

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 048**

51 Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2014 PCT/US2014/047551**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15013244**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2014 E 14750092 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2022 EP 3024323**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para estabilizar las células tumorales circulantes**

30 Prioridad:

**24.07.2013 US 201361857847 P**

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

**04.04.2023**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FERNANDO, M. ROHAN;  
RYAN, WAYNE L. y  
HUNSLEY, BRAD**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 938 048 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para estabilizar las células tumorales circulantes

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de muestras de sangre para estabilizar y preservar las células tumorales circulantes sin dañar la integridad de las células tumorales para una mejor protección y regulación de las células tumorales circulantes durante la recogida, almacenamiento y envío.

**Antecedentes de la invención.**

10 En la sangre periférica de pacientes con tumores sólidos de origen epitelial, los estudios han identificado células circulantes que tienen características de células tumorales. Se cree que estas células presentes en el torrente sanguíneo de los pacientes con cáncer (denominadas células tumorales circulantes o CTC) desempeñan un papel importante en la metástasis del cáncer al desprenderse de un tumor sólido, entrar en la circulación y migrar a órganos distantes para desarrollar tumores secundarios. Por ello, la enumeración y caracterización de las células tumorales circulantes (CTC) en la sangre de pacientes con cáncer es útil para el pronóstico del cáncer y la monitorización del tratamiento. Aunque el número de CTC presentes en la sangre de los pacientes sea muy bajo, se han desarrollado tecnologías robustas para enumerar y caracterizar las CTC en muestras de sangre de pacientes. Las CTC pueden detectarse en la sangre de pacientes con cáncer metastásico mediante diversas tecnologías. Dado que las CTC son raras, es necesario enriquecerlas a partir de la sangre del paciente para su enumeración y caracterización precisas. La mayoría de los ensayos de enriquecimiento e identificación de CTC disponibles en la actualidad se basan en el enriquecimiento con anticuerpos anti-EpCAM y la posterior identificación mediante anticuerpos anti-citoqueratina. Un ejemplo es el sistema de instrumentos CellSearch<sup>®</sup> disponible en Janssen Diagnostics, Raritan, NJ.

20 Aunque la presencia de CTC en pacientes con cáncer se conoce desde hace más de un siglo, la utilización de estas células raras en el diagnóstico y pronóstico del cáncer no era factible ya que las metodologías para detectar, aislar y caracterizar las CTC no se han desarrollado hasta hace poco. Con el desarrollo de metodologías robustas para enriquecer, aislar y caracterizar las CTC en diferentes tipos de cáncer que se encuentran en órganos sólidos, se han llevado a cabo varios estudios clínicos para investigar el posible uso de las CTC en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. Se han desarrollado ensayos que enumeran las CTC mediante el sistema Cell Search<sup>®</sup> para su uso como ayuda en el seguimiento de pacientes con cáncer metastásico de mama, colorrectal y próstata. También se ha demostrado la utilidad potencial de la enumeración de CTC mediante el sistema Cell Search<sup>™</sup> para el seguimiento de pacientes con melanoma, cáncer urotelial y de pulmón.

25 Los factores que limitan la utilidad de las CTC en el diagnóstico y pronóstico del cáncer son la baja abundancia y la fragilidad de las CTC, que pueden introducir variabilidad en la evaluación de las CTC utilizando diferentes plataformas de ensayo. El transporte de muestras de sangre desde el lugar de la flebotomía a otro centro suele ser necesario para la enumeración y caracterización de CTC. Durante el transporte/almacenamiento de la muestra de sangre tras la flebotomía, las CTC frágiles pueden degradarse y comprometer la precisión de la enumeración y caracterización de las CTC.

