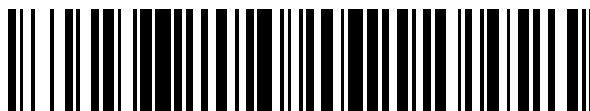


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 126**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2012 PCT/EP2012/068892**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013 WO13045457**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2012 E 12762295 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2761020**

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

30 Prioridad:

26.09.2011 EP 11182819

26.09.2011 US 201161539245 P

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

23.10.2018

73 Titular/es:

QIAGEN GMBH (100.0%)

Qiagen Strasse 1

40724 Hilden, DE

72 Inventor/es:

HORLITZ, MARTIN;

SCHUBERT, ANABELLE y

SPRENGER-HAUSSELS, MARKUS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 687 126 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Estabilización y aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares

Campo de la invención.

5 La tecnología descrita en el presente texto se refiere a métodos y composiciones adecuadas para estabilizar la población de ácido nucleico extracelular en una muestra que contiene células, en particular en una muestra de sangre, y a un método para aislar ácidos nucleicos extracelulares de muestras biológicas estabilizadas respectivamente.

Fundamento de la invención.

10 Se han identificado ácidos nucleicos extracelulares en sangre, plasma, suero y otros fluidos corporales. Los ácidos nucleicos extracelulares que se encuentran en muestras respectivas son hasta cierto punto resistentes a la degradación debido al hecho de que están protegidos de las nucleasas (por ejemplo, porque se segregan en forma de un complejo proteolipídico, están asociados con proteínas o están contenidos en vesículas). La presencia de niveles elevados de ácidos nucleicos extracelulares, tales como ADN y/o ARN, en muchas afecciones médicas, tumores malignos y procesos infecciosos es de interés, entre otras cosas, para el cribado, el diagnóstico, el pronóstico, la vigilancia de la progresión de la enfermedad, para identificar dianas terapéuticas potenciales, y para monitorizar la respuesta al tratamiento. Además, se usa ADN/ARN fetal elevado en sangre materna para determinar p. ej. la identidad del género, evaluar anomalías cromosómicas y monitorizar las complicaciones asociadas con el embarazo. Por tanto, los ácidos nucleicos extracelulares son particularmente útiles en el diagnóstico y el pronóstico no invasivos y pueden usarse, p. ej., como marcadores de diagnóstico en muchos campos de aplicación, tales como pruebas genéticas prenatales no invasivas, oncología, medicina de trasplantes u otras muchas enfermedades y, por tanto, son de relevancia diagnóstica (por ejemplo, ácidos nucleicos fetales o derivados de tumores). Sin embargo, los ácidos nucleicos extracelulares también se encuentran en seres humanos sanos. Las aplicaciones comunes y los métodos de análisis de ácidos nucleicos extracelulares se describen p. ej. en los documentos WO97/035589, WO97/34015, Swarup et al., FEBS Letters 581 (2007) 795 - 799, Fleischhacker Ann. N. Y. Acad. Sci. 1075: 40 - 49 (2006), Fleischhacker y Schmidt, Biochimica et Biophysica Acta 1775 (2007) 191 - 232, Hromadnikova et al. (2006) DNA and Cell Biology, Volumen 25, Número 11, pp 635 - 640; Fan et al. (2010) Clinical Chemistry 56: 8.

15 Tradicionalmente, la primera etapa del aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares a partir de una muestra biológica que contiene células, tal como sangre, es obtener una fracción esencialmente libre de células de dicha muestra, p. ej. bien sea suero o bien plasma en el caso de la sangre. Los ácidos nucleicos extracelulares se aíslan después de dicha fracción libre de células, comúnmente plasma, cuando se procesa una muestra de sangre. Sin embargo, obtener una fracción de una muestra esencialmente libre de células puede ser problemático y la separación es frecuentemente un proceso tedioso y lento de múltiples etapas, ya que es importante usar condiciones controladas cuidadosamente para evitar la rotura de las células durante la centrifugación, que podría contaminar los ácidos nucleicos extracelulares con ácidos nucleicos celulares liberados durante la rotura. Además, frecuentemente es difícil eliminar todas las células. Así pues, muchas muestras procesadas que a menudo y comúnmente se clasifican como "libres de células", tales como plasma o suero, todavía contienen de hecho cantidades residuales de células que no se eliminaron durante el proceso de separación. Otra consideración importante es que el ácido nucleico celular se libera de las células contenidas en la muestra debido a la rotura celular durante la incubación *ex vivo*, típicamente dentro de un período de tiempo relativamente corto desde una operación de extracción de sangre. Una vez que comienza la lisis celular, las células lisadas liberan ácidos nucleicos adicionales que se mezclan con los ácidos nucleicos extracelulares, y se hace cada vez más difícil recuperar los ácidos nucleicos extracelulares para pruebas. Estos problemas se discuten en la técnica anterior (véase, por ejemplo, Chiu et al. (2001), Clinical Chemistry 47: 9 1607 - 1613, Fan et al (2010) y US2010/0184069). Además, la cantidad y la recuperabilidad de los ácidos nucleicos extracelulares disponibles pueden disminuir sustancialmente durante un período de tiempo debido a la degradación.

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

25 Los problemas discutidos anteriormente son en particular un problema, si la muestra comprende una gran cantidad de células como es el caso, p. ej., con las muestras de sangre entera. Por lo tanto, para evitar respectivamente reducir los problemas descritos anteriormente, es común separar una fracción esencialmente libre de células de la muestra de las células contenidas en la muestra, básicamente, inmediatamente después de obtenerse la muestra. P. ej. se recomienda obtener plasma sanguíneo a partir de sangre entera, básicamente, directamente después de extraer la sangre y/o enfriar la sangre completa y/o el plasma o suero obtenido con el fin de preservar la integridad de los ácidos nucleicos extracelulares y evitar contaminaciones de la población de ácido nucleico extracelular con ácidos nucleicos intracelulares que se liberan de las células contenidas. Sin embargo, la necesidad de separar directamente p. ej. el plasma de la sangre es una importante desventaja porque muchas instalaciones en las que se extrae sangre (por ejemplo, la consulta de un médico) carecen de una centrifuga que permita la separación eficaz del plasma sanguíneo.

Además, el plasma que se obtiene en condiciones regulares comprende a menudo cantidades residuales de células que, en consecuencia, pueden también dañarse o morir durante la manipulación de la muestra, liberando así ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico, como se describió anteriormente. Estas células remanentes también plantean un riesgo de dañarse durante la manipulación de modo que su contenido de ácido nucleico, particularmente ADN genómico (nuclear) y ARN citoplasmático, se fusionaría y por tanto contaminaría o diluiría la fracción de ácido nucleico extracelular circulante. Para eliminar estas células contaminantes remanentes y para evitar/reducir los problemas anteriormente mencionados, se conocía la realización de una segunda etapa de centrifugación a una velocidad más elevada. Sin embargo, una vez más, estas potentes centrífugas no suelen estar disponibles en las instalaciones donde se obtiene la sangre. Además, incluso si el plasma se obtiene directamente después de extraer la sangre, se recomienda congelarlo a -80 °C para conservar los ácidos nucleicos contenidos en él, si los ácidos nucleicos no pueden aislarse directamente. Esto también impone restricciones prácticas sobre el procesamiento de las muestras, como p. ej. que las muestras de plasma deben enviarse congeladas. Esto aumenta los costes y, además, presenta el riesgo de que la muestra se vea comprometida en caso de que se interrumpa la cadena de frío.

Por lo general y en el momento presente, las muestras de sangre se recogen habitualmente en tubos de recogida de sangre que contienen EDTA líquido o secado por pulverización (por ejemplo, BD Vacutainer K₂EDTA). El EDTA quelata el calcio y otros iones de metales bivalentes, inhibiendo de ese modo las reacciones enzimáticas, como p. ej. la coagulación de la sangre o la degradación del ADN debido a DNasas. Sin embargo, aun cuando es un anticoagulante eficaz, el EDTA no previene eficazmente la dilución, respectivamente la contaminación de la población de ácido nucleico extracelular por los ácidos nucleicos intracelulares liberados. Por lo tanto, la población de ácido nucleico extracelular que se encuentra en la porción libre de células de la muestra cambia durante el almacenamiento. De acuerdo con esto, el EDTA no es capaz de estabilizar suficientemente la población de ácido nucleico extracelular, en particular porque no puede evitar la contaminación de la población de ácido nucleico extracelular, p. ej. con fragmentos de ADN genómico que se generan después de la extracción de sangre por degradación celular e inestabilidad celular durante el transporte y almacenamiento de la muestra.

Se conocen métodos en la técnica anterior que apuntan específicamente a estabilizar los ácidos nucleicos circulantes contenidos en la sangre completa. Un método emplea el uso de formaldehído para estabilizar las membranas celulares, reduciendo así la lisis celular y, además, el formaldehído inhibe las nucleasas. Los métodos respectivos se describen, p. ej., en los documentos US 7.332.277 y US 7.442.506. Sin embargo, el uso de formaldehído o sustancias que liberan formaldehído tiene inconvenientes, ya que pueden comprometer la eficacia del aislamiento del ácido nucleico extracelular mediante la inducción de reticulaciones entre moléculas de ácido nucleico o entre proteínas y ácidos nucleicos. Los métodos alternativos para estabilizar muestras de sangre se describen p. ej. en los documentos US 2010/0184069 y US 2010/0209930. Estos métodos recientemente desarrollados demuestran la gran necesidad de proporcionar medios para estabilizar muestras biológicas que contienen células, para permitir la recuperación eficiente de, p. ej., ácidos nucleicos extracelulares contenidos en tales muestras.

Sin embargo, a pesar de estos desarrollos bastante recientes, todavía hay una continua necesidad de desarrollar técnicas de procesamiento de muestras que den como resultado una estabilización de la población de ácido nucleico extracelular comprendida en una muestra biológica, en particular una muestra que contiene células, incluyendo muestras sospechosas de contener células, en particular sangre completa, plasma o suero, haciendo así más fácil la manipulación y el procesamiento de dichas muestras (p. ej. evitando la necesidad de separar directamente el plasma de la sangre completa o enfriar o incluso congelar el plasma aislado) haciendo así también fiable el aislamiento y las pruebas de los ácidos nucleicos extracelulares contenidos en tales muestras y mejorando de esta forma las capacidades de diagnóstico y pronóstico de los ácidos nucleicos extracelulares. En particular, hay una continua necesidad de una solución para conservar ácidos nucleicos extracelulares en muestras de sangre completa, p. ej. para pruebas prenatales y/o para el cribado de enfermedades neoplásicas, en particular enfermedades premalignas o malignas.

El objeto de la presente invención es superar al menos uno de los inconvenientes de los métodos de estabilización de muestras de la técnica anterior. Por tanto, entre otros, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método que es capaz de estabilizar una muestra que contiene células, en particular sangre completa. En particular, es un objeto de la presente invención estabilizar la población de ácido nucleico extracelular contenida en una muestra biológica y en particular evitar una contaminación de la población de ácido nucleico extracelular con ADN genómico, en particular ADN genómico fragmentado. Además, un objeto particular de la presente invención es proporcionar un método adecuado para estabilizar una muestra biológica, preferiblemente una muestra de sangre completa, incluso a temperatura ambiente, preferiblemente durante un período de al menos dos, preferiblemente al menos tres días. Además, es un objeto de la presente invención proporcionar un recipiente colector de muestras, en particular un tubo colector de sangre, que sea capaz de estabilizar eficazmente una muestra biológica y en particular la población de ácido nucleico extracelular comprendida en la muestra.

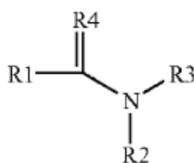
Sumario de la invención.

La presente invención está basada en el descubrimiento de que ciertos aditivos son sorprendentemente eficaces en la estabilización de muestras biológicas que contienen células, que comprenden ácidos nucleicos extracelulares, en particular muestras de sangre completa o muestras derivadas de sangre completa tales como, por ejemplo, plasma

sanguíneo. Se descubrió que estos aditivos son altamente eficaces para estabilizar la población de ácido nucleico extracelular y en particular son capaces de evitar, o al menos reducir significativamente, la contaminación con ADN genómico, en particular ADN genómico fragmentado.

5 De acuerdo con un primer aspecto, se proporciona un método adecuado para estabilizar una población de ácido nucleico extracelular comprendida en una muestra que contiene células, en el que una muestra se pone en contacto con

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



formula 1

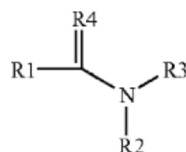
10

en la que R1 es un resto de hidrógeno o un resto alquilo, preferiblemente un resto alquilo C1-C5, siendo más preferido un resto metilo, R2 y R3 son restos de hidrocarburo idénticos o diferentes, con una longitud de la cadena de carbono de 1 – 20 átomos dispuesta de forma lineal o ramificada, y R4 es un resto de oxígeno, azufre o selenio.

15 De acuerdo con un primer sub-aspecto, se proporciona un método adecuado para estabilizar una población de ácido nucleico extracelular comprendido en una muestra que contiene células, en el que la muestra se pone en contacto con al menos un inhibidor de la apoptosis. Preferiblemente, la muestra que contiene células se elige entre sangre completa, plasma o suero. Sorprendentemente, se encontró que el inhibidor de apoptosis reduce las contaminaciones de la población de ácido nucleico extracelular con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que se originan a partir de células contenidas en la muestra, p. ej. de células dañadas o moribundas. Además, los
 20 autores de la presente invención encontraron que el inhibidor de la apoptosis reduce la degradación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra. Por tanto, la estabilización descrita en este documento usando un inhibidor de la apoptosis tiene el efecto de que la población de ácido nucleico extracelular contenida en la muestra se conserva sustancialmente en el estado que había mostrado en el momento en que se obtuvo o se recogió la muestra biológica.

25 De acuerdo con un segundo sub-aspecto, se proporciona un método adecuado para estabilizar una población de ácido nucleico extracelular comprendida en una muestra que contiene células, en el que una muestra se pone en contacto con al menos un agente hipertónico que es capaz de estabilizar las células comprendidas en la muestra. Sorprendentemente, se descubrió que la contracción o encogimiento celular inducido por efectos hipertónicos leves (ósmosis) da como resultado un aumento considerable de la estabilidad celular. Al aumentar la estabilidad celular, el agente hipertónico en particular reduce la liberación de ácidos nucleicos intracelulares, en particular el ADN genómico,
 30 desde las células contenidas a la porción o compartimento extracelular de la muestra. Por lo tanto, la estabilización de acuerdo con la presente invención usando un agente hipertónico tiene el efecto de que la población de ácido nucleico extracelular contenida en la muestra se conserva sustancialmente en el estado que había mostrado en el momento en que se obtuvo o se recogió respectivamente la muestra biológica.

35 De acuerdo con un tercer sub-aspecto de la presente invención, se proporciona un método adecuado para estabilizar una población de ácido nucleico extracelular comprendida en una muestra que contiene células, en donde una muestra se pone en contacto con al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1



formula 1

40 en la que R1 es un resto de hidrógeno o un resto alquilo, preferiblemente un resto alquilo C1 – C5, más preferiblemente un resto metilo, R2 y R3 son restos hidrocarburo idénticos o diferentes con una longitud de cadena de carbono de 1 – 20 átomos dispuestos de forma lineal o ramificada, y R4 es un resto de oxígeno, azufre o selenio. Se encontró que añadiendo un compuesto respectivo tiene un efecto estabilizante ventajoso sobre la población de ácido nucleico extracelular.

De acuerdo con un cuarto sub-aspecto, se proporciona un método adecuado para estabilizar una población de ácido nucleico extracelular comprendido en una muestra que contiene células, en el que una muestra se pone en contacto con

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

Se encontró que la combinación de estos agentes estabilizantes (y opcionalmente aditivos adicionales) es notablemente eficaz en la inhibición de la liberación de ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico, desde las células contenidas a la porción extracelular de la muestra. Además, se demostró que la degradación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra se previene de manera altamente eficiente. En particular, se encuentra
10 menos ADN genómico fragmentado en muestras estabilizadas. Por lo tanto, la estabilización de acuerdo con este documento usando esta combinación de aditivos estabilizantes tiene el efecto de que la población de ácido nucleico extracelular contenida en la muestra se conserva sustancial y efectivamente en el estado que había mostrado en el momento en que se obtuvo o se recolectó respectivamente la muestra biológica (p. ej. se extrajo en el caso de la sangre) y que en particular se reducen las contaminaciones de la población de ácido nucleico extracelular con ADN
15 genómico fragmentado.

Para potenciar el efecto de estabilización hacia ácidos nucleicos extracelulares, es también un objeto de la presente invención proporcionar otras combinaciones de agentes estabilizadores con el fin de estabilizar la población de ácido nucleico extracelular comprendida en una muestra que contiene células. Una combinación puede comprender al menos un inhibidor de la apoptosis, al menos un agente hipertónico y/o al menos un compuesto según la fórmula 1 como se definió anteriormente, por ejemplo (1) una combinación de al menos un inhibidor de la apoptosis y al menos un compuesto según la fórmula 1 como se definió anteriormente, (2) una combinación de al menos un agente hipertónico y al menos un compuesto según la fórmula 1, o (3) una combinación de los tres agentes estabilizantes, es decir, al menos un inhibidor de la apoptosis, al menos un agente hipertónico y al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1. Una combinación respectiva también puede comprender aditivos adicionales que potencian el efecto
20 estabilizador tal como, p. ej., agentes quelantes. En caso de que la muestra sea sangre o una muestra derivada de sangre, normalmente se agrega también un anticoagulante. Agentes quelantes como p. ej. EDTA son adecuados para este propósito. Las respectivas combinaciones de estabilización pueden ser de acuerdo con un quinto sub-aspecto utilizado ventajosamente en un método adecuado para estabilizar una población de ácido nucleico extracelular comprendida en una muestra que contiene células de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

De acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona un método para el aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares de una muestra biológica, en el que dicho método comprende las etapas de:

- a) estabilizar la población de ácido nucleico extracelular comprendida en una muestra de acuerdo con el método definido en el primer aspecto de la presente invención; y
- b) aislar los ácidos nucleicos extracelulares de dicha muestra.

La estabilización en la etapa a) se puede lograr p. ej. de acuerdo con uno de los cinco sub-aspectos del primer aspecto según la presente invención, como se describió anteriormente. Como se discutió anteriormente, la estabilización según la presente invención tiene el efecto de que la población de ácido nucleico extracelular contenida en la muestra se conserva sustancialmente en el estado que había mostrado en el momento en que se obtuvo o respectivamente se recolectó la muestra biológica. Por lo tanto, los ácidos nucleicos extracelulares obtenidos a partir de una muestra estabilizada respectivamente comprenden menos contaminaciones con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que resulta p. ej. de células en descomposición comprendidas en la muestra, en comparación con los ácidos nucleicos extracelulares que se obtienen de una muestra no estabilizada. La preservación sustancial de la población de ácido nucleico extracelular es una ventaja importante porque esta estabilización/preservación mejora la precisión de cualquier prueba posterior. Permite estandarizar el aislamiento y el análisis subsiguiente de la población de ácido nucleico extracelular, haciendo así que las aplicaciones de diagnóstico o pronóstico que se basan en la fracción de ácido nucleico extracelular sean más fiables y más independientes de las condiciones de almacenamiento/manipulación utilizadas. De ese modo, se mejora la aplicabilidad en diagnóstico y pronóstico de los ácidos nucleicos extracelulares respectivamente aislados. En particular, las enseñanzas de la presente invención tienen la ventaja de que la relación de ciertas moléculas de ácido nucleico extracelular pueden mantenerse sustancialmente constantes en comparación con la relación en el momento en que se recolectó la muestra. La estabilización consigue que los ácidos nucleicos intracelulares se mantengan sustancialmente dentro de las células y que los ácidos nucleicos extracelulares sean sustancialmente estabilizados.

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

- 55 a) al menos un inhibidor de la apoptosis, preferiblemente un inhibidor de la caspasa, y/o
- b) al menos un agente hipertónico que es adecuado para estabilizar las células comprendidas en la muestra, preferiblemente un compuesto orgánico hidroxilado; y/o

- c) al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se definió anteriormente; y/o
- d) opcionalmente al menos un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante.

Una composición estabilizante respectiva es particularmente efectiva en la estabilización de una muestra biológica que contiene células, en particular sangre completa, plasma y/o suero, estabilizando las células y el población de ácido nucleico extracelular comprendida en dicha muestra. Preferiblemente, al menos dos de los agentes estabilizantes definidos en los apartados de a) a c) más preferidos, todos los agentes estabilizadores definidos en dichos apartados a) a c) están presentes en la composición de estabilización. Una composición de estabilización respectiva permite el almacenamiento y/o la manipulación, p. ej. su envío, de la muestra, p. ej. sangre completa, a temperatura ambiente durante al menos dos, o preferiblemente al menos tres días sin comprometer sustancialmente la calidad de la muestra, respectivamente, la población de ácido nucleico extracelular contenida en la misma. Por lo tanto, cuando se utiliza la composición de estabilización descrita en este documento, el tiempo entre la recogida de muestras, p. ej. la extracción de sangre y la extracción de ácido nucleico, puede variar sin un efecto sustancial sobre la población de ácido nucleico extracelular contenida en la muestra. Esto es una ventaja importante ya que reduce la variabilidad en la población de ácido nucleico extracelular atribuible a diferentes procedimientos de manipulación.

De acuerdo con un cuarto aspecto, se describe un recipiente para recoger una muestra biológica que contiene células, preferiblemente una muestra de sangre, en donde el contenedor comprende una composición de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención. Proporcionar un contenedor respectivo, p. ej. un tubo colector de muestras que comprende la composición de estabilización, tiene la ventaja de que la muestra se estabiliza inmediatamente tan pronto como la muestra se recoge en el recipiente correspondiente. Además, un recipiente colector de muestras respectivo, en particular un tubo colector de sangre, es capaz de estabilizar células sanguíneas y ácidos nucleicos extracelulares y opcionalmente, virus respectivamente ácidos nucleicos virales contenidos en una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre. De ese modo, se solucionó otro problema.

De acuerdo con un quinto aspecto, se proporciona un método que comprende la etapa de recoger, preferiblemente extraer, una muestra biológica de un paciente, preferiblemente sangre, directamente en una cámara de un recipiente de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención.

De acuerdo con un sexto aspecto, se proporciona un método para producir una composición de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención, en el que los componentes de la composición se mezclan, preferiblemente se mezclan en una solución. El término "solución", como se usa en el presente texto en particular, se refiere a una composición líquida, preferiblemente una composición acuosa. Puede ser una mezcla homogénea de una sola fase, pero también está dentro del alcance de la presente invención que una solución comprenda componentes sólidos tales como, p. ej., precipitados.

Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción que sigue y de las reivindicaciones adjuntas. Sin embargo, ha de entenderse que la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones de la solicitud preferidas, se dan solamente a título de ilustración. Diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y del alcance de la invención descrita resultarán evidentes para los expertos en la técnica al leer lo que sigue.

Breve descripción de los dibujos.

La Fig. 1a muestra una imagen del gel después de la electroforesis con chip de ADN aislado de muestras tratadas con inhibidores de la caspasa (Ejemplo 1).

La Fig. 1b es un diagrama que muestra el efecto de los inhibidores de la caspasa sobre el aumento de ADN 18S ribosómico en el plasma (Ejemplo 1).

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

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

La Fig. 3 muestra la integridad de las células sanguíneas medida mediante citometría de flujo para las células sanguíneas tratadas con dihidroxiacetona disuelta en diferentes tampones (Ejemplo 3).

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

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

La Fig. 5 muestra la integridad de las células sanguíneas medida por citometría de flujo para las células sanguíneas tratadas con diferentes concentraciones de dihidroxiacetona (Ejemplo 4).

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

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

- 5 La Fig. 7a muestra la integridad de las células sanguíneas medida mediante citometría de flujo para células sanguíneas tratadas con una combinación de K₂EDTA, Q-VD-OPH y DHA elevados (Ejemplo 5).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La Fig. 18 es un diagrama que muestra los porcentajes de aciertos de fragmentos de ADN *spiked-in* (Ejemplo 14).

- 25 La Fig. 19 es un diagrama que muestra las copias promedio (Ejemplo 14).

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

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

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

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

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

- 35 **Descripción detallada de esta invención.**

La presente invención se dirige a métodos, composiciones y dispositivos, y por tanto a tecnologías adecuadas para estabilizar la población de ácido nucleico extracelular comprendida en una muestra biológica que contiene células. Las tecnologías de estabilización descritas en el presente texto reducen el riesgo de que la población de ácido nucleico extracelular esté contaminada con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que se deriva, p. ej. se libera, de células dañadas y/o moribundas contenidas en la muestra. Por lo tanto, la presente invención logra la estabilización de la muestra y, por tanto, la estabilización de la población de ácido nucleico extracelular comprendida en la misma, sin la lisis de las células contenidas. Más bien las células contenidas en la muestra se estabilizan, previniendo o reduciendo sustancialmente la liberación de ácidos nucleicos intracelulares. La notable estabilización que se logra con la presente invención permite el almacenamiento y/o la manipulación de la muestra estabilizada durante un período de tiempo prolongado a temperatura ambiente, sin menoscabar la calidad de la muestra, respectivamente, los ácidos nucleicos extracelulares contenidos en la misma. Como la composición de la población de ácido nucleico extracelular está estabilizada y así se conserva sustancialmente en el momento en que se obtiene la muestra usando las enseñanzas de la presente invención, el tiempo entre la recogida de la muestra y la

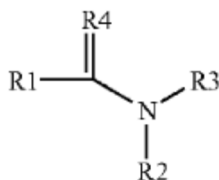
40

45

extracción del ácido nucleico puede variar sin un efecto significativo sobre la composición de la población de ácidos nucleicos extracelulares. Esto permite la estandarización de, p. ej., el análisis de ácido nucleico extracelular de diagnóstico o de pronóstico porque las variaciones en la manipulación o el almacenamiento de las muestras tienen menos influencia sobre la calidad, respectivamente de la composición de la población de ácido nucleico extracelular, proporcionando así una ventaja importante sobre los métodos de la técnica anterior. Por tanto, las muestras, respectivamente los ácidos nucleicos extracelulares obtenidos a partir de muestras respectivamente estabilizadas se vuelven más comparables. Además, las enseñanzas de la presente invención obvian la necesidad de separar directamente las células contenidas en la muestra de la porción libre de células de la muestra para evitar, respectivamente reducir las contaminaciones de los ácidos nucleicos extracelulares con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que de no ser así se libera de las células en descomposición. Esta ventaja simplifica considerablemente la manipulación de las muestras, en particular la manipulación de muestras de sangre completa. P. ej., las muestras de sangre completa obtenidas en una clínica y estabilizadas de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención se pueden enviar a temperatura ambiente, y el plasma que contiene los ácidos nucleicos extracelulares se puede separar convenientemente en el laboratorio clínico receptor. Sin embargo, las enseñanzas de la invención son también ventajosas cuando se procesan muestras biológicas agotadas en células, o muestras comúnmente denominadas "libres de células", tales como p. ej. plasma sanguíneo o suero. Las muestras biológicas respectivas agotadas o "libres de células" pueden aún (dependiendo del procedimiento de separación usado) comprender células residuales, en particular glóbulos blancos que comprenden ADN genómico, que, en consecuencia, presentan el riesgo de que la población de ácido nucleico extracelular se vuelva cada vez más contaminada con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, si las células remanentes (potencialmente) se dañan o mueren durante el envío del proceso de almacenamiento. Este riesgo se reduce considerablemente cuando se usa el método de estabilización que enseña la presente invención. Debido a que la tecnología de la presente invención permite preservar de manera eficiente la población de ácido nucleico extracelular de la muestra en el momento en el que la muestra se recoge y se pone en contacto con los agentes estabilizadores, dichas muestras pueden tratarse apropiadamente en las instalaciones receptoras con el fin de aislar de dichas muestras los ácidos nucleicos extracelulares al tiempo que se evitan y se reducen respectivamente de forma sustancial las contaminaciones de la población nucleica extracelular con ácidos nucleicos intracelulares. Las instalaciones que reciben las muestras, como p. ej. los laboratorios, tienen también generalmente el equipo necesario, como p. ej. centrifugas de alta velocidad (u otros medios, véase también más adelante) para eliminar de manera eficiente las células comprendidas en las muestras, incluidas las células residuales que podrían estar presentes en las muestras agotadas de células tal como, p. ej. en plasma sanguíneo. Tal equipo no suele estar presente en las instalaciones en las que se obtiene la muestra. Por lo tanto, la presente invención tiene muchas ventajas cuando se estabilizan muestras biológicas que comprenden una gran cantidad de células tales como p. ej. muestras de sangre entera, pero también tienen ventajas importantes cuando se estabilizan muestras biológicas que comprenden solamente una pequeña cantidad de células, o que solo pueden ser sospechosas de contener células tales como p. ej. plasma, suero, orina, saliva, fluidos sinoviales, líquido amniótico, fluido lagrimal, ícores, fluido linfático, licor, fluido cerebroespinal y similares.

De acuerdo con un primer aspecto, se proporciona un método adecuado para estabilizarla población de ácido nucleico extracelular comprendida en una muestra que contiene células, preferiblemente una muestra de sangre, poniendo en contacto la muestra con

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



formula 1

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

Con ello se reduce el riesgo de que la población de ácido nucleico extracelular se contamine con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado que se origina a partir de células contenidas, p. ej. desde células dañadas o moribundas y/o la degradación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra se reduce, respectivamente, se inhibe. Esto tiene el efecto de que la composición de la población de ácido nucleico extracelular comprendida en dicha muestra es sustancialmente conservada, respectivamente estabilizada.

La expresión "ácidos nucleicos extracelulares" o "ácido nucleico extracelular" como se usa en este documento, se refiere en particular a ácidos nucleicos que no están contenidos en las células. Los respectivos ácidos nucleicos extracelulares también se denominan a menudo ácidos nucleicos libres de células. Estos términos se usan como sinónimos en este documento. Por tanto, los ácidos nucleicos extracelulares normalmente están presentes en el exterior de una célula o en el exterior de una pluralidad de células dentro de una muestra. La expresión "ácidos nucleicos extracelulares" se refiere p. ej. al ARN extracelular así como al ADN extracelular. Ejemplos de ácidos nucleicos extracelulares típicos que se encuentran en la fracción libre de células (respectivamente porción de muestras biológicas tales como fluidos corporales tales como p. ej. el plasma sanguíneo, incluyen, pero no se limitan a ellos, ácidos nucleicos extracelulares de mamífero, tales como p. ej. ADN y/o ARN extracelular asociado a un tumor o derivado de un tumor, otro ADN y/o ARN extracelular relacionado con la enfermedad, ADN modificado epigenéticamente, ADN y/o ARN fetal, ARN interferente pequeño tal como p. ej. ARNmi y ARNsi, y ácidos nucleicos extracelulares no mamíferos tales como p. ej. ácidos nucleicos víricos, ácidos nucleicos patógenos liberados en la población de ácido nucleico extracelular, p. ej. de procariontes (por ejemplo, bacterias), virus, parásitos eucarióticos u hongos. De acuerdo con una realización, el ácido nucleico extracelular se obtiene a partir de, respectivamente está comprendido, en un fluido corporal como muestra biológica que contiene células, tal como p. ej. sangre, plasma, suero, saliva, orina, licor, líquido cefalorraquídeo, esputo, líquido lagrimal, sudor, líquido amniótico o linfático. Aquí, los autores de la presente invención se refieren a ácidos nucleicos extracelulares que se obtienen a partir de fluidos corporales circulantes, como ácidos nucleicos circulantes extracelulares o circulantes libres de células. De acuerdo con una realización, la expresión ácido nucleico extracelular se refiere en particular a ácidos nucleicos extracelulares de mamíferos, preferiblemente ácidos nucleicos extracelulares asociados a enfermedades o derivados de enfermedades, tales como ácidos nucleicos extracelulares asociados a tumores o derivados de tumores, ácidos nucleicos extracelulares liberados debido a inflamaciones o lesiones, en particular traumatismos, ácidos nucleicos extracelulares relacionados y/o liberados debido a otras enfermedades, o ácidos nucleicos extracelulares derivados de un feto. La expresión "ácidos nucleicos extracelulares" o "ácido nucleico extracelular" como se describe en este documento también se refiere a ácidos nucleicos extracelulares obtenidos a partir de otras muestras, en particular muestras biológicas distintas de los fluidos corporales. Habitualmente, en una muestra está comprendido más de un ácido nucleico extracelular. Normalmente, una muestra comprende más de un tipo o clase de ácidos nucleicos extracelulares. La expresión "población de ácido nucleico extracelular" como se usa en la presente memoria se refiere en parte al conjunto de diferentes ácidos nucleicos extracelulares que están comprendidos en una muestra que contiene células. Una muestra que contiene células generalmente comprende una población de ácido nucleico extracelular característica y, por tanto única. Así pues, el tipo, la clase y/o la cantidad de uno o más ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en la población de ácido nucleico extracelular de una muestra específica son características de la muestra importantes. Como se discutió anteriormente, es por ello importante estabilizar y preservar sustancialmente dicha población de ácido nucleico extracelular ya que su composición y/o la cantidad de uno o más ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en la población de ácido nucleico extracelular de una muestra puede proporcionar información valiosa en el campo médico, del pronóstico o del diagnóstico. En particular, es importante reducir la contaminación y, por tanto la dilución de la población de ácido nucleico extracelular por ácidos nucleicos intracelulares, en particular por ADN genómico, después de recoger la muestra. La preservación sustancial de la población de ácido nucleico extracelular que se puede lograr con las tecnologías de estabilización de acuerdo con la invención permite que la población de ácidos nucleicos extracelulares dentro de una muestra se mantenga sustancialmente sin cambios durante el período de estabilización, en comparación con la población de ácidos nucleicos extracelulares en el momento de la estabilización de la muestra. Al menos, los cambios en la población de ácido nucleico extracelular con respecto a la cantidad, la calidad y/o la composición de los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos, en particular cambios atribuibles a un aumento del ADN genómico liberado, se reducen considerablemente a lo largo del período de estabilización (preferiblemente en al menos 60%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% o al menos 95%) en comparación con una muestra no estabilizada o una muestra correspondiente que es, p. ej., estabilizado por EDTA en el caso de una muestra de sangre o una muestra derivada de la sangre.

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

La expresión "inhibidor de la apoptosis", como se usa en el presente texto se refiere en particular a un compuesto cuya presencia en una muestra biológica que contiene células proporciona una reducción, una prevención y/o una inhibición de los procesos apoptóticos en las células, y/o hace a las células más resistentes a los estímulos apoptóticos. Los inhibidores de la apoptosis incluyen, pero no se limitan a ellos, proteínas, péptidos o moléculas similares a proteínas o péptidos, moléculas orgánicas e inorgánicas. Los inhibidores de la apoptosis incluyen compuestos que actúan como inhibidores metabólicos, inhibidores de la degradación de ácidos nucleicos, respectivamente rutas de ácidos nucleicos, inhibidores de enzimas, en particular inhibidores de la caspasa, inhibidores de calpaína e inhibidores

de otras enzimas implicadas en procesos apoptóticos. Los respectivos inhibidores de la apoptosis se enumeran en la Tabla 1. Preferiblemente, el al menos un inhibidor de apoptosis que se usa para estabilizar la muestra biológica que contiene células se selecciona del grupo que consiste en inhibidores metabólicos, inhibidores de la caspasa e inhibidores de calpaína. Los ejemplos adecuados para cada clase se enumeran en la Tabla 1 en la categoría respectiva. Preferiblemente, el inhibidor de la apoptosis es permeable a las células.

También está dentro del alcance de la presente invención utilizar una combinación de inhibidores de la apoptosis diferentes, ya sea de la misma o de una clase diferente de inhibidores de la apoptosis, respectivamente para utilizar una combinación de diferentes inhibidores de la apoptosis que inhiben la apoptosis ya sea mediante el mismo mecanismo de trabajo o uno diferente.

En una realización ventajosa de la presente invención, el inhibidor de la apoptosis es un inhibidor de la caspasa. Los miembros de la familia de genes caspasa desempeñan un importante papel en la apoptosis. Las preferencias del sustrato o las especificidades de las caspasas individuales se han explotado para el desarrollo de péptidos que compiten con éxito en la unión a caspasas. Es posible generar inhibidores reversibles o irreversibles de la activación de la caspasas mediante el acoplamiento de péptidos específicos de la caspasa a, p. ej., compuestos de aldehído, de nitrilo o de cetona. P. ej., los péptidos derivatizados con fluorometilcetona (FMK) tales como Z-VAD-FMK actúan como inhibidores irreversibles efectivos sin efectos citotóxicos añadidos. Los inhibidores sintetizados con un grupo benciloxicarbonilo (BOC) en las cadenas laterales N-terminal y O-metil exhiben una permeabilidad celular mejorada. Otros inhibidores de la caspasa adicionales adecuados se sintetizan con un grupo fenoxi en el extremo C-terminal. Un ejemplo es Q-VD-OPh, que es un inhibidor de la caspasa, de amplio espectro, permeable a la célula, irreversible, que es incluso más eficaz en la prevención de la apoptosis que Z-VAD-FMK.

De acuerdo con una realización, el inhibidor de la caspasa es un inhibidor de pancaspasa y, por tanto, es un inhibidor de la caspasa de amplio espectro. De acuerdo con una realización, el inhibidor de la caspasa comprende un péptido específico de la caspasa modificado. Preferiblemente, dicho péptido específico de la caspasa se modifica mediante un compuesto de aldehído, nitrilo o cetona. De acuerdo con una realización preferida, el péptido específico de la caspasa se modifica preferiblemente en el extremo carboxilo con un grupo O-fenoxi o una fluorometilcetona (FMK). De acuerdo con una realización, el inhibidor de la caspasa se elige entre el grupo que consiste en Q-VD-OPh y Z-VAD (OMe)-FMK. En una realización, se usa Z-VAD(OMe)-FMK, un inhibidor de pancaspasa, que es un inhibidor peptídico irreversible competitivo y bloquea las enzimas de la familia caspasa-1 y de la familia caspasa-3. En una realización preferida, se usa Q-VD-OPh, que es un inhibidor de amplio espectro para caspasas. Q-VD-OPh es permeable a las células e inhibe la muerte celular por apoptosis. Q-VD-OPh no es tóxico para las células incluso a concentraciones extremadamente altas y consiste en un grupo fenoxi carboxi terminal conjugado con los aminoácidos valina y aspartato. Es igualmente efectivo en la prevención de la apoptosis mediada por las tres principales rutas apoptóticas, caspasa-9 y caspasa-3, caspasa-8 y caspasa-10, y caspasa-12 (Caserta et al, 2003). En la Tabla 1 se enumeran más inhibidores de la caspasa. De acuerdo con una realización, el inhibidor de la caspasa que se usa como inhibidor de la apoptosis para estabilizar la muestra que contiene células es un inhibidor que actúa sobre una o más caspasas situadas aguas abajo en la ruta de muerte celular intracelular de la célula, tal como la caspasa-3. En una realización de la presente invención, el inhibidor de la caspasa es un inhibidor para una o más caspasas seleccionadas entre el grupo que consiste en caspasa-3, caspasa-8, caspasa-9, caspasa-10 y caspasa-12. También está dentro del alcance de la presente invención usar una combinación de inhibidores de la caspasa.

La mezcla que se obtiene después de poner en contacto la muestra biológica con el al menos un inhibidor de la apoptosis puede comprender el inhibidor de la apoptosis (o una combinación de inhibidores de la apoptosis) en una concentración seleccionada entre el grupo de al menos 0,01 μM , al menos 0,05 μM , al menos 0,1 μM , al menos 0,5 μM , al menos 1 μM , al menos 2,5 μM o al menos 3,5 μM . Desde luego, también se pueden usar concentraciones más altas. Los intervalos de concentración adecuados para el inhibidor o los inhibidores de la apoptosis cuando se mezclan con la muestra biológica que contiene células incluyen, pero no están limitados a ellos, de 0,01 μM a 100 μM , de 0,05 μM a 100 μM , de 0,1 μM a 50 μM , de 0,5 μM a 50 μM , de 1 μM a 40 μM , más preferiblemente de 1 μM a 30 μM o de 2,5 μM a 25 μM . Se encontró que las concentraciones más altas eran más efectivas, si bien también se lograron buenos resultados de estabilización a concentraciones más bajas. Por tanto, también se consigue una estabilización eficiente a concentraciones más bajas, p. ej. en un intervalo elegido entre 0,1 μM a 10 μM , de 0,5 μM a 7,5 μM o de 1 μM a 5 μM , en particular si el inhibidor de la apoptosis se usa en combinación con un agente hipertónico (véase más adelante). Las concentraciones mencionadas anteriormente son válidas para el uso de un único inhibidor de la apoptosis así como para el uso de una combinación de inhibidores de la caspasa. Si se usa una combinación de inhibidores de la caspasa, la concentración de un inhibidor de la apoptosis individual que se usa en dicha mezcla de inhibidores de la apoptosis puede estar también por debajo de las concentraciones mencionadas anteriormente, si la concentración global de la combinación de inhibidores de la apoptosis satisface las características mencionadas anteriormente. El uso de una concentración más baja que todavía estabilice eficientemente las células y/o reduzca la degradación de ácidos nucleicos presentes en la muestra tiene la ventaja de que se pueden reducir los costes de estabilización. Se pueden usar concentraciones más bajas, p. ej. si el inhibidor de la apoptosis se usa en combinación con uno o más estabilizantes como se describen en este documento. Las concentraciones mencionadas anteriormente son en particular adecuadas cuando se usa un inhibidor de la caspasa, en particular un péptido específico de la caspasa modificado, tal como Q-VD-OPh y/o Z-VAD (OMe)-FMK como inhibidor de la apoptosis. Las concentraciones anteriormente mencionadas son, p. ej., muy adecuadas para estabilizar sangre completa, en particular 10 ml de sangre. Los intervalos de concentración adecuados para otros inhibidores de la apoptosis y/o para otras muestras

biológicas que contienen células pueden determinarse por un profesional experto usando experimentos rutinarios, p. ej. ensayando los inhibidores de la apoptosis, respectivamente las diferentes concentraciones en los ensayos de ensayo descritos en los ejemplos.

