



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114457068 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 14

(21) 申请号 202210141849.5

(22) 申请日 2016.11.21

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114457068 A

(43) 申请公布日 2022.05.10

(30) 优先权数据
15195656.2 2015.11.20 EP
16163863.0 2016.04.05 EP

(62) 分案原申请数据
201680067712.2 2016.11.21

(73) 专利权人 普瑞阿那利提克斯有限公司
地址 瑞士洪布雷希蒂孔

(72) 发明人 丹尼尔·格勒尔兹
安德烈埃·由立乌斯

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219
专利代理师 杨青 郭翠霞

(51) Int.Cl.
C12N 15/10 (2006.01)
C12Q 1/6806 (2018.01)

(56) 对比文件
CN 104080905 A, 2014.10.01
US 2015056604 A1, 2015.02.26
WO 2014146781 A1, 2014.09.25
审查员 靳春鹏

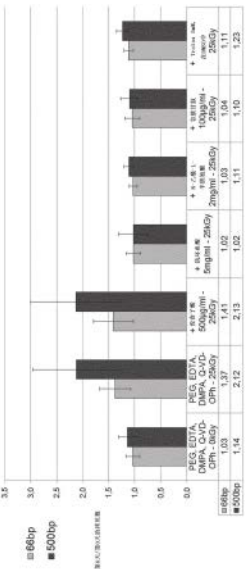
权利要求书5页 说明书72页
序列表2页 附图11页

(54) 发明名称

用于稳定细胞外核酸的已灭菌组合物的制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种制备用于稳定细胞外核酸的已灭菌组合物的制备方法。还提供了可灭菌组合物,其中已灭菌形式的该组合物适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体。还提供了其他有用的方法、装置、试剂盒和用途。在此描述的其他可灭菌和已灭菌组合物也适合于稳定细胞内核酸(例如细胞内DNA如基因组DNA和/或细胞内RNA)和细胞特征,例如细胞表面蛋白和/或细胞形态。



1. 一种适用于采集含细胞生物样品的可灭菌采集装置, 其中所述采集装置包含已灭菌的液体组合物, 所述已灭菌的液体组合物适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体, 其中所述组合物包含:

i. 至少一种半胱天冬酶抑制剂, 和

ii. 至少一种选自硫醇、水溶性维生素、和水溶性维生素E衍生物的化合物, 所述硫醇是N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽, 其中所述水溶性维生素是抗坏血酸或维生素B6, 并且其中所述水溶性维生素E衍生物是trolox;

其中所述组合物以液体形式辐照灭菌。

2. 根据权利要求1所述的采集装置, 其中所述采集装置是已灭菌的。

3. 根据权利要求2所述的采集装置, 其中所述采集装置和其中包含的所述组合物一起灭菌。

4. 根据权利要求1所述的采集装置, 其中:

a) 通过电离辐照来辐照所述组合物和/或所述采集装置以进行灭菌;

b) 通过 γ 辐照、电子束辐照或X射线来辐照所述组合物和/或所述采集装置以进行灭菌;

c) 以5kGy至35kGy、6kGy至30kGy、7kGy至26kGy、约8kGy至约25kGy、或约8kGy至约15kGy的辐照剂量来辐照所述组合物和/或所述采集装置以进行灭菌, 其中表述“约”表示给定值 $\pm 10\%$;

d) 以5kGy至35kGy、6kGy至30kGy、7kGy至26kGy、约8kGy至约25kGy、或约8kGy至约15kGy的辐照剂量通过 γ 辐照来辐照所述组合物和/或所述采集装置以进行灭菌, 其中表述“约”表示给定值 $\pm 10\%$; 和/或

e) 辐照灭菌导致所述组合物的无菌性保证水平(SAL) 为 10^{-6} 或更低。

5. 根据权利要求1所述的采集装置, 其中所述组合物具有以下特征中的一个或多个:

a) 所述组合物是含水的;

b) 所述组合物具有酸性pH;

c) 所述组合物具有pH 4.0至7.0、pH 4.1至6.9、pH 4.2至6.8、pH 4.3至6.6、pH 4.4至6.3、pH 4.5至6.0、或pH 4.5至5.5;

d) 所述组合物是经缓冲的; 和/或

e) 所述组合物以含水形式辐照灭菌。

6. 根据权利要求1所述的采集装置, 其中所述谷胱甘肽是还原形式。

7. 根据权利要求1所述的采集装置, 其中所述组合物包含浓度小于20mg/ml、15mg/ml或更低、10mg/ml或更低、7mg/ml或更低、3mg/ml或更低、或1.5mg/ml或更低的至少一种选自硫醇、抗坏血酸、维生素B6和trolox的化合物, 所述硫醇是N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽。

8. 根据权利要求1所述的采集装置, 其中所述组合物包含:

i. 至少一种半胱天冬酶抑制剂, 和

ii. 下列中的至少一种

aa) N-乙酰半胱氨酸, 浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml;

ab) 谷胱甘肽,浓度为0.03mg/ml至10mg/ml、0.075mg/ml至5mg/ml、0.15mg/ml至4mg/ml、或0.4mg/ml至1.3mg/ml;

ac) 抗坏血酸,浓度为小于20mg/ml、0.1mg/ml至15mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml、或2mg/ml至11mg/ml;

ad) 维生素B6,浓度为0.1mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至14mg/ml、0.1mg/ml至11mg/ml、0.2mg/ml至7.5mg/ml、或0.2mg/ml至2mg/ml;

ae) trolox,浓度为0.5mg/ml至5mg/ml、0.75mg/ml至3mg/ml、0.9mg/ml至2mg/ml、或1mg/ml至1.4mg/ml。

9. 根据权利要求8所述的采集装置,其中所述谷胱甘肽是还原形式。

10. 根据权利要求8所述的采集装置,其中所述组合物以含水形式灭菌。

11. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置,其中所述半胱天冬酶抑制剂具有以下特征中的一个或多个:

a) 所述半胱天冬酶抑制剂是泛半胱天冬酶抑制剂;

b) 所述半胱天冬酶抑制剂包含修饰的半胱天冬酶特异性肽;

c) 所述半胱天冬酶抑制剂包含修饰的半胱天冬酶特异性肽,所述肽用O-苯氧基(OPh)基团和/或用谷氨酰胺(Q)基团进行修饰;

d) 所述半胱天冬酶抑制剂包含修饰的半胱天冬酶特异性肽,所述肽用O-苯氧基(OPh)基团在羧基端进行修饰和/或用谷氨酰胺(Q)基团在N-端进行修饰;

e) 所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh、Boc-D-(OMe)-FMK和Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK;

f) 所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh和Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK;和/或

g) 所述半胱天冬酶抑制剂是Q-VD-OPh。

12. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置,其中所述组合物还包含以下的一种或多种:

a) 抗凝剂和/或螯合剂;

b) 作为稳定剂的聚(氧乙烯)聚合物;和/或

c) 至少一种伯、仲或叔酰胺。

13. 根据权利要求12所述的采集装置,其中所述抗凝剂和/或螯合剂是EDTA。

14. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置,其中所述组合物还包含至少一种聚(氧乙烯)聚合物。

15. 根据权利要求14所述的采集装置,其中所述组合物具有以下特征中的一个或多个:

a) 所述聚(氧乙烯)聚合物是聚乙二醇;

b) 所述组合物包含聚(氧乙烯)聚合物,其是分子量为至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物;

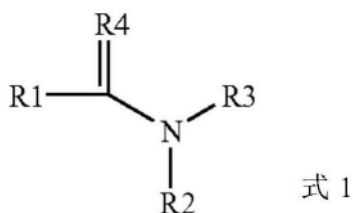
c) 所述组合物包含至少一种分子量为1000或更低或者分子量位于选自100至800、150至700、200至600和200至500的范围内的低分子量聚(氧乙烯)聚合物;

d) 所述组合物包含作为分子量为至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物的聚(氧乙烯)聚合物,以及至少一种其它聚(氧乙烯)聚合物,所述其它聚(氧乙烯)聚合物是分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物;和/或

e) 所述组合物包含作为高分子量聚(氧乙烯)聚合物的聚(氧乙烯)聚合物和作为低分子量聚(氧乙烯)聚合物的聚(氧乙烯)聚合物,其中所述高分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量位于选自1500-50000、1500至40000、2000至30000、2500至25000、3000至20000、3500至15000和4000至12500的范围内,和/或其中所述低分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量为1000或更低或者分子量位于选自100至1000、150至800、150至700、200至600和200至500的范围内。

16. 根据权利要求15所述的采集装置,其中所述聚(氧乙烯)聚合物是未取代的聚乙二醇。

17. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置,其中所述组合物包含至少一种式1的化合物



其中R1是氢基团或烷基基团,R2和R3是相同或不同的并选自氢基团和碳链长度为1-20个原子的以直链或支链方式排列的烃基团,并且R4是氧、硫或硒基团。

18. 根据权利要求17所述的采集装置,其中R1是C1-C5烷基基团、C1-C4烷基基团、C1-C3烷基基团或C1-C2烷基基团。

19. 根据权利要求17所述的采集装置,其中所述烃基团是烷基基团,和/或其中R4是氧。

20. 根据权利要求17所述的采集装置,其中所述式1的化合物是伯、仲或叔酰胺。

21. 根据权利要求17所述的采集装置,其中所述式1的化合物是伯、仲或叔羧酸酰胺。

22. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置,其中所述组合物包含N,N-二烷基丙酰胺和/或丁酰胺。

23. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置,其中所述组合物包含N,N-二甲基丙酰胺。

24. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置,其中所述已灭菌组合物具有以下特征中的一个或多个:

- i) 它适用于稳定含细胞生物样品中的细胞外核酸群体;
- ii) 它适用于稳定含细胞样品中包含的细胞内核酸;
- iii) 由于所述稳定化,它减少含细胞样品中存在的核酸的降解;
- iv) 它适用于稳定所述样品中所含的细胞中的转录组和/或转录物水平;
- v) 它不诱导有核细胞或总细胞的裂解;和/或
- vi) 它不包含诱导核酸-核酸、蛋白质-核酸和/或蛋白质-蛋白质交联的交联剂并且不涉及甲醛释放剂的使用;

和/或其中所述已灭菌组合物具有以下稳定化特征:

- a) 所述稳定化允许从被稳定的含细胞样品中分离细胞;
- b) 所述含细胞样品是血液样品,并且其中所述血液样品中含有的细胞被稳定化;
- c) 所述含细胞样品是血液样品,并且其中白细胞被稳定化;

- d) 保留细胞的形态;
- e) 保留有核细胞的形态;
- f) 所述样品是血液样品并且所含的淋巴细胞和/或单核细胞被稳定化;
- g) 保留细胞表面表位;和/或
- h) 保留细胞表面蛋白。

25. 根据权利要求24所述的采集装置, 其中在特征ii) 中, 稳定细胞内RNA和/或细胞内DNA。

26. 根据权利要求24所述的采集装置, 其中在特征iv) 中, 所述组合物适用于稳定一种或多种选自c-fos、IL-1 β 、IL-8和p53的标志物基因的转录物水平, 在稳定化后被稳定至少12h、至少24h或至少48h。

27. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置, 其中:

- a) 所述采集装置是适用于采集血液、血浆和/或血清的采集装置;
- b) 所述采集装置适用于从患者抽取血液;和/或
- c) 所述含细胞生物样品是血液样品。

28. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置, 其中所述组合物以有效提供待采集在所述采集装置中的样品量的稳定化的量被包含在所述采集装置中。

29. 根据权利要求28所述的采集装置, 其中所述稳定化组合物是液体并以选自以下的体积比与所述生物样品接触: 10:1至1:20、5:1至1:15、1:1至1:10、1:4至1:10、1:5至1:9、和约1:6至1:8, 其中表述“约”表示给定值 $\pm 10\%$ 。

30. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置, 其中所述采集装置被抽真空。

31. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置, 其中所述采集装置预填充有限定量的液体形式的稳定化组合物, 并提供有限定的真空并用隔膜密封。

32. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置, 其中所述采集装置具有开放的顶部、底部和在其间延伸的限定腔室的侧壁, 其中所述组合物包含在所述腔室中。

33. 根据权利要求32所述的采集装置, 其中所述组合物是含水液体。

34. 根据权利要求32所述的采集装置, 其中所述采集装置是管, 所述底部是封闭的底部, 所述采集装置还在所述开放的顶部中包含封闭件, 并且所述腔室处于降低的压力下。

35. 根据权利要求34所述的采集装置, 其中所述封闭件能够用针或套管刺穿, 并且所述降低的压力被选择成将特定体积的液体样品抽入所述腔室中。

36. 根据权利要求34所述的采集装置, 其中所述腔室处于降低的压力下, 所述降低的压力被选择成将特定体积的液体样品抽入所述腔室中, 并且所述组合物是液体并被布置在所述腔室中, 使得所述稳定化组合物与所述特定体积的含细胞样品的体积比选自10:1至1:20、5:1至1:15、1:1至1:10、1:5至1:10、和1:6至1:8。

37. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置, 其中所述采集装置已灭菌并包含已灭菌组合物, 其中所述已灭菌采集装置可通过用于生产适用于稳定化生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物的方法获得, 所述方法包括:

- a) 在所述采集装置中提供如权利要求1或权利要求5至26中的任一项所定义的组合物; 并且
- b) 辐照所述组合物以进行灭菌。

38. 根据权利要求1至10中的任一项所述的采集装置, 其中所述组合物与含细胞生物样品混合。

39. 根据权利要求38所述的采集装置, 其中所述含细胞生物样品是全血和/或包含细胞外核酸。

40. 一种方法, 所述方法包括将生物样品直接从患者采集到根据权利要求1至39中的任一项所述的采集装置的腔室中的步骤。

41. 根据权利要求40所述的方法, 其中从所述患者抽取所述生物样品, 并且所述生物样品是血液。

用于稳定细胞外核酸的已灭菌组合物的制备方法

[0001] 本申请为国际申请日2016年11月21日、国际申请号PCT/EP2016/078330于2018年5月18日进入中国国家阶段、申请号201680067712.2、发明名称“用于稳定细胞外核酸的已灭菌组合物的制备方法”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明提供了一种制备适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物的方法。还提供了可灭菌组合物,其中已灭菌形式的所述组合物适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体。还提供了其他有用的方法、装置、试剂盒和用途。具体地说,提供了适用于稳定含细胞样品例如血液样品的可灭菌和已灭菌组合物。在实施方式中,这些组合物适用于稳定细胞内核酸(例如细胞内DNA和/或细胞内RNA)、细胞表面特征和/或细胞形态。

背景技术

[0003] 已在血液、血浆、血清和其他体液中鉴定到细胞外核酸。在相应样品中发现的细胞外核酸,因为它们受到保护而免受核酸酶影响(例如,因为它们以蛋白脂质复合物的形式分泌、与蛋白质结合或包含在囊泡中)这一事实,因此具有一定程度的抗降解性。在许多医学状况、恶性肿瘤和感染过程中存在细胞外核酸例如DNA和/或RNA水平的改变例如升高是令人感兴趣的,尤其是对于筛查、诊断、预后、监测疾病进展、鉴定潜在治疗靶点和监测治疗反应而言。此外,母体血液中胎儿DNA/RNA的升高正被用于确定例如性别认同、评估染色体异常、和监测妊娠相关并发症。因此,细胞外核酸特别可用于非侵入性诊断和预后并且可在许多应用领域例如非侵入性产前基因检测、肿瘤学、移植医学或许多其他疾病中用作例如诊断标志物,并因此具有诊断相关性(例如胎儿或肿瘤来源的核酸)。然而,细胞外核酸也见于健康的人类中。除源自于例如肿瘤细胞或胎儿的哺乳动物细胞外核酸外,含细胞样品也可以包含未包含在细胞中的其他目标核酸。重要的非限制性实例是病原体核酸例如病毒核酸。在运输和处理期间保留含细胞样品中、例如特别是血液样品中的病毒核酸的完整性,对于后续的分析和病毒载量监测也是至关重要的。在例如以下文献中描述了细胞外核酸的常见应用和分析方法:WO 97/035589,WO 97/34015,Swarup等人,FEBS Letters 581(2007) 795-799,Fleischhacker Ann.N.Y.Acad.Sci.1075:40-49(2006),Fleischhacker和Schmidt,Biochimica et Biophysica Acta 1775(2007) 191-232,Hromadnikova等人(2006) DNA and Cell biology,第25卷,第11期,第635-640页;Fan等人(2010) Clinical Chemistry 56:8。

[0004] 尽管细胞外核酸的分析令人高度感兴趣,但由于若干原因,发现它们的分析是困难的。样品中通常只包含低浓度的细胞外核酸。此外,细胞外核酸经常作为大小为500nt、300nt(当指示大小并由此指示链长时,术语“nt”在DNA的情况下也包括“bp”)或甚至更小(循环核小体)的片段循环。对于血浆中的循环的无细胞DNA(ccfDNA)而言,平均长度经常仅为约140-170bp。另外,被认为是为了诊断目的而鉴定的实际靶细胞外核酸通常也只占总细胞外核酸当中的一小部分。关于ccfDNA,取决于例如妊娠状态或肿瘤分级,每ml血液通常只

存在数千个可扩增的拷贝。具体来说,肿瘤特异性DNA片段非常罕见,并且所包含的浓度经常比“正常”细胞外核酸背景低1000-倍。这种低浓度对于样品的稳定化和随后从被稳定的样品中分离细胞外核酸提出了挑战。此外,除了在血清以及可能还有血浆中发生的降解之外,与循环的无细胞核酸(cfNA)例如来自肿瘤的或胎儿来源的cfNA的分析相关的主要问题是:在样品采集后,细胞外DNA(和RNA)可能被来自损伤或衰变细胞的遗传物质稀释。采集样品后,在离体温育期间,通常在样品采集后相对短的时间内,由于细胞破碎而使细胞核酸从样品中含有的细胞中释放。一旦细胞裂解开始,裂解的细胞就释放出大量额外的核酸,所述核酸变成与所述细胞外核酸混合,而回收细胞外核酸进行测试就变得越来越困难。

[0005] 如果样品包含大量细胞,正如例如用全血样品的情况那样,则样品采集后细胞内核酸的释放特别是个问题。关于血液样品,特别是白细胞的裂解是个问题,因为它们除了释放RNA之外还释放大量的基因组DNA。红细胞不含基因组DNA。因此,全血中循环核酸的稳定化必须包括稳定血细胞的机制,以便在稳定化期间防止细胞外核酸群体被细胞基因组DNA以及还有RNA污染。具体来说,细胞外核酸、特别是稀有的靶细胞外核酸的稀释是个问题,并且必须予以防止。现有技术中讨论了这些问题(参见例如,Chiu等人(2001),*Clinical Chemistry* 47:9 1607-1613;Fan等人(2010)和US 2010/0184069)。此外,可用的细胞外核酸的量和可回收性可在一段时间后由于降解而显著减少。

[0006] 为了解决这些问题以及对有效稳定细胞外核酸的需求,已经开发了许多用于稳定细胞外核酸群体的方法、组合物和装置。

[0007] US 7,332,277、US 7,442,506和US 2011/0111410中描述了使用甲醛或甲醛释放剂进行稳定化。在例如US 2010/0184069和US 2010/0209930中也描述了稳定血液样品的方法。然而,使用甲醛或甲醛释放物质有缺点。甲醛是有毒的。而且,这些稳定剂可以化学修饰生物分子如蛋白质和核酸。因此它们可以通过诱导核酸分子之间或蛋白质与核酸之间的交联来危害细胞外核酸分离的效能。这尤其可减少可扩增或可得到以用于诊断的核酸分子的数量。由于血浆中ccfDNA的数量限于每毫升血液仅数千个拷贝,这是一个巨大的缺点。

[0008] 除了细胞外核酸之外,其他核酸也是诊断领域中的重要生物标志物。例如,基因组的转录物(特别是mRNA和miRNA)谱被广泛用作分子体外诊断中的生物标志物,并提供对正常的生物和病理过程的了解,以期预测疾病后果并指示个体化治疗过程。因此,核酸、特别是RNA的谱型分析在疾病诊断、预后和在用于生物标志物发现的临床试验中是重要的。然而,如果在待分析样品的稳定化方面没有预防措施,则样品在运输和储存期间将经历变化,这可能严重改变靶分子的表达谱(参见例如Rainen等人,2002;Baechler等人,2004)。因此,基因表达、特别是血细胞基因表达对样品的离体处理是敏感的。如果由于处理样品而改变了表达谱,则后续分析不能反映样品的原始状况,因此也不反映患者的原始状况,而是测量了样品处理、运输和储存期间产生的人工谱。因此,需要优化的稳定化方法来稳定表达谱,从而允许可靠的分析。特别是,需要稳定血液样品以便允许分析血细胞基因表达谱。

[0009] 许多用于稳定表达谱的已知技术是基于细胞裂解的(例如PAXgene血RNA管,US 6,617,170,US 7,270,953,Kruhoffer等人,2007)。各种方法的缺点是该稳定化导致细胞完全裂解。细胞的破坏导致细胞内核酸变得与细胞外核酸混合,这妨碍了对这两个核酸群体进行单独的分析。而且,细胞的破坏使得任何细胞分选或细胞富集分别不可能进行细胞分析。因此,对于某些应用,需要样品采集和稳定化系统,其保留细胞的形态,同时稳定核酸。为了

解决对同时细胞稳定化和核酸稳定化的需求,开发了基于甲醛释放剂的使用的稳定化体系(例如无细胞RNA BCT(采血管(blood collection tube))),US 2011/0111410)。然而,从相应被稳定的样品分离核酸非常困难,因为所使用的甲醛释放剂干扰后续的核酸分离过程。因此,会出现如上文对于细胞外核酸所述的类似的问题。

[0010] 为了克服上述缺点,开发了不需要使用交联剂例如甲醛或甲醛释放剂的稳定化技术。这些稳定化技术被公开于例如WO 2013/045457 A1、WO 2014/146780 A1、WO 2014/146782 A1、PCT/EP2015/055699(WO 2015/140218)、WO 2014/049022 A1、WO 2013/045458 A1、WO 2013/045432 A1和WO 2014/146781 A1中。所描述的技术特别使用半胱天冬酶(caspase)抑制剂,其单独或与其他稳定化化合物例如伯、仲或者叔酰胺组合使用,以稳定细胞外核酸群体。这些稳定化技术在样品采集和稳定化后减少了细胞外核酸群体被细胞内核酸、特别是被基因组DNA污染。WO 2014/049022、WO 2014/146780、WO 2014/146782和WO 2014/146781也教导了适合稳定细胞内核酸(特别是基因表达谱)的相应稳定化组合物。此外,这些申请公开了稳定化组合物,其允许被稳定的细胞的后续分析,例如细胞表面特征和/或细胞形态。此外,WO 2008/145710描述了用于稳定含细胞样品例如血液或组织样品的方法,所述方法稳定例如细胞、转录组、基因组和蛋白质组。虽然这些申请提供了确保例如细胞外核酸的稳定化的有效的稳定化技术,但它们没有具体解决所公开的稳定化组合物和装置的灭菌和无菌性方面。

[0011] 然而,以已灭菌形式使用这些稳定化组合物提供了几个优点。例如,可以增加所述组合物的保质期。并且,当将样品与已灭菌组合物接触以进行稳定化时,在某些应用中可以进一步增加被稳定的样品的储存时间。如果从例如人或动物采集生物样品并将所述生物样品直接与稳定化组合物接触的话,则适用于稳定细胞外核酸群体的已灭菌组合物是特别有用的。这是例如稳定化组合物被包含在样品采集装置、例如采血装置或管中的情况,所述样品采集装置也可受到法规要求。这同样适用于使用也稳定细胞内核酸的稳定化组合物的情况。

[0012] 因此,在大量应用中,从安全和/或法规角度来看,提供无菌稳定化组合物提供了显著的优点。然而,虽然希望将用于稳定细胞外和/或细胞内核酸的组合物以及包含这样的组合物的装置进行灭菌,但是灭菌过程造成几个问题。一方面,灭菌应在足够严格的条件下进行,以确保所得组合物或装置的无菌性。另一方面,应用这样的灭菌条件可能干扰稳定化组合物的相关性质。例如,据发现,常用的灭菌方法可显著降低所述组合物在稳定生物样品的细胞外核酸群体中的稳定化性能。另外,实施灭菌的措施理想地不应干扰更下游的应用,例如被稳定的细胞外核酸的分离和分离的核酸的处理或分析。这同样适用于使用也稳定细胞内核酸的稳定化组合物的情况。

[0013] 在可用的灭菌方法中,辐照灭菌提供了优点。辐照在工作时没有过多的热量,并且不会将待灭菌的产品暴露于有毒化学品。通常用于灭菌目的的辐照形式通常包括电离辐照形式,例如 γ 辐照、X射线和电子束辐照。例如,根据ISO规范(特别是ISO11137-1:2006、ISO11137-2:2012,ISO11137-3:2006)通过 γ 辐照灭菌可作为一次性医疗装置的生产过程、例如样品采集装置如采血管的生产过程的一部分进行。通过电子束辐照对一次性医疗装置进行灭菌同样受ISO标准1137和13409的管控。

[0014] 对于通过辐照、例如 γ 辐照进行灭菌来说,应选择足够高的辐照剂量以确保期望

的无菌性水平。并且,在用于样品采集的组合物和装置、例如特别是采血装置或管的生产中,应当满足相关ISO标准中陈述的关于无菌性和辐照剂量的最低要求。通常,医疗应用的灭菌必须保证单个单元在经过灭菌后不是无菌的概率不高于 10^{-6} 。 10^{-6} 的微生物存活概率产生1,000,000分之一的“无菌性保证水平(sterility assurance level)”(SAL)——灭菌后在物品上出现一个单一活微生物的几率。 γ 辐照的执行和保障SAL为 10^{-6} 的最小剂量的确定是通过几个ISO标准被标准化的(ISO11137-1:2006,ISO11137-2:2012,ISO11137-3:2006)。达到 10^{-6} 的SAL所需的最小剂量取决于产品的初始生物负荷。

[0015] 还经常希望用超过最小灭菌剂量的辐照剂量进行灭菌。例如,从辐照设备的工作流程的实际观点来看,在给定的较高剂量下辐照往往更为方便。并且,选择超过最小灭菌剂量的辐照剂量可以提供重要的优点,因为取决于所应用的剂量,可以进行简化的微生物学检验来证实产品无菌性。取决于所应用的辐照剂量,产品可以在减少或甚至没有微生物学检验下就被标记为无菌。例如,对样品采集装置例如采血管进行灭菌的一个相关下边界是用约7.8kGy或8kGy剂量辐照。剂量 $\geq 8\text{kGy}$ 一般足以消除低生物负荷水平。在生物负荷水平升高的情况下,可能需要更高的剂量来实现无菌性。如果所述管用15kGy的剂量辐照,经常可以应用简化的微生物学检验来确定和证实无菌性。一般而言,25kGy可实现无菌性保证水平(SAL)为 10^{-6} 的无菌性。即使生物负荷水平升高,也能够以降低的无菌性概率(例如,SAL为 10^{-5} 或 10^{-4})实现生物负荷减少。因此,可以不需要进行微生物学检验就能够将用25kGy的(同等高)剂量辐照过的采血管标记为无菌,这是一个显著的优点。

[0016] 然而,辐照例如 γ 辐照、X射线或电子束辐照导致自由基的形成。一旦应用的辐照剂量高于最大辐照剂量,则辐照期间形成的自由基可导致已灭菌产品的活性成分效力减退或丧失。最大辐照剂量可定义为不影响产品完整性的灭菌剂量,即不会导致降解效应的最大剂量。例如,因为已知的降解问题, γ 辐照未被广泛用于含水药品和有蛋白质组分的药物(STERIS® Isomedix Services, TechTip 01:09/07, Rev 1)。

[0017] 在产品的初始生物负荷决定了最小灭菌剂量高于最大可耐受剂量的情况下,已经提出了几个措施。这些措施包括改进生产过程,例如使用清洁和已灭菌的组分和设备、过滤等。然而,实施这些措施是高成本的并且使用已无菌组分可能并不总是可行的。虽然这些措施可能有助于实现较低的最小灭菌剂量,但仍然需要最终产品的灭菌。所记载的用于减轻降解作用的其他策略包括降温或控温辐照、调整剂量率、使水含量最小化或以干燥或固体形式辐照、以及使用充当辐射防护剂的添加剂。然而,这些策经常不能以通用的方式应用,并且适当策略的实施也取决于待灭菌的产品或组合物。

[0018] 因此,众所周知的问题是,实现灭菌、特别是辐照灭菌所需的条件可能导致稳定化组合物的活性组分降解,并因此可能降低或甚至消除所述稳定化组合物在灭菌后稳定细胞外核酸群体的能力。这同样适用于当使用也稳定细胞内核酸和/或细胞特征的稳定化组合物时的情况;在灭菌后必须被保持所述稳定化性质。

[0019] 本发明人发现,用于稳定样品中细胞外核酸群体的含有半胱天冬酶抑制剂的组合物在辐照灭菌后显示出显著降低的性能。当然,灭菌过程对稳定化组合物的稳定化性质的这种负面影响是不希望的。虽然可以采取措来降低给定产品所需的最小灭菌剂量,但这些措施通常不足以确保最终产品本身的无菌性,并且降低最小灭菌剂量并不能解决由于例如上述原因而希望应用超过最大灭菌剂量的辐照剂量的情况。上面讨论的用于减轻降解作

用的策略许多是针对药物产品开发的,并且因为适用不同的考虑因素而不易转移到核酸相关的应用上来。

[0020] 对适用于稳定生物样品中的核酸群体的组合物进行灭菌的适当策略需要确保在灭菌后具有适当的稳定化功能并且理想地不干扰更下游的过程例如核酸分离和/或分析。灭菌后适当的稳定化性能与经常以低浓度包含在生物样品中的细胞外核酸群体尤为相关。

[0021] 因此,本发明的目的是克服上述现有技术的至少一个缺点。特别地,本发明的目的是提供一种制备已灭菌组合物的方法,所述已灭菌组合物包含半胱天冬酶抑制剂并且在灭菌后也适用于稳定生物样品例如含细胞生物样品的细胞外核酸群体。本发明的另一个目的是提供相应的可灭菌组合物,其中已灭菌形式的所述组合物适用于稳定这样的生物样品的细胞外核酸群体。本发明的另一个目的是在辐照灭菌期间防止所述稳定化组合物中含有一种或多种活性成分例如半胱天冬酶抑制剂的降解,以维持所述已灭菌组合物中的稳定化特征。因此维持所述已灭菌组合物中的可灭菌组成的一种或多种稳定化特征是期望的并因此是本发明目的。另一个目的是为含有半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物提供相应的灭菌技术,所述稳定化组合物稳定例如i) 生物样品内包含的细胞,ii) 包含的细胞内核酸(例如DNA和/或RNA,特别对于稳定所含细胞的基因表达谱来说)和/或iii) 细胞相关蛋白例如细胞表面蛋白。

发明内容

[0022] 本发明是基于令人惊奇的发现,即,如果在适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的含有半胱天冬酶抑制剂的组合物(在本文中也称为“稳定化组合物”)中包含至少一种选自硫醇(例如优选N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物,则可有效地保护所述稳定化组合物免受辐照灭菌期间的降解作用。令人惊奇的是,这些化合物中的一种或多种可被包含在所述稳定化组合物中用于降解防护,却不会不利地影响所述细胞外核酸稳定化性质。并且,将这些化合物中的至少一种包含在所述稳定化组合物中有利地不干扰下游应用,例如被稳定的细胞外核酸群体的分离和/或分析。这些化合物因此分别保护组合物中的至少一种活性组分例如特别是半胱天冬酶抑制剂免于在辐照灭菌期间降解,并且在灭菌后有效保留所述稳定化组合物的稳定化特征。

[0023] 本发明的方法显著促进了适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的组合物通过辐照例如 γ 辐照、电子束辐照或X射线进行灭菌。它允许制备已灭菌的稳定化组合物,所述稳定化组合物基于包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂和任选的一种或多种其他稳定剂的稳定化组合物,所述其它稳定剂公开于WO 2013/045457 A1、WO 2014/146780 A1、WO 2014/146782 A1、PCT/EP2015/055699、WO 2014/049022 A1、WO 2013/045458 A1和WO 2014/146781 A1中,这些申请在此通过引用并入。正如所论述的,这些申请还公开了适用于稳定所含细胞的细胞内核酸例如细胞内DNA(例如基因组DNA)和/或细胞内RNA(特别是基因表达谱)的稳定化组合物。本发明方法特别允许制备一种已灭菌的稳定化组合物,其基于包含在PCT/EP2015/055699中公开的一种或多种半胱天冬酶抑制剂的高效且有利的稳定化组合物,PCT/EP2015/055699通过引用并入本文。所述稳定化组合物可以方便地直接在样品采集装置中制备和/或灭菌。

[0024] 通过使用选自硫醇、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物,还有可能制

备可通过辐照灭菌的液体组合物。液体形式、特别是含水形式的已灭菌组合物是高度有利的。在例如血液样品的稳定化中,使用已灭菌的液体或含水稳定化组合物允许例如减少溶血,从而改善稳定化效果。利用本发明的方法,有可能制备和灭菌液体稳定化组合物,包括具有温和pH、特别是弱酸性pH的那些液体稳定化组合物。可以在不必恢复到强碱性或强酸性pH条件下进行灭菌。弱酸性pH有助于避免或减少灭菌期间所述稳定化组合物中出现沉淀物。

[0025] 本发明还允许制备与未灭菌的稳定化组合物和与在没有前述化合物下灭菌的灭菌组合物相比保质期延长的已灭菌的稳定化组合物。

[0026] 根据第一方面,本发明因此提供了一种制造适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物的方法,所述方法包括:

[0027] a) 提供一种组合物,其包含:

[0028] i. 至少一种半胱天冬酶抑制剂,和

[0029] ii. 至少一种选自硫醇(优选N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物;以及

[0030] b) 辐照所述组合物进行灭菌。

[0031] 根据第二方面,本发明提供了一种用于稳定含细胞生物样品中包含的细胞外核酸群体的方法,所述方法包括:

[0032] a) i) 根据本发明第一方面的方法获得适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物,或ii) 获得已灭菌形式的根据本发明第六方面所述的组合物;以及

[0033] b) 使所述含细胞生物样品与所述已灭菌组合物接触以进行稳定化。

[0034] 根据第三方面,本发明提供了一种从被稳定的含细胞生物样品中分离细胞外核酸的方法,所述方法包括:

[0035] a) 根据本发明第二方面的方法稳定所述含细胞生物样品;以及

[0036] b) 分离细胞外核酸。

[0037] 根据第四方面,本发明提供了一种用于处理和/或分析细胞外核酸的方法,所述方法包括:

[0038] a) 根据本发明第三方面的方法从被稳定的含细胞生物样品中分离细胞外核酸;以及

[0039] b) 对分离的细胞外核酸进行处理和/或分析。

[0040] 根据第五方面,本发明提供了一种用于制造可灭菌组合物的方法,其中已灭菌形式的所述组合物适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体,所述方法包括:

[0041] a) 制备一种组合物,其包含:

[0042] i. 至少一种半胱天冬酶抑制剂,和

[0043] ii. 至少一种选自硫醇(优选N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物;以及任选地

[0044] b) 将所述组合物灭菌。

[0045] 这种方法可用于制备根据第六方面所述的组合物。

[0046] 根据第六方面,本发明提供了一种可灭菌组合物,其中已灭菌形式的所述组合物适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体,其中所述组合物是如根据本发明第一方面所述的

方法的步骤a)中提供的组合物。它包含i.至少一种半胱天冬酶抑制剂,和ii.至少一种选自硫醇(优选N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物。根据第六方面所述的可灭菌组合物可以是如根据本发明第一方面所述的方法的步骤a)中提供的组合物,它在实施方式中可以被灭菌以提供已灭菌组合物。

[0047] 根据第七方面,本发明提供了一种样品采集装置,例如容器,优选样品采集管,其包含根据本发明第六方面所述的可灭菌组合物。

[0048] 根据第八方面,本发明提供了一种试剂盒,其包含根据本发明第六方面所述的组合物或根据本发明第七方面所述的样品采集装置。

[0049] 根据第九方面,本发明涉及至少一种选自硫醇(优选N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物在辐照灭菌期间保护适用于稳定生物样品或其组分的细胞外核酸群体的组合物中的应用。

[0050] 在下面的详细描述中提供了本发明的其他方面。

[0051] 本技术允许以便利、可靠、安全和成本有效的方式制备适用于稳定生物样品中的细胞外核酸群体的可灭菌和已灭菌组合物。这样的稳定化组合物对于从人或动物中采集生物样品例如血液样品的应用来说是特别有利的。在这些应用中,从安全性观点来看,所述稳定化组合物和装置的无菌性是高度优选的。此外,根据本发明,可以使用无毒化合物作为辐照防护剂,这同样有助于安全性。在实施方式中,所提供的可灭菌和已灭菌组合物也适用于稳定细胞内核酸(例如细胞内DNA,如基因组DNA和/或细胞内RNA),特别是所含细胞的基因表达谱。在其它实施方式中,所提供的可灭菌和已灭菌组合物适合于稳定含细胞样品,使得可以例如基于细胞表面特征和/或细胞形态来分析被稳定的样品中所含的细胞。

[0052] 特别地,本发明允许制备包含半胱天冬酶抑制剂的经辐照灭菌的液体稳定化组合物。液体通过辐照进行灭菌常常干扰待灭菌的产品的活性。本发明人发现,将至少一种选自硫醇(优选N-乙酰半胱氨酸和/或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物纳入包含半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物中,保护了所述稳定化组合物免于辐照诱导的降解,同时不干扰所述稳定化组合物的稳定化性质。这提供了维持所述稳定化特征的已灭菌组合物。在使用其它用作自由基清除剂的化合物时没有看到这些有利效果。已发现N-乙酰半胱氨酸、抗坏血酸和还原形式的谷胱甘肽是特别有效的。