30 Existe un interés creciente en el uso de las CTC en el diagnóstico no invasivo, el pronóstico y la monitorización de los regímenes de tratamiento. La baja abundancia de las CTC y su naturaleza frágil pueden introducir variabilidad en la evaluación de las CTC utilizando diferentes plataformas de ensayo. Esta naturaleza frágil de las CTC se debe a la apoptosis de las CTC, que comienza tras la separación del tumor de origen y tras la extracción de sangre del paciente. Por lo tanto, es necesario abordar varias cuestiones preanalíticas que surgen durante el tiempo que transcurre entre la extracción de sangre y el enriquecimiento y la caracterización de las CTC, con el fin de preservar eficazmente las CTC para el análisis. Entre ellos se incluyen los retrasos en el procesamiento de la sangre, la temperatura de almacenamiento de la sangre y la agitación de la muestra durante el transporte y el envío de la sangre. Estas condiciones pueden afectar a la integridad de las CTC, ya de por sí frágiles, dificultando su enumeración y caracterización precisas. En consecuencia, es importante tener en cuenta el tipo de dispositivo de extracción de sangre y las condiciones posteriores a la flebotomía cuando se trabaja con muestras de CTC. Procedimientos y composiciones para estabilizar las CTC en una muestra de sangre con el fin de permitir su posterior análisis en el diagnóstico/pronóstico del cáncer se describen en los documentos WO 03/018757 A2 y US 2005/181353 A1.

35 Sin embargo, existe la necesidad de procedimientos para estabilizar y proteger las células tumorales circulantes mediante los cuales se mantenga la integridad estructural de modo que el envío y el almacenamiento sean posibles con un efecto deletéreo mínimo sobre las células tumorales circulantes. Existe también la necesidad de tales procedimientos en los que eviten los efectos deletéreos de la fijación de aldehídos.

55

**Sumario de la invención**

Las enseñanzas del presente documento emplean un protocolo que utiliza una composición única de agente protector que preserva con éxito las muestras mientras estabiliza la integridad de las CTC durante un periodo prolongado (por ejemplo, que puede ser de al menos 14 días, y que puede ser a temperatura ambiente). Las presentes enseñanzas proporcionan un procedimiento consistente y eficiente para preservar las CTC en muestras biológicas. Los datos aquí demostrados describen un procedimiento que reduce la lisis celular y la actividad nucleasa, y que además permite un análisis analítico exacto y preciso en virtud de la preservación de la concentración final de las CTC recuperables a lo largo del tiempo. De este modo, las enseñanzas proporcionan un enfoque novedoso que mejora el análisis clínico posterior de las CTC. Las presentes enseñanzas describen la protección de las CTC mediante la inhibición de toda actividad metabólica celular en las CTC en sangre. Como resultado de la inhibición metabólica de las CTC en sangre se inhiben todas las vías apoptóticas y necróticas y las CTC quedan protegidas de la degradación celular. Por lo tanto, ya no es necesario aislar y caracterizar las CTC inmediatamente después de la venopunción. Además, las muestras pueden conservarse a temperatura ambiente hasta 14 días sin efectos perjudiciales para la integridad de la muestra, lo que elimina la necesidad de conservar la muestra de sangre en frío.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de muestras de sangre que comprende:

a. colocar de 50 µl a 400 µl de un agente protector en un tubo, incluyendo el agente protector imidazolidinil urea, EDTA y glicina;

b. introducir una muestra de sangre con una primera concentración de células tumorales circulantes en el tubo, por lo que entra en contacto con el agente protector;

c. aislar células tumorales circulantes de la muestra de sangre contactada al menos 24 horas después de la extracción de sangre, teniendo la muestra de sangre contactada una segunda concentración de células tumorales circulantes, en el que la segunda concentración de células tumorales circulantes no es inferior ni superior a la primera concentración de células tumorales circulantes en ningún valor estadísticamente significativo;

en el que la concentración de la imidazolidinil urea tras la etapa de contacto es superior a 5 mg/ml;

en el que la concentración de glicina tras la etapa de contacto es inferior a 0,03 g/ml; en el que el agente protector está presente en una cantidad inferior al 5% del volumen total de la mezcla del agente protector y la muestra de sangre extraída;

en el que el agente protector no contiene formaldehído, tal como muestra la <sup>13</sup>C-NMR; y

en el que, como resultado de la inhibición metabólica de las células tumorales circulantes en la muestra de sangre tratada, se inhiben las vías apoptótica y necrótica y las células tumorales circulantes quedan protegidas de la degradación celular. Un dispositivo de recogida de sangre que contiene una muestra de sangre puede transportarse desde un primer lugar a un segundo lugar, en el que al menos una parte del transporte se realiza a una temperatura superior a 0 °C aproximadamente.