5 De acuerdo con una realización, el inhibidor de la apoptosis, en una cantidad efectiva, disminuirá o reducirá la apoptosis en una muestra biológica que contiene células en al menos un 25 por ciento, al menos un 30 por ciento, al menos un 40 por ciento, al menos un 50 por ciento, preferiblemente al menos un 75 por ciento, más preferiblemente al menos un 85 por ciento en comparación con una muestra testigo que no contiene inhibidor de la apoptosis respectivo.

10 De acuerdo con un segundo sub-aspecto del primer aspecto, se usa al menos un agente hipertónico para estabilizar la muestra, en donde el agente hipertónico utilizado estabiliza las células comprendidas en la muestra. Como se indica por los ejemplos que se proporcionan, el agente hipertónico es eficaz ya por sí solo para estabilizar una muestra que contiene células y preservar sustancialmente la composición de la población de ácido nucleico extracelular comprendida en la misma. El agente hipertónico induce el encogimiento celular por efectos hipertónicos suaves (ósmosis), con lo que aumenta la estabilidad celular. Por lo tanto, las células son menos propensas, p. ej., a un daño celular inducido mecánicamente. La muestra puede ponerse en contacto con el agente hipertónico, p. ej. añadiendo el agente hipertónico a la muestra o viceversa. El agente hipertónico presente en la mezcla resultante en particular es adecuado para estabilizar las células contenidas en la muestra, reduciendo con ello la cantidad de ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico que se libera de las células dañadas. De ese modo, la población de ácido nucleico extracelular se conserva sustancialmente y se reduce el riesgo de contaminar respectivamente diluir los ácidos nucleicos extracelulares con ácidos nucleicos intracelulares, en particular el ADN genómico.

20 De acuerdo con una realización, el agente hipertónico es activo osmóticamente lo suficiente como para inducir la contracción celular (las células liberan agua), pero sin dañar las células, es decir, sin inducir o promover la lisis celular, respectivamente la rotura celular. Por lo tanto, el agente hipertónico preferiblemente tiene un leve efecto osmótico. Además, es deseable que las interacciones entre el agente hipertónico y la muestra estén limitadas predominantemente al efecto de estabilización celular básicamente para evitar efectos secundarios no deseados. Por tanto, de acuerdo con la presente invención, se puede usar un agente hipertónico sin carga. El uso de un agente hipertónico no cargado tiene la ventaja de que aunque las células se encogen respectivamente se estabilizan debido al efecto osmótico del agente hipertónico, las interacciones entre el agente hipertónico y otros compuestos incluidos en la muestra son limitadas en comparación con el uso de un agente hipertónico cargado.

30 De acuerdo con una realización ventajosa, el agente hipertónico es un compuesto orgánico hidroxilado y, en consecuencia, lleva al menos un grupo hidroxilo. De acuerdo con una realización, el compuesto orgánico hidroxilado comprende al menos dos grupos hidroxilo. De acuerdo con una realización, el compuesto orgánico hidroxilado es un poliol. De acuerdo con una realización, el poliol comprende de 2 a 10 grupos hidroxilo, preferiblemente de 3 a 8 grupos hidroxilo. El compuesto orgánico hidroxilado puede comprender de 2 a 12 átomos de carbono, preferiblemente de 3 a 8 y puede ser una molécula cíclica o lineal, ramificada o no ramificada; puede ser saturado o insaturado; aromático o no aromático. De acuerdo con una realización, el compuesto orgánico hidroxilado es un compuesto de hidroxicarbonilo. Un compuesto hidroxicarbonilo es un compuesto que posee uno o más grupos hidroxilo (OH) y uno o más grupos carbonilo. Los compuestos orgánicos hidroxilados pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, compuestos de cetona hidroxilados e hidratos de carbono, o compuestos derivados de los mismos. De acuerdo con una realización, el compuesto orgánico hidroxilado es un polialcohol, en particular un alcohol de azúcar. Por lo tanto, los compuestos orgánicos hidroxilados incluyen, pero no se limitan a ellos, carbohidratos tales como glucosa, rafinosa, sucrosa, fructosa, alfa-D-lactosa monohidrato, inositol, maltitol, manitol, dihidroxiacetona, alcoholes tales como glicerol, eritritol, manitol, sorbitol, volemitol, o alcoholes de azúcar. Los ejemplos adecuados también se enumeran en la tabla que sigue. También se pueden usar combinaciones de compuestos orgánicos hidroxilados respectivos.

| Fórmula química | Nombre de la IUPAC | Nombre común |
|--|--------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Poliolés, p. ej.</i> | | |
| C ₃ H ₅ (OH) ₃ | Propano-1,2,3-triol | Glicerina |
| C ₄ H ₆ (OH) ₄ | Butano-1,2,3,4-tetraol | Eritritol |
| C ₅ H ₇ (OH) ₅ | Pentano-1,2,3,4,5-pentol | Xilitol, Arabitol, Ribitol |
| C ₆ H ₈ (OH) ₆ | Hexano-1,2,3,4,5,6-hexol | Manitol, Sorbitol, Dulcitol, Iditol |
| C ₇ H ₉ (OH) ₇ | Heptano-1,2,3,4,5,6,7-heptol | Volemitol |
| <i>Alcoholes alicíclicos y de azúcar, p. ej.</i> | | |
| C ₆ H ₆ (OH) ₆ | Ciclohexano-1,2,3,4,5,6-geksol | Inositol |

| | | |
|---|--|----------|
| C ₁₂ H ₂₄ O ₁₁ | 1-O- α -D-Glucopiranosil-D-manitol | Isomalt |
| C ₁₂ H ₂₄ O ₁₁ | 4-O- α -D-Glucopiranosil-D-glucitol | Maltitol |
| C ₁₂ H ₂₄ O ₁₁ | 4-O- α -D-Galactopiranosil-D-glucitol | Lactitol |

De acuerdo con una realización, los polioles y alcoholes de azúcar enumerados anteriormente pueden reemplazarse por alcoholes con menos grupos hidroxilo (por ejemplo, hexano-1,2,3,4,5-pentol, pentano-1,2,3,4-tetraol). De acuerdo con una realización, el compuesto orgánico hidroxilado no es un alcohol que tiene de 1 a 5 átomos de carbono y que lleva solamente un grupo hidroxilo. De acuerdo con una realización, los alcoholes con un solo grupo hidroxilo se excluyen como compuesto orgánico hidroxilado. El compuesto orgánico hidroxilado que se puede usar como estabilizante de acuerdo con la presente invención es preferiblemente soluble en agua y no tóxico para las células comprendidas en la muestra biológica a estabilizar. Preferiblemente, el compuesto orgánico hidroxilado no induce o no soporta la lisis de las células contenidas en la muestra biológica y, en consecuencia, preferiblemente no funciona como un detergente o como un agente de disolución de la membrana celular. Un compuesto orgánico hidroxilado adecuado logra un efecto estabilizante de la muestra que contiene células mejorando la conservación de la composición de la población de ácido nucleico extracelular como puede probarse, p. ej., por los ensayos descritos en la sección de ejemplo.

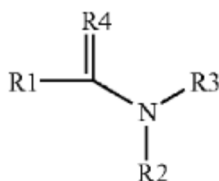
Añadir un compuesto orgánico hidroxilado a una muestra biológica que contiene células tal como p. ej. sangre entera, aumenta la concentración de dicho compuesto orgánico hidroxilado en la porción respectivamente fracción libre de células (por ejemplo, el plasma sanguíneo) y así fuerza a las células sanguíneas a liberar agua en el plasma como resultado de un efecto osmótico (hipertónico). De acuerdo con una realización, se usa un compuesto orgánico hidroxilado que está estrechamente relacionado con un producto del metabolismo celular, pero preferiblemente no puede ser utilizado por las células.

De acuerdo con una realización preferida, las células contenidas en la muestra biológica son esencialmente impermeables para el agente hipertónico que se usa para la estabilización. Por tanto, el agente hipertónico, que preferiblemente es un compuesto orgánico hidroxilado como se describió con detalle anteriormente, es esencialmente impermeable a las células. Esencialmente impermeable a las células a este respecto significa en particular que la concentración del agente hipertónico, que preferiblemente es un compuesto orgánico hidroxilado, es sustancialmente mayor en la porción extracelular de la muestra que en el interior de las células contenidas en la muestra biológica, que está estabilizada de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. De acuerdo con una realización preferida, el agente hipertónico, que preferiblemente es un compuesto orgánico hidroxilado, no es tóxico, de forma que no se ve comprometida la viabilidad celular. Esto se prefiere para evitar influencias perturbadoras sobre el metabolismo celular.

De acuerdo con una realización, el agente hipertónico es dihidroxiacetona (DHA). La DHA es un carbohidrato y habitualmente sirve como sustancia bronceadora en lociones para el autobronceado. Como se demuestra mediante los ejemplos, la DHA tiene sorprendentemente un notable efecto estabilizador sobre muestras biológicas que contienen células, en particular muestras de sangre completa y muestras derivadas de sangre completa tal como plasma sanguíneo o suero. La DHA no se presenta de forma natural en células de mamíferos a excepción del éster de ácido fosfórico de DHA, fosfato de dihidroxiacetona, un producto intermedio de la glucólisis. Por lo tanto, no es de esperar que la DHA se transporte activamente ni se difunda en las células sanguíneas. Según una realización, el agente hipertónico no es dihidroxiacetona fosfato.

La mezcla que se obtiene cuando se pone en contacto la muestra biológica que contiene células con al menos un agente hipertónico puede comprender el agente hipertónico o la mezcla de agentes hipertónicos en una concentración de al menos 0,05 M, preferiblemente 0,1 M, preferiblemente al menos 0,2 M, más preferiblemente al menos 0,25 M. Por supuesto, también se pueden usar concentraciones más altas. Los intervalos de concentración adecuados para el agente hipertónico se pueden seleccionar entre 0,05 M a 2 M, de 0,1 M a 1,5 M, de 0,15 M a 0,8 M, de 0,2 M a 0,7 M o de 0,1 M a 0,6 M. Las concentraciones respectivas son particularmente adecuadas cuando se usa un compuesto orgánico hidroxilado, p. ej. un hidrato de carbono tal como dihidroxiacetona, como agente hipertónico. Las concentraciones mencionadas anteriormente son, p. ej. muy adecuadas para estabilizar sangre completa, en particular 10 ml de sangre. Los intervalos de concentración adecuados para otros agentes hipertónicos y/u otras muestras biológicas que contienen células pueden también ser determinadas por un experto en la técnica usando experimentos de rutina, p. ej. probando los agentes hipertónicos, respectivamente, diferentes concentraciones de los mismos en los ensayos de ensayo descritos en los ejemplos.

De acuerdo con un tercer sub-aspecto del primer aspecto de la presente invención, para estabilizar la población de ácido nucleico extracelular en una muestra que contiene células, se usa al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1



formula 1

en la que R1 es un resto de hidrógeno o un resto alquilo, preferiblemente un resto alquilo C1 – C5, más preferiblemente un resto metilo, R2 y R3 son restos hidrocarburo idénticos o diferentes con una longitud de cadena de carbono de 1–20 átomos dispuestos de forma lineal o ramificada, y R4 es un resto de oxígeno, azufre o selenio.

- 5 Como se muestra mediante los ejemplos proporcionados, un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 descrito anteriormente es eficaz para lograr un efecto estabilizante notable y para preservar sustancialmente la composición de la población de ácido nucleico extracelular en la muestra estabilizada. También se puede usar para la estabilización una mezcla de uno o más compuestos de acuerdo con la fórmula 1.

10 Los restos hidrocarburo R2 y/o R3 se pueden elegir independientemente entre ellos dentro del grupo que comprende alquilo, incluyendo alquilo de cadena corta y alquilo de cadena larga, alqueno, alcoxi, alcoxi de cadena larga, cicloalquilo, arilo, haloalquilo, alquilsililo, alquilsililoxi, alquilenos, alqueniilo, arileno, carboxilatos y carbonilo. Los grupos generales, por ejemplo, alquilo, alcoxi, arilo, etc. se reivindican y se describen en la descripción y las reivindicaciones. Preferiblemente, se usan los siguientes grupos dentro de los grupos generalmente descritos:

- 15 (1) alquilo: preferiblemente alquilos de cadena corta, en particular alquilos C1-C5 lineales y ramificados o alquilos de cadena larga: alquilos C5-C20 lineales y ramificados;

(2) alqueno: preferiblemente alqueno C2-C6;

(3) cicloalquilo: preferiblemente cicloalquilo C3-C8;

(4) alcoxi: preferiblemente alcoxi C1-C6;

(5) alcoxi de cadena larga: preferiblemente alcoxi C5-C20 lineal y ramificado;

- 20 (6) alquilenos: preferiblemente un resto de hidrocarburo alifático, cicloalifático o aromático lineal o ramificado divalente con 2 a 18 átomos de carbono que contiene opcionalmente heteroátomos, p. ej. seleccionados del grupo que comprende: metileno; 1,1-etileno; 1,1-propilideno; 1,2-propileno; 1,3-propileno; 2,2-propilideno; butan-2-ol-1,4-diilo; propan-2-ol-1,3-diilo; 1,4-butileno; 1,4-pentileno; 1,6-hexileno; 1,7-heptileno; 1,8-octileno; 1,9-nonileno; 1,10-decileno; 1,11-undecileno; 1,12-docecileno; ciclohexano-1,1-diilo; ciclohexano-1,2-diilo; ciclohexano-1,3-diilo; ciclohexano-1,4-diilo; ciclopentano-1,1-diilo; ciclopentano-1,2-diilo; y ciclopentano-1,3-diilo;

- 25 (7) alqueniilo: preferiblemente seleccionado entre el grupo que comprende: 1,2-propeniilo; 1,2-buteniilo; 2,3-buteniilo; 1,2-penteniilo; 2,3-penteniilo; 1,2-hexeniilo; 2,3-hexeniilo; y 3,4-hexeniilo;

(8) alquiniilo: es igual a $-C \equiv C-$;

(9) arilo: preferiblemente seleccionado entre grupos aromáticos con un peso molecular inferior a 300 Da;

- 30 (10) arilenos: preferiblemente seleccionados entre el grupo que comprende: 1,2-fenileno; 1,3-fenileno; 1,4-fenileno; 1,2-naftalenileno; 1,3-naftalenileno; 1,4-naftalenileno; 2,3-naftalenileno; 1-hidroxi-2,3-fenileno; 1-hidroxi-2,4-fenileno; 1-hidroxi-2,5-fenileno; 1-hidroxi-2,6-fenileno;

(11) carboxilato: preferiblemente el grupo $-C(O)OR$, donde R se selecciona entre: hidrógeno; alquilo C1-C6; fenilo; (alquilo C1-C6)-C₆H₅; Li; Na; K; Cs; Mg; Ca;

- 35 (12) carbonilo: preferiblemente el grupo $-C(O)R$, donde R se selecciona entre: hidrógeno; alquilo C1-C6; fenilo; (alquilo C1-C6)-C₆H₅ y amina (resultando una amida) seleccionada del grupo: NR'₂, en donde cada R' se elige independientemente entre hidrógeno; alquilo C1-C6; (alquilo C1-C6)-C₆H₅ y fenilo, donde, si ambos Rs representan alquilo C1-C6, pueden formar un anillo heterocíclico NC₃ a NC₅ con sustituyentes alquilo del anillo que forma la otra cadena alquilo;

- 40 (13) alquilsililo: preferiblemente el grupo $-SiR_1R_2R_3$, en donde R1, R2 y R3 se seleccionan independientemente entre sí entre: hidrógeno; alquilo; alquilo de cadena larga; fenilo; cicloalquilo; haloalquilo; alcoxi; alcoxi de cadena larga;

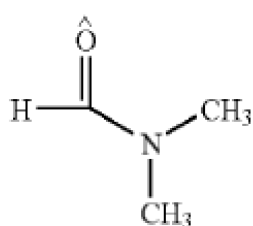
(14) alquilsililoxi: preferiblemente el grupo $-O-SiR_1R_2R_3$, en donde R1, R2 y R3 se seleccionan independientemente entre ellos entre: hidrógeno; alquilo; alquilo de cadena larga; fenilo; cicloalquilo; haloalquilo; alcoxi; alcoxi de cadena larga.

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

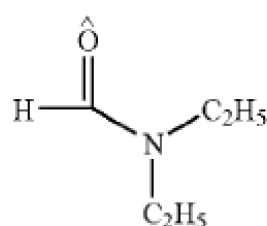
La longitud de cadena n de R1 preferiblemente tiene el valor 1, 2, 3, 4 o 5. Particularmente preferida es una longitud de cadena de 1 o 2 para R1.

R4 es preferiblemente oxígeno.

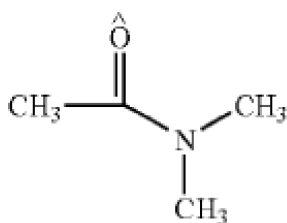
De acuerdo con una realización preferida, el compuesto según la fórmula 1 es una amida del ácido N,N-dialquilcarboxílico. Los grupos R1, R2, R3 y R4 preferidos se han descrito anteriormente. De acuerdo con una realización, el compuesto se elige entre el grupo que consiste en N,N-dimetilacetamida; N,N-dietilacetamida; N,N-dimetilformamida y N,N-dietilformamida. También son adecuados N,N-dialquilpropanamidas tales como N,N-dimetilpropanamida como se muestra en los ejemplos. Preferiblemente, la sustancia de acuerdo con la fórmula 1 es N,N-dimetilacetamida (DMAA). Las fórmulas estructurales de los compuestos preferidos son las siguientes:



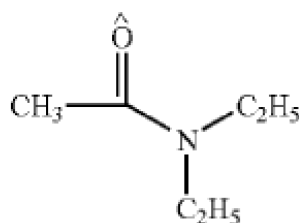
N,N-dimetilformamida



N,N,-dietilformamida



N,N-dimetilacetamida



N,N-dietilacetamida

15

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

La mezcla que se obtiene cuando se pone en contacto la muestra biológica que contiene células con un compuesto de acuerdo con la fórmula 1, o una mezcla de compuestos respectivos, puede comprender dicho compuesto o mezcla de compuestos en una concentración final de al menos 0,1%, al menos 0,5%, al menos 0,75%, al menos 1%, al menos 1,25% o al menos 1,5%. Un intervalo de concentración adecuado incluye, pero sin limitarse al mismo, de 0,1% hasta 50%. Los intervalos de concentración preferidos se pueden elegir entre el grupo que consiste en 0,1% a 30%, 0,1% a 20%, 0,1% a 15%, 0,1% a 10%, 0,1% a 7,5%, 0,1% a 5%, 1% a 30%, 1% a 20%, 1% a 15%, 1% a 10%, 1% a 7,5%, 1% a 5%; 1,25% a 30%, 1,25% a 20%, 1,25% a 15%, 1,25% a 10%, 1,25% a 7,5%, 1,25% a 5%; 1,5% a 30%, 1,5% a 20%, 1,5% a 15%, 1,5% a 10%, 1,5% a 7,5% y 1,5% a 5%. Las concentraciones respectivas son particularmente adecuadas cuando se usa una amida de ácido N,N-dialquilcarboxílico, p. ej. N,N-dimetilacetamida, N,N-dietilacetamida, N,N-dietilformamida o N,N-dimetilformamida o N,N-dimetilpropanamida como agente estabilizante. Las concentraciones mencionadas anteriormente son p. ej. muy adecuadas para estabilizar sangre completa o productos sanguíneos como el plasma. Los intervalos de concentración adecuados para otros compuestos de acuerdo con la fórmula 1 y/u otras muestras biológicas que contienen células pueden también ser determinados por un experto en la técnica usando experimentos de rutina, p. ej. ensayando el compuesto, respectivamente diferentes concentraciones del mismo, en los ensayos de prueba descritos en los ejemplos.

Preferiblemente, el compuesto de acuerdo con la fórmula 1 se usa en combinación con un agente quelante para estabilizar la muestra que contiene células. En particular, se puede usar un agente quelante como anticoagulante cuando se estabiliza una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre tal como p. ej. plasma o suero. Más adelante se proporcionan agentes quelantes y rangos de concentración adecuados.

De acuerdo con un cuarto sub-aspecto preferido, se proporciona un método adecuado para estabilizar una muestra que contiene células, preferiblemente una muestra de sangre, donde dicho método comprende poner en contacto la muestra con

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

Por tanto, de acuerdo con esta realización preferida, el inhibidor de la apoptosis y el agente hipertónico, que ambos solos son ya efectivos para estabilizar una muestra que contiene células (véase más arriba y ejemplos), se usan en combinación. De este modo, el efecto de estabilización puede aumentarse y/o la concentración de los componentes individuales (el inhibidor de la apoptosis y/o el agente hipertónico) puede también reducirse conservando de manera eficiente la población de ácido nucleico extracelular en la muestra, y en particular evitando, respectivamente reduciendo la contaminación por ácidos nucleicos intracelulares en particular ADN genómico fragmentado que se libera de células dañadas o en descomposición contenidas en la muestra. Como se muestra en los ejemplos, usar una combinación respectiva es particularmente eficaz en la estabilización de una muestra que contiene células, incluso muestras muy complejas tales como una muestra de sangre completa. También está dentro del alcance de la presente invención usar una mezcla de diferentes inhibidores de la apoptosis en combinación con diferentes agentes hipertónicos. Los ejemplos adecuados y preferidos del inhibidor de la apoptosis y el agente hipertónico, así como las concentraciones adecuadas y preferidas de los respectivos agentes adecuados para lograr una estabilización eficiente de la muestra, se describen anteriormente con detalle junto con los ejemplos, en los que se usa o bien un inhibidor de la apoptosis o bien un agente hipertónico para estabilizar la muestra biológica que contiene células. Se hace referencia a la descripción anterior que también es válida para el ejemplo, en el que se usa un inhibidor de la apoptosis en combinación con un agente hipertónico. Preferiblemente, al menos un inhibidor de la caspasa, preferiblemente un péptido específico de la caspasa modificado, preferiblemente modificado en el extremo C con un grupo O-fenoxi tal como Q-VD-OPh, se usa en combinación con al menos un compuesto orgánico hidroxilado, p. ej. un hidrato de carbono, tal como dihidroxiacetona o un poliol, como agente hipertónico. Como se demuestra mediante los ejemplos, una combinación respectiva es notablemente eficaz para estabilizar una muestra biológica que contiene células, en particular una muestra de sangre completa, a temperatura ambiente durante más de 3 días e incluso durante 6 días.

De acuerdo con una realización, se usa una combinación de agentes estabilizantes que comprende al menos un inhibidor de la apoptosis, al menos un agente hipertónico y/o al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se definió anteriormente. Los ejemplos de combinaciones respectivas incluyen (1) una combinación de al menos un inhibidor de la apoptosis y al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se definió anteriormente, (2) una combinación de al menos un agente hipertónico y al menos un compuesto según la fórmula 1 como se ha definido anteriormente, o (3) una combinación de los tres agentes estabilizantes, es decir, al menos un inhibidor de la apoptosis, al menos un agente hipertónico y al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se definió anteriormente. Una combinación respectiva también puede comprender aditivos adicionales que mejoran el efecto estabilizante tal como p. ej. anticoagulantes y agentes quelantes. De acuerdo con una realización, la combinación de agentes estabilizantes comprende un inhibidor de la caspasa y un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante tal como EDTA. Las combinaciones respectivas pueden ser de acuerdo con un quinto sub-aspecto utilizado ventajosamente en un método adecuado para estabilizar una población de ácido nucleico extracelular comprendida en una muestra que contiene células de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención. El efecto estabilizante observado con combinaciones de agentes estabilizantes es más fuerte que el efecto observado para cualquiera de los agentes estabilizantes individuales cuando se usa solo y/o permite usar concentraciones más bajas, haciendo de este modo que el uso combinatorio de agentes estabilizantes sea una opción atractiva. Las realizaciones adecuadas y preferidas del inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y el compuesto de acuerdo con la fórmula 1 definido anteriormente, así como las concentraciones adecuadas y preferidas de los respectivos agentes adecuados para lograr una estabilización eficiente de la muestra, se describen anteriormente con detalle junto con los ejemplos, en los que se usa o bien un inhibidor de la apoptosis, o un agente hipertónico o un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 para estabilizar la muestra biológica que contiene células.

Como se discute en el fundamento de la invención, los ácidos nucleicos extracelulares no están generalmente presentes "desnudos" en la muestra, sino que están p. ej. estabilizados hasta cierto punto estando liberados protegidos en complejos o contenidos en vesículas y similares. Esto tiene el efecto de que los ácidos nucleicos extracelulares ya están estabilizados en cierta medida por naturaleza y, por ello, habitualmente no se degradan rápidamente por nucleasas en muestras que contienen células, tales como sangre completa, plasma o suero. Por lo tanto, cuando se pretende estabilizar ácidos nucleicos extracelulares que están comprendidos en una muestra biológica, uno de los problemas principales es la dilución, respectivamente la contaminación de la población de ácido nucleico extracelular por ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado, que se origina a partir de células dañadas o moribundas que están contenidas en la muestra. Esto plantea también un problema cuando se procesan muestras agotadas de células, tales como plasma o suero (que a veces también se describe como "libre de células", aunque pueden comprender cantidades minoritarias de células). La tecnología de estabilización descrita aquí es de particular ventaja a este respecto porque no solo preserva sustancialmente los ácidos nucleicos extracelulares presentes en la muestra y p. ej. inhibe la degradación de los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos (preferiblemente al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o lo más preferiblemente al menos en un 95% durante el período de estabilización comparado con una muestra no estabilizada o una muestra estabilizada con EDTA), sino que además reduce eficientemente la liberación de ADN genómico a partir de las células contenidas en la muestra y/o reduce la fragmentación del ADN genómico respectivo. De acuerdo con una realización, usando el inhibidor de la apoptosis el agente hipertónico y/o el compuesto de acuerdo con la fórmula 1 para estabilizar la muestra que contiene células de acuerdo con las enseñanzas de la presente

invencción tienen el efecto de que el aumento de ADN que resulta de una liberación de ADN de las células contenidas en la muestra se reduce en comparación con una muestra no estabilizada. De acuerdo con una realización, dicha liberación de ADN genómico se reduce en al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 10 veces, al menos 12 veces, al menos 15 veces, al menos 17 veces o al menos 20 veces durante el período de estabilización en comparación con la muestra no estabilizada o una muestra correspondiente que es estabilizada con EDTA (en particular en el caso de una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre, como plasma o suero). De acuerdo con una realización, dicha liberación de ADN genómico se reduce en al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% sobre el período de estabilización en comparación con una muestra no estabilizada o una muestra correspondiente que está estabilizada con EDTA (en particular en el caso de una muestra de sangre o una muestra derivada de sangre tal como plasma o suero). La liberación de ADN puede determinarse, p. ej., mediante la cuantificación del ADN 18S ribosómico como se describe en el presente texto en la sección de ejemplos. P. ej. las muestras de sangre estabilizadas con EDTA estándar muestran un aumento de 40 veces el ADN determinado p. ej. en el día 6 de almacenamiento a temperatura ambiente en un ensayo respectivo (ver Fig. 2b). La estabilización que se puede conseguir con las enseñanzas de la presente invencción reduce notablemente esta liberación de ADN incluso por debajo, p. ej. a un máximo de 4 veces. Por lo tanto, la población de ácido nucleico extracelular contenida en la muestra se estabiliza considerablemente en comparación con las muestras estabilizadas en tubos de EDTA estándar. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, el efecto de estabilización que se logra con el inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se enseña en la presente invencción, da como resultado que la liberación de ADN de las células contenidas en la muestra se reduce al menos hasta un máximo de 10 veces, preferiblemente 7 veces, más preferiblemente 5 veces y lo más preferiblemente se reduce al menos hasta un máximo de 4 veces, como puede determinarse p. ej. en el ensayo de ADN 18S descrito en los ejemplos. Como se muestra por los ejemplos, se puede lograr una estabilización efectiva de la población de ácido nucleico extracelular durante un período de hasta al menos 6 días. Durante un almacenamiento de las muestras más corto, p. ej. hasta tres días, la liberación de ADN puede reducirse al menos hasta un máximo de dos veces, como puede determinarse p. ej. en el ensayo de ADN 18S descrito en los ejemplos. Así, la liberación de ADN puede reducirse a 2 veces o menos hasta tres días de almacenamiento cuando se usan los métodos de estabilización de acuerdo con la presente invencción. Esta es una mejora notable en la estabilización de la población de ácido nucleico extracelular en comparación con los métodos de la técnica anterior. Esto mejora significativamente la precisión de cualquier prueba posterior. En ciertos casos, por ejemplo, si el material de muestra debe ser transportado largas distancias o almacenado por períodos más largos, p. ej. a temperatura ambiente (como puede ser, por ejemplo, el caso en ciertos países), el proceso descrito en este documento hace posible por primera vez que estas pruebas se lleven a cabo después de dicho período de tiempo. Sin embargo, por supuesto, las muestras también pueden procesarse adicionalmente más temprano, si se desea. No es necesario hacer uso de todo el período de estabilización que cabe conseguir. La estabilización que se logra con la presente invencción reduce las variaciones en la población de ácido nucleico extracelular que pueden resultar de una manipulación/procesamiento diferente de las muestras (p. ej. condiciones y períodos de almacenamiento) después de ser recogidas. Esto mejora en gran medida la estandarización de la manipulación y el análisis molecular.

Se pueden usar otros aditivos adicionales además del inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se definió antes, con el fin de estabilizar adicionalmente la muestra que contiene células. La selección de aditivos adecuados que también pueden contribuir al efecto de estabilización puede depender también del tipo de muestra que contiene células que se ha de estabilizar. Por ejemplo cuando se procesa sangre completa como muestra biológica que contiene células, es ventajoso y también común incluir un anticoagulante, p. ej. seleccionado entre el grupo que consiste en heparina, ácido etilendiaminotetraacético, citrato, oxalato y cualquier combinación de los mismos. En una realización ventajosa el anticoagulante es un agente quelante. Un agente quelante es un compuesto orgánico que es capaz de formar enlaces de coordinación con metales a través de dos o más átomos del compuesto orgánico. Los agentes quelantes de acuerdo con la presente invencción incluyen, pero sin limitarse a ellos, ácido dietilentriamino pentaacético (DTPA), ácido etilendinitrilo tetraacético (EDTA), ácido etilenglicol tetraacético (EGTA) y N,N-bis (carboximetil) glicina (NTA). De acuerdo con una realización preferida, se usa EDTA. Como se usa en el presente texto, el término "EDTA" indica, entre otras cosas, la porción de EDTA de un compuesto de EDTA tal como, por ejemplo, K₂EDTA, K₃EDTA o Na₂EDTA. El uso de un agente quelante tal como EDTA tiene también el efecto ventajoso de que las nucleasas tales como las DNAsas se inhiben, evitando por tanto, p. ej., una degradación del ADN extracelular por DNAsas. Además, se descubrió que el EDTA usado/añadido en concentraciones más altas es capaz de reducir la liberación de ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico de las células, apoyando así el efecto estabilizador que se logra mediante el inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1. Sin embargo, el EDTA por sí solo no es capaz de inhibir eficazmente la fragmentación de, p. ej., ADN genómico que se libera de las células contenidas en la muestra. Así pues, el EDTA no logra un efecto de estabilización suficiente. Pero usado en combinación con las enseñanzas de la presente invencción, en particular en combinación con el inhibidor de la apoptosis, en particular el inhibidor de la caspasa, puede mejorar adicionalmente la estabilización por las razones discutidas anteriormente. Además, también parece aumentar la estabilidad química del ARN. De acuerdo con una realización, la concentración del agente quelante, preferiblemente EDTA, en la muestra biológica que se mezcla con uno o más de los compuestos estabilizantes descritos anteriormente está en el intervalo elegido entre el grupo que consiste en 0,05 mM a 100 mM, 0,05 mM a 50 mM, de 0,1 mM a 30 mM, de 1 mM a 20 mM y de 2 mM a 15 mM después de la etapa de puesta en contacto. Las concentraciones respectivas son particularmente efectivas cuando se estabilizan muestras de sangre,

plasma y/o suero, en particular muestras de sangre de 10 ml.

También se pueden usar otros aditivos con el fin de soportar adicionalmente la estabilización de la muestra que contiene células, respectivamente soportar la preservación de la población de ácido nucleico extracelular. Los ejemplos de los aditivos respectivos incluyen, pero no se limitan a ellos, inhibidores de nucleasas, en particular compuestos inhibidores de RNasa y ADNasa. Los ejemplos de inhibidores de RNasa incluyen, pero no se limitan a ellos, anticuerpos anti-nucleasa o complejos de ribonucleósido-vanadilo. Cuando se elige otro aditivo adicional respectivo, se debe tener cuidado de no comprometer y/o no contrarrestar el efecto estabilizador del inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto de acuerdo con la fórmula 1. Así pues, no deben usarse aditivos en concentraciones que tengan como resultado la lisis, o la apoyen, y/o degradación de las células contenidas en la muestra biológica y/o que soportan la degradación de los ácidos nucleicos contenidos en la fracción libre de células de la muestra biológica.

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

a) al menos un inhibidor de la caspasa como inhibidor de apoptosis, preferiblemente con Q-VD-OPh, preferiblemente en un intervalo de concentración de 1 μ M a 30 μ M;

b) opcionalmente al menos un compuesto orgánico hidroxilado tal como dihidroxiacetona como agente hipertónico, preferiblemente en un intervalo de concentración de 0,1 M a 0,6 M; y

c) opcionalmente al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 definida anteriormente (los ejemplos preferidos y las concentraciones se han descrito anteriormente) y / o

d) otro aditivo, preferiblemente un agente quelante preferiblemente en un intervalo de concentración de 4 mM a 50 mM, preferiblemente de 4 mM a 20 mM, lo más preferiblemente EDTA.

Los componentes de la composición de estabilización pueden estar comprendidos, respectivamente, disueltos en un tampón, p. ej. un tampón biológico tal como MOPS, TRIS, PBS y similares.

El inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se definió anteriormente, así como los aditivos adicionales opcionalmente presentes pueden estar presentes p. ej. en un dispositivo, preferiblemente un recipiente, para recoger la muestra, o se puede añadir a un dispositivo de recolección respectivo inmediatamente antes de la recolección de la muestra biológica; o puede añadirse al dispositivo de recolección inmediatamente después de que la muestra se haya recogido en el mismo. También está dentro del alcance de la presente invención añadir el agente o agentes estabilizantes y, opcionalmente, los otros aditivos por separado, a la muestra biológica que contiene células. Sin embargo, para una mayor facilidad de manipulación, se prefiere que el uno o más agentes estabilizantes y opcionalmente los aditivos adicionales se proporcionen en una composición. Además, en una realización ventajosa, el inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se describió anteriormente y opcionalmente el otro o los otros aditivos, están presentes en el dispositivo de recogida antes de añadir la muestra. Esto asegura que la muestra biológica que contiene células se estabiliza inmediatamente al contacto con el agente o los agentes de estabilización. El agente o agentes de estabilización están presentes en el recipiente en una cantidad efectiva para proporcionar la estabilización de la cantidad de muestra que contiene células que se va a recoger, respectivamente comprendida en dicho recipiente. Como se ha descrito, la muestra se puede mezclar con el agente o agentes de estabilización directamente después y/o durante la recogida de la muestra, proporcionando así una muestra estabilizada.

Preferiblemente, la muestra se mezcla con el agente o agentes de estabilización directamente después y/o durante la recolección de la muestra. Por tanto, preferiblemente, el agente o agentes de estabilización y los aditivos descritos anteriormente se proporcionan en forma de una composición de estabilización. Preferiblemente, dicha composición de estabilización se proporciona en forma líquida. Puede ser, p. ej., previamente introducida en el dispositivo de recolección de muestras de forma que la muestra se estabilice inmediatamente durante la recolección. De acuerdo con un ejemplo, la composición de estabilización se pone en contacto con la muestra que contiene células en una relación volumétrica elegida entre 10:1 a 1:20, 5:1 a 1:15, 1:1 a 1:10 y 1:2 a 1:5. Una ventaja particular de las enseñanzas de la presente invención es que se puede lograr la estabilización de un gran volumen de muestra con un pequeño volumen de la composición de estabilización. Por tanto, preferiblemente, la relación de composición de estabilización a muestra se encuentra en un intervalo de 1:2 a 1:7, más preferiblemente 1:3 a 1:5.

La expresión "muestra que contiene células" como se usa en el presente documento, se refiere en particular a una muestra que comprende al menos una célula. La muestra que contiene células puede comprender al menos 2, al menos 10, al menos 50, al menos 100, al menos 250, al menos 500, al menos 1000, al menos 1500, al menos 2000 o al menos 5000 células. Además, también las muestras que contienen células que comprenden considerablemente más células están comprendidas en dicha expresión y se pueden estabilizar con las enseñanzas de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, la expresión "muestra que contiene células" también se refiere, y de este modo abarca, a muestras agotadas de células, que incluyen muestras agotadas de células que comúnmente se denominan "libres de células", tales como p. ej. el plasma sanguíneo ya que las muestras respectivas a menudo incluyen células residuales. Al menos, frecuentemente no puede excluirse totalmente que incluso las muestras llamadas "libres de

células" como el plasma sanguíneo comprendan cantidades residuales de células que, en consecuencia, plantean el riesgo de que la población de ácido nucleico extracelular se contamine con ácidos nucleicos intracelulares liberados de dichas células residuales. Por tanto, las respectivas muestras agotadas de células y "libres de células" están de acuerdo con una realización también comprendida por la expresión "muestra que contiene células". Así pues, la "muestra que contiene células" puede comprender grandes cantidades de células, como es el caso, p. ej., con la sangre completa, pero también puede comprender solo cantidades meramente menores de células. Por lo tanto, la expresión "muestra que contiene células" también abarca muestras que solo pueden ser sospechosas o que presentan un riesgo de contener células. Como se discutió anteriormente, también con respecto a las muestras biológicas que solo comprenden cantidades menores, respectivamente residuales, de células tales como p. ej. plasma sanguíneo (el plasma sanguíneo – dependiendo del método de preparación – contiene normalmente pequeñas cantidades residuales de células, aunque comúnmente se le conoce como libre de células), el método de la presente invención tiene ventajas considerables ya que estas células residuales también pueden dar como resultado una contaminación no deseada de los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos. El uso de la tecnología de estabilización de la presente invención también asegura que las muestras respectivas que solo comprenden cantidades residuales de células o que son meramente sospechosas o plantean un riesgo de cantidades residuales de células, se estabilizan eficientemente como también se describió con detalle anteriormente. El uso del método de estabilización descrito aquí tiene la ventaja de que al margen de la composición de la muestra y el número de células contenidas en ella, la población de ácido nucleico extracelular contenida en la misma está sustancialmente preservada, respectivamente estabilizada, permitiendo así la estandarización del posterior aislamiento y/o análisis de los ácidos nucleicos extracelulares contenidos.

De acuerdo con una realización, la muestra biológica que contiene células se elige entre el grupo que consiste en sangre completa, muestras derivadas de sangre, plasma, suero, esputo, fluido lagrimal, líquido linfático, orina, sudor, licor, líquido cefalorraquídeo, ascitis, leche, heces, lavado bronquial, saliva, líquido amniótico, secreciones nasales, secreciones vaginales, semen/líquido seminal, secreciones de heridas y sobrenadantes de cultivos celulares y sobrenadantes obtenidos de otras muestras de frotis. De acuerdo con una realización, la muestra biológica que contiene células es un fluido corporal, una secreción corporal o excreción corporal, preferiblemente un fluido corporal, más preferiblemente sangre completa, plasma o suero. La muestra biológica que contiene células comprende ácidos nucleicos extracelulares. De acuerdo con otra realización, la muestra biológica que contiene células es una muestra no fluida derivada de un ser humano o animal, tal como p. ej. heces, tejido o una muestra de biopsia. Otros ejemplos de muestras biológicas que contienen células y que se pueden estabilizar con el método de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, suspensiones celulares de muestras biológicas, cultivos celulares, sobrenadante de cultivos celulares y similares, que comprenden ácidos nucleicos extracelulares.

Como se ha descrito con anterioridad, y como se demuestra por los ejemplos, el uso de los métodos de la presente invención permite estabilizar la muestra que contiene células sin refrigeración o congelación durante un período de tiempo prolongado. Por tanto, las muestras pueden mantenerse a temperatura ambiente o incluso a temperaturas elevadas, p. ej. de hasta 30 °C o hasta 40 °C. De acuerdo con una realización, se consigue un efecto estabilizador durante al menos dos días, preferiblemente al menos tres días; más preferiblemente al menos de un día a seis días, lo más preferiblemente durante un tiempo desde al menos un día hasta al menos siete días a temperatura ambiente. Como se muestra en los ejemplos, las muestras que fueron estabilizadas de acuerdo con el método descrito de la presente invención no se vieron comprometidas sustancialmente cuando se almacenaron durante 3 días a temperatura ambiente. Incluso durante almacenamientos más prolongados durante un tiempo de hasta 6 o incluso 7 días a temperatura ambiente, la población de ácido nucleico extracelular estaba sustancialmente más estabilizada en comparación con muestras no estabilizadas o p. ej. en comparación con muestras que se estabilizaron usando un método estándar tal como un tratamiento con EDTA. Aunque el efecto de la estabilización puede disminuir con el tiempo, aún es suficiente preservar la composición de la población de ácido nucleico extracelular para permitir el análisis y/o el procesamiento adicional. Por lo tanto, las muestras que fueron estabilizadas de acuerdo con los métodos de la presente invención eran todavía adecuadas para aislar y opcionalmente analizar los ácidos nucleicos extracelulares contenidos en ellas incluso después de un almacenamiento más prolongado a temperatura ambiente. Por tanto, como las muestras no se vieron comprometidas en particular cuando se usa la combinación de agentes de estabilización preferida, son concebibles incluso tiempos de almacenamiento/envío más largos. Sin embargo, generalmente, no son necesarios períodos más largos, como el almacenamiento regular y, p. ej., el tiempo de transporte al laboratorio en que se realiza el aislamiento y opcionalmente el análisis del ácido nucleico, generalmente no excede de 6 o 7 días, pero por lo general se completa incluso después de dos o tres días. Como se muestra en los ejemplos, la eficacia de la estabilización es particularmente buena durante este período de tiempo. Sin embargo, los tiempos de estabilización extraordinariamente largos y la eficacia de estabilización que se pueden lograr con el método de acuerdo con la presente invención proporcionan un importante factor de seguridad.