[0053] 提供液体无菌组合物是特别有用的。例如,它允许所述稳定化组合物和液体生物样品例如全血或血液来源的样品如血浆或血清的快速且均匀的混合。而且,使用液体组合物、优选含水的组合物减少了溶血。

[0054] 此外,根据本发明的方法对稳定化组合物进行灭菌可以进一步改善所述稳定化组合物的储存性质,并且与未灭菌的组合物和在没有硫醇(优选N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物中的至少一种的情况下灭菌的组合物相比,允许保质期延长。这是另一个优点。

[0055] 根据以下描述和权利要求书,本申请的其他目的、特征、优点和方面对本领域技术人员而言将变得显而易见。然而,应该理解,以下描述、权利要求和具体的实施例,在指示本申请的优选实施方式的同时,只给出作为说明。通过阅读以下内容,在所公开的发明的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员而言将变得显而易见。

附图说明

[0056] 图1: γ 辐照对含有半胱天冬酶抑制剂的组合物的稳定化性质的效应。该效应是基于血浆中的ccfDNA水平进行分析的。该图显示储存后在未被稳定的EDTA血液样品(左)和被稳定的血液样品中18S rDNA基因的66bp和500bp片段的拷贝数的平均变化和标准差(x倍变化),所述被稳定的血液样品被抽入包含含有半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物的管(非无菌或用不同剂量的 γ 辐照灭菌)中。

[0057] 图2:用溶于DMSO中的不同浓度的纯半胱天冬酶抑制剂制备的HPLC标准曲线。

[0058] 图3:将N-乙酰半胱氨酸、抗坏血酸、没食子酸和鞣酸添加到所述含有半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物中。在储存后,被稳定的血液中18S rDNA基因的66bp和500bp片段的拷贝数的平均变化(x倍变化)。

[0059] 图4:向所述含有半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物添加不同浓度的抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽(还原型)。在储存后,被稳定的血液中18S rDNA基因的66bp和500bp片段的拷贝数的平均变化(x倍变化)。

[0060] 图5:向所述含有半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物添加不同浓度的抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽。在储存后,被稳定的血液中18S rDNA基因的500bp片段的平均总拷贝数。

[0061] 图6:向所述含有半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物添加抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽的不同组合。在储存后,被稳定的血液中18S rDNA基因的66bp和500bp片段的拷贝数的平均变化(x倍变化)。

[0062] 图7: γ 辐照对添加清除剂的被稳定的血液中ccfDNA水平的效应。在储存后,用经辐照的稳定化试剂稳定的血液样品中18S rDNA基因的66bp和500bp片段的拷贝数的平均变化(x倍变化)。

[0063] 图8A, 8B:向所述稳定化试剂添加N-乙酰半胱氨酸以及剂量逐渐增加的 γ 辐照对血浆中ccfDNA水平的效应。在未被稳定的EDTA血液中(左)和在抽入含有0.5、1.0、2.0和4.0mg/ml N-乙酰半胱氨酸、非无菌或用不同剂量的 γ 辐照灭菌的管中的被稳定的血液样品中18S rDNA基因的66bp和500bp片段的拷贝数的平均变化和标准差(x倍变化);在所述被稳定的样品储存之后测定ccfDNA水平。

[0064] 图9:来自8个供体并在室温下储存5天的血液样品中18S rDNA基因的500bp片段的平均总拷贝数。利用含有(左边的条)或不含(左起第三条)维生素B6作为清除剂的稳定化试剂稳定血液样品。这些稳定化试剂已被灭菌。作为对照,将有维生素B6但尚未灭菌的稳定化试剂(左起第二条)和未被稳定的EDTA血(左起第四条)包括在内。

[0065] 图10:来自6个供体并在室温下储存5天的血液样品中18S rDNA基因的500bp片段的平均总拷贝数。用包含不同半胱天冬酶抑制剂的稳定化试剂稳定血液样品。左边的条:包含半胱天冬酶抑制剂Boc-D-(OMe)-FMK的稳定化试剂(未灭菌);左起第二条:包含半胱天冬酶抑制剂Boc-D-(OMe)-FMK和N-乙酰半胱氨酸作为清除剂的稳定化试剂(已灭菌);左起第三条:包含半胱天冬酶抑制剂Z-VAD(OMe)-FMK的稳定化试剂(未灭菌);左起第四条:包含半胱天冬酶抑制剂Z-VAD(OMe)-FMK和N-乙酰半胱氨酸作为清除剂的稳定化试剂(已灭菌);左起第五条:PAXgene血ccfDNA管;左起第六条:未被稳定的EDTA血。

具体实施方式

[0066] 如上所述,提供适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体、特别是ccfDNA群体的已灭菌组合物由于多种原因是所希望的。这对于额外适用于稳定细胞内核酸例如细胞内DNA(例如基因组DNA)和/或细胞内RNA并且特别适用于稳定基因表达谱的稳定化组合物同样适用。不希望受到理论的束缚,本发明人已经发现通过辐照、特别是 γ 辐照灭菌可以导致所述稳定化试剂的主要组分——半胱天冬酶抑制剂的降解。根据辐照能量和时间,在灭菌过程期间高达95%的半胱天冬酶抑制剂可能会降解。在灭菌期间所述半胱天冬酶抑制剂的降解导致所述稳定化组合物的性能损失。在实施例,当使用这样已灭菌的稳定化组合物来稳定血液样品时,通过基因组DNA从血细胞中的释放增加可以看到这种效应。因此,需要一种方法来防止包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物内的一种或多种活性成分、例如特别是所述半胱天冬酶抑制剂在涉及辐照的灭菌过程期间、特别在通过 γ 辐照灭菌期间变得基本上降解。

[0067] 本发明人已经发现,只有某些化合物能够在涉及辐照的灭菌、例如通过 γ 辐照灭菌期间保护所述稳定化组合物。这些化合物包括硫醇,例如特别是N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽(特别是还原形式)、水溶性维生素例如抗坏血酸、和维生素E或其衍生物,例如trolox。在所测试的众多候选化合物中,仅发现这些化合物保护所述稳定化组合物中包含的半胱天冬酶抑制剂(和任选的其他降解敏感性组分)免于在辐照灭菌期间的基本上降解,却不会不利地影响所述稳定化组合物的稳定化性能。在稳定血液样品中ccfDNA群体的实施例中显示了这种有利的效应组合。为了易于参考,有时在本文中硫醇例如特别是N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽(特别是还原形式)、水溶性维生素例如抗坏血酸、和维生素E或其衍生物例如trolox统称为“本发明的化合物”。

[0068] 其他化合物,例如已知在例如药物组合物中充当自由基清除剂的鞣酸和没食子酸,被发现在灭菌后干扰适用于稳定细胞外核酸群体的含有半胱天冬酶抑制剂的组合物的稳定化性能。因此,所获得的包含这些化合物的已灭菌组合物不适合于稳定样品中的细胞外核酸群体。并且,没有发现本领域中描述的充当自由基清除剂的其他化合物例如甘露糖醇、异丙醇或吐温-80介导了对适用于稳定生物样品中包含的细胞外核酸群体的含半胱天冬酶抑制剂的组合物的适当辐射防护。

[0069] 如实施例所证明的,由本发明的化合物介导的保护效应是在广泛范围的灭菌条件和宽范围的辐照剂量下获得的。有利地,所述化合物在弱酸性pH下有效,并且在灭菌期间有利地不需要恢复到强酸性或碱性的pH条件。

[0070] 因此,本发明人已经发现,通过在灭菌之前将至少一种本发明的化合物包含在适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的含有半胱天冬酶抑制剂的组合物中,可以有效地保护所述组合物免于在灭菌期间降解。令人惊奇的是有可能添加这些保护性化合物而不会实质性地不利影响所述组合物在稳定细胞外核酸群体中的性能。所得到的已灭菌组合物也允许下游应用,例如分离和/或分析所含的被稳定的细胞外核酸群体。这对于额外适用于稳定细胞内核酸例如细胞内DNA和/或细胞内RNA并且特别适用于稳定基因表达谱的含半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物也同样适用。本发明由此对本领域做出了重要贡献。

[0071] 本发明中使用的最优选的化合物是N-乙酰半胱氨酸。它在灭菌例如通过辐照、特别是 γ 辐照灭菌期间提供了优异的保护。同时,如实施例中所证明的,它不干扰所述稳定化

性质,特别是所述稳定化组合物在ccfDNA稳定化方面的性能。

[0072] A.已灭菌组合物的制造方法

[0073] 上述发现可以有利地应用于制造适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体并包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂的已灭菌组合物的方法中。

[0074] 因此,根据第一方面,本发明提供了一种制造适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物的方法,所述方法包括:

[0075] a) 提供一种组合物,其包含:

[0076] i. 至少一种半胱天冬酶抑制剂,和

[0077] ii. 至少一种选自硫醇(优选是N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物;以及

[0078] b) 辐照所述组合物进行灭菌。

[0079] 如本文中所用的术语“细胞外核酸”特别是指不包含在细胞中的核酸。相应的细胞外核酸也经常被称为无细胞核酸(cell-free nucleic acid)。这些术语在本文中作为同义词使用。因此,细胞外核酸通常存在于样品内细胞的外部或许多细胞的外部。术语“细胞外核酸”是指例如细胞外RNA以及细胞外DNA。在生物样品例如体液的无细胞级分(相应部分)中发现的典型的细胞外核酸的实例包括但不限于哺乳动物细胞外核酸例如细胞外肿瘤相关或肿瘤来源的DNA和/或RNA、其他细胞外疾病相关DNA和/或RNA、表观遗传修饰的DNA、胎儿DNA和/或RNA、小干扰RNA例如miRNA和siRNA、以及由例如原核生物(例如细菌)、病毒、真核寄生虫或真菌释放到所述细胞外核酸群体中的非哺乳动物细胞外核酸例如病毒核酸、病原体核酸。所述细胞外核酸群体通常包含一定量的从损伤或濒死细胞释放的细胞内核酸。例如,血液中存在的细胞外核酸群体通常包含从损伤或濒死细胞释放的细胞内球蛋白mRNA。这是体内发生的一个自然过程。细胞外核酸群体中存在的这种细胞内核酸甚至可以在后续核酸检测方法中用作对照的目的。前述申请中描述的稳定化方法特别降低了在采集含细胞样品之后由于离体处理样品而使包含在细胞外核酸群体中的细胞内核酸例如基因组DNA的量显著增加的风险。因此,减少并且甚至可以防止由于离体处理而引起的细胞外核酸群体的改变。在本文中,指的是从循环体液例如血液或淋巴液获得的作为循环的细胞外核酸或循环的无细胞核酸的细胞外核酸。用于本文中时,术语细胞外核酸特别可以指哺乳动物细胞外核酸。实例包括但不限于疾病相关或疾病来源的细胞外核酸,例如肿瘤相关或肿瘤来源的胞外核酸,由于炎症、坏死或受伤、特别是创伤而释放的细胞外核酸,与其他疾病相关和/或由于其他疾病而释放的细胞外核酸,或来源于胎儿的细胞外核酸。稳定ccfDNA并由此稳定ccfDNA群体是特别优选的。本文中描述的术语“细胞外核酸”也指从其他含细胞生物样品、特别是体液之外的生物样品获得的细胞外核酸。通常,样品包含多于一个种类或类型的细胞外核酸。

[0080] 如本文所用的术语“细胞外核酸群体”特别是指含细胞样品中包含的不同细胞外核酸的集合。含细胞样品通常包含特征性的并由此独特的细胞外核酸群体。因此,特定样品的细胞外核酸群体中包含的一种或多种细胞外核酸的类型、种类、比率和/或量可以是重要的样品特征。根据一个实施方式,所述细胞外核酸群体是指细胞外DNA,特别是无细胞的循环DNA。如上所述,重要的是稳定并由此基本上保留处于样品采集时的状态下的所述细胞外核酸群体,因为样品的细胞外核酸群体中包含的一种或多种细胞外核酸的组成和/或量可

以提供有价值的医疗、预后或诊断信息。因此,如果细胞外核酸群体谱在预定的稳定期内被有效地稳定,这是有利的。本文所述的稳定化技术减少了样品采集和稳定化后的污染,并因此减少了细胞外核酸群体被细胞内核酸、特别是被基因组DNA稀释。由此实现了基本上保留细胞外核酸群体。如实施例所示,在血液样品或来源于血液的样品的情况下,当使用如本文所述的包含半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物时,与未被稳定的样品或例如被EDTA稳定的相应样品相比,细胞外核酸群体(在此显示的是细胞外DNA群体)中关于所包含的细胞外核酸的量、质量和/或组成的变化、特别是可归因于基因组DNA释放增加的变化在所述稳定期内大幅减小。根据一个实施方式,在血液样品(例如用1.5mg EDTA/ml稳定的血液样品)或来源于血液的样品的情况下,与未被稳定的样品或例如被EDTA稳定的相应样品相比,从 T_0 (稳定化点)至稳定期结束(优选 T_0 后48小时、72小时或96小时)的基因组DNA增加减少了至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%。

[0081] 在实施方式中,所提供的已灭菌组合物还适用于稳定细胞内核酸,例如细胞内DNA(例如基因组DNA)和/或细胞内RNA。特别地,它可以适用于稳定所含细胞的基因表达谱,从而允许可靠的基因表达谱分析。通过稳定并由此保留所含细胞的基因转录谱,减少或甚至防止了在稳定期期间基因表达谱的变化。因此,提供的已灭菌的稳定化组合物允许如果需要的话分别分析被稳定的样品中的细胞外和细胞内核酸群体。

[0082] 在实施方式中,所述已灭菌的稳定化组合物也能够通过稳定生物样品中包含的细胞使它们保持基本上完整,从而分析所述被稳定的样品中包含的细胞。细胞性质例如细胞表面特征和/或细胞形态的稳定化是有利的。它允许分析以及分离所述被稳定的样品中包含的特定细胞,例如,血液样品中包含的血细胞或循环肿瘤细胞。

[0083] 所述生物样品可以是含细胞生物样品或疑似含有细胞的生物样品。所述生物样品可以选自体液和来源于体液的含细胞样品。实例包括但不限于全血、来源于血液的样品例如血浆或血清、血沉棕黄层(buffy coat)、尿液、痰液、泪液、淋巴液、羊水、汗液、汁液、脑脊液、腹水、乳汁、粪便、支气管灌洗液、唾液、羊水、鼻分泌物、阴道分泌物、精液、伤口分泌物、细胞培养物和拭子样品。根据一个实施方式,所述含细胞生物样品是体液、身体分泌物或身体排泄物,优选体液,最优选尿液、淋巴液、血液、血沉棕黄层、血浆或血清。特别地,所述含细胞生物样品可以是循环体液,例如血液或淋巴液。优选地,所述含细胞生物样品是血液样品,有时也称为全血。所述血液样品优选在稳定化之前未被稀释或分级。根据一个实施方式,所述血液样品是外周血。还优选所述生物样品可以是血浆或血清。根据一个实施方式,所述含细胞生物样品是从人获得的。所述含细胞生物样品在样品的细胞外部分中包含或疑似包含细胞外核酸。

[0084] 应该理解,在根据本发明第一方面所述的方法中,步骤a)中提供的并且在步骤b)中辐照的组合物尚未与待稳定的生物样品接触。原样的稳定化组合物(即没有生物样品的试剂)被辐照进行灭菌。因此,步骤a)中提供的并且在步骤b)中辐照的组合物尚未与生物样品接触,因而在步骤a)和b)中不包含生物样品。于是,步骤a)中提供的并且在步骤b)中辐照的组合物不包含细胞和/或细胞碎片。由此,步骤a)中提供的并且在步骤b)中辐照的组合物不包含体液和/或来源于体液的含细胞样品。

[0085] 现在将更详细地描述该方法。在这样做时,首先将描述所述方法的步骤a)和b)。当论述步骤a)时,重点将放在进一步描述根据步骤a)的特征ii所述的有利化合物。然后,将进

一步描述在步骤a)中提供的、例如制备的示例性组合物。

[0086] 步骤a)提供组合物

[0087] 步骤a)包括提供包含至少一种半胱天冬酶抑制剂和至少一种选自硫醇(优选N-乙酰半胱氨酸和/或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物的组合物。这样的组合物可以使用根据第五方面所述的方法产生并由此制备。

[0088] 所提供的含有半胱天冬酶抑制剂的组合物适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体,特别是ccfDNA。可以额外包含在所述组合物中以提高稳定效应的其他添加剂是技术人员已知的并且也在本文中描述。

[0089] 步骤a)中提供的组合物的形式没有特别限制。例如,所述组合物可以固体形式提供。如果需要,所述组合物可以冻干形式提供。在以固体形式提供、例如制备所述组合物的情况下,它可以在进行方法步骤b)之前被改性从而提供液体组合物。例如,可以在辐照之前将所述固体组合物溶解在液体中以便为辐照步骤b)提供液体组合物,其优选是含水组合物。

[0090] 优选地,在步骤a)中提供的组合物为液体形式。优选地,所述组合物以含水形式制备。例如,所述组合物的组分可以与合适的溶剂接触、优选混合,以产生液体组合物。所述液体组合物优选是含水组合物。水可以用作溶剂。

[0091] 如本文所用,以“液体形式”提供或制备可特别意指提供或制备液体组合物。所述液体组合物可以是仅有单相的均匀混合物,但液体组合物包含固体组分例如沉淀物也在本发明的范围内。如本文所用,以“含水形式”提供或制备可特别意指提供或制备含水液体组合物。“含水”组合物包含水。根据一个实施方式,“含水”组合物包含水作为主要成分(%v/v)。

[0092] 不希望受理论束缚,当用于稳定生物样品中的细胞外核酸群体时,液体特别是含水组合物的制备提供了若干优点。液体组合物允许例如与待稳定的包含或疑似包含细胞外核酸的液体样品快速而方便的混合。液体样品的实例是血液样品、血浆样品和血清样品。并且,当稳定血液样品时,制备含有水的稳定化组合物是特别优选的,因为这种实施方式显著减少溶血。于是,制备含有水的稳定化组合物在所述稳定化组合物随后用于稳定血液样品时提供了优点。

[0093] 步骤a)中制备的组合物的组分可以被包含、相应地可以被溶解在溶剂例如水或缓冲液中,所述缓冲液例如包含生物缓冲剂如MOPS、TRIS、PBS等。此外,所述稳定化组合物的组分可以被溶解在极性非质子溶剂例如二甲基亚砜(DMSO)中,或者所述稳定化组合物可以包含极性非质子溶剂例如二甲基亚砜(DMSO)。还发现,DMSO支持由本发明化合物赋予的在灭菌期间对所述稳定化组合物的保护,特别是当与维生素E或其衍生物例如trolox组合使用时。

[0094] 利用本发明的方法,有可能在涉及辐照的灭菌过程期间保护所述稳定化组合物中所含的半胱天冬酶抑制剂。在温和的pH条件下这也是有利的。不需要恢复到强酸性或强碱性pH条件。所述至少一种选自硫醇(优选是N-乙酰半胱氨酸和/或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物在温和的pH条件下是有活性的。这包括使用抗坏血酸进行保护。使用温和的pH条件例如弱酸性条件是有利的,因为它特别好地防止所述稳定化试剂的单一组分在较低的温度下沉淀。从而,也可能甚至更加迅速地与液体样品混合,这有助

于减少溶血并由此改善稳定效应。优选地,所述组合物具有弱酸性pH。

[0095] 根据一个实施方式,步骤a)中提供的稳定化组合物具有选自以下的pH:pH 4.0至7.0、pH 4.1至6.9、pH 4.2至6.8、pH 4.3至6.6、pH 4.4至6.3、pH 4.5至6.0、或pH 4.5至5.5。

[0096] 根据一个实施方式,将所述组合物提供在样品采集装置中,或者在进行辐照步骤b)之前将所述组合物填充到样品采集装置中。所述样品采集装置可以是根据本发明的第七方面所述的装置。所述样品采集装置适用于涉及辐照的灭菌。

[0097] 特征i,至少一种半胱天冬酶半抑制剂

[0098] 步骤a)中提供的稳定化组合物包含至少一种半胱天冬酶抑制剂。

[0099] 所述半胱天冬酶抑制剂可以是如WO 2013/045457 A1或WO 2013/045458 A1中所述的半胱天冬酶抑制剂。其中公开的半胱天冬酶抑制剂通过引用并入本文。如这些现有技术文献中所描述的,半胱天冬酶抑制剂单独地以及与其他稳定剂组合地高效稳定生物样品例如血液样品的细胞外核酸群体(例如细胞外DNA)。

[0100] 优选地,所述半胱天冬酶抑制剂是可穿透细胞的。半胱天冬酶基因家族的成员在凋亡中发挥重要作用。已利用各个半胱天冬酶的底物偏好性或特异性来开发成功竞争半胱天冬酶结合的肽。通过将半胱天冬酶特异性肽与例如醛、腈或酮化合物偶联,有可能产生可逆或不可逆的半胱天冬酶活化抑制剂。例如,氟甲基酮(FMK)衍生的肽例如Z-VAD-FMK充当有效的不可逆抑制剂而不会添加细胞毒性效应。在N-端和O-甲基侧链上具有苄氧基羰基基团(BOC)的合成的抑制剂表现出细胞穿透性提高。其它合适的半胱天冬酶抑制剂被合成为在C-端具有苄氧基基团。一个实例是Q-VD-OPh,它是一种可穿透细胞的、不可逆的广谱半胱天冬酶抑制剂,它在防止细胞凋亡并由此支持稳定化方面比半胱天冬酶抑制剂Z-VAD-FMK甚至更有效。

[0101] 根据一个实施方式,所述半胱天冬酶抑制剂是泛半胱天冬酶抑制剂,并由此是广谱半胱天冬酶抑制剂。根据一个实施方式,所述半胱天冬酶抑制剂包含肽或蛋白质或由肽或蛋白质组成。根据一个实施方式,所述半胱天冬酶抑制剂包含修饰的半胱天冬酶特异性肽。优选地,用醛、腈或酮化合物对所述半胱天冬酶特异性肽进行修饰。根据一个实施方式,用O-苄氧基(OPh)或氟甲基酮(FMK)基团,优选在羧基端,修饰所述半胱天冬酶特异性肽。包含蛋白质或肽或由蛋白质或肽组成的合适的半胱天冬酶抑制剂、以及包含修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂公开于WO 2013/045457的表1中,并通过引用并入本文。该表提供了合适的半胱天冬酶抑制剂的实例。不希望受理论束缚,据信,本发明的化合物尤其对于保护包含肽的半胱天冬酶抑制剂,特别是作为用官能团修饰的肽的半胱天冬酶抑制剂来说是有活性的。本发明的化合物特别适合于保护用O-苄氧基(OPh)基团优选在羧基端修饰和/或用谷氨酰胺(Q)基团优选在N-端修饰的肽类半胱天冬酶抑制剂。这样的半胱天冬酶抑制剂的一个实例是Q-VD-OPh。

[0102] 根据一个实施方式,所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh、Z-VAD(OMe)-FMK和Boc-D-(OMe)-FMK。根据一个实施方式,所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh和Z-VAD(OMe)-FMK。在一个优选的实施方式中,作为半胱天冬酶的广谱抑制剂的Q-VD-OPh被用于稳定化。Q-VD-OPh是可穿透细胞的并且抑制由凋亡引起的细胞死亡。Q-VD-OPh即使在极高浓度下也对细胞没有毒性,并且包含与氨基酸缬氨酸和天冬氨酸缀合的羧基端苄氧基。它在

防止由以下三种主要凋亡途径介导的凋亡方面同等有效：半胱天冬酶-9和半胱天冬酶-3、半胱天冬酶-8和半胱天冬酶-10、以及半胱天冬酶-12(Caserta等人., 2003)。

[0103] 如实施例中所示,本发明的化合物在宽浓度范围内有效并且在辐照期间保护所述稳定化组合物中所含的半胱天冬酶抑制剂。在对本发明的保护性化合物测试的浓度范围内,在所述稳定化组合物中包含的宽范围的半胱天冬酶抑制剂浓度内均实现了保护,且赋予的保护程度在很大程度上与所测试的半胱天冬酶抑制剂浓度无关。

[0104] 所述稳定化组合物包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂,特别是包含修饰的半胱天冬酶特异性肽例如Q-VD-OPh的半胱天冬酶抑制剂,其量足以对所述生物样品中所含的细胞外核酸群体产生稳定效应。根据一个实施方式,所述稳定化组合物包含半胱天冬酶抑制剂,其浓度使得在所述稳定化组合物与预期体积的待稳定样品接触后产生半胱天冬酶抑制剂的终浓度为0.1 μ M至25 μ M、0.5 μ M至20 μ M、1 μ M至17 μ M、2 μ M至16 μ M,更优选为3 μ M至15 μ M。从实施例中可以看出,发现约5 μ M、约10 μ M和约15 μ M的终浓度是非常合适的。也如上所解释的,虽然这里所指的是在所述稳定化组合物与预期体积的待稳定样品接触之后产生半胱天冬酶抑制剂的终浓度的浓度,但应当理解,在根据本发明第一方面所述的方法中,步骤a)中提供的并且在步骤b)中辐照的组合物尚未与待稳定的生物样品接触。

[0105] 根据一个实施方式,所述稳定化组合物以及由此所述稳定化试剂包含选自以下浓度的半胱天冬酶抑制剂:0.35 μ g/ml至70 μ g/ml,0.7 μ g/ml至63 μ g/ml,1.74 μ g/ml至59 μ g/ml,10.5 μ g/ml至56 μ g/ml,或15 μ g/ml至50 μ g/ml,20 μ g/ml至45 μ g/ml,25 μ g/ml至40 μ g/ml,和30 μ g/ml至38 μ g/ml。所述浓度可以选自0.7 μ g/ml至45 μ g/ml和1.74 μ g/ml至40 μ g/ml。

[0106] 根据一个实施方式,所述稳定化组合物以及由此所述稳定化试剂包含选自以下浓度的半胱天冬酶抑制剂:0.68 μ M至136 μ M,1.36 μ M至122.5 μ M,3.38 μ M至114.72 μ M,20.4 μ M至109 μ M,或29.2 μ M至97.2 μ M,38.9 μ M至87.5 μ M,48.6 μ M至77.8 μ M,和58.3 μ M至74 μ M。所述浓度可以选自20.4 μ M至97.2 μ M和29.2 μ M至87.5 μ M。

[0107] 在包含稳定化组合物(试剂)和待稳定的生物样品的混合物中半胱天冬酶抑制剂的上述浓度以及所述稳定化组合物(试剂)本身适用于使用单一半胱天冬酶抑制剂以及使用半胱天冬酶抑制剂的组合。当使用泛半胱天冬酶抑制剂、特别是修饰的半胱天冬酶特异性肽例如Q-VD-OPh和/或Z-VAD(OMe)-FMK时,上述浓度特别合适。修饰的半胱天冬酶特异性肽的另一个实例是Boc-D-(OMe)-FMK。上述浓度例如适用于稳定血液样品。对于各个半胱天冬酶抑制剂和/或其它含细胞生物样品来说的合适浓度范围可以由技术人员确定,例如通过在实施例中描述的测试测定法中测试不同浓度的相应半胱天冬酶抑制剂来确定。

[0108] 特征ii,至少一种选自硫醇(优选N-乙酰半胱氨酸和/或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物

[0109] 步骤a)中提供的组合物额外包含至少一种选自硫醇(其优选为N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物。因此所述组合物可通过辐照(例如通过 γ 辐照)灭菌,其中已灭菌组合物基本上维持它的稳定化性质并因此维持性能。不希望受理论束缚,这些化合物有助于保护待辐照的稳定化组合物,尤其是其中包含的半胱天冬酶抑制剂。同时,这些化合物不干扰稳定效应,从而确保了所述组合物在稳定细胞外核酸群体、例如特别是ccfDNA中的功能性。令人惊奇的是本发明的化合物实现了这些平衡的效应。如实施例中所示,许多其它自由基清除剂不赋予针对辐照的保护和/或干扰所述组

合物的稳定化性能,因此是不合适的。

[0110] 所述稳定化组合物中包含的所述至少一种化合物可选自N-乙酰半胱氨酸,谷胱甘肽、优选还原形式的谷胱甘肽,抗坏血酸,B族维生素,和/或水溶性维生素E衍生物。所述稳定化组合物中包含的所述至少一种化合物可选自N-乙酰半胱氨酸,谷胱甘肽、优选还原形式的谷胱甘肽,抗坏血酸,和/或水溶性维生素E衍生物。优选地,所述至少一种化合物选自N-乙酰半胱氨酸,谷胱甘肽、优选还原形式的谷胱甘肽,抗坏血酸,和/或trolox。更优选地,所述至少一种化合物选自N-乙酰半胱氨酸,谷胱甘肽、优选还原形式的谷胱甘肽,维生素B6,和/或抗坏血酸。更优选地,所述至少一种化合物选自N-乙酰半胱氨酸,谷胱甘肽、优选还原形式的谷胱甘肽,和/或抗坏血酸。已经发现N-乙酰半胱氨酸和抗坏血酸特别有效,谷胱甘肽、特别是还原形式的谷胱甘肽也是如此。同样发现维生素B6是有用的。根据本发明最优选的是N-乙酰半胱氨酸。

[0111] 如实施例所示,本发明的化合物可以被包含在所述组合物中并且在宽浓度范围内有效。

[0112] 根据一个实施方式,所述稳定化组合物包含至少一种选自硫醇(其优选为N-乙酰半胱氨酸和/或谷胱甘肽(优选是还原形式))、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物,其浓度小于20mg/ml、优选15mg/ml或更低、10mg/ml或更低、12mg/ml或更低、7mg/ml或更低、3mg/ml或更低、1.5mg/ml或更低、或0.75mg/ml或更低。优选地,所述组合物包含至少0.05mg/ml、至少0.1mg/ml、至少0.2mg/ml或至少0.3mg/ml的所述至少一种化合物。根据一个实施方式,所述组合物以这些浓度包含至少一种选自N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽(优选还原形式)、抗坏血酸、B族维生素例如维生素B6、和trolox的化合物。根据一个实施方式,所述组合物以这些浓度包含至少一种选自N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽(优选还原形式)、抗坏血酸和trolox的化合物。

[0113] 本发明的所述至少一种化合物可以被包含的浓度要使得在辐照灭菌之前所述稳定化组合物中包含的半胱天冬酶抑制剂的至少15%、至少20%、至少35%或至少50%在灭菌后存在于所述稳定化组合物中。优选地,本发明的所述至少一种化合物可以被包含的浓度要使得在辐照灭菌之前所述稳定化组合物中包含的半胱天冬酶抑制剂的至少60%、至少70%、至少80%、或至少90%、更优选至少80%在灭菌后存在于所述稳定化组合物中。这可以例如使用HPLC分析按实施例中所做的那样来确定。如实施例所示,辐照后半胱天冬酶抑制剂的降解程度和仍以未降解形式存在的半胱天冬酶抑制剂的百分比取决于辐照剂量。在实施例中还示出了用给定辐照剂量辐照后实现期望百分比的剩余半胱天冬酶抑制剂的示例性化合物浓度。

[0114] 本发明的所述至少一种化合物可以按如下所述的浓度被包含,在所述浓度中它可以在如上定义的灭菌期间对半胱天冬酶抑制剂发挥保护效应,同时基本上不干扰所述稳定化组合物的稳定化性质。根据一个实施方式,包含本发明的保护性化合物的所述稳定化组合物的稳定效应是其它方面相同但不包含所述保护性化合物的组合物的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或100%。通过添加所述保护性化合物甚至可以提高稳定效应。例如,包含本发明的保护性化合物的所述稳定化组合物的稳定效应可以是其它方面相同但不包含所述保护性化合物的组合物的120%、115%、110%或105%。优选地,将包含本发明的保护性化合物的所述稳定化组合物和其它方面相同但不包含所述保护性化合

物的组合物以未灭菌或未辐照的形式相互比较。在实施例提供了用于确定有和没有目标化合物的稳定化组合物的稳定化性质的测试,并在其中的实验程序部分中进行了描述。样品中的细胞外核酸可以使用实时PCR测定法来定量并且所描述的随时间的拷贝数增加可以用于确定给定稳定化组合物的稳定效应。因此,在一个实施方式中,给定的稳定化组合物的稳定效应可以通过测定第0天在抽血后立刻和在室温下储存例如6天后的总ccfDNA的比率来确定,如实施例中所描述的。

[0115] 根据一个实施方式,本发明的所述至少一种化合物以如下所述的浓度被包含,在所述浓度中它可以在如上定义的灭菌期间对半胱天冬酶抑制剂发挥保护效应,而同时基本上不减少被稳定的样品中可检测的目标细胞外核酸的量。在一个实施方式中,当用包含所述保护性化合物的组合物稳定样品时,检测到在用其他方面相同但不包含所述保护性化合物的组合物稳定的样品中检测到的目标细胞外核酸的至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或100%。细胞外核酸的量可以例如使用实时PCR并测定绝对拷贝数来确定,如实施例中所示。

[0116] 还提供并包括了包含多于一种本发明化合物的组合物的制备。在这种情况下,所述组合物可以以上文所指示的浓度包含每种所含化合物。或者,上文所指示的浓度是指所述组合物中包含的本发明所有化合物的总浓度。单个化合物和化合物组合的合适浓度可以由技术人员按照本文中提供的技术信息来确定。如实施例所示,与使用单个化合物相比,组合本发明的化合物可以进一步改善灭菌期间所述稳定化组合物的保护。这种有利效应在高辐照剂量下趋于更明显,并且在使用相对低浓度的每种单个化合物时已经实现。在本文中特别考虑了实施例的图6和表7中描述的示例性组合和浓度以供使用。

[0117] 在最初以固体形式提供所述组合物的情况下,可以在辐照之前使组合物变成液体形式。所述液体组合物可以包含前述浓度的所述至少一种化合物。根据这种实施方式,所述固体组合物包含本发明的所述一种或多种化合物,其量足以在溶剂化后产生包含如上文和下文所述浓度的所述一种或多种化合物的液体组合物。

[0118] 现在将更详细地解释可被包含在所述组合物中用于保护的本发明的各个组分。

[0119] 根据一个实施方式,所提供的组合物例如在步骤a)中制备的组合物包含至少一种硫醇。如本文所用的“硫醇”特别可以是如在**Römp** Lexikon Chemie,1999年第十版,Georg Thieme Verlag Stuttgart,纽约中定义的硫醇。

[0120] 特别优选的硫醇是N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽。用于本发明目的的高度合适且非常优选的组分是N-乙酰半胱氨酸。如本文所用的“N-乙酰半胱氨酸”优选是“N-乙酰-L-半胱氨酸”。因此,如本文所用的“N-乙酰半胱氨酸”优选指示化合物“N-乙酰-L-半胱氨酸”。因此,当在本文中提“N-乙酰半胱氨酸”时,相应的公开内容也适用于“N-乙酰-L-半胱氨酸”,除非上下文另有规定。每当提到“N-乙酰半胱氨酸”时,优选N-乙酰-L-半胱氨酸。也可以使用N-乙酰-D-半胱氨酸。像谷胱甘肽一样,N-乙酰半胱氨酸是一种硫醇。用于本文中时,“N-乙酰半胱氨酸”特别可以是如Pschyrembel Klinisches **Wörterbuch** (258.Auflage, Walter de Gruyter,柏林,纽约,1998)中定义的N-乙酰半胱氨酸。

[0121] 已经发现N-乙酰半胱氨酸在辐照灭菌例如 γ 辐照灭菌期间,有效保护包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂、特别是包含含有半胱天冬酶特异性肽例如Q-VD-OPh的半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物。同时,N-乙酰半胱氨酸有利地基本上不干扰细胞外核酸群体例如

ccfDNA的稳定。因此,在一个优选的实施方式中,所述稳定化组合物包含N-乙酰半胱氨酸。N-乙酰半胱氨酸此外还允许所述稳定化组合物的温和pH,例如弱酸性pH。上面描述了合适的pH值。有利地,所述包含N-乙酰半胱氨酸的稳定化组合物可以以液体形式、包括含水形式进行辐照和灭菌。有利的是,不需要辐照固体或冷冻形式的所述组合物以维持所述含有半胱天冬酶抑制剂的组合物的稳定化性能。

[0122] 所述稳定化组合物可以包含浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、或0.1mg/ml至2mg/ml的N-乙酰半胱氨酸。优选地,所述组合物包含至少0.2mg/ml、或至少0.3mg/ml N-乙酰半胱氨酸。特别优选的是包含0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml的组合物。

[0123] 所述稳定化组合物可以包含浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml的N-乙酰半胱氨酸,并以液体形式、优选含水形式被辐照灭菌。

[0124] 已经发现N-乙酰半胱氨酸提供了所述稳定化组合物中包含的所述一种或多种半胱天冬酶抑制剂的特别好的保护,同时确保了所述稳定化组合物在下游应用中的良好性能。前述的N-乙酰半胱氨酸浓度效果好,并且产生特别好的结果。如实施例所示,在所有测试浓度(0.5mg/ml,1mg/ml,2mg/ml,4mg/ml和10mg/ml)下的N-乙酰半胱氨酸都在辐照期间提供所述稳定化组合物的优异保护。同时,即使较高浓度的N-乙酰半胱氨酸也没有干扰所述稳定化组合物在后续应用中的性能。

[0125] 在所述含半胱天冬酶抑制剂的组合物中,0.2mg/ml至1mg/ml或0.3mg/ml至0.8mg/ml的N-乙酰半胱氨酸浓度是特别优选的。发现这样的组合物在灭菌后提供了储存性能特别好的已辐照/已灭菌的稳定化组合物。特别是,在保质期结束时观察到优异的稳定性。使用这些浓度,可以有利地延长所述已灭菌的稳定化组合物的保质期。