Las enseñanzas del presente documento incluyen además que el conservante puede seleccionarse del grupo que consiste en diazolidinil urea e imidazolidinil urea. La concentración del conservante antes de la etapa de contacto puede estar comprendida entre 0,1 g/ml y 3 g/ml aproximadamente. Las células tumorales circulantes pueden aislarse de la muestra al menos 3 días después de la extracción de sangre. Las células tumorales circulantes pueden aislarse de la muestra al menos 7 días después de la extracción de sangre. Las células tumorales circulantes pueden aislarse de la muestra al menos 14 días después de la extracción de sangre. La etapa de transporte puede realizarse sin congelar la muestra de sangre a una temperatura inferior a -30 °C aproximadamente. El agente protector puede entrar en contacto con las células tumorales circulantes de modo que, tras un periodo de al menos 7 días desde la extracción de la muestra de sangre, la cantidad de células tumorales circulantes es al menos aproximadamente el 90% de la cantidad de células tumorales circulantes en el momento de la extracción de la muestra de sangre. El agente protector puede entrar en contacto con las células tumorales circulantes de modo que, tras un periodo de al menos 7 días desde el momento en que se extrae la muestra de sangre, la cantidad de células tumorales circulantes presentes en la muestra es aproximadamente el 100% de la cantidad de células tumorales circulantes presentes en la muestra en el momento en que se extrae la muestra de sangre.

En el presente documento se divulgan además composiciones mejoradas de agentes protectores y procedimientos para estabilizar una muestra biológica para su análisis. Las composiciones de agentes protectores incluirán generalmente un agente conservante, tal como se describe en el presente documento, y un agente de extinción para reducir sustancialmente que cualquier aldehído libre (por ejemplo, formaldehído) reaccione con el ADN dentro de una muestra. La composición del agente protector también puede incluir uno o más inhibidores de nucleasas. La composición del agente protector también puede incluir uno o más inhibidores metabólicos. Los procedimientos aquí descritos pueden comprender una etapa de obtención en el dispositivo de recogida de sangre de una muestra biológica de un sujeto. La muestra biológica puede incluir al menos una célula tumoral circulante del sujeto. Los procedimientos pueden incluir una etapa de poner en contacto la muestra biológica, mientras está dentro del dispositivo de recogida de sangre, con una composición de agente protector que incluye un agente conservante, un anticoagulante opcional

5 y un agente de extinción para formar una mezcla que incluye la composición de agente protector y la muestra. Los procedimientos pueden incluir una etapa de extinción de cualquier formaldehído libre que pueda estar presente con el agente de extinción de la composición de agente protector, de modo que el formaldehído libre reacciona para formar un producto de reacción que es inerte para las CTC dentro de la muestra biológica. La mezcla resultante puede estar desprovista de cualquier aldehído, y las CTC de la muestra pueden ser adecuadas para aplicaciones posteriores.

10 Para muestras derivadas de sangre, puede haber una etapa de extracción e introducción de sangre de un paciente en un dispositivo de extracción de sangre que tiene cargada la composición de agente protector antes de la etapa de extracción de sangre. El procedimiento puede incluir una etapa de transporte de la muestra mientras está en contacto con la composición del agente protector desde un lugar de extracción de sangre hasta un laboratorio clínico (por ejemplo, uno situado al menos a 100 metros, 1.000 metros, 10.000 metros del lugar de extracción de sangre) en el que se realizará un análisis de la muestra. La extinción se produce antes y/o sustancialmente al mismo tiempo que la etapa de contacto. Los procedimientos pueden incluir una etapa de aislamiento de las células tumorales circulantes de la muestra. Los procedimientos pueden estar exentos de cualquier etapa de centrifugación de la muestra. Los procedimientos pueden estar exentos de cualquier etapa de aislamiento de ADN fetal libre de células, ADN libre de células, ARN libre de células o ARN celular a partir de una muestra de sangre. Los procedimientos pueden estar exentos de cualquier etapa de refrigeración de la muestra (por ejemplo, a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, como unos 10°C o menos) después de que se haya puesto en contacto con la composición de agente protector.