Los métodos y también las composiciones descritas posteriormente de acuerdo con la presente invención permiten también la estabilización de grandes volúmenes de muestras biológicas con pequeños volúmenes de sustancias añadidas porque los aditivos que se usan de acuerdo con las enseñanzas descritas en este documento son muy activos. Esta es una importante ventaja debido a que el tamaño/volumen de la muestra plantea considerables limitaciones en el procedimiento de aislamiento posterior, en particular cuando se pretende utilizar procesos automáticos para aislar los ácidos nucleicos extracelulares contenidos en las muestras. Además, hay que considerar que los ácidos nucleicos extracelulares a menudo solo están comprendidos en pequeñas cantidades en la muestra

contenida. Por lo tanto, procesar volúmenes más grandes de una muestra que contiene células tal como p. ej. una muestra de sangre, tiene la ventaja de que se pueden aislar más ácidos nucleicos circulantes de la muestra y, por lo tanto, están disponibles para un análisis posterior.

5 La estabilización de la muestra biológica puede seguirse directamente por técnicas para analizar ácidos nucleicos, o los ácidos nucleicos pueden purificarse de la muestra. Por tanto, la muestra que se estabilizó de acuerdo con el método descrito en este documento puede analizarse en un método analítico y/o de detección de ácido nucleico y o puede procesarse adicionalmente. P. ej. el ácido nucleico extracelular se puede aislar de la muestra estabilizada y puede entonces analizarse en un método analítico y/o de detección de ácido nucleico o se puede procesar adicionalmente.

10 Además, de acuerdo con un segundo aspecto, se proporciona un método para aislar ácidos nucleicos extracelulares a partir de una muestra biológica que contiene células, en donde dicho método comprende las etapas de:

a) estabilizar la población de ácido nucleico extracelular comprendida en una muestra que contiene células, de acuerdo con el método definido en el primer aspecto de la presente invención;

b) aislar los ácidos nucleicos extracelulares.

15 Como se ha discutido anteriormente, la estabilización descrita en la presente memoria tiene el efecto de que la población de ácido nucleico extracelular contenida en la muestra se conserva sustancialmente en el estado que había mostrado en el momento en que fue obtenida, respectivamente extraída, la muestra biológica. En particular, el alto aumento generalmente observado en ácidos nucleicos que resulta de los ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico, más específicamente ADN genómico fragmentado, liberado de células dañadas o moribundas, se reduce eficientemente como se demuestra en los ejemplos. Por lo tanto, los ácidos nucleicos extracelulares obtenidos a partir de una muestra estabilizada respectivamente comprenden menos contaminaciones con ácidos nucleicos intracelulares que se originan de células degradadas o moribundas comprendidas en la muestra, y en particular comprenden menores cantidades de ADN genómico fragmentado en comparación con muestras no estabilizadas. Además, la etapa de estabilización única permite aumentar la cantidad de ácidos nucleicos extracelulares recuperables. El método de estabilización de acuerdo con la presente invención puede realizarse sin la reticulación de la muestra. Esto es una ventaja importante sobre el uso de agentes de reticulación tales como formaldehído o liberadores de formaldehído, ya que estos reactivos podrían reducir la cantidad recuperable de ácidos nucleicos extracelulares debido a la reticulación. Por tanto, el método de acuerdo con la presente invención mejora la capacidad de diagnóstico y pronóstico de los ácidos nucleicos extracelulares. Además, dicha estabilización permite almacenar y/o manipular la muestra, p. ej. transportarla, incluso a temperatura ambiente, durante un período de tiempo prolongado antes de separar las células contenidas en la muestra y/o antes de aislar los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos en ella en la etapa b). Con respecto a los detalles de la estabilización, se hace referencia a la descripción anterior que también es válida aquí.

25 De acuerdo con una realización, la muestra biológica que contiene células, tal como p. ej. una muestra de sangre completa, se estabiliza en la etapa a) como se describe con detalle anteriormente usando al menos un inhibidor de la apoptosis, al menos un agente hipertónico y/o al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se describió anteriormente, preferiblemente usando al menos dos de estos agentes de estabilización y, opcionalmente, otros aditivos. Los ejemplos adecuados y preferidos se describieron anteriormente. Particularmente preferido es el uso de un inhibidor de la caspasa en combinación con un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante como se describió anteriormente, para estabilizar muestras de sangre entera.

40 Si la muestra comprende grandes cantidades de células como es p. ej. el caso la sangre completa, las células se separan del resto de la muestra con el fin de obtener una fracción de la muestra libre de células, respectivamente reducida en células o agotada en células, que comprende los ácidos nucleicos extracelulares. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, las células se eliminan de la muestra que contiene células entre la etapa a) y la etapa b). Este paso intermedio es solo opcional y p. ej. puede ser obsoleto si se procesan muestras que meramente comprenden cantidades menores de células residuales tales como p. ej. plasma o suero. Sin embargo, con el fin de mejorar los resultados, se prefiere que también se eliminen las células restantes respectivas (o las células potencialmente restantes) ya que podrían contaminar la población de ácido nucleico extracelular durante el aislamiento. Dependiendo del tipo de muestra, las células, incluidas las células residuales, se pueden separar y eliminar, p. ej. por centrifugación, preferiblemente centrifugación a alta velocidad, o usando medios distintos a la centrifugación, tal como p. ej. filtración, sedimentación o unión a superficies sobre partículas (opcionalmente magnéticas) si se ha de evitar una etapa de centrifugación. Los pasos de eliminación de células respectivos también se pueden incluir fácilmente en un protocolo de preparación de muestras automatizado. Las células retiradas respectivamente con anticipación también pueden procesarse más. Las celdas pueden p. ej. almacenarse, y/o las biomoléculas tales como p. ej. ácidos nucleicos o proteínas se pueden aislar a partir de las células eliminadas.

55 Además, está también dentro del alcance de la presente invención incluir otras etapas intermedias etapas adicionales para procesar la muestra.

Después se aíslan los ácidos nucleicos extracelulares en la etapa b), p. ej. de la fracción libre de células, respectivamente empobrecida en células, p. ej. de sobrenadantes, plasma y/o suero. Para aislar ácidos nucleicos

extracelulares se puede usar cualquier método de aislamiento de ácidos nucleicos conocido que sea adecuado para aislar ácidos nucleicos de la muestra respectiva, respectivamente la muestra agotada de células. Los ejemplos de métodos de purificación respectivos incluyen, pero no están limitados a ellos, extracción, extracción en fase sólida, purificación basada en sílice, purificación basada en partículas magnéticas, extracción con fenol-cloroformo, cromatografía, cromatografía de intercambio aniónico (usando superficies de intercambio aniónico), electroforesis, filtración, precipitación, inmunoprecipitación de cromatina y combinaciones de los mismos. También está dentro del alcance de la presente invención aislar específicamente ácidos nucleicos extracelulares diana específicos, p. ej. usando sondas apropiadas que permiten una unión específica de secuencia y están acopladas a un soporte sólido. También puede ser utilizada cualquier otra técnica de aislamiento de ácidos nucleicos conocida por los expertos. De acuerdo con una realización, los ácidos nucleicos se aíslan usando un agente caotrópico y/o alcohol. Preferiblemente, los ácidos nucleicos se aíslan uniéndolos a una fase sólida, preferiblemente una fase sólida que comprende sílice o grupos funcionales de intercambio aniónico. También están disponibles comercialmente métodos y *kits* adecuados tales como el *Kit QIAamp® Circulating Nucleic Acid (QIAGEN)*, el *kit Chemagic Circulating NA (Chemagen)*, el *Kit NucleoSpin Plasma XS (Macherey-Nagel)*, el *Kit Plasma/Serum Circulating DNA Purification (Norgen Biotek)*, el *Kit Plasma/Serum Circulating DNA Purification (Norgen Biotek)*, el *Kit High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume (Roche)* y otros *kits* disponibles comercialmente adecuados para extraer y purificar ácidos nucleicos circulantes.

De acuerdo con una realización, todos los ácidos nucleicos que están comprendidos en la muestra que se obtiene después de la etapa a) u opcionalmente obtenida después de que las células han sido eliminadas en la etapa intermedia, se aíslan, p. ej. se aíslan de la fracción libre de células, respectivamente de la fracción de células agotadas. P. ej. los ácidos nucleicos totales pueden ser aislados del plasma o del suero y los ácidos nucleicos extracelulares estarán comprendidos como una porción en estos ácidos nucleicos extraídos. Si las células se eliminan de manera eficiente, los ácidos nucleicos totales aislados comprenderán predominantemente o incluso consistirán en ácidos nucleicos extracelulares. También está dentro del alcance de la presente invención aislar predominantemente al menos un ácido nucleico diana específico. Un ácido nucleico diana puede ser, p. ej., un cierto tipo de ácido nucleico, p. ej. ARN o ADN, incluyendo ARNm, microARN, otros ácidos nucleicos no codificadores, ácidos nucleicos modificados epigenéticamente y otros ácidos nucleicos. También está dentro del alcance de la presente invención, p. ej. digerir el ácido nucleico no diana utilizando nucleasas después del aislamiento. El término ácido nucleico diana se refiere también a un tipo específico de ácido nucleico, p. ej. un ácido nucleico extracelular específico que se sabe que es un cierto marcador de enfermedad. Como se discutió anteriormente, el aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares también puede comprender el aislamiento específico de un ácido nucleico diana respectivo, p. ej. usando sondas de captura apropiadas. La expresión "un ácido nucleico diana" también se refiere a un ácido nucleico que tiene una cierta longitud, p. ej. un ácido nucleico que tiene una longitud de 2000 nt o menos, 1000 nt o menos o 500 nt o menos. El aislamiento de los ácidos nucleicos diana más pequeños respectivos puede ser ventajoso porque se sabe que los ácidos nucleicos extracelulares tienen normalmente un tamaño más pequeño de menos de 2000 nt, usualmente menos de 1000 nt, y frecuentemente incluso menos de 500 nt. Los tamaños, respectivamente los intervalos de tamaño indicados en el presente texto se refieren a la longitud de la cadena. Es decir, en el caso del ADN, se refiere a pb. Enfocar el aislamiento, respectivamente la purificación, sobre los ácidos nucleicos pequeños respectivos puede incrementar la porción de ácidos nucleicos extracelulares obtenidos en los ácidos nucleicos aislados. Los métodos de estabilización de acuerdo con la presente invención permiten, en particular debido a la inhibición de la fragmentación de ADN genómico intracelular, una separación más eficaz de dicho ADN genómico de alto peso molecular a partir de la población de ácido nucleico extracelular fragmentada, p. ej. durante el procedimiento de extracción de ácido nucleico. Como la diferencia sustancial de tamaño entre los ácidos nucleicos genómicos y circulantes se preserva esencialmente usando la tecnología de estabilización de acuerdo con la presente invención, el ADN genómico puede ser eliminado, p. ej. mediante la recuperación selectiva del tamaño de ADN de manera más eficiente que sin la estabilización respectiva. Métodos adecuados para lograr un respectivo aislamiento selectivo de la población de ácido nucleico extracelular, p. ej. agotando el ADN genómico de alto peso molecular son bien conocidos en la técnica anterior y, por lo tanto, no necesitan más descripción aquí. P. ej. sería suficiente usar un método de selección de tamaño que agote una muestra de cualquier ácido nucleico de más de 1.000 – 10.000 nucleótidos o pares de bases. Como la diferencia de tamaño entre los ácidos nucleicos genómicos (habitualmente con más de 10.000 bp) y extracelulares (habitualmente menos de 1.000 bp) en una muestra estabilizada de acuerdo con la tecnología descrita suele ser relativamente grande debido a la estabilización eficiente (la diferencia puede p. ej. basarse en un intervalo de 1.000 – 10.000 pb), podrían aplicarse métodos conocidos para aislar selectivamente ácido nucleico extracelular de una muestra biológica. Esto también proporciona otras oportunidades para reducir la cantidad de ácidos nucleicos intracelulares en la población de ácido nucleico extracelular aislada. Por ejemplo, la eliminación de ADN genómico durante el protocolo de extracción de ácido nucleico también podría suplementar o incluso reemplazar una centrifugación de alta fuerza g separada de una muestra de plasma antes de comenzar la extracción de ácido nucleico con el fin de eliminar las células residuales. Se evita que el ADN genómico que se libera de dichas células residuales se degrade masivamente debido a la estabilización de acuerdo con la presente invención y, en consecuencia, puede eliminarse mediante protocolos de aislamiento selectivos del tamaño. Esta opción es de ventaja particular, ya que muchos laboratorios clínicos no tienen una centrífuga capaz de realizar tal centrifugación de alta fuerza g u otros medios para eliminar en particular cantidades traza de células residuales.

Los ácidos nucleicos aislados pueden luego analizarse y/o procesarse adicionalmente en una etapa c) usando métodos analíticos y/o de ensayo adecuados. P. ej. pueden identificarse, modificarse, ponerse en contacto con al menos una enzima, amplificarse, someterse a transcripción inversa, clonarse, secuenciarse, ponerse en contacto con

una sonda, detectarse (su presencia o ausencia) y/o cuantificarse. Los métodos respectivos son bien conocidos en la técnica anterior y se aplican comúnmente en el campo médico, de diagnóstico y/o de pronóstico para analizar ácidos nucleicos extracelulares (véase también la descripción detallada en el fundamento de la presente invención). Así pues, después de aislar los ácidos nucleicos extracelulares, opcionalmente como parte del ácido nucleico total, el ARN total y/o el ADN total (véase anteriormente), se pueden analizar para identificar la presencia, la ausencia o la gravedad de un estado patológico que incluye, pero no se limita a ellas, una multitud de enfermedades neoplásicas, en particular enfermedades premalignas y malignas como distintas formas de cáncer. P. ej. los ácidos nucleicos extracelulares aislados pueden analizarse para detectar marcadores de diagnóstico y/o pronóstico (por ejemplo, ácidos nucleicos extracelulares derivados de fetos o tumores) en muchos campos de aplicación que incluyen, sin limitarse a ellas, pruebas genéticas prenatales no invasivas, respectivamente, cribado, cribado de enfermedades, cribado de agentes patógenos, oncología, cribado de cáncer, cribado de cáncer en estadio temprano, monitorización de terapia del cáncer, pruebas genéticas (genotipado), pruebas de enfermedades infecciosas, diagnóstico de lesiones, diagnóstico traumatológico, medicina de trasplantes o muchas otras enfermedades y, por lo tanto, son de importancia en diagnóstico y/o pronóstico. De acuerdo con una realización, los ácidos nucleicos extracelulares aislados se analizan para identificar y/o caracterizar una enfermedad o una característica fetal. Por lo tanto, como se discutió anteriormente, el método de aislamiento descrito en el presente texto puede comprender además una etapa c) de análisis y/o procesamiento de ácidos nucleicos. Por lo tanto, según un ejemplo, los ácidos nucleicos extracelulares aislados se analizan en la etapa c) para identificar, detectar, seleccionar, cribar o excluir una enfermedad y/o al menos una característica fetal. El análisis/procesamiento posterior de los ácidos nucleicos puede realizarse usando cualquier método de análisis/procesamiento de ácidos nucleicos incluyendo, pero sin limitarse a ellos, tecnologías de amplificación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), reacción en cadena de polimerasa en tiempo real cuantitativa (Q-PCR), PCR digital, electroforesis en gel, electroforesis capilar, espectrometría de masas, detección de fluorescencia, espectrometría ultravioleta, ensayos de hibridación, secuenciación de ADN o ARN, análisis de restricción, transcripción inversa, NASBA, reacción en cadena de polimerasa alelo específica, ensamblaje de ciclación de polimerasa (PCA), reacción en cadena de la polimerasa asimétrica, lineal después de la reacción en cadena de la polimerasa exponencial (LATE-PCR), amplificación dependiente de helicasa (HDA), reacción en cadena de la polimerasa de inicio en caliente, reacción en cadena de la polimerasa específica de intersecuencia (ISSR), reacción en cadena de la polimerasa inversa, reacción en cadena de la polimerasa mediada por ligamiento, reacción en cadena de la polimerasa específica de la metilación (MSP), reacción en cadena de la polimerasa múltiplex, reacción en cadena de la polimerasa anidada, reacción en cadena de la polimerasa en fase sólida, o cualquier combinación de las mismas. Las tecnologías respectivas son bien conocidas por los expertos y por tanto no necesitan una descripción adicional en el presente texto.

De acuerdo con una realización, una o ambas de las etapas de aislamiento o análisis b) y c) ocurren al menos un día, hasta 7 días, después de que la muestra ha sido recolectada, respectivamente estabilizada de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. Los periodos de tiempo adecuados para los que la muestra, en particular una muestra de sangre, respectivamente la población de ácido nucleico extracelular contenida en la misma, pueden estabilizarse usando el método descrito en la presente memoria, también se describen anteriormente y también son válidas aquí. De acuerdo con una realización, la etapa de aislamiento se realiza al menos un día, al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días o al menos 6 días después de recogerse la muestra y se estabiliza de acuerdo con el método según la presente invención. De acuerdo con una realización, una o ambas etapas de aislamiento o de análisis se producen sin congelar la muestra y/o sin usar formaldehído para preservar la muestra biológica que contiene células. La muestra biológica se estabiliza después del contacto con el inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se definió anteriormente, preferiblemente en combinación con otro aditivo tal como un anticoagulante como EDTA. Se usa un anticoagulante preferiblemente cuando se estabiliza sangre o una muestra derivada de sangre. Las muestras estabilizadas respectivamente se pueden manipular, p. ej. pueden ser almacenadas y/o enviadas a temperatura ambiente.

Además, de acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición adecuada para estabilizar la población de ácido nucleico extracelular en una muestra biológica, que comprende:

- a) al menos un inhibidor de la apoptosis, preferiblemente un inhibidor de la caspasa, y/o
- b) al menos un agente hipertónico que estabiliza las células comprendidas en la muestra, preferiblemente dihidroxiacetona; y/o
- c) al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se definió anteriormente; y
- d) opcionalmente al menos un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante.

Como se discutió anteriormente, una composición de estabilización respectiva es particularmente efectiva para estabilizar una muestra biológica que contiene células, en particular sangre completa, plasma y/o suero, estabilizando las células comprendidas y los ácidos nucleicos extracelulares comprendidos conservando sustancialmente, respectivamente estabilizando la población de ácido nucleico extracelular. Una composición de estabilización respectiva permite el almacenamiento y/o la manipulación, p. ej. el envío de la muestra, que preferiblemente es sangre completa, a temperatura ambiente durante al menos dos, preferiblemente al menos tres días, sin comprometer

sustancialmente la calidad de la muestra, respectivamente la población de ácido nucleico extracelular contenida en la misma. Por supuesto, no es obligatorio hacer uso del período de estabilización completo posible; las muestras también pueden procesarse antes si se desea. La puesta en contacto de la muestra biológica con la composición de estabilización permite almacenar y/o manipular la muestra, p. ej. enviarla, incluso a temperatura ambiente, antes de aislar y opcionalmente analizar y/o procesar los ácidos nucleicos circulantes contenidos. Por lo tanto, el tiempo entre la recogida o la estabilización de la muestra y la extracción de ácido nucleico puede variar sin afectar sustancialmente a la población, respectivamente a la composición de la población de ácido nucleico extracelular contenida en la misma. En particular, se reducen las diluciones, respectivamente las contaminaciones con ácidos nucleicos intracelulares, en particular ADN genómico fragmentado. Preferiblemente, la composición de estabilización se pone en contacto con la muestra inmediatamente después o durante la recogida de la muestra. Preferiblemente, cuando se estabiliza una muestra de sangre, la composición comprende al menos un inhibidor de la caspasa y al menos un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante como se describió anteriormente. También puede comprender otros agentes estabilizantes como se describe en el presente texto.

Realizaciones adecuadas y preferidas del inhibidor de la apoptosis, el agente hipertónico y/o el compuesto de acuerdo con la fórmula 1, así como las concentraciones adecuadas y preferidas de los compuestos respectivos, se describen arriba con detalle junto con el método de estabilización. Se hace referencia a la descripción anterior que también se aplica con respecto a la composición de estabilización. Preferiblemente, al menos un inhibidor de la caspasa, preferiblemente un péptido específico de la caspasa modificado, preferiblemente modificado en el extremo C con un grupo O-fenoxi tal como Q-VD-OPh, se usa en combinación con al menos un agente hipertónico, preferiblemente un compuesto orgánico hidroxilado tal como dihidroxiacetona. Otros compuestos orgánicos hidroxilados adecuados también se describen con anterioridad, se hace referencia a la descripción respectiva. Como se demuestra por los ejemplos, una combinación respectiva es notablemente eficaz para estabilizar una muestra biológica que contiene células, en particular una muestra de sangre.

Preferiblemente, el al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 es una amida de ácido N,N-dialquil-carboxílico. Los grupos R1, R2, R3 y R4 preferidos se han descrito antes. De acuerdo con una realización, el compuesto se elige entre el grupo que consiste en N,N-dimetilacetamida; N,N-dietilacetamida; N,N-dimetilformamida, N,N-dietilformamida y N,N-dimetilpropanamida. Dicho compuesto también puede usarse en combinación con un inhibidor de la apoptosis, preferiblemente un inhibidor de la caspasa (las realizaciones preferidas se describen más arriba, se refiere a la descripción anterior) y/o un agente hipertónico, preferiblemente un compuesto de hidroxil carbono (los ejemplos preferidos se describen anteriormente, se hace referencia a la descripción anterior).

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

De acuerdo con una realización, la composición de estabilización consiste esencialmente en los estabilizantes y aditivos opcionales mencionados y, opcionalmente, agentes tampón. La composición de estabilización estabiliza la muestra y, por tanto, no promueve la lisis ni la rotura de las células contenidas en la muestra. La composición de estabilización puede reducir el daño de las células comprendidas en la muestra como puede determinarse, p. ej., por los métodos de ensayo descritos en la sección de ejemplos.

La composición se puede proporcionar en una forma sólida. Esto es una opción adecuada, p. ej., si la muestra biológica a estabilizar contiene líquido para disolver el sólido (tal como, por ejemplo, fluidos corporales que contienen células, células en el medio, orina) o si se añade líquido, p. ej. agua, para disolver el sólido. La ventaja de usar una composición de estabilización sólida es que los sólidos son generalmente más estables químicamente. Sin embargo, también se puede usar una composición líquida. Las composiciones líquidas a menudo tienen la ventaja de que la mezcla con la muestra a estabilizar puede conseguirse rápidamente, proporcionando así básicamente un efecto estabilizador inmediato tan pronto como la muestra entra en contacto con la composición de estabilización líquida. Preferiblemente, el agente o los agentes estabilizantes presentes en la composición de estabilización líquida permanecen estables en solución y no requieren pretratamiento –como por ejemplo la disolución de precipitados de solubilidad limitada– por el usuario porque los pretratamientos de este tipo presentan riesgo de variaciones en la eficacia de estabilización.

También se proporciona una mezcla que comprende la composición de estabilización de acuerdo con la presente invención mezclada con una muestra biológica. Los ejemplos adecuados y preferidos de muestras biológicas así como las concentraciones adecuadas del agente o de los agentes estabilizantes cuando se mezclan con la muestra biológica, se han descrito anteriormente junto con el método de estabilización. Se hace referencia a la descripción anterior que también es válida aquí. Preferiblemente, la composición de estabilización se introduce previamente en un dispositivo colector de muestras de modo que la muestra se estabiliza inmediatamente durante la recogida. De acuerdo con una realización, la composición de estabilización se pone en contacto con la muestra biológica en una relación volumétrica seleccionada entre 10:1 a 1:20, 5:1 a 1:15, 1:1 a 1:10 y 1:2 a 1:5. Una ventaja particular de la composición de estabilización descrita en este documento es que puede lograrse la estabilización de un gran volumen de muestra con un pequeño volumen de la composición de estabilización. Por lo tanto, preferiblemente, la relación de composición de estabilización a muestra se encuentra en un intervalo de 1:2 a 1:7, más preferiblemente de 1:3 a 1:5.

La composición de estabilización según el tercer aspecto de la presente invención puede usarse para estabilizar la población de ácido nucleico extracelular comprendida en una muestra que contiene células. Además, la composición

de estabilización de acuerdo con el tercer aspecto de la presente invención también puede usarse para estabilizar células contenidas en una muestra. Como se describió anteriormente, la composición de estabilización, entre otras cosas, reduce la liberación de ADN genómico de las células, que resulta de las células en descomposición. Por lo tanto, un uso respectivo es también ventajoso y proporcionado por las enseñanzas de acuerdo con la presente invención.

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

La composición de la presente invención puede también incorporarse en un dispositivo de recogida de muestras, en particular un conjunto de recogida de sangre, proporcionando de ese modo una versión nueva y útil de dicho dispositivo. Tales dispositivos incluyen típicamente un contenedor que tiene un extremo abierto y un extremo cerrado. El contenedor es preferiblemente un tubo colector de sangre. El tipo de contenedor también depende de la muestra a recoger. Otros formatos adecuados se describen a continuación.

Además, la presente invención proporciona un recipiente para recoger una muestra biológica que contiene células, preferiblemente una muestra de sangre, en donde el recipiente comprende una composición de estabilización de acuerdo con la presente invención. Proporcionar un recipiente respectivo, p. ej. un tubo de recolección de muestra, que comprende la composición de estabilización de acuerdo con la presente invención, tiene la ventaja de que la muestra se estabiliza rápidamente cuando la muestra es recolectada en el contenedor respectivo. Se han descrito anteriormente detalles con respecto a la composición de estabilización; se hace referencia a la descripción anterior que también es válida aquí.

De acuerdo con una realización, se proporciona un recipiente colector para recibir y recoger una muestra biológica, en donde el recipiente comprende:

a) al menos un inhibidor de la apoptosis tal que cuando se recoge la muestra la concentración del inhibidor de la apoptosis o la combinación de dos o más inhibidores de la apoptosis en la mezcla resultante se selecciona entre al menos 0,01 μM , al menos 0,05 μM , al menos 0,1 μM , al menos 0,5 μM , al menos 1 μM , al menos 2,5 μM o al menos 3,5 μM y preferiblemente está presente en un intervalo de concentración seleccionado entre 0,01 μM a 100 μM , 0,05 μM a 100 μM , 0,1 μM a 50 μM , 1 μM a 40 μM , 1,0 μM 30 μM o 2,5 μM a 25 μM ; y/o

b) al menos un agente hipertónico de manera que cuando se recoge la muestra, la concentración del agente hipertónico o la combinación de dos o más inhibidores de la apoptosis en la mezcla resultante es al menos 0,05 M, al menos 0,1 M, preferiblemente al menos 0,25 M, y preferiblemente está presente en un intervalo de concentración de 0,05 M a 2 M, de 0,1 M a 1,5 M, de 0,15 M a 0,8 M, de 0,2 M a 0,7 M o de 0,1 M a 0,6 M; y/o

c) al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se definió anteriormente, de forma que cuando se recoge la muestra el compuesto de acuerdo con la fórmula 1 está comprendido en una concentración de al menos 0,1%, al menos 0,5%, al menos 0,75%, al menos 1%, al menos 1,25% o al menos 1,5% o en donde dicho compuesto está comprendido en un intervalo de concentración seleccionado entre 0,1% a 50%, 0,1 a 30%, 1% a 20%, 1% a 10%, 1% a 7,5% y 1% a 5%; y/o

d) opcionalmente al menos otro aditivo, preferiblemente un anticoagulante tal como un agente quelante, preferiblemente EDTA si el contenedor es para recoger sangre o un producto sanguíneo. Las concentraciones adecuadas se describen anteriormente y preferiblemente están en el intervalo de 4 mM a 50 mM, más preferiblemente de 4 mM a 20 mM.

Los componentes precargados a), b), c) y/o d) pueden proporcionarse en forma líquida o en forma seca. Para estabilizar sangre completa se prefiere usar al menos los componente a) y d). Preferiblemente, los componentes de estabilización se proporcionan como una composición de estabilización. Una forma seca es p. ej. una opción adecuada si la muestra biológica a estabilizar contiene líquido para disolver el sólido (como, por ejemplo, fluidos corporales que contienen células, células en un medio, orina) o si es líquido p. ej. se añade agua para disolver el sólido. La ventaja de usar una composición de estabilización sólida es que los sólidos generalmente son químicamente más estables que los líquidos. De acuerdo con una realización, la pared interna del recipiente se trata/recubre con una composición de estabilización según la presente invención. Dicha composición se puede aplicar a las paredes internas usando p. ej. un método de secado por pulverización *spray-dry*. Las técnicas de eliminación de líquidos se pueden realizar en la composición de estabilización para obtener una composición protectora en estado sustancialmente sólido. Las condiciones de eliminación del líquido pueden ser tales que den como resultado la eliminación de al menos aproximadamente 50% en peso, al menos aproximadamente 75% en peso, o al menos aproximadamente 85% en peso, de la cantidad original de la composición de estabilización líquida dispensada. Las condiciones de eliminación del líquido pueden ser tales que den como resultado la eliminación del líquido suficiente para que la composición resultante esté en forma de una película, un gel u otra capa sustancialmente sólida o altamente viscosa. Por ejemplo, puede dar como resultado un recubrimiento sustancialmente inmóvil (preferiblemente un recubrimiento que puede volver a disolverse o dispersarse de otra forma al contacto con la muestra que contiene células que preferiblemente es una muestra de producto sanguíneo). Es posible que la liofilización u otras técnicas se puedan emplear para realizar una forma sustancialmente sólida del agente protector (por ejemplo, en forma de uno o más gránulos). Así pues, las

condiciones de eliminación de líquido pueden ser tales que den como resultado un material que al contacto con la muestra bajo consideración (por ejemplo, una muestra de sangre completa) el agente protector se disperse en la muestra y conserve sustancialmente componentes (por ejemplo, ácidos nucleicos extracelulares) en la muestra. Las condiciones de eliminación de líquido pueden ser tales que den como resultado una composición remanente que está sustancialmente libre de cristalinidad, que tiene una viscosidad que es lo suficientemente alta como para que la composición restante sea sustancialmente inmóvil a temperatura ambiente, o ambas cosas.

Sin embargo, también se puede usar una composición líquida. Las composiciones líquidas a menudo tienen la ventaja de que la mezcla con la muestra a estabilizar puede conseguirse rápidamente, proporcionando así básicamente un efecto estabilizador inmediato tan pronto como la muestra entra en contacto con la composición de estabilización líquida. Preferiblemente, el agente o agentes de estabilización presentes en la composición de estabilización líquida permanecen estables en solución y no requieren pretratamiento –como, por ejemplo, la disolución de precipitados de solubilidad limitada – por parte del usuario porque los tratamientos previos de este tipo presentan un riesgo de variaciones en la eficiencia de estabilización.

La composición de estabilización está comprendida en el recipiente en una cantidad efectiva para proporcionar la estabilización de la cantidad de muestra a recoger en dicho recipiente. De acuerdo con una realización, la composición de estabilización líquida se pone en contacto con la muestra biológica en una relación volumétrica elegida de 10:1 a 1:20, 5:1 a 1:15, 1:1 a 1:10 y 1:2 a 1:5. Es una ventaja particular de la composición de estabilización de la presente invención que la estabilización de un gran volumen de muestra se pueda lograr con un pequeño volumen de la composición de estabilización. Por lo tanto, preferiblemente, la relación de composición de estabilización a muestra se encuentra en un intervalo de 1:2 a 1:7, más preferiblemente de 1:3 a 1:5.

De acuerdo con una realización, el recipiente es evacuado. La evacuación es preferiblemente efectiva para extraer un volumen específico de una muestra de fluido al interior. De este modo, se asegura que la cantidad correcta de muestra se pone en contacto con la cantidad precargada de la composición de estabilización comprendida en el recipiente y, por consiguiente, que la estabilización es eficiente. De acuerdo con una realización, el recipiente comprende un tubo que tiene un extremo abierto sellado por un tabique. P.ej. el recipiente se llena previamente con una cantidad definida de la composición de estabilización en forma sólida o líquida y se le dota con un vacío definido y se sella con un septo. El septo está construido de manera que sea compatible con los accesorios de muestreo estándar (por ejemplo, cánula, etc.). Cuando se contacta p. ej. con la cánula, se recoge en el recipiente una cantidad de muestra que está predeterminada por el vacío. Una realización respectiva es en particular ventajosa para recoger sangre. Un contenedor adecuado se describe p. ej. en el documento US 6.776.959.

El recipiente de acuerdo con la presente invención puede estar hecho de vidrio, material plástico u otros materiales adecuados. Los materiales plásticos pueden ser materiales impermeables al oxígeno o pueden contener una capa impermeable al oxígeno. Alternativamente, el contenedor puede estar hecho de material plástico permeable al agua y al aire. El recipiente de acuerdo con la presente invención está hecho preferiblemente de un material transparente. Entre los ejemplos de materiales termoplásticos transparentes adecuados se incluyen policarbonatos, polietileno, polipropileno y poli(tereftalato de etileno). El contenedor puede tener una dimensión adecuada elegida de acuerdo con el volumen requerido de la muestra biológica que se recoge. Como se describió anteriormente, preferiblemente, el recipiente se evacúa a una presión interna por debajo de la presión atmosférica. Tal realización es particularmente adecuada para recoger fluidos corporales tales como sangre completa. La presión se selecciona preferiblemente para extraer un volumen predeterminado de una muestra biológica en el contenedor. Además de tales tubos de vacío, también se pueden usar tubos no de vacío, tubos separadores mecánicos o tubos de barrera de gel como recipientes de muestra, en particular para la recogida de muestras de sangre. Ejemplos de contenedores adecuados y dispositivos de taponamiento se describen en los documentos US 5.860.397 y US 2004/0043505. Como recipiente para recoger la muestra que contiene células también se pueden usar dispositivos de recogida adicionales, por ejemplo, una jeringa, un dispositivo de recogida de orina u otros dispositivos de recogida. El tipo de recipiente también puede depender del tipo de muestra que se va a recoger y los recipientes adecuados también están disponibles para los expertos.

En una realización ventajosa el recipiente, respectivamente el dispositivo, se llena o se pre-llena con al menos un inhibidor de la apoptosis, preferiblemente un inhibidor de la caspasa, al menos un agente hipertónico, preferiblemente al menos un compuesto orgánico hidroxilado como se describió con detalle anteriormente, p. ej. dihidroxiacetona y opcionalmente otro aditivo tal como un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante, más preferido EDTA. La mezcla de al menos un agente hipertónico, que preferiblemente es un compuesto orgánico hidroxilado, p. ej. un carbohidrato tal como dihidroxiacetona y al menos un inhibidor de la caspasa, preferiblemente Q-VD-OPH, estabiliza inesperadamente los ácidos nucleicos extracelulares en sangre completa, plasma o suero y previene la liberación de ácidos nucleicos celulares, en particular de glóbulos blancos que están contenidos en tales muestras. Por lo tanto, la población de ácido nucleico extracelular se conserva en el estado que había mostrado en el momento de la extracción de sangre. También se obtienen resultados beneficiosos cuando el recipiente, respectivamente el dispositivo, se llena o se prellena con al menos un inhibidor de la caspasa y al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se definió anteriormente, como agente de estabilización. Preferiblemente, se incluye un anticoagulante además del compuesto de acuerdo con la fórmula 1. El anticoagulante es preferiblemente un agente quelante tal como EDTA. Además, la composición de estabilización comprendida en el recipiente puede también comprender un inhibidor de la apoptosis, preferiblemente un inhibidor de la caspasa y/o al menos un agente hipertónico, preferiblemente al menos un compuesto orgánico hidroxilado como se describe en detalle anteriormente, p. ej. dihidroxiacetona y opcionalmente

otros aditivos. De acuerdo con una realización, la composición de estabilización comprendida en el contenedor comprende un inhibidor de la caspasa y un anticoagulante.

5 De acuerdo con una realización, el recipiente tiene una parte superior abierta, un fondo y una pared lateral que se extiende entre ellas que definen una cámara, en donde la composición de estabilización de acuerdo con la presente invención está comprendida en la cámara. Puede estar comprendida en ella en forma líquida o sólida. De acuerdo con una realización, el recipiente es un tubo, el fondo es un fondo cerrado, el recipiente comprende además un cierre en la parte superior abierta, y la cámara está a una presión reducida. Las ventajas de una presión reducida en la cámara se describieron anteriormente. Preferiblemente, el cierre puede ser perforado con una aguja o una cánula, y la presión reducida se elige para extraer un volumen concreto de una muestra de líquido en la cámara.

10 De acuerdo con una realización, la cámara está a una presión reducida seleccionada para extraer un volumen especificado de una muestra líquida en la cámara, y la composición de estabilización es un líquido y está dispuesta en la cámara de manera que la relación volumétrica de la composición de estabilización al volumen especificado de la muestra que contiene células se selecciona de 10:1 a 1:20, 5:1 a 1:15, 1:1 a 1:10 y 1:2 a 1:5. Las ventajas asociadas se describieron anteriormente.

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

De acuerdo con un quinto aspecto, se proporciona un método que comprende la etapa de recoger una muestra de un paciente directamente en una cámara de un recipiente de acuerdo con el cuarto aspecto de la presente invención. Los detalles con respecto al recipiente y la muestra se describieron anteriormente. Se hace referencia a la descripción respectiva. Según una realización, se recoge una muestra de sangre, preferiblemente se extrae del paciente.

20 Los métodos y composiciones descritos en el presente texto permiten la conservación y el aislamiento eficaces de los ácidos nucleicos extracelulares, al tiempo que reducen la posible mezcla con ácidos nucleicos, en particular ADN genómico fragmentado, que se origina de células comprendidas en la muestra biológica y que pueden entrar en una muestra biológica debido a un daño celular, respectivamente lisis celular. Los métodos de acuerdo con la presente invención, así como las composiciones y los dispositivos descritos (por ejemplo, los recipientes colectores) reducen la degradación de ácidos nucleicos extracelulares y también reducen la lisis celular y/o la liberación de ácidos nucleicos genómicos, en particular ADN genómico fragmentado, de forma que los ácidos nucleicos extracelulares contenidos en la muestra no se contaminan con ácidos nucleicos intracelulares, en correspondencia se reduce la contaminación mediante las enseñanzas de acuerdo con la presente invención. Como se discutió anteriormente, una entremezcla de ácidos nucleicos extracelulares y ácidos nucleicos celulares, en particular ADN genómico fragmentado, puede reducir la precisión de cualquier medición de la cantidad de ácidos nucleicos extracelulares en una muestra biológica. Como se discutió anteriormente, una importante ventaja de la presente invención es la posibilidad de estabilización esencialmente simultánea de las células contenidas en la muestra (en particular, glóbulos blancos en el caso de sangre completa, plasma o suero) y los ácidos nucleicos extracelulares. Esto contribuye a evitar que los ácidos nucleicos celulares, tales como el ADN genómico, se liberen en la porción libre de células de la muestra, y diluyendo adicionalmente los ácidos nucleicos extracelulares de interés (y los biomarcadores asociados), al tiempo que se mantiene la integridad estructural de los ácidos nucleicos extracelulares. Como se discute en el presente texto, poner en contacto la muestra biológica que contiene células, tal como sangre completa o plasma, con el agente o agentes de estabilización, permite que la muestra se almacene durante un período de tiempo antes de aislar los ácidos nucleicos extracelulares. Más preferiblemente, la muestra biológica que contiene células, p. ej. sangre o plasma, puede extraerse en un lugar (por ejemplo, un centro médico), ponerse en contacto con el agente o los agentes de estabilización, y luego transportarse a un lugar remoto diferente (por ejemplo, un laboratorio) para el proceso de aislamiento y prueba de ácido nucleico.

Además, los reactivos de estabilización, como se describen en el presente texto, proporcionan una ventaja sobre los reactivos de estabilización del estado de la técnica conocidos, que implican el uso de reactivos de reticulación, tales como formaldehído, liberadores de formaldehído y similares, ya que la estabilización de las muestras de acuerdo con la presente invención no implica el uso de tales reactivos de reticulación. Los reactivos de reticulación causan enlaces covalentes intermoleculares o intramoleculares entre moléculas de ácido nucleico o entre ácidos nucleicos y proteínas. Este efecto puede conducir a una recuperación reducida de tales ácidos nucleicos estabilizados y parcialmente reticulados después de una purificación o extracción de una muestra biológica compleja. Como, por ejemplo, la concentración de ácidos nucleicos en circulación en muestras de sangre entera es ya relativamente baja, se debe evitar cualquier medida que reduzca más el rendimiento de tales ácidos nucleicos. Esto puede ser de particular importancia cuando se detectan y analizan moléculas de ácido nucleico muy raras derivadas de tumores malignos o de un feto en desarrollo en el primer trimestre del embarazo. Por lo tanto, de acuerdo con una realización, ningún liberador de formaldehído está comprendido en la composición de estabilización, respectivamente, no se usa adicionalmente para la estabilización. Según una realización, el inhibidor de la apoptosis que se usa en las composiciones según la presente invención no se elige entre el grupo que consiste en ácido aurintricarboxílico, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), leupeptina y clorhidrato de Na-Tosil-Lys clorometil cetona (TLCK). De acuerdo con una realización, el inhibidor de la apoptosis no se elige entre dicho grupo en particular si el inhibidor de la apoptosis no se usa en combinación con un agente hipertónico como estabilizante adicional.