[0126] 根据一个实施方式,所述稳定化组合物包含N-乙酰半胱氨酸和任选的一种或多种选自谷胱甘肽、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物。根据一个实施方式,所述稳定化组合物包含N-乙酰半胱氨酸并且还可包含谷胱甘肽、优选还原形式的谷胱甘肽、抗坏血酸、B族维生素、优选维生素B6、和水溶性维生素E衍生物、优选trolox中的一种或多种。特别地,所述组合物可包含N-乙酰半胱氨酸并且还可包含谷胱甘肽、优选还原形式的谷胱甘肽、抗坏血酸、和水溶性维生素E衍生物、优选trolox中的一种或多种。由此,也考虑了步骤a)的稳定化组合物包含N-乙酰半胱氨酸并且还包含谷胱甘肽,优选还原形式的谷胱甘肽,和/或抗坏血酸。根据一个实施方式,所述组合物包含N-乙酰半胱氨酸和抗坏血酸。根据一个实施方式,该组合物包含N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽,优选还原形式的谷胱甘肽。虽然已经发现所有上述组合对于保护待辐照灭菌的包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物都非常有用,但发现单独的N-乙酰半胱氨酸也能产生优异的结果。也考虑了N-乙酰半胱氨酸和B族维生素例如特别是维生素B6的组合。

[0127] 根据一个实施方式,步骤a)中提供的稳定化组合物包含谷胱甘肽。如实施例所示,所述硫醇谷胱甘肽,特别是还原形式的谷胱甘肽也适合于在辐照灭菌期间保护组合物,且基本上不会不利地影响所述含有半胱天冬酶抑制剂的组合物的稳定化性质。谷胱甘肽以还原和氧化两种形式存在。在还原形式中,所述化合物中包含的半胱氨酸的硫醇基团能够提供还原当量。如本文所用的“谷胱甘肽”特别可以是如Pschyrembel Klinisches

Wörterbuch (258. Auflage, Walter de Gruyter, 柏林, 纽约, 1998) 中定义的谷胱甘肽。

[0128] 所述组合物可以包含浓度为0.03mg/ml至10mg/ml、0.04mg/ml至7.5mg/ml、0.075mg/ml至5mg/ml、0.15mg/ml至4mg/ml、0.3mg/ml至3mg、0.4mg/ml至2mg/ml、或0.4mg/ml至1.3mg/ml的谷胱甘肽, 优选还原形式的谷胱甘肽。所述组合物可以包含浓度为0.03mg/ml至10mg/ml、0.04mg/ml至7.5mg/ml、0.075mg/ml至5mg/ml、0.15mg/ml至4mg/ml、0.3mg/ml至3mg、0.4mg/ml至2mg/ml、或0.4mg/ml至1.3mg/ml的谷胱甘肽, 优选还原形式的谷胱甘肽, 并可以以液体形式、优选含水形式辐照。

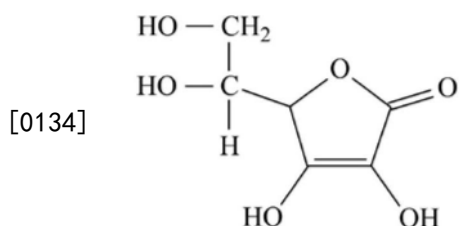
[0129] 技术人员将理解, 在辐照和/或灭菌之后, 所述稳定化组合物中还原型谷胱甘肽的量可能减少, 因为在该过程期间部分或全部的谷胱甘肽可能被氧化。因此, 以上指出的还原形式的谷胱甘肽的浓度特别是指在辐照灭菌之前在所述组合物中的浓度。

[0130] 如实施例中所示, 谷胱甘肽, 特别是还原形式的谷胱甘肽, 在保护包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物中非常有效。谷胱甘肽的还原形式对所述稳定化组合物传达了特别好的保护作用。在该实施方式中可以使用相对较低的浓度和温和的pH条件, 特别是弱酸性条件。有利地, 有可能辐照和灭菌液体形式的所述组合物。不需要为了维持所述组合物的稳定化性能而辐照固体或冷冻形式的所述组合物。如实施例中所示, 在低至0.05mg/ml的谷胱甘肽浓度下能观察到对所述半胱天冬酶抑制剂的保护效应。在稍高的浓度下, 例如至少0.1mg/ml或至少0.2mg/ml, 观察到更明显的效应。0.5mg/ml和1mg/ml的浓度产生特别好的结果。

[0131] 如实施例中所示, 水溶性维生素例如抗坏血酸在保护包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物中也具有活性。此外, 所述实施例显示水溶性维生素B6在保护包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物中具有活性。因此, 可以在步骤a) 中提供包含至少一种水溶性维生素的稳定化组合物, 以进行保护。水溶性维生素的衍生物在本文中也考虑并且可以使用。如本文所用的“水溶性维生素的衍生物”特别可以是与相应的维生素一样具有作为自由基清除剂的活性的衍生物。在一个实施方式中, 所述水溶性维生素选自维生素C和B族维生素。在一个实施方式中, 所述水溶性维生素选自抗坏血酸和B族维生素。在实施方式中, 所述B族维生素是维生素B6。在本文中使用, 维生素B6特别是指吡哆醇。因而, 本文给出的关于“维生素B6”的任何公开内容一般尤为适用于实施方式吡哆醇并且是指实施方式吡哆醇。因而, 本申请中描述的关于维生素B6的所有公开内容一般尤其适用于优选实施方式吡哆醇并特别是指优选实施方式吡哆醇, 即使没有明确说明。在实施方式中, 维生素B6可选自吡哆醇、吡哆醛、吡哆胺和/或吡哆醛磷酸酯。

[0132] 所述水溶性维生素可选自抗坏血酸、硫胺素(维生素B1)、核黄素(维生素B2)、烟酸(维生素B3)、吡哆醇(维生素B6)、叶酸或叶酸、维生素B12(钴胺素)、生物素和泛酸。

[0133] 优选使用抗坏血酸作为水溶性维生素。抗坏血酸可由下式表示:



[0135] 如本文所用的“抗坏血酸”可以包括立体异构体, 例如L-抗坏血酸、D-抗坏血酸、L-

异抗坏血酸、D-异抗坏血酸。如本文所用的“抗坏血酸”特别可以是如在Pschyrembel Klinisches **Wörterbuch** (258. Auflage, Walter de Gruyter, 柏林, 纽约, 1998) 中定义的抗坏血酸。应该理解, 抗坏血酸的衍生物同样是被考虑的并且可以在此使用。如本文所用的“抗坏血酸的衍生物”特别可以是像抗坏血酸一样具有作为自由基清除剂活性的衍生物。

[0136] 为了易于阅读, 在下文中, 提及“水溶性维生素”而不还明确提及其衍生物。并且, 提及“抗坏血酸”而不明确提及抗坏血酸的衍生物。然而, 除非上下文另有规定, 否则与水溶性维生素 (例如关于浓度范围) 有关的公开内容也始终适用于水溶性维生素的衍生物, 并且除非上下文另有规定, 否则对抗坏血酸 (例如关于浓度范围) 的公开内容也始终适用于抗坏血酸的衍生物。

[0137] 所述稳定化组合物可以包含浓度小于20mg/ml, 例如0.1mg/ml至15mg/ml、0.2mg/ml至14mg/ml、0.5mg/ml至13.5mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml、或2mg/ml至11mg/ml的至少一种水溶性维生素, 优选选自抗坏血酸、维生素B1、维生素B2、维生素B3、维生素B6、叶酸或叶酸、维生素B12、生物素和泛酸, 更优选抗坏血酸。在实施方式中, 所述稳定化组合物包含前述浓度之一的B族维生素, 例如维生素B6。特别地, 可以包含例如浓度为0.1mg/ml至15mg/ml或0.1mg/ml至14mg/ml的B族维生素, 其优选为维生素B6。发现维生素B6已经以相对较低的浓度例如约2mg/ml的浓度在灭菌期间保护所述包含至少一种半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物。因此, B族维生素并特别是维生素B6也可以在相对较低的浓度例如0.1mg/ml至11mg/ml、0.2mg/ml至7.5mg/ml或甚至0.2mg/ml至2mg/ml下使用。在相应的低浓度下使用B族维生素例如维生素B6也更为经济。

[0138] 所述组合物可以包含浓度小于20mg/ml, 例如0.1mg/ml至15mg/ml、0.2mg/ml至14mg/ml、0.5mg/ml至13.5mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml、或2mg/ml至11mg/ml的至少一种水溶性维生素, 优选选自抗坏血酸、维生素B1、维生素B2、维生素B3、维生素B6、叶酸或叶酸、维生素B12、生物素和泛酸, 更优选抗坏血酸, 并且可以液体形式、优选含水形式进行辐照以便灭菌。在实施方式中, 所述稳定化组合物包含前述浓度之一的B族维生素, 例如维生素B6。特别地, 可以包含例如浓度为0.1mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至14mg/ml、0.1mg/ml至11mg/ml、0.2mg/ml至7.5mg/ml或0.2mg/ml至2mg/ml的B族维生素, 其优选为维生素B6。

[0139] 所述稳定化组合物可以包含浓度小于20mg/ml, 例如0.1mg/ml至15mg/ml、0.2mg/ml至14mg/ml、0.5mg/ml至13.5mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml、或2mg/ml至11mg/ml的抗坏血酸。

[0140] 所述组合物可以包含浓度小于20mg/ml, 例如0.1mg/ml至15mg/ml、0.2mg/ml至14mg/ml、0.5mg/ml至13.5mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml、或2mg/ml至11mg/ml的抗坏血酸, 并且可以液体形式、优选含水形式被辐照灭菌。

[0141] 如实施例所示, 发现多种浓度例如1mg/ml、2mg/ml、5mg/ml和10mg/ml的抗坏血酸在灭菌期间在所施加的宽范围辐照剂量内保护所述包含至少一种半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物。在所测试的浓度内, 随着抗坏血酸浓度增加, 保护作用趋于增加。在浓度为约5mg/ml至约10mg/ml时最为明显。虽然已发现抗坏血酸在宽浓度范围内使用时都能在灭菌期间保护所述稳定化组合物, 但优选使用浓度小于20mg/ml的抗坏血酸。特别合适的抗坏血酸浓度是在上文指出的0.5mg/ml至15mg/ml, 例如2mg/ml至11mg/ml范围内的那些浓度 (例

如2、4或5mg/ml)。令人惊奇地发现,抗坏血酸在这些相对较低的浓度下也是保护性的,这有利地也允许在温和pH例如弱酸性pH下使用抗坏血酸。有利地,有可能辐照和灭菌液体形式的所述组合物。令人惊奇的是不需要为了维持所述组合物的稳定化性能而辐照固体或冷冻形式的所述组合物。此外,使用浓度小于20mg/ml、优选15mg/ml或更低的抗坏血酸有利地防止了抗坏血酸对血浆中ccfDNA的稳定化的抑制作用。

[0142] 该组合物可以包含抗坏血酸与本发明的一种或多种其它化合物的组合。如在论述N-乙酰半胱氨酸时所解释的,所述包含半胱天冬酶抑制剂的组合物可以例如包含抗坏血酸和N-乙酰半胱氨酸以进行保护。同样地,所述组合物可包含抗坏血酸和谷胱甘肽,优选还原形式的谷胱甘肽。图6中以及表7的实例中示出了示例性的组合,并且本文中具体考虑了这些组合。

[0143] 如实施例中所示,维生素E及其衍生物在辐照灭菌期间对包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物也提供保护作用。维生素E及其衍生物,特别是水溶性衍生物例如trolox,同样显示出保护活性,虽然由例如trolox介导的保护程度低于对N-乙酰半胱氨酸、抗坏血酸或谷胱甘肽所观察到的保护程度。在本文中也考虑了其它脂溶性维生素的水溶性衍生物,例如维生素D、K和A的水溶性衍生物;所述衍生物特别可以像相应的脂溶性维生素一样,具有作为自由基清除剂的活性。

[0144] 如本文所用的“维生素E”特别可以是如在Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (258.Auflage,Walter de Gruyter,柏林,纽约,1998)中定义的维生素E。如本文所用的“维生素E的衍生物”特别可以是像维生素E一样具有作为自由基清除剂的活性的衍生物。如本文所用的“维生素E的衍生物”特别可以是具有作为自由基清除剂的活性的水溶性维生素E衍生物。一种特别优选的水溶性维生素E衍生物的实例是trolox。Trolox可以称为6-羟基-2,5,7,8-四甲基色满-2-羧酸。

[0145] 因此,可以制备包含维生素E或其衍生物的组合。所述组合物可以包含水溶性维生素E衍生物。优选地,所述水溶性维生素E衍生物是trolox。在整个申请中,与“维生素E或其衍生物”有关的公开内容特别适用于包括trolox的水溶性维生素E衍生物,除非上下文另有规定。每当提到“维生素E或其衍生物”时,优选水溶性维生素E衍生物,例如特别是trolox。

[0146] 维生素E或其衍生物,例如优选水溶性维生素E衍生物,更优选trolox,可以特别以0.5mg/ml至5mg/ml、0.6mg/ml至4mg/ml、0.75mg/ml至3mg/ml、0.9mg/ml至2mg/ml、或1mg/ml至1.4mg/ml的浓度用于所述稳定化组合物中。因而,所述组合物可以例如包含浓度为0.5mg/ml至5mg/ml、0.6mg/ml至4mg/ml、0.75mg/ml至3mg/ml、0.9mg/ml至2mg/ml、或1mg/ml至1.4mg/ml的trolox。

[0147] 所述包含至少一种半胱天冬酶抑制剂的组合物可包含浓度为0.5mg/ml至5mg/ml、0.6mg/ml至4mg/ml、0.75mg/ml至3mg/ml、0.9mg/ml至2mg/ml或1mg/ml至1.4mg/ml的维生素E或其衍生物,优选水溶性维生素E衍生物,更优选trolox,并以液体形式、优选含水形式被辐照灭菌。

[0148] 所述组合物可以包含浓度为0.5mg/ml至5mg/ml、0.6mg/ml至4mg/ml、0.75mg/ml至3mg/ml、0.9mg/ml至2mg/ml、或1mg/ml至1.4mg/ml的水溶性维生素E衍生物,优选trolox,并以液体形式、优选含水形式被辐照灭菌。如实施例所示,发现浓度为约1.25mg/ml的维生素E

衍生物在辐照期间提供所述稳定化组合物的保护。在那里,已经测试了维生素E衍生物 trolox。

[0149] 当将多于一种化合物组合时,也可以使用本文公开的各化合物的浓度和浓度范围。例如,当将多于一种化合物组合时,可以使用根据下表A所述的范围。N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽和抗坏血酸的示例性组合和浓度范围在图6中和实施例的表7中显示,并且在本文中具体考虑。从实施例中可以看出,当组合使用时,已经相对较低浓度的各化合物在辐照灭菌期间仍是保护性的。因此,当将一种或多种下述化合物组合时,对于N-乙酰半胱氨酸和抗坏血酸各自可以使用例如约0.3mg/ml至4mg/ml的浓度,对于谷胱甘肽可以使用例如约0.1mg/ml至1.3mg/ml的浓度范围。

[0150] 下表公开了步骤a)中提供的稳定化组合物中包含的本发明示例性优选化合物以及有利的浓度范围。

表 A		
化合物	范围 1 (mg/ml)	范围 2 (mg/ml)
[0151] N-乙酰半胱氨酸	0.05 – 15	0.3 – 0.8
抗坏血酸	0.1 – 15	2 – 11
谷胱甘肽(优选还原型)	0.03 – 10	0.4 – 1.3
Trolox	0.5 – 5	1 – 1.4

[0152] 下表中也公开了步骤a)中提供的稳定化组合物中包含的本发明示例性优选化合物以及有利的浓度范围。

表 B		
化合物	范围 1 (mg/ml)	范围 2 (mg/ml)
[0153] N-乙酰半胱氨酸	0.05 – 15	0.3 – 0.8
抗坏血酸	0.1 – 15	2 – 11
谷胱甘肽(优选还原型)	0.03 – 10	0.4 – 1.3
Trolox	0.5 – 5	1 – 1.4
维生素 B6	0.1 – 11	0.2 – 2

[0154] 步骤a)中制备或提供的组合物的其它特征

[0155] 除了如上所述的所述至少一种半胱天冬酶抑制剂和所述至少一种选自硫醇(优选是N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物之外,步骤a)中提供的稳定化组合物还可以包含附加组分。可特别包括这些附加组分以支持对细胞外核酸群体的稳定效应。

[0156] 下面描述可以包含的其它组分和可以在步骤a)中提供、例如制备的有利组合物。当然,上面论述的、特别是与特征i.和ii.相关的优选实施方式适用,并且本文中提供的标题和小节仅用来便于阅读。

[0157] 适用于稳定细胞外核酸群体的包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂的有利组合物公开于WO 2013/045457 A1、WO 2014/146780 A1、WO 2014/146782 A1、PCT/EP2015/055699、WO 2014/049022 A1、WO 2013/045458 A1和WO 2014/146781 A1。它所参考的这些参考文献描述了用于稳定细胞外核酸群体的几种稳定化组合物。所描述的稳定化组合物的

细胞外核酸稳定效应是基于使用半胱天冬酶抑制剂或一种或多种可与半胱天冬酶抑制剂联合用于稳定化的其它化合物。W02014/049022和W02014/146781也教导了适用于稳定细胞内核酸(例如细胞内DNA和/或细胞内RNA,特别适用于稳定基因表达谱)的含有半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物。此外,这些申请公开了允许被稳定细胞、例如细胞形态和/或细胞表面特征的后续分析的稳定化组合物。这些参考文献中描述的包含一种或多种在其中公开的半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物通过引用并入本文,并且PCT/EP2015/055699中描述的稳定化组合物是特别优选的。这些含有半胱天冬酶抑制剂的组合物可以用本发明的方法灭菌。因此,优选在步骤a)中提供在前述参考文献之一中公开的包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂的组合物,其中所述组合物还包含至少一种选自硫醇(优选N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽,优选其中谷胱甘肽为还原形式)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物,N-乙酰半胱氨酸是高度优选的。这同样适用于将如W0 2008/145710中公开的稳定化组合物(其允许稳定例如基因组、转录组和蛋白质组)与半胱天冬酶抑制剂组合以提供含有半胱天冬酶抑制剂的组合物的情况,其中所述组合物还包含所描述的至少一种选自硫醇(优选N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽,优选其中谷胱甘肽为还原形式)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物,N-乙酰半胱氨酸是高度优选的。

[0158] 步骤a)中提供、例如制备的稳定化组合物因此还可以包含以下一种或多种:

[0159] a) 抗凝剂和/或螯合剂;

[0160] b) 聚(氧乙烯)聚合物;和/或

[0161] c) 至少一种伯、仲或叔酰胺。

[0162] PCT/EP2015/055699中公开了抗凝剂、螯合剂、聚(氧乙烯)聚合物以及伯、仲和叔酰胺的合适浓度。

[0163] 随后,指示了如果存在于所述稳定化组合物中,各个试剂的示例性合适浓度。

[0164] 所述稳定化组合物可以是液体。所指示的浓度对于稳定血液样品来说是特别优选的。例如可以使用0.5ml至2.5ml、0.5ml至2ml、优选1ml至2ml或1ml至1.5ml的液体稳定化组合物。包含下面指示浓度的稳定剂的这种稳定化组合物可用于稳定例如10ml血液。

[0165] 例如,所述组合物还可以包含抗凝剂,优选螯合剂,更优选EDTA,例如K₂EDTA。在待稳定的样品是血液的情况下,这种实施方式特别有用。根据一个实施方式,所述组合物包含抗凝剂或螯合剂,优选EDTA,浓度选自9.5mM至1100mM、20mM至750mM、50mM至600mM、75mM至550mM、100mM至500mM、125mM至450mM、130mM至300mM和140mM至250mM。根据一个实施方式,所述浓度是100mM至250mM。

[0166] 在一个实施方式中,步骤a)中提供的组合物包含至少一种聚(氧乙烯)聚合物。如在其参考的PCT/EP2015/055699中详细描述,当打算稳定细胞外核酸时,聚(氧乙烯)聚合物表现出有利的稳定化性质。它们在与半胱天冬酶抑制剂组合使用时特别有效并且可以改善稳定效应。因此,待灭菌的稳定化组合物额外包含聚(氧乙烯)聚合物是有利的。这种组合物可具有一个或多个以下特征:

[0167] a) 所述聚(氧乙烯)聚合物是聚乙二醇,优选未取代的聚乙二醇;

[0168] b) 所述组合物包含聚(氧乙烯)聚合物,其是分子量为至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物;

[0169] c) 所述组合物包含至少一种分子量低于1500的聚(氧乙烯)聚合物,优选分子量为

1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物,更优选所述分子量位于选自100至800、150至700、200至600和200至500的范围内;

[0170] d)所述组合物包含作为分子量为至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物的聚(氧乙烯)聚合物,和至少一种其它聚(氧乙烯)聚合物,所述其它聚(氧乙烯)聚合物的分子量比所述高分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量低至少100,优选至少200、至少300或至少400,其中所述其它聚(氧乙烯)聚合物优选是分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物;和/或

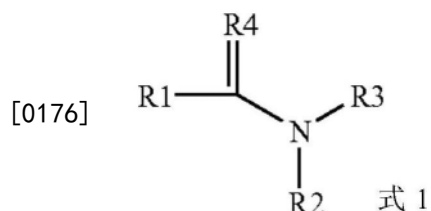
[0171] e)所述组合物包含作为高分子量聚(氧乙烯)聚合物的聚(氧乙烯)聚合物和作为低分子量聚(氧乙烯)聚合物的聚(氧乙烯)聚合物,其中所述高分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量位于选自1500至50000、1500至40000、2000至30000、2500至25000、3000至20000、3500至15000和4000至12500的范围内和/或其中所述低分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量为1000或更低并且其中优选所述分子量位于选自100至1000、150至800、150至700、200至600、200至500和200至400的范围内。

[0172] 根据一个实施方式,所述稳定化组合物包含浓度选自0.4%至35% (w/v)、0.8%至25% (w/v)、1.5%至20% (w/v)、2.5%至17.5% (w/v)、3%至15% (w/v)、4%至10% (w/v)和3%至5% (w/v)的高分子量聚(氧乙烯)聚合物,其优选是聚乙二醇。合适的浓度可以由技术人员确定,并且尤其可以取决于所述高分子量聚(氧乙烯)二醇是单独使用还是与其它聚(氧乙烯)聚合物例如低级聚(氧乙烯)聚合物组合使用,以及用于稳定一定量的含细胞样品的所述稳定化组合物的量,例如体积。当单独使用高分子量聚(氧乙烯)聚合物时,合适的浓度范围的实例包括但不限于选自以下的浓度:2.2%至33.0% (w/v)、4.4%至22.0 (w/v) %、6.6%至16.5% (w/v)和8.8%至13.2% (w/v)。当高分子量聚(氧乙烯)聚合物与低分子量聚(氧乙烯)聚合物组合使用时,合适的浓度范围的实例包括但不限于选自以下的浓度:0.4%至30.7%、0.8%至15.3%、1%至10%、1.5%至7.7%、2.5%至6%、3.1%至5.4%和3%至4%。

[0173] 根据一个实施方式,所述稳定化组合物包含浓度选自0.8%至92.0%、3.8%至76.7%、11.5%至53.7%、19.2%至38.3%、20%至30%和20%至27.5%的低分子量聚(氧乙烯)聚合物,其优选是聚乙二醇。根据一个实施方式,所述浓度为11.5%至30%。取决于所述低分子量聚(氧乙烯)聚合物是否为液体,前述浓度是指(w/v)或(v/v)。如在PCT/EP2015/055699的实施例中所证明的,低分子量聚(氧乙烯)聚合物可以有效地支持含细胞样品的稳定化,特别是当与其中所述的一种或多种其它稳定剂组合使用时。

[0174] 根据一个实施方式,在步骤a)中制备或提供的稳定化组合物包含至少一种伯、仲或叔酰胺。使用这些酰胺中的一种或多种支持所述细胞外核酸群体的稳定化,正如在它参考的申请WO 2013/045457 A1、WO 2014/146780 A1、WO 2014/146782 A1、PCT/EP2015/055699、WO 2014/049022 A1、WO 2013/045458 A1或WO 2014/146781 A1中证明的那样。WO 2014/049022和WO 2014/146781还教导了这样的酰胺适用于稳定细胞内核酸(特别是基因表达谱)。除了用于稳定化的所述半胱天冬酶抑制剂之外,优选除了至少一种聚(氧乙烯)聚合物之外,还可以使用这些酰胺中的一种或多种。

[0175] 根据一个实施方式,所述组合物因此包含一种或多种式1的化合物

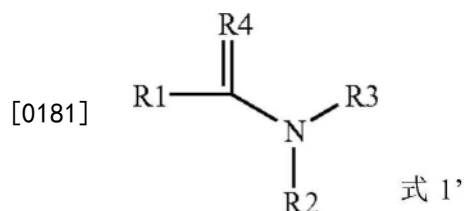


[0177] 其中R1是氢基团或烷基基团,优选C1-C5烷基基团、C1-C4烷基基团或C1-C3烷基基团,更优选C1-C2烷基基团,R2和R3是相同或不同的并且选自氢基团和碳链长度为1-20个原子的以直链或支链方式排列的烃基团,优选烷基基团,并且R4是氧、硫或硒基团,优选R4是氧。

[0178] 也可以使用一种或多种式1的化合物的组合。在其中R1是烷基基团的实施方式中,R1的链长为1或2是优选的。式1的化合物的R2和/或R3是相同或不同的,并且选自氢基团和烃基团,其优选是烷基基团。根据一个实施方式,R2和R3两个都是氢。根据一个实施方式,R2和R3中的一个为氢而另一个是烃基团。根据一个实施方式,R2和R3是相同或不同的烃基团。烃基团R2和/或R3可以彼此独立地选自烷基(包括短链烷基和长链烷基)、烯基、烷氧基、长链烷氧基、环烷基、芳基、卤代烷基、烷基甲硅烷基、烷基甲硅烷氧基、亚烷基、亚烷二基、亚芳基、羧酸酯和羰基(关于这些基团,参见例如W02013/045457,第20-21页,在此通过引用并入)。R2和/或R3的链长n特别可以具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20的值。根据一个实施方式,R2和R3的碳链长度为1-10,优选1至5,更优选1至2。根据一个实施方式,R2和/或R3是烷基基团,优选C1-C5烷基基团。优选地,式1的化合物是羧酸酰胺,因此R4为氧。它可以是伯、仲或叔羧酸酰胺。

[0179] 根据一个实施方式,式1的化合物是N,N-二烷基羧酸酰胺。优选的R1、R2、R3和R4基团如上所述。使用式1的相应化合物具有以下优点:可以额外稳定所述含细胞样品中的细胞内核酸,例如特别是RNA,例如mRNA和/或miRNA转录物。细胞内核酸、特别是基因转录物水平的额外稳定化是有利的,因为它例如允许后续分析所含细胞中的靶转录物或转录物谱。根据一个实施方式,式1的化合物选自N,N-二甲基乙酰胺、N,N-二乙基乙酰胺、N,N-二甲基甲酰胺和N,N-二乙基甲酰胺。包含硫而不是氧作为R4的相应硫代类似物也是合适的。优选地,使用至少一种式1的化合物,其根据GHS分类不是毒性剂。根据一个实施方式,式1的化合物是N,N-二烷基丙酰胺,例如N,N-二甲基丙酰胺。

[0180] 并且,例如所述组合物可以包含一种或多种式1'的化合物



[0182] 其中R1是氢基团或烷基基团,优选C1-C5烷基基团,更优选甲基基团,R2和R3是碳链长度为1-20个原子并以支链或支链方式排列的相同或不同的烃基团,并且R4是氧、硫或硒基团。

[0183] 式1'被上面论述的式1包涵,并且与其相比,限定了R2和R3是相同或不同的烃基团(不是氢)。除此以外,基团R1至R4对应于上面针对式1所论述的那些,并且这参考上面也适用于此处的公开内容。

[0184] 优选地,所述组合物包含丁酰胺和/或N,N-二烷基丙酰胺,更优选N,N-二甲基丙酰胺。

[0185] 根据一个实施方式,所述稳定化组合物包含浓度选自0.4%至38.3%、0.8%至23.0%、2.3%至11.5%、3.8%至9.2%、5%至15%和7.5%至12.5%的一种或多种伯、仲或叔酰胺。取决于所述伯、仲或叔酰胺是否为液体,前述的浓度指(w/v)或(v/v)。如所论述的,优选伯、仲或叔羧酸酰胺。

[0186] 所述组合物还可以包含DMSO。例如,所述组合物可以包含0.05%至2.5%(v/v) DMSO、0.1%至1.8%、或0.2%至1.4% DMSO。DMSO是合适的溶剂,并且发现它在辐照、更特别是 γ 辐照期间支持所述稳定化组合物的保护。特别是当DMSO与trolox组合使用时观察到这种效应,但不限于此。

[0187] 如上所解释的,所述组合物最初可以以固体形式提供。然后可以在辐照之前将其变成液体形式。所述固体组合物可包含所述半胱天冬酶抑制剂、一种或多种本发明化合物和本文论述的任意的其他组分,其量足以在溶剂化后产生包含如上文和下文所述浓度的所述半胱天冬酶抑制剂、所述一种或多种化合物和任意的其它组分。

[0188] 根据非限制性的示例性实施方式,可以制备包含0.001%至0.01%(w/w)半胱天冬酶抑制剂、例如0.005%至0.009%(w/w)半胱天冬酶抑制剂的固体组合物。根据这种示例性实施方式所述的组合物可以包含约0.05至约0.5%(w/w)、例如0.1%至0.4%(w/w)的本发明化合物,例如硫醇,特别是N-乙酰半胱氨酸。如上面和下面论述的,其他组分可被包含在所述示例性固体组合物中。如果存在高分子量聚(氧乙烯)聚合物的话,其示例性浓度是例如3.25%至10%(w/w),如5%至8.5%(w/w)。如果存在低分子量聚(氧乙烯)聚合物的话,其示例性浓度是例如20%至70%(w/w),如40%至65%(w/w)。如果存在伯、仲或叔酰胺的话,其示例性浓度是例如15%至30%(w/w),如18%至25%(w/w)。如果存在抗凝剂和/或螯合剂的话,其示例性浓度是例如6%至24%(w/w),如8%至15%(w/w)。

[0189] 待灭菌的优选组合物包含:

[0190] a) 一种或多种半胱天冬酶抑制剂,

[0191] b) 一种或多种选自硫醇(优选是N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其如上所论述的衍生物的化合物,其中优选地,所述组合物包含N-乙酰半胱氨酸,

[0192] c) 作为稳定剂的至少一种聚(氧乙烯)聚合物,其优选是分子量至少为1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物,

[0193] 以及任选的一种或多种、优选两种或更多种选自以下的其它添加剂:

[0194] d) 至少一种其它聚(氧乙烯)聚合物,其分子量比第一聚(氧乙烯)聚合物的分子量低至少100、优选至少200、至少300或至少400,所述第一聚(氧乙烯)聚合物优选是高分子量聚(氧乙烯)聚合物,其中所述其它聚(氧乙烯)聚合物优选是分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物;

[0195] e) 至少一种伯、仲或叔酰胺;

[0196] f) 抗凝剂和/或螯合剂。

[0197] 优选地,所述稳定化组合物包含一种或多种本发明化合物,其浓度如上面在论述特征ii时所公开的,更优选如上面表A中所公开的。所述稳定化组合物可包含一种或多种如

上面表B所公开的化合物。特别优选使用N-乙酰半胱氨酸。

[0198] 通过稳定含细胞生物样品例如血液、血浆和/或血清中包含的细胞和细胞外核酸群体,相应的稳定化组合物在稳定所述样品中特别有效。所述含细胞生物样品中包含的细胞外核酸群体在稳定期内基本上保留其在所述生物样品与所述稳定化组合物接触时所显示的状态。如例如本申请的实施例和PCT/EP2015/055699的实施例所示,基因组DNA和其他细胞内核酸的释放显著降低。与从未被稳定的样品中分离的细胞外核酸相比,从相应被稳定的样品中分离的细胞外核酸包含显著较少的细胞内核酸、特别是片段化基因组DNA的污染。相应的稳定化组合物允许所述被稳定的样品例如血液在数日间在室温下储存和/或处理、例如运输,而基本上不损害所述样品的质量,相应地不损害其中包含的细胞外核酸群体。

[0199] 另一种待灭菌的优选组合物包含:

[0200] a) 一种或多种半胱天冬酶抑制剂,优选泛半胱天冬酶抑制剂,更优选包含修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂,甚至更加优选选自Q-VD-OPh、Z-VAD(OMe)-FMK和Boc-D-(OMe)-FMK的半胱天冬酶抑制剂,最优选Q-VD-OPh;

[0201] b) 一种或多种选自硫醇(优选是N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素(优选是维生素B6或抗坏血酸)、和维生素E或其如上所论述的衍生物的化合物,其中优选地,所述组合物包含N-乙酰半胱氨酸,

[0202] c) 至少一种作为稳定剂的聚(氧乙烯)聚合物,其中优选所述聚(氧乙烯)聚合物是聚乙二醇,更优选未取代的聚乙二醇;

[0203] 以及任选的一种或多种、优选两种选自以下的其它添加剂:

[0204] d) 至少一种伯、仲或叔酰胺;

[0205] e) 抗凝剂和/或螯合剂。

[0206] 优选地,所述稳定化组合物包含一种或多种本发明化合物,其浓度如上面在论述特征ii时所公开的,更优选如上面表A或表B中所公开的。特别优选使用N-乙酰基半胱氨酸。

[0207] 在实施方式中,优选为聚乙二醇的所述至少一种聚(氧乙烯)聚合物选自低分子量聚(氧乙烯)聚合物,优选分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物,和/或分子量至少为1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物。

[0208] 具有优异的稳定化和灭菌性质的优选稳定化组合物的另一个实例包含:

[0209] a) 至少一种半胱天冬酶抑制剂,优选泛半胱天冬酶抑制剂,更优选包含修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂,最优选Q-VD-OPh;

[0210] b) N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽(优选为还原形式)和/或抗坏血酸,优选N-乙酰半胱氨酸,更优选浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml的N-乙酰半胱氨酸;

[0211] c) 至少一种分子量为至少1500、优选在2000至40000范围内、更优选2500至30000、2500至25000或3000至20000的高分子量聚(氧乙烯)聚合物;

[0212] d) 一种或多种式1的化合物,优选其中所述组合物包含丁酰胺和/或N,N-二烷基丙酰胺,更优选N,N-二甲基丙酰胺;

[0213] e) 至少一种其它聚(氧乙烯)聚合物,其分子量比所使用的高分子量聚(氧乙烯)聚

合物的分子量低至少100、优选至少200、至少300或至少400,并且其中所述其它聚(氧乙烯)聚合物优选是分子量为1000或更低、优选分子量在200至800或200至600范围内的低分子量聚(氧乙烯);

[0214] f) 任选的抗凝剂和/或螯合剂,优选EDTA。

[0215] 具有优异的稳定化和灭菌性质的优选稳定化组合物的另一个实例包含:

[0216] a) 至少一种半胱天冬酶抑制剂,优选泛半胱天冬酶抑制剂,更优选包含修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂,甚至更加优选最优选Q-VD-OPh;

[0217] b) N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽(优选为还原形式)和/或抗坏血酸,优选N-乙酰半胱氨酸,更优选浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml的N-乙酰半胱氨酸;

[0218] c) 至少一种作为稳定剂的聚(氧乙烯)聚合物,其中优选所述聚(氧乙烯)聚合物是聚乙二醇,更优选未取代的聚乙二醇;

[0219] d) 一种或多种式1的化合物,优选其中所述组合物包含丁酰胺和/或N,N-二烷基丙酰胺,更优选N,N-二甲基丙酰胺;

[0220] e) 任选的抗凝剂和/或螯合剂,优选EDTA。

[0221] 在实施方式中,优选为聚乙二醇的所述至少一种聚(氧乙烯)聚合物选自低分子量聚(氧乙烯)聚合物,优选分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物,和/或分子量至少为1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物。

[0222] 步骤a)中提供的稳定化组合物可具有一种或多种以下特征:

[0223] a) 它能够稳定细胞并减少基因组DNA从所述含细胞生物样品中所含的细胞释放到所述样品的无细胞部分;

[0224] b) 它能够减少被稳定的样品中存在的核酸、特别是基因组DNA的降解;

[0225] c) 它能够减少或防止所述生物样品中包含的细胞外DNA群体被来源于所述被稳定的样品中所含的细胞的基因组DNA污染;

[0226] d) 它能够减少或防止所述生物样品中包含的细胞外核酸群体被来源于所述被稳定的样品中所含的细胞的细胞内核酸污染;

[0227] e) 所述稳定化组合物包含的添加剂的浓度不会使所述添加剂诱导或促进细胞裂解;

[0228] f) 所述稳定化组合物不包含诱导蛋白质-DNA和/或蛋白质-蛋白质交联的交联剂,例如甲醛、福尔马林、多聚甲醛或甲醛释放剂;

[0229] g) 所述稳定化组合物不包含毒性剂;

[0230] h) 它能够在无需冷藏、优选在室温下稳定所述含细胞生物样品中包含的细胞外核酸群体达选自至少三天、至少四天、至少五天或至少六天的时间段;和/或

[0231] i) 所述组合物不包含待稳定的含细胞样品,所述样品优选是血液。

[0232] 特别地,优选所述组合物不包含诱导蛋白质-DNA和/或蛋白质-蛋白质交联的交联剂。诱导蛋白质-DNA和/或蛋白质-蛋白质交联的交联剂是例如甲醛、福尔马林、多聚甲醛或甲醛释放剂。这提供了超越涉及交联试剂例如甲醛、甲醛释放剂等的使用的已知现有技术稳定化试剂和方法的重要优点。交联试剂引起核酸分子之间或核酸与蛋白质之间的分子间