20 Como puede apreciarse a partir de lo anterior, las enseñanzas del presente documento proporcionan un tratamiento ventajoso de las muestras que contienen CTC y proporcionan muestras estabilizadas que están esencialmente libres de modificaciones covalentes detectables que inhiben las pruebas posteriores de las características de las CTC.

### Breve descripción de los dibujos

25 La Fig. 1 muestra un gráfico que muestra el efecto de dos composiciones de agentes protectores ejemplares y una composición estándar de K<sub>3</sub>EDTA sobre la recuperación de células MCF-7 en el Día 1 y el Día 4 después de la extracción de sangre.

La Fig. 2 muestra los resultados de la tinción celular por inmunofluorescencia (EpCAM y citoqueratina) de dos composiciones de agentes protectores ejemplares y una composición estándar de K<sub>3</sub>EDTA.

La Fig. 3 muestra resultados de tinción celular por fluorescencia que muestran los niveles de expresión de ARNm tras el contacto con una composición ejemplar de agente protector y una composición estándar de K<sub>3</sub>EDTA.

### 30 Descripción detallada

La presente solicitud está relacionada con y reivindica el beneficio de la fecha de presentación de Solicitud provisional estadounidense n.º de serie 61/857.847 presentada el 24 de julio de 2013.

35 Las explicaciones e ilustraciones aquí presentadas pretenden familiarizar a otros expertos en la materia con las enseñanzas, sus principios y su aplicación práctica. Los expertos en la materia pueden adaptar y aplicar las enseñanzas en sus numerosas formas, como mejor convenga a los requisitos de un uso particular. Por consiguiente, las realizaciones específicas de las presentes enseñanzas no pretenden ser exhaustivas o limitativas de las mismas. Por lo tanto, el alcance de las enseñanzas no debe determinarse con referencia a la descripción anterior, sino con referencia a las reivindicaciones adjuntas.

40 A menos que se indique lo contrario, los porcentajes aquí establecidos se refieren a porcentajes en peso. Además, a menos que el contexto de la discusión deje claro lo contrario, las referencias a células tumorales circulantes se refieren no sólo a células tumorales circulantes intactas, sino también a fragmentos de células tumorales.

45 Las presentes enseñanzas contemplan un procedimiento de cribado no invasivo para la identificación de células tumorales circulantes que son potencialmente indicativas del diagnóstico y la progresión del cáncer. Las enseñanzas del presente documento prevén no sólo preservar el estado de cualquier célula en una muestra, sino también proteger las células tumorales circulantes de cualquier efecto adverso durante cualquier retraso entre la recogida de la muestra y el procesamiento y/o análisis. Los procedimientos aquí divulgados generalmente implican etapas para poner en contacto una muestra biológica (que puede incluir múltiples células sanguíneas y biomoléculas libres de células), con una composición de agente protector libre de aldehído (por ejemplo, libre de formaldehído) en una cantidad y tiempo que sea suficiente para prevenir la degradación de las células tumorales circulantes. El tratamiento es tal que impide sustancialmente que cualquier aldehído libre reaccione negativamente con las CTC de la muestra, por ejemplo empleando un agente de extinción. De este modo, se pueden mantener cantidades sustanciales de CTC dentro de la muestra y aislarlas de ella. La integridad de las CTC se preserva sustancialmente en su estado tal como se suministra (por ejemplo, el estado en el momento de la extracción de sangre) evitando los efectos perjudiciales de cualquier aldehído (por ejemplo, formaldehído). De este modo, se puede lograr un análisis analítico exacto y preciso de las CTC de la muestra. El procedimiento puede incluir además etapas de análisis de las CTC de una muestra que ha sido tratada de acuerdo con lo anterior, o que ha sido puesta en contacto de otro modo con la composición de agente protector y el agente de extinción que contiene. Como se ha señalado, las enseñanzas del presente documento

permiten la identificación de las características de las CTC para el uso pronóstico y diagnóstico de diversas afecciones patológicas en la clínica.