60 Esta invención no está limitada por los ejemplos de métodos y materiales descritos en el presente texto, y cualquier

método o material similar o equivalente a los descritos en el presente texto puede usarse en la práctica o pruebas de realizaciones de la presente invención. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Los títulos proporcionados en este documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta invención, que pueden leerse por referencia a la especificación en su conjunto.

5 El término "solución" como se usa en el presente texto se refiere en particular a una composición líquida, preferiblemente una composición acuosa. Puede ser una mezcla homogénea de una sola fase, pero también está dentro del alcance de la presente invención que una solución comprenda aditivos sólidos tales como, p. ej., precipitados.

10 Los tamaños, respectivamente los intervalos de tamaño indicados en el presente texto con referencia a los nucleótidos nt, se refieren a la longitud de la cadena y, por tanto, se usan para describir la longitud de las moléculas monocatenarias así como de las bicatenarias. En las moléculas bicatenarias, dichos nucleótidos están emparejados.

15 Según una realización, la materia descrita en el presente texto como materia que comprende ciertos pasos en el caso de métodos o que comprende ciertos ingredientes en el caso de composiciones, soluciones y/o tampones, se refiere a la materia que consiste en los pasos o ingredientes respectivos. Se prefiere seleccionar y combinar realizaciones preferidas descritas en el presente texto, y la materia específica que surge de una combinación correspondiente de realizaciones preferidas pertenece también a la presente descripción.

Tabla 1: Resumen de los inhibidores de la apoptosis.

| Inhibidor de la apoptosis | Descripción |
|---|--|
| Inhibidores metabólicos | |
| AICA-Ribósido, Acadesina, AICAr, 5-Aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-ribósido, Z-Ribósido | Ofrece protección contra la muerte celular inducida por la privación de glucosa |
| Inhibidor de la apoptosis II, compuesto de diarilurea | Previene la formación de complejo apoptosomal activo de ~ 700-kDa |
| Bloqueante Bax Channel, (±) -1-(3,6-Dibromocarbazol-9-il) -3-piperazin-1-il-propan-2-ol, bis TFA, iMAC1 | Un derivado de dibromocarbazolo-piperazinilo permeable a las células que muestra propiedades apoptóticas. Bloquea eficazmente la liberación de citocromo c inducida por Bid a partir de las mitocondrias de células HeLa (~ 80% de inhibición a 5 μM) inhibiendo la actividad de formación de canales Bax (IC50 = 520 nM en un ensayo de canal liposómico). |
| Péptido Inhibidor de Bax, V5 Secuencia del péptido: H-Val-Pro-Met-Leu-Lys-OH | Un pentapéptido permeable a las células basado en el dominio inhibidor de Ku70-Bax que ofrece citoprotección. Funciona tan eficazmente como el Inhibidor de la caspasa VI (Z-VAD-FMK; Cat. No. 219007) para la apoptosis mediada por Bax (~50-200 μM). También bloquea eficazmente la muerte celular necrótica independiente de la caspasa. Se muestra que es competitivo con Ku70, interactúa con Bax, previene su cambio conformacional y la translocación mitocondrial. Muestra estabilidad prolongada en medio de cultivo (~ 3 días). También está disponible péptido de control negativo. |
| Bcl-xL BH44-23, humano, permeable a las células | Un péptido permeable a las células que previene la muerte celular apoptótica uniéndose directamente al canal aniónico dependiente de la tensión (VDAC) y bloqueando su actividad. Conduce a la inhibición de la liberación de citocromo c y pérdida de potencial de membrana mitocondrial (Δψm). Contiene el dominio de homología N-terminal conservado (BH4) de Bcl-xL (aminoácidos 4-23), que se ha mostrado esencial para inhibir la actividad de VDAC en liposomas y en mitocondrias aisladas. El dominio BH4 está unido a un péptido transportador, una secuencia de VIH-TAT48-57 de 10 aminoácidos con un resto de β-alanina como espaciador para una flexibilidad máxima. Después de su absorción, se localiza principalmente en las mitocondrias |
| Ácido Bongkreki, sal triamónica | Actúa como ligando del translocador de nucleótidos de adenina. Un potente inhibidor del megacanal mitocondrial (poro de transición de permeabilidad). Reduce significativamente los signos de la apoptosis inducida por óxido nítrico. Previene la degradación apoptótica del potencial transmembrana mitocondrial interno (Δψm), así como cierto número de otros fenómenos ligados a la apoptosis. |

| | |
|--|--|
| Daunorrubicina, clorhidrato | Potente agente anticanceroso permeable a las células cuyo sitio diana potencial puede ser la citocromo c oxidasa mitocondrial. Se ha demostrado que inhibe la síntesis de ARN y ADN. Inhibe las topoisomerasas eucariotas I y II. Induce roturas de ADN de cadena simple. También induce apoptosis en células tumorales HeLa S3. Según una realización, dicho compuesto no se usa como estabilizante de acuerdo con la presente invención. |
| Humanina, humana, sintética | Un péptido anti-apoptótico de 24 restos que, cuando se expresa intracelularmente, ofrece protección contra la apoptosis neuronal inducida por mutantes los presenilina y APP (proteína precursora amiloide) asociados con la enfermedad de Alzheimer familiar (AD). Se demuestra que reduce la liberación de citocromo c in vitro uniéndose directamente a Bax (proteína X asociada a Bcl-2, Kd ~ 2 nM) y previene su asociación con mitocondrias aisladas. |
| Forbol-12-miristato-13-acetato | El más comúnmente utilizado éster de forbol. Promotor extremadamente potente de tumores de piel en ratones. Activa la proteína cinasa C in vivo e in vitro, incluso a concentraciones nM. Promueve la expresión de NOS inducible en hepatocitos cultivados. Activa la Ca ²⁺ -ATPasa y potencia la formación de cAMP inducida por forskolina. Inhibe la apoptosis inducida por el antígeno Fas, pero induce la apoptosis en células de leucemia promielocítica HL-60. Su unión es reversible. |
| Pifitrina- α | Un inhibidor químico de p53 permeable a las células. Inhibe reversiblemente la transactivación dependiente de p53 de genes que responden a p53 y bloquea reversiblemente la apoptosis mediada por p53. Inhibe la detención del crecimiento dependiente de p53 de los fibroblastos diploides humanos en respuesta al daño del ADN, pero no tiene efecto sobre los fibroblastos deficientes en p53. Protege los tejidos normales de los efectos secundarios nocivos de la quimioterapia. Se ha publicado que protege las neuronas contra el péptido β -amiloide y la apoptosis inducida por glutamato |
| Pifitrina- μ | Una sulfonamida permeable a las células que bloquea la interacción de p53 con las proteínas Bcl-xL y Bcl-2 e inhibe selectivamente la translocación de p53 a las mitocondrias sin afectar a la función de transactivación de p53. Protege eficazmente contra la muerte celular inducida por radiación y in vitro y la letalidad animal in vivo. Debido a que Pifitrina- μ se dirige solo a la rama mitocondrial de la ruta de p53 sin afectar a las importantes funciones transcripcionales de p53, es superior a la Pifitrina- α (Nº de Cat. 506132) en estudios in vivo. Demostrado que interactúa selectivamente con HSP70 inducible y altera sus funciones. |
| Pifitrina- α , cíclica | Un análogo de Pifitrina- α permeable a las células y muy estable (Nº de Cat. 506132), con función biológica similar, pero con citotoxicidad reducida. Un inhibidor químico de p53. Inhibe reversiblemente la transactivación dependiente de p53 de genes que responden a p53; también bloquea reversiblemente la apoptosis mediada por p53. Actúa como modulador de P-gp cambiando la especificidad relativa del sustrato del transportador. Se ha publicado que este compuesto es un potente inhibidor transcripcional de STAT6. |
| Pifitrina- α , p-Nitro | Un inhibidor de p53 permeable a las células que sirve como la forma profármaco de Pifitrina- α , p-Nitro cíclica (Nº de Cat. 506154). Aunque su eficacia in vitro (ED50 = 0,3 μ M en la protección de la muerte de neuronas corticales inducida por etopósido) es similar a la de Pifitrina- α (Nº de catálogo 506132), es 100 veces más potente que la Pifitrina- α cuando se administra a ratas in vivo debido a su conversión constante y duradera a la correspondiente forma cíclica de compuesto activo en sistemas biológicos ($t_{1/2}$ = 8 h en medio de cultivo de neuronas a 37 °C). |
| Pifitrina- α , p-Nitro, cíclica | Un inhibidor de p53 permeable a las células que exhibe una potencia 10 veces más alta (ED50 = 30 nM en la protección de la muerte neuronal cortical inducida por etopósido) y vida mitad un 50% más larga ($t_{1/2}$ = 6h en medio de cultivo neuronal a 37 °C) que Pifitrina- α (Cat. Nº 506132). Sin embargo, a pesar de su eficacia in vitro, este inhibidor no es efectivo cuando se administra en ratas in vivo. Para aplicaciones in vivo, considérese Pifitrina- α , p-Nitro (Cat. |

| | |
|--|---|
| | No. 506152). |
| <p>Péptido inhibidor de STAT3</p> <p>Secuencia de péptidos:</p> <p>Ac-Pro-Tyr (P03H2) -Leu-Lys-Thr-Lys-O</p> | <p>Un fosfopéptido de unión al dominio Stat3-SH2 que actúa como un inhibidor selectivo de la señalización de Stat3 (transductores de señal y activadores de la transcripción 3) con DB50 de 235 μM (concentración de péptido a la cual la actividad de unión al ADN se inhibe en un 50%). Hace descender significativamente la actividad de unión a ADN de Stat3 formando un complejo inactivo Stat3:péptido y reduce los niveles de dímeros Stat3:Stat3 activos que pueden unirse al ADN. Muestra una mayor afinidad por Stat3 y, en menor medida, Stat1, sobre Stat5. Suministrado como una sal trifluoroacetato</p> |
| <p>Péptido inhibidor de STAT3, permeable a las células</p> <p>Secuencia de péptidos:</p> <p>Ac-Pro-Tyr (P03H2) -Leu-Lys-Thr-Lys-OH</p> | <p>Un análogo permeable a las células del fosfopéptido de unión al dominio Stat3-SH2 (Nº de catálogo 573095) que contiene una mts (secuencia de translocación de membrana) C-terminal y actúa como bloqueador altamente selectivo y potente de activación de Stat3. También suprime la transformación de Src dependiente de Stat-3 constitutiva, sin efecto sobre la transformación de Ras independiente de Stat-3. El péptido de control inactivo no fosforilado también está disponible en Cat. No. 573105. Suministrado como una sal trifluoroacetato.</p> |
| <p>CAY10500, 6,7-dimetil-3 - {[metil-[1-(3-trifluorometil-fenil) -1H-indol-3-ilmetil] -amino} -etil) -amino] -metil} -cromen-4-ona</p> | <p>Inhibidor del factor de necrosis tumoral α (TNFα) que previene la unión al receptor 1 del TNF (TNFR1).6 Se une al trímero de TNFα biológicamente activo y promueve el desplazamiento acelerado de una subunidad única para inactivar rápidamente la citocina. En un ensayo basado en células, el compuesto inhibió la de la degradación de IKB estimulación mediada por TNFα.</p> |
| <p>Amida gambógica</p> | <p>Un agonista selectivo para TrkA que imita las acciones de NGF. Este compuesto posee actividad neurotrófica robusta, mientras que previene la muerte celular neuronal 1.</p> |
| <p>Ácido maslínico</p> | <p>Un triterpeno pentacíclico con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Se muestra que bloquea la generación de óxido nítrico e inhibe la secreción de IL-6 y TNF-α inducida por lipopolisacáridos</p> |
| <p>Hidrato de naringina</p> | <p>Un bioflavonoide cítrico que se ha descubierto que inhibe la actividad de citocromo P450 monooxigenasa en el hígado de ratón. Previene la rotura citoesquelética inducida por toxinas y la muerte apoptótica de células hepáticas</p> |
| <p>Necrostatina-1</p> | <p>Un inhibidor de la necroptosis, una ruta de muerte celular no apoptótica. No afecta a la apoptosis desencadenada por Fas/TNFR. De acuerdo con una realización, dicho compuesto no se usa como estabilizante de acuerdo con la presente invención.</p> |
| <p>Hidrato de NSC348884 hidrato, N1, N2-bis ((3-imino-6-metil-3H-indol-2-il) metil) -N1,N2 -bis ((6-metil-1H-benzo [d] imidazol-2-il) metil) etano-1,2-diamina</p> | <p>Este producto es una fosfoproteína nucleolar que muestra varias actividades biológicas en la biogénesis de los ribosomas, proliferación celular, transporte citoplásmico/de lanzadera nuclear, unión de ácido nucleico, escisión ribonucleica, duplicación de centrosoma y caperamiento molecular, y se encuentra en niveles más altos en células tumorales. Se ha demostrado que la sobreexpresión conduce a la inhibición de la apoptosis. NSC34884 actúa hiperactivando p53.</p> |
| <p>Ácido orselínico</p> | <p>Ácido benzoico. Bloquea la apoptosis neuronal mediada por PAF. Muestra la actividad de limpieza de radicales libres.</p> |
| <p>Ácido tetrametil nordihidroguaiarético</p> | <p>Un derivado sintético de NDGA y un inhibidor de lipoxigenasa no selectivo. Inhibe la unión del factor de transcripción Sp1 al promotor de repetición terminal larga del VIH y al promotor α-ICP4 (un gen esencial para la replicación del VHS).</p> |
| <p>GW 4869, 3,3' - (1,4-fenileno) bis [N- [4 - (4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il) fenil] -hidrocloruro-2-</p> | <p>Un compuesto dihidroimidazoloamida simétrico, permeable a las células, que actúa como un inhibidor potente, específico y no competitivo de la N-SMasa (esfingomielinasa neutra) [IC50 = \sim1μM, cerebro de rata; Km para esfingomielina \sim 13 μM]. No inhibe la A-SMasa humana (esfingomielinasa</p> |

| | |
|---|--|
| propenamida | ácida) incluso a 150 µM. Inhibe débilmente las actividades de la proteína bovina fosfatasa 2A y el PLC de liso-PAF de mamífero, mientras que no se observa inhibición para el PLC bacteriano específico de fosfatidilcolina. Se publicó que ofrece una protección completa contra la muerte celular inducida por TNF-α o diamina en células de cáncer de mama MCF7 a 20 µM. No modifica los niveles de glutatión intracelular ni interfiere con los efectos de señalización mediada por TNF-α o diamina. |
| SP 600125, 1,9-Pirazoloantrona, Antrapirazolona | SP600125 es un inhibidor de JNK (IC50 = 40 nM para JNK-1 y JNK-2 y 90 nM para JNK-3). Este agente exhibe una selectividad más 300 veces superior para JNK frente a MAP cinasas relacionadas ERK1 y p38-2, y la serina treonina cinasa PKA. [1] SP600125 es un inhibidor reversible ATP-competitivo. En las células, la dosis de SP600125 dependientemente inhibió la fosforilación de c-Jun, la expresión de genes inflamatorios COX-2, IL-2, IFN-γ, TNF-α, y previno la activación y diferenciación de cultivos de células CD4 humanas primarias. |
| Mdivi-1, 3- (2,4-Dicloro-5-metoxifenil) -2,3-dihidro-2-tioxo-4 (1H) -quinazolinona, 3- (2,4-dicloro-5-metoxifenil) -2-sulfanil-4(3H) -quinazolinona | Mdivi-1 es un inhibidor selectivo de la división mitocondrial en levaduras y células de mamíferos que actúa a través de la inhibición de la dinamina de división mitocondrial. En las células, Mdivi-1 inhibe la apoptosis inhibiendo la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Mdivi-1 causa la rápida formación (< 5 min) reversible y dependiente de la dosis de mitocondrias tipo red en células de tipo silvestre con una IC50 = ~ 10 µM. En la levadura, la microscopía de fluorescencia <i>time-lapse</i> no reveló ninguna división mitocondrial detectable después del tratamiento con Mdivi-1. |
| Minociclina, hidrocloreuro | Derivado de tetraciclina con actividad antimicrobiana. Inhibidor de la angiogénesis, apoptosis y poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1). Antiinflamatorio y neuroprotector. |
| Ro 08-2750 (C13H10N4O3) | Inhibidor de la apoptosis inducida por NGF. |
| RKTS-33 (C7H8O4) | Inhibición selectiva de la ruta dependiente del ligando Fas solo. |
| 2. Ácidos nucleicos | |
| 3,4-Dicloroisocumarina | Inhibidor de proteasas de serina → granzima B y bloquea la escisión del ADN internucleosómico apoptótico en timocitos sin la participación de endonucleasas. No afecta a las tiolproteasas ni a las metaloproteasas. |
| Actinomicina D, Streptomyces sp. | También actúa como un inhibidor competitivo de proteasas de serina; Fármaco antineoplásico clásico. Inductor citotóxico de la apoptosis contra las células tumorales. Un inhibidor dependiente del ADN de la síntesis de ARN, la actinomicina promueve la inducción de la apoptosis por algunos estímulos específicos, por ejemplo, TRAIL y Fas (CD95). La actinomicina D también puede aliviar o bloquear el proceso apoptótico y disminuir la citotoxicidad inducida por varios estímulos, tal como el inhibidor de la dihidrofolato reductasa aminopterina y el derivado de la prostaglandina 15-desoxi-D12,14-prostaglandina J2, por lo que puede tener actividades tanto pro- como anti-apoptóticas en algunos sistemas. Según una realización, dicho compuesto no se usa como estabilizante de acuerdo con la presente invención |
| Ácido aurintricarboxílico | Inhibidor de la ADN topoisomerasa II. |
| Baicaleína | Una flavona permeable a las células que inhibe la actividad de la 12-lipoxigenasa (IC50 = 120 nM) y la transcriptasa inversa. Protege las neuronas corticales de la toxicidad inducida por β-amiloide. Reduce la biosíntesis de leucotrienos e inhibe la liberación de enzimas lisosómicas. También inhibe la absorción y movilización de Ca ²⁺ celular y la artritis inducida por coadyuvante. Se ha publicado que inhibe la peroxidación lipídica microsómica formando un complejo hierro-baicaleína. Inhibe la topoisomerasa II e induce la muerte celular en líneas de células de carcinoma hepatocelular. Potencia las respuestas contráctiles a la estimulación nerviosa. Inhibe la proteína tirosina cinasa y la proteína cinasa C estimulada por PMA. |
| Camptotecina, Camptotheca acuminata | Un inhibidor de la ADN topoisomerasa I permeable a las células. Exhibe propiedades antileucémicas y antitumorales. Induce apoptosis en células HL- |

| | |
|---|--|
| | 60 y timocitos de ratón. Arrestos de células en la fase G2/M. |
| Diisopropilfluorofosfato | Inhibidor de la proteasa de serina. |
| Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) | Inhibidor irreversible de proteasas de serina. Su mecanismo de acción es análogo al del diisopropilfluorofosfato. PMSF causa sulfonilación de los restos de serina del sitio activo. También se informó que inhibe la fragmentación del ADN internucleosómico en timocitos inmaduros. Para un inhibidor relacionado, más estable, véase AEBSF. |
| (-)-Huperzina A | Un inhibidor de AChE. Antagonista de los receptores NMDA. Protege contra la excitotoxicidad mediada por glutamato. |
| Razoxano | Inhibe la topoisomerasa II sin inducir roturas de la cadena de ADN (inhibidor catalítico topo II). |
| Suptopina-2 | Supresor de la inhibición de la topoisomerasa II. Revierte el arresto del ciclo celular; desvía la función del <i>checkpoint</i> o punto de control. Tiene fluorescencia inherente y una clara ventaja en la identificación de las dianas moleculares; concentración efectiva en el rango de μM . |
| 3. Enzimas | |
| 3.1. Caspasas | |
| Inhibidor de la apoptosis; 2- (p-Methoxybenzyl) -3,4-pirrolidindiol-3-acetato | Efectos atribuibles a la inhibición de la activación de la caspasa-3 |
| clAP-1, humana, recombinante, E. coli | Recombinante, clAP-1 humana (aminoácidos 1-618) fusionada a la secuencia peptídica MATVIDH10SSNG en el extremo N y expresado en E. coli. La clAP es un miembro de la familia de las proteínas del inhibidor de la apoptosis que inhibe la actividad proteolítica de las caspasas maduras por interacción del dominio BIR con la caspasa activa. |
| CrmA, Recombinante | CrmA (modificador A de la respuesta de la serpiente viral vacuna citocina) se purifica de E. coli transformada con una construcción que contiene la región codificadora de longitud completa del gen CrmA y 7 aminoácidos adicionales que no afectan a la actividad. CrmA es un inhibidor natural de la caspasa-1 humana y granzima B, enzimas que intervienen en la apoptosis. |
| Grupo III Inhibidor de la caspasa I Secuencia del péptido: Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-CHO, Ac-IEPD-CHO, inhibidor III de la caspasa-8 | Un potente inhibidor, permeable a las células e irreversible de las caspasas del grupo III (caspasa-6, -8, -9 y -10), aunque más efectivo hacia las caspasas -6 y -8. También inhibe la caspasa-1 y la caspasa-3. Cuando se utiliza con una enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa. |
| Kaempferol | Un fitoestrógeno permeable a las células que inhibe la religación de ADN catalizada por topoisomerasa I en células HL-60. Ofrece protección contra la muerte celular inducida por A β 25-35 en neuronas corticales neonatales. Sus efectos protectores son comparables a los del estradiol. Bloquea la activación inducida por A β de la caspasa -2, -3, -8 y -9, y reduce la apoptosis neuronal inducida por NMDA. Se ha publicado que es un potente inhibidor de monoamino oxidasas. Actúa como un inhibidor de la actividad de COX-1 (IC ₅₀ = 180 μM) y de la activación transcripcional de COX-2 (IC ₅₀ < 15 μM) |
| Q-VD-OPH | General, Pancaspasa |
| Boc-D (OMe) -FMK | General, Pancaspasa |
| Z-D(OMe) E (OMe) VD (OMe) -FMK | Caspasa 3, 7 |
| Z-LE (OMe)TD (OMe) -FMK | Caspasa 8 |
| Z-YVAD (OMe) -FMK | Caspasa 1,4 |

| | |
|--|--|
| Z-FA-FMK | inhibe la catepsina B |
| Z-FF-FMK | Catepsina B, L |
| Mu-PheHphe-FMK | Catepsina B, L |
| Z-AE (OMe) VD (OMe)-FMK | Caspasa 10 |
| Z-ATAD (OMe) -FMK | Caspasa 12 |
| Z-VK (Biotin) -D (OMe)-FMK | Caspasa General |
| Z- LE (OMe) VD (OMe)-FMK | Caspasa 4 |
| Z-VAM-FMK | Inhibidor del péptido antiviral, inhibe HRV2 y HRV14 |
| 4'-Azidocitidina | Inhibidor de HCV |
| Inhibidor I de la caspasa-13 Secuencia del péptido: Ac- Leu-Glu-Glu-Asp-CHO | Un potente inhibidor reversible de la caspasa-13 (ERICE) |
| Inhibidor II de la caspasa-13 Secuencia del péptido: Z-Leu-Glu (OMe)-Glu(OMe) - Asp(OMe) -FMK | Un inhibidor irreversible de la caspasa-13 permeable a las células. Cuando se utiliza con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa. |
| Inhibidor I de la Caspasa-1 Secuencia del péptido: Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-CHO | Un potente inhibidor, específico y reversible, de la caspasa-1 (Ki = 200 pM para la caspasa-1 recombinante humana), caspasa-4 y caspasa-5. Inhibe fuertemente la apoptosis inducida por anti-APO-1 en células L929-APO-1. |
| Inhibidor I de la caspasa-1, permeable a células Secuencia del péptido: Ac- Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro- Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Ala-Pro- Tyr-Val-Ala-Asp-CHO | Un inhibidor de la caspasa-1 permeable a las células (ICE; Enzima convertidora de interleucina β), caspasa 4 y caspasa 5. La secuencia YVAD-CHO C-terminal de este péptido es un inhibidor altamente específico, potente y reversible de la caspasa-1 (Ki = 1 nM). La secuencia N-terminal (restos de aminoácidos 1 - 16) corresponde a la región hidrofóbica (región h) del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi (K-FGF) y confiere permeabilidad celular al péptido. |
| Inhibidor II de la Caspasa-1 Secuencia del péptido: Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-CMK | Un inhibidor permeable a las células e irreversible, de la caspasa-1 (Ki = 760 pM), caspasa-4 y caspasa-5. Inhibe la apoptosis mediada por Fas y la activación de esfingomielinasa ácida. |
| Inhibidor IV de la Caspasa-1 Secuencia del péptido: Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-AOM (AOM = 2, 6-dimetilbenzoiloximetilcetona) | Un inhibidor altamente selectivo, competitivo, permeable a las células e irreversible de la caspasa-1, caspasa-4 y caspasa -5. Inactiva la enzima con una velocidad limitada por la difusión y es relativamente inerte con respecto a otros bionucleófilos como el glutatión, lo que lo convierte en un candidato excelente para estudios in vivo de la inhibición enzimática. |

| | |
|---|---|
| <p>Inhibidor V de la caspasa-1</p> <p>Secuencia de péptido: Z-Asp-CH₂-DCB</p> | <p>Un potente inhibidor de las proteasas del tipo de la caspasa-1. Bloquea la muerte celular apoptótica en células de leucemia mieloide humana U937 y bloquea la fragmentación de ADN inducida por etopósido.</p> |
| <p>Inhibidor VI de la Caspasa-1</p> <p>Secuencia del péptido: Z-Tyr-Val-Ala-Asp (OMe) -CH₂F *</p> | <p>Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de la caspasa-1 (ICE), caspasa- 4, y caspasa-5.</p> |
| <p>Inhibidor I de la caspasa-2</p> <p>Secuencia de Péptido: Z-Val-Asp (OMe) -Val-Ala-Asp (OMe) -CH₂F *</p> | <p>Un inhibidor permeable a las células e irreversible de la caspasa-2 (ICH-1</p> |
| <p>Inhibidor II de la Caspasa-2</p> <p>Secuencia del péptido: Ac-Leu-Asp-Glu-Ser-Asp-CHO</p> | <p>Un inhibidor reversible de la caspasa-2 y caspasa-3</p> |
| <p>Inhibidor I de la caspasa-3/7</p> <p>Secuencia del péptido: 5-[(S)-(+)-2-(metoximetil) pirrolidino] sulfonilisatina</p> | <p>Un potente inhibidor reversible, permeable a las células, y específico, de la caspasa-3 (K_i = 60 nM) y caspasa-7 (K_i = 170 nM).</p> |
| <p>Inhibidor I de la caspasa-3</p> <p>Secuencia del péptido: Ac -Asp-Glu-Val-Asp-CHO</p> | <p>Un inhibidor muy potente, específico y reversible de la caspasa-3 (IC₅₀ = 200 pM), caspasa-6, caspasa-7, caspasa-8 y caspasa-10.</p> |
| <p>Inhibidor I de la caspasa-3, permeable a las células</p> <p>Secuencia del péptido: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu -Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Ala-Pro-Asp-Glu-Val-Asp-CHO</p> | <p>Un inhibidor de la caspasa-3 permeable a las células, así como de la caspasa-6, caspasa-7, caspasa-8 y caspasa-10. La secuencia C-terminal DEVD-CHO de este péptido es un inhibidor altamente específico, potente y reversible de la caspasa-3 (K_i < 1 nM) que también ha demostrado inhibir fuertemente la escisión de PARP en extractos de células de osteosarcoma humano cultivadas (IC₅₀ = 200 pM). La secuencia N-terminal (restos de aminoácidos 1-16) corresponde a la región hidrofóbica (región h) del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi (K-FGF) y confiere permeabilidad celular al péptido. También se encuentra disponible una solución 5 mM (1 µg/100 µl) de Inhibidor I de la caspasa-3, permeable a las células (Nº de catálogo 235427) en DMSO.</p> |
| <p>Inhibidor II de la caspasa-3</p> <p>Secuencia de péptidos: Z-Asp (OCH₃) -Glu (OCH₃) -Val-Asp (OCH₃) – FMK</p> | <p>Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de la caspasa-3 así como caspasa-6, caspasa-7, caspasa-8 y caspasa-10. Cuando se usa con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa. También está disponible una solución 5 mM (250 µg/75 µl) de Z-DEVD-FMK (Nº de catálogo 264156) en DMSO.</p> |

| | |
|--|--|
| <p>Inhibidor III de la caspasa-3</p> <p>Secuencia del péptido: Ac-Asp-Glu-Val-Asp- CMK</p> | <p>Un inhibidor de la caspasa-3 potente, permeable a las células e irreversible, así como de la caspasa-6, caspasa-7, caspasa-8 y caspasa-10.</p> |
| <p>Inhibidor IV de la Caspasa-3</p> <p>Secuencia de péptidos: Ac-Asp-Met-Gln-Asp-CHO</p> | <p>Un inhibidor específico de la caspasa-3. Este inhibidor de tetrapéptido se ha usado con el inhibidor de la caspasa-6 Ac-VEID-CHO para diseccionar la ruta de activación de la caspasa en células Jurkat estimuladas con Fas.</p> |
| <p>Inhibidor V de la caspasa-3</p> <p>Secuencia del péptido: Z-Asp (OMe) -Gln-Met-Asp (OMe) -CH2F *</p> | <p>Un potente inhibidor, permeable a las células e irreversible, de la caspasa-3, también reconoce caspasa-1. Cuando se utiliza con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere un pretratamiento con una esterasa.</p> |
| <p>Inhibidor VII de la caspasa-3</p> <p>Secuencia del péptido: acetato de 2- (4- metil-8- (morfolin-4-ilsulfonil) - 1,3-dioxo-1,3-dihidro-2H-pirroló [3,4-c] quinolein-2-il) etilo</p> | <p>Un compuesto permeable a las células, no peptídil pirroloquinoleína que actúa como un inhibidor potente, reversible y no competitivo de la caspasa-3 (IC50 = 23 nM) con una selectividad 10-100 veces mayor. Se ha demostrado que muestra una actividad antiapoptótica mayor que Z-VAD-FMK (Nº de Cat. 627610) en un modelo de apoptosis inducida por estaurosporina - (Nº de Cat. 569397) en células Jurkat T humanas.</p> |
| <p>Inhibidor I de la Caspasa-4</p> <p>Secuencia del péptido: Ac-Leu-Glu-Val-Asp-CHO</p> | <p>Un inhibidor reversible de la caspasa-4 .</p> |
| <p>Inhibidor I de la caspasa-4, permeable a las células</p> <p>Secuencia del péptido: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu- Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Leu-Glu-Val-Asp-CHO</p> | <p>Un potente inhibidor, permeable a las células y reversible de la caspasa-4. La secuencia N-terminal (restos de aminoácidos 1-16) corresponde a la región hidrofóbica del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi y confiere permeabilidad celular al péptido.</p> |
| <p>Inhibidor I de la caspasa-5</p> <p>Secuencia del Péptido: Z-Trp-Glu (OMe) -His-Asp (OMe) -CH2F *</p> | <p>Un potente inhibidor, permeable a las células e irreversible, de la caspasa-5. Inhibe fuertemente la caspasa-1. También inhibe la caspasa-4 y caspasa-8 .</p> |
| <p>Inhibidor I de la caspasa-6</p> <p>Secuencia del péptido: Z-Val-Glu (OMe) -Ile-Asp (OMe) -CH2F *</p> | <p>Un inhibidor irreversible permeable a las células, de la caspasa-6. Cuando se utiliza con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere el pretratamiento con una esterasa.</p> |

| | |
|---|--|
| <p>Inhibidor II de la Caspasa-6, permeable a las células</p> <p>Secuencia del péptido: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Val-Glu-Ile-Asp-CHO</p> | <p>Un potente inhibidor, permeable a las células y reversible, de la caspasa-6. La secuencia N-terminal (aminoácidos 1-16) corresponde a la región hidrofóbica del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi y confiere permeabilidad celular al péptido.</p> |
| <p>Inhibidor I de la Caspasa-8, permeable a las células</p> <p>Secuencia del péptido: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro-Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Ile-Glu-Thr-Asp-CHO</p> | <p>Un inhibidor potente, permeable a las células y reversible de la caspasa-8 y Granzima B. La secuencia N-terminal (aminoácidos 1-16) corresponde a la región hidrofóbica del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi y confiere permeabilidad celular al péptido.</p> |
| <p>Inhibidor II de la Caspasa-8</p> <p>Secuencia del péptido: Z-Ile-Glu (OMe) -Thr-Asp (OMe) -CH2F *</p> | <p>Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de la caspasa-8 y granzima B. Inhibe eficazmente la apoptosis inducida por el virus de la gripe en células HeLa. También inhibe la granzima B. Cuando se usa con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa. También se encuentra disponible una solución 5 mM (250 µg/76 µl) de Z-IETD-FMK (Nº de Cat. 218840) en DMSO.</p> |
| <p>Inhibidor I de la Caspasa-9</p> <p>Secuencia de péptidos: Z-Leu-Glu (OMe) -His-Asp (OMe) -CH2F *</p> | <p>Un potente inhibidor, permeable a las células e irreversible, de la caspasa-9. También puede inhibir caspasa-4 y caspasa-5. Cuando se usa con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa. También está disponible una solución 5 mM (250 µg/72 µl) de Z-LEHD-FMK (Nº de Cat. 218841) en DMSO.</p> |
| <p>Inhibidor II de la Caspasa -9, permeable a las células</p> <p>Secuencia del péptido: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro -Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Pro-Leu-Glu-His-Asp-CHO</p> | <p>Un inhibidor potente, permeable a las células y reversible, de la caspasa-9. También puede inhibir caspasa-4 y caspasa-5. La secuencia N-terminal (aminoácidos 1-16) corresponde a la región hidrofóbica del péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi y confiere la permeabilidad celular al péptido.</p> |
| <p>Inhibidor III de la Caspasa-9</p> <p>Secuencia del péptido: Ac-Leu-Glu-His-Asp-CMK</p> | <p>Un inhibidor potente, irreversible de la caspasa-9. Se ha publicado que reduce el tamaño del infarto de miocardio durante la reperfusión (~ 70 nM).</p> |
| <p>Inhibidor I de la caspasa</p> <p>Secuencia del péptido: Z-Val-Ala-Asp (OMe) -CH2F *</p> | <p>Un inhibidor de la pan-caspasa irreversible, permeable a las células. Inhibe la apoptosis mediada por Fas en células Jurkat y la muerte celular inducida por estaurosporina en células epiteliales corneales. Cuando se utiliza con enzima nativa o recombinante purificada, se requiere pretratamiento con una esterasa.</p> |
| <p>Inhibidor II de la caspasa.</p> | <p>Un inhibidor potente y reversible de la pan-caspasa.</p> |

| | |
|---|--|
| Secuencia del péptido: Ac -Val-Ala-Asp-CHO | |
| Inhibidor II de la Caspasa, Permeable a las Celulas Secuencia del péptido: Ac-Ala-Ala-Val-Ala-Leu-Leu-Pro- Ala-Val-Leu-Leu-Ala-Leu-Leu- Ala-Pro-Val-Ala-Asp- CHO | Un inhibidor de pan-caspasa reversible y permeable a las células producido uniendo la secuencia N-terminal (aminoácidos 1-16) del péptido señalizador del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi, que confiere permeabilidad celular al péptido VAD. |
| Inhibidor III de la Caspasa Secuencia del péptido: Boc-Asp (OMe) -CH ₂ F * | Un inhibidor de la caspasa de amplio espectro, permeable a las células, irreversible. |
| Inhibidor IV de la Caspasa Secuencia del péptido: Boc-Asp (OBzl) -CMK | Un inhibidor de la caspasa irreversible general |
| Inhibidor VI de la Caspasa Secuencia de péptidos: Z-Val-Ala-Asp-CH ₂ F * | Un inhibidor de la caspasa irreversible general. Útil para estudios que implican enzimas caspasa recombinantes, aisladas y purificadas. A diferencia del Inhibidor I de la caspasa (Cat. No. 627610), este inhibidor no requiere pretratamiento con esterasa para estudios in vitro. También está disponible una solución 10 mM (1 mg/221 µl) de Inhibidor VI de la Caspasa (Nº de Cat. 219011) en DMSO. |
| Inhibidor de la caspasa VIII Secuencia de péptidos: Ac-Val-Asp-Val-Ala-Asp-CHO | Un potente inhibidor reversible de la caspasa-2 (K _i = 3,5 nM), caspasa-3 (K _i = 1 nM) y caspasa-7 (K _i = 7,5 nM). También sirve como inhibidor de DRONC (caspasa de Drosophila), una proteasa de glutamato / aspartato |
| Inhibidor de la caspasa X Secuencia de péptidos: BI-9B12 | Un benzodioxano que contiene un compuesto tiazolo 2,4-disustituido que actúa como un inhibidor selectivo, reversible y competitivo de las caspasas (K _i = 4,3 µM, 6,2 µM y 2,7 µM para caspasa-3, -7 y -8, respectivamente). Se muestra que el resto de benzodioxano se ajusta al "agujero de aspartato" de las caspasas y posiblemente rompe la escisión asistida por caspasa-8 de BID, una proteína proapoptótica. Débilmente afecta la actividad del factor letal del ántrax, una metaloproteasa, a ~ 20 µM. |
| Inhibidores de la caspasa-1 | Incluyendo, pero no limitado a Ac-N-Me-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehído (pseudo ácido) Ac-Trp-Glu-His-Asp-aldehído (pseudo ácido) Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-aldehído (pseudo ácido) Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-clorometilcetona Ac-Tyr-Val-Ala-Asp-2,6-dimetilbenzoiloximetilcetona Ac-Tyr-Val-Ala-Asp (OtBu) -aldehído-dimetilacetal |

| | |
|---|--|
| | <p>Ac-Tyr-Val-Lys-Asp-aldehído (pseudo ácido)</p> <p>Ac-Tyr-Val-Lys (biotinil) -Asp-2,6-dimetilbenzoiloximetilcetona</p> <p>Biotinil-Tyr-Val-Ala-Asp-clorometilcetona</p> <p>Biotinil-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona</p> <p>Fluoresceína-6-carbonilo-Tyr-Val-Ala-DL-Asp (OMe) -fluorometilcetona</p> <p>Fluoresceína-6-carbonil-Val-Ala-DL-Asp (OMe) -fluorometilcetona</p> <p>Z-Asp-2,6-diclorobenzoiloximetilcetona</p> <p>Z-Tyr-Val-Ala-Asp-clorometilcetona</p> <p>Z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona</p> <p>Z-Val-Ala-DL-Asp (OMe) –fluorometilcetona</p> |
| Inhibidores de la caspasa-2 | <p>Incluyendo, pero no limitado a</p> <p>Ac-Val-Asp-Val-Ala-Asp-aldehído (pseudo ácido)</p> <p>Fluoresceína-6-carbonil-Val-Asp(OMe)-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona</p> <p>Z-Val-Asp (OMe) -Val-Ala-DL-Asp (OMe) –fluorometilcetona</p> |
| Inhibidores de la proteasa precursora de la caspasa-3 | <p>Incluyendo, pero no se limitan a</p> <p>Ac-Glu-Ser-Met-Asp-aldehído (pseudo ácido)</p> <p>Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-aldehído (pseudo ácido)</p> |
| Inhibidores de la caspasa-3 | <p>Incluyendo, pero no limitado a</p> <p>Ac-Asp-Glu-Val-Asp-aldehído (pseudo ácido)</p> <p>Ac-Asp-Met-Gln-Asp-aldehído (pseudo ácido)</p> <p>Biotinil-Asp-Glu-Val-Asp-aldehído (pseudo ácido)</p> <p>Inhibidor II de la caspasa-3/7</p> <p>Fluoresceína-6-carbonil-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona</p> <p>Z-Asp (OMe) -Gln-Met-DL-Asp (OMe) -fluorometilcetona</p> <p>Z-Asp-Glu-Val-Asp-clorometilcetona</p> <p>Z-Asp (OMe) -Glu (OMe) -Val-DL-Asp (OMe) –fluorometilcetona</p> |
| Inhibidores de la caspasa-4 | <p>Incluyendo, pero no limitado a</p> <p>Ac-Leu-Glu-Val-Asp-aldehído (pseudo ácido)</p> <p>Z-Tyr-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilcetona</p> |
| Inhibidores de la caspasa-6 | <p>Incluyendo, pero no limitado a</p> |

| | |
|--|--|
| | <p>Ac-Val-Glu-Ile-Asp-aldehído (pseudo ácido)</p> <p>Fluoresceína-6-carbonil-Val-Glu (OMe) -Ile-DL-Asp (OMe) -fluorometilcetona</p> <p>Z-Val-Glu (OMe) -Ile-DL-Asp (OMe) -fluorometilcetona</p> |
| Inhibidores de la caspasa-8 | <p>Incluyendo, pero no limitado a</p> <p>Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-aldehído (pseudo ácido)</p> <p>Boc-Ala-Glu-Val-Asp-aldehído (pseudo ácido)</p> <p>Fluoresceína-6-carbonil-Ile-Glu (OMe) -Thr-DL-Asp (OMe) -fluorometilcetona</p> <p>Fluoresceína-6-carbonil-Leu-Glu (OMe) -Thr-DL-Asp (OMe) -fluorometilcetona</p> <p>Z-Ile-Glu (OMe) -Thr-DL-Asp (OMe) -fluorometilcetona</p> <p>Z-Leu-Glu (OMe) -Thr-DL-Asp(OMe)-fluorometilcetona</p> <p>Z-LE (OMe) TD (OMe) –FMK</p> |
| Inhibidores de la caspasa-9 | <p>Incluyendo, pero no limitado a</p> <p>Ac-Leu-Glu-His-Asp-aldehído (pseudo ácido)</p> <p>Ac-Leu-Glu-His-Asp-clorometilcetona</p> <p>Fluoresceína-6-carbonil-Leu-Glu (OMe) -His-DL-Asp (OMe) -fluorometilcetona</p> |
| Inhibidores de la caspasa-10 | <p>Incluyendo, pero no limitado a</p> <p>Fluoresceína-6-carbonil-Ala-Glu (OMe) -Val-DL-Asp (OMe)-fluorometilcetona</p> <p>Z-Ala-Glu-Val-DL-Asp-fluorometilcetona</p> |
| 3.2. Calpaína | |
| <p>Inhibidor III de Calpaína</p> <p>Secuencia de péptidos:</p> <p>Z-Val-Phe-CHO</p> | <p>Un potente inhibidor de calpaína I y II permeable a las células ($K_i = 8 \text{ nM}$). Reduce la muerte celular mediada por capsaicina en el ganglio de la raíz dorsal cultivada. Se ha publicado que bloquea la supresión inducida por A23187 de la excrecencia de neuritas en neuronas piramidales hipocampales aisladas. Exhibe efecto neuroprotector en la toxicidad inducida por glutamato.</p> |
| <p>Inhibidor IV de Calpaína</p> <p>Secuencia de péptidos:</p> <p>Z-Leu-Leu-Tvr-CH₂F</p> | <p>Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible de calpaína II ($k_2 = 28.900 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). También actúa como inhibidor de la catepsina L ($k_2 = 680.000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).</p> |
| <p>Inhibidor V de Calpain</p> <p>Secuencia de péptidos:</p> <p>Mu-Val-HPh-CH₂F</p> | <p>Un inhibidor potente, permeable a las células e irreversible, de la calpaína</p> |

