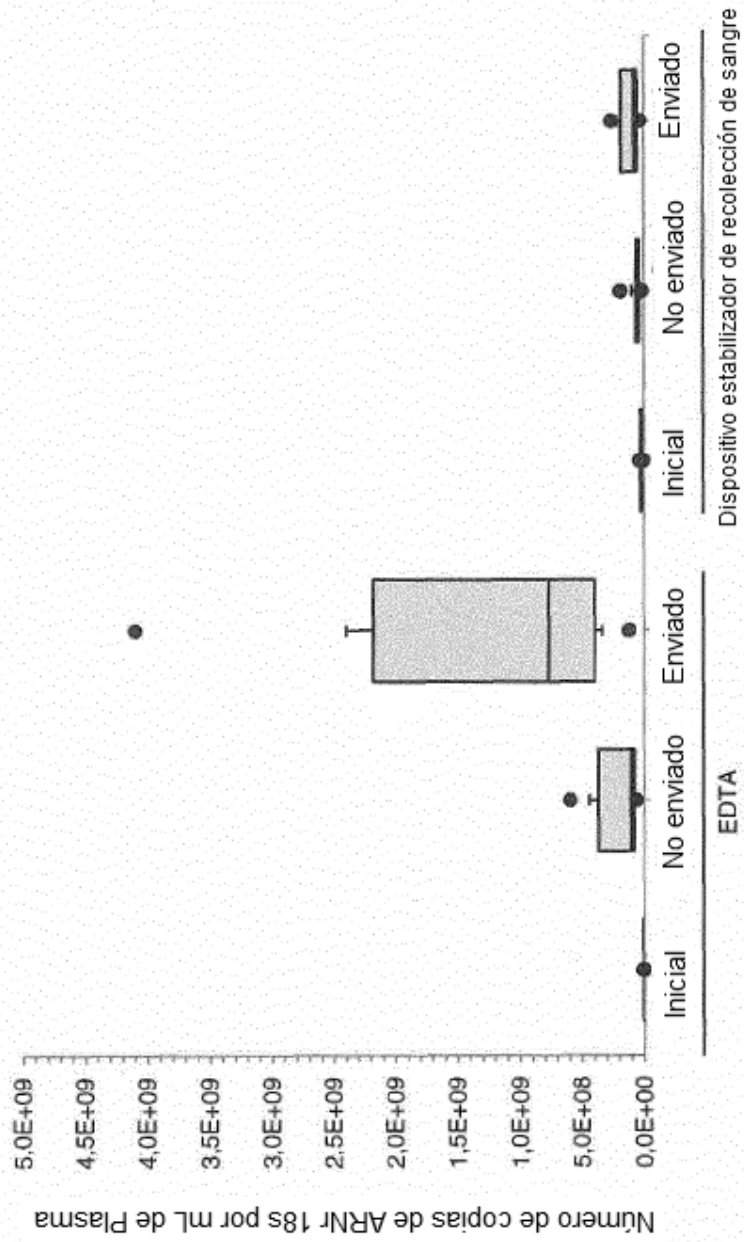


Figura 3A: Efecto de la temperatura de almacenamiento en las concentraciones de ARN libre de células en muestras de sangre

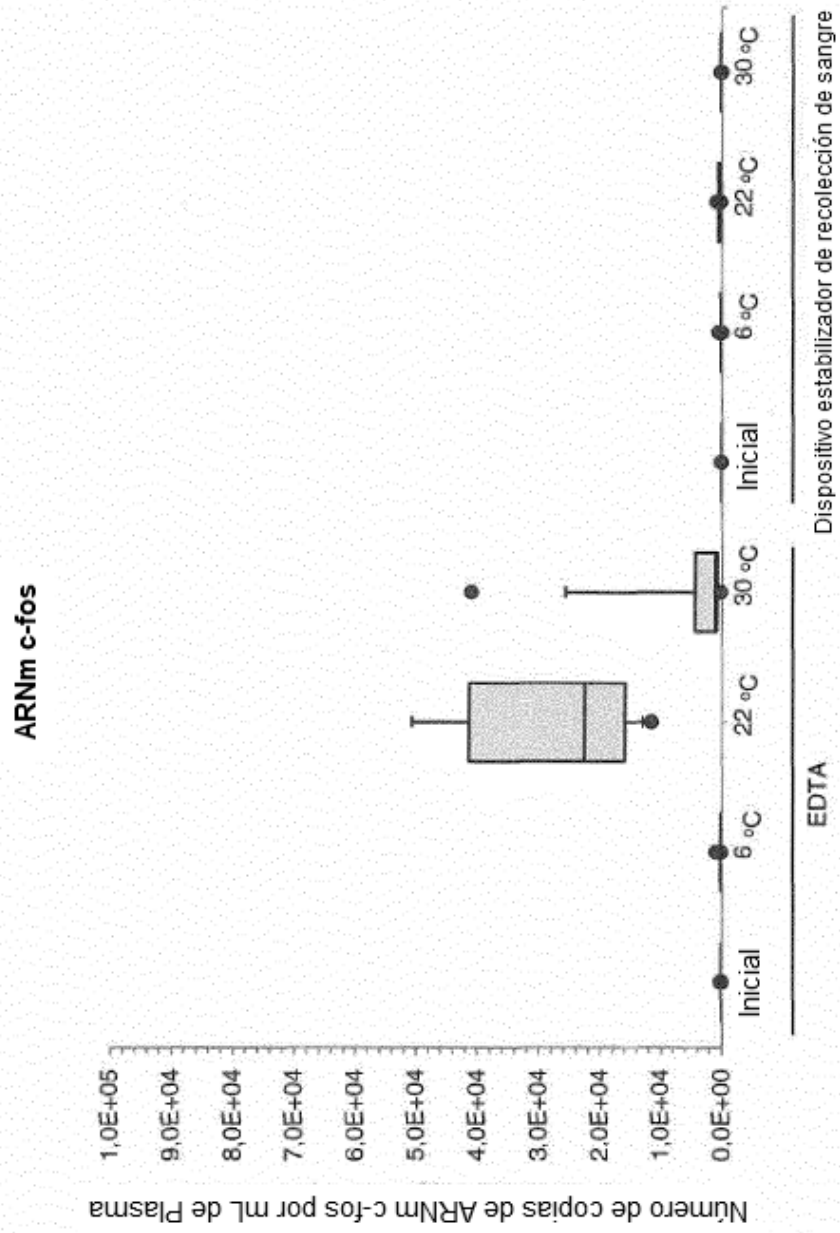


Figura 3B: Efecto de la temperatura de almacenamiento en concentraciones de ARN libre de células en muestras de sangre

β -Actina