或分子内共价键。这种效应可导致在从复杂的生物样品纯化或提取后,这种被稳定和部分交联的核酸的回收率降低。由于例如全血样品中循环核酸的浓度已经相对较低,应避免进一步降低此类核酸收率的任何措施。这在检测和分析来源于恶性肿瘤或来源于妊娠头三个月的发育胎儿的非常罕见的核酸分子时可能特别重要。因此,优选在已灭菌的稳定化组合中不包含甲醛释放剂,相应地也不将所述甲醛释放剂另外用于稳定化。由此,根据一个实施方式,所述稳定化组合中不包含交联剂例如甲醛或甲醛释放剂,相应地也不将所述交联剂另外用于稳定化。此外,正如所描述的,所述稳定化组合优选不包含任何会诱导有核细胞或总细胞裂解的添加剂,例如,离液盐。

[0233] 包含半胱天冬酶抑制剂Q-VD-OPh、二甲基丙酰胺、PEG、EDTA例如K₂EDTA以及一种或多种上表A的化合物的组合是非常合适的并具有优异的灭菌以及稳定化性质。这同样适用于包含半胱天冬酶抑制剂Q-VD-OPh、二甲基丙酰胺、PEG、EDTA例如K₂EDTA以及一种或多种上表B的化合物的组合。最优选地,所述组合包含N-乙酰半胱氨酸。包含抗坏血酸的组合和包含谷胱甘肽(优选还原形式)的组合也是优选的。Trolox也被发现在灭菌期间提供保护。然而其他化合物是更优选的。

[0234] 如所论述的,在实施方式中,所述含有半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合也适用于稳定细胞内核酸,特别是细胞内DNA(例如基因组DNA)和/或细胞内RNA。特别地,它可以适用于稳定细胞内RNA,并优选适用于稳定所含细胞的基因转录谱。因此,从相应被稳定的样品中分离的细胞内核酸非常适合例如用于基因表达谱分析和其他分析方法,所述方法需要所述被稳定的样品中的体内转录物水平的准确表现。此外,有利地,如果需要,这样的稳定化允许从同一被稳定的样品中与被稳定的细胞内核酸分开地分离被稳定的细胞外核酸。相应的组合可以包含例如至少一种伯或仲羧酸酰胺和/或至少一种叔酰胺,优选N,N-二烷基丙酰胺,更优选N,N-二甲基丙酰胺(参见,例如WO 2014/049022和WO 2014/146781)。样品稳定化后,细胞内RNA受到保护而免于降解,此外,所含细胞的基因转录谱的变化被抑制。因此,所述稳定化特别降低了体外降解并使基因诱导最小化。稳定所含细胞的基因转录物水平是有利的,因为与未被稳定的样品相比,被稳定的样品中新转录物的产生和已有转录物的降解得以抑制,从而在稳定化后基本上“冻结”了所含细胞的基因转录谱。因此,所述稳定化也适用于通过将转录物水平维持在它们在样品采集和稳定化时显示的状态下来稳定转录组。术语转录组特别是指在一个或一群细胞中产生的所有RNA分子(包括mRNA、rRNA、tRNA和其他非编码RNA,例如miRNA)的集合。在实施方式中,含细胞生物样品例如血液样品可被稳定至少三天而转录物水平基本上没有变化。通过减少RNA降解和使基因表达的改变例如特别是基因诱导或下调最小化,特别稳定了所述基因转录谱。从而,保留了在采集、相应稳定化时存在的体内基因表达谱。此外,可维持所述RNA的质量和完整性,从而提供样品采集、相应样品稳定化时的体内转录物水平的准确表现。在稳定化后保留所述体内基因转录谱允许进行例如,基因表达谱分析或其他分析方法,所述方法需要使用相应被稳定的样品准确表现所述转录物水平。然而,即使期望,但经常不需要稳定或同样好地稳定所有转录物水平。特定的或新的靶转录物的稳定化和性能特征应该进行验证,正如现有技术中用于稳定基因转录谱的技术所通常会做的。实现基因转录谱或特定转录物水平的稳定化可以例如基于为分析所述基因转录谱的稳定化而建立的标志物基因来确定。根据一个实施方式,所含细胞的基因转录谱或转录物水平的稳定化导致一种或多种、优选两种或更多种选自c-fos、

IL-1 β 、IL-8和p53的标志物基因在稳定化后被稳定至少12h、至少24h或至少48h。这些标志物基因被鉴定为在储存期间提供非常不稳定的转录物,因此在样品采集后没有适当稳定化的情况下上调或下调。因此,这些基因的转录物水平适合作为标志物来分析是否实现了基因转录水平的稳定化。所述稳定效应可以使用实施例中描述的实时RT-PCR测定法来分析。根据一个实施方式,一个或多个这些标志物基因的转录物水平在T₀(稳定化点)和稳定期结束之间改变不超过1.5CT值,优选不超过1.25CT值,更优选不超过1CT值。优选地,实现至少12h、至少24h、至少48h、至少72h或至少96g的相应稳定效应。优选地,至少用标志物基因c-fos、IL8和IL-1 β 并优选所有前述的标志物基因实现相应的稳定化特性。正如W2014/049022和W2014/146781所证明的,各种酰胺例如伯和/或仲羧酸酰胺实现了相应的稳定化性能。

[0235] 在实施方式中,所述已灭菌的稳定化组合物能够保留待稳定的样品中包含的细胞的特性,例如,保留所含细胞的细胞表面特征和/或细胞形态。由于稳定化,细胞保持完整。这允许例如在稳定期后从被稳定的样品中分离细胞,并且从所述被稳定的样品中分离的细胞适用于分析。例如,细胞内核酸如DNA和/或RNA可以从所包含的细胞中分离出来并且可以进行分析。此外,保留所述被稳定的样品中的细胞打开了分选或捕获细胞甚至富集特定细胞例如肿瘤细胞的可能性,然后可以具体地分析所述细胞。例如,可以分离循环肿瘤细胞并可以分析它们的基因表达谱。此外,可以分析细胞形态和/或细胞标志物,特别是细胞表面标志物,以便表征所获得的细胞。此外,可以从所述富集的特定细胞中分离细胞内核酸。例如,可以从所述细胞分离RNA。本文所述的稳定化组合物的转录物水平稳定化性质有利地允许使用分离的RNA进行基因表达谱分析和其他重要分析。因此,这样的稳定化在例如癌症或其他疾病的分子诊断中是有利的,因为它允许富集细胞,然后从富集的细胞中提取核酸,从而增加了例如在含细胞样品中、例如在血液样品中检测出循环肿瘤细胞的罕见事件的机率。这也增加了在所述样品中鉴定到特定生物标志物、特别是罕见生物标志物的几率。根据一个实施方式,在优选至少12h、至少24h并更优选至少48h的稳定期期间保留细胞的形态。这允许基于所含细胞的形态对其进行分析和任选地对其进行表征。根据一个实施方式,保留有核细胞的形态。

[0236] 根据一个实施方式,在使用所述已灭菌的稳定化组合物时,血液样品中包含的淋巴细胞的形态在稳定期间得以保留。根据一个实施方式,保留细胞的细胞表面表位。根据一个实施方式,保留细胞表面蛋白例如CD蛋白。细胞表面表位和细胞表面蛋白的保留是一个优点,因为它允许基于这些细胞表面特征来表征和/或分离所含的细胞。特别地,它允许基于所述标志物分析所述细胞表面上存在的肿瘤标志物或分离特定细胞。用于该目的的合适的稳定化组合物是例如在其所参考的WO 2014/049022和WO 2014/146781中描述的。

[0237] 在实施方式中,所使用的稳定化组合物适用于稳定蛋白质组。

[0238] 步骤b) 辐照组合物进行灭菌

[0239] 所述方法还包含在步骤b) 中辐照所述稳定化组合物以进行灭菌。如上文所解释的,在所述组合物与生物样品接触之前对所述组合物进行辐照。目的是提供一种包含半胱天冬酶抑制剂的已灭菌的稳定化组合物,其可通过例如使生物样品与所述已灭菌组合物接触而用于稳定所述样品中的细胞外核酸群体。

[0240] 几种辐照形式是合适的并且可以应用。适用于组合物和装置灭菌的辐照形式是技

术人员已知的。例如,可以使用电离辐照,适用于组合物和装置的灭菌的电离辐照形式同样是技术人员已知的。电离辐照的实例是 γ 辐照、电子束辐照、X射线和电离紫外辐射。为了进行本发明,优选 γ 辐照、电子束辐照和X射线;更优选 γ 辐照和X射线。最优选通过 γ 辐照进行辐照。

[0241] γ 辐照剂量以千戈瑞 (kGy) 单位度量,其将吸收的辐射能量量化。一戈瑞是1千克物质吸收1焦耳的辐射能 (1kGy=1焦耳/克)。

[0242] 所述组合物可以用5kGy至35kGy、6kGy至30kGy、7kGy至26kGy或约8kGy至约25kGy、例如约8kGy至约15kGy或约15kGy至约25kGy的辐照剂量辐照。用约8kGy至约15kGy的辐照剂量辐照提供了相对温和的辐照条件的优点,所述辐照条件进一步支持被辐照的组合物中的稳定化性质的维持。用约15kGy至约25kGy的辐照剂量辐照同样是良好可行的并且特别有成本效率,这对大规模生产来说是一个重要优势。所述组合物可以通过 γ 辐照以约8kGy至约25kGy、约8kGy至约15kGy或约15kGy至约25kGy的辐照剂量辐照。所述组合物可以通过 γ 辐照以5kGy至35kGy、6kGy至30kGy、7kGy至26kGy、或约8kGy至约25kGy、例如约8kGy至约15kGy或约15kGy至约25kGy的辐照剂量辐照。

[0243] 所述辐照剂量可以在宽范围的辐照时间内施加。虽然已经发现辐照时间不是辐照所述稳定化溶液的关键参数,但从实用和经济的观点来看,可以优选选择相对较短的辐照时间。技术人员熟悉合适的辐照时间选择。示例性范围包括1秒至1小时、1秒至30分钟、2秒至10分钟或5秒至1分钟。

[0244] 通常,用足够高的辐照剂量辐照所述组合物以确保所述组合物被灭菌。

[0245] 如本文所用的“无菌性”或“已灭菌的”特别可以通过在已被灭菌后的产品上存活的微生物的概率来定义。这种概率可以被称为无菌性保证水平 (SAL)。举例来说, 10^{-6} 的SAL经常用于医疗装置的灭菌。如本文所用, 10^{-6} 的SAL特别可以指在灭菌后发现非无菌单元例如非无菌组合物或装置的概率为1/1,000,000。如本文所用的“无菌性”或“已灭菌的”特别可以指SAL为 10^{-4} 或更低,更优选 10^{-5} 或更低,最优选 10^{-6} 或更低。根据一个实施方式,“无菌性”或“已灭菌的”表示“没有活的微生物”。

[0246] 为了证明灭菌过程常规赋予选定的SAL的适当验证方法是技术人员已知的,并且用于辐照的是例如在ANSI/AAMI/ISO 11137:2006中陈述的。

[0247] 因此,辐照灭菌可以导致组合物或装置的无菌性保证水平 (SAL) 为 10^{-4} 或更低,更优选 10^{-5} 或更低,最优选 10^{-6} 或更低。辐照可以满足ISO标准ISO11137-1:2006、ISO11137-2:2012和/或ISO11137-3:2006的要求。

[0248] 根据一种优选实施方式,通过用5kGy至35kGy、6kGy至30kGy、7kGy至26kGy或约8kGy至约25kGy、例如约8kGy至约15kGy或约15kGy至约25kGy、特别优选约8kGy至约15kGy的辐照剂量辐照来实现无菌性,其中优选通过 γ 辐照进行辐照。

[0249] 所述组合物以何种形式被辐照没有限制。由此,所述组合物可以例如以固体或液体形式被辐照。然而,对于本文描述的所有实施方式而言,优选将所述组合物以液体形式、优选含水形式进行辐照灭菌。

[0250] 发现所述至少一种选自N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物在保护包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂、特别是包含一种或多种肽类半胱天冬酶抑制剂的液体、尤其是含水的稳定化组合物中特别有活性。这是令人惊奇的,因

为液体组合物在现有技术中(例如在药物领域中)经常被发现难以在不损害所述组合物功能的情况下灭菌。辐照适用于稳定生物样品的细胞外核酸群并包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂的液体形式、特别是含水形式的组合物是合乎需要的。这允许提供可以方便地处理并与生物样品,特别是液体生物样品例如血液、血浆或血清混合的已灭菌的稳定化组合物。

[0251] 如果所述组合物以液体形式、优选含水形式被辐照,则有可能首先在步骤a)中提供、例如制备固体形式的所述组合物,然后将其溶解在合适的溶剂中以提供液体、优选含水的组合物,然后将其辐照灭菌。这可以例如通过在步骤b)之前或期间溶解所述组合物来完成。

[0252] 根据一个实施方式,所述稳定化组合物以非固态被辐照。根据一个实施方式,所述稳定化组合物以非冷冻态被辐照。

[0253] 所述包含至少一种半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物可以在样品采集装置例如容器中灭菌。所述容器可以是管,更优选是采血管。所述容器通常由适用于辐照的材料构成。例如,所述容器例如采血管可包含聚对苯二甲酸乙二醇酯或由聚对苯二甲酸乙二醇酯构成。所述采集装置可以是根据本发明的第七方面所述的装置。

[0254] 辐照所述组合物进行灭菌可提供已灭菌组合物。因此,本发明第一方面的方法优选是一种制造适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物的方法,所述方法包括:

[0255] a) 提供如上所述的稳定化组合物;和

[0256] b) 通过辐照对所述组合物进行灭菌。

[0257] 所述稳定化组合物的其他细节和实施方式如上所述并参考相应的公开内容。在实施方式中,所述已灭菌组合物适合于额外稳定细胞内核酸(特别是细胞内RNA和/或细胞内DNA,例如基因组DNA)。在实施方式中,所述已灭菌组合物适合于额外稳定细胞特征,例如细胞表面特征和/或细胞形态。这参考上面也适用于此处的公开内容。所述组合物优选以液体形式、更优选含水形式被灭菌。这参考上面的公开内容。

[0258] 根据本发明第一方面所述的具体实施方式

[0259] 下面描述根据本发明第一方面所述的方法的合适并优选的实施方式。

[0260] 根据本发明第一方面的一个实施方式,提供了一种制造适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物的方法,所述方法包括:

[0261] a) 提供液体的、优选含水的组合物,其包含:

[0262] i. 至少一种半胱天冬酶抑制剂,优选泛半胱天冬酶抑制剂,更优选包含修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂。可以用醛、腈或酮化合物对所述半胱天冬酶特异性肽进行修饰。根据一个实施方式,用O-苯氧基(OPh)或氟甲基酮(FMK)基团,优选在羧基端,修饰所述半胱天冬酶特异性肽。根据一个实施方式,所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh、Boc-D-(OMe)-FMK和Z-VAD(OMe)-FMK。根据一个实施方式,所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh和Z-VAD(OMe)-FMK,最优选Q-VD-OPh。

[0263] ii. 一种或多种以下化合物:

[0264] -N-乙酰半胱氨酸,浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml,

[0265] -还原形式的谷胱甘肽,浓度为0.03mg/ml至10mg/ml、0.04mg/ml至7.5mg/ml、0.075mg/ml至5mg/ml、0.15mg/ml至4mg/ml、0.3mg/ml至3mg、0.4mg/ml至2mg/ml、或0.4mg/ml至1.3mg/ml,和/或

[0266] -抗坏血酸,浓度小于20mg/ml,例如1mg/ml至15mg/ml、0.2mg/ml至14mg/ml、0.5mg/ml至13.5mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml、或2mg/ml至11mg/ml,

[0267] -B族维生素,优选维生素B6,浓度为0.1mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至14mg/ml、0.1mg/ml至11mg/ml、0.2mg/ml至7.5mg/ml、或0.2mg/ml至2mg/ml,

[0268] 所述组合物任选还包含一种或多种选自以下的组分:

[0269] iii.至少一种作为稳定剂的聚(氧乙烯)聚合物,其中优选所述聚(氧乙烯)聚合物是聚乙二醇,更优选未取代的聚乙二醇,

[0270] iv.至少一种伯、仲或叔酰胺,优选N,N-二烷基丙酰胺(例如N,N-二甲基丙酰胺)和/或丁酰胺,

[0271] v.抗凝剂和/或螯合剂,优选EDTA;以及

[0272] b)辐照所述组合物进行灭菌,优选通过 γ 辐照来实现。

[0273] 在实施方式中,优选为聚乙二醇的所述至少一种聚(氧乙烯)聚合物选自低分子量聚(氧乙烯)聚合物,优选分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物,和/或分子量为至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物。

[0274] 所述组合物可通过辐照所述组合物进行灭菌。

[0275] 根据本发明第一方面的另一个实施方式,提供了一种制造适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物的方法,所述方法包括:

[0276] a)提供液体的、优选含水的组合物,其包含:

[0277] i.至少一种半胱天冬酶抑制剂,优选泛半胱天冬酶抑制剂,更优选包含修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂。可以用醛、腈或酮化合物对所述半胱天冬酶特异性肽进行修饰。根据一个实施方式,用O-苯氧基(OPh)或氟甲基酮(FMK)基团,优选在羧基端,修饰所述半胱天冬酶特异性肽。根据一个实施方式,所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh、Boc-D-(OMe)-FMK和Z-VAD(OMe)-FMK。根据一个实施方式,所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh和Z-VAD(OMe)-FMK,最优选Q-VD-OPh。

[0278] ii.一种或多种以下化合物:

[0279] -N-乙酰半胱氨酸,浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml,

[0280] -还原形式的谷胱甘肽,浓度为0.03mg/ml至10mg/ml、0.04mg/ml至7.5mg/ml、0.075mg/ml至5mg/ml、0.15mg/ml至4mg/ml、0.3mg/ml至3mg、0.4mg/ml至2mg/ml、或0.4mg/ml至1.3mg/ml,和/或

[0281] -抗坏血酸,浓度小于20mg/ml,例如1mg/ml至15mg/ml、0.2mg/ml至14mg/ml、0.5mg/ml至13.5mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml、或2mg/ml至11mg/ml,

[0282] 所述组合物任选还包含一种或多种选自以下的组分:

[0283] iii.至少一种分子量为至少1500、优选在2000至40000范围内、更优选2500至30000、2500至25000或3000至20000的高分子量聚(氧乙烯)聚合物;

[0284] iv. 至少一种伯、仲或叔酰胺, 优选N,N-二烷基丙酰胺(例如N,N-二甲基丙酰胺)和/或丁酰胺,

[0285] v. 至少一种其它聚(氧乙烯)聚合物, 其分子量比所使用的高分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量低至少100、优选至少200、至少300或至少400, 并且其中所述其它聚(氧乙烯)聚合物优选是分子量为1000或更低、优选分子量在200至800或200至600范围内的低分子量聚(氧乙烯), 和

[0286] vi. 抗凝剂和/或螯合剂, 优选EDTA; 以及

[0287] b) 辐照所述组合物进行灭菌, 优选通过 γ 辐照来实现。

[0288] 所述组合物可通过辐照所述组合物进行灭菌。

[0289] 根据本发明第一方面的另一个实施方式, 提供了一种制造适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物的方法, 所述方法包括:

[0290] a) 提供液体组合物, 其优选是含水的, 所述组合物包含:

[0291] i. 至少一种半胱天冬酶抑制剂, 优选泛半胱天冬酶抑制剂, 更优选包含如上所述的修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂, 最优选Q-VD-OPh,

[0292] ii. 至少一种如上面表A或表B中所限定的化合物, 优选其中所述组合物包含N-乙酰半胱氨酸,

[0293] 所述组合物任选还包含一种或多种选自以下的组分:

[0294] iii. 至少一种分子量为至少1500、优选在2000至40000范围内、更优选2500至30000、2500至25000或3000至20000的高分子量聚(氧乙烯)聚合物;

[0295] iv. 至少一种伯、仲或叔酰胺, 优选N,N-二烷基丙酰胺(例如N,N-二甲基丙酰胺)和/或丁酰胺,

[0296] v. 至少一种其它聚(氧乙烯)聚合物, 其分子量比所使用的高分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量低至少100、优选至少200、至少300或至少400, 并且其中所述其它聚(氧乙烯)聚合物优选是分子量为1000或更低、优选分子量在200至800或200至600范围内的低分子量聚(氧乙烯), 和

[0297] vi. 抗凝剂和/或螯合剂, 优选EDTA; 以及

[0298] b) 辐照所述组合物进行灭菌, 优选通过 γ 辐照。

[0299] 所述稳定化组合物可通过辐照所述组合物进行灭菌。

[0300] 根据一个优选实施方式, 本发明提供了一种制造适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物的方法, 所述方法包括:

[0301] a) 提供含水组合物, 其包含:

[0302] i. 至少一种泛半胱天冬酶抑制剂, 更优选包含如上所述的修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂, 最优选Q-VD-OPh,

[0303] ii. N-乙酰半胱氨酸, 浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml,

[0304] 并且所述组合物任选还包含:

[0305] iii. 至少一种作为稳定剂的聚(氧乙烯)聚合物, 其中优选所述聚(氧乙烯)聚合物是聚乙二醇, 更优选未取代的聚乙二醇,

[0306] iv. 至少一种伯、仲或叔酰胺, 优选N,N-二烷基丙酰胺(例如N,N-二甲基丙酰胺)和/或丁酰胺, 和

[0307] v. 任选的抗凝剂和/或螯合剂, 优选EDTA; 以及

[0308] b) 辐照所述组合物进行灭菌, 优选通过 γ 辐照, 更优选利用5kGy至35kGy、6kGy至30kGy、7kGy至26kGy、约8kGy至约25kGy、或约8kGy至约15kGy的剂量。

[0309] 在实施方式中, 优选为聚乙二醇的所述至少一种聚(氧乙烯)聚合物选自低分子量聚(氧乙烯)聚合物, 优选分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物, 和/或分子量为至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物。

[0310] 所述稳定化组合物可通过辐照所述组合物进行灭菌。

[0311] 根据另一个优选实施方式, 本发明提供了一种制造适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物的方法, 所述方法包括:

[0312] a) 提供含水组合物, 其包含:

[0313] i. 至少一种泛半胱天冬酶抑制剂, 更优选包含如上所述的修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂, 最优选Q-VD-OPh,

[0314] ii. N-乙酰半胱氨酸, 浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml,

[0315] 并且所述组合物任选还包含:

[0316] iii. 至少一种分子量为至少1500、优选在2000至40000范围内、更优选2500至30000、2500至25000或3000至20000的高分子量聚(氧乙烯)聚合物;

[0317] iv. 至少一种伯、仲或叔酰胺, 优选N,N-二烷基丙酰胺(例如N,N-二甲基丙酰胺)和/或丁酰胺,

[0318] v. 至少一种其它聚(氧乙烯)聚合物, 其分子量比所使用的高分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量低至少100、优选至少200、至少300或至少400, 并且其中所述其它聚(氧乙烯)聚合物优选是分子量为1000或更低、优选分子量在200至800或200至600范围内的低分子量聚(氧乙烯), 和

[0319] vi. 任选的抗凝剂和/或螯合剂, 优选EDTA; 以及

[0320] b) 辐照所述组合物进行灭菌, 优选通过 γ 辐照, 更优选利用5kGy至35kGy、6kGy至30kGy、7kGy至26kGy、约8kGy至约25kGy、或约8kGy至约15kGy的剂量。

[0321] 所述稳定化组合物可通过辐照所述组合物进行灭菌。

[0322] 根据一个实施方式, 在上述优选实施方式中, 步骤a) 中提供的含水组合物包含浓度为0.03mg/ml至10mg/ml、0.04mg/ml至7.5mg/ml、0.075mg/ml至5mg/ml、0.15mg/ml至4mg/ml、0.3mg/ml至3mg、0.4mg/ml至2mg/ml、或0.4mg/ml至1.3mg/ml的还原形式的谷胱甘肽, 和/或包含浓度小于20mg/ml, 例如0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至14mg/ml、0.5mg/ml至13.5mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml、或2mg/ml至11mg/ml的抗坏血酸。

[0323] 除了N-乙酰半胱氨酸之外或作为N-乙酰半胱氨酸的替代物, 所述组合物中可以包含还原形式的谷胱甘肽和抗坏血酸。然而, 如之前解释的, 所述组合物包含N-乙酰半胱氨酸是有利的。

[0324] 根据另一个优选实施方式, 本发明提供了一种制造适用于稳定生物样品的细胞外

核酸群体的已灭菌组合物的方法,所述方法包括:

[0325] a) 提供含水组合物,其包含:

[0326] i. 半胱天冬酶抑制剂Q-VD-OPh,

[0327] ii. N-乙酰半胱氨酸,浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml,

[0328] 所述组合物任选还包含:

[0329] iii. 至少一种作为稳定剂的聚(氧乙烯)聚合物,其中优选所述聚(氧乙烯)聚合物是聚乙二醇,更优选未取代的聚乙二醇,

[0330] iv. 至少一种伯、仲或叔酰胺,优选N,N-二烷基丙酰胺(例如N,N-二甲基丙酰胺)和/或丁酰胺,和

[0331] v. 任选的抗凝剂和/或螯合剂,优选EDTA;以及

[0332] b) 将所述组合物通过 γ 辐照进行灭菌,优选利用5kGy至35kGy、6kGy至30kGy、7kGy至26kGy、约8kGy至约25kGy、或约8kGy至约15kGy的剂量。

[0333] 在实施方式中,优选为聚乙二醇的所述至少一种聚(氧乙烯)聚合物选自低分子量聚(氧乙烯)聚合物,优选分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物,和/或分子量为至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物。

[0334] 根据另一个优选实施方式,本发明提供了一种制造适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物的方法,所述方法包括:

[0335] a) 提供含水组合物,其包含:

[0336] i. 半胱天冬酶抑制剂Q-VD-OPh,

[0337] ii. N-乙酰半胱氨酸,浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml,

[0338] 所述组合物任选还包含:

[0339] iii. 至少一种分子量为至少1500、优选在2000至40000范围内、更优选2500至30000、2500至25000或3000至20000的高分子量聚(氧乙烯)聚合物;

[0340] iv. 至少一种伯、仲或叔酰胺,优选N,N-二烷基丙酰胺(例如N,N-二甲基丙酰胺)和/或丁酰胺,

[0341] v. 至少一种其它聚(氧乙烯)聚合物,其分子量比所使用的高分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量低至少100、优选至少200、至少300或至少400,并且其中所述其它聚(氧乙烯)聚合物优选是分子量为1000或更低、优选分子量在200至800或200至600范围内的低分子量聚(氧乙烯),和

[0342] vi. 抗凝剂和/或螯合剂,优选EDTA;以及

[0343] b) 所述组合物通过 γ 辐照进行灭菌,更优选利用5kGy至35kGy、6kGy至30kGy、7kGy至26kGy、约8kGy至约25kGy、或约8kGy至约15kGy的剂量。

[0344] 根据一个实施方式,在步骤a)中提供且在步骤b)中辐照的组合物不包含鞣酸,并且不包含没食子酸。根据一个实施方式,所述组合物还不包含甘露糖醇、异丙醇和/或吐温-80或可干扰所述稳定效应的其它化合物。根据一个实施方式,所述组合物具有弱酸性pH。

[0345] 根据一个实施方式,所述稳定化组合物包含半胱天冬酶抑制剂Q-VD-OPh,其浓度选自0.35 μ g/ml至70 μ g/ml、0.7 μ g/ml至63 μ g/ml、1.74 μ g/ml至59 μ g/ml、10.5 μ g/ml至56 μ g/ml、或15 μ g/ml至50 μ g/ml、20 μ g/ml至45 μ g/ml、25 μ g/ml至40 μ g/ml以及30 μ g/ml至38 μ g/ml。

[0346] B.用于稳定细胞外核酸群体的方法

[0347] 根据第二方面,本发明提供了一种用于稳定含细胞生物样品中包含的细胞外核酸群体的方法,所述方法包括:

[0348] a) 根据本发明第一方面的方法制造适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物;以及

[0349] b) 使所述含细胞生物样品与所述已灭菌组合物接触。

[0350] 还考虑了一种用于稳定含细胞生物样品中包含的细胞外核酸群体的方法,所述方法包括:

[0351] a) 获得根据本发明第六方面所述的组合物,其中对所述组合物进行灭菌,或获得根据本发明第七方面所述的样品采集装置,其中对所述样品采集装置中包含的组合物进行灭菌;以及

[0352] b) 使所述含细胞生物样品与已灭菌组合物接触。

[0353] 所述稳定化组合物和所述用于灭菌保护的化合物的合适的和优选的实施方式如上所述,参考上面也适用于此的公开内容。根据优选实施方式,所述被稳定的细胞外核酸群是ccfDNA。

[0354] 在所述含细胞生物样品与所述组合物接触后,所得混合物可以例如包含:

[0355] a) 至少一种半胱天冬酶抑制剂,优选泛半胱天冬酶抑制剂,更优选Q-VD-OPh,优选其浓度位于0.1 μ M至20 μ M、0.2 μ M至18 μ M、0.5 μ M至17 μ M、3 μ M至16 μ M范围内,更优选3 μ M至12 μ M的范围内;

[0356] 以及以下的一种或多种

[0357] b) N-乙酰半胱氨酸,浓度范围选自0.05mM至13.4mM、0.09mM至8.9mM、0.09mM至6.7mM、0.09mM至4.5mM、0.09mM至1.8mM、0.18mM至0.9mM、或0.27mM至0.71mM;

[0358] c) 谷胱甘肽,优选为还原形式,浓度范围选自0.01mM至4.2mM、0.02mM至3.15mM、0.03mM至2.1mM、0.06mM至1.68mM、0.13mM至1.26mM、0.17mM至0.95mM或0.17mM至0.61mM;

[0359] d) 水溶性维生素,优选抗坏血酸,浓度范围选自小于16.5mM,例如0.08mM至12.4mM、0.83mM至10.72mM、1.24mM至9.9mM、或1.65mM至9.1mM;

[0360] e) 维生素E或其衍生物,优选水溶性维生素E衍生物,更优选trolox,浓度范围选自0.29mM至2.9mM、0.44mM至1.74mM、0.52mM至1.16mM、或0.58mM至0.81mM。

[0361] 还考虑了所得混合物可包含B族维生素,优选维生素B6,浓度范围选自0.08mM至12.9mM、0.08mM至12mM、0.1mM至9.4mM、0.17mM至6.4mM、或0.17mM至1.7mM。

[0362] 使用N-乙酰半胱氨酸是优选的。

[0363] 在所述含细胞生物样品已经与所述已灭菌的稳定化组合物接触后,所得混合物可包含以下的一种或多种:

[0364] a) 一种或多种式1的化合物,浓度位于0.25%至5%、0.3%至4%、0.4%至3%、0.5%至2.5%或0.75%至2%范围内;

[0365] b) 至少一种聚(氧乙烯)聚合物,其中优选所述聚(氧乙烯)聚合物是聚乙二醇,更

优选未取代的聚乙二醇；

[0366] c) 螯合剂,更优选EDTA。

[0367] 在实施方式中,优选为聚乙二醇的所述至少一种聚(氧乙烯)聚合物选自低分子量聚(氧乙烯)聚合物,优选分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物,和/或分子量为至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物。

[0368] 因此,在所述含细胞生物样品已经与所述已灭菌的稳定化组合物接触后,所得混合物可包含以下的一种或多种:

[0369] a) 一种或多种式1的化合物,浓度位于0.25%至5%、0.3%至4%、0.4%至3%、0.5%至2.5%或0.75%至2%范围内;

[0370] b) 高分子量聚(氧乙烯)聚合物,浓度范围选自0.1%至3% (w/v)、0.2%至2.5% (w/v)、0.25%至2% (w/v)、0.3%至1.75% (w/v)和0.35%至1.5% (w/v)或者选自0.25%至1.5% (w/v)、0.3%至1.25% (w/v)、0.35%至1% (w/v)和0.4%至0.75% (w/v);

[0371] c) 低分子量聚(氧乙烯)聚合物,浓度范围选自0.5%至10%、1.5%至9%、1.75%至8%、2%至7%和2.5%至6%;

[0372] d) 螯合剂,更优选EDTA。

[0373] 根据一个实施方式,所述含细胞样品是血液样品。在这种实施方式中,稳定化优选包括使用抗凝剂,所述抗凝剂可以是螯合剂,例如EDTA。

[0374] 在本文中所述,在实施方式中,所述已灭菌组合物适合于额外稳定细胞内核酸例如细胞内DNA(例如基因组DNA)和/或RNA。根据一个实施方式,由于所述稳定化,减少了所述含细胞样品中存在的核酸的降解。特别地,稳定了细胞内RNA。优选地,稳定了所述样品中包含的细胞中的转录组和/或转录物水平。详情如上所述。根据一个实施方式,一种或多种选自c-fos、IL-1 β 、IL-8和p53的标志物基因的转录物水平在稳定化后被稳定了至少12h,至少24h,优选至少48h。根据一个实施方式,在所述稳定化组合物与血液样品接触后,一种或多种选自c-fos、IL-1 β 、IL-8和p53的标志物基因的转录物水平在稳定化后被稳定了至少12h,至少24h,优选至少48h,并且其中,在一个实施方式中,所述稳定化组合物与所述含细胞样品的体积比选自10:1至1:20、5:1至1:15、1:1至1:10和1:2至1:5。

[0375] 在实施方式中,所述已灭菌组合物适合于额外稳定细胞特征,例如细胞表面特征和/或细胞形态。重要的是,被稳定的细胞保持完整并由此可以从被稳定的样品中分离。这参考上面的公开内容。在一个实施方式中,所述稳定化方法具有一个或多个以下的特征:

[0376] a) 所述稳定化允许从被稳定的样品中分离细胞;

[0377] b) 所述含细胞样品是血液样品,并且其中所述血液样品中包含的细胞被稳定化;

[0378] c) 所述含细胞样品是血液样品,并且其中白细胞被稳定化;

[0379] d) 保留细胞的形态;

[0380] e) 保留有核细胞的形态;

[0381] f) 所述样品是血液样品并且所含的淋巴细胞和/或单核细胞被稳定化;

[0382] g) 保留细胞表面表位;和/或

[0383] h) 保留细胞表面蛋白。

[0384] 根据一个实施方式,所述样品是血液样品,并且其中保留了白细胞、优选淋巴细胞上的形态和/或细胞表面表位。如上所述,如果存在的话,所述血液样品中包含的其他细胞

例如循环肿瘤细胞的特征也可以被保留。

[0385] 在稳定期之后,所述方法可以包含以下的一项或多项

[0386] a) 所述被稳定的样品经受核酸分析和/或检测方法;

[0387] b) 从所述被稳定的样品中分离细胞外核酸;

[0388] c) 从所述被稳定的样品中分离细胞外核酸并对分离的核酸进行分析和/或检测;

[0389] d) 除去所述被稳定的样品中包含的细胞;

[0390] e) 在进行核酸分离、分析和/或检测步骤之前,除去所述被稳定的样品中包含的细胞;

[0391] f) 从所述被稳定的样品中除去细胞,并从所述被稳定的样品的无细胞或贫细胞部分中分离细胞外核酸;

[0392] g) 储存 (i) 所述被稳定的样品, (ii) 细胞已被除去的所述被稳定的样品和/或 (iii) 从样品中除去的细胞;

[0393] h) 从所述被稳定的样品中除去细胞并丢弃;和/或

[0394] i) 从所述被稳定的样品中除去细胞并从由所述被稳定的样品中除去的细胞分离核酸;

[0395] j) 从所述被稳定的样品中除去细胞,并从由所述被稳定的样品中除去的细胞分离生物分子例如蛋白质和/或代谢物、核酸;

[0396] k) 从所述被稳定的样品中除去细胞,并从由所述被稳定的样品中除去的细胞分离核酸和生物分子,例如蛋白质和/或代谢物;

[0397] l) 从所述被稳定的样品中除去细胞,并使用尺寸选择性核酸分离方法从所述被稳定的样品的无细胞或贫细胞部分中分离细胞外核酸。

[0398] 因此,使用本发明的方法稳定的所述含细胞生物样品可以在核酸分析和/或检测方法中分析和/或可以被进一步处理。所述生物样品的稳定化可以紧跟有核酸分析技术,或者可以首先从所述被稳定的样品中分离出核酸。关于核酸分离和分析的细节也在下面结合本发明的第三方面进行描述,并参考所述公开内容。

[0399] 此外,正如所描述的,可以从所述被稳定的样品中去除细胞并进行分析,和/或可以从所获得的细胞中分离核酸。这允许例如鉴定肿瘤细胞。根据一个实施方式,从所述被稳定的样品中所含的细胞中分离细胞内RNA并进行分析。根据一个实施方式,所述方法包含对一种或多种基因转录物进行定性或定量分析。此外,在实施方式中,可以分析所述细胞的形态或细胞表面特征。

[0400] 根据一个实施方式,所述含细胞样品是血液样品,并且所述已灭菌的稳定化组合物实现了白细胞的稳定化。这允许从所述被稳定的样品中分离白细胞。如果至少一种类型的所含血细胞在所述稳定期期间被稳定化的话,则白细胞被稳定化,所述稳定期优选至少12h,更优选至少24h,更优选至少48h。根据一个实施方式,所述血液样品中含有的淋巴细胞和/或单核细胞被稳定化。在一个实施方式中,所述已灭菌组合物不诱导或促进所述含细胞样品中含有的有核细胞的裂解。因此,稳定化不是基于细胞裂解。优选地,当所述含细胞样品是血液并且目标核酸是细胞外核酸,特别是细胞外RNA时,所述已灭菌的稳定化组合物防止溶血。体外溶血的大部分原因与样本采集有关。然而,如果不使用适当的稳定化方法的话,体外溶血通常也在血液样品的离体储存期间发生。取决于目标细胞外核酸,溶血可能是