| | |
|---|--|
| (Mu = morfolinoureidilo; HPh = homofenilalanilo) | |
| Ac-Leu-Lele-al | Inhibidor de aldehído peptídico permeable a las células, de calpaína I, (Ki = 190 nM), calpaína II (Ki = 150 nM), catepsina L (Ki = 0,5 nM) y otras proteasas de cisteína neutras. Inhibe la progresión del ciclo celular a G1/S y metafase/anafase en células CHO inhibiendo la degradación de ciclina B. También estimula la transcripción de HMG-CoA sintasa al inhibir la degradación de SREBP-1 activa (proteína 1 de unión a elemento regulador de esterol). Protege contra el daño neuronal causado por hipoxia e isquemia. Inhibe la apoptosis en timocitos y metamielocitos. También previene la producción de óxido nítrico por los macrófagos activados al interferir con la transcripción de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS; NOS II). Inhibe la degradación proteolítica de I κ B α e I κ B β en macrófagos RAW inducidos con LPS. También prolonga la asociación de moléculas del MHC de clase I con los transportadores asociados con el procesamiento de antígenos. |
| Z-LLY-FMK | Calpaína |
| N-Acetil-Leu-Leu-Met | Calpaína I |
| N-Acetil-Leu-Leu-Nle-CHO | Calpaína I |
| 3.3. otros | |
| BAPTA/AM | Forma permeable a la membrana de BAPTA. Puede cargarse en una amplia variedad de células, donde se hidroliza mediante esterasas citosólicas y queda atrapada intracelularmente como el quelante activo BAPTA. Previene las fibrilaciones ventriculares inducidas por la cocaína. Suprime el aumento inducido por la vitamina D3 en el Ca ²⁺ intracelular. Induce la inactivación de la proteína cinasa C. También inhibe la apoptosis inducida por taspigargina en timocitos de rata. |
| Inhibidor I de Granzima B Secuencia del péptido: Z-Ala-Ala-Asp-CH ₂ Cl | Un inhibidor débil de la granzima humana y murina B. También inhibe la fragmentación del ADN relacionada con la apoptosis en los linfocitos por la fragmentina 2, una proteasa de gránulos de linfocitos de rata homóloga a la granzima B (ID50 = 300 nM). |
| Inhibidor II de Granzima B Secuencia de péptidos: Ac-Ile-Glu-Thr-Asp-CHO | Un potente inhibidor reversible de granzima B y caspasa-8 (Ki = 1 nM). También inhibe la caspasa-1 (< 6 nM), caspasa-6 (5,6 nM) y caspasa-10 (27 nM). |
| Inhibidor IV de Granzima B Secuencia del Péptido: Ac-Ile-Glu-Pro-Asp-CHO | Un inhibidor reversible de granzima B y caspasa-8 |
| Leupeptina, Hemisulfato, Microbial | Un inhibidor reversible de proteasas de tipo tripsina y proteasas de cisteína. También se sabe que inhibe la muerte celular programada inducida por activación y restaura las respuestas inmunitarias defectuosas de los donantes VIH+. |
| N-etilimidaimida | Reactivo alquilante de sulfhidrilo que inhibe la H ⁺ -ATPasa y suprime la corriente de cortocircuito (IC50 = 22 μ M) en las células de los conductos pancreáticos. Inactiva la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP. También un inhibidor potente de la fragmentación de ADN estimulada tanto por Mg ²⁺ como Ca ²⁺ /Mg ²⁺ en núcleos de hígado de rata. Estimula la liberación de ácido araquidónico a través de la activación de PLA2 en células |

| | |
|---|---|
| | endoteliales. |
| N α -Tosyl-Lys Clorometil Cetona, Clorhidrato (TLCK) | Inhíbe las proteinasas de serina de tipo tripsina. Inactiva irreversiblemente la tripsina sin afectar a la quimotripsina. Previene la producción de óxido nítrico por los macrófagos activados al interferir con la transcripción del gen iNOS. Bloquea la adhesión célula-célula y la unión del virus VIH-1 a las células diana. En macrófagos, bloquea la óxido nítrico sintasa inducida por interferón- γ y lipopolisacáridos (EC50 = 80 μ M). Previene la muerte apoptótica que acompaña a la endonucleólisis de células de leucemia HL-60 y timocitos normales. |
| Inhibidor de proteasa Omi/HtrA2, Ucf-101 | Un compuesto de ácido furfúridina-tiobarbitúrico permeable a las células, que actúa como inhibidor potente, específico, competitivo y reversible de la proteasa de serina mitocondrial proapoptótica, inducible por calor, Omi/HtrA2 (IC50 = 9,5 μ M para His-Omi134-458). Muestra muy escasa actividad contra otras proteasas de serina probadas (IC50 \geq 200 μ M). Se ha publicado que bloqueaba la muerte celular inducida por Omi/HtrA2 en caspasa-9 (-/-) fibroblastos nulos. |
| Óxido de fenilarsina | Un inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa permeable a la membrana (IC50 = 18 μ M). Estimula el transporte de 2-desoxiglucosa en el músculo esquelético humano resistente a la insulina y activa la proteína tirosina cinasa p56lck. Bloquea la activación de NF- κ B dependiente de TNF- α en células mieloides humanas ML-1a. PAO inhibe las actividades de proteasa de las caspasas humanas recombinantes, así como de las caspasas endógenas que son activas en extractos de células DU249 preapoptóticas de pollo (extractos S/M). |
| Forbol-12,13-dibutirato | Fuertemente irritante para la piel del ratón, pero solo moderadamente activo como promotor de tumores. Activa la proteína cinasa C. Estimula la fosforilación de Na ⁺ , K ⁺ – ATPasa, inhibiendo así su actividad. Promueve la expresión de NOS inducible en hepatocitos cultivados. Comúnmente utilizado en estudios de unión o en aplicaciones que requieren altas concentraciones de compuestos de forbol. |
| Hipericina | Inhíbe PKC, CKII, MAP cinasa, Insulina R, EGFR, PI-3 cinasa y también se ha observado que posee actividad antiviral. |
| Butirolactona I | Un inhibidor permeable a las células y altamente selectivo de proteína cinasas dependientes de ciclina (Cdks) que inhibe la progresión del ciclo celular en las transiciones G1/S y G2/M. Inhíbe p34cdk1/ciclinaB (Cdk1; IC50 = 680 nM). También inhibe selectivamente Cdk2 y Cdk5 cinasas. Tiene escaso efecto sobre la caseína cinasa I, la caseína cinasa II, la cinasa del receptor del EGF, MAP cinasa, PKA y PKC. Se ha demostrado que evita la fosforilación de la proteína del retinoblastoma y la histona H1. También bloquea la apoptosis inducida por Fas en células HL-60 y muestra efectos antitumorales sobre líneas celulares de cáncer de pulmón humano. |
| Nilotinib | Inhibidor específico BCR-ABL-Tirosincinasa. |
| Quercetina (Soforetina) | La quercetina es un inhibidor de PI3K y PKC con IC50 de 3,8 μ M y 15 μ g/ml. Abolió fuertemente las PI3K y Src cinasas, inhibió ligeramente Akt1/2, y ligeramente afectó PKC, p38 y ERK1/2. [1] [2] Quercetina es un inhibidor de transporte de auxina polar de curso natural con IC50 de 0,8, 16,7, 6,1, 11,36 μ M para la inhibición de la liberación de LDH%, la inhibición de la adhesión de PMN-EC inducida por TNF, la inhibición inducida por TNF de la síntesis y proliferación de ADN. Es un tipo de sustancia química basada en plantas, o fitoquímica, conocido como flavonoide y un flavonoide derivado de plantas que se encuentra en frutas, vegetales, hojas y granos. También se puede usar como ingrediente en suplementos, bebidas o alimentos. En varios estudios, puede tener propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, y está siendo investigado para una amplia gama de posibles beneficios para la salud. |

Ejemplos.

En los ejemplos que siguen se proporcionan materiales y métodos de la presente invención. Debe entenderse que

estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no deben considerarse en modo alguno como limitantes de esta invención.

I. Materiales y métodos.

5 Se diseñó un sistema de ensayo, en el que las muestras biológicas que contienen células, en este caso muestras de sangre completa, se incubaron a temperatura ambiente (RT) durante un tiempo de hasta 6 o 7 días. De allí, las propiedades de estabilización de muestra de los aditivos de la presente invención se ensayaron el día 0, el día 3 y el día 6/7 las muestras. Las muestras se procesaron de acuerdo con los siguientes protocolos, en su caso (para más detalles, véanse también los ejemplos específicos en la sección de resultados):

10 1. Medida de la integridad de las células sanguíneas mediante clasificación de células activada por fluorescencia (FACS).

1.1. Lisis de glóbulos rojos.

- Transferencia de 2 ml de muestra de sangre a un tubo Falcon nuevo de 15 ml.

- Adición de Tampón EL dilución quintuple (QIAGEN)

- Inversión de la muestra (10 X)

15 - Incubación en hielo (10 min.)

- Centrifugación durante 10 min. @ 400 x g y 4 °C

- Desechamiento del sobrenadante

- Adición de tampón EL doble dilución (QIAGEN) al sedimento de glóbulos blancos

- Resolución del sedimento en tampón EL (QIAGEN) mediante ligera agitación en vórtice

20 - Centrifugación durante 10 min @ 400 x g

- Desechamiento del sobrenadante

- Adición de 500 µl de FACS Flow (Becton, Dickinson Plymouth, Reino Unido) al sedimento de glóbulos blancos

- Resolución del sedimento en FACS Flow mediante ligera agitación en vórtice.

- Transferencia de 1 ml de FACS Flow en un tubo FACS nuevo.

25 - Transferencia de 100 µl del sedimento resuelto en un tubo FACS.

Los glóbulos rojos se lisan porque, de lo contrario, las poblaciones de células decisivas (que pueden liberar, por ejemplo, ADN genómico) no son distinguibles en el análisis FACS debido a la gran cantidad de glóbulos rojos.

1.2. Medida de la integridad celular mediante citometría de flujo.

30 La medida se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (FACSCalibur; Becton, Dickinson Plymouth, Reino Unido).

2. Separación del plasma sanguíneo.

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

El plasma sanguíneo resultante se usó para el aislamiento de los ácidos nucleicos contenidos en el mismo.

35 3. Purificación de ácidos nucleicos.

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

- 10 ml de entrada de muestra;

- lisis: 1 ml de proteinasa K y 8 ml de tampón ACL (QIAGEN)

40 - unión: 18 ml de tampón ACB (QIAGEN)

- etapas de lavado: sin cambios y de acuerdo con el manual

- en 60 µl de tampón AVE (QIAGEN)

4. Análisis de los eluatos.

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

5 4.1. Medida de la estabilidad de la célula sanguínea/liberación de ADN mediante la determinación de la distribución de tamaños de ADN usando electroforesis en gel con chip (2100 Bioanalyzer; Agilent Technologies; Inc., EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (consúltese el manual Agilent DNA 7500 y DNA 12000 Kit Guide), pero en vez de 1 µl de muestra se transfirieron 1,5 µl a los pocillos.

10 4.2. Cuantificación del ADN con un ensayo de PCR en tiempo real, sensible para la degradación del ADN (objetivo: secuencias de codificación de ADN 18S ribosómicas de 500 y 66 pb de longitud).

El ensayo dúplex de ADN se llevó a cabo de acuerdo con el manual QuantiTect® Multiplex PCR (Qiagen) con las siguientes adaptaciones:

- La concentración de cebador se hizo a una escala de 8 µM a 16 µM.

15 - La etapa de reasociación/alargamiento se extendió de 1 a 2 minutos.

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

4.3. Detección de ARN utilizando ensayos de PCR en tiempo real, sensible a variaciones en los niveles de ARN en circulación libre de células (objetivo: ARNr 18S, IL8, c-fos y p53). Los ensayos de ARN se llevaron a cabo de acuerdo con las condiciones descritas en las Tablas 2 a 4.

20 **Tabla 2:** muestra las composiciones de reactivos de PCR y condiciones de ciclización del ARNm de p53 en una etapa en tiempo real.

| Taq Man Master Mix (MM) | | | | | |
|--|-----------------|-------------------------|----------|-----|----------------------------|
| componente | reacción simple | master-mix (x veces) | c | p53 | FAM-BHQ + HEX-BHQ |
| x-veces | 1 x | 182 | 1 x | | 20.000 mastermix /reacción |
| ARN | 5.000 | / | var. | | 5 µl ARN |
| A. dest (grado PCR) | 3.813 | 693,9 | / | | 25,00 µl de reacción |
| 2 x Sonda QuantiTect | | | | | |
| RT-PCR MasterMix (tampón) | 12.500 | 2275,0 | 1 x | | |
| cebador directo (20 µM) | 0,500 | 91,0 | 400 nm | | |
| cebador inverso (20 µM) | 0,500 | 91,0 | 400 nm | | |
| sonda (20 µM) | 0,313 | 56,9 | 250 nm | | |
| ARNsin (40U/µl; Promega) | 0,125 | 22,8 | 0,2 U/µl | | |
| MgCl2 (25 mM) | 2.000 | 364,0 | 6 mM | | |
| QuantiTect RT-PCR Mix (mezcla de enzimas) | 0,250 | 45,5 | U/ µl | | |
| Volumen de reacción [µl] | 25.000 | 3640,0 | | | |

Ciclización:

30 min 50 °C

25 15 min 95 °C

40 ciclos

15 s 95 °C

Tabla 3: muestra las composiciones de los reactivos de la PCR y las condiciones de ciclización de la PCR en tiempo real en un solo paso de mRNA de IL8.

| componente | reacción simple | master-mix (x veces) | conc. final | IL8 | FAM-BHQ |
|--|-----------------|-------------------------|-------------|-----|------------------------------|
| x-veces | 1 x | 106 | 1 x | | 20,00 µl mastermix /reacción |
| ARN | 5.000 | / | var. | | 5 µl ARN |
| A. dest (grado PCR) | 3.751 | 397,6 | / | | 25,00 µl de reacción |
| 2 x Sonda QuantiTect | | | | | |
| RT-PCR MasterMix (tampón) | 12.500 | 1325,0 | 1 x | | |
| cebador directo (40 µM) | 0,562 | 59,60 | 900 nm | | |
| cebador inverso (40 µM) | 0,562 | 59,6 | 900 nm | | |
| sonda (20 µM) | 0,250 | 26,5 | 200 nm | | |
| ARNsin (40U/µl; Promega) | 0,125 | 13,3 | 0,2 U/µl | | |
| MgCl2 (25 mM) | 2.000 | 212,0 | 6 mM | | |
| QuantiTect RT-PCR Mix (mezcla de enzimas) | 0,250 | 26,5 | U/ µl | | |
| Volumen de reacción [µl] | 25.000 | 2120,0 | | | |

5

Ciclización:

30 min 50 °C

15 min 95 °C

40 ciclos

10 15 s 95 °C

1 min. 60 °C

Tabla 4: muestra las composiciones de los reactivos de PCR y las condiciones de ciclización de la PCR en tiempo real dúplex c-fos mRNA/rRNA 18S.

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

ES 2 687 126 T3

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

Ciclización:

30 min 50 °C

15 min 95 °C

5 40 ciclos

15 s 95 °C

1,30 min 60 °C

Tabla 5: resume la información de las secuencias diana de ADN utilizadas detectadas en 4.2 y 4.3.

| diana | descripción | posición | tamaño de amplicón [pb] | posición | secuencia 5' – 3' | longitud [nt] | color |
|-------|-----------------------|--|-------------------------|----------|-------------------------------|---------------|--------------------|
| 18 S | ADN ribosómico humano | p12 - región de cromosoma 13, 14, 15, 21, 22 | 66 | directo | GCCGCTAGAGGT GAAATTCTTG | 22 | 5' Cy5 - BHQ 3' |
| | | | | inverso | CATTCTTGGCAA ATGCTTTCG | 21 | |
| | | | | sonda | ACCGGCGCAAGA CGGACCAGA | 21 | |
| 18 S | ADN ribosómico humano | p12 - región de cromosoma 13, 14, 15, 21, 22 | 500 | directo | GTCGCTCGCTCC TCTCCTACTT | 22 | 5' FAM- BHQ 3' |
| | | | | inverso | GGCTGCTGGCAC CAGACTT | 19 | |
| | | | | sonda | CTAATACATGCC GACGGGCGCTGAC | 25 | |

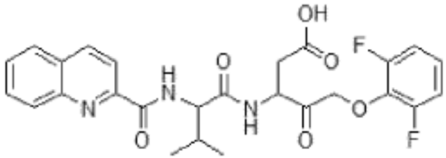
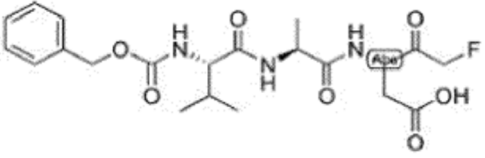
10 Experimentos realizados y resultados

A continuación se explican los detalles de los experimentos realizados. Los detalles de los métodos usados en los ejemplos se describieron anteriormente en I.

Ejemplo 1: Estabilización mediante la adición de un inhibidor de la caspasa.

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

Tabla 6: Inhibidores de la caspasa ensayados.

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

5 Cada inhibidor de la caspasa ensayado se añadió a muestras de sangre completa (concentración final de 20 µM en 10 ml de sangre; la sangre se recogió en tubos Vacutainer K2E; BD). La muestra de sangre completa se procesó como se describe en la sección 1, véase 2. (preparación de plasma) y 3. (aislamiento de ácido nucleico).

Resultados de la electroforesis por gel con chip.

10 El ADN libre de células en circulación eluido se separó por tamaños usando electroforesis por gel con chip (para más detalles sobre el método, véase I, 4.1 anteriormente). La Fig. 1a muestra los resultados obtenidos. El control de DMSO y la sangre K2E (no tratada de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención) muestran el mismo patrón de bandas en forma de escalera. Este patrón se presenta en muestras en las que ocurre la apoptosis. Durante la apoptosis, las endonucleasas degradan el ADN genómico en las regiones de ligado internucleosómico y producen fragmentos de ADN de cerca de 180 pb o múltiplos de 180 pb. Por lo tanto, la apoptosis ocurre en muestras que manifiestan un claro patrón similar a una escalera. Además, la fuerza (oscuridad) del patrón es decisiva. Cuanto más oscuras son las bandas, más ADN genómico se liberó de las células y, por lo tanto, contamina la población de ácido nucleico extracelular.

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

20 En cambio, las muestras de sangre entera tratadas con Z-Val-Ala-Asp (OMe)-FMK muestran un patrón similar a la escalera reducido, en particular el día 7 en comparación con los controles, lo que indica una inhibición de la liberación de ADN genómico, respectivamente fragmentación de ADN genómico causada por apoptosis. Este efecto está confirmado por los resultados mostrados en la Fig. 1 b) (véase más adelante). El efecto es incluso más prominente en las muestras de sangre tratadas con Q-VD-OPh, que muestran patrones de tipo escalera reducidos significativamente ya en el día 3 y el día 7. Así pues, la liberación y degradación del ADN genómico se previenen de forma efectiva, respectivamente, reducidas por la adición del inhibidor de la caspasa Q-VD-OPh.

Resultados de la cuantificación de ADN.

30 El ADN libre de células circulantes eluido también se cuantificó con el ensayo de PCR en tiempo real que es sensible a la degradación del ADN (para detalles sobre el método, véase más arriba, I, 4.2). La Fig. 1 b) muestra el efecto de los inhibidores de la caspasa ensayados, sobre la estabilización de la población de ácido nucleico extracelular (ensayo dúplex de ADN 18S) dentro de los 7 días de almacenamiento a RT, en este caso el aumento en el ADN.

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

Resumen.

Resumiendo los resultados de la PCR en tiempo real y la electroforesis en gel, se demostró que la adición de Q-VD-OPh o Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK inhibe la fragmentación del ADN y, además, reduce la liberación de ADN genómico en el plasma sanguíneo. Por lo tanto, la adición de un inhibidor de la caspasa a sangre completa es efectiva para estabilizar la muestra y, en particular, la población de ácido nucleico extracelular, incluso a temperatura ambiente. Por lo tanto, la utilización del método de estabilización de acuerdo con la presente invención permite el envío de muestras de sangre entera incluso a temperatura ambiente sin comprometer la calidad de la muestra. Para prevenir por completo la liberación de ADN genómico también durante periodos de almacenamiento más largos, la concentración de Q-VD-OPh también puede aumentarse.

10 Ejemplo 2: Influencia de concentraciones más bajas del inhibidor de la caspasa Q-VD-OPh en la estabilidad de la sangre.

En este ejemplo, se ensayaron concentraciones más bajas del inhibidor de la caspasa Q-VD-OPh en combinación con glucosa, en donde la glucosa se añadió como compañero de combinación para respaldar que las células sanguíneas permanecen vivas (previniendo el daño celular). Se añadieron glucosa 21,4 mM y Q-VD-OPh 4 μ M, 1 μ M o nada, a 10 ml de sangre extraída en tubos BD Vacutainer y se almacenaron durante un tiempo de hasta 7 días a temperatura ambiente. La muestra de sangre completa se procesó como se describe en la sección 1, véase 2. (preparación de plasma) y 3. (aislamiento del ácido nucleico).

Resultados de la electroforesis en gel con chip.

20 El ADN eluido se separó por tamaños usando electroforesis en gel con chip (para detalles sobre el método véase más arriba, I, 4.1). La Fig. 2a muestra que, en comparación con las muestras de control en las que no se añadió inhibidor de la caspasa, el inhibidor de la caspasa 1 μ M ya redujo significativamente la liberación/fragmentación de ADN genómico el día 7. El efecto se mejora si se usa inhibidor de la caspasa 4 μ M. Por lo tanto, las concentraciones muy bajas del inhibidor de la caspasa son ya eficaces para estabilizar la muestra de sangre, en particular cuando se combinan con un hidrato de carbono.

25 *Resultados de la cuantificación de ADN.*

La figura 2b muestra los efectos de las concentraciones ensayadas del inhibidor de la caspasa Q-VD-OPh en combinación con glucosa 21 mM sobre el aumento del ADN genómico en el plasma (ensayo dúplex de ADN 18S) dentro de los 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente (RT). La adición de Q-VD-OPh en combinación con glucosa reduce significativamente la liberación de ADN genómico en el plasma. La Fig. 2b muestra solo un aumento menor de ADN genómico dentro de los 7 días de almacenamiento, incluso cuando solamente se añadió Q-VD-OPH 1 μ M a la muestra de sangre completa para la estabilización. La adición de 4 μ M de Q-VD-OPh inhibe la liberación de ADN genómico al plasma hasta un máximo de 4 veces. En cambio, extraer sangre completa en tubos K2E sin estabilización de acuerdo con la presente invención conduce a un aumento del ADN en el plasma de aproximadamente 40 veces.

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

Ejemplo 3: Estabilización de células sanguíneas por efectos osmóticos.

40 Sorprendentemente, los inventores encontraron también que las células sanguíneas se pueden estabilizar añadiendo un reactivo que actúa como un medio hipertónico en la sangre completa. La generación de un medio hipertónico mediante la adición a la sangre completa de, por ejemplo, uno o más compuestos orgánicos hidroxilados, da como resultado una ligera liberación de agua de las células sanguíneas contenidas y produce una mayor estabilidad por encogimiento celular. Se supone que dicho encogimiento celular estabiliza las células contra las fuerzas mecánicas.

45 La dihidroxiacetona (DHA) es un producto intermedio del metabolismo de la fructosa y su forma fosfato, fosfato de dihidroxiacetona (DHAP), es parte de la glucólisis. La DHA fue probada como agente hipertónico. La adición de este reactivo fuerza a las células sanguíneas a contraerse sin dañarlas. La DHA se disolvió primero en PBS (adquirido a SIGMA-Aldrich Kat. No: D8537) o 3 x MOPS (diluido a partir de 1 litro de 10 x MOPS: MOPS 200 mM; NaAc 50 mM, EDTA 10 mM; pH 5; suponiendo que un medio ácido también estabiliza el ARN ccf) obteniendo DHA disuelto 4,2 M. Después se añadieron 2 ml de DHA 4,2 M disuelto en tampón PBS o tampón 3 x MOPS, a 10 ml de sangre para obtener una concentración final de DHA 0,7 M en sangre completa. Los dos disolventes diferentes de DHA se compararon con tubos de PAXgene® Blood DNA (QIAGEN), un tubo de recolección de sangre del estado actual de la técnica, para la estabilización del ADN.

50 *Resultados del análisis FACS.*

La integridad de las células sanguíneas se analizó mediante FACS (para obtener detalles sobre el método véase más arriba, I, 1). La Fig. 3 muestra la integridad de las células sanguíneas medida por citometría de flujo. Las gráficas de puntos visualizan tres poblaciones celulares diferentes: granulocitos (1), monocitos (2) y linfocitos (3). La nube (4) en

el campo inferior izquierdo de la gráfica representa los residuos, generados principalmente por la lisis de los eritrocitos.

Los resultados en la Fig. 3 muestran que las células sanguíneas recolectadas y almacenadas en los tubos de PAXgene® Blood DNA no son distinguibles entre ellos y los residuos del día 6 de almacenamiento. La adición de DHA permite una diferenciación de las subpoblaciones de células sanguíneas en el día 6 de almacenamiento incluso aunque estas células se hacen más pequeñas como resultado del encogimiento celular. Esto indica que las células contenidas en la muestra se estabilizaron por la adición de DHA.

Resultados de la electroforesis en gel con chip.

Los resultados presentados en la Fig. 4a también muestran una estabilización de las muestras de sangre mediante la adición de DHA, porque la liberación de ADN genómico es significativamente más baja con las muestras tratadas con DHA que en las muestras almacenadas en tubos PAXgene® Blood DNA. Además, como es evidente por la Fig. 4a, las muestras estabilizadas con DHA no muestran un patrón de degradación similar a una escalera que sugiere que se previene eficazmente la apoptosis, o una degradación del ADN.

Resultados de la cuantificación del ADN.

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

La división del número de copias del amplicón corto por el número de copias del amplicón largo (66 pb/500 pb) indica si la cantidad de amplicones cortos o largos detectados cambia a lo largo del tiempo de forma similar. Una disminución de esta relación implica una liberación más intensa de moléculas de ADN más largas que más cortas, y puede interpretarse como la liberación de ADN genómico de alto peso molecular a partir de células sanguíneas. El diagrama mostrado en la Fig. 4b indica la liberación de ADN genómico para las tres condiciones. Los resultados muestran que la presencia de DHA ralentiza este proceso. Por lo tanto, también este experimento muestra que la adición de DHA a sangre completa con EDTA estabiliza las células sanguíneas y por lo tanto preserva la población de ADNccf en la fracción de plasma libre de células y evita contaminaciones con ADN liberado de las células contenidas en la muestra, p. ej. debido a la ruptura mecánica.

Ejemplo 4: Ensayo de diferentes concentraciones de dihidroxiacetona.

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

Resultados del análisis FACS.

La Fig. 5 muestra la integridad de las células sanguíneas medida por citometría de flujo. Las gráficas de puntos visualizan tres poblaciones celulares diferentes: granulocitos (1), monocitos (2) y linfocitos (3). La nube en el campo inferior izquierdo de la gráfica representa los residuos, causados principalmente por la lisis de los eritrocitos.

Debido a la adición de DHA a la sangre total, las diferentes poblaciones celulares se pueden distinguir incluso el día 6 de almacenamiento, al margen de la concentración de DHA. Con todo, los resultados del análisis de citometría de flujo (Fig. 5) no muestran diferencias en la integridad celular entre las diferentes concentraciones de DHA.

Resultados de la electroforesis en gel con chip.

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

Resultados de la cuantificación del ADN.

La Fig. 6b muestra el efecto de diferentes concentraciones de DHA sobre el aumento de ADN (ensayo dúplex de ADN 18S) dentro de los 6 días de almacenamiento a temperatura ambiente. Como se muestra en la Fig. 6b, la DHA 0,5 M en sangre completa previene de la manera más eficaz la liberación de ADN genómico. Además, la relación entre el número de copias de amplicones cortos y largos se mantiene constante durante un tiempo de hasta 3 días y solo disminuye ligeramente hasta el día 6. Estos resultados demuestran el efecto notable del agente hipertónico DHA sobre la estabilización de la sangre completa.

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

Un aumento de EDTA en los tubos de recogida de sangre inhibe la micro- y la macro-coagulación, como se sabe para los tubos PAXgene® Blood DNA. Por lo tanto, concentraciones más altas de EDTA pueden apoyar la estabilización de las células sanguíneas y los ácidos nucleicos extracelulares en el plasma. Además, los experimentos presentados anteriormente muestran un efecto inhibidor del inhibidor de la caspasa, en particular Q-VD-OPh, y el compuesto osmóticamente activo DHA, sobre el daño de las células sanguíneas y en particular indican que se reduce eficazmente un aumento de ADN genómico, en particular ADN genómico fragmentado, en la población de ácido nucleico

extracelular. Sorprendentemente, los inhibidores de la caspasa probados también previnieron/inhibieron la fuga de ADN genómico a la fracción libre de células (plasma). Por lo tanto, la combinación de estos reactivos da como resultado una estabilización mejorada de los ácidos nucleicos extracelulares, en particular ADN extracelular, en sangre completa que dura al menos 6 días, y además, da como resultado una eficaz estabilización de las células sanguíneas, evitando así la liberación de ADN genómico, lo que de no ser así daría como resultado una dilución del nivel de ácido nucleico extracelular natural en el plasma.

En este ejemplo, la DHA se disolvió en 2 ml de 3 x MOPS (DHA 3M en 2 ml de 3 x MOPS), 50 mg de K₂EDTA y se añadieron 2,4 µl de Q-VD-OPh 5 nM y luego se transfirieron a 10 ml de sangre completa, que se recogió en tubos K2E. Las muestras de plasma se centrifugaron durante 10 min a 16.000 x g, 4 °C y luego se purificaron usando el kit QIAamp® Circulating NA (Qiagen) (los detalles se describieron anteriormente en la sección I).

Resultados del análisis FACS.

La Fig. 7a muestra la integridad de la célula sanguínea medida por citometría de flujo. Las gráficas de puntos visualizan tres poblaciones celulares diferentes: granulocitos (1), monocitos (2) y linfocitos (3). La nube en el campo inferior izquierdo de la gráfica representa los residuos, principalmente causados por la lisis de los eritrocitos que quedan.

La adición del inhibidor de la caspasa, el agente hipertónico y el agente complejante a la sangre completa dio como resultado un patrón de sangre distinguible de poblaciones de células sanguíneas después de 6 días de almacenamiento. Por lo tanto, las células contenidas en la muestra de sangre se estabilizaron eficazmente.

Resultados de la cuantificación del ADN.

La Fig. 7b muestra el efecto de la combinación de EDTA, DHA y el inhibidor de la caspasa Q-VD-OPh sobre el aumento de ADN (ensayo dúplex de ADN 18S) dentro de los 6 días de almacenamiento a temperatura ambiente. Los resultados indican que la combinación de EDTA, DHA y Q-VD-OPh conduce a una estabilización notablemente intensa del ADN extracelular en plasma (el nivel de ADNr 18S permanece constante hasta el día 6) y a una fuerte prevención de la liberación de ADN genómico a partir de las células sanguíneas (la relación de los números de copias de amplicón corto a largo permanece constante) hasta el día 3 de almacenamiento. Sólo un ligero aumento de ADN genómico en plasma se hace visible entre el día 3 y el día 6 de almacenamiento.

Por lo tanto, la combinación de agentes estabilizantes ensayada es particularmente eficaz para estabilizar muestras de sangre completa.

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

Como una combinación de K₂EDTA, Q-VD-OPh y DHA mostraron unos efectos estabilizadores notables sobre el ADN circulante libre y la integridad de las células sanguíneas en sangre completa, también se analizó la capacidad de estabilización de estos agentes sobre el ARN circulante libre. Para preservar un nivel constante de ARN circulante libre en el plasma (como está presente cuando se recolecta la sangre), el reactivo estabilizador no solo debe proteger a los ARN de la degradación y evitar la liberación de ARN de células sanguíneas en descomposición, sino que también debe inhibir las rutas metabólicas, respectivamente, tener el efecto de que los cambios en la ruta metabólica no afectan al nivel en plasma de ARN extracelular, respectivamente, deberían reducir los efectos respectivos. Por lo tanto, se repitió el experimento 5 y se midió el nivel de ARNm mediante RT-PCR en tiempo real.

La Fig. 8 muestra el efecto de la combinación de EDTA, DHA y el inhibidor de la caspasa ensayado, sobre el nivel de transcripción en plasma dentro de los 6 días de almacenamiento. Con el fin de medir las variaciones en los niveles de ARN, se denominó a los ARNm diana como objetivo de referencia (ARNr 18S) calculando un ΔCt entre p53, IL8 o c-fos y el patrón interno (ARNr 18S). Restar el ΔCt de las muestras del día 3 o 6 con las muestras de ΔCt del día 0 define el $\Delta\Delta\text{Ct}$ que visualiza una disminución relativa (valores -) o un aumento (valores +) de los niveles de transcripción del ARNm. IL8 y c-fos son genes cuya transcripción se induce después de extracción de sangre. Por lo tanto, los niveles de transcripción de estos objetivos aumentarían drásticamente cuando las células liberan sus contenidos; la adición de la solución de estabilización descrita en el presente texto (combinación de EDTA elevado, dihidroxiacetona, inhibidor de la caspasa Q-VD-OPh) previene fuertemente la liberación de ácido nucleico desde las células sanguíneas hasta el día 3 de almacenamiento. Pero, sorprendentemente, los datos en el diagrama anterior no muestran ningún aumento significativo de mRNA de c-fos e IL8 hasta el día 6 de almacenamiento. Por lo tanto, la estabilización previene aparentemente la degradación del ARN (p53) y la liberación de ARNm (IL8/c-fos).

La transcripción de p53 se reprime durante el metabolismo continuado después de la extracción de sangre y, por ello, una degradación o regulación a la baja del mRNA p53 daría como resultado una disminución de (-) $\Delta\Delta\text{Ct}$. Sin embargo, los resultados indican que la solución de estabilización de QGN ensayada previene que el nivel de ARNm de p53 se degrade durante el almacenamiento de sangre completa en un tiempo de hasta 6 días.

Este experimento demostró que la adición de una combinación de EDTA elevada, dihidroxiacetona, e inhibidor de la caspasa Q-VD-OPh a la sangre completa recién extraída actúa para preservar la población de ARNm de plasma circulante que estaba presente en el momento de la extracción de sangre, reduciendo los cambios específicos de

ARNm en la concentración de ARNm. Esto es de especial importancia para el análisis de ARNm circulante en el plasma, por ejemplo, para la identificación y caracterización de especies potenciales de ARNm específicas de un tumor. Dichos estudios requieren que la población de ARNm en el plasma permanezca sustancialmente inalterada entre la extracción de sangre y la extracción y análisis de los ácidos nucleicos.

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

Se ensayaron dos concentraciones diferentes de DMAA junto con K₂EDTA y se compararon con EDTA solo (K2E BD; 18 mg de K₂EDTA).

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

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

15 Resultados de la cuantificación del ADN.

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

25 En resumen, la adición de DMAA reduce la liberación de ADN genómico en el plasma sanguíneo. Por lo tanto, la adición de DMAA a una muestra de sangre es eficaz para estabilizar la muestra incluso a temperatura ambiente.

Ejemplo 8: Influencia de los alcoholes de azúcar en la preservación del estado de ADNccf en sangre completa.

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

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

30

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

Ejemplo 9: Influencia de DMAA, DHA y glicina sobre el nivel de ADNccf.

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

| Solución estabilización de | DHA (M) | DMAA (%) | EDTA | OPH (inhibidor de la caspasa) | Ninguno (K2E) |
|----------------------------|------------|----------|--------------|-------------------------------|---------------|
| 1 | 0,5 | | | | |
| 2 | 0,1 | | | | |
| 3 | 0,05 | | | | |
| 4 (mezcla QGN) | 0,5 | | 14 mM | 1 µM | |
| 5 | | 1 % | 14 mM | 1 µM | |
| 6 | | 3 % | 14 mM | 1 µM | |
| 7 | | 5 % | 14 mM | 1 µM | |
| 8 | | | | | X |

Las muestras se procesaron como se describe en el ejemplo 8. Los resultados así como las condiciones de ensayo se muestran en la figura 11. Como puede observarse, la DHA sola estabiliza el nivel de ADNccf durante un tiempo de hasta tres días (véase donante 1). Se obtuvieron niveles de ADNccf particularmente estables cuando se usó la mezcla QGN. Se pueden obtener resultados comparables a los de la mezcla QGN cuando se añade DMAA a la muestra en combinación, p. ej., con el aumento de las concentraciones de EDTA y agregando un inhibidor de la caspasa.

Ejemplo 10: Influencia del alcohol de azúcar en combinación con el inhibidor de la caspasa y concentraciones crecientes de EDTA sobre el nivel de ADNccf.

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

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

Después se procesaron las muestras como se describe en el ejemplo 8. Los resultados se muestran en la figura 12. Los mejores resultados se obtuvieron para la mezcla QGN. Las combinaciones de alcohol de azúcar a la mezcla QGN indicaron también efectos estabilizantes en comparación con las muestras estabilizadas con EDTA.

Ejemplo 11: Influencia de las combinaciones de concentraciones de DMAA y OPH (inhibidor de la caspasa) sobre los niveles de ADNccf.

Primero se recogieron muestras de sangre completa de 10 ml en BD Vacutainer K2E-EDTA (EDTA 4,45 mM = referencia). Luego, se añadieron 2 ml de las siguientes soluciones (las concentraciones dadas representan la

concentración final en la solución de sangre estabilizada). Cada condición se probó con seis tubos de diferentes donantes.

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

La incubación de la muestra, el aislamiento del plasma y el aislamiento de ácidos nucleicos de la fracción plasmática eliminada, se realizaron como se describe en el ejemplo 8. Sin embargo, después de la primera etapa de centrifugación a 3.000 rpm, se agruparon muestras de plasma de condiciones de estabilización idénticas antes de llevarse a cabo el segundo paso de centrifugación para el aclaramiento del plasma (16.000 x g). Los resultados se muestran en la figura 13. Como puede observarse, diferentes concentraciones de DMAA en combinación con diferentes concentraciones de OPH muestran resultados comparables a la mezcla QGN. La Figura 14 muestra la influencia de combinaciones de concentraciones de DMAA y OPH sobre los niveles de ADNccf (diferente escala debido a la exclusión de datos de referencia).

Ejemplo 12: Influencia de la combinación de la mezcla QGN con alcoholes de azúcar sobre el nivel de ADNccf.

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

- 1: Referencia EDTA (BD Vacutainer K2E);
- 25 2: mezcla QGN (DHA 0,01 M, EDTA 14 mM, OPH 1 μ M);
- 3: DHA 0,01 M;
- 4: DMAA 5%, EDTA 14 mM, OPH 1 μ M;
- 5: DHA 0,01 M, DMAA 3%, OPH 1 μ M, EDTA 14 mM;
- 6: OPH 1 μ M, EDTA 14 mM, DHA 0,01 M, maltitol 0,01 M;
- 30 7: OPH 1 μ M, EDTA 14 mM, DHA 0,01 M, nositol 0,05 M;
- 8: OPH 1 μ M, EDTA 14 mM, DHA 0,01 M, inositol 0,05 M, maltitol 0,01 M.

Las muestras se procesaron como se describe en el ejemplo 11. Sin embargo, las muestras no se almacenaron a temperatura ambiente, sino a 37 °C. Los resultados se muestran en la figura 15. Como puede verse, se consiguieron niveles estables de ADNccf, especialmente cuando se añadió DMAA al 5% en combinación con EDTA 14 mM y OPH 1 μ M. Por lo tanto, inesperadamente, se pudo lograr una muy buena estabilización de ADNccf en sangre completa incluso a temperaturas elevadas (37 °C).

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

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

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

45 Las muestras se incubaron a 37 °C durante un tiempo de hasta seis días. De otra forma, se siguió el mismo procedimiento que en el ejemplo 8. Los resultados se muestran en las figuras 16 y 17. Como puede observarse, para

los seis donantes, el nivel de ADNccf fue preservado cuando se añadieron a las muestras de sangre diferentes concentraciones de DMAA en combinación con OPH y EDTA. Por lo tanto, se puede lograr una estabilización eficaz con el método descrito en la presente invención.

Ejemplo 14: Límite de detección (LoD).