Las Composiciones de Agentes Protectores A y B descritas en los ejemplos siguientes y mostradas en los dibujos incluyen un reactivo de estabilización libre de formaldehído que estabiliza las CTC en una muestra de sangre hasta 14 días a temperatura ambiente. Lo hacen inhibiendo el metabolismo celular en las CTC en sangre e impidiendo la apoptosis y necrosis celulares que degradan las CTC en sangre. Estos ejemplos se diseñaron para investigar la eficacia de estos dispositivos de extracción de sangre para la estabilización de las CTC en una muestra de sangre durante un periodo de tiempo prolongado a temperatura ambiente.

El estudio fue aprobado por la junta de revisión institucional del Methodist Hospital, Omaha, NE, EE.UU. y se obtuvo el consentimiento informado de todos los donantes antes de la extracción de sangre. Se recogieron muestras de sangre de donantes adultos aparentemente sanos mediante técnicas de flebotomía estándar.

La línea celular de cáncer de mama, células MCF-7 se obtuvo de American Type Culture Collection (Rockville, MD, EE.UU.) y se pasó rutinariamente en medio MEM de Eagle que contenía 10% de suero bovino fetal a 37 °C en atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para el experimento de sembrado de células MCF-7, se introdujo sangre de cada donante sano (7 donantes en total) en tubos de 10 mL con K<sub>3</sub>EDTA (BDVacutainer®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), y tubos de 10 mL con Agente Protector A y tubos de 10 mL con Agente Protector B. El volumen de sangre fue lo más cercano posible a 10 mL para todos los tipos de tubos. A continuación, se sembraron células MCF-7 (2000 células/10 mL de sangre) en todos los tubos y la sangre se mezcló inmediatamente después del sembrado invirtiéndolos 10 veces cada uno. Todas las muestras se enviaron a temperatura ambiente a Geneuity Clinical Research Services (Maryville, TN, EE.UU.) y se analizaron en el sistema CellSearch los días 1 y 4 después de la flebotomía para determinar la estabilidad de las células MCF-7 sembradas. Las muestras de sangre se mantuvieron a temperatura ambiente durante todo el proceso.

Si bien se utilizó el sistema CellSearch para los ejemplos aquí descritos, se prevé que las composiciones de agentes protectores aquí descritas podrían utilizarse con cualquier dispositivo y/o plataforma equipada para el enriquecimiento y caracterización de células tumorales.

### Ejemplos

Se introdujo sangre de cada donante en múltiples tubos de 10 mL con K<sub>3</sub>EDTA y múltiples tubos de 10 mL para cada una de las Composiciones de Agentes Protectores A y B. En todos los tipos de tubos se sembraron con células de cáncer de mama MCF-7 y se almacenaron a temperatura ambiente. Las células MCF-7 sembradas se enumeraron mediante el sistema CellSearch™ los días 1 y 4. Se determinó el efecto del almacenamiento sobre la estabilidad de las proteínas y ácidos nucleicos en células MCF-7 aisladas del tubo con K<sub>3</sub>EDTA y Composiciones A y B del Agente Protector mediante tinción fluorescente y microscopía confocal de barrido láser.