一个相当大的问题。如果目标细胞外核酸是DNA,则溶血不太成问题,因为红细胞不含核并因此不含基因组DNA。因此,在溶血期间红细胞不释放细胞内DNA。当目标细胞外核酸是DNA时,特别是白细胞的裂解或衰变是一个问题,因为在这种情况下,除细胞内RNA之外还释放基因组DNA。因此,当目标细胞外核酸是细胞外DNA时,特别必须防止白细胞的裂解。白细胞在它们的稳定性特征上可能彼此不同。因而,某些类型的白细胞比其他类型更稳定。然而,一般白细胞比红细胞显著更稳定。因此,红细胞的裂解并不一定表明白细胞被裂解。白细胞和红细胞对裂解的不同易感性也在本领域中用于例如具体裂解红细胞,同时保留白细胞以便允许例如采集白细胞。但是,如果目标胞外核酸是RNA的话,则溶血并因此红细胞裂解确实构成问题。成熟的红细胞也不含RNA,然而,它们的前体(网织红细胞)含有RNA。网织红细胞占红细胞约0.5%至1%,并含有大量的球蛋白RNA。因此,特别是当目标细胞外核酸是RNA时,为了减少细胞外核酸群体、特别是细胞外RNA群体被球蛋白mRNA稀释,应该防止/减少储存期间红细胞和因此网织红细胞的裂解。在一个实施方式中,可以通过所述已灭菌的稳定化组合物(关于可以使用本发明的教导进行灭菌的含有合适的半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物,例如参见W0 2014/146781)有效地防止/减少溶血。由此,基本上保留了所述细胞外核酸群体,并且此外,由于防止了溶血和细胞溶解,所述被稳定的血液样品,特别是从所述被稳定的血液样品获得的血浆或血清一般也适用于其他标准实验室分析。此外,防止白细胞裂解允许分离和分析相应的细胞。特别地,它允许从所述被稳定的样品中含有的白细胞或其他被保留的细胞中分离细胞内核酸,例如细胞内RNA。而且,当稳定包括无核细胞(例如网织红细胞)的细胞和细胞内核酸时,也可以例如分析这样的无核细胞的转录组。

[0401] C.用于分离细胞外核酸的方法

[0402] 根据第三方面,本发明提供了一种从被稳定的含细胞生物样品中分离细胞外核酸的方法,所述方法包括:

[0403] a) 根据本发明第二方面的方法稳定所述含细胞生物样品;以及

[0404] b) 分离细胞外核酸。

[0405] 在步骤a)中,根据本发明第二方面中描述的方法稳定含细胞样品中包含的细胞外核酸群体,其中使用如上所述的已灭菌的稳定化组合物。这参考上面也适用于此处的公开内容。

[0406] 如果所述含细胞生物样品包含大量的细胞,如例如在使用全血的情况下,优选将细胞与其余的样品分离,以便获得所述被稳定的样品的无细胞的、相应的细胞减少或贫细胞的部分,然后在步骤b)中从中分离细胞外核酸。因而,根据一个实施方式,在步骤a)和步骤b)之间从所述含细胞样品中除去细胞。如果处理仅包含少量的残留细胞的样品例如血浆或血清和/或其中目标细胞外核酸是DNA的话,可以取消这个中间步骤。由于本发明的稳定化,减少或甚至防止了在稳定期间从所含细胞释放的基因组DNA,此外,由于半胱天冬酶抑制剂,减少了基因组DNA的片段化。由于显著更大的尺寸,未片段化的基因组DNA可以与较小的细胞外DNA区分开来。这例如允许即使在未片段化的基因组DNA存在下,也能通过使用尺寸选择性分离方案来选择性分离细胞外DNA。然而,为了改善结果,优选在步骤b)中分离所述细胞外核酸之前从所述被稳定的样品中除去细胞(或潜在的剩余细胞),以便减少所述细胞外核酸群体被否则将在核酸分离期间从所述细胞释放的细胞内核酸污染。如果目标细胞外核酸是RNA,则除去所含细胞也是有利的,因为可能难以区分细胞内RNA与细胞外RNA,

并且此外,由此可以防止细胞外RNA的稀释。如果目标细胞外核酸是DNA的话,在步骤b)之前的细胞去除步骤通常也是有利的并因而是优选的,因为这允许在步骤b)中使用标准核酸分离程序。

[0407] 取决于含细胞生物样品的类型,可例如通过离心、例如中速离心,或者如果要避免离心步骤的话,通过使用离心以外的手段,例如过滤、沉降或结合于例如(任选磁性的)粒子上的表面,来分离和除去细胞,包括残留细胞。相应的细胞分离方法在现有技术中是公知的,因此不需要详细描述。相应的细胞除去步骤也可以被容易地包括在自动化样品制备方案中。如果需要,相应除去的细胞也可以被进一步处理。所述细胞可以例如被储存、分析和/或可以从所除去的细胞中分离生物分子例如核酸或蛋白质。此外,细胞内核酸(例如细胞内DNA和/或RNA)可以从含有的细胞中分离出来,例如在从剩余的样品中分离出所述细胞之后。例如,可以分离细胞内RNA并用于基因表达分析。对于这些实施方式,优选所述已灭菌组合物也稳定细胞内核酸,例如特别是如上所论述的RNA和/或细胞特征。这参考相应的公开内容。

[0408] 此外,包括其它中间步骤以便后处理(work-up)所述被稳定的样品也在本发明的范围内。

[0409] 在步骤b)中分离细胞外核酸,优选从所述被稳定的样品的无细胞、相应的贫细胞部分中分离细胞外核酸,例如从上清液中或者在所述被稳定的含细胞样品是血液样品的情况下,从血浆和/或血清中分离细胞外核酸。为了分离细胞外核酸,可以使用适用于从所述被稳定的样品、相应地所获得的贫细胞样品中分离核酸的任何已知的核酸分离方法。相应的纯化方法的实例包括但不限于提取、固相提取、基于二氧化硅的纯化方法、基于磁性粒子的纯化、苯酚-氯仿提取、色谱法、阴离子交换色谱法(使用阴离子交换表面)、电泳、过滤、沉淀及其组合。特异性分离特定的靶细胞外核酸,例如通过使用与固体载体偶联并能够实现序列特异性结合的适当探针来特异性分离特定的靶细胞外核酸,也在本发明的范围内。也可以使用技术人员已知的任何其他核酸分离技术。用于分离细胞外核酸的示例性方法描述于WO 2013/045432 A1中,其通过引用并入本文。WO 2013/045432 A1的细胞外核酸分离方法可以应用于根据本发明第三方面所述的方法中。

[0410] D. 用于处理和/或分析细胞外核酸的方法

[0411] 根据第四方面,本发明提供了一种用于处理和/或分析细胞外核酸的方法,所述方法包括:

[0412] a) 根据本发明第三方面的方法从被稳定的含细胞生物样品中分离细胞外核酸;以及

[0413] b) 对分离的细胞外核酸进行处理和/或分析。

[0414] 上文中描述了在步骤a)中用于分离细胞外核酸的根据第三方面所述的方法,参考也适用于此处的相应公开内容。在步骤b)中,然后对所述分离的细胞外核酸进行分析和/或进一步处理。这可以使用合适的测定法和/或分析方法来完成。例如,它们可以被鉴定、修饰、与至少一种酶接触、扩增、反转录、克隆、测序、与探针接触、检测(它们的存在或不存在)和/或可以被定量。相应的方法是现有技术中公知的并普遍应用于医疗、诊断和/或预后领域,以便分析细胞外核酸(也参见本发明的背景中的详细描述)。因此,在步骤a)中分离细胞外核酸之后,可以分析它们以例如鉴定疾病状态的存在、不存在或严重度,所述疾病状态包

括但不限于众多肿瘤疾病,特别是恶变前肿瘤和恶性肿瘤例如不同形式的肿瘤或癌症。例如,在许多应用领域,包括但不限于非侵入性产前遗传检测相应的筛查,疾病筛查,点突变、三染色体性、染色体畸变的筛查,病原体筛查,肿瘤学,癌症筛查,早期癌症筛查,癌症治疗监测,遗传检测(基因分型),感染性疾病检测,受伤诊断,创伤诊断,移植医学或许多其他疾病中,可以分析所述分离的细胞外核酸以便检测诊断性和/或预后性标志物(例如,胎儿或肿瘤来源的细胞外核酸),并因此具有诊断和/或预后相关性。根据一个实施方式,分析所述分离的细胞外核酸以鉴定和/或表征疾病或胎儿特征。因此,如上所论述,本文所述的分离方法还可以包含步骤c)核酸分析和/或处理。

[0415] 因此,根据一个实施方式,在步骤b)中分析所述分离的细胞外核酸以鉴定、检测、筛查、监测或排除疾病和/或至少一个胎儿特征。

[0416] E. 用于制造可灭菌组合物的方法

[0417] 根据第五方面,本发明提供了一种用于制造可灭菌组合物的方法,其中已灭菌形式的所述组合物适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体,所述方法包括:

[0418] a) 制备一种组合物,其包含:

[0419] i. 至少一种半胱天冬酶抑制剂,和

[0420] ii. 至少一种选自硫醇(优选是N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物。

[0421] 所述方法还可以包含:

[0422] b) 将所述组合物灭菌。

[0423] 所述方法可用于制造可灭菌组合物,如本发明第一方面的步骤a)中提供的那些,或根据本发明第六方面所述的可灭菌组合物。所述组合物的组分相互接触的顺序没有限制。例如,但不作为限制,可通过以下方式制备步骤a)中的组合物:首先制备包含一种或多种半胱天冬酶抑制剂的组合物,然后添加所述至少一种选自硫醇(优选是N-乙酰半胱氨酸和/或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物。如果需要,也可以在添加所述一种或多种半胱天冬酶抑制剂之前,添加所述至少一种选自硫醇(优选是N-乙酰半胱氨酸和/或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物。当制备液体组合物(例如含水组合物)时,为了方便起见可以首先提供液体(例如水),然而这不是要求的。同样,步骤a)中的组合物可以例如通过使待制备的组合物的各个组分同时或以任何顺序依次相互接触来制备。因此,所述组合物的组分可以互相接触。它们优选被混合而产生液体组合物,优选含水组合物。所述液体组合物可以是仅有单相的均匀混合物,但液体组合物包含固体组分例如沉淀物也在本发明的范围内。根据本发明的第五方面所述的方法的步骤a)可以对应于根据本发明的第一方面所述的方法的步骤a)。这参考上面的公开内容。在那里,还描述了所述稳定化组合物的合适和优选的实施方式以及可实现的稳定化特性。

[0424] 根据任意的步骤b),然后将所述组合物灭菌。灭菌可以通过辐照或其他合适的手段来实现。特别地,可以如上所述结合本发明第一方面的方法实现灭菌。这参考上面的公开内容。

[0425] F. 可灭菌组合物

[0426] 根据第六方面,本发明提供了一种可灭菌组合物,其中已灭菌形式的所述组合物适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体。所述组合物是本发明第一方面的方法的步骤a)中

提供的组合物。上文在论述根据第一方面所述的方法时已经描述了本发明的合适的可灭菌组合物,这参考相应的公开内容。特别参考上文关于该组合物的细节的公开内容,特别是上文论述的所包含的组分、其合适且优选的实施方式、以及合适且优选的浓度和其他特征。在实施方式中,所述可灭菌组合物适合于额外稳定细胞内核酸(特别是细胞内RNA和/或细胞内DNA(例如基因组DNA))。在实施方式中,所述可灭菌组合物适合于额外稳定细胞特征,例如细胞表面特征和/或细胞形态。上文描述了细节,参考上文的公开内容。

[0427] 优选地,所述组合物是已灭菌的。如所论述的,通过辐照例如 γ 辐照来灭菌是优选的。根据一个实施方式,所述组合物是通过根据本发明第一方面所述的方法可获得和/或获得的已灭菌组合物。因此,考虑了用根据本发明第一方面所述的方法制备的适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物,并且它是优选的。

[0428] 优选地,所述组合物是液体,更优选所述组合物是含水的。

[0429] 本发明第六方面的可灭菌组合物可用于稳定含细胞生物样品、优选血液样品中的细胞外核酸群体。在实施方式中,所述可灭菌组合物可用于额外稳定细胞内核酸(特别是细胞内RNA和/或细胞内DNA),优选基因表达谱。在实施方式中,所述可灭菌组合物可用于额外稳定细胞特征,例如,细胞表面特征和/或细胞形态。这参考上文的公开内容。

[0430] 有利地,所述组合物以已灭菌的形式使用。

[0431] G. 采集装置

[0432] 根据本发明的第七方面,还提供了用于采集含细胞生物样品、优选血液样品的采集装置。所述采集装置随后也被称为容器。

[0433] 所述装置包含根据本发明第六方面所述的组合物。因此,所述装置中包含的组合物可以是根据本发明第一方面所述的方法的步骤a)中提供的组合物。详情参考上文的公开内容。

[0434] 因此,在一个实施方式中,所述采集装置包含组合物,所述组合物优选是液体,更优选是含水的,并且它包含:

[0435] a) 一种或多种半胱天冬酶抑制剂,

[0436] b) 一种或多种选自硫醇(优选是N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其如上所论述的衍生物的化合物,其中优选地,所述组合物包含N-乙酰半胱氨酸,

[0437] c) 作为稳定剂的至少一种聚(氧乙烯)聚合物,其优选是分子量至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物,

[0438] 以及任选的一种或多种、优选两种或更多种选自以下的其它添加剂:

[0439] d) 至少一种其它聚(氧乙烯)聚合物,其分子量比所述第一聚(氧乙烯)聚合物的分子量低至少100、优选至少200、至少300或至少400,所述第一聚(氧乙烯)聚合物优选是高分子量聚(氧乙烯)聚合物,其中所述其它聚(氧乙烯)聚合物优选是分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物;

[0440] e) 至少一种伯、仲或叔酰胺;

[0441] f) 抗凝剂和/或螯合剂。

[0442] 优选地,所述稳定化组合物包含一种或多种本发明化合物,其浓度如上面在本发明的第一方面中论述特征ii时所公开的,更优选如上面表A中公开的。合适的化合物和浓度

也在表B中显示。特别优选使用N-乙酰半胱氨酸。

[0443] 因此,在一个实施方式中,所述采集装置包含组合物,所述组合物优选是液体,更优选是含水的,并且它包含:

[0444] a) 一种或多种半胱天冬酶抑制剂,优选泛半胱天冬酶抑制剂,更优选包含修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂,甚至更加优选选自;Q-VD-OPh、Z-VAD(OMe)-FMK和Boc-D-(OMe)-FMK的半胱天冬酶抑制剂,最优选Q-VD-OPh;

[0445] b) 一种或多种选自硫醇(优选是N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素(优选是维生素B6或抗坏血酸)、和维生素E或其如上所论述的衍生物的化合物,其中优选地,所述组合物包含N-乙酰半胱氨酸,

[0446] c) 至少一种作为稳定剂的聚(氧乙烯)聚合物,其中优选所述聚(氧乙烯)聚合物是聚乙二醇,更优选未取代的聚乙二醇;

[0447] 以及任选的一种或多种、优选两种选自以下的其它添加剂:

[0448] d) 至少一种伯、仲或叔酰胺;

[0449] e) 抗凝剂和/或螯合剂。

[0450] 在实施方式中,优选为聚乙二醇的所述至少一种聚(氧乙烯)聚合物选自低分子量聚(氧乙烯)聚合物,优选分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物,和/或分子量为至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物。

[0451] 优选地,所述稳定化组合物包含一种或多种本发明化合物,其浓度如上面在论述特征ii时所公开的,更优选如上面表A或表B中公开的。特别优选使用N-乙酰半胱氨酸。

[0452] 在另一个实施方式中,所述采集装置包含稳定化组合物,所述组合物优选是液体,更优选是含水的,并且它包含:

[0453] a) 至少一种半胱天冬酶抑制剂,优选泛半胱天冬酶抑制剂,更优选包含修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂。可以用醛、腈或酮化合物对所述半胱天冬酶特异性肽进行修饰。根据一个实施方式,用O-苯氧基(OPh)或氟甲基酮(FMK)基团,优选在羧基端,修饰所述半胱天冬酶特异性肽。根据一个实施方式,所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh、Boc-D-(OMe)-FMK和Z-VAD(OMe)-FMK。根据一个实施方式,所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh和Z-VAD(OMe)-FMK,最优选Q-VD-OPh。

[0454] b) 一种或多种以下化合物:

[0455] -N-乙酰半胱氨酸,浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml,

[0456] -还原形式的谷胱甘肽,浓度为0.03mg/ml至10mg/ml、0.04mg/ml至7.5mg/ml、0.075mg/ml至5mg/ml、0.15mg/ml至4mg/ml、0.3mg/ml至3mg、0.4mg/ml至2mg/ml、或0.4mg/ml至1.3mg/ml,和/或

[0457] -抗坏血酸,浓度小于20mg/ml,例如1mg/ml至15mg/ml、0.2mg/ml至14mg/ml、0.5mg/ml至13.5mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml、或2mg/ml至11mg/ml,

[0458] -B族维生素,优选维生素B6,浓度为0.1mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至14mg/ml、0.1mg/ml至11mg/ml、0.2mg/ml至7.5mg/ml、或0.2mg/ml至2mg/ml,

[0459] 所述组合物任选还包含一种或多种选自以下的组分:

[0460] c) 至少一种作为稳定剂的聚(氧乙烯)聚合物,其中优选所述聚(氧乙烯)聚合物是聚乙二醇,更优选未取代的聚乙二醇,

[0461] d) 至少一种伯、仲或叔酰胺,优选N,N-二烷基丙酰胺(例如N,N-二甲基丙酰胺)和/或丁酰胺,以及

[0462] e) 抗凝剂和/或螯合剂,优选EDTA。

[0463] 在实施方式中,优选为聚乙二醇的所述至少一种聚(氧乙烯)聚合物选自低分子量聚(氧乙烯)聚合物,优选分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物,和/或分子量为至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物。

[0464] 在另一个实施方式中,所述采集装置包含稳定化组合物,所述组合物优选是液体,更优选是含水的,并且它包含:

[0465] a) 至少一种半胱天冬酶抑制剂,优选泛半胱天冬酶抑制剂,更优选包含修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂。可以用醛、腈或酮化合物对所述半胱天冬酶特异性肽进行修饰。根据一个实施方式,用O-苯氧基(OPh)或氟甲基酮(FMK)基团,优选在羧基端,修饰所述半胱天冬酶特异性肽。根据一个实施方式,所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh、Boc-D-(OMe)-FMK和Z-VAD(OMe)-FMK。根据一个实施方式,所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh和Z-VAD(OMe)-FMK,最优选Q-VD-OPh。

[0466] b) 一种或多种以下化合物:

[0467] -N-乙酰半胱氨酸,浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml,

[0468] -还原形式的谷胱甘肽,浓度为0.03mg/ml至10mg/ml、0.04mg/ml至7.5mg/ml、0.075mg/ml至5mg/ml、0.15mg/ml至4mg/ml、0.3mg/ml至3mg、0.4mg/ml至2mg/ml、或0.4mg/ml至1.3mg/ml,和/或

[0469] -抗坏血酸,浓度小于20mg/ml,例如1mg/ml至15mg/ml、0.2mg/ml至14mg/ml、0.5mg/ml至13.5mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml、或2mg/ml至11mg/ml,

[0470] 所述组合物任选还包含一种或多种选自以下的组分:

[0471] c) 至少一种分子量为至少1500、优选在2000至40000范围内、更优选2500至30000、2500至25000或3000至20000的高分子量聚(氧乙烯)聚合物;

[0472] d) 至少一种伯、仲或叔酰胺,优选N,N-二烷基丙酰胺(例如N,N-二甲基丙酰胺)和/或丁酰胺,

[0473] e) 至少一种其它聚(氧乙烯)聚合物,其分子量比所使用的高分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量低至少100、优选至少200、至少300或至少400,并且其中所述其它聚(氧乙烯)聚合物优选是分子量为1000或更低、优选分子量在200至800或200至600范围内的低分子量聚(氧乙烯);以及

[0474] f) 抗凝剂和/或螯合剂,优选EDTA。

[0475] 在另一个实施方式中,所述采集装置包含稳定化组合物,所述组合物优选是液体,更优选是含水的,并且它包含:

[0476] a) 至少一种泛半胱天冬酶抑制剂,更优选包含如上所述的修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂,最优选Q-VD-OPh,

[0477] b) N-乙酰半胱氨酸, 浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml,

[0478] 所述组合物任选还包含:

[0479] c) 至少一种作为稳定剂的聚(氧乙烯)聚合物, 其中优选所述聚(氧乙烯)聚合物是聚乙二醇, 更优选未取代的聚乙二醇,

[0480] d) 至少一种伯、仲或叔酰胺, 优选N,N-二烷基丙酰胺(例如N,N-二甲基丙酰胺)和/或丁酰胺, 和

[0481] e) 抗凝剂和/或螯合剂, 优选EDTA。

[0482] 在实施方式中, 优选为聚乙二醇的所述至少一种聚(氧乙烯)聚合物选自低分子量聚(氧乙烯)聚合物, 优选分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物, 和/或分子量为至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物。

[0483] 在另一个实施方式中, 所述采集装置包含稳定化组合物, 所述组合物优选是液体, 更优选是含水的, 并且它包含:

[0484] a) 至少一种泛半胱天冬酶抑制剂, 更优选包含如上所述的修饰的半胱天冬酶特异性肽的半胱天冬酶抑制剂, 最优选Q-VD-OPh,

[0485] b) N-乙酰半胱氨酸, 浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml,

[0486] 所述组合物任选还包含:

[0487] c) 至少一种分子量为至少1500、优选在2000至40000范围内、更优选2500至30000、2500至25000或3000至20000的高分子量聚(氧乙烯)聚合物;

[0488] d) 至少一种伯、仲或叔酰胺, 优选N,N-二烷基丙酰胺(例如N,N-二甲基丙酰胺)和/或丁酰胺,

[0489] e) 至少一种其它聚(氧乙烯)聚合物, 其分子量比所使用的高分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量低至少100、优选至少200、至少300或至少400, 并且其中所述其它聚(氧乙烯)聚合物优选是分子量为1000或更低、优选分子量在200至800或200至600范围内的低分子量聚(氧乙烯); 以及

[0490] f) 任选的抗凝剂和/或螯合剂, 优选EDTA。

[0491] 所述采集装置中包含的所述组合物可以根据本发明第一方面所述的方法的步骤a)中所描述的来提供和例如制备, 直接提供和例如制备在所述采集装置中, 或者可在制备后将其填充到所述采集装置中。

[0492] 提供包含根据本发明第六方面所述的组合物的相应采集装置, 例如容器, 例如样品采集管, 优选采血管, 具有的优点在于一旦将所述含细胞生物样品采集在相应的装置中, 就立即稳定所述样品。

[0493] 所述采集容器中包含的用于稳定化的所述稳定化组合物和/或各个化合物可以液体、半液体或干燥形式提供。用于稳定化的化合物也可以在所述容器中作为分开的实体提供, 并且也可以在所述容器中以不同的形式提供。例如, 一种组分可以干燥形式提供, 而另一种化合物可以作为液体提供。其他组合也是可行的。合适的配制和制造选项是技术人员

已知的。使用固体稳定化组合物的优点是固体通常在化学上比液体更稳定。根据一个实施方式,所述容器的内壁用本发明的稳定化组合物或用其单个组分例如所述抗凝剂处理/覆盖。所述组合物或组分可以使用例如喷雾干燥法施加于内壁。可以对所述稳定化组合物进行液体去除技术以获得基本上固态的保护性组合物。PCT/EP2015/055699中描述了这样的液体去除条件和技术,参考该公开内容。

[0494] 然而如上所解释的,优选所述稳定化组合物以液体形式、优选含水形式提供。这在辐照灭菌方面具有优点,并且对于特定的样品例如血液样品也具有优点。液体组合物具有的优点在于:可以快速获得与所述待稳定的含细胞生物样品的混合物,从而一旦所述样品与所述液体稳定化组合物接触就基本上立即提供稳定效应。此外,如果使用大量的稳定化组合物,因此不能或难以喷雾干燥,或者如果所述组合物妨碍提供干燥组合物,则液体组合物是有利的。

[0495] 所述容器中包含的稳定化组合物的量能够有效提供待采集在所述容器中的样品量的稳定化。根据一个实施方式,所述液体稳定化组合物以选自以下的体积比与生物样品接触:10:1至1:20、5:1至1:15、1:1至1:10、1:4至1:10和1:5至1:9,特别是约1:6至1:8。

[0496] 优选地,所述采集装置是可灭菌的,更优选地它可使用根据本发明第一方面所述的方法灭菌。再次,详情参考上面在本发明的第一方面中的公开内容,它也在此适用。因此,非常优选辐照包含液体、优选含水形式的组合物的采集装置。如果所述采集装置最初包含固体形式的组合物,则可以在辐照之前使所述组合物成为液体形式。

[0497] 所述装置和其中包含的组合物可以一起灭菌,例如以根据本发明第一方面所述的方法进行灭菌。这有利地允许提供样品采集即用型已灭菌的终端产品。

[0498] 因此优选地,所述装置是已灭菌的。更优选地,所述装置是通过根据本发明第一方面所述的方法可获得和/或获得的已灭菌的装置。因此,考虑了包含利用根据本发明第一方面所述的方法制备的适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物的装置,并且该装置是优选的。

[0499] 所述采集装置可以被抽真空。所述抽真空优选能够有效地用于将特定体积的含细胞的流体生物样品抽入内部。从而确保了使正确量的样品与所述容器中包含的预填充量的稳定化组合物接触,并且因此所述稳定化是有效的。根据一个实施方式,所述容器包含具有由隔膜密封的开口端的管。例如,所述容器预填充有有限量的固定或液体形式的稳定化组合物,并提供有限定的真空并用隔膜密封。隔膜被构造成使它与标准采样配件(例如套管等)相容。当与例如套管接触时,由真空预先确定的样品量被采集在容器中。相应的实施方式对于采集血液来说特别有利。合适的容器是例如在US 6,776,959中公开的。

[0500] 所述容器可以由玻璃、塑料或其他合适的材料制成。塑料材料可以是不透氧材料或可以包含不透氧层。或者,所述容器可以由透气塑料材料制成。本发明的容器优选由透明材料制成。合适的透明热塑性材料的实例包括聚碳酸酯、聚乙烯、聚丙烯和聚对苯二甲酸乙二醇酯。所述容器可具有根据需要采集的生物样品的体积而选择的合适尺寸。如上所述,优选地,所述容器被抽真空至内部压力低于大气压。这样的实施方式特别适用于采集诸如全血的体液。所述压力优选被选择成将预定体积的生物样品抽入所述容器中。除了这样的真空管之外,还可以使用非真空管、机械分离器管或凝胶阻隔管作为样品容器,特别是用于采集血液样品。合适的容器和封盖装置的实例公开于US 5,860,397和US 2004/0043505中。作

为用于采集含细胞样品的容器,也可以使用其他采集装置,例如注射器、尿液采集装置或别的采集装置。所述容器的类型也可以取决于待采集的样品类型,并且合适的容器也是技术人员可得到的。

[0501] 根据一个实施方式,所述容器具有开放的顶部、底部和在其间延伸的限定腔室的侧壁,其中所述腔室中包含根据本发明第六方面所述的组合物或在根据本发明第一方面所述的方法的步骤a)中提供的组合物。它可以以液体或固体形式包含在其中。根据一个实施方式,它是液体,优选含水液体。根据一个实施方式,所述容器是管,所述底部是封闭的底部,所述容器还在开放的顶部中包含封闭件,并且所述腔室处于降低的压力下。上面描述了所述腔室内降低的压力的优点。优选地,所述封闭件能够用针或套管刺穿,并且所述降低的压力被选择成将特定体积的液体样品抽入所述腔室中。根据一个实施方式,所述腔室处于降低的压力下,所述降低的压力被选择成将特定体积的液体样品抽入所述腔室中,并且所述稳定化组合物是液体并被布置在所述腔室中,使得所述稳定化组合物与所述特定体积的含细胞样品的体积比选自10:1至1:20、5:1至1:15和1:1至1:10,并优选是1:5至1:10,更优选1:6至1:8。相关的优点在上文描述并且也在PCT/EP2015/055699中论述。

[0502] 优选地,所述容器用于从患者抽取血液。根据一个实施方式,它用于从患者抽取10ml血液。根据一个实施方式,所述稳定化组合物是液体,并且体积是2ml或更少,并且可以位于0.5ml至2ml、0.75ml至1.75ml和1ml至1.5ml的范围内。

[0503] 还提供了一种方法,所述方法包括将生物样品、优选血液直接从患者采集、优选抽取到根据本发明第七方面所述的装置或容器的腔室中的步骤。

[0504] H. 试剂盒

[0505] 根据第八方面,本发明提供了一种试剂盒,其包含根据本发明第六方面所述的组合物或根据本发明第七方面所述的采集装置。所述试剂盒还可以包含其它组分,例如用于分离细胞外核酸的试剂。

[0506] I. 用途

[0507] 根据第九方面,本发明涉及至少一种选自硫醇(优选N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物在灭菌、特别是辐照灭菌期间保护适用于稳定生物样品或其组分的细胞外核酸群体的组合物中的应用。这些化合物如上所述特别适合于在辐照期间保护所含有的半胱天冬酶抑制剂免于降解。当使用这些化合物中的一种或多种时,降解程度显著降低。辐照可以优选是电离辐照,更优选 γ 辐照、电子束辐照或X射线,最优选 γ 辐照。所应用的辐照和/或灭菌条件可以如上面关于本发明第一方面所论述的。

[0508] 根据本发明第一方面所述的方法中关于合适的本发明化合物和化合物的组合以及合适的浓度的公开内容也适用于本方面。所述化合物可以例如选自N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽(优选还原形式)、抗坏血酸和/或trolox。N-乙酰半胱氨酸是高度优选的。上文也描述了合适的浓度,并且所述化合物可以例如但不限于按如上表A指示的浓度应用。上表B中也指示了合适的浓度。

[0509] 所述半胱天冬酶抑制剂特别可以选自Q-VD-OPh、Boc-D-(OMe)-FMK和Z-VAD(OMe)-FMK。所述半胱天冬酶抑制剂可以选自Q-VD-OPh和Z-VAD(OMe)-FMK,最优选地,所述半胱天冬酶抑制剂是Q-VD-OPh。

[0510] J.其它方面

[0511] 根据第十方面,本发明提供了至少一种自由基清除剂在辐照期间保护样品采集装置、特别是采血管中包含的含水组合物的应用。

[0512] 根据第十一方面,提供了样品采集装置中包含的含水组合物的灭菌方法,所述方法包括:

[0513] a) 制备所述样品采集装置中包含的含有至少一种自由基清除剂的含水组合物,以及

[0514] b) 将所述组合物通过辐照灭菌。

[0515] 本发明的第十和第十一方面的所述含水组合物可以是用于稳定生物样品、例如含细胞生物样品、优选血液中包含的组分的组合物。目标生物样品的实例已经在本发明的第一方面中描述,并且由所述含水组合物稳定的样品可以是这样的样品。优选地,所述待保护的含水组合物包含半胱天冬酶抑制剂。所述半胱天冬酶抑制剂可以是如W0 2013/045457 A1或W0 2013/045458 A1中公开的抑制剂。合适的半胱天冬酶抑制剂和浓度已经在上面本发明的第一方面中公开。参考该公开内容,它也适用于此。并且,合适且优选的含水组合物已经在上面本发明的第一方面中公开。该公开内容也适用于此,意味着根据第一方面所述的含水组合物是可用于本发明的第十和第十一方面的含水组合物的实例。所述含水组合物特别可以是用于稳定循环的肿瘤细胞、循环的无细胞RNA、循环的无细胞miRNA、病毒和/或外来体的组合物。稳定化可以便于后续的分选、分析和/或诊断。循环的肿瘤细胞是患有癌症的哺乳动物和人类中特别关心的。分析循环肿瘤细胞可以例如提供关于肿瘤负荷、肿瘤分期和/或形成远处转移的信息。循环的无细胞RNA和循环的无细胞miRNA是细胞外核酸群体的实例。病毒可以是例如来自被病毒感染的哺乳动物或人类的生物样品中含有的。外来体是细胞衍生的囊泡,其存在于许多生物流体、包括血液和尿液中。外来体例如参与凝血和细胞间信号传导。分析无细胞RNA和miRNA可用于鉴定循环生物标志物、检测体细胞突变和致癌基因表达。在实施方式中,所述已灭菌的含水组合物适合于稳定细胞内核酸(特别是细胞内RNA和/或细胞内DNA)。在实施方式中,所述已灭菌的含水组合物适合于额外稳定细胞特征,例如细胞表面特征和/或细胞形态。这样的组合物和稳定化特性的细节在上文描述,并参考上面也适用于此的公开内容。

[0516] 根据第十和第十一方面所述的至少一种自由基清除剂可以是能够与生物系统中的自由基反应的化合物。它特别可以是至少一种选自硫醇(如N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽)、水溶性维生素、和维生素E或其衍生物的化合物,如本发明第一方面中所述。合适的化合物和浓度可以如本发明第一方面中所述并应用。优选地,所述至少一种自由基清除剂具有在辐照期间保护含水组合物的活性,从而降低或消除由于辐照导致的所述含水组合物的稳定化功能降低。在减少或消除稳定化功能降低上的活性可以通过将包含所述至少一种自由基清除剂的已灭菌的含水组合物和与待测组合物组成相同并且不同之处优选只在于不包含所述至少一种自由基清除剂的已灭菌的含水组合物的稳定化功能进行比较来确定。

[0517] 在上面本发明的第七方面中已经描述了可以在本发明第十和第十一方面中使用的合适的样品采集装置,并且该描述也适用于此。因此,所述采集装置可以被抽真空。它可以由玻璃、塑料或其他合适的材料制成。根据一个实施方式,所述采集装置或容器可具有开放的顶部、底部、和在其间延伸的限定腔室的侧壁,腔室中包含所述含水组合物。

[0518] 已经在上面结合第三方面描述了从被稳定的含细胞生物样品、例如血液样品中分离细胞外核酸的方法。根据另一方面,提供了用于从被稳定的含细胞生物样品中分离核酸的方法,所述方法包括:

[0519] a) 稳定含细胞生物样品,其中稳定化包括

[0520] i) 根据本发明第一方面的方法获得已灭菌组合物;或者

[0521] ii) 获得根据本发明第六方面所述的组合物,其中对所述组合物进行灭菌;或

[0522] iii) 获得根据本发明第七方面所述的样品采集装置,其中对所述样品采集装置中包含的组合物进行灭菌;

[0523] 并将所述含细胞生物样品与所述已灭菌组合物接触;以及

[0524] b) 从所述被稳定的样品中分离核酸。

[0525] 上文详细描述了关于所述已灭菌的稳定化组合物以及它们的稳定化性质的细节,并且参考上文也适用于此的公开内容。在步骤b)中,可以从所述被稳定的样品中分离细胞内核酸和/或细胞外核酸。上面结合本发明的第三方面描述了合适的分离方法,并参考也适用于此的相应公开内容。在实施方式中,在分离核酸之前,从所述含细胞的被稳定样品中除去细胞。在实施方式中,例如在所述细胞与剩余的样品分离之后,从所含的细胞分离细胞内核酸(例如DNA和/或RNA)。例如,可以分离RNA并用于基因表达分析。细节在上文描述并参考相应的公开内容。

[0526] 所述分离的核酸然后可以在步骤c)中使用合适的测定法和/或分析方法分析和/或进一步处理。

[0527] 根据另一方面,提供了用于从被稳定的含细胞生物样品中分离细胞的方法,所述方法包括:

[0528] a) 稳定含细胞生物样品,其中稳定化包括

[0529] i) 根据本发明第一方面的方法获得已灭菌组合物;或者

[0530] ii) 获得根据本发明第六方面所述的组合物,其中对所述组合物进行灭菌;或

[0531] iii) 获得根据本发明第七方面所述的样品采集装置,其中对所述样品采集装置中包含的组合物进行灭菌;

[0532] 并将所述含细胞生物样品与所述已灭菌组合物接触;以及

[0533] b) 从所述被稳定的样品中分离细胞。

[0534] 所述分离的细胞可以被例如进一步分析。如上所论述,在实施方式中,所述已灭菌的稳定化组合物还保留细胞表面特征(例如细胞表面表位或蛋白质)和/或细胞形态。细节在上文描述并参考上文也适用于此的公开内容。

[0535] 根据另一方面,提供了一种方法,其包含将来自患者的样品直接采集到根据本发明第七方面所述的采集装置的腔室中的步骤。上文描述了关于所述采集装置和样品的细节。这参考相应的公开内容。根据一个实施方式,采集血液样品,优选从患者抽取血液样品。

[0536] 本发明不受本文中公开的示例性方法和材料限制,并且与本文中描述的方法和材料相似或等效的任何方法和材料均可用于实践或测试本发明的实施方式。数值范围包括限定所述范围的数值。本文中提供的标题不限制本发明的各种方面或实施方式,本发明可通过将说明书作为一个整体进行参考来理解。

[0537] 在本说明书和权利要求书中使用时,不带数量指示的指称物包括复数的情况,除

非上下文明确地另有规定。因此,例如,提及“半胱天冬酶抑制剂”包括单一类型的半胱天冬酶抑制剂以及两种或更多种半胱天冬酶抑制剂。提到“公开内容”和“发明”等包括本文中教导的单个或多个方面;等等。本文中教导的方面被术语“发明”涵盖。

[0538] 在本说明书中使用时,表述“约”旨在表示给定值 $\pm 10\%$ 。

[0539] 根据一个实施方式,在本文中描述为在方法的情况下包含某些步骤或在组合物、溶液和/或缓冲液的情况下包含某些成分的主题是指由相应的步骤或成分组成的主题。优选选择和组合本文中描述的优选实施方式,并且由优选实施方式的相应组合产生的特定主题也属于本公开。