5 Los ácidos nucleicos extracelulares suelen estar comprendidos en cantidades muy pequeñas en la muestra. Por lo tanto, es importante tener un procedimiento de estabilización que no solo preserve eficientemente los ácidos nucleicos extracelulares dentro de la muestra estabilizada, sino que además permita aislar posteriormente los ácidos nucleicos extracelulares con alto rendimiento de la muestra estabilizada. El ejemplo 14 demuestra que el método de estabilización descrito en la presente memoria es superior a los métodos de estabilización de la técnica anterior, por
10 cuanto los ácidos nucleicos extracelulares se pueden aislar con mayor rendimiento de las muestras estabilizadas. Esto reduce ventajosamente el límite de detección y, por tanto, permite determinar de forma fiable también ácidos nucleicos diana raros dentro de la población de ácidos nucleicos extracelulares.

Se compararon las siguientes soluciones/tubos de estabilización:

- 15 1. El ARN libre de células BCT (Streck Inc, cat. nº: 218976 – comprende un agente de liberación de formaldehído como estabilizante).
2. BD Vacutainer K2E (BD, cat. nº: 367525 – comprende EDTA) = referencia.
3. Estabilización de QGN (DMAA al 5%, EDTA 14 mM, OPH 2 µM (inhibidor de la caspasa)).

Se recogieron muestras de sangre completa en tubos BCT y BD Vacutainer K2E de ARN libre de células. A la mitad de la sangre recogida en tubos BD, se añadió solución de estabilización QGN. Por lo tanto, la muestra estabilizada de acuerdo con la invención comprende una cantidad adicional de EDTA que es aportada por la estabilización Vacutainer BD. Las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 minutos, y el plasma obtenido se distribuyó en partes alícuotas a 1,5 ml de replicados. Posteriormente, se añadieron las siguientes cantidades de control de ADN “spike-in” (1.000 pb) por muestra: 1.000 copias, 5.000 copias, 100 copias, 50 copias y 10 copias.

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

Los resultados se muestran en la figura 18. Como puede verse, se obtuvo un 100% de aciertos ≥ 1.000 copias por muestra cuando se usaron los tubos de EDTA de BD, o bien la solución de estabilización de acuerdo con la presente invención. Esto indica que el aislamiento de ácidos nucleicos no se altera cuando se utiliza la solución de estabilización de acuerdo con la presente invención. En cambio, la estabilización que se basa en el uso de un agente de liberación de formaldehído (Streck) muestra una fuerte inhibición del aislamiento del ácido nucleico. Como puede verse, se pudieron aislar significativamente menos ácidos nucleicos de las muestras respectivas, incluso con aquellas muestras en las que se agregaron 500 o incluso 1.000 copias. Además, la figura 18 muestra que la mejor sensibilidad se obtuvo con una muestra estabilizada de acuerdo con la presente invención. Incluso para aquellas realizaciones en las que solo se agregaron 10 copias por muestra, todavía se obtuvieron 13% de aciertos de PCR positivos. Por lo tanto, el método descrito en la presente memoria no solo estabiliza eficazmente las muestras tales como las muestras de sangre, sino que además permite la recuperación posterior de ácidos nucleicos extracelulares incluso muy poco abundantes. Esta es una ventaja importante porque hace que este método sea particularmente adecuado para aplicaciones de diagnóstico y p. ej. la detección de ácidos nucleicos extracelulares diana raros tales como, p. ej., ácidos nucleicos extracelulares derivados de tumores o ácidos nucleicos fetales. En particular, en los números de copias inferiores, la solución de estabilización que se basa en el uso de agentes de liberación de formaldehído tuvo un rendimiento muy bajo y mostró el límite de detección más alto.

45 Esto también se confirma en la siguiente tabla:

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

Como puede verse en dicha tabla, para el fragmento de 1.000 pb son comparables los resultados obtenidos con la

muestra de EDTA y la solución de estabilización de la presente invención. Por lo tanto, la estabilización de acuerdo con la invención no perjudica el posterior aislamiento de los ácidos nucleicos. La estabilización usando un agente de liberación de formaldehído mostró el límite más alto de detección y, por lo tanto, demuestra que el posterior aislamiento del ácido nucleico se vio fuertemente alterado. Por consiguiente, la estabilización de acuerdo con la presente invención es adecuada para la detección sensible de dianas de ADNccf raras, lo que no se logra utilizando los métodos del estado actual de la técnica.

Esto también se confirma por los resultados mostrados en las figuras 19 y 20. Como puede observarse, se obtienen rendimientos de ADNccf comparables para muestras estabilizadas con EDTA y muestras estabilizadas usando el método de acuerdo con la presente invención (medido por 18S rDNA qPCR). Sin embargo, se obtuvieron rendimientos de ADNccf reducidos para la estabilización, lo que implica el uso de liberadores de formaldehído (tubos Streck). El rendimiento de las muestras estabilizadas con formaldehído se redujo en aproximadamente un 50% en comparación con las muestras estabilizadas con EDTA. En cambio, el reactivo de estabilización de acuerdo con la presente invención no tiene efectos adversos sobre el rendimiento de ADNccf, cuando se usan métodos convencionales de aislamiento de ácidos nucleicos. Esto es una ventaja importante ya que permite integrar el método de estabilización de acuerdo con la presente invención en procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos y flujos de trabajo existentes.

Ejemplo 15: *Spike-in* de VIH 10⁴ UI/ml, VHC a muestras de sangre completa de 3 donantes.

Se recogieron muestras de sangre completa en tubos Vacutainer 2KE de BD. Después se añadieron 2 ml de la solución de estabilización que sigue (las concentraciones dadas representan la concentración final en solución de sangre estabilizada). Luego, se añadieron VIH y VHC a las muestras de sangre completa a 10⁴ UI/ml.

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

Se usaron de nuevo muestras estabilizadas con BD Vacutainer K2E como referencia.

Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante un tiempo de hasta seis días a 37 °C. El día 0 y el día 3, los replicados se procesaron de la siguiente manera: las muestras se centrifugaron a 3.000 rpm, durante 15 minutos a temperatura ambiente para recoger el plasma. El plasma obtenido se centrifugó de nuevo a 16.000 x g durante 10 minutos, a 4 °C. Los ácidos nucleicos extracelulares obtenidos del sobrenadante de plasma aclarado se purificaron usando el protocolo QIA Symphony virus/bacteria Cell-free 1000. Se usó 1 ml de plasma como material de entrada, se utilizó un volumen de 60 µl para elución. Los resultados se muestran en la figura 21. Como puede verse, la combinación de DMAA, EDTA y OPH con alcoholes de azúcar permite estabilizar los niveles de ácidos nucleicos virales durante un tiempo de hasta tres días a 37 °C. Por lo tanto, el método de acuerdo con la presente invención es particularmente adecuado para aplicaciones de diagnóstico y también es adecuado para estabilizar las muestras en entornos en los que posiblemente no se dispone de equipos de refrigeración. ΔCt entre el día 0 y el día 3 se reduce (ΔCt de aproximadamente 2,5 a ΔCt de aproximadamente 1) en comparación con la referencia de sangre con EDTA. Además, se observaron efectos de estabilización con una combinación de sorbitol en combinación con inositol (ΔCt de aproximadamente 1 a 1,4).

La figura 22 muestra la disminución del VHC en sangre completa que se incubó a 37°C. De nuevo, se muestra que cuando se combinan DMAA, EDTA y OPH con alcoholes de azúcar, el nivel de ácido nucleico del VHC se estabiliza, lo que se indica por una disminución lenta en los niveles de ARN viral, durante tres días a 37 °C. El ΔCt entre el día 0 y el día 3 se reduce (ΔCt de aproximadamente 1) en comparación con la referencia de sangre con EDTA (ΔCt de aproximadamente 2 – 3). Además, se consiguieron buenos efectos estabilizadores para el sorbitol en combinación con inositol.

Ejemplo 16: Estabilización con N,N dimetilpropanamida e inhibidor de la caspasa.

Se recogió sangre de dos donantes diferentes en tubos K2 EDTA de 10 ml (BD). Se mezclaron 4,5 ml de la sangre recogida respectivamente con 0,9 ml de solución de estabilización que contiene (por ml de solución de estabilización): 34,2 mg de EDTA K2, 1,2 ml de solución de quinoleína-Val-Asp-CH₂-OPH (inhibidor de la caspasa) (1 mg disuelto en 388 µl de DMSO) y 0,15 g, 0,3 g o 0,45 g de N,N dimetilpropanamida o 0,3 ml de DMAA, respectivamente. Por tanto, se obtuvo la concentración final en la sangre/mezcla de estabilización que es como sigue: 5,7 mg de K2EDTA, quinoleína-Val-Asp-CH₂-OPH 1 µM (inhibidor de la caspasa) y 2,5, 5 o 7,5% (p/v) de N,N-dimetilpropanamida o 5% (v/v) de DMAA, respectivamente.

Todas las muestras de sangre estabilizadas se prepararon por triplicado por condición y tiempo de la prueba. En el momento de tiempo 0 (referencia), inmediatamente después de mezclar la solución de estabilización y la sangre, se generó plasma y se extrajo el ADNccf. La muestra de sangre residual se almacenó durante tres días y seis días a

5 temperatura ambiente. Como control, la muestra de sangre estabilizada con EDTA también se almacenó durante 3 y 6 días. El plasma se generó a partir de las muestras de sangre estabilizadas y no estabilizadas (EDTA) invirtiendo cuatro veces los tubos que contenían sangre. Después, los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 3.000 rpm / 1912 x g. Se transfirieron 2,5 ml de la fracción de plasma a un tubo Falcon nuevo de 15 ml y se centrifugó durante 10 minutos a 16.000 x g. Se usaron 2 ml del plasma aclarado respectivamente para aislar el ácido nucleico extracelular usando el kit de ácido nucleico circulante QIAamp.

10 Los resultados se muestran en las figuras 23 y 24. Se muestra el aumento de ADN en relación con el instante 0 con 2,5%, 5% y 7,5% de N,N-dimetilpropanamida o 5% de DMAA (cambio de pliegue) usando diferentes longitudes de amplicón del gen 18SrRNA. Las barras indican la media de las muestras triplicadas por condición y momento del ensayo. Todas las soluciones de acuerdo con la presente invención muestran cantidades significativamente más bajas de ADN liberado después del almacenamiento durante 3 y 6 días a temperatura ambiente, en comparación con la sangre EDTA no estabilizada.

Listado de secuencias

- <110> QIAGEN GmbH
- 15 <120> Estabilización y aislamiento de ácidos nucleicos extracelulares
- <130> 53 889 K
- <150> EP 11 182 819.0
- <151> 2011-09-26
- 20 <150> US 61/539,245
- <151> 2011-09-26
- <160> 72
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 5
- 25 <212> PRT
- <213> Desconocido
- <220>
- <223> péptido inhibidor de Bax, V5
- <400> 1
- 30 Val Pro Met Leu Lys
- 1 5
- <210> 2
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> Desconocido
- 35 <220>
- <223> péptido inhibidor de STAT3
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1)..(1)
- 40 <223> ACETILACIÓN
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (2)..(2)
- <223> FOSFORILACIÓN
- 45 <400> 2
- Pro Tyr Leu Lys Thr Lys
- 1 5
- <210> 3
- <211> 4
- <212> PRT

<213> Artificial
 <220>
 <223> Inhibidor I de caspasa grupo III
 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 <400> 3
 Ile Glu Pro Asp
 1
 <210> 4
 15 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Inhibidor de caspasa 3, 7
 20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO
 <220>
 25 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> METILACIÓN
 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> METILACIÓN
 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 40 <400> 4
 Asp Glu Val Asp
 1
 <210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Inhibidor de caspasa 8
 <220>
 50 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO

- <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> METILACIÓN
- 5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
- 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN
- <400> 5
 Leu Glu Thr Asp
 1
- 15 <210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 20 <220>
 <223> Inhibidor de Caspasa 1, 4
- <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO
- 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
- 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN
- <400> 6
 Tyr Val Ala Asp
 1
- 35 <210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
- 40 <220>
 <223> Inhibidor de caspasa 10
- <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO
- 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> METILACIÓN
- 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 5 <400> 7
 Ala Glu Val Asp
 1
 <210> 8
 <211> 4
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Inhibidor de caspasa 12
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO
 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN
 20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 25 <400> 8
 Ala Thr Ala Asp
 1
 <210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Inhibidor de caspasa 4
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO
 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> METILACIÓN
 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN
 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 <400> 9
 Leu Glu Val Asp
 50 1
 <210> 10

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

 <220>
 5 <223> Inhibidor de Caspasa 13, reversible

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

 <400> 10
 Leu Glu Glu Asp
 15 1

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

 20 <220>
 <223> Inhibidor de caspasa 13, irreversible

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 25 <223> BLOQUEADO

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> METILACIÓN

 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> METILACIÓN

 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN

 <220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

 <400> 11
 Leu Glu Glu Asp
 1

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

 <220>
 <223> inhibidor de la apoptosis inducida por anti-APO-1 en células L929-APO-1

 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 5 <223> BLOQUEADO
 <400> 12
 Tyr Val Ala Asp
 1
 <210> 13
 <211> 20
 10 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Inhibidor I de Caspasa 1, permeable a las células
 <220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 20 <222> (20)..(20)
 <223> BLOQUEADO
 <400> 13
 Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15
 Tyr Val Ala Asp
 20
 <210> 14
 25 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Inhibidor II de Caspasa 1, permeable a las células
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 <400> 14
 Tyr Val Ala Asp
 1
 40 <210> 15
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> Inhibidor IV de Caspasa 1, permeable a las células
 <220>
 <221> MOD_RES

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

Val Asp Val Ala Asp
1 5

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

<220>
 <223> Inhibidor II de Caspasa 2

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> BLOQUEADO

<400> 18
Leu Asp Glu Ser Asp
1 5

20 <210> 19
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inhibidor I de Caspasa 3

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

<400> 19
Asp Glu Val Asp
1

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

<220>
 <223> Inhibidor I de Caspasa 3, permeable a las células

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> BLOQUEADO

<400> 20

<213> Artificial
 <220>
 <223> Inhibidor IV de Caspasa 3
 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 <400> 23
 Asp Met Gln Asp
 1
 <210> 24
 15 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Inhibidor V de caspasa 3
 20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO
 <220>
 25 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> METILACIÓN
 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN
 <220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 <400> 24
 Asp Gln Met Asp
 1
 <210> 25
 40 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Inhibidor I de Caspasa 4
 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 50 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

<400> 25
 Leu Glu Val Asp
 1

<210> 26
 <211> 20
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inhibidor I de Caspasa 4, permeable a las células

<220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

<220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> BLOQUEADO

<400> 26
 Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

Leu Glu Val Asp
 20

<210> 27
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inhibidor I de Caspasa 5

<220>
 25 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO

<220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> METILACIÓN

<220>
 35 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN

<220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

<400> 27
 Trp Glu His Asp
 1

<210> 28
 <211> 4
 45 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Inhibidor I de Caspasa 6

ES 2 687 126 T3

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

Ile Glu Thr Asp
20

- 5 <210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
- <220>
<223> Inhibidor II de Caspasa 8
- 10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> BLOQUEADO
- 15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> METILACIÓN
- <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> BLOQUEADO
- 20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> METILACIÓN
- 25 <400> 31
Ile Glu Thr Asp
1
- <210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
- 30 <220>
<223> Inhibidor I de Caspasa 9
- <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
35 <223> BLOQUEADO
- <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> METILACIÓN
- 40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> BLOQUEADO
- 45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> METILACIÓN
- <400> 32

Leu Glu His Asp
1
 <210> 33
 <211> 20
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Inhibidor II de Caspasa 9, permeable a las células
 <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 15 <223> BLOQUEADO
 <400> 33
 Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 1 5 10 15

Leu Glu His Asp
20
 <210> 34
 <211> 4
 20 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Inhibidor de Caspasa 9 III
 <220>
 25 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 <400> 34
Leu Glu His Asp
1
 <210> 35
 35 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Inhibidor II de pancaspasas, permeable a las células
 <220>
 40 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> BLOQUEADO

ES 2 687 126 T3

<400> 35
Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

Val Ala Asp

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

<220>
<223> Inhibidor de caspasa VIII

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETILACIÓN

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> BLOQUEADO

<400> 36
Val Asp Val Ala Asp
1 5

20 <210> 37
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> inhibidor de la caspasa 1

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETILACIÓN

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> METILACIÓN

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> BLOQUEADO

<400> 37
Tyr Val Ala Asp
1

40 <210> 38
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> inhibidor de la caspasa 1

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

5 <400> 38
Trp Glu His Asp
 1

<210> 39
 <211> 4
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> inhibidor de la caspasa 1

<220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 20 <223> BLOQUEADO

<400> 39
Tyr Val Ala Asp
 1

<210> 40
 <211> 4
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> inhibidor de la caspasa 1

<220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

<400> 40
Tyr Val Ala Asp
 1

<210> 41
 <211> 4
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> inhibidor de la caspasa 1

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)

<223> BLOQUEADO

<400> 41
Tyr Val Ala Asp
 1

5 <210> 42
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> inhibidor de la caspasa 1

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

<400> 42
Tyr Val Lys Asp
 1

20 <210> 43
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> inhibidor de la caspasa 1

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

<400> 43
Tyr Val Ala Asp
 1

35 <210> 44
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> inhibidor de la caspasa 2

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> BLOQUEADO

50 <400> 44

| | Val Asp | Val Ala | Asp |
|----|--|---------|---------|
| | 1 | | 5 |
| | <210> 45 | | |
| | <211> 5 | | |
| | <212> PRT | | |
| 5 | <213> Artificial | | |
| | <220> | | |
| | <223> inhibidor de la caspasa 2 | | |
| | <220> | | |
| | <221> MOD_RES | | |
| 10 | <222> (1)..(1) | | |
| | <223> BLOQUEADO | | |
| | <220> | | |
| | <221> MOD_RES | | |
| | <222> (2)..(2) | | |
| 15 | <223> METILACIÓN | | |
| | <220> | | |
| | <221> MOD_RES | | |
| | <222> (5)..(5) | | |
| | <223> BLOQUEADO | | |
| 20 | <220> | | |
| | <221> MOD_RES | | |
| | <222> (5)..(5) | | |
| | <223> METILACIÓN | | |
| | <400> 45 | | |
| | Val Asp | Val Ala | Asp |
| 25 | 1 | | 5 |
| | <210> 46 | | |
| | <211> 4 | | |
| | <212> PRT | | |
| | <213> Artificial | | |
| 30 | <220> | | |
| | <223> inhibidor del precursor de caspasa 3 | | |
| | <220> | | |
| | <221> MOD_RES | | |
| | <222> (1)..(1) | | |
| 35 | <223> ACETILACIÓN | | |
| | <220> | | |
| | <221> MOD_RES | | |
| | <222> (4)..(4) | | |
| | <223> BLOQUEADO | | |
| 40 | <400> 46 | | |
| | Glu | Ser | Met Asp |
| | 1 | | |
| | <210> 47 | | |
| | <211> 4 | | |
| | <212> PRT | | |
| 45 | <213> Artificial | | |
| | <220> | | |
| | <223> inhibidor del precursor de caspasa 3 | | |
| | <220> | | |
| | <221> MOD_RES | | |
| | <222> (1)..(1) | | |
| 50 | <223> ACETILACIÓN | | |

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

5 <400> 47
Ile Glu Thr Asp
1

<210> 48
 <211> 4
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> inhibidor de la caspasa 3

<220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 20 <223> BLOQUEADO

<400> 48
Asp Glu Val Asp
1

<210> 49
 <211> 4
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> inhibidor de la caspasa 3

<220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 35 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

<400> 49
Asp Met Gln Asp
1

<210> 50
 <211> 4
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Caspasa 3/7 inhibidor II

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)

<223> METILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 5 <223> METILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 10 <400> 50
 Asp Gln Met Asp
 1
 <210> 51
 <211> 4
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> inhibidor II de Caspasa 3/7
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 20 <223> BLOQUEADO
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 25 <223> BLOQUEADO
 <400> 51
 Asp Glu Val Asp
 1
 <210> 52
 <211> 4
 30 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> inhibidor II de Caspasa 3/7
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 35 <223> BLOQUEADO
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 40 <223> METILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 45 <223> METILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN
 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)

<223> BLOQUEADO
 <400> 52
Asp Glu Val Asp
 1
 <210> 53
 5 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> inhibidor de la caspasa 4
 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 <400> 53
Leu Glu Val Asp
 1
 20 <210> 54
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> inhibidor de la caspasa 4
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 <400> 54
Tyr Val Ala Asp
 35 1
 <210> 55
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> inhibidor de caspasa 6
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 45 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 50 <400> 55

Val Glu Ile Asp
 1
 <210> 56
 <211> 4
 <212> PRT
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> inhibidor de caspasa 6
 <220>
 <221> MOD_RES
 10 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO
 <220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (2)..(2)
 <223> METILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN
 20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 <400> 56
 Val Glu Ile Asp
 25 1
 <210> 57
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> inhibidor de caspasa 8
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 35 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO
 40 <400> 57
 Ile Glu Pro Asp
 1
 <210> 58
 <211> 4
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> inhibidor de caspasa 8
 <220>
 <221> MOD_RES
 50 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

5 <400> 58
Ala Glu Val Asp
1

<210> 59
 <211> 4
 <212> PRT
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> inhibidor de caspasa 8

<220>
 <221> MOD_RES
 15 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 20 <223> METILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

<400> 59
Ile Glu Thr Asp
 30 **1**

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

35 <220>
 <223> inhibidor de caspasa 8

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 40 <223> BLOQUEADO

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> METILACIÓN

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> METILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 50 <223> BLOQUEADO

<400> 60
Leu Glu Thr Asp
 1

<210> 61
 <211> 4
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> inhibidor de caspasa 9

<220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

<220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

<400> 61
Leu Glu His Asp
 1

<210> 62
 20 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> inhibidor de caspasa 9

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

<220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

<400> 62
Leu Glu His Asp
 1

35 <210> 63
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> inhibidor de la caspasa 10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> BLOQUEADO

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> BLOQUEADO

<400> 63
Ala Glu Val Asp
 50 1

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

5 <220>
 <223> Inhibidor II de Granzyme B

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)

10 <223> ACETILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)

15 <223> BLOQUEADO

<400> 64
 Ile Glu Thr Asp
 1

<210> 65
 <211> 4
 <212> PRT

20 <213> Artificial

<220>
 <223> Inhibidor IV de Granzyme B

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)

25 <223> ACETILACIÓN

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)

30 <223> BLOQUEADO

<400> 65
 Ile Glu Pro Asp
 1

<210> 66
 <211> 22
 <212> ADN

35 <213> Artificial

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

<400> 66
 gccgctagag gtgaaattct tg 22

<210> 67
 <211> 21
 <212> ADN

45 <213> Artificial

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

<400> 67
 cattctggc aaatgcttc g 21

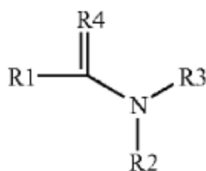
<210> 68
 <211> 21
 <212> ADN

50

<213> Artificial
<220>
<223> sonda de ADN ribosómico humano
<400> 68
5 accggcgcaa gacggaccag a 21
<210> 69
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
10 <220>
<223> cebador directo de ADN ribosómico humano
<400> 69
gtcgtctgct cctctcctac tt 22
<210> 70
15 <211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> cebador inverso de ADN ribosómico humano
20 <400> 70
ggctgctggc accagactt 19
<210> 71
<211> 25
<212> ADN
25 <213> Artificial
<220>
<223> sonda de ADN ribosómico humano
<400> 71
ctaatacatg cgcgacggcg ctgac 25
30 <210> 72
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
35 <223> cebador directo de ADN ribosómico humano
<400> 72
gaattgacgg aagggcac 18

REIVINDICACIONES

1. Un método para estabilizar una población de ácido nucleico extracelular comprendida en una muestra que contiene células, poniendo una muestra en contacto con un inhibidor de la caspasa y al menos un compuesto según la fórmula 1



formula 1

5

en la que R1 es un resto de hidrógeno o un resto alquilo, preferiblemente un resto alquilo C1-C5, más preferido un resto metilo, R2 y R3 son restos de hidrocarburo iguales o diferentes con una longitud de la cadena de carbono de 1 - 20 átomos dispuesta de forma lineal o ramificada, y R4 es un resto de oxígeno, azufre o selenio.

10 2. El método según la reivindicación 1, en el que la liberación de ADN genómico a partir de las células contenidas en la muestra, a la porción libre de células de la muestra, se reduce debido a la estabilización.

3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el inhibidor de la caspasa es un péptido específico de la caspasa, preferiblemente un péptido específico de la caspasa modificado por un compuesto aldehído, nitrilo o cetona.

4. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 3, en el que

15 a) el inhibidor de la caspasa tiene una o más de las siguientes características:

i) es un inhibidor de pancaspasa; y/o

ii) se elige entre el grupo que consiste en Q-VD-OPh y Z-Val-Ala-Asp (OMe) -FMK

y / o

20 b) el método comprende poner en contacto la muestra con al menos un agente hipertónico que estabiliza las células comprendidas en la muestra, en donde opcionalmente el agente hipertónico tiene una o más, preferiblemente dos o más, de las características siguientes:

i) está descargado;

ii) estabiliza las células comprendidas en la muestra induciendo el encogimiento de las células;

iii) es impermeable a las células;

25 iv) es soluble en agua;

v) es un compuesto orgánico hidroxilado;

vi) es un poliol;

vii) es un compuesto de hidroxicarbonilo;

viii) es un carbohidrato o un alcohol de azúcar; y/o

30 ix) es dihidroxiacetona

y/o

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

i) R1, R2 y R3 comprenden de 1 a 5 átomos de carbono;

ii) R1, R2 y R3 comprenden 1 o 2 átomos de carbono;

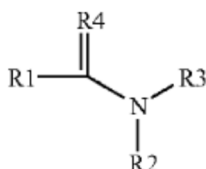
35 iii) R4 es oxígeno;

iv) es una amida de ácido N,N-dialquilcarboxílico; y/o

- v) se elige entre el grupo que consiste en N,N-dimetilacetamida, N,N-dietilacetamida, N,N-dimetilformamida y N,N-dietilformamida; y/o
- vi) es N,N-dimetilpropanamida.
5. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra se pone adicionalmente en contacto con al menos un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante tal como EDTA.
6. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 5, en el que después de que la muestra ha sido puesta en contacto con el inhibidor de la caspasa, el agente hipertónico, el compuesto según la fórmula 1 y/o el anticoagulante, la mezcla resultante tiene una o más de las características siguientes:
- a) comprende el inhibidor de la caspasa en una concentración elegida entre al menos 0,01 μM , al menos 0,05 μM , al menos 0,1 μM , al menos 0,5 μM , al menos 1 μM , al menos 2,5 μM o al menos 3,5 μM ;
- b) comprende el inhibidor de la caspasa en un intervalo de concentración elegido entre los intervalos de 0,01 μM a 100 μM , de 0,05 μM a 100 μM , de 0,1 μM a 50 μM , de 1 μM a 40 μM , de 1 μM a 30 μM o de 2,5 μM a 25 μM ;
- c) comprende el agente hipertónico en una concentración de al menos 0,05 M, al menos 0,1 M, preferiblemente al menos 0,25 M, más preferiblemente al menos 0,5 M;
- d) comprende el agente hipertónico en un intervalo de concentración elegido entre los intervalos de 0,05 M a 2 M, de 0,1 a 1,5 M, de 0,15 M a 0,8 M, de 0,2 M a 0,7 M o de 0,1 M a 0,6 M;
- e) comprende el compuesto según la fórmula 1 en una concentración de al menos 0,1%, al menos 0,5%, al menos 1%, al menos 0,75%, al menos 1%, al menos 1,25 % o al menos 1,5%;
- f) comprende el compuesto de acuerdo con la fórmula 1 en un intervalo de concentración elegido entre los intervalos de 0,1% a 50%, 0,5% a 25%, 0,75% a 20%, 1% a 15% o 1% a 10 %; y/o
- g) comprende el anticoagulante, preferiblemente un agente quelante, en un intervalo de concentración elegido entre los intervalos de 0,05 mM a 100 mM, de 0,05 mM a 50 mM, de 0,1 mM a 30 mM, de 1 mM a 20 mM o de 2 mM a 15 mM.
7. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la muestra tiene una o más de las características siguientes:
- a) comprende ácidos nucleicos extracelulares;
- b) se elige entre el grupo que consiste en sangre completa, muestras derivadas de la sangre, plasma, suero, fluido linfático, orina, licor, líquido cefalorraquídeo, ascitis, leche, heces, lavado bronquial, saliva, líquido amniótico, semen/líquido seminal, frotis/hisopos, fluidos corporales, secreciones corporales, secreciones nasales, secreciones vaginales, secreciones y excreciones de heridas, y sobrenadantes de cultivos celulares;
- c) es un fluido corporal que está agotado de células o que contiene células;
- d) se elige entre sangre completa, plasma y/o suero; y/o
- e) es sangre completa.
8. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 7, en el que
- a) el uno o más agentes de estabilización y opcionalmente otros aditivos están comprendidos en una composición de estabilización y en donde la relación volumétrica de la composición de estabilización al volumen especificado de la muestra que contiene células se elige entre los intervalos de 10:1 a 1:20, 5:1 a 1:15, 1:1 a 1:10 y 1:2 a 1:5;
- b) la muestra estabilizada es sometida a un análisis de ácidos nucleicos y/o a un método de detección;
- c) los ácidos nucleicos extracelulares son aislados de la muestra estabilizada;
- d) los ácidos nucleicos extracelulares son aislados de la muestra estabilizada y los ácidos nucleicos aislados son analizados y/o detectados;
- e) las células comprendidas en la muestra estabilizada son eliminadas;
- f) las células comprendidas en la muestra estabilizada son eliminadas antes de realizar una etapa de aislamiento, análisis y/o detección;

- g) se realiza una etapa de aislamiento de ácidos nucleicos después de un periodo de estabilización como se define en la reivindicación 8;
- h) (i) la muestra estabilizada, (ii) la muestra estabilizada de la cual se han eliminado las células y/o (iii) las células eliminadas de la muestra, son almacenadas.
- 5 i) las células que se eliminaron de la muestra estabilizada son desechadas.
- j) los ácidos nucleicos son aislados de las células que fueron eliminadas de la muestra estabilizada; y/o
- k) la estabilización de la población de ácidos nucleicos extracelulares puede conseguirse sin refrigeración, preferiblemente a temperatura ambiente, durante un periodo de tiempo elegido entre:
- 10 i) al menos dos días;
- ii) al menos tres días;
- iii) al menos de un día a tres días;
- iv) al menos de un día a seis días; y/o
- v) al menos de un día a siete días.
9. El método según una o más de las reivindicaciones 1 a 8, para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra de sangre, que comprende poner en contacto la muestra de sangre con un inhibidor de la caspasa y un anticoagulante, en donde la liberación del ADN genómico a partir de las células contenidas en la muestra de sangre, a la porción libre de células de la muestra de sangre se reduce y la degradación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra se reduce debido a la estabilización.
- 15
10. Un método para aislar ácidos nucleicos extracelulares a partir de una muestra biológica, preferiblemente una muestra de sangre, que comprende las etapas de:
- 20 a) estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares en la muestra según el método definido en una o más de las reivindicaciones 1 a 9; y
- b) aislar los ácidos nucleicos extracelulares.
11. El método según la reivindicación 10, que comprende una o más de las siguientes etapas:
- 25 i) opcionalmente, eliminar las células de la muestra que contiene células entre la etapa a) y la etapa b);
- ii) realizar una o más de las etapas b) a j) como se define en la reivindicación 8;
- iii) aislar los ácidos nucleicos extranucleares de la muestra en la etapa b) de la reivindicación 10 usando un método de aislamiento elegido entre el grupo que consiste en extracción, extracción en fase sólida, métodos de aislamiento usando una fase sólida de unión de ácido nucleico, métodos de aislamiento usando un material de sílice, métodos de aislamiento que están basados en el uso de una fase sólida que comprende grupos de intercambio aniónico; purificación basada en partículas magnéticas, extracción con fenol-cloroformo, método de aislamiento nucleico basado en alcohol y/o uno o más agentes caotrópicos, cromatografía, cromatografía de intercambio aniónico, aislamiento basado en partículas de intercambio aniónico, electroforesis, filtración, precipitación, métodos de aislamiento específicos de ácidos nucleico diana, y combinaciones de los mismos; y/o
- 30
- iv) procesar o analizar los ácidos nucleicos aislados en una etapa c) adicional, en donde los ácidos nucleicos aislados preferiblemente son modificados, puestos en contacto con al menos una enzima, amplificados, sometidos a transcripción inversa, secuenciados, puestos en contacto con una sonda, detectados, cuantificados, y/o identificados.
- 35
- 40 12. El método según la reivindicación 10 o 11, en el que
- a) la población del ácido nucleico extracelular que es aislada de la porción libre de células de la muestra y/o que se obtiene después del aislamiento en la etapa b) de la reivindicación 10, tiene una o más de las siguientes características:
- 45 i) está comprendida como una porción en el ácido nucleico total que se aísla;
- ii) predominantemente comprende ADN;
- iii) predominantemente comprende ARN;

- 5
- iv) comprende ácidos nucleicos extracelulares circulantes;
 - v) comprende ácidos nucleicos relacionados con la enfermedad;
 - vi) comprende ácidos nucleicos asociados a un tumor o derivados de un tumor;
 - vii) comprende ácidos nucleicos relacionados con una inflamación;
 - viii) comprende ácidos nucleicos fetales;
 - ix) comprende ácidos nucleicos virales;
 - x) comprende ácidos nucleicos patógenos;
 - xi) comprende ácidos nucleicos extracelulares de mamífero;
 - xii) es una mezcla de ADN y ARN;
- 10 y/o
- b) el ácido nucleico extracelular que es analizado y/o procesado adicionalmente, preferiblemente detectado, en la etapa c), tiene una o más de las características siguientes:
- i) es ADN;
 - ii) es ARN;
- 15
- iii) es un ácido nucleico extracelular circulante;
 - iv) comprende ácidos nucleicos relacionados con la enfermedad;
 - v) comprende ácidos nucleicos asociados a un tumor o derivados de un tumor;
 - vi) comprende ácidos nucleicos relacionados con una inflamación;
 - vii) es un ácido nucleico fetal;
- 20
- viii) es un ácido nucleico viral;
 - ix) es un ácido nucleico patógeno;
 - x) es un ácido nucleico extracelular de mamífero; y/o
 - xi) es una mezcla de ADN y ARN.
- 25
13. Una composición adecuada para estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares en una muestra biológica, preferiblemente una muestra de sangre, que comprende:
- a) al menos un inhibidor de la caspasa, y
 - b) al menos un compuesto según la fórmula 1



formula 1

30 en la que R1 es un resto de hidrógeno o un resto alquilo, preferiblemente un resto alquilo C1-C5, más preferido un resto metilo, R2 y R3 son restos hidrocarburo iguales o diferentes con una longitud de la cadena de carbono de 1 - 20 átomos dispuesta de forma lineal o ramificada, y R4 es un resto de oxígeno, azufre o selenio.

14. La composición según la reivindicación 13, que tiene una o más de las siguientes características:
- a) adicionalmente comprende al menos un anticoagulante, preferiblemente un agente quelante;
 - b) es capaz de reducir la liberación de ADN genómico a partir de las células contenidas en la muestra, en la

- porción libre de células de la muestra;
- c) es capaz de reducir la degradación de los ácidos nucleicos, en particular ADN genómico, presentes en la muestra;
- d) el inhibidor de la caspasa tiene una o más de las características como se definen en la reivindicación 4;
- 5 e) comprende al menos un agente hipertónico como se define en la reivindicación 4;
- f) comprende al menos un compuesto de acuerdo con la fórmula 1 como se define en la reivindicación 4;
- g) cuando se mezcla con una muestra biológica, preferiblemente sangre, plasma o suero, la mezcla resultante comprende el inhibidor de la caspasa, el agente hipertónico, el compuesto de acuerdo con la fórmula 1 y/o el agente quelante en una concentración como se define en la reivindicación 6;
- 10 h) se proporciona en forma sólida;
- i) se proporciona en forma líquida; y/o
- j) es capaz de estabilizar la población de ácidos nucleicos extracelulares contenida en dicha muestra a temperatura ambiente durante al menos 3 días, preferiblemente al menos 6 días.
15. La composición según la reivindicación 13 o 14, en la que la composición de estabilización se proporciona como mezcla con una muestra biológica y en la que dicha muestra tiene una o más de las características siguientes:
- a) comprende ácidos nucleicos extracelulares;
- b) se elige entre el grupo consistente en sangre completa, plasma, suero, fluido linfático, orina, licor, líquido cefalorraquídeo, ascitis, leche, heces, lavado bronquial, saliva, líquido amniótico, semen/líquido seminal, frotis/hisopos, fluidos corporales, secreciones corporales, secreciones nasales, secreciones vaginales, secreciones y excreciones de heridas, y sobrenadantes de cultivos celulares;
- 20 c) es un fluido corporal que está agotado de células o que contiene células;
- d) se elige entre sangre completa, plasma y/o suero; y/o
- e) es sangre completa.
25. La composición según la reivindicación 15, en la que la relación volumétrica de la composición de estabilización al volumen especificado de la muestra que contiene células se elige entre 10:1 a 1:20, 5:1 a 1:15, 1:1 a 1:10, y 1:2 a 1:5.
17. Uso de un inhibidor de la caspasa para estabilizar una población de ácidos nucleicos extracelulares comprendida en una muestra que contiene células, poniendo en contacto una muestra con el inhibidor de la caspasa.
30. El uso según la reivindicación 17, en el que el inhibidor de la caspasa tiene una o más de las características siguientes:
- a) es un inhibidor de la pancaspasa;
- b) es un péptido específico de la caspasa, preferiblemente modificado por un compuesto aldehído, nitrilo o cetona; y/o
- c) se elige entre el grupo Q-VD-OPh y Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK.
35. El uso según las reivindicaciones 17 o 18, en el que la muestra que contiene células tiene una o más de las características siguientes:
- a) se elige entre el grupo que consiste en sangre completa, muestras derivadas de la sangre, plasma, suero, fluido linfático, orina, licor, líquido cefalorraquídeo, ascitis, leche, heces, lavado bronquial, saliva, líquido amniótico, semen/líquido seminal, frotis/hisopos, fluidos corporales, secreciones corporales, secreciones nasales, secreciones vaginales, secreciones y excreciones de heridas, y sobrenadantes de cultivos celulares;
- 40 b) es un fluido corporal agotado de células o que contiene células;
- c) se elige entre sangre completa, plasma y/o suero; y/o
- d) es sangre completa.