En general, el recuento de células MCF-7 en sangre con K<sub>3</sub>EDTA mostró un descenso significativo de las células MCF-7 recuperadas en los días 1 y 4 en comparación con los valores obtenidos para las Composiciones de Agentes Protectores A y B. Sin embargo, en la sangre introducida en tubos que contenían las Composiciones de Agentes Protectores A y B, el recuento de células MCF-7 se mantuvo estable hasta 4 días a temperatura ambiente. La molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM) y la citoqueratina (CK) en células MCF-7 aisladas de tubos que contenían las Composiciones A y B del Agente Protector se mantuvieron estables a temperatura ambiente durante un máximo de 4 días, mientras que en las células MCF-7 aisladas de sangre con K<sub>3</sub>EDTA se observó una reducción de la expresión de las proteínas EpCAM y CK. La expresión de la proteína CK no mostró cambios significativos a lo largo de 4 días en los tubos que contenían las Composiciones de Agentes Protectores A y B. De forma similar, la Composición de Agentes Protectores A mostró una mejor estabilización del ARNm de c-fos en comparación con los tubos con K<sub>3</sub>EDTA. No se observaron cambios significativos en la expresión de ARNm de ciclina D1 en todos los tubos.

Como se detalla más adelante, las Composiciones de Agentes Protectores A y B proporcionan preservación y estabilización de las CTC en muestras de sangre durante al menos 4 días a temperatura ambiente. De este modo, facilita el desarrollo de nuevas metodologías no invasivas de diagnóstico y pronóstico para la enumeración y caracterización de CTC.

*Efecto del almacenamiento sobre la estabilidad de EpCAM y CK determinada por tinción celular de inmunofluorescencia - Fig. 2*

Se introdujo sangre de cada donante en un tubo de 10 mL con K<sub>3</sub>EDTA, un tubo de 10 mL que contenía la Composición de Agente Protector A, y un tubo de 10 mL que contenía la Composición de Agente Protector B. Se separó el plasma de la sangre dentro de las 2 h posteriores a la extracción. Para separar el plasma, las muestras de sangre se centrifugaron a 300 x g durante 20 min a temperatura ambiente. La capa superior de plasma se retiró cuidadosamente sin alterar la capa leucocitaria y se transfirió a un nuevo tubo que se centrifugó a 5000 x g durante 10 min. A continuación, el plasma libre de células se sembró con células MCF-7 (≈ 2.000 células / 4 - 5 mL de plasma) y se almacenó a temperatura ambiente. En los días 0 y 4, las células MCF-7 se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y se centrifugaron a 500 rpm durante 7 minutos en portaobjetos de vidrio utilizando la citocentrífuga Shandon

Cytospin® 3. A continuación se secaron los portaobjetos y se realizó la inmunotinción para EpCAM y citoqueratina con un cóctel de anticuerpos primarios que contenía un anticuerpo anti-EpCAM de ratón (VU-1D9, #sc-51681, 1:1:100) y un anticuerpo anti-CK de ratón (T-13, #sc-241376, 1:100). Tras 1 h de incubación, los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS y se cubrieron con anticuerpos secundarios marcados con fluorescencia para anti-EpCAM de ratón (anti-IgG de ratón-FITC auxiliar, #sc-2099, 1:200) y anti-CK de ratón (anti-IgG de cabra-PerCP-Cy5,5 auxiliar, #sc-45102, 1:200).5, #sc-45102, 1:200) durante 1 h. Tras lavar los portaobjetos dos veces con PBS, los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con medio de montaje UltraCruz™ (#sc-24941) que contenía 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para la contratinción de los núcleos celulares. Todos los anticuerpos y el medio de montaje se adquirieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, EE.UU.) y se siguió el protocolo del fabricante. Las imágenes fluorescentes se obtuvieron utilizando el microscopio confocal de barrido láser Zeiss LSM 510 META NLO (Oberkochen, Alemania).

#### *Efecto del almacenamiento en la estabilidad de las moléculas de ARNm mediante balizas moleculares - Fig. 3*

Se prepararon portaobjetos de citospin de células MCF-7 sembradas como se ha descrito anteriormente. Las células de los portaobjetos se trataron con metanol helado (-10 °C) durante 5 a 10 minutos. Tras secarse al aire, los portaobjetos se tiñeron con una mezcla de 200 nmol/L de balizas moleculares marcadas con fluorescencia dirigidas a los ARNm de c-fos o ciclina D1 en Opti-MEM (Invitrogen) a 37 °C durante 1 h. A continuación, se lavaron las células teñidas de los portaobjetos, se contrateñieron con DAPI y se examinaron con un microscopio confocal. Las balizas moleculares se adquirieron de Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL).