[0540] 还公开了以下各项:

[0541] 1.一种制造适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物的方法,所述方法包括:

[0542] a) 提供一种组合物,其包含:

[0543] i. 至少一种半胱天冬酶抑制剂,和

[0544] ii. 至少一种选自硫醇和维生素或其衍生物的化合物;以及

[0545] b) 辐照所述组合物进行灭菌。

[0546] 2. 项目1的方法,所述方法包括:

[0547] a) 提供一种组合物,其包含:

[0548] i. 至少一种半胱天冬酶抑制剂,和

[0549] ii. 至少一种选自硫醇、水溶性维生素或其衍生物、和脂溶性维生素的水溶性衍生物的化合物;以及

[0550] b) 辐照所述组合物进行灭菌。

[0551] 3. 项目1或2的方法,所述方法包括

[0552] a) 提供一种组合物,其包含:

[0553] i. 至少一种半胱天冬酶抑制剂,和

[0554] ii. 至少一种选自硫醇、水溶性维生素或其衍生物、和脂溶性维生素的水溶性衍生物的化合物,所述硫醇为N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽,任选地其中所述至少一种化合物选自硫醇、水溶性维生素和水溶性维生素E衍生物,所述硫醇为N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽;以及

[0555] b) 辐照所述组合物进行灭菌。

[0556] 4. 根据项目1至3的一项或多项所述的方法,其中辐照所述组合物进行灭菌具有以下特征中的一个或多个:

[0557] a) 通过电离辐照来辐照所述组合物;

[0558] b) 通过 γ 辐照、电子束辐照或X射线来辐照所述组合物;

[0559] c) 通过 γ 辐照或X射线来辐照所述组合物;

[0560] d) 通过 γ 辐照来辐照所述组合物;

[0561] e) 以5kGy至35kGy、6kGy至30kGy、7kGy至26kGy、约8kGy至约25kGy、或约8kGy至约15kGy的辐照剂量来辐照所述组合物;

[0562] f) 以5kGy至35kGy、6kGy至30kGy、7kGy至26kGy、约8kGy至约25kGy、或约8kGy至约15kGy的辐照剂量通过 γ 辐照来辐照所述组合物;

[0563] g) 以8kGy至25kGy、或8kGy至15kGy的辐照剂量通过 γ 辐照来辐照所述组合物;和/或

[0564] h) 辐照灭菌导致所述组合物的无菌性保证水平 (SAL) 为 10^{-6} 或更低。

[0565] 5. 根据项目1至4的一项或多项所述的方法, 其中所述组合物具有以下特征中的一个或多个:

[0566] a) 所述组合物以固体形式制备;

[0567] b) 所述组合物以固体形式制备并在辐照前溶解以提供液体组合物, 所述液体组合物优选是含水的;

[0568] d) 所述组合物以液体形式制备和辐照;

[0569] e) 所述组合物是含水的;

[0570] f) 所述组合物具有酸性pH;

[0571] g) 所述组合物具有pH 4.0至7.0、pH 4.1至6.9、pH 4.2至6.8、pH 4.3至6.6、pH 4.4至6.3、pH 4.5至6.0、或pH 4.5至5.5, 和/或

[0572] h) 所述组合物是经缓冲的。

[0573] 6. 根据项目1至5的一项或多项所述的方法, 其包含辐照液体形式、优选含水形式的所述组合物。

[0574] 7. 根据项目1至6的一项或多项所述的方法, 其中所述组合物包含浓度小于20mg/ml、15mg/ml或更低、10mg/ml或更低、7mg/ml或更低、3mg/ml或更低、或1.5mg/ml或更低的所述至少一种选自硫醇、水溶性维生素或其衍生物、和脂溶性维生素的水溶性衍生物的化合物, 所述硫醇为N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽。

[0575] 8. 根据项目1至7的一项或多项所述的方法, 其中所述组合物包含

[0576] i. 选自N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、B族维生素、抗坏血酸或其衍生物和trolox的化合物, 其中所述谷胱甘肽优选是还原形式, 所述B族维生素优选是维生素B6;

[0577] ii. 选自N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、抗坏血酸或其衍生物、和trolox的化合物, 其中所述谷胱甘肽优选是还原形式;

[0578] iii. 选自N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、B族维生素、和抗坏血酸的化合物, 其中所述谷胱甘肽优选是还原形式, 所述B族维生素优选是维生素B6;

[0579] iv. 选自N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽、和抗坏血酸或其衍生物的化合物, 其中所述谷胱甘肽优选是还原形式; 或

[0580] v. N-乙酰半胱氨酸。

[0581] 9. 根据项目1至8的一项或多项所述的方法, 所述方法包括:

[0582] a) 提供一种组合物, 其包含:

[0583] i. 至少一种半胱天冬酶抑制剂, 优选如项目15中限定的, 和

[0584] ii. 下列中的至少一种

[0585] aa) N-乙酰半胱氨酸, 浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml;

[0586] ab) 谷胱甘肽, 浓度为0.03mg/ml至10mg/ml、0.04mg/ml至7.5mg/ml、0.075mg/ml至5mg/ml、0.15mg/ml至4mg/ml、0.3mg/ml至3mg、0.4mg/ml至2mg/ml、或0.4mg/ml至1.3mg/ml,

其中所述谷胱甘肽优选是还原形式；

[0587] ac) 抗坏血酸或其衍生物, 浓度小于20mg/ml, 例如0.1mg/ml至15mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml、或2mg/ml至11mg/ml；

[0588] ad) B族维生素, 优选维生素B6, 浓度为0.1mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至14mg/ml、0.1mg/ml至11mg/ml、0.2mg/ml至7.5mg/ml、或0.2mg/ml至2mg/ml；

[0589] ae) trolox, 浓度为0.5mg/ml至5mg/ml、0.75mg/ml至3mg/ml、0.9mg/ml至2mg/ml、或1mg/ml至1.4mg/ml；以及

[0590] b) 辐照所述组合物进行灭菌,

[0591] 其中优选地, 所述组合物包含浓度如aa)中限定的N-乙酰半胱氨酸。

[0592] 10. 根据项目9所述的方法, 其中所述组合物以液体形式、优选含水形式被辐照和/或其中所述组合物通过 γ 辐照进行辐照灭菌。

[0593] 11. 根据项目1至10的一项或多项所述的方法, 其中所述组合物具有以下特征中的一个或多个:

[0594] a) 所述组合物包含N-乙酰半胱氨酸;

[0595] b) 所述组合物包含浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml的N-乙酰半胱氨酸;

[0596] c) 所述组合物包含N-乙酰半胱氨酸, 并以液体形式、优选含水形式通过辐照进行灭菌; 和/或

[0597] d) 所述组合物包含浓度为0.05mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至10mg/ml、0.1mg/ml至7.5mg/ml、0.1mg/ml至5mg/ml、0.1mg/ml至2mg/ml、0.2mg/ml至1mg/ml、或0.3mg/ml至0.8mg/ml的N-乙酰半胱氨酸, 并以含水的液体形式灭菌。

[0598] 12. 根据项目1至11的一项或多项所述的方法, 其中所述组合物具有以下特征中的一个或多个:

[0599] a) 所述组合物包含谷胱甘肽;

[0600] b) 所述组合物包含还原形式的谷胱甘肽;

[0601] c) 所述组合物包含浓度为0.03mg/ml至10mg/ml、0.04mg/ml至7.5mg/ml、0.075mg/ml至5mg/ml、0.15mg/ml至4mg/ml、0.3mg/ml至3mg、0.4mg/ml至2mg/ml、或0.4mg/ml至1.3mg/ml的谷胱甘肽, 其中所述谷胱甘肽优选是还原形式;

[0602] d) 所述组合物包含谷胱甘肽并以液体形式、优选含水形式灭菌, 其中所述谷胱甘肽优选是还原形式; 和/或

[0603] e) 所述组合物包含浓度为0.03mg/ml至10mg/ml、0.04mg/ml至7.5mg/ml、0.075mg/ml至5mg/ml、0.15mg/ml至4mg/ml、0.3mg/ml至3mg、0.4mg/ml至2mg/ml、或0.4mg/ml至1.3mg/ml的谷胱甘肽并以含水的液体形式灭菌, 其中所述谷胱甘肽优选是还原形式。

[0604] 13. 根据项目1至12的一项或多项所述的方法, 其中所述组合物具有以下特征中的一个或多个:

[0605] a) 所述组合物包含至少一种水溶性维生素或其衍生物, 其中优选所述水溶性维生素选自抗坏血酸或其衍生物、维生素B1、维生素B2、维生素B3、维生素B6、叶酸盐或叶酸、维生素B12、生物素和泛酸, 更优选其中所述组合物包含抗坏血酸;

[0606] b) 所述组合物包含浓度小于20mg/ml,例如0.1mg/ml至15mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml、或2mg/ml至11mg/ml的至少一种水溶性维生素或其衍生物,优选选自抗坏血酸、维生素B1、维生素B2、维生素B3、维生素B6、叶酸盐或叶酸、维生素B12、生物素和泛酸,更优选抗坏血酸或其衍生物;

[0607] c) 所述组合物包含至少一种水溶性维生素或其衍生物并以液体形式、优选含水形式灭菌;

[0608] d) 所述组合物包含抗坏血酸并以液体形式、优选含水形式灭菌;

[0609] e) 所述组合物包含浓度小于20mg/ml,例如0.1mg/ml至15mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml或2mg/ml至11mg/ml mg/ml的至少一种水溶性维生素或其衍生物,并以液体形式、优选含水形式灭菌;

[0610] f) 所述组合物包含浓度小于20mg/ml的抗坏血酸或其衍生物,其中所述浓度可选自0.1mg/ml至15mg/ml、1mg/ml至13mg/ml、1.5mg/ml至12mg/ml、或2mg/ml至11mg/ml,并且其中所述组合物以液体形式、优选含水形式通过辐照进行灭菌;

[0611] g) 所述组合物包含浓度为0.1mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至14mg/ml、0.1mg/ml至11mg/ml、0.2mg/ml至7.5mg/ml、或0.2mg/ml至2mg/ml的B族维生素,优选维生素B6;和/或

[0612] h) 所述组合物包含浓度为0.1mg/ml至15mg/ml、0.1mg/ml至14mg/ml、0.1mg/ml至11mg/ml、0.2mg/ml至7.5mg/ml、或0.2mg/ml至2mg/ml的B族维生素,优选维生素B6,并且其中所述组合物以液体形式、优选含水形式通过辐照进行灭菌。

[0613] 14. 根据项目1至13的一项或多项所述的方法,其中所述组合物具有以下特征中的一个或多个:

[0614] a) 所述组合物包含脂溶性维生素的水溶性衍生物,其中任选所述脂溶性维生素选自维生素E、维生素D、维生素A和维生素K;

[0615] b) 所述组合物包含水溶性维生素E衍生物,其中优选所述水溶性维生素E衍生物是trolox;

[0616] c) 所述组合物包含trolox;

[0617] d) 所述组合物包含浓度为0.5mg/ml至5mg/ml、0.75mg/ml至3mg/ml、0.9mg/ml至2mg/ml、或1mg/ml至1.4mg/ml的脂溶性维生素的水溶性衍生物,优选水溶性维生素E衍生物,更优选trolox;

[0618] e) 所述组合物包含脂溶性维生素的水溶性衍生物并以液体形式、优选含水形式通过辐照进行灭菌;

[0619] f) 所述组合物包含水溶性维生素E衍生物,优选trolox,并以液体形式、优选含水形式灭菌;

[0620] g) 所述组合物包含浓度为0.5mg/ml至5mg/ml、0.75mg/ml至3mg/ml、0.9mg/ml至2mg/ml、或1mg/ml至1.4mg/ml的脂溶性维生素的水溶性衍生物,并以液体形式、优选含水形式灭菌;和/或

[0621] h) 所述组合物包含浓度为0.5mg/ml至5mg/ml、0.75mg/ml至3mg/ml、0.9mg/ml至2mg/ml、或1mg/ml至1.4mg/ml的水溶性维生素E衍生物,任选trolox,并以液体形式、优选含水形式灭菌。

[0622] 15. 根据项目1至14的一项或多项所述的方法,其中所述半胱天冬酶抑制剂具有以

下特征中的一个或多个：

- [0623] a) 所述半胱天冬酶抑制剂是泛半胱天冬酶抑制剂；
- [0624] b) 所述半胱天冬酶抑制剂包含修饰的半胱天冬酶特异性肽；
- [0625] c) 所述半胱天冬酶抑制剂包含修饰的半胱天冬酶特异性肽，所述肽用O-苯氧基(OPh)基团、优选在羧基端进行修饰；
- [0626] d) 所述半胱天冬酶抑制剂包含修饰的半胱天冬酶特异性肽，所述肽用谷氨酰胺(Q)基团、优选在N-端进行修饰；
- [0627] e) 所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh、Boc-D-(OMe)-FMK和Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK；
- [0628] f) 所述半胱天冬酶抑制剂选自Q-VD-OPh和Z-Val-Ala-Asp(OMe)-FMK；和/或
- [0629] g) 所述半胱天冬酶抑制剂是Q-VD-OPh。

[0630] 16. 根据项目1至15的一项或多项所述的方法，其中所述组合物还包含以下的一种或多种：

- [0631] a) 抗凝剂和/或螯合剂，优选EDTA；
- [0632] b) 作为稳定剂的聚(氧乙烯)聚合物；和/或
- [0633] c) 至少一种伯、仲或叔酰胺。

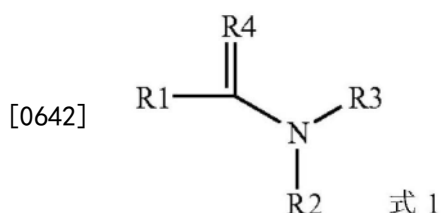
[0634] 17. 根据项目1至16的一项或多项所述的方法，其中所述组合物还包含至少一种聚(氧乙烯)聚合物，任选地其中所述组合物具有以下特征中的一个或多个：

- [0635] a) 所述聚(氧乙烯)聚合物是聚乙二醇，优选未取代的聚乙二醇；
- [0636] b) 所述组合物包含聚(氧乙烯)聚合物，其是分子量为至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物；
- [0637] c) 所述组合物包含至少一种分子量低于1500的聚(氧乙烯)聚合物，优选分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物，更优选所述分子量位于选自100至800、150至700、200至600和200至500的范围内；
- [0638] d) 所述组合物包含作为分子量为至少1500的高分子量聚(氧乙烯)聚合物的聚(氧乙烯)聚合物，以及至少一种其它聚(氧乙烯)聚合物，所述其它聚(氧乙烯)聚合物的分子量比所述高分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量低至少100、优选至少200、至少300或至少400，其中所述其它聚(氧乙烯)聚合物优选是分子量为1000或更低的低分子量聚(氧乙烯)聚合物；和/或

[0639] e) 所述组合物包含作为高分子量聚(氧乙烯)聚合物的聚(氧乙烯)聚合物和作为低分子量聚(氧乙烯)聚合物的聚(氧乙烯)聚合物，其中所述高分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量位于选自1500-50000、1500至40000、2000至30000、2500至25000、3000至20000、3500至15000和4000至12500的范围内，和/或其中所述低分子量聚(氧乙烯)聚合物的分子量为1000或更低并且其中优选所述分子量位于选自100至1000、150至800、150至700、200至600和200至500的范围内。

[0640] 18. 根据项目1至17的一项或多项所述的方法，其中所述组合物还包含至少一种伯、仲或叔酰胺，任选地其中所述组合物具有以下特征中的一个或多个：

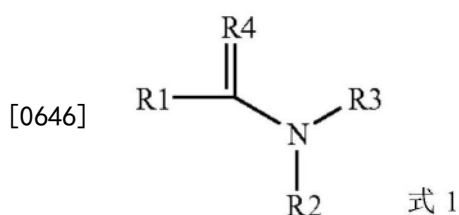
- [0641] a) 所述组合物包含至少一种式1的伯、仲或叔酰胺



[0643] 其中R1是氢基团或烷基基团,优选C1-C5烷基基团、C1-C4烷基基团或C1-C3烷基基团,更优选C1-C2烷基基团,R2和R3是相同或不同的并且选自氢基团和碳链长度为1-20个原子的以直链或支链方式排列的烃基团,优选烷基基团,并且R4是氧、硫或硒基团,优选R4是氧;和/或

[0644] b) 所述组合物包含N,N-二烷基丙酰胺,优选N,N-二甲基丙酰胺,和/或丁酰胺。

[0645] 19. 根据项目1至18的一项或多项所述的方法,其中所述组合物包含至少一种式1的化合物



[0647] 其中R1是氢基团或烷基基团,优选C1-C5烷基基团、C1-C4烷基基团或C1-C3烷基基团,更优选C1-C2烷基基团,R2和R3是相同或不同的并且选自氢基团和碳链长度为1-20个原子的以直链或支链方式排列的烃基团,优选烷基基团,并且R4是氧、硫或硒基团,优选R4是氧。

[0648] 20. 根据项目19所述的方法,其中所述至少一种式1的化合物是伯、仲或叔羧酸酰胺。

[0649] 21. 根据项目1至20的一项或多项所述的方法,其中所述已灭菌组合物具有以下特征中的一个或多个:

[0650] i) 它适用于稳定含细胞样品中包含的细胞内核酸,其中优选稳定细胞内RNA和/或细胞内DNA;

[0651] ii) 由于所述稳定化,它减少含细胞样品中存在的核酸的降解;

[0652] iii) 它适用于稳定所述样品中含有的细胞中的转录组和/或转录物水平,其中优选地,它适用于稳定一种或多种选自c-fos、IL-1 β 、IL-8和p53的标志物基因的转录物水平,在稳定化后被稳定至少12h、至少24h、优选至少48h。

[0653] 22. 根据项目1至21的一项或多项所述的方法,其中所述已灭菌组合物不诱导有核细胞或总细胞的裂解。

[0654] 23. 根据项目1至22的一项或多项所述的方法,其中所述已灭菌组合物不包含诱导核酸-核酸、蛋白质-核酸和/或蛋白质-蛋白质交联的交联剂并且不涉及甲醛释放剂的使用。

[0655] 24. 根据项目1至23的一项或多项所述的方法,其中所述已灭菌组合物具有以下稳定化特征:

[0656] a) 所述稳定化允许从被稳定的含细胞样品中分离细胞;

- [0657] b) 所述含细胞样品是血液样品,并且其中所述血液样品中含有的细胞被稳定化;
- [0658] c) 所述含细胞样品是血液样品,并且其中白细胞被稳定化;
- [0659] d) 保留细胞的形态;
- [0660] e) 保留有核细胞的形态;
- [0661] f) 所述样品是血液样品并且所含的淋巴细胞和/或单核细胞被稳定化;
- [0662] g) 保留细胞表面表位;和/或
- [0663] h) 保留细胞表面蛋白。
- [0664] 25. 一种可灭菌组合物,其中已灭菌形式的所述组合物适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体,其中所述组合物是如项目1至18的一项或多项或项目19至24的一项或多项的步骤a)中提供的组合物,并且其中优选所述组合物是已灭菌的。
- [0665] 26. 一种用于稳定含细胞生物样品中包含的细胞外核酸群体的方法,所述方法包括:
- [0666] a) 根据项目1至18的一项或多项或者项目19至24的一项或多项中限定的方法获得适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体的已灭菌组合物,或者获得已灭菌形式的根据项目25所述的组合物;和
- [0667] b) 使所述含细胞生物样品与所述已灭菌组合物接触以进行稳定化。
- [0668] 27. 一种从被稳定的含细胞生物样品中分离细胞外核酸的方法,所述方法包括:
- [0669] a) 根据项目26的方法稳定所述含细胞生物样品;以及
- [0670] b) 分离细胞外核酸。
- [0671] 28. 一种处理和/或分析细胞外核酸的方法,所述方法包括:
- [0672] a) 根据项目27的方法从被稳定的含细胞生物样品中分离细胞外核酸;以及
- [0673] b) 对分离的细胞外核酸进行处理和/或分析。
- [0674] 29. 至少一种选自硫醇和维生素或其衍生物的化合物在辐照灭菌期间保护适用于稳定生物样品或其组分的细胞外核酸群体的组合物中的应用。
- [0675] 30. 项目29的应用,其中所述至少一种化合物选自硫醇、水溶性维生素或其衍生物、以及脂溶性维生素的水溶性衍生物;或
- [0676] 其中所述至少一种化合物选自硫醇、水溶性维生素或其衍生物、以及脂溶性维生素的水溶性衍生物,所述硫醇为N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽;或
- [0677] 其中所述至少一种化合物选自硫醇、水溶性维生素、和水溶性维生素E衍生物,所述硫醇为N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽;或
- [0678] 其中所述至少一种化合物选自硫醇、抗坏血酸或其衍生物、和水溶性维生素E衍生物,所述硫醇为N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽。
- [0679] 31. 一种制造可灭菌组合物的方法,其中已灭菌形式的所述组合物适用于稳定生物样品的细胞外核酸群体,所述方法包括:
- [0680] a) 制备一种组合物,其包含:
- [0681] i. 至少一种半胱天冬酶抑制剂,和
- [0682] ii. 至少一种选自硫醇和维生素E或其衍生物的化合物;以及任选地
- [0683] b) 将所述组合物灭菌。
- [0684] 32. 项目31的方法,其中项目31的步骤a)中制备的组合物是如项目1-18的一项或

多项或项目19-24的一项或多项的步骤a)中制备的组合物。

[0685] 33.一种样品采集装置,例如容器,优选样品采集管,其包含根据项目25所述的可灭菌组合物。

[0686] 34.一种试剂盒,其包含根据项目25所述的可灭菌组合物或根据项目33所述的样品采集装置。

[0687] 35.一种从被稳定的含细胞生物样品中分离核酸的方法,所述方法包括:

[0688] a) 稳定含细胞生物样品,其中稳定化包括

[0689] i. 根据项目1至24的一项或多项中限定的方法获得已灭菌组合物;或

[0690] ii. 获得根据项目25所述的组合物,其中对所述组合物进行灭菌;或

[0691] iii. 获得根据项目33所述的样品采集装置,其中对所述样品采集装置中包含的组合物进行灭菌;

[0692] 并将所述含细胞生物样品与所述已灭菌组合物接触;以及

[0693] b) 从所述被稳定的样品中分离核酸。

[0694] 36. 根据项目35所述的方法,其中步骤b) 包括分离细胞内核酸,优选细胞内RNA和/或细胞内DNA。

[0695] 37. 根据项目35或36所述的方法,其包括从被稳定的样品中去除细胞并从去除的细胞中分离核酸。

[0696] 38. 一种从被稳定的含细胞生物样品中分离细胞的方法,所述方法包括:

[0697] a) 稳定含细胞生物样品,其中稳定化包括

[0698] i. 根据项目1至24的一项或多项中限定的方法获得已灭菌组合物;或

[0699] ii. 获得根据项目25所述的组合物,其中对所述组合物进行灭菌;或

[0700] iii. 获得根据项目33所述的样品采集装置,其中对所述样品采集装置中包含的组合物进行灭菌;

[0701] 并将所述含细胞生物样品与所述已灭菌组合物接触;以及

[0702] b) 从所述被稳定的样品中分离细胞。

[0703] 39. 通过根据项目1-24的一项或多项所述的方法可获得和/或获得的已灭菌组合物。

[0704] 40. 已灭菌的样品采集装置,例如容器,优选样品采集管,其包含根据项目39所述的已灭菌组合物,其中所述已灭菌的样品采集装置通过根据项目1-24的一项或多项所述的方法可获得和/或获得。

[0705] 本申请要求于2015年11月20日提交的EP 15 195 656.2以及于2016年4月5日提交的EP 16 163 863.0的优先权。EP 15 195 656.2和EP 16 163 863.0的内容通过引用以其整体并入本文。

[0706] 实施例

[0707] 实施例仅用于说明的目的,并且不能以任何方式被解释为限制本发明。

[0708] 使用的缩写:

[0709] ccfDNA:循环的无细胞DNA

[0710] PEG:聚乙二醇

[0711] EDTA:乙二胺四乙酸

[0712] DMPA:二甲基丙酰胺

[0713] HPLC:高效液相色谱

[0714] BCT:采血管

[0715] kGy:千戈瑞

[0716] DMSO:二甲基亚砷

[0717] I. 实验程序

[0718] 灭菌、特别是 γ 辐照灭菌对用于稳定细胞外核酸群体的组合物(以下也称为“稳定化试剂”或“稳定化组合物”)的效应通过两种不同的手段来确定。所述稳定化组合物的化学降解谱通过高效液相色谱(HPLC)评价。进行功能性测定法来确定所述灭菌对所述组合物稳定细胞外核酸活性的影响。在该测定法中,分析ccfDNA作为细胞外核酸群体的优选实施方式。

[0719] 本发明人能够鉴定意外地能够减轻或甚至消除所述稳定化组合物在灭菌期间发生的化学降解的化合物。重要的是,这些化合物同时允许所述稳定化组合物一旦被灭菌后的最佳功能。

[0720] 1. 稳定化试剂的HPLC测试:

[0721] 将半胱天冬酶抑制剂(Q-VD-OPh)在DMSO中溶解并稀释以产生标准曲线。使用7.5、15、30和60 μ g/ml的浓度来产生所述标准曲线。

[0722] 在 γ 辐照之前和之后测试含有半胱天冬酶抑制剂、EDTA、DMPA和PEG的混合物的稳定化试剂。鉴定半胱天冬酶抑制剂的独特峰,并与标准曲线比较进行半胱天冬酶抑制剂的总定量。辐照之前和之后测定半胱天冬酶抑制剂的浓度,并比较这些浓度来相对定量。

[0723] 2. PAXgene血ccfDNA Alpha管的制造:

[0724] 为了制造PAXgene血ccfDNA Alpha采血管(Alpha BCT),用1.3-1.7ml ccfDNA稳定化试剂填充用于10ml抽血的BD标准试管。根据PCT/EP2015/055699,所测试的示例性稳定化试剂包含半胱天冬酶抑制剂(Q-VD-OPh)、K2EDTA、DMPA、PEG300和PEG10000的混合物。向所述管施加真空以允许抽血10.25ml。通过使用钴60作为高能 γ 射线源的 γ 辐照在5至35kGy的范围内对管进行灭菌。

[0725] 3. 全血的稳定化:

[0726] 将血液抽入Alpha BCT以稳定ccfDNA水平。具有1.8mg K2EDTA/ml全血的10毫升喷雾干燥EDTA管(BD)用作未被稳定的阴性对照。将管颠倒10次来混合血液和试剂。被稳定和未被稳定的血液样品在室温下以直立位置储存。

[0727] 4. 血浆的制备:

[0728] 将全血样品在环境温度下以1.900x g离心15min。将澄清的血浆级分转移到新离心管中。在第二轮中,血浆样品在未被稳定的EDTA血的情况下以16.000x g离心10min或在被稳定的Alpha BCT血的情况下以1.900x g离心10min。将上清液转移到新管中,直接用于纯化ccfDNA或在-20 $^{\circ}$ C下储存直至使用。

[0729] 5. 用QIAamp循环核酸试剂盒手动纯化ccfDNA:

[0730] 用QIAamp循环核酸试剂盒(QIAGEN GmbH),使用从1ml、2ml或3ml血清或血浆纯化循环核酸的方案,从血浆分离DNA。如果没有另外说明,则根据制造商的建议,将2ml血浆与蛋白酶K和裂解缓冲液ACL混合,在60 $^{\circ}$ C下温育30分钟,与缓冲液ACB混合,借助于QIAvac

24Plus真空歧管结合在QIAamp Mini柱上,洗涤并用60μl洗脱缓冲液AVE洗脱。

[0731] 6.在QIASymphony上自动纯化ccfDNA:

[0732] 用QIASymphony循环DNA方案和试剂盒(QIAGEN)的初步版本从2ml血浆分离ccfDNA。如果没有另外说明,QIASymphony机器人将2ml血浆与蛋白酶K、结合缓冲液和磁珠混合。将具有结合的DNA的珠子洗涤三次,用60μl洗脱缓冲液洗脱DNA。

[0733] 7.定量实时PCR测定法和ccfDNA拷贝的计算:

[0734] 为了测量ccfDNA的量,用3μl洗脱液在Abi Prism HT7900(Life Technologies)上进行实时PCR测定法。在20μl测定体积中,使用QuantiTect多重PCR试剂盒试剂(QIAGEN GmbH),以多重PCR扩增人18S rDNA基因的两个片段。通过与从3000稀释到0.3基因组当量(1基因组当量等于约6.6pg的人基因组DNA)的人类基因组DNA产生的标准曲线进行比较来实现总定量。

[0735]	靶的描述	位置	位置	序列 5' - 3'	染料
	h 18S rDNA 66bp 扩增子	p12 - 染色体 13、14、15、 21、22 的区域	正向	GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTG	5' Bodipy -BHQ 3'
			反向	CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG	
			探针	ACCGGCGCAAGACGGACCAGA	
	h18S rDNA 500bp 扩 增 子	p12 - 染色体 13、14、15、 21、22 的区域	正向	GTCGCTCGCTCCTCTCCTACTT	5' FAM -BHQ 3'
			反向	GGCTGCTGGCACCAGACTT	
			探针	CTAATACATGCCGACGGGCGCTGA C	

[0736] 表1:通过实时PCR检测的DNA靶序列

[0737] 使用66bp片段的定量来反映血浆中18S rDNA拷贝的总量。使用500bp的定量来确定来自全血中源自于凋亡或机械裂解的白细胞的18S rDNA拷贝的量。无细胞DNA具有140-170bp的典型长度(Forshew等人.(2012)Cancer Genomics 4(136)136ra68)。因此500bp片段来源于凋亡、裂解或以其它方式被破坏的血细胞。将储存0天与3天或6天之间的500bp片段的拷贝数增加用作稳定性效率的度量。

[0738] II. 实施例

[0739] 1. 实施例1: γ 辐照对ccfDNA稳定化的效应

[0740] 制造PAXgene血ccfDNA Alpha管并通过不同能量水平的 γ 辐照进行灭菌。在10ml喷雾干燥K2EDTA管(未被稳定的对照)和PAXgene血ccfDNA Alpha管中采集来自8个供体的10ml全血样品。抽血后立即从5ml被稳定或未被稳定的血液样品生成血浆。剩余的血液在室温下再储存6天,然后生成血浆。从2ml血浆手动纯化ccfDNA,通过实时PCR一式三份测定18S rDNA基因的拷贝数。

[0741] 根据PCT/EP2015/055699所述的稳定化试剂混合物(对于一个Alpha管)是:11.45μl半胱天冬酶抑制剂(Q-VD-OPh;1mg溶解在388μl DMSO中);所述试剂还包含PEG10.000、PEG300、EDTA和DMPA,水加至1.7ml。加入全血后,所述Alpha管包含终浓度约5μM的Q-VD-OPh。

[0742] 所述未被稳定的对照包含在全血中的终浓度为1.8mg/ml的K2EDTA。

[0743] 图1显示了 γ 辐照对血浆中ccfDNA水平的效应。该图显示在未被稳定的EDTA血液(左)和抽入Alpha管(非无菌或用不同剂量的 γ 辐照灭菌)的被稳定的血液样品中18S rDNA基因的66bp和500bp片段的拷贝数的平均变化和标准差(x倍变化)。样品来自8个供体,并在室温下储存6天。

[0744] 可以看出,与未被稳定的对照(EDTA血液,左)相比,被稳定的样品(Alpha管)中拷贝数的比率(第6天/第0天)较低,证明在被稳定的样品中发生了细胞外核酸的稳定化。然而,在比较被稳定的样品时可以看出,ccfDNA稳定化的效率随着在加入待稳定的血液样品之前用于灭菌所述稳定化试剂的 γ 辐照剂量的增加而降低。与 γ 辐照剂量增加相关的稳定效率降低可以从辐射剂量增加时获得的拷贝数比率(第6天/第0天)增加来看出。

[0745] 结论:

[0746] 当应用于包含半胱天冬酶抑制剂的稳定化试剂时,用于灭菌的 γ 辐照对后续通过所述稳定化试剂进行的ccfDNA稳定化具有剂量依赖性效应。用于灭菌的辐照剂量越高,后续应用中的稳定化就越低。

[0747] 2.实施例2:通过 γ 辐照降解半胱天冬酶抑制剂

[0748] 制造PAXgene血ccfDNA Alpha管并通过不同能量水平的 γ 辐照进行灭菌。为了通过HPLC定量,只生成溶解于DMSO中的半胱天冬酶抑制剂(Q-VD-OPh)的标准曲线。生成的标准曲线在图2中显示。表2(下)指示半胱天冬酶抑制剂的浓度以及不同浓度的半胱天冬酶抑制剂的峰面积和保留时间。

[0749]

标准	半胱天冬酶抑制剂 面积	保留时间 (min)	[半胱天冬酶抑制剂] ($\mu\text{g/ml}$)
水平 1 (7.5 $\mu\text{g/ml}$)	877.8911	26.2441	7.6628
水平 2 (15 $\mu\text{g/ml}$)	1708.6633	26.2605	15.4100
水平 3 (30 $\mu\text{g/ml}$)	3335.8472	26.3373	30.6098
水平 4 (60 $\mu\text{g/ml}$)	6420.9580	26.3873	59.5803

[0750] 表2:HPLC分析结果;标准曲线的制备

[0751] 作为下一步,在辐照之前和之后测量来自Alpha管的稳定化试剂以确定半胱天冬酶抑制剂的浓度。将半胱天冬酶抑制剂的独特峰与标准曲线比较进行总定量。通过与未灭菌的Alpha管比较来计算灭菌后未降解的半胱天冬酶抑制剂的百分比。

[0752] 结果显示在表3(下)中。该表显示了通过HPLC测定的不同被测样品的峰面积和保留时间,以及基于标准曲线计算的抑制剂浓度。

[0753]

	半胱天冬酶抑制剂 面积	保留时间 (min)	[半胱天冬酶抑制剂] ($\mu\text{g/ml}$)
[半胱天冬酶抑制剂] ~ 15 $\mu\text{g/ml}$	1708.6633	26.2605	15.4100
A13-2 本体溶液(在填充到 Alpha 管中之前)	1682.2621	26.3736	15.1219
批号 13-1 的 Alpha 管 (未辐照)	1742.5447	26.4114	15.6875
批号 13-3 的 Alpha 管 (15 kGy 辐照)	294.2026	26.3655	2.0992
辐照后剩余%			13.38

[0754] 表3:HPLC分析结果;辐照后剩余半胱天冬酶抑制剂%的测定。

[0755] 根据PCT/EP2015/055699所述的稳定化试剂中的其他组分引起的峰在该过程中比半胱天冬酶抑制剂的峰更早出现。虽然半胱天冬酶抑制剂在26min时出现,但其他组分更接近16-22min的范围。因此,将所述稳定化试剂的HPLC结果与仅仅半胱天冬酶抑制剂(用于产生标准曲线的)的HPLC结果相比较,证明在所述稳定化试剂中不存在由其他成分(EDTA、PEG和DMPA)引起对半胱天冬酶抑制剂检测的干扰。

[0756] 结论:

[0757] 总之,HPLC是一种用于定量 γ 辐照引起的半胱天冬酶抑制剂降解程度的有用的技术。在辐照期间发生半胱天冬酶抑制剂的降解,并且灭菌后ccDNA水平的稳定化降低(参见图1)与完好的未降解的半胱天冬酶抑制剂的浓度降低相关。

[0758] 为了进一步检查不同剂量 γ 辐照对半胱天冬酶抑制剂的影响,在PAXgene血ccfDNA Alpha管中定量来自不同批次的用不同剂量 γ 辐照灭菌的稳定化试剂中的半胱天冬酶抑制剂。所述Alpha管包含如上表3中详述的稳定化试剂。

[0759] 结果显示在表4(下)中。可以看出, γ 辐照对半胱天冬酶抑制剂降解具有剂量依赖性效应。

[0760]

PAXgene 血 ccfDNA Alpha-管 批号	辐照 (kGy)	在 DOM 下的初 始[C-Inh] [$\mu\text{g/ml}$]	HPLC 测试 [C-Inh] ($\mu\text{g/ml}$)	检出的 %	溶液中 剩余 C-Inh %
A13 1	0	18	15.688	87.15%	100.00%
A13 1-1	18.6	18	0.634	3.52%	4.06%
A13 1-2	29.7	18	0.064	0.35%	0.41%
A13 1-3	39.3	18	0.033	0.18%	0.21%
A13 2	0	18	15.586	86.59%	100.00%
A13 2-1	15.8	18	2.360	13.11%	15.14%
A13 2-2	27.1	18	0.603	3.35%	3.87%
A13 2-3	37.5	18	0.103	0.57%	0.66%

[0761] 表4:PAXgene血ccfDNA Alpha管中来自不同批次、用不同剂量 γ 辐照灭菌的稳定化试剂中半胱天冬酶抑制剂的定量。

[0762] 结论:

[0763] γ 辐照对稳定化试剂中的半胱天冬酶抑制剂降解具有剂量依赖性效应。辐照剂量

越高,发生的降解越多。HPLC可用于定量由 γ 辐照对半胱天冬酶抑制剂引起的降解效应。

[0764] 3. 实施例3:添加清除剂对ccfDNA稳定化的效应

[0765] 为了防止通过 γ 辐照灭菌期间半胱天冬酶抑制剂的降解,测试组分在辐照期间保护所述半胱天冬酶抑制剂免于降解的能力。为了排除所述附加组分本身对细胞外核酸水平具有负面影响,将这些化合物添加到包含半胱天冬酶抑制剂(Q-VD-OPh)并还包含PEG、EDTA和DMPA的稳定化试剂中,并在功能测定法中测试。