Figura 1a

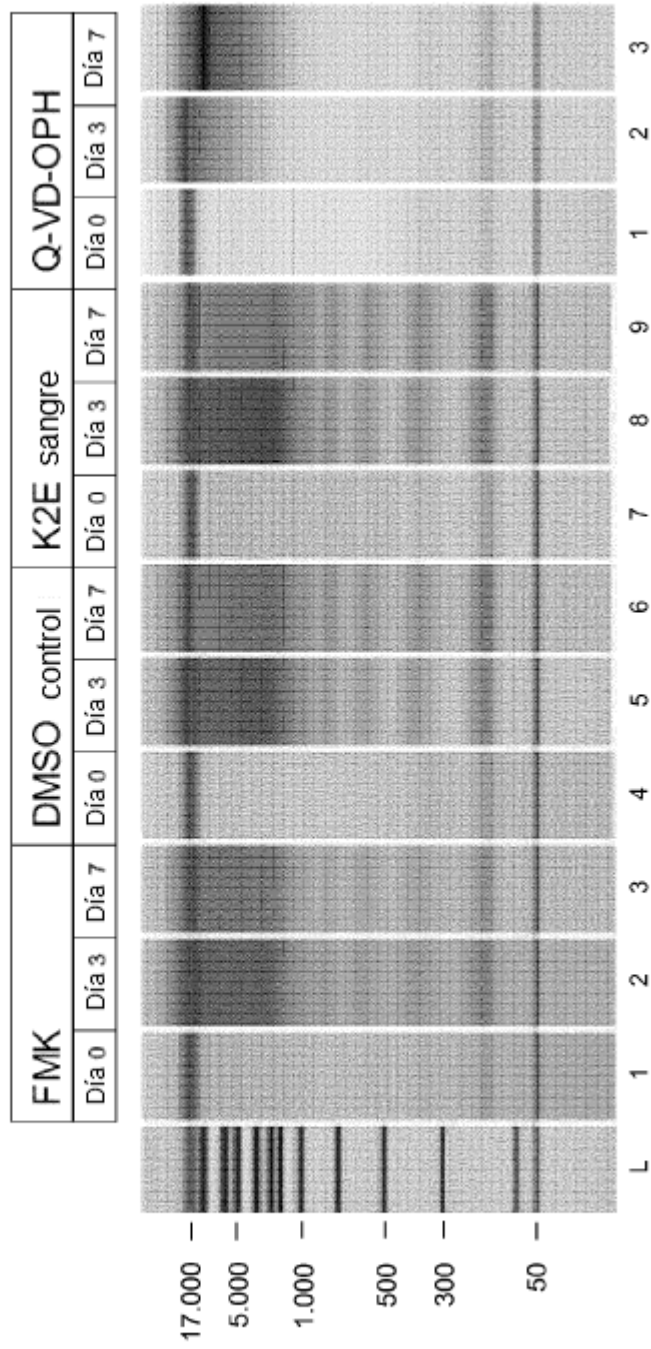


Figura 1b

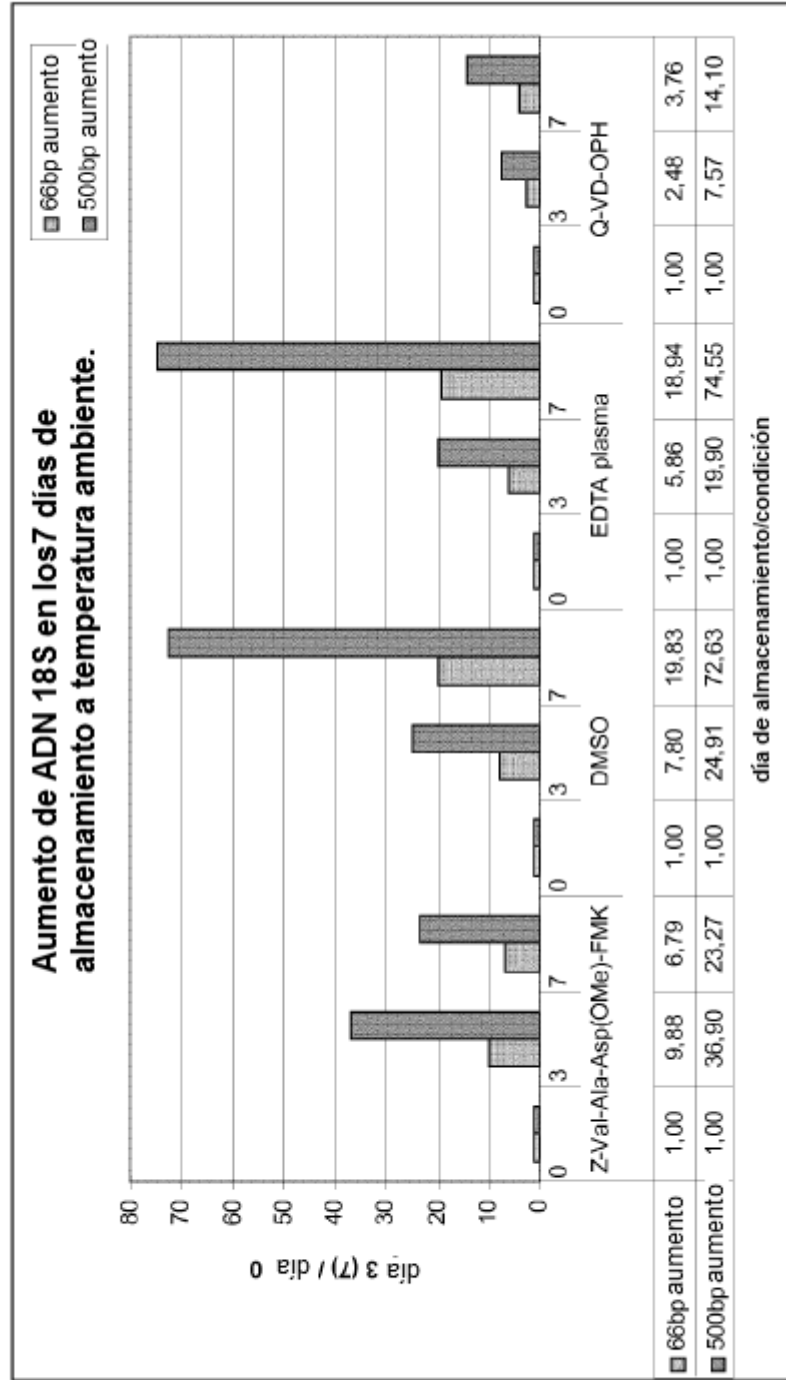


Figura 2a

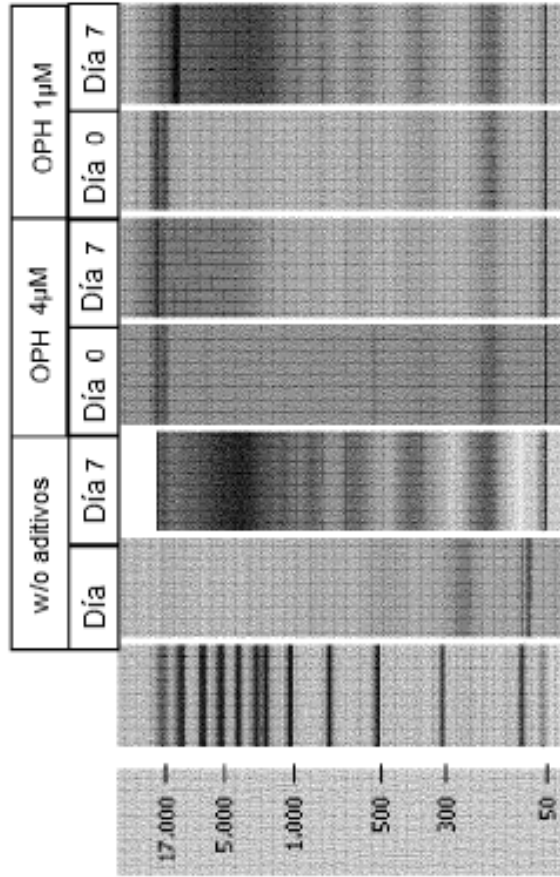


Figura 2b

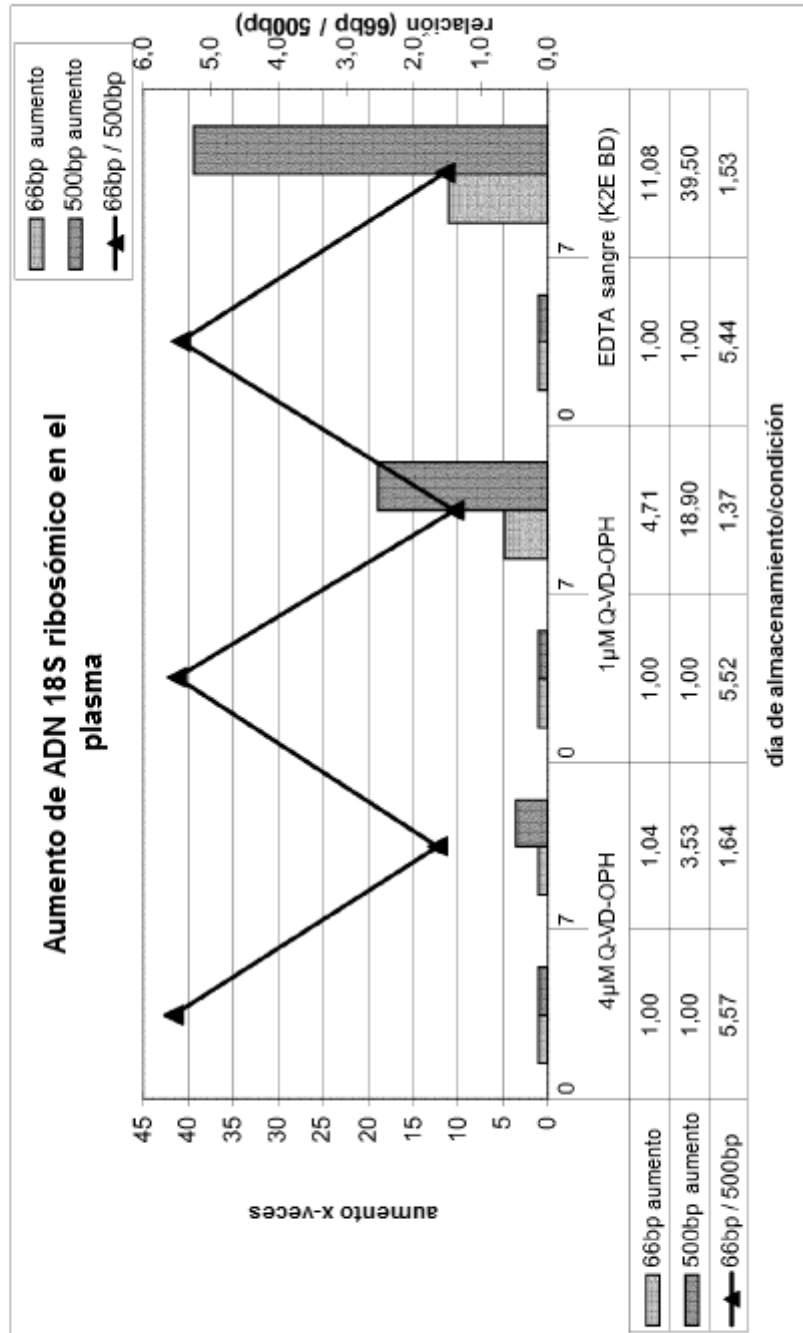


Figura 3

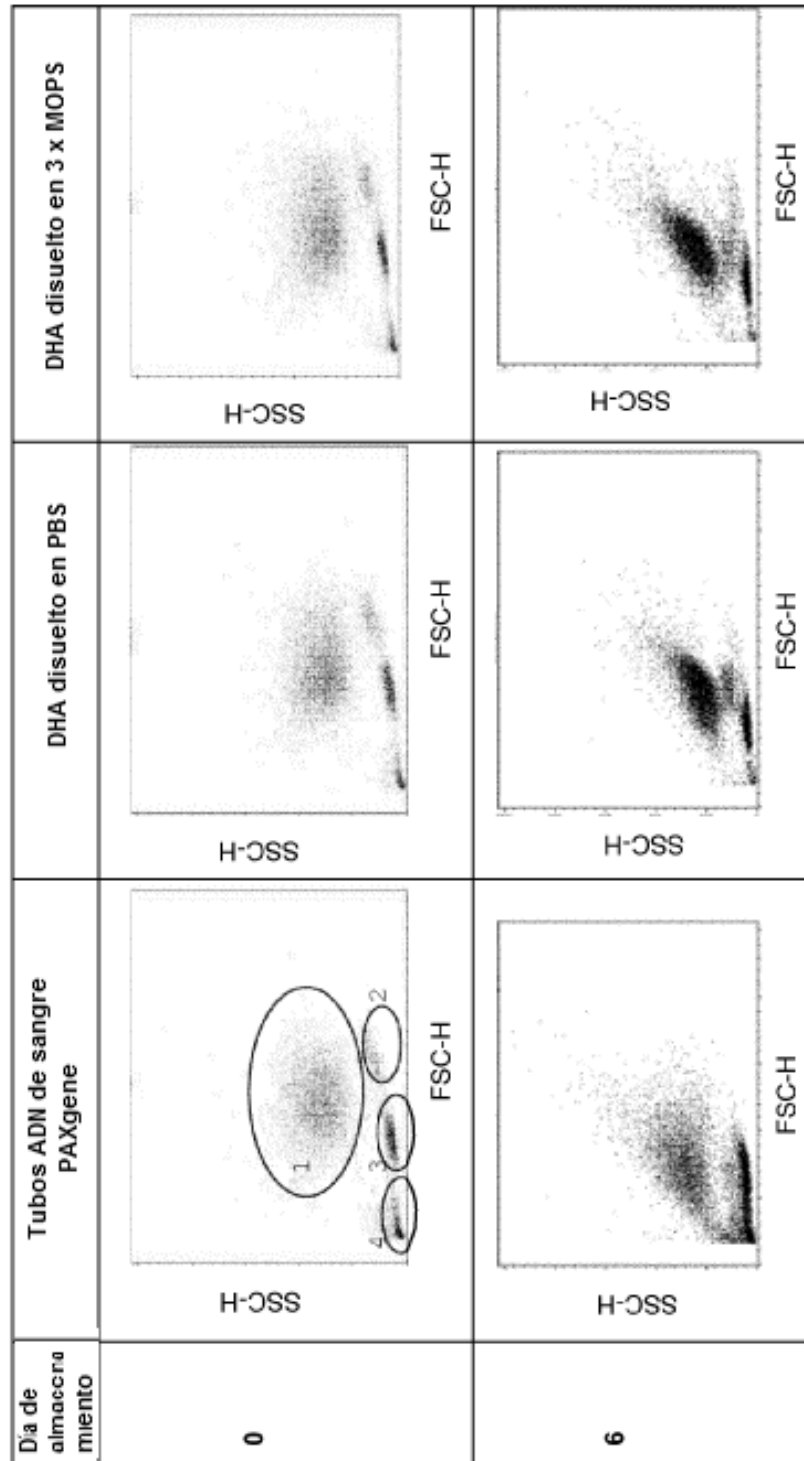


Figura 4a

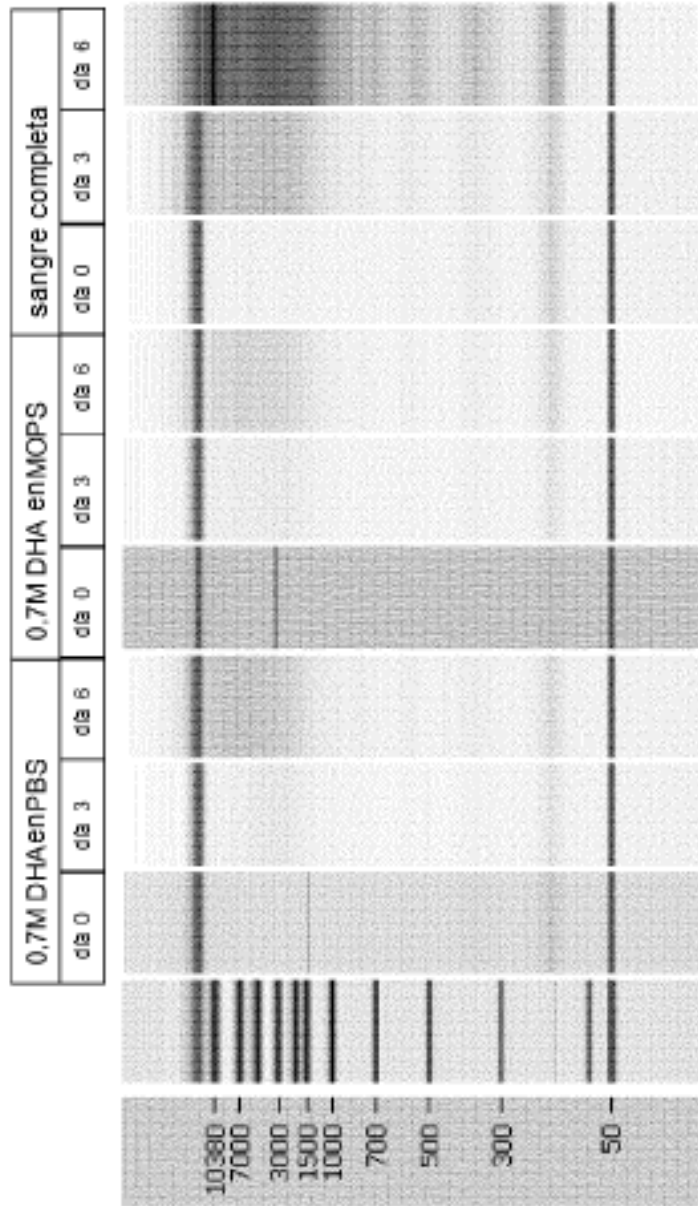
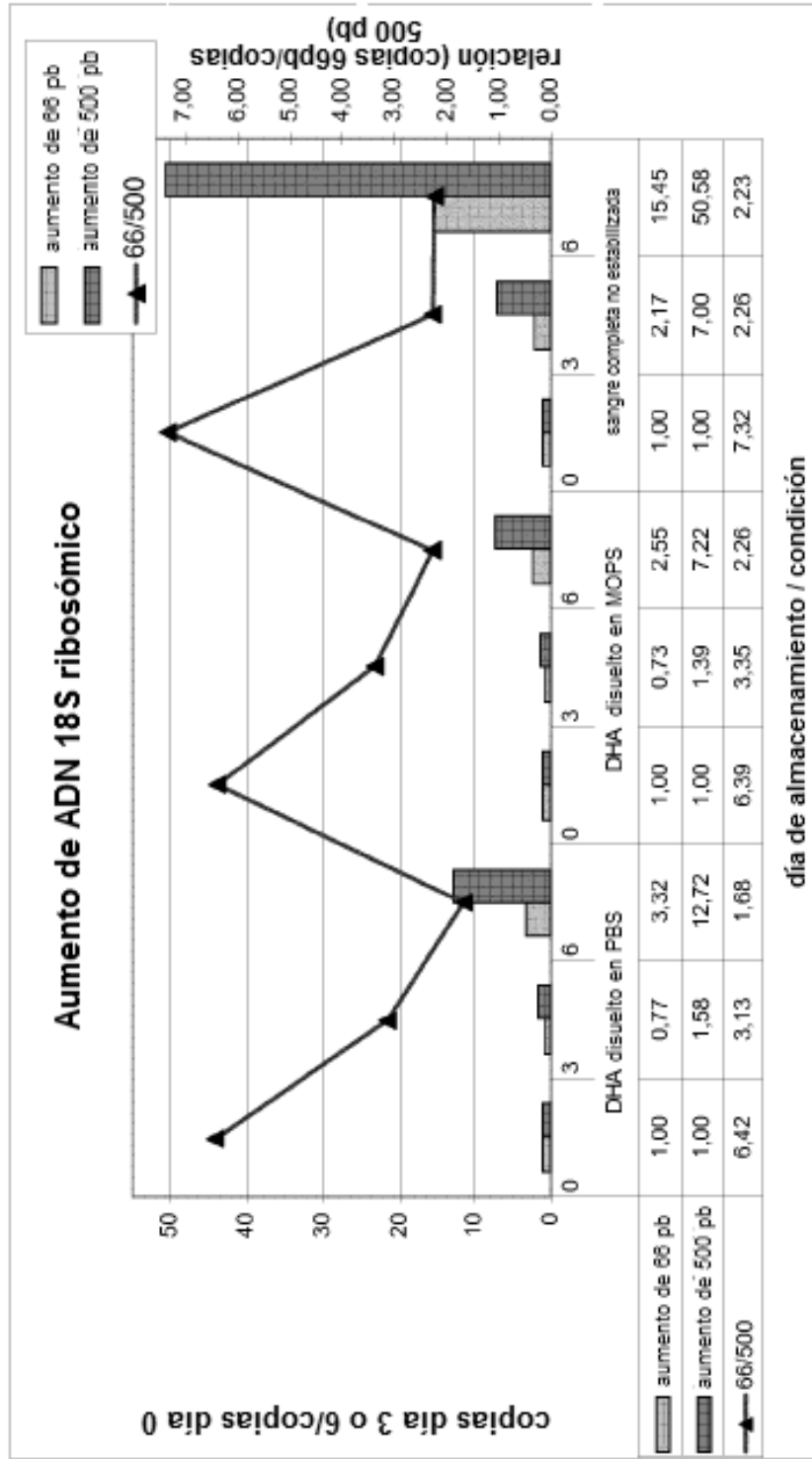


Figura 4b



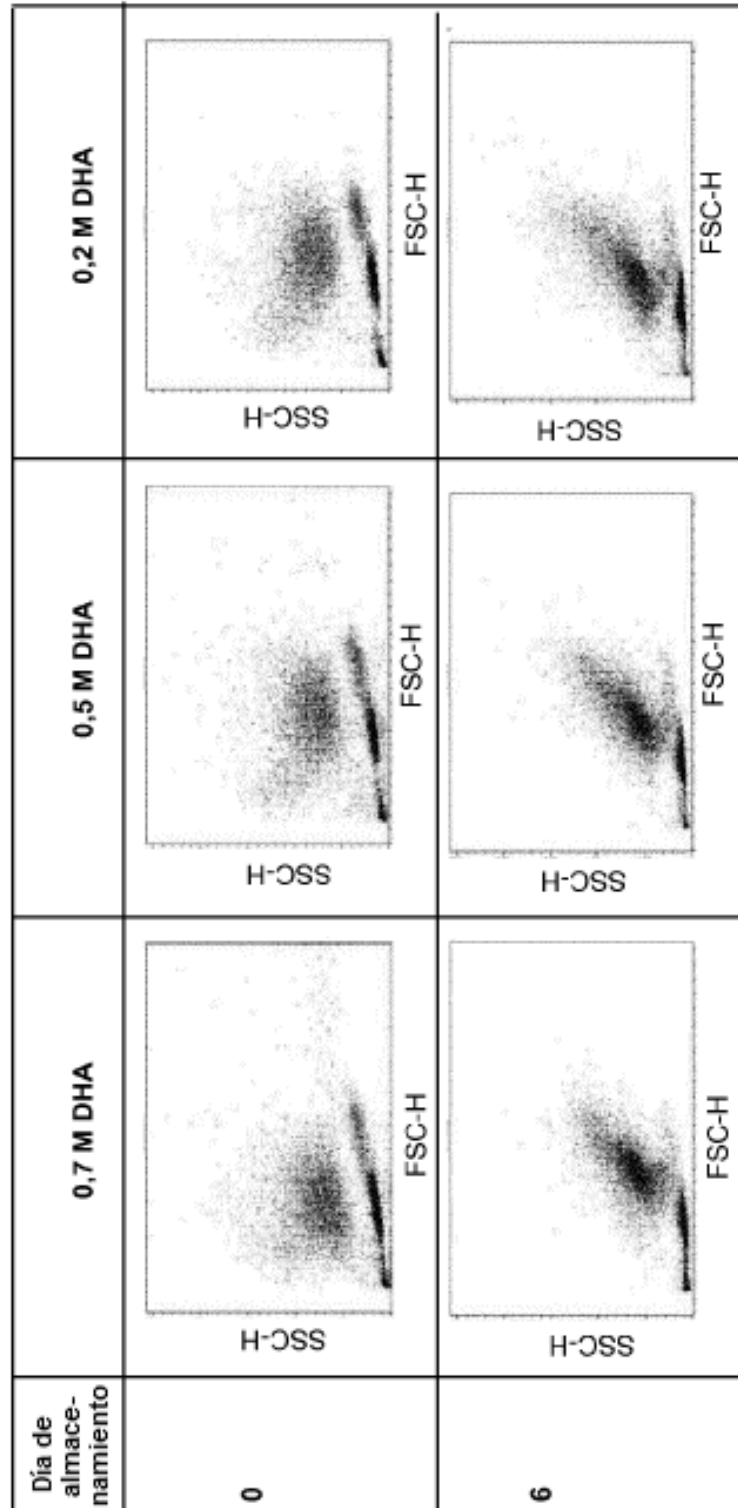


Figura 5

Figura 6a

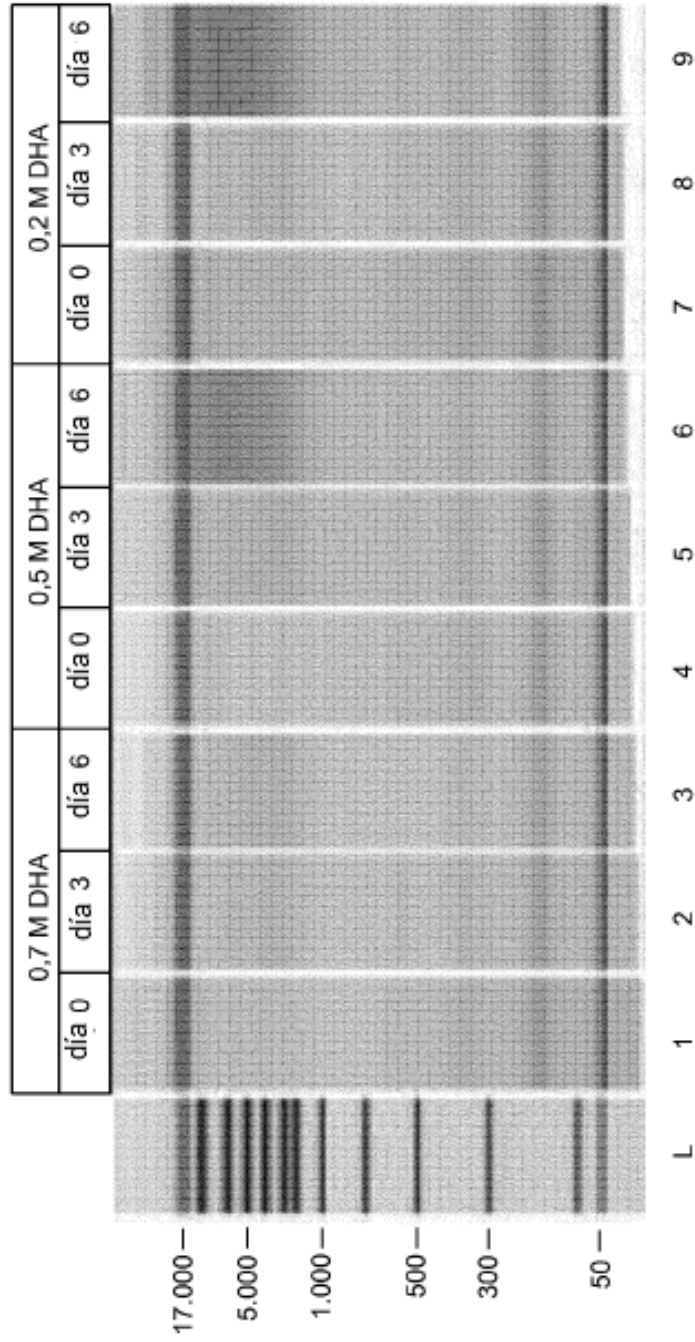
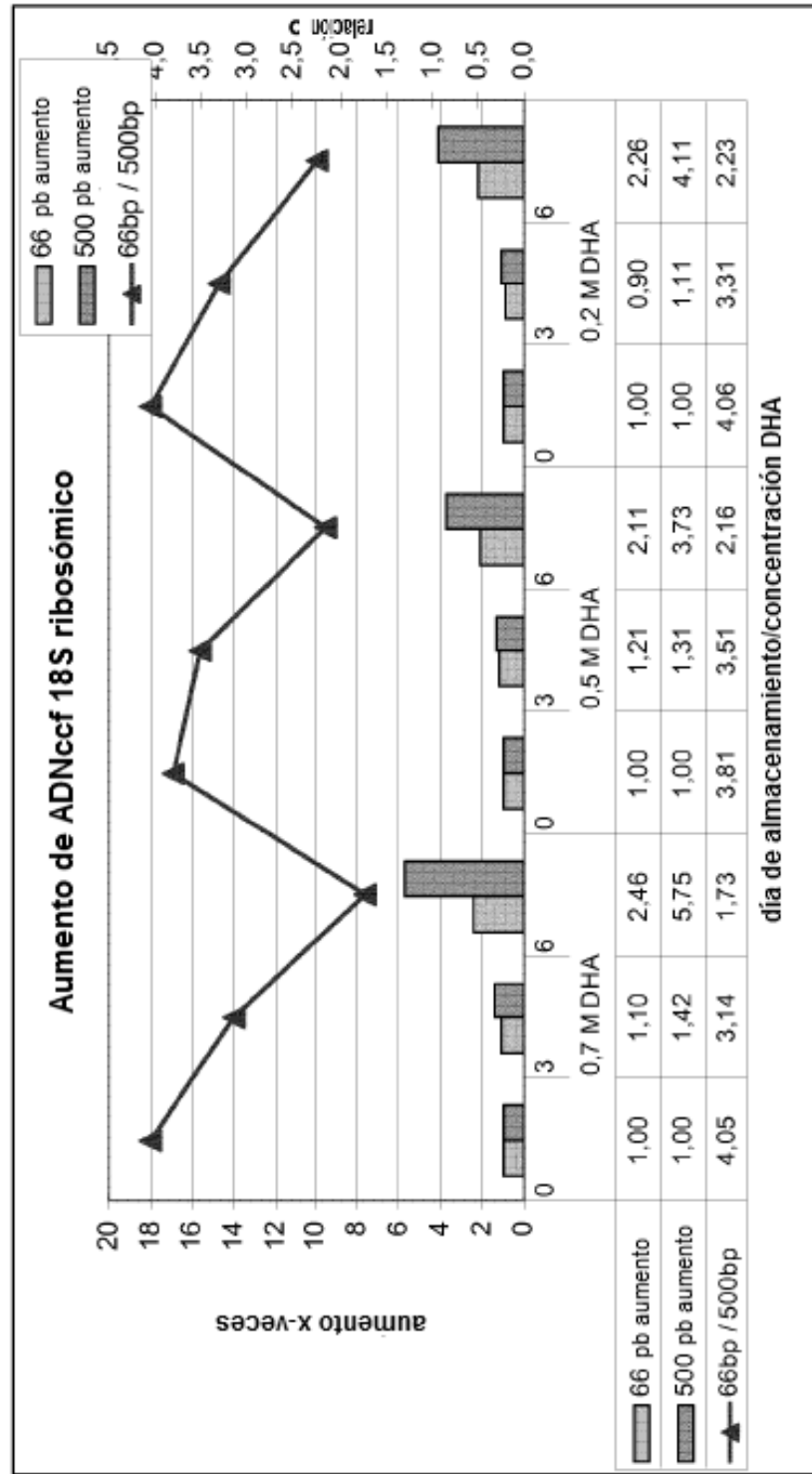


Figura 6b





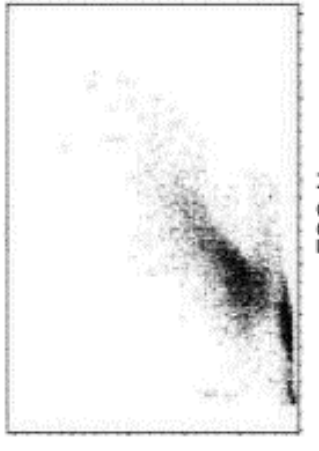
| Día de almacenamamiento | Sangre completa (recogida en KZE BD) | mezcla de reactivos |
|-------------------------|---|--|
| 0 |  | <p>n/a</p> |
| 6 |  |  |