[0766] 在10ml喷雾干燥的K2EDTA管中采集来自8个供体的10ml全血样品。在抽血后即刻将未被稳定的血液样品通过添加1.7ml根据PCT/EP2015/055699所述的ccfDNA稳定化试剂进行稳定,所述稳定化试剂中添加或者未添加了不同化合物以测试它们对细胞外核酸稳定化的影响。

[0767] 所述稳定化试剂包含(对于10ml K2EDTA全血而言):

[0768] 11.45 μ l半胱天冬酶抑制剂(Q-VD-OPh;1mg溶解在388 μ l DMSO中),所述试剂还包含PEG10.000、PEG300、EDTA和DMPA,水加至1.7ml。按下面进一步详述的来添加清除剂。

[0769] 加入全血后,所述Alpha管包含终浓度为5 μ M的Q-VD-OPh。

[0770] 抽血后立即(第0天)从5ml被稳定的血液样品生成血浆。剩余的血液在室温下再储存6天,然后生成血浆(第6天)。从2ml血浆纯化ccfDNA,并通过实时PCR一式三份测定18S rDNA基因的拷贝数。

[0771] a) 添加N-乙酰半胱氨酸、抗坏血酸、没食子酸和鞣酸

[0772] 向所述稳定化试剂添加N-乙酰半胱氨酸、抗坏血酸、没食子酸或鞣酸,浓度如图3所示:N-乙酰半胱氨酸,2mg/ml;抗坏血酸,5mg/ml;没食子酸,2mg/ml;鞣酸,1mg/ml。

[0773] 全血中的终浓度为:1.7mM N-乙酰半胱氨酸或4.0mM抗坏血酸或1.7mM没食子酸或0.09mM鞣酸。

[0774] 结果在图3中显示。该图显示了在只有稳定化试剂(左)和添加N-乙酰半胱氨酸、抗坏血酸、没食子酸或鞣酸后的情况下储存后,被稳定的血液中18S rDNA基因的66bp和500bp片段的拷贝数的平均变化(x倍变化)。结果来自8位供体在室温下储存6天的血液。

[0775] 结论:

[0776] 可以向所述含有半胱天冬酶抑制剂的稳定化试剂添加某些自由基清除剂例如抗坏血酸和N-乙酰半胱氨酸,而不影响ccfDNA稳定化特性。

[0777] 然而,令人惊奇地发现,添加现有技术中报告对抗 γ 辐射诱导的自由基有效的某些自由基清除剂例如鞣酸或没食子酸,导致用所述ccfDNA稳定化试剂稳定的血液中DNA释放增加,这可以在图3中通过第6天和第0天之间500bp拷贝数的比率增加以及66和500bp这两个片段的高标准差而看出。因此这些化合物不适合用在用于稳定细胞外核酸群体的组合物中。

[0778] b) 添加不同浓度的抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽(还原型)。

[0779] 在另一个实验中,向所述稳定化试剂添加抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽(还原型),浓度如图4中所示:抗坏血酸,5mg/ml、10mg/ml或20mg/ml;N-乙酰半胱氨酸,2mg/ml、4mg/ml或10mg/ml;谷胱甘肽(还原型),0.1mg/ml、0.5mg/ml或1mg/ml。

[0780] 全血中的终浓度为:4.0mM或8.0mM或16.0mM抗坏血酸;1.7mM或3.5mM或8.7mM N-乙酰半胱氨酸;或者0.05mM或0.23mM或0.47mM谷胱甘肽(还原型)。

[0781] 结果在图4中显示。该图显示了在只有稳定化试剂(左)和添加不同浓度的抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽(还原型)后的情况下储存后,被稳定的血液中18S rDNA基因的66bp和500bp片段的拷贝数的平均变化(x倍变化)。血液来自8位供体,并在室温下储存6天。

[0782] 图5显示了血液采集后立即测定时在被稳定的血液中18S rDNA基因的500bp片段的平均总拷贝数。

[0783] 结论:

[0784] 包含抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸或谷胱甘肽(还原型)的稳定化试剂在被测浓度下显示出良好的稳定化性质(图4)。从图5可以看出,以20mg/ml的浓度添加抗坏血酸(该浓度在本领域中据报告对 γ 辐射诱导的自由基具有(辐射)防护性),导致ccfDNA绝对拷贝数减少。

[0785] c) 添加抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽的不同组合

[0786] 在另一个实验中,测试了抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽的不同组合对所述稳定化试剂的ccfDNA稳定化特性的影响。

[0787] 为此目的,将抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽(还原型)以如图6所示的组合和浓度添加到所述稳定化试剂中:抗坏血酸(2mg/ml)和谷胱甘肽(0.2mg/ml);N-乙酰半胱氨酸(1mg/ml)和谷胱甘肽(0.2mg/ml);抗坏血酸(2mg/ml)和N-乙酰半胱氨酸(1mg/ml);抗坏血酸(2mg/ml)、N-乙酰半胱氨酸(1mg/ml)和谷胱甘肽(0.2mg/ml)。

[0788] 全血中的终浓度为:1.65mM抗坏血酸和0.1mM谷胱甘肽(还原型);0.9mM N-乙酰半胱氨酸和0.1mM谷胱甘肽(还原型);1.65mM抗坏血酸和0.9mM N-乙酰半胱氨酸;1.65mM抗坏血酸和0.9mM N-乙酰半胱氨酸和0.1mM谷胱甘肽(还原型)。

[0789] 结果在图6中显示。该图显示了在来自8个供体并在室温下储存6天的被稳定血液中18S rDNA基因的66bp和500bp片段的拷贝数的平均变化(x倍变化)。

[0790] 从图6可以看出,用被测的清除剂组合可以获得良好的ccfDNA稳定化特性。

[0791] 结论:

[0792] 可以将本发明的自由基清除剂例如抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽(还原型)的组合以合适的浓度添加到包含半胱天冬酶抑制剂的稳定化试剂中,而不影响ccfDNA稳定化特性。

[0793] 4. 实施例4:添加清除剂对 γ 辐照后半胱天冬酶抑制剂浓度和ccfDNA稳定化的效应

[0794] 分析了添加清除剂对 γ 辐照灭菌期间半胱天冬酶抑制剂降解的效应。并且,评估了添加清除剂(在灭菌之前以便保护所述半胱天冬酶抑制剂)对(已灭菌的)稳定化试剂的ccfDNA稳定化特性的效应。

[0795] 在有或没有添加自由基清除剂的情况下制备稳定化试剂,并通过 γ 辐照批量灭菌。在辐照之前和之后通过HPLC测量半胱天冬酶抑制剂浓度,以确定添加清除剂对 γ 辐照灭菌期间半胱天冬酶抑制剂降解的效应。

[0796] 所述稳定化试剂包含(对于10ml K2EDTA全血而言):

[0797] 11.45 μ l半胱天冬酶抑制剂(Q-VD-OPh;1mg溶解在388 μ l DMSO中),所述试剂还包含PEG10.000、PEG300、EDTA和DMPA,水加至1.7ml。按下面进一步详述的来添加清除剂。加入

全血后,所述Alpha管包含终浓度为5 μ M的Q-VD-OPh。

[0798] 将清除剂以如表5(下)所示的浓度添加到所述稳定化试剂中。

稳定化试剂+ 清除剂	类型	体积 (ml)	辐照 (kGy)	[Casp] (辐照 前) [μ g/ml]	[Casp] (辐照 后) [μ g/ml]	C-Inh 剩余%
PEG, EDTA, DMPA, Q-VD-OPh	参比	50	25	16,505	0,9382	5,68%
+ 没食子酸 (500 μ g/ml - 2.9 mM)	清除剂	50	25	16,633	0,5888	3,54%
+ 抗坏血酸 (5 mg/ml - 27.5 mM)	清除剂	50	25	16,522	12,5986	76,25%
[0799] + N-乙酰-L-半胱氨酸 (2 mg/ml - 12 mM)	清除剂	50	25	16,468	14,1849	86,14%
+ 谷胱甘肽 (100 μ g/ml - 320 μ M)	清除剂	50	25	16,454	10,4422	63,46%
+ 甘露糖醇 (0.5%)	清除剂	50	25	16,554	1,0667	6,44%
+ 异丙醇 (1%)	清除剂	50	25	16,572	0,8517	5,14%
+ Trolox (4 mM)	清除剂	50	25	16,534	3,0195	18,26%
+ Trolox (5 mM, 在 DMSO 中)	清除剂	50	25	16,649	3,3548	20,15%
+ 吐温-80 (0.6 mM)	清除剂	50	25	16,550	0,8856	5,35%

[0800] 表5: γ 辐照之前和之后,在有或没有清除剂的稳定化试剂中半胱天冬酶抑制剂的定量

[0801] 为了分析在灭菌之前添加清除剂对已灭菌的稳定化试剂的ccfDNA稳定化特性的效应,在10ml喷雾干燥K2EDTA管中采集来自8个供体的10ml全血样品,并用有或没有清除剂的各种ccfDNA稳定化试剂1.7ml进行稳定。抽血后立即从5ml被稳定的血液样品生成血浆。剩余的血液在室温下再储存6天,然后生成血浆。从2ml血浆纯化ccfDNA,通过实时PCR一式三份测定18S rDNA基因的拷贝数。

[0802] 所添加的清除剂和所用的浓度在图7中指示。全血中的终浓度为0.42mM没食子酸、4.0mM抗坏血酸、12mM N-乙酰半胱氨酸、0.05mM谷胱甘肽或0.73mM Trolox。

[0803] 结果在图7中显示。用包含半胱天冬酶抑制剂并含有不同清除剂的经辐照的稳定化试剂稳定的血液样品中18S rDNA基因的66bp和500bp片段的拷贝数的平均变化(x倍变化)。来自8位供体在室温下储存6天的平均值。

[0804] 从抽血后第6天与第0天抽血后立即之间66和500bp片段的总拷贝数的较高比例、以及大标准差可以看出,没食子酸未能防止通过 γ 辐照诱导的ccfDNA稳定化降低。这与通过HPLC测量的高降解速率一致(表5)。与此相反,清除剂例如抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽稳定了ccfDNA的水平,如通过第6天和第0天之间的拷贝数比率测得的。trolox也显示出稳定化效应。

[0805] 结论:

[0806] 令人惊奇的是,仅添加所选择的清除剂例如抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽和Trolox在包含半胱天冬酶抑制剂的稳定化试剂例如根据PCT/EP2015/055699所述的稳定化试剂中防止了由 γ 辐照引起的半胱天冬酶抑制剂的降解。

[0807] 同样令人惊奇的是,添加某些清除剂例如抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽和

Trolox防止了 γ 辐照对用包含半胱天冬酶抑制剂的稳定化试剂稳定的血液中ccfDNA稳定性水平的负面效应。

[0808] 相反,许多据发表能够处置自由基的清除剂不能防止由辐照引起的半胱天冬酶抑制剂降解和/或在血液储存后引起ccfDNA水平增加并由此干扰稳定化。这特别适用于没食子酸。

[0809] 5. 实施例5:清除剂活性概述

[0810] 表6中显示了被测清除剂的概述,所述被测清除剂一方面显示防护 γ 辐照,另一方面显示对ccfDNA稳定性的效应。

清除剂	浓度 1	浓度 2	对 ccfDNA 稳定性的效应	防护 γ 辐照
抗坏血酸	5 - 10mg/ml	0.5 - 1% (w/v)	中性	高
抗坏血酸	20mg/ml	2% (w/v)	显著减少 ccfDNA 产率	-
N-乙酰-L-半胱氨酸	0,5 - 10mg/ml	0.05 - 1% (w/v)	中性	高
谷胱甘肽(还原型)	0.1 - 1mg/ml	0.01 - 0.1% (w/v)	中性	高
Trolox	1.25 mg/ml	0.125 % (w/v)	中性	中
甘露糖醇	5 mg/ml	0.5% (w/v)		无
异丙醇	-	1% (v/v)		无
没食子酸	0.5 - 2mg/ml	0.2% (w/v)	血液储存后 ccfDNA 水平增加	无
吐温-80	0.74 mg/ml	0.07% (v/v)		无
鞣酸	1mg/ml	0.1%	血液储存后 ccfDNA 水平增加	-

[0812] 表6:总结-用于保护含有半胱天冬酶抑制剂的稳定化试剂对抗 γ 辐照的被测清除剂和浓度。浓度1指示以mg/ml表示的被测化合物浓度。浓度2指示按重量/体积(w/v)或体积/体积(v/v)计的被测化合物浓度,这取决于所述化合物是液体还是固体。

[0813] 结论:

[0814] 仅添加特定的自由基清除剂例如抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸、谷胱甘肽和Trolox,特别是抗坏血酸、N-乙酰半胱氨酸和谷胱甘肽,防止或有效降低由于 γ 辐照灭菌引起的半胱天冬酶抑制剂降解。令人惊奇的是,添加这些自由基清除剂保留了用包含半胱天冬酶抑制剂的稳定化组合物实现的ccfDNA稳定化的质量。

[0815] 有效的清除化合物以及它们的有效浓度与以前发表的防辐射赋形剂显著不同。例如,没食子酸、鞣酸,还有甘露糖醇、异丙醇和吐温-80先前被描述为清除剂。然而,它们对包含半胱天冬酶抑制剂的稳定化试剂不提供 γ 辐照防护。并且,以前描述的清除剂如鞣酸和没食子酸干扰所述稳定化试剂的稳定化效应。

[0816] 6. 实施例6:清除剂和半胱天冬酶抑制剂浓度对 γ 辐照期间半胱天冬酶抑制剂保护的效应

[0817] 在有或者没有添加不同浓度的自由基清除剂并且有不同浓度的半胱天冬酶抑制剂的情况下制造根据PCT/EP2015/055699所述的稳定化试剂。通过将1.7ml相应的稳定化试

剂填充到标准Vacutainer中来制造PAXgene血ccfDNA Alpha管。管通过不同能量水平的 γ 辐照灭菌。在辐照之前和之后通过HPLC测量半胱天冬酶抑制剂浓度(参见下表7)。

[0818] 所述稳定化试剂每管包含:

[0819] 3.3 μ l或6.6 μ l或9.8 μ l的半胱天冬酶抑制剂(Q-VD-Oph;将18mg溶解在2ml DMSO中;血终浓度分别为5、10或15 μ M),所述试剂还包含PEG10.000、PEG300、EDTA和DMPA,水加至1.7ml。

[0820] 如表7中所示,将清除剂以不同的浓度和组合添加到所述稳定化试剂中。

[0821]

稳定化试剂 + 清除剂	试剂中清除剂浓度	半胱天冬酶抑制终浓度 [μ M]	辐照 (kGy)	HPLC 测试 [C-Inh] (μ g/ml)	与没有辐照相对比的剩余 C-Inh%
PEG, EDTA, DMPA,	无	5	0	14.7	100.0%

[0822]

Q-VD-Oph					
	无	5	10	5.6	38.4%
	无	5	20	0.8	5.3%
	无	5	30	0.5	3.7%
+ 抗坏血酸	1mg/ml	5	0	18.2	100.0%
	1mg/ml	5	10	12.7	69.7%
	1mg/ml	5	20	7.0	38.5%
	1mg/ml	5	30	5.0	27.3%
+ 抗坏血酸	2mg/ml	5	0	19.4	100.0%
	2mg/ml	5	10	15.2	78.2%
	2mg/ml	5	20	10.7	55.2%
	2mg/ml	5	30	9.5	48.9%
+ 抗坏血酸	5mg/ml	5	0	19.2	100.0%
	5mg/ml	5	10	16.0	83.1%
	5mg/ml	5	20	12.8	66.7%
	5mg/ml	5	30	12.1	63.1%
+ 抗坏血酸	5mg/ml	10	0	37.7	100.0%
	5mg/ml	10	10	31.2	82.7%
	5mg/ml	10	20	26.8	71.1%
	5mg/ml	10	30	23.7	62.9%
+ 抗坏血酸	5mg/ml	15	0	55.5	100.0%
	5mg/ml	15	10	46.4	83.6%
	5mg/ml	15	20	40.6	73.2%
	5mg/ml	15	30	35.5	63.9%
+ 抗坏血酸	10mg/ml	5	0	18.4	100.0%
	10mg/ml	5	10	16.0	86.8%
	10mg/ml	5	20	13.5	73.5%
	10mg/ml	5	30	13.2	71.6%
+ N-乙酰-L-半胱氨酸	0.5mg/ml	5	0	19.3	100.0%
	0.5mg/ml	5	10	16.2	83.8%
	0.5mg/ml	5	20	13.7	70.9%
	0.5mg/ml	5	30	12.3	63.8%
+ N-乙酰-L-半胱氨酸	1mg/ml	5	0	18.5	100.0%
	1mg/ml	5	10	15.8	85.4%
	1mg/ml	5	20	13.4	72.3%
	1mg/ml	5	30	12.5	67.5%
+ N-乙酰-L-半胱氨酸	2mg/ml	5	0	19.7	100.0%
	2mg/ml	5	10	17.2	87.3%
	2mg/ml	5	20	15.3	77.7%

[0823]

	2mg/ml	5	30	14.3	72.3%
+ N-乙酰-L-半胱氨酸					
	2mg/ml	10	0	37.8	100.0%
	2mg/ml	10	10	33.3	88.0%
	2mg/ml	10	20	30.7	81.2%
	2mg/ml	10	30	27.6	73.0%
+ N-乙酰-L-半胱氨酸					
	2mg/ml	15	0	56.0	100.0%
	2mg/ml	15	10	50.0	89.2%
	2mg/ml	15	20	46.3	82.8%
	2mg/ml	15	30	41.2	73.6%
+ N-乙酰-L-半胱氨酸					
	4mg/ml	5	0	16.6	100.0%
	4mg/ml	5	10	14.8	89.1%
	4mg/ml	5	20	13.4	80.8%
	4mg/ml	5	30	12.8	77.3%
+ 谷胱甘肽					
	0.05mg/ml	5	0	19.1	100.0%
	0.05mg/ml	5	10	14.1	73.7%
	0.05mg/ml	5	20	8.9	46.6%
	0.05mg/ml	5	30	6.6	34.7%
+ 谷胱甘肽					
	0.1mg/ml	5	0	18.8	100.0%
	0.1mg/ml	5	10	14.3	76.1%
	0.1mg/ml	5	20	9.9	52.7%
	0.1mg/ml	5	30	7.5	40.1%
+ 谷胱甘肽					
	0.1mg/ml	10	0	37.9	100.0%
	0.1mg/ml	10	10	29.4	77.6%
	0.1mg/ml	10	20	23.3	61.5%
	0.1mg/ml	10	30	17.7	46.6%
+ 谷胱甘肽					
	0.1mg/ml	15	0	55.5	100.0%
	0.1mg/ml	15	10	42.7	77.0%
	0.1mg/ml	15	20	33.2	59.9%
	0.1mg/ml	15	30	25.0	45.1%
+ 谷胱甘肽					
	0.2mg/ml	5	0	19.9	100.0%
	0.2mg/ml	5	10	15.7	78.8%
	0.2mg/ml	5	20	11.9	59.8%
	0.2mg/ml	5	30	10.2	51.1%
+ 谷胱甘肽					
	0.5mg/ml	5	0	18.7	100.0%
	0.5mg/ml	5	10	15.4	82.0%
	0.5mg/ml	5	20	12.3	65.7%
	0.5mg/ml	5	30	11.1	59.3%
+ 谷胱甘肽					
	1mg/ml	5	0	20.0	100.0%
	1mg/ml	5	10	16.8	83.7%

[0824]

+ 抗坏血酸 & 谷胱甘肽	1mg/ml	5	20	13.8	68.9%
	1mg/ml	5	30	12.6	62.8%
	2mg/ml AA + 0.2mg/ml Glut.	5	0	18.7	100.0%
	2mg/ml AA + 0.2mg/ml Glut.	5	10	15.7	84.0%
	2mg/ml AA + 0.2mg/ml Glut.	5	20	12.7	67.8%
	2mg/ml AA + 0.2mg/ml Glut.	5	30	11.5	61.6%
+ N-乙酰-L-半胱氨酸 & 抗坏血酸	1mg/ml NAC + 2mg/ml AA	5	0	17.6	100.0%
	1mg/ml NAC + 2mg/ml AA	5	10	15.5	88.3%
	1mg/ml NAC + 2mg/ml AA	5	20	13.8	78.4%
	1mg/ml NAC + 2mg/ml AA	5	30	13.3	75.8%
+ 谷胱甘肽 & N-乙酰-L-半胱氨酸	0.2mg/ml Glut. + 1mg/ml NAC	5	0	19.4	100.0%
	0.2mg/ml Glut. + 1mg/ml NAC	5	10	16.8	86.7%
	0.2mg/ml Glut. + 1mg/ml NAC	5	20	14.7	75.7%
	0.2mg/ml Glut. + 1mg/ml NAC	5	30	13.2	68.4%
+ N-乙酰-L-半胱氨酸 & 抗坏血酸	2 mg/ml NAC + 0.5 mg/ml Asc. Ac.	10	0	30.5	100.0%
	2 mg/ml NAC + 0.5 mg/ml Asc. Ac.	10	15	26.9	88.3%
+ N-乙酰-L-半胱氨酸 & 抗坏血酸	2 mg/ml NAC + 1 mg/ml Asc. Ac.	10	0	30.6	100.0%
	2 mg/ml NAC + 1 mg/ml Asc. Ac.	10	15	27.4	89.6%
+ N-乙酰-L-半胱氨酸 & 谷胱甘肽	0.5mg/ml NAC + 0.5 mg/ml Glut.	10	0	30.9	100.0%

[0825]

	0.5mg/ml NAC + 0.5 mg/ml Glut.	10	15	25.3	81.9%
+ N-乙酰-L-半 胱氨酸 & 谷胱 甘肽	0.5mg/ml NAC + 1 mg/ml Glut.	10	0	29.8	100.0%
	0.5mg/ml NAC + 1 mg/ml Glut.	10	15	24.7	83.1%
+ N-乙酰-L-半 胱氨酸 & 谷胱 甘肽	1 mg/ml NAC + 0.5 mg/ml Glut.	10	0	31.0	100.0%
	1 mg/ml NAC + 0.5 mg/ml Glut.	10	15	26.0	83.8%
+ N-乙酰-L-半 胱氨酸 & 谷胱 甘肽	1 mg/ml NAC + 1 mg/ml Glut.	10	0	30.3	100.0%
	1 mg/ml NAC + 1 mg/ml Glut.	10	15	25.6	84.7%
+ N-乙酰-L-半 胱氨酸 & 谷胱 甘肽	2 mg/ml NAC + 0.5 mg/ml Glut.	10	0	29.6	100.0%
	2 mg/ml NAC + 0.5 mg/ml Glut.	10	15	25.7	86.8%
+ N-乙酰-L-半 胱氨酸 & 谷胱 甘肽	2 mg/ml NAC + 1 mg/ml Glut.	10	0	29.8	100.0%
	2 mg/ml NAC + 1 mg/ml Glut.	10	15	26.0	87.1%

[0826] 表7:在 γ 辐照之前和之后,有或者没有不同浓度的清除剂以及有不同浓度的半胱天冬酶抑制剂的稳定化试剂中半胱天冬酶抑制剂的定量。

[0827] 结论:

[0828] 可与本发明结合使用的自由基清除剂在很宽的浓度范围内是有效的。对于所测试的浓度范围(清除剂和半胱天冬酶抑制剂),由清除剂赋予的保护水平在很大程度上与所使用的半胱天冬酶抑制剂浓度无关。自由基清除剂可以组合以进一步改善保护。

[0829] 7. 实施例7:已灭菌的A1pha管中清除剂浓度对ccfDNA稳定化的效应

[0830] 选择来自实施例6的PAXgene血ccfDNA A1pha管用于功能测试以确定所述ccfDNA稳定化特性。将N-乙酰半胱氨酸以不同浓度添加到所述稳定化试剂中。如图8所示制备具有0.5、1.0、2.0和4.0mg/ml N-乙酰半胱氨酸的A1pha管。使用的管是非无菌的或在使用前用不同剂量的 γ 辐照灭菌。将来自四个供体的10ml全血样品各自采集在10ml喷雾干燥K2EDTA管(未被稳定的对照)和A1pha管(已灭菌的和作为对照未灭菌的)中。全血中N-乙酰半胱氨酸的终浓度是0.44、0.88、1.75和3.5mM。未被稳定的对照管包含1.8mg/ml K2EDTA(全血中的终浓度)。抽血后立即从5ml被稳定或未被稳定的血液样品生成血浆。剩余的血液在室温下再储存6天,然后生成血浆。在QIASYMPHONY上从2ml血浆纯化ccfDNA,并通过实时PCR一式

三份测定18S rDNA基因的拷贝数。

[0831] 所述稳定化试剂每管包含：

[0832] 3.3 μ l的半胱天冬酶抑制剂(Q-VD-OPh;将18mg溶解在2ml DMSO中;血终浓度为5 μ M),所述试剂还包含PEG10.000、PEG300、EDTA和DMPA,水加至1.7ml。

[0833] 通过定量实时PCR分析ccfDNA的稳定化。结果显示在图8A、B中。比较未被稳定的EDTA血和被抽入有0.5、1.0、2.0和4.0mg/ml N-乙酰半胱氨酸的Alpha管(非无菌或用不同剂量的 γ 辐照灭菌)中的被稳定的血液样品中18S rDNA基因的66bp和500bp片段的拷贝数的平均变化和标准差(x倍变化)。

[0834] 从图8A、B可以看出,N-乙酰半胱氨酸在所有被测浓度下都提供在宽辐照剂量范围内、甚至在30kGy的高剂量下的优异保护。而且,从包含N-乙酰基-L-半胱氨酸的未经辐照的(0Gy)稳定化试剂可以看出,添加N-乙酰半胱氨酸不干扰所述稳定化试剂对细胞外核酸的稳定化。

[0835] 结论：

[0836] N-乙酰半胱氨酸在广泛的浓度范围内作用以防护 γ 辐照。随着自由基清除剂加入到所述稳定化试剂中,消除了 γ 辐照对ccfDNA稳定性的剂量依赖性效应。N-乙酰半胱氨酸不干扰所述稳定化试剂对细胞外核酸的稳定化,并优选它用作保护剂来防止辐照期间半胱天冬酶抑制剂的降解。

[0837] 8.实施例8:添加水溶性维生素B6作为清除剂对 γ 辐照后的ccfDNA水平稳定化的效应

[0838] 分析了添加维生素B6作为清除剂在 γ 辐照灭菌期间防止半胱天冬酶抑制剂降解的效应。在有或没有添加维生素B6的情况下制备稳定化试剂,并通过30KGy的 γ 辐照批量灭菌。

[0839] 在10ml喷雾干燥K2EDTA管中采集来自八个供体的10ml全血样品,并通过在抽血后立即添加1.7ml有或没有清除剂的已灭菌的ccfDNA稳定化试剂来稳定。将血液样品在室温下储存5天,然后生成血浆。利用QIASymphony PAXgene血ccfDNA试剂盒和PAXcircDNA_2400_LAF(PreAnalytiX)方案,使用被稳定的血液样品在QIASymphony上从2.4ml血浆自动纯化ccfDNA。作为对照,利用QIASymphony循环DNA方案和试剂盒(QIAGEN),使用未被稳定的血液样品从2.4ml血浆纯化ccfDNA。实验中也包括添加维生素B6但未灭菌的稳定化试剂。通过实时PCR以一式三份测定18S rDNA基因(500bp片段)的总拷贝数。

[0840] 所述稳定化试剂包含(对于10ml K2EDTA全血而言)：

[0841] 3.28 μ l半胱天冬酶抑制剂(Q-VD-OPh;1mg溶解在111 μ l DMSO中),所述试剂还包含PEG、EDTA和DMPA,水加至1.7ml。上文描述了合适的聚乙二醇,例如PEG 300和PEG 10.000。对于包含清除剂维生素B6(吡哆醇)的稳定化试剂,将维生素B6(吡哆醇)以2mg/ml的浓度添加到所述稳定化试剂中。被稳定的血液中的半胱天冬酶抑制剂(Q-VD-OPh)终浓度为约5 μ M。全血中维生素B6(吡哆醇)的终浓度为约1.7mM。

[0842] 图9中显示了来自8个供体的在室温下储存5天的血液样品中18S rDNA基因的500bp片段的平均总拷贝数。利用含有(左侧的条)或不含(左起第三条)维生素B6作为清除剂的稳定化试剂稳定血液样品。这些稳定化试剂已被灭菌(30kGy)。作为对照,将有维生素B6但尚未灭菌的稳定化试剂(左起第二条)和未被稳定化的EDTA血(左起第四条)包括在内。

[0843] 在用含有维生素B6作为清除剂的稳定化试剂(经辐照以及未经辐照)稳定的血液样品中,18S rDNA基因的500bp片段的数量仅为与没有清除剂的稳定化试剂(经辐照)相比的一半。由于天然存在的ccfDNA具有大约150bp的大小,更长的片段来源于裂解或凋亡的白细胞。因此,用包含维生素B6作为清除剂的稳定化试剂稳定的血液样品中观察到的18S rDNA基因的500bp片段的低数目表明血液被有效稳定化。特别地,用包含维生素B6的经辐照的稳定化试剂观察到的稳定化优于用没有清除剂的经辐照的稳定化试剂观察到的稳定化。这表明所述稳定化试剂的稳定化性质在辐照期间被维生素B6有效保护。在使用未被稳定的血液的阴性对照中,500bp片段拷贝数比被稳定的血液样品高甚至25-50倍。

[0844] 结论:

[0845] 像清除剂抗坏血酸、N-乙酰-L-半胱氨酸、谷胱甘肽和Trolox一样,水溶性维生素B6也防止 γ 辐照对用包含半胱天冬酶抑制剂的稳定化试剂稳定的血液中的ccfDNA稳定性水平的负面效应。因此,添加维生素B6在辐照期间保护所述稳定化组合物并且允许制备具有良好的稳定化性质的已灭菌的稳定化组合物。

[0846] 9. 实施例9:不同半胱天冬酶抑制剂对ccfDNA水平稳定化的效应以及在灭菌期间有效保护不同的半胱天冬酶抑制剂

[0847] 测试了添加不同半胱天冬酶抑制剂(Boc-D-(OMe)-FMK和Z-VAD(OMe)-FMK)对稳定全血中ccfDNA水平的效应。并且,分析了在辐照灭菌期间保护这些不同的半胱天冬酶抑制剂免于降解。

[0848] 在有或者没有所述清除剂N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)作为灭菌保护剂的情况下,添加作为半胱天冬酶抑制剂的Boc-D-(OMe)-FMK或Z-VAD(OMe)-FMK来制造稳定化试剂。在添加NAC的情况下,试剂通过30kGy的 γ 辐照批量灭菌。将ccfDNA水平的稳定化与PAXgene血ccfDNA管(PreAnalytiX)和未被稳定的EDTA血液进行比较。

[0849] 将来自6个供体的10ml全血样品采集到10ml喷雾干燥的K2EDTA管中,并通过添加1.7ml稳定化试剂进行稳定化,以及采集到PAXgene血ccfDNA管中或保持不稳定。血液样品在室温下储存5天,然后生成血浆。利用QIASymphony PAXgene血ccfDNA试剂盒和PAXcircDNA_2400_LAF(PreAnalytiX)方案,使用被稳定的血液样品在QIASymphony上从2.4ml血浆自动纯化ccfDNA。作为对照,利用QIASymphony循环DNA方案和试剂盒(QIAGEN),使用未被稳定的血液样品从2.0ml血浆纯化ccfDNA。通过实时PCR以一式三份测定18S rDNA基因(500bp片段)的总拷贝数。

[0850] 所述稳定化试剂包含(对于10ml K2EDTA全血而言):

[0851] 3.28 μ l半胱天冬酶抑制剂(以1mg溶解在217 μ l DMSO中的Boc-D-(OMe)-FMK,或以1mg溶解在122 μ l DMSO中的Z-VAD(OMe)-FMK),所述试剂还包含PEG、EDTA和DMPA,水加至1.7ml。上文描述了合适的聚乙二醇,例如PEG 300和PEG 10.000。对于包含N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)作为清除剂的稳定化试剂,将N-乙酰-L-半胱氨酸以0.5mg/ml的浓度添加到所述稳定化试剂中。在被稳定的血液中的半胱天冬酶抑制剂终浓度为约5 μ M。清除剂在全血中的终浓度为约0.44mM。

[0852] 图10中显示了来自6个供体的在室温下储存5天的血液样品中18S rDNA基因的500bp片段的平均总拷贝数。利用包含不同半胱天冬酶抑制剂的稳定化试剂稳定血液样品。左边的条:包含半胱天冬酶抑制剂Boc-D-(OMe)-FMK的稳定化试剂(未灭菌);左起第二

条:包含半胱天蛋白酶抑制剂Boc-D-(OMe)-FMK和N-乙酰半胱氨酸作为清除剂的稳定化试剂(灭菌);左起第三条:包含半胱天蛋白酶抑制剂Z-VAD(OMe)-FMK的稳定化试剂(未灭菌);左起第四条:包含半胱天蛋白酶抑制剂Z-VAD(OMe)-FMK和N-乙酰半胱氨酸作为清除剂的稳定化试剂(灭菌);左起第五条:PAXgene血ccfDNA管;左起第六条:未被稳定的EDTA血。

[0853] 从图10可以看出,在用半胱天冬酶抑制剂Boc-D-(OMe)-FMK或Z-VAD(OMe)-FMK稳定的血液样品中,可被认为来自凋亡细胞的所述500bp片段的拷贝数,与用PAXgene血ccfDNA管稳定的血液中的片段数相当。因此,包含半胱天冬酶抑制剂Boc-D-(OMe)-FMK和Z-VAD(OMe)-FMK的稳定化试剂实现了良好的稳定化特性。添加所述清除剂N-乙酰基-L-半胱氨酸(NAC)有效地保护了半胱天冬酶抑制剂Boc-D-(OMe)-FMK和Z-VAD(OMe)-FMK免于 γ -辐照。在使用未被稳定的血液的阴性对照中,500bp片段拷贝数比所述被稳定的血液样品高50-100倍。

[0854] 结论:

[0855] 像包含半胱天冬酶抑制剂Q-VD-OPh的稳定化试剂(参见例如图9)一样,包含其他半胱天冬酶抑制剂例如Boc-D-(OMe)-FMK或Z-VAD(OMe)-FMK的稳定化试剂也阻止基因组DNA释放入血浆并从而稳定ccfDNA水平。根据本发明使用的化合物,例如特别是N-乙酰半胱氨酸,在 γ 辐照期间保护包含不同半胱天冬酶抑制剂(如Q-VD-OPh、Boc-D-(OMe)-FMK或Z-VAD(OMe)-FMK)的稳定化试剂,并可通过添加自由基清除剂例如N-乙酰-L-半胱氨酸防止 γ -辐照的负面效应。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 凯杰有限公司
- [0003] <120> 用于稳定细胞外核酸的已灭菌组合物的制备方法
- [0004] <130> 57 538 K
- [0005] <150> EP 15 195 656.2
- [0006] <151> 2015-11-20
- [0007] <150> EP 16 163 863.0
- [0008] <151> 2016-04-05
- [0009] <160> 6
- [0010] <170> PatentIn version 3.5
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 22
- [0013] <212> DNA
- [0014] <213> 人工序列
- [0015] <220>
- [0016] <223> 人核糖体DNA正向引物
- [0017] <400> 1
- [0018] gccgctagag gtgaaattct tg 22
- [0019] <210> 2
- [0020] <211> 21
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列
- [0023] <220>
- [0024] <223> 人核糖体DNA反向引物
- [0025] <400> 2
- [0026] cattcttggc aaatgctttc g 21
- [0027] <210> 3
- [0028] <211> 21
- [0029] <212> DNA
- [0030] <213> 人工序列
- [0031] <220>
- [0032] <223> 人核糖体DNA探针
- [0033] <400> 3
- [0034] accggcgcaa gacggaccag a 21
- [0035] <210> 4
- [0036] <211> 22
- [0037] <212> DNA
- [0038] <213> 人工序列

-
- [0039] <220>
[0040] <223> 人核糖体DNA正向引物
[0041] <400> 4
[0042] gtcgctcgct cctctcctac tt 22
[0043] <210> 5
[0044] <211> 19
[0045] <212> DNA
[0046] <213> 人工序列
[0047] <220>
[0048] <223> 人核糖体DNA反向引物
[0049] <400> 5
[0050] ggctgctggc accagactt 19
[0051] <210> 6
[0052] <211> 25
[0053] <212> DNA
[0054] <213> 人工序列
[0055] <220>
[0056] <223> 人核糖体DNA探针
[0057] <400> 6
[0058] ctaatacatg ccgacgggcg ctgac 25

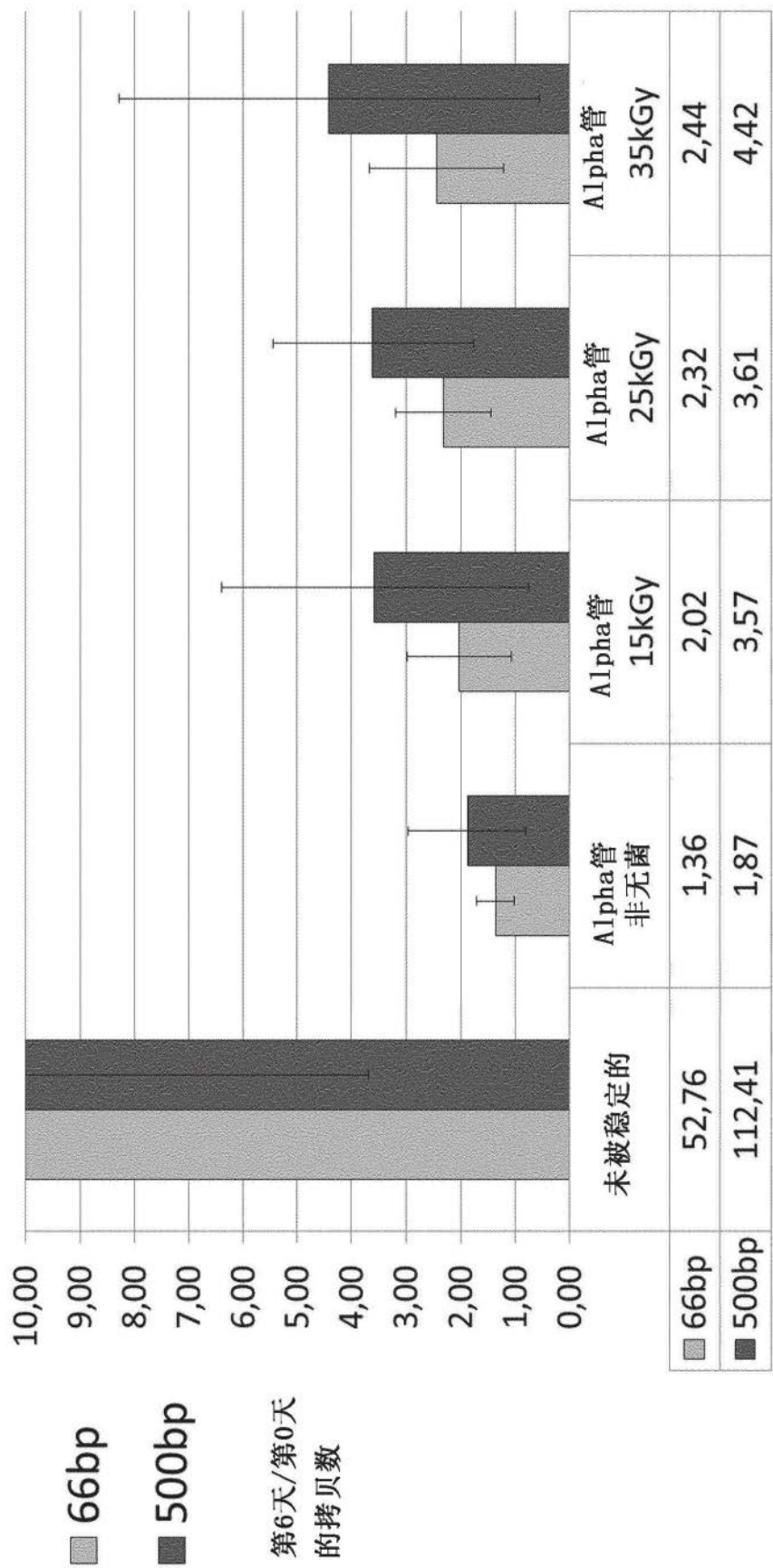


图1

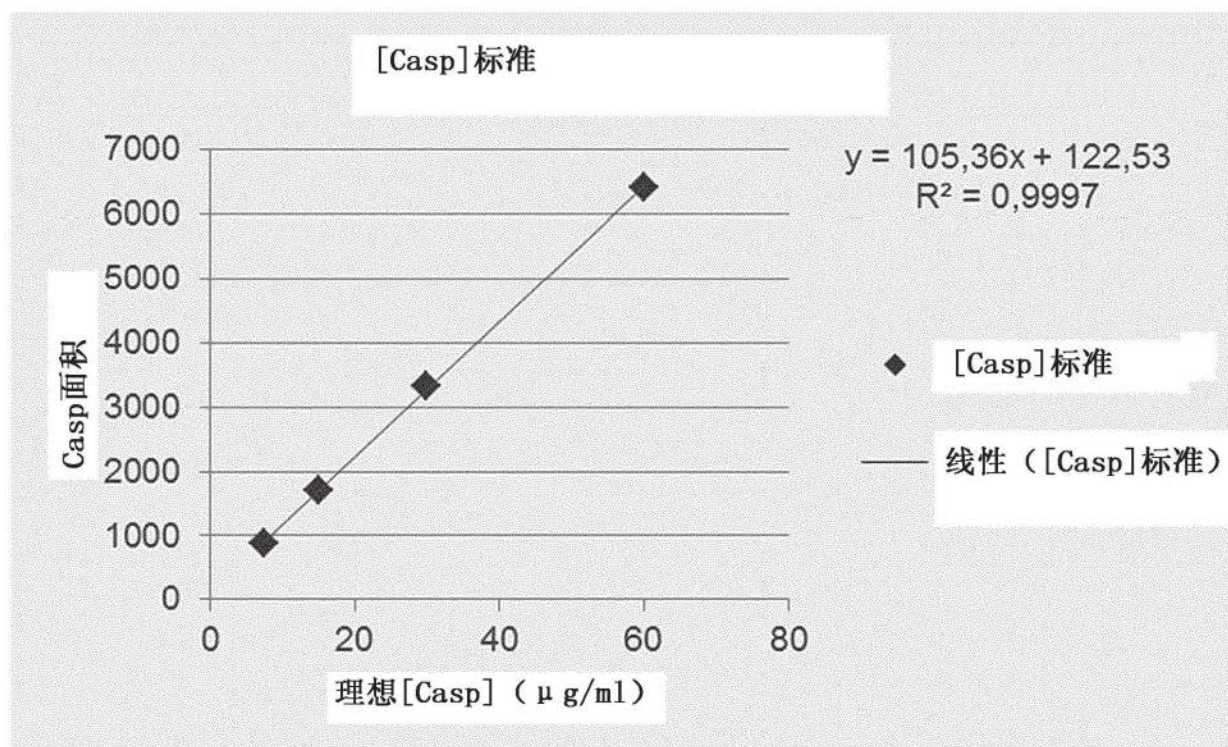


图2

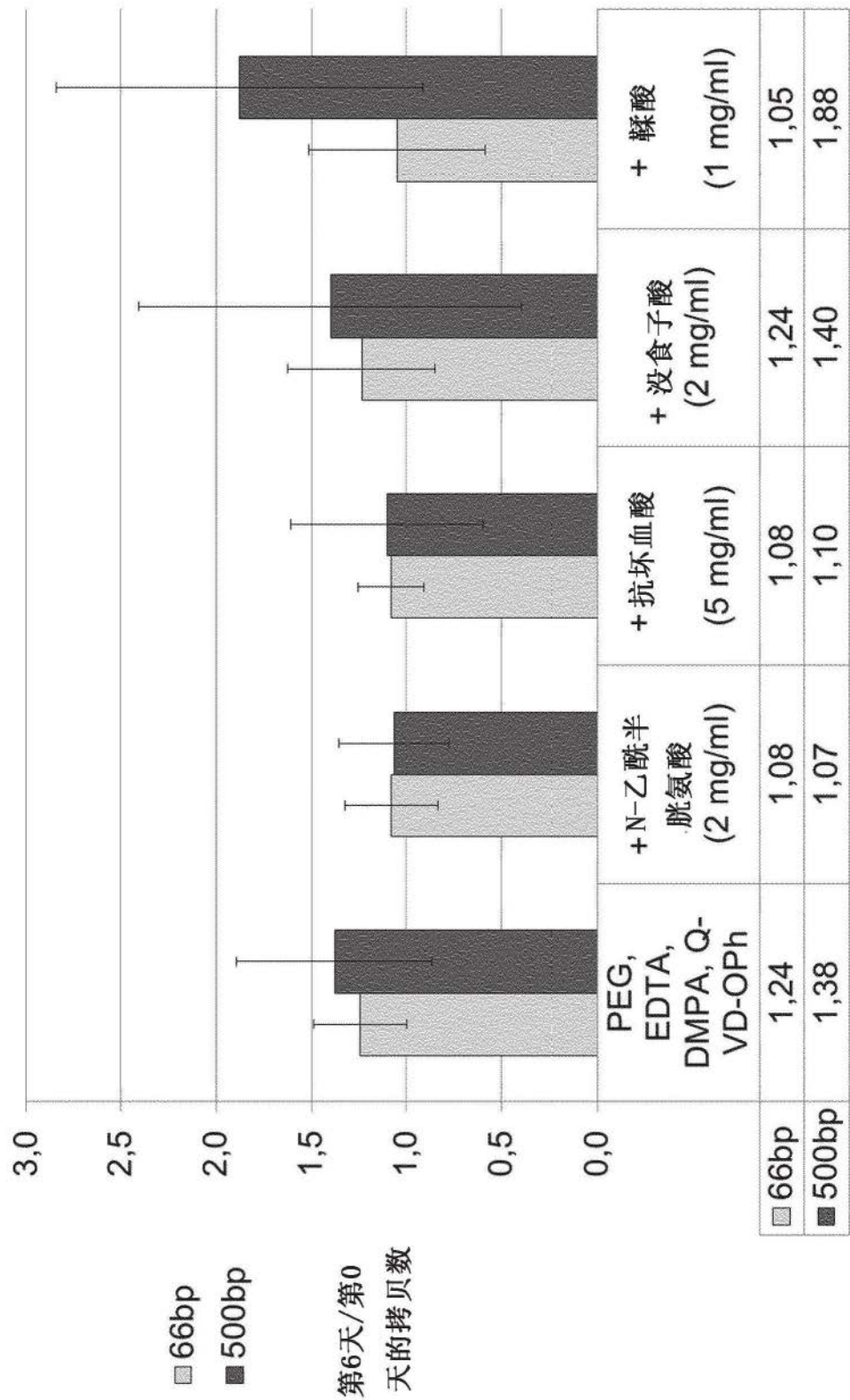


图3

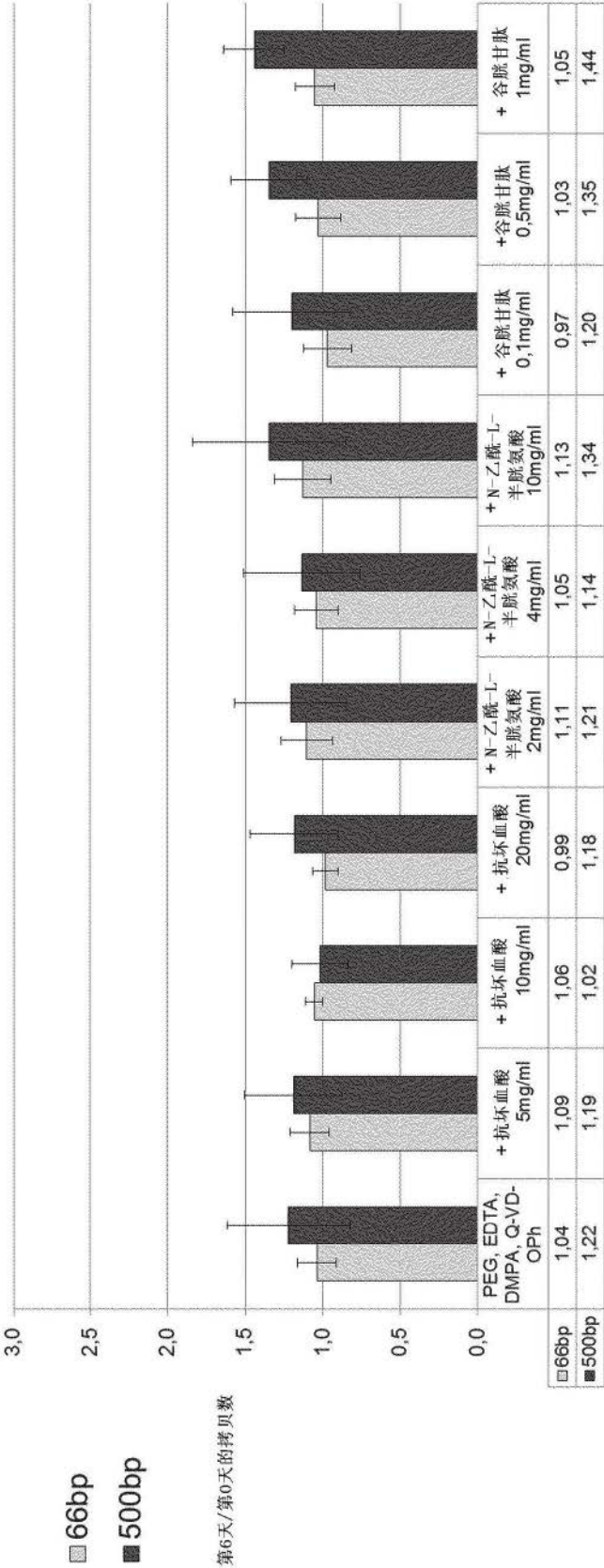


图4

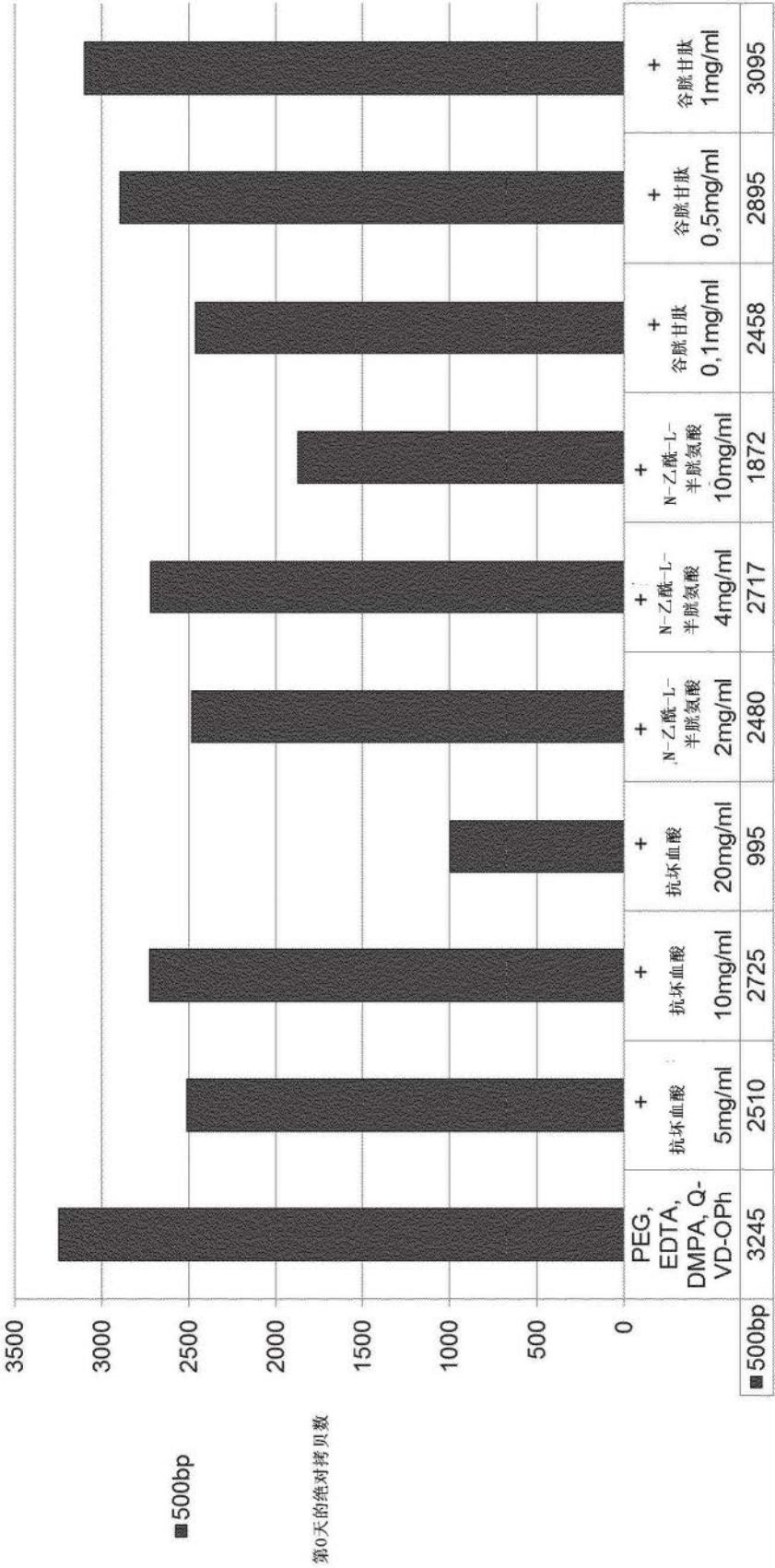


图5

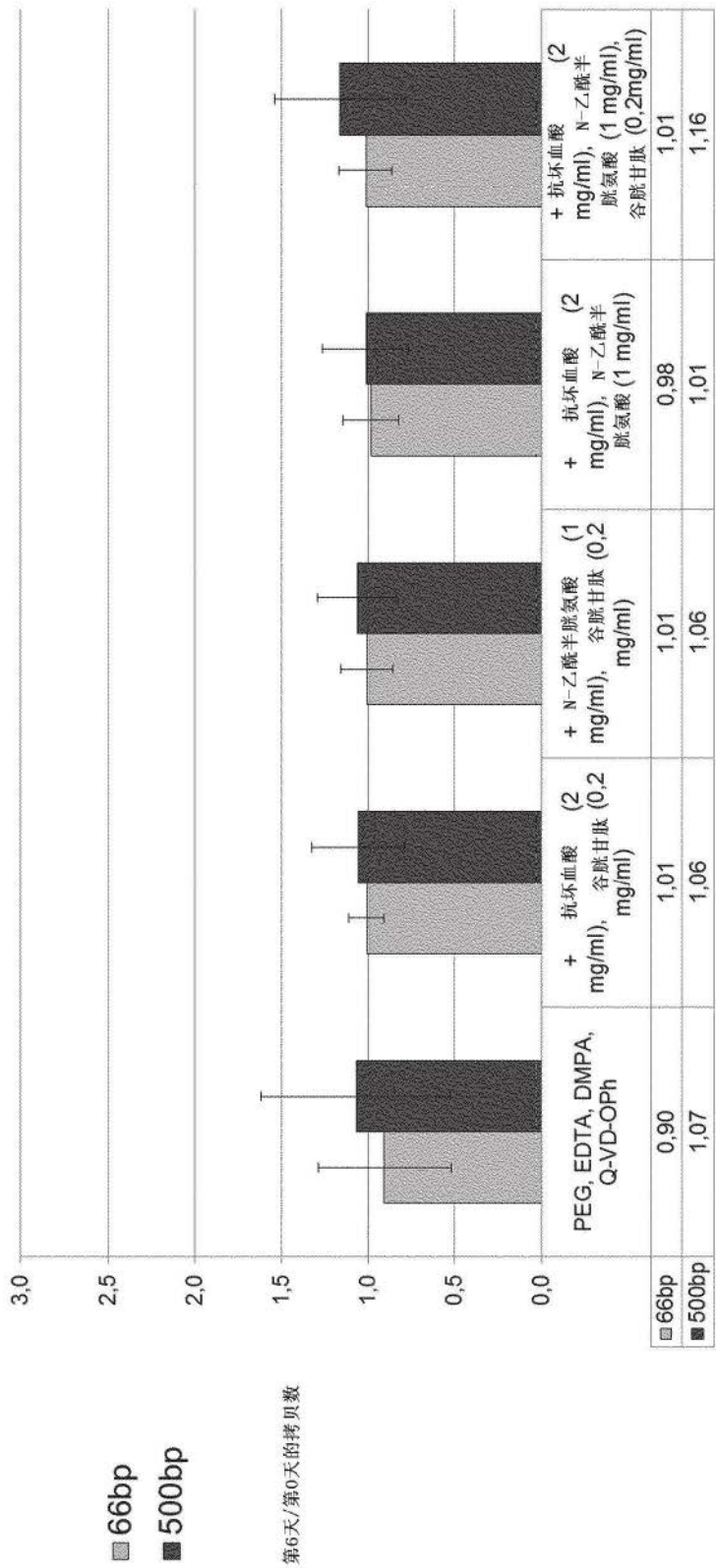


图6

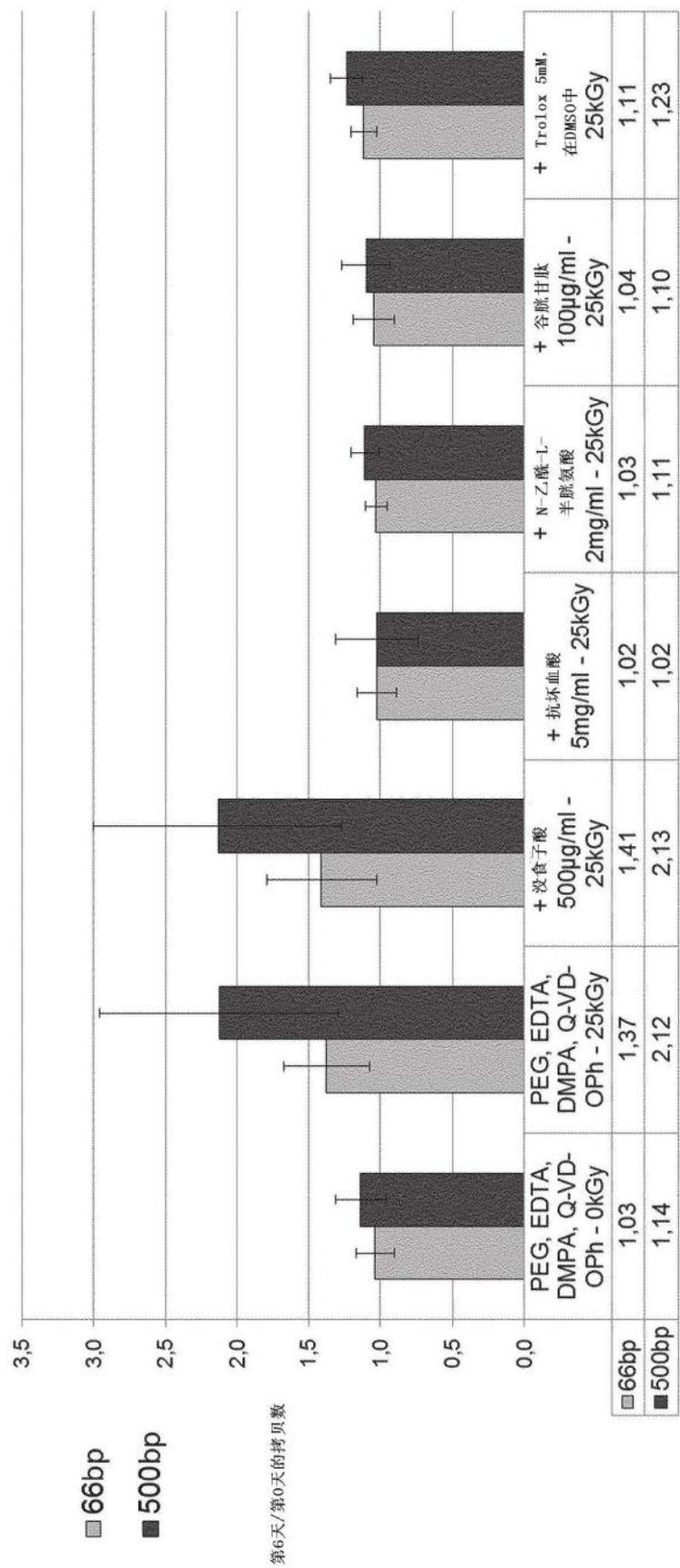


图7

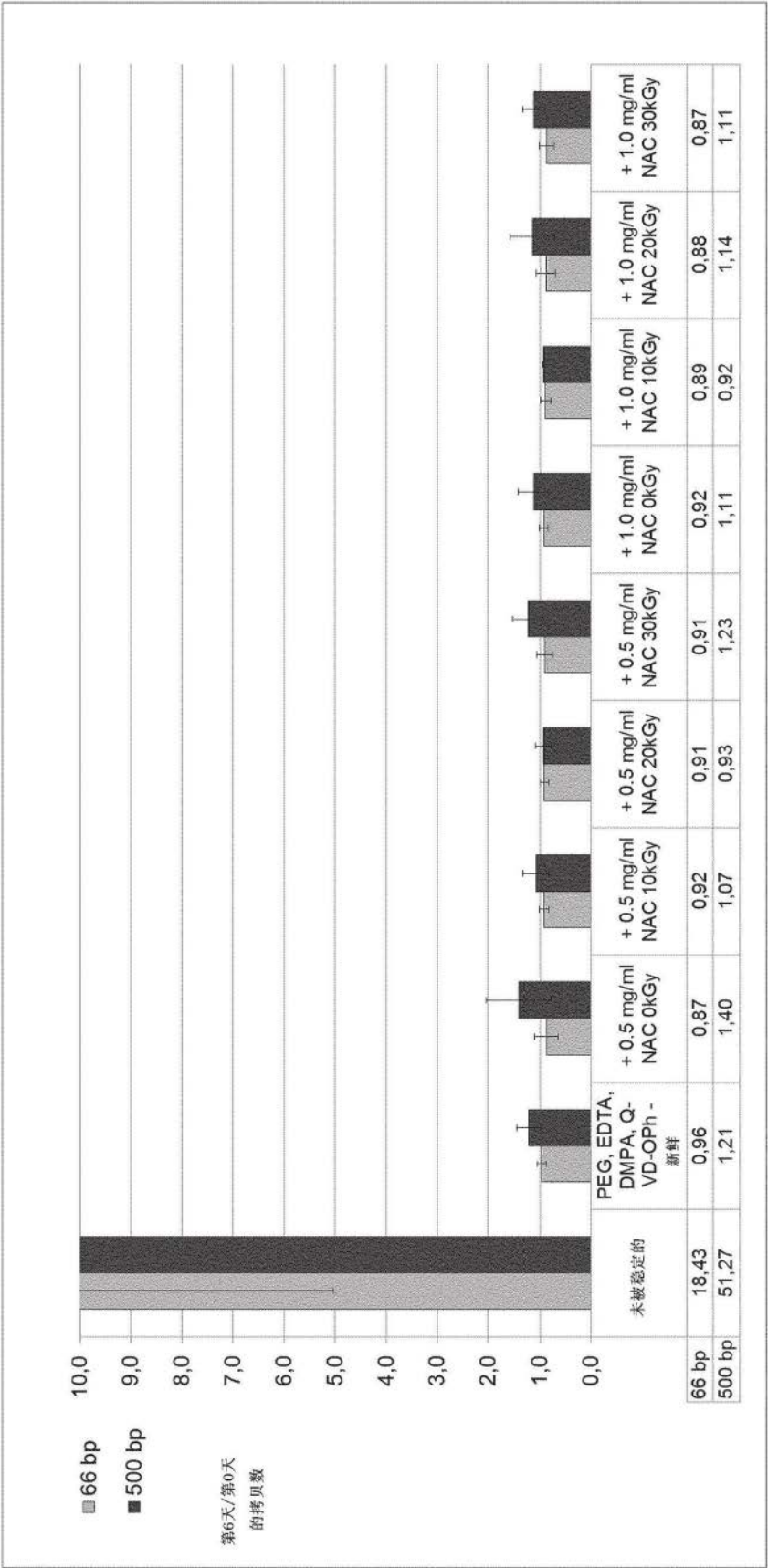


图8A

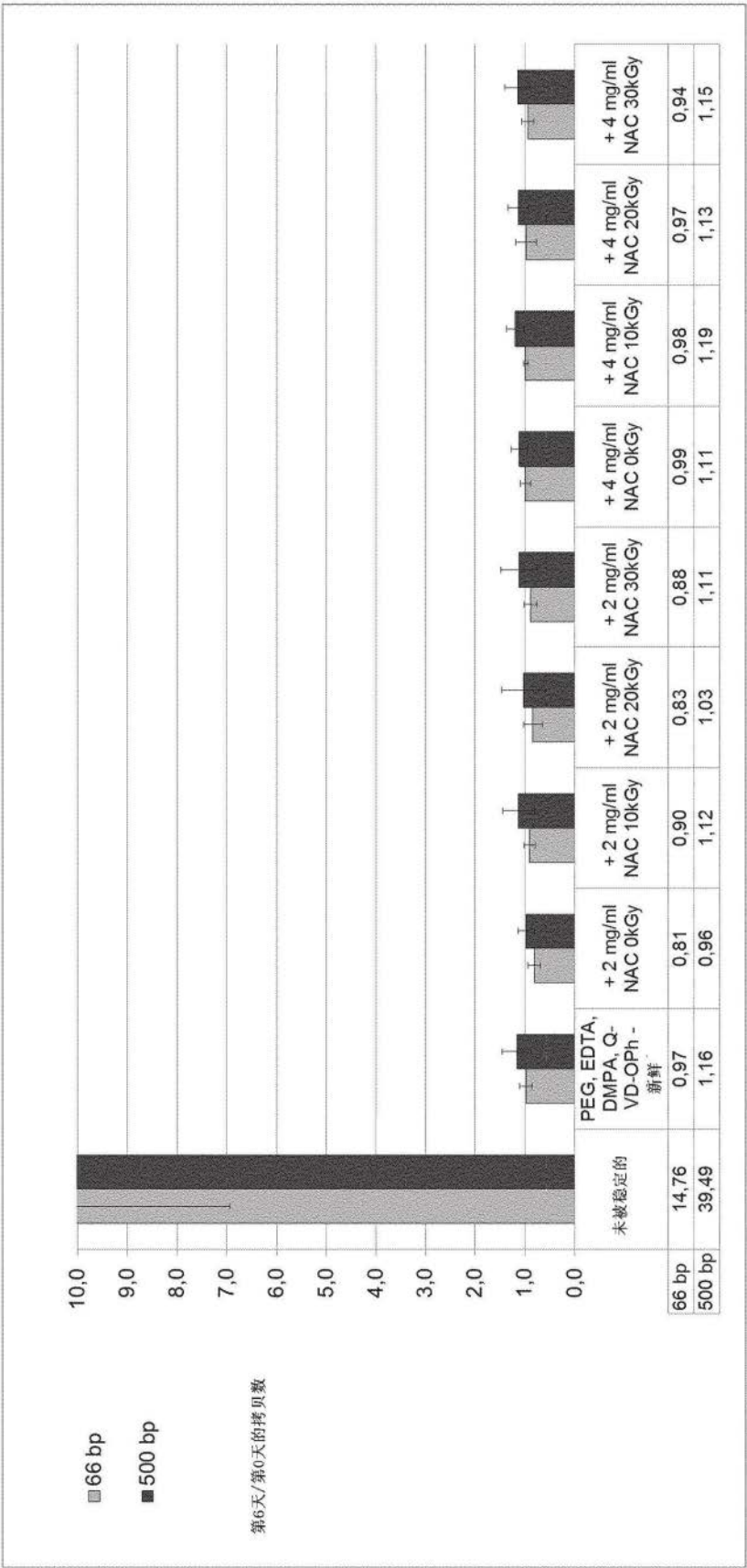


图8B

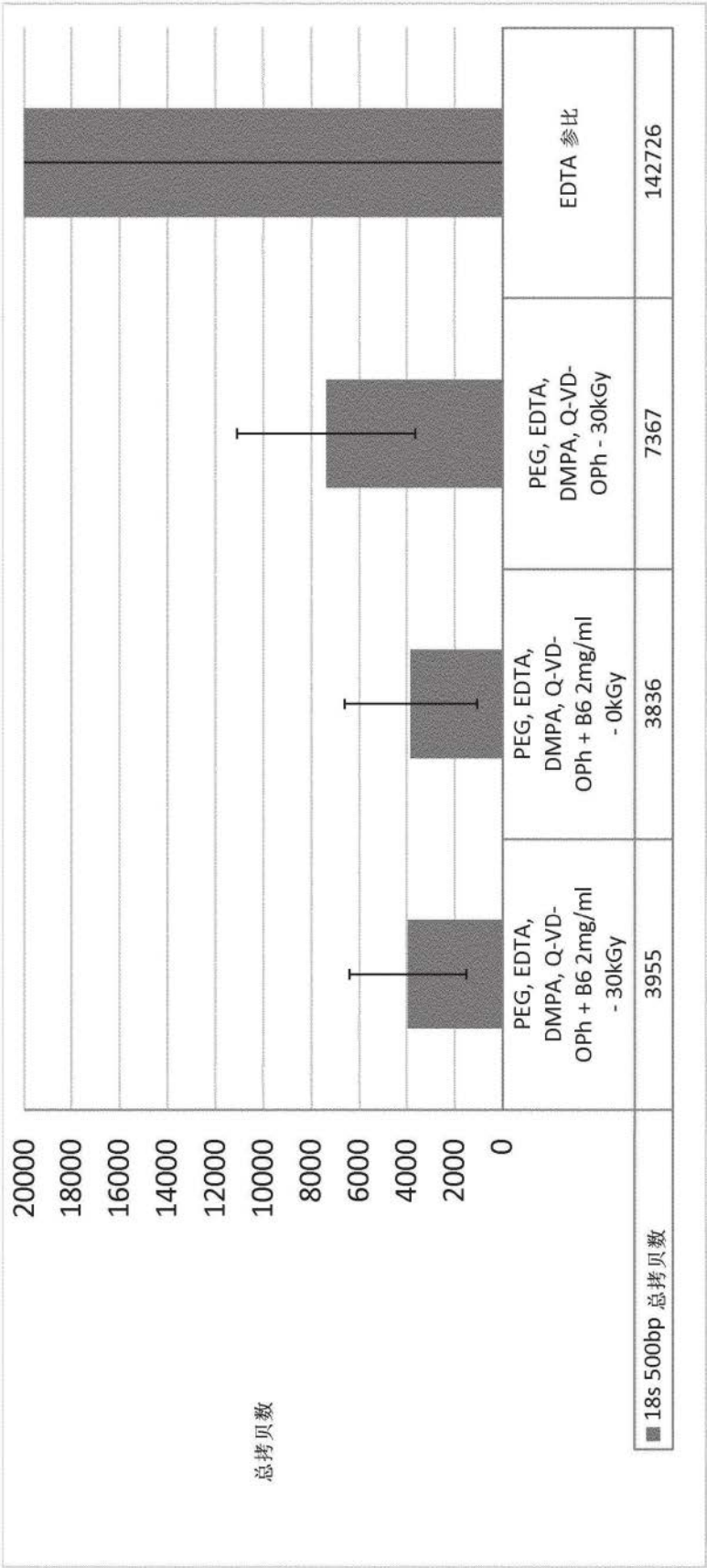


图9

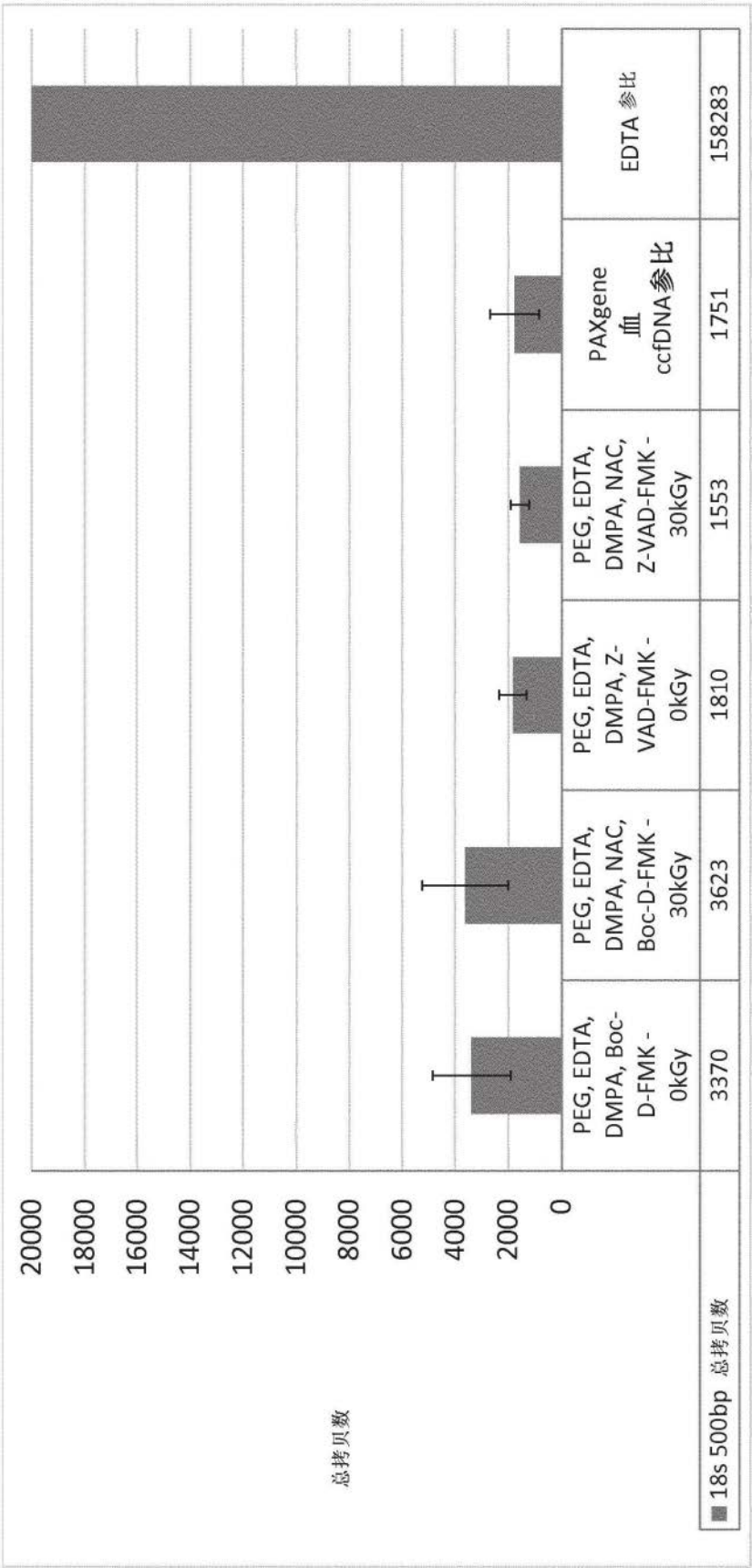


图10