Figura 7a

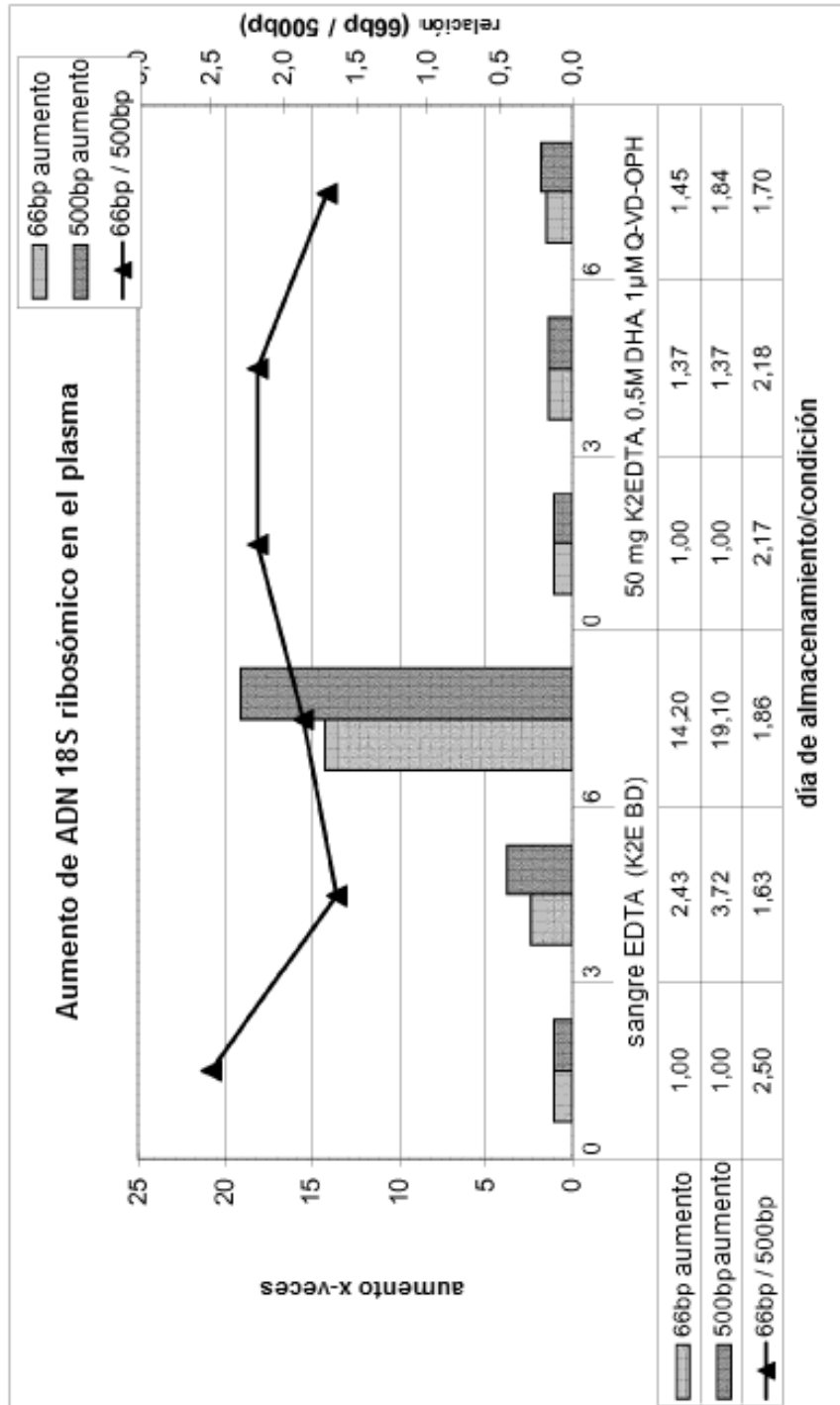


Figura 7b

Figura 8

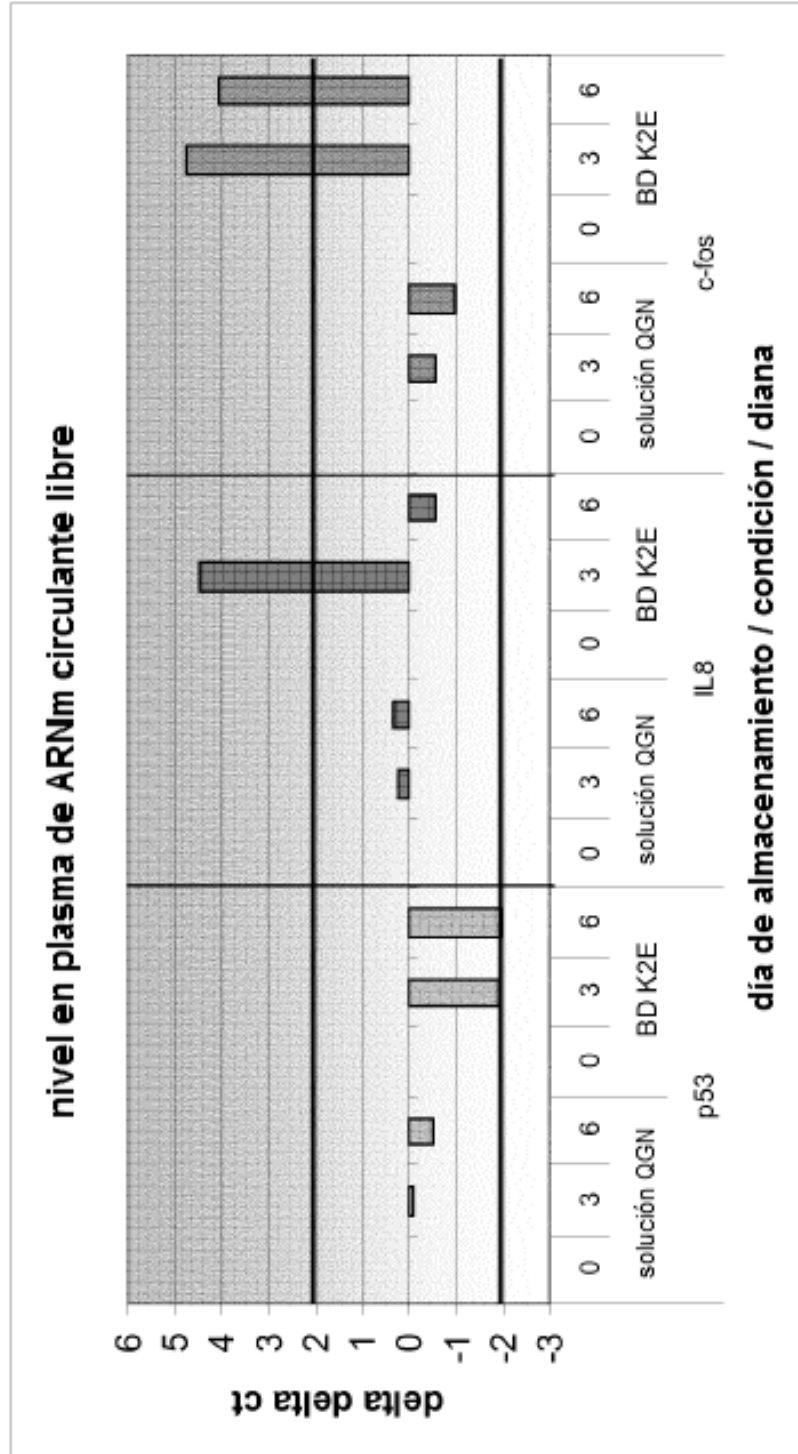


Figura 9

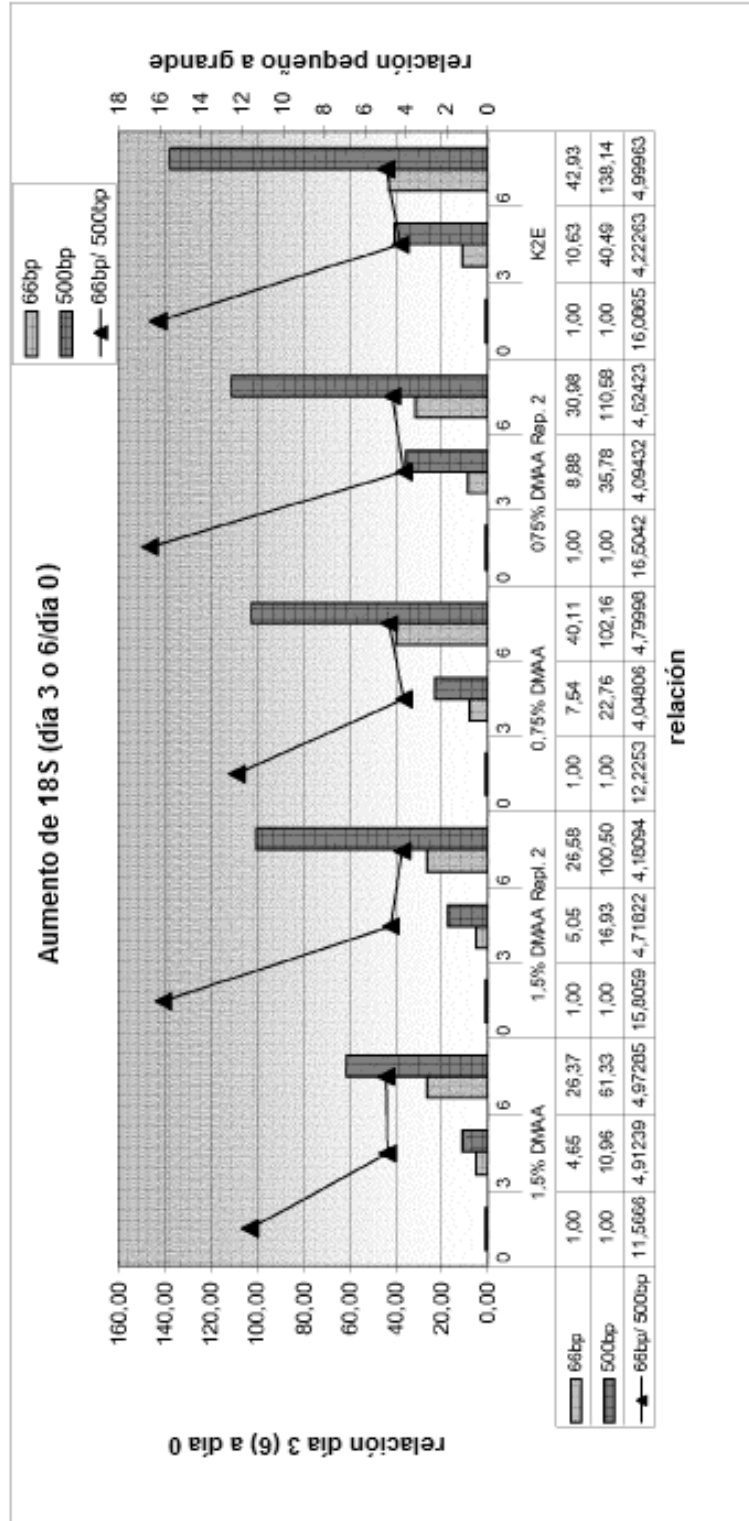


Figura 10

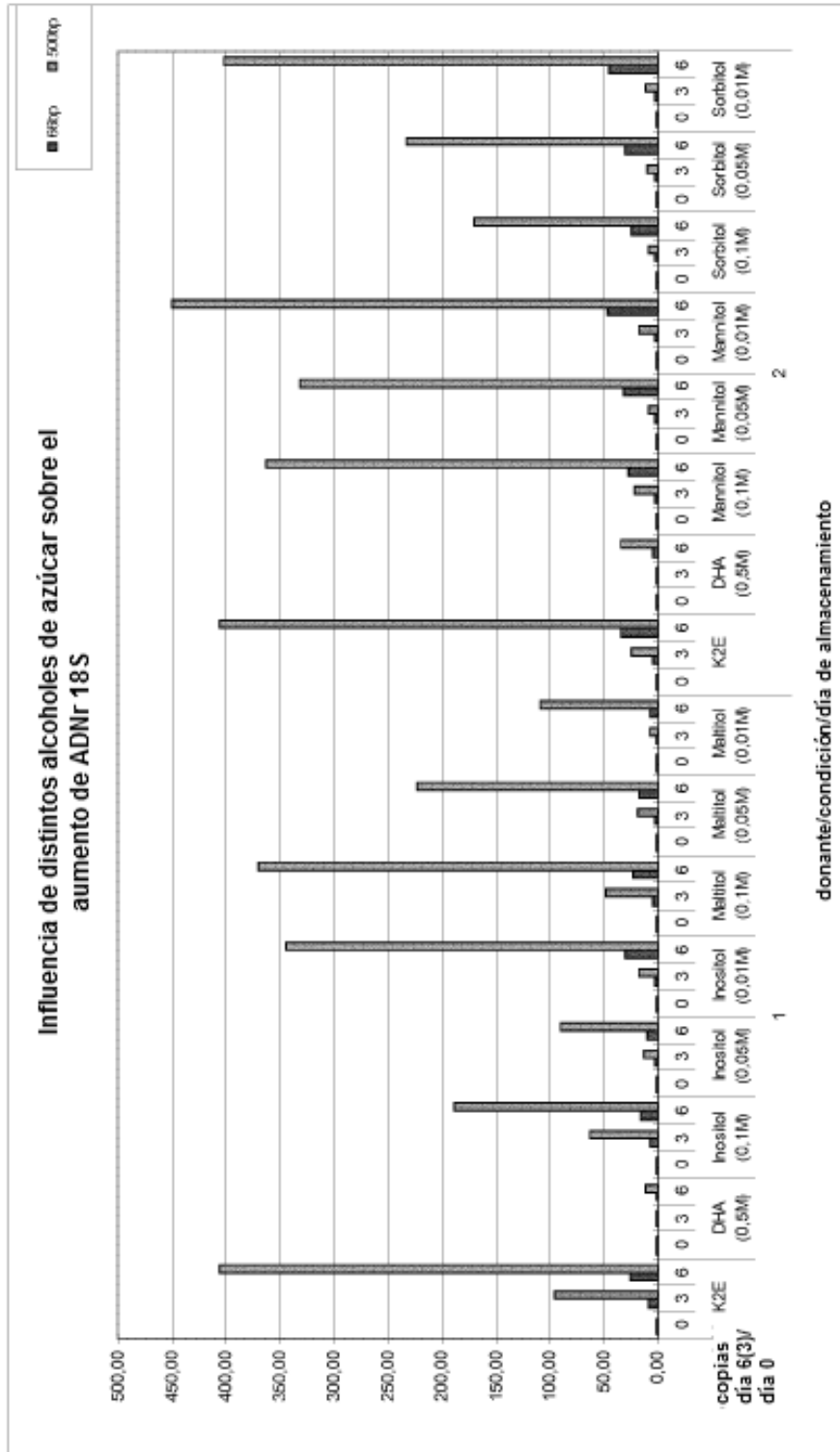


Figura 11

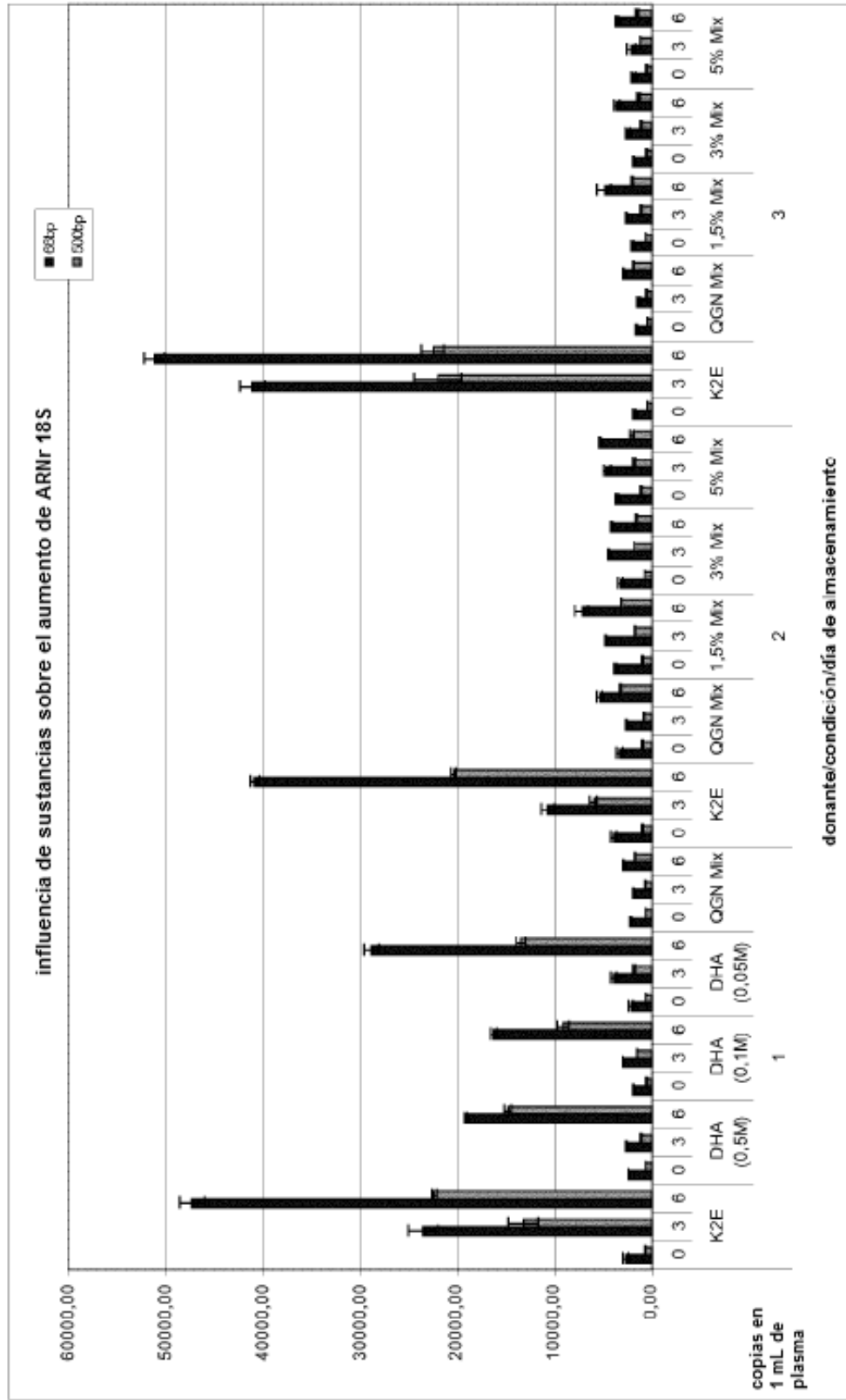


Figura 12

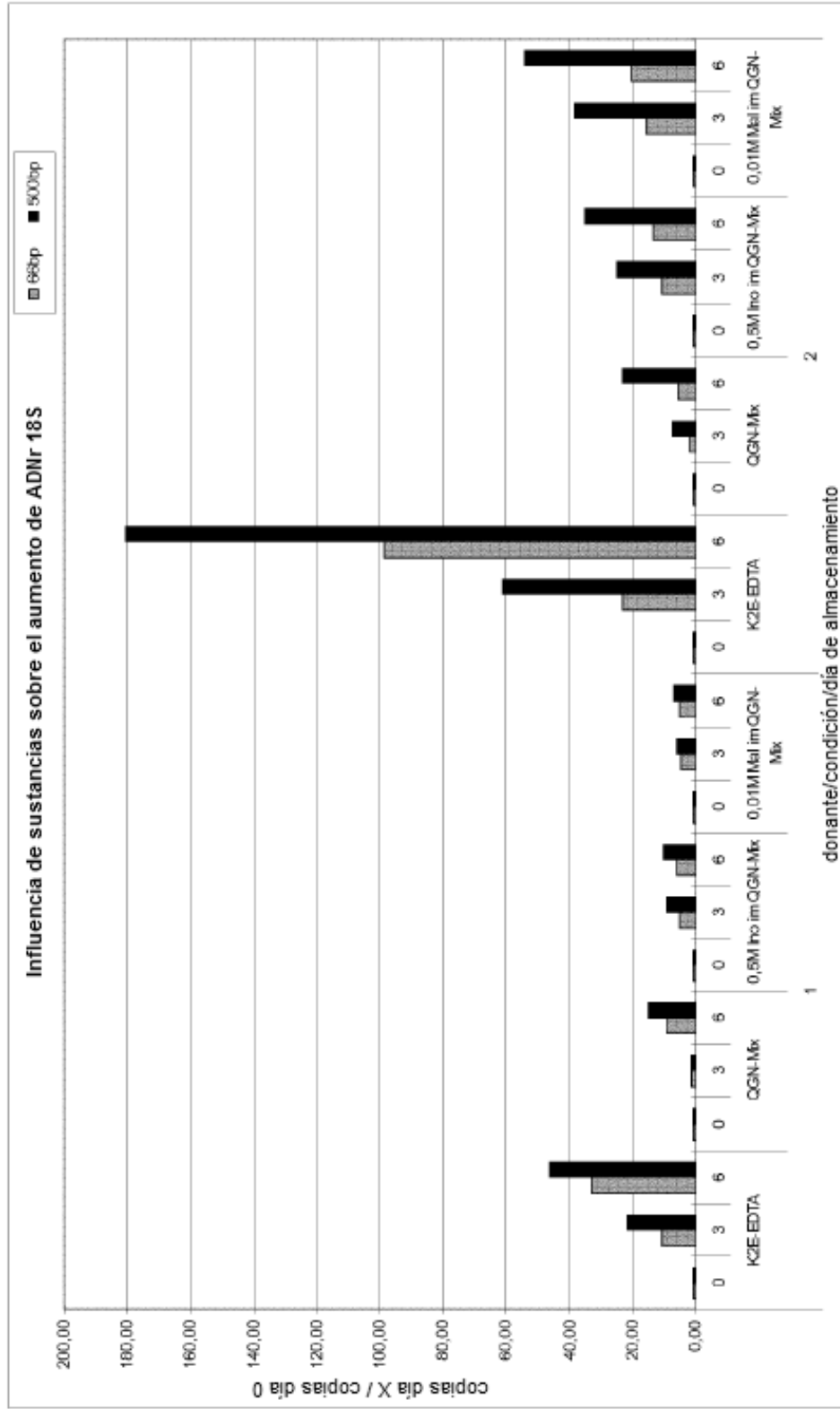


Figura 13

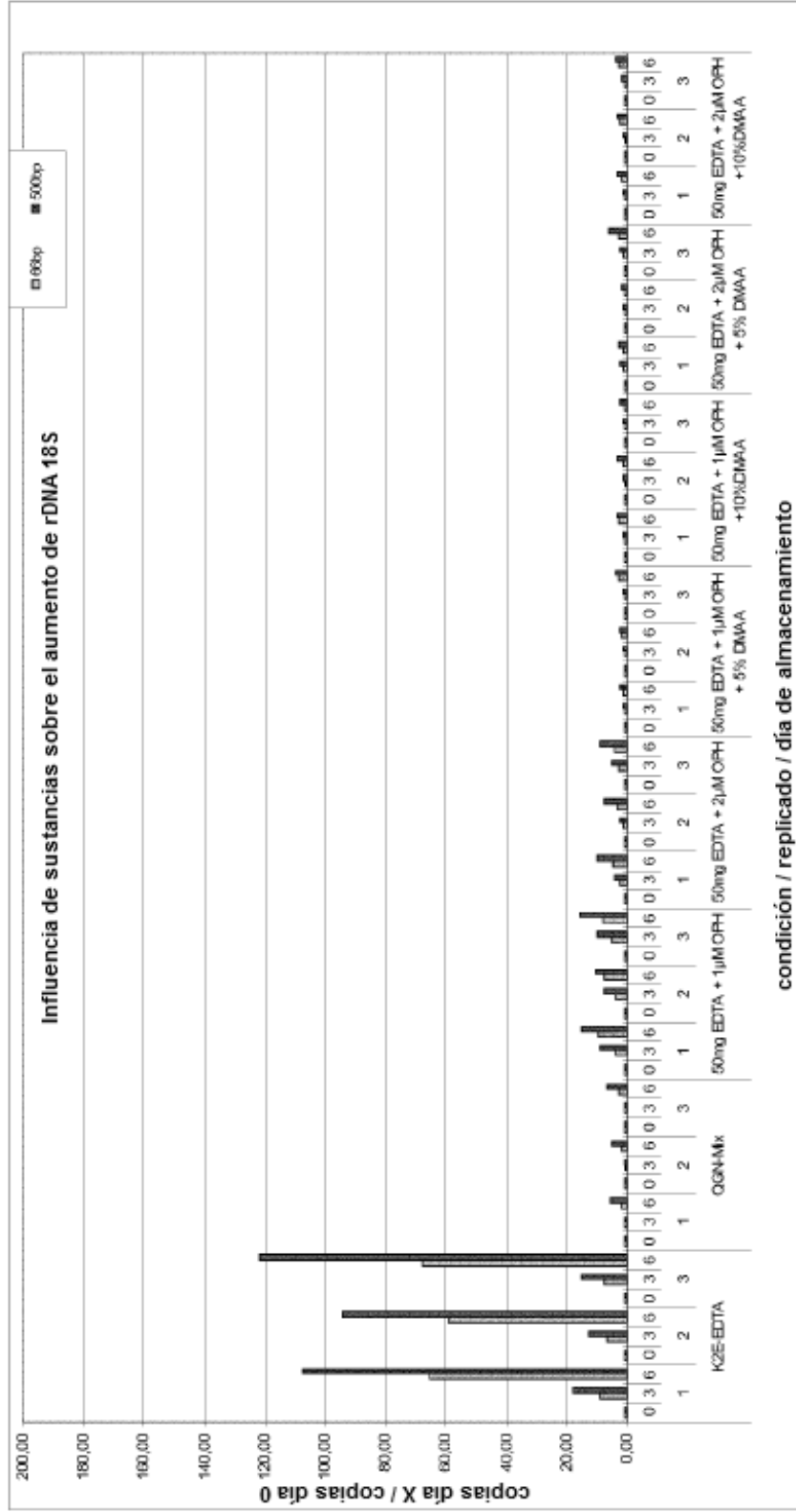


Figura 14

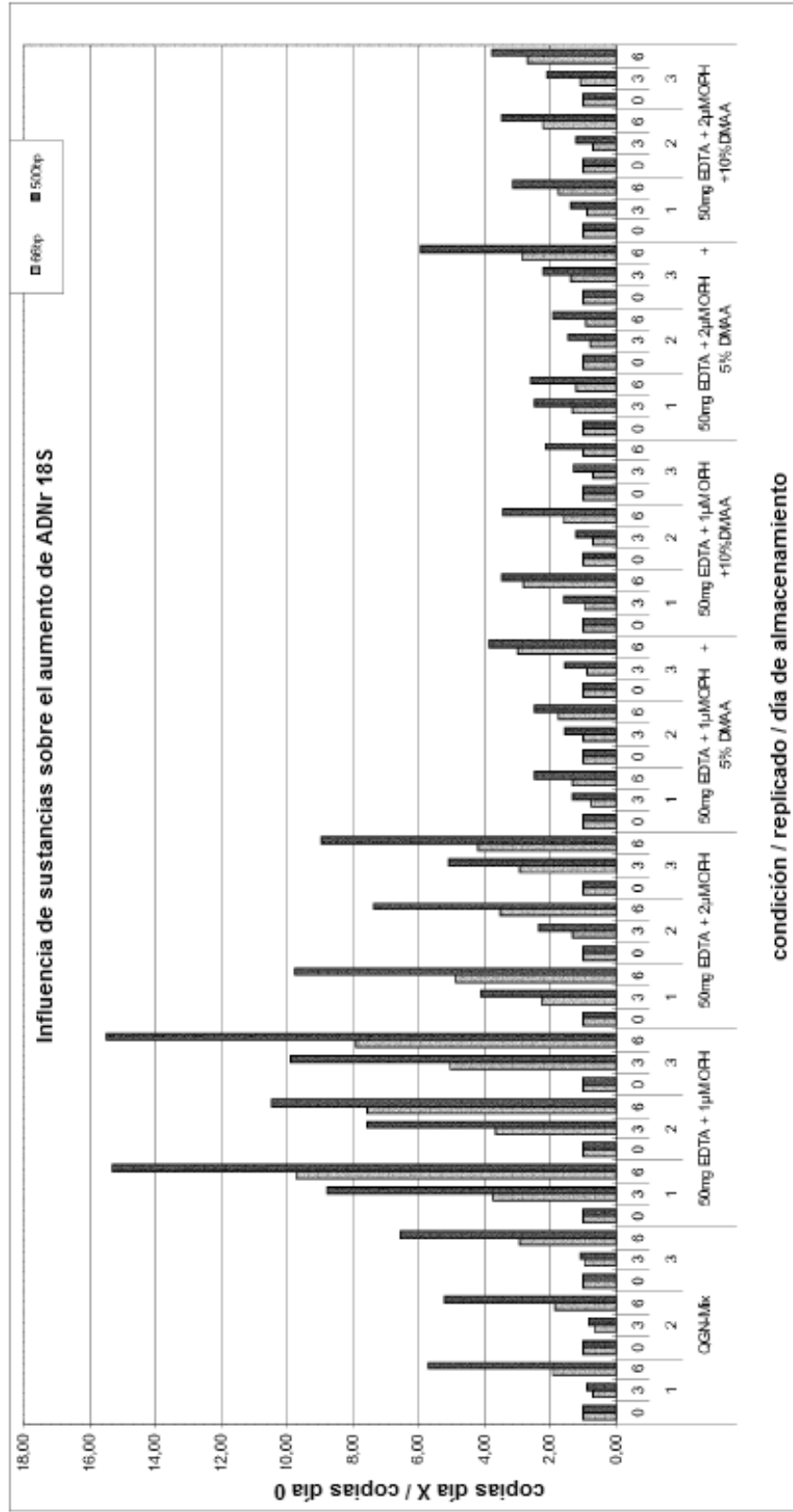


Figura 16

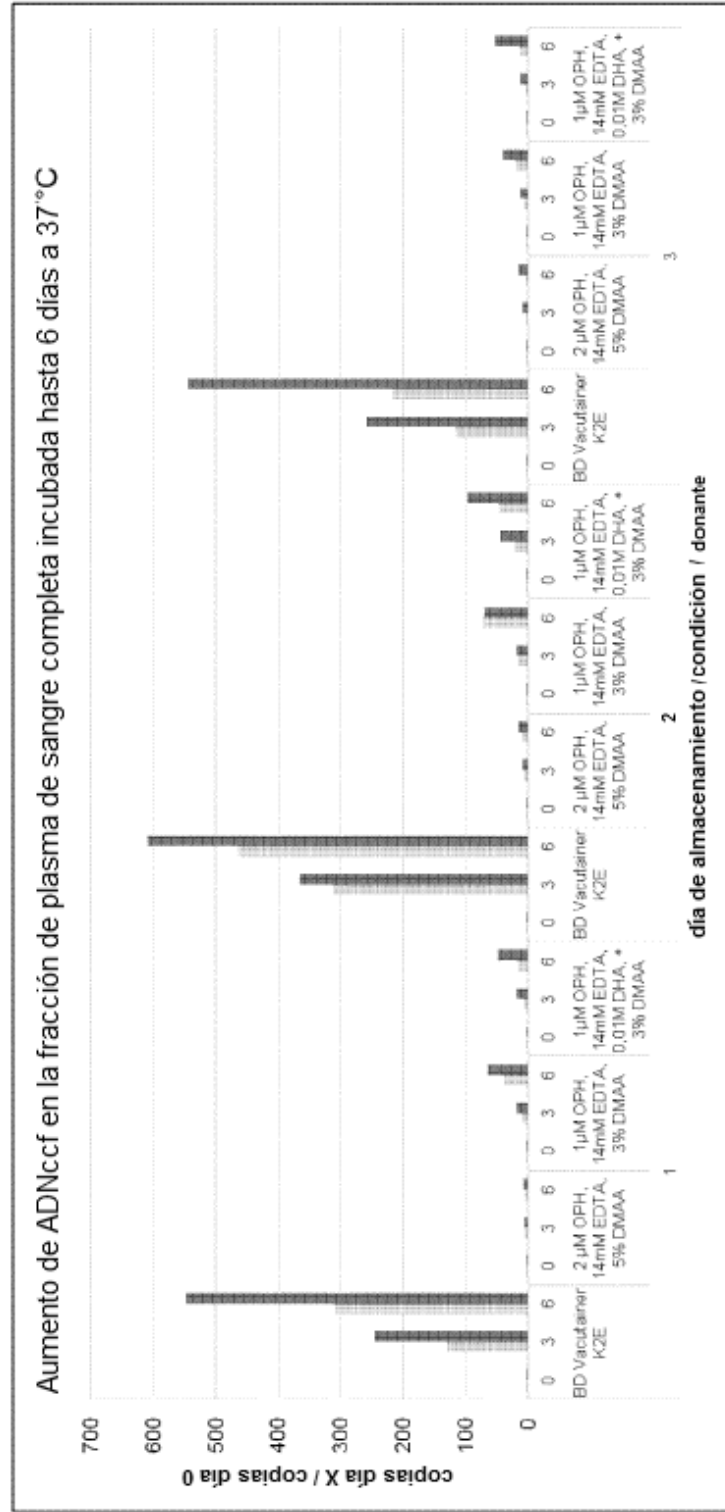


Figura 17

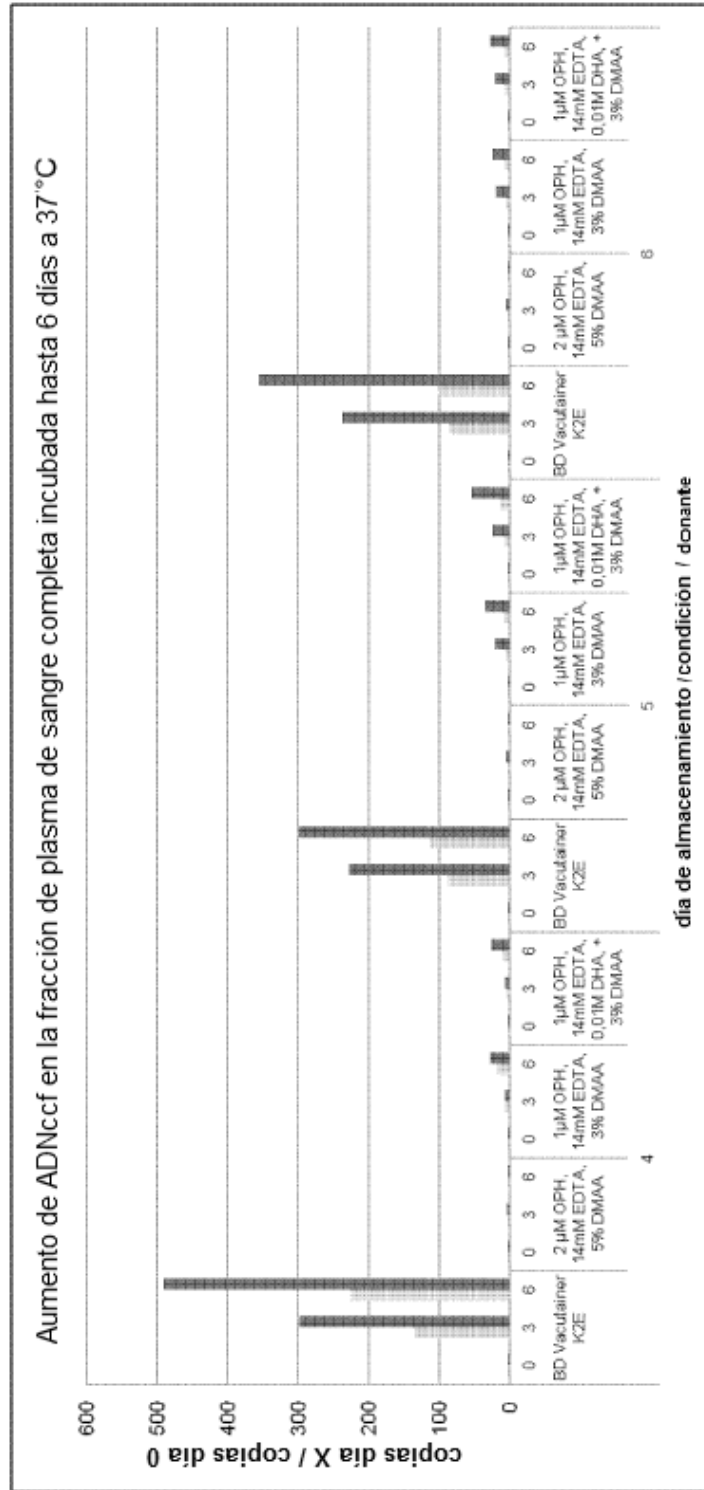


Figura 18

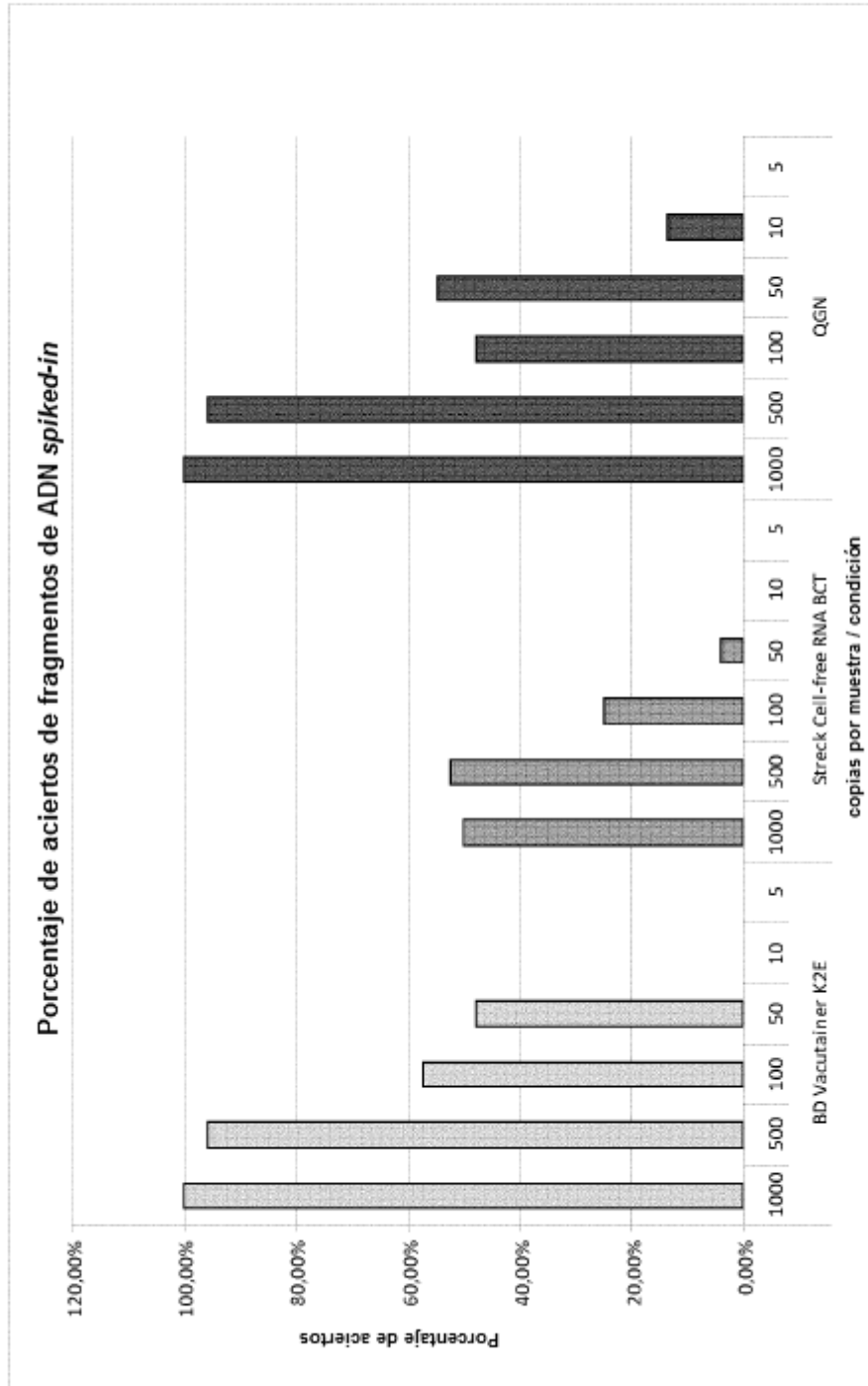


Figura 19

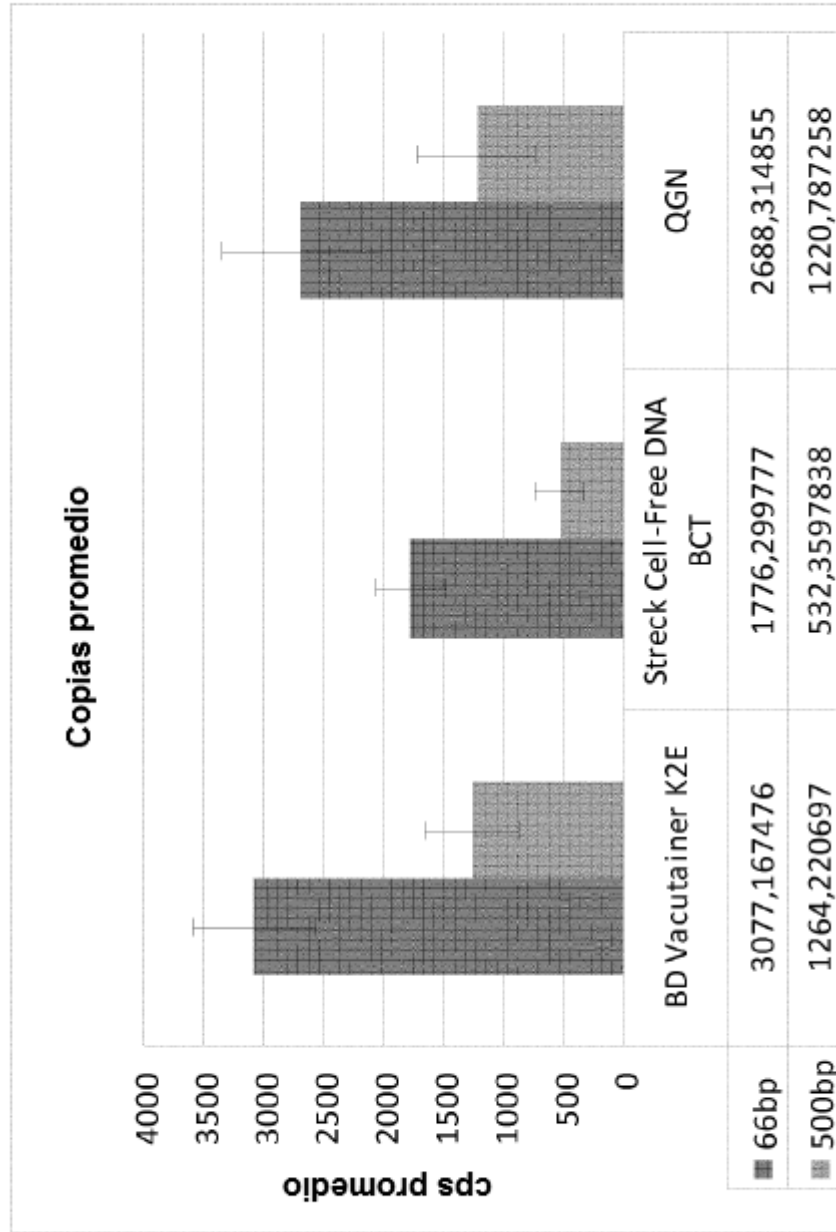


Figura 20

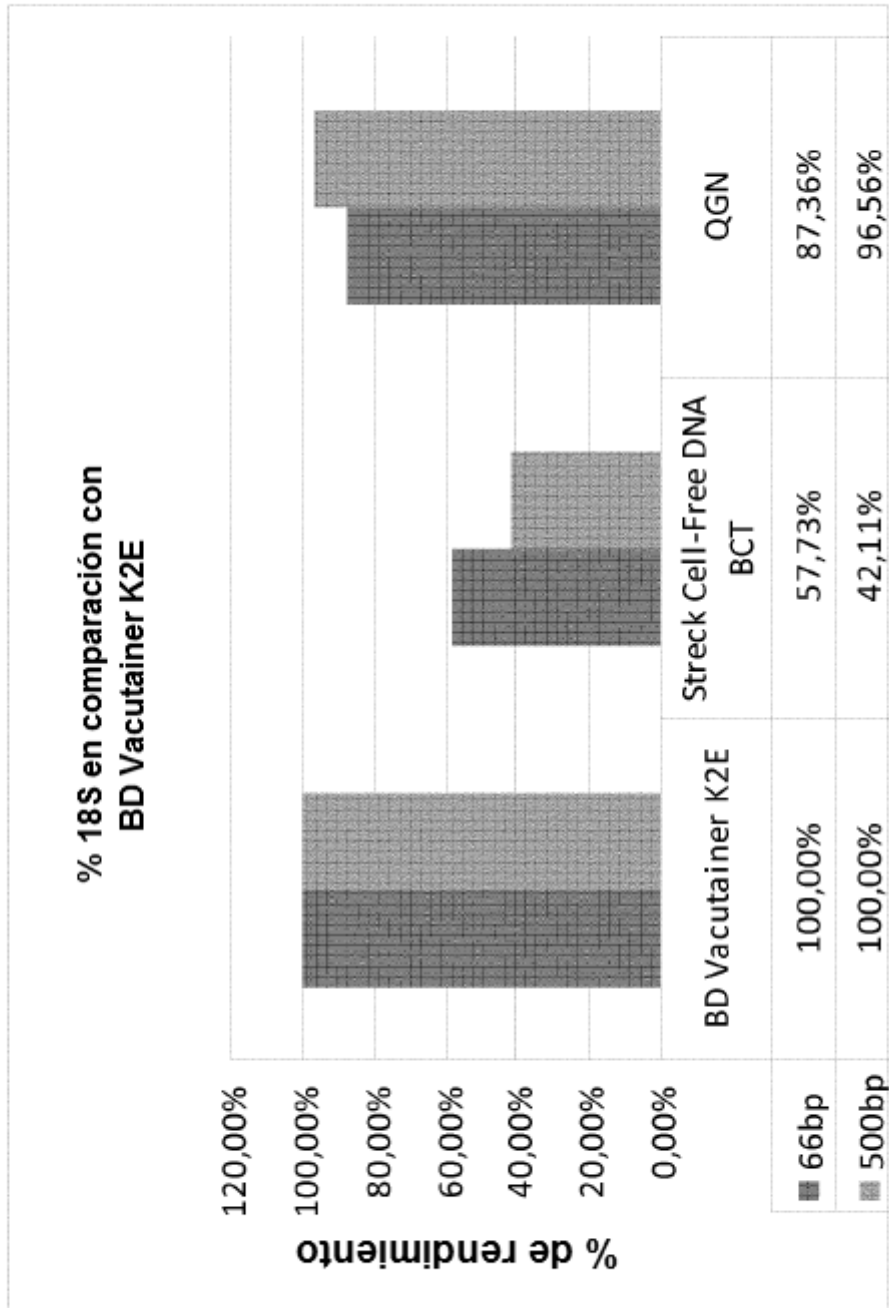


Figura 21

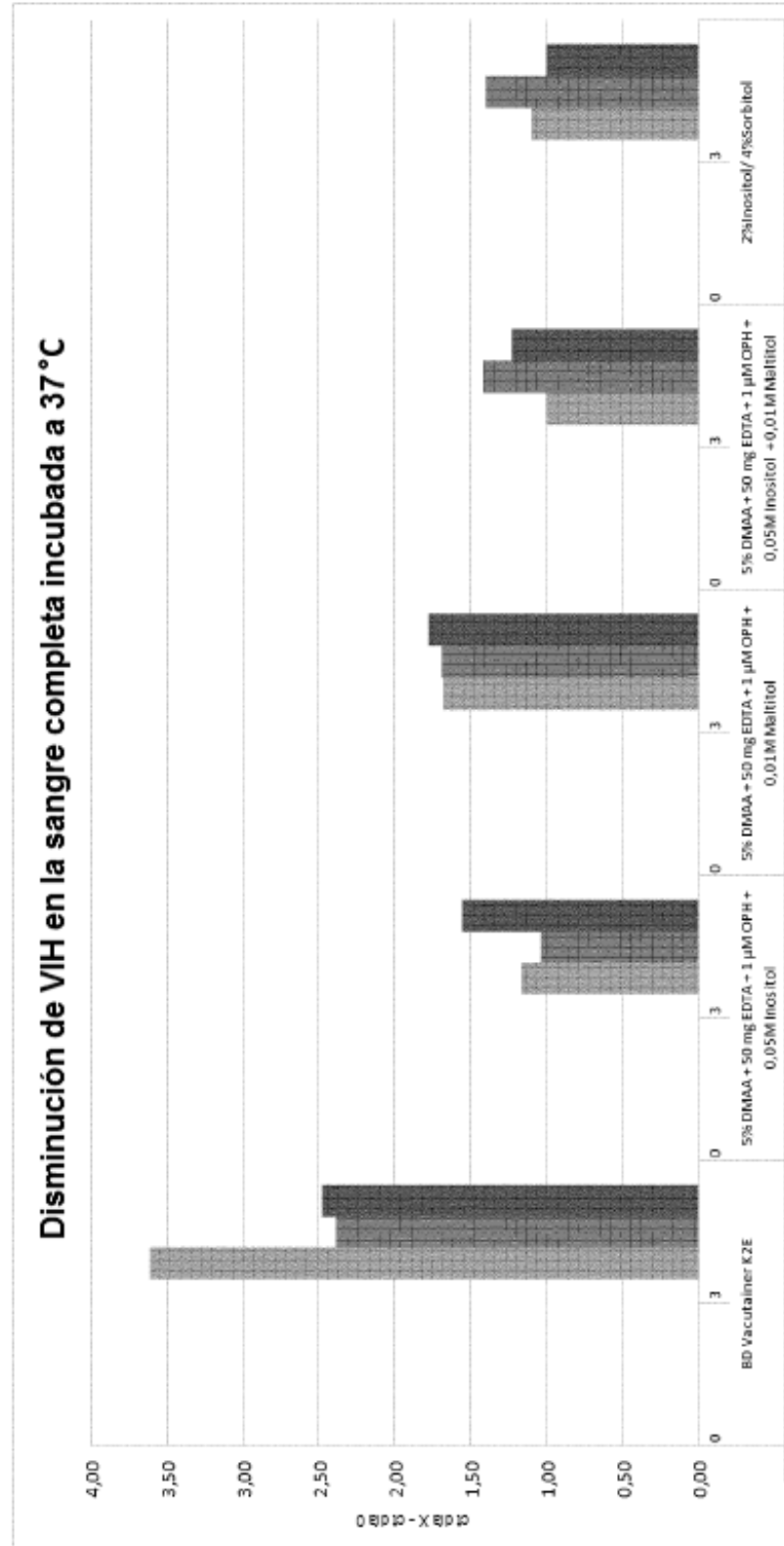


Figura 22

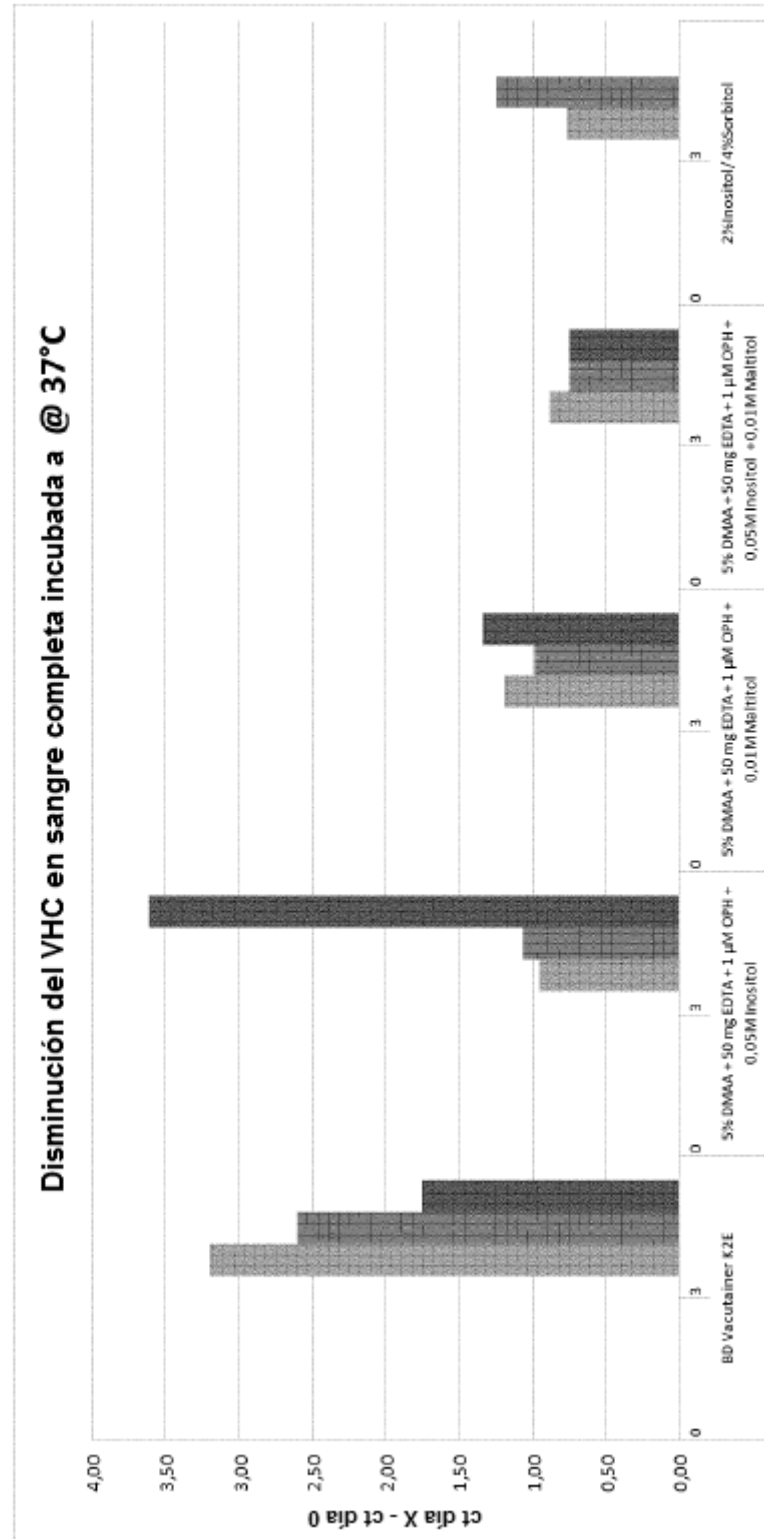


Figura 24