#### *Estabilidad de las células MCF-7 sembradas en sangre - Fig. 1*

Se llevaron a cabo experimentos para determinar la capacidad de las Composiciones de Agentes Protectores A y B para estabilizar las CTC durante el almacenamiento y transporte de muestras de sangre en comparación con los tubos de recogida de sangre con K<sub>3</sub>EDTA normales. Se analizaron muestras de sangre paralelas introducidas en K<sub>3</sub>EDTA y tubos que contenían las composiciones de agentes protectores A y B y en las que se habían sembrado células MCF-7 utilizando el sistema CellSearch para la recuperación de células tumorales sembradas. Como se muestra en la Figura 1, las Composiciones de Agentes Protectores A y B demostraron la recuperación porcentual deseada de las células tumorales a temperatura ambiente durante un máximo de 4 días. En las composiciones A y B del agente protector, en el día 1 se recuperó el 60% (desviación estándar [SD] = 4%, coeficiente de variación [CV] = 7,3%) de las células MCF-7 sembradas y en el día 4 fue del 58% (SD = 8%, CV = 14,3%). Por el contrario, los tubos con K<sub>3</sub>EDTA no lograron preservar las CTC, lo que dio lugar a unas tasas de recuperación mucho más bajas tanto para el día 1 como para el día 4, en comparación con las composiciones de agentes protectores A y B. En los tubos con K<sub>3</sub>EDTA, en el día 1, la tasa de recuperación fue del 32% (SD = 12%, CV = 36,3%) de las células MCF-7 sembradas y en el día 4 fue del 16% (SD = 14%, CV = 87%).

#### *Efecto del almacenamiento sobre la estabilidad de las proteínas EpCAM y CK determinado mediante tinción celular por inmunofluorescencia - Fig. 2*

La Figura 2 ilustra los efectos del almacenamiento a temperatura ambiente sobre la estabilidad de la proteína transmembrana EpCAM asociada al tumor y la proteína citoqueratina del citoesqueleto de células tumorales MCF-7 sembradas en plasma sanguíneo. Según la Figura 2, la proteína EpCAM que se expresa en la membrana celular de las células MCF-7 es estable hasta 4 días a temperatura ambiente en tubos que contienen las Composiciones A y B del Agente Protector, mientras que en tubos con K<sub>3</sub>EDTA esta proteína de membrana se degradó parcialmente al cuarto día. Según la Figura 2, la señal de fluorescencia para la proteína de membrana celular EpCAM es muy débil y difusa en las células MCF-7 sembradas en sangre con K<sub>3</sub>EDTA en el día 4. La proteína CK se estabiliza en los tubos que contienen las Composiciones A y B del Agente Protector en el día 4, sin embargo, esta proteína era menos estable en los tubos con K<sub>3</sub>EDTA en el día 4, como lo demuestra la menor intensidad de fluorescencia de esta proteína en las células MCF-7 sembradas recuperadas de los tubos con K<sub>3</sub>EDTA. La tinción de las células con DAPI muestra que el núcleo y el contenido nuclear son estables en las células recuperadas de los tubos que contienen las Composiciones A y B del Agente Protector, pero no en las células recuperadas de los tubos con K<sub>3</sub>EDTA tras 4 días de almacenamiento a temperatura ambiente (Figura 2).

#### *Efecto del almacenamiento en la estabilidad de las moléculas de ARNm mediante balizas moleculares - Fig. 3*

Se llevaron a cabo experimentos para estudiar la estabilidad del ARNm en células MCF-7 sembradas recuperadas de tubos con Composición A del Agente Protector y K<sub>3</sub>EDTA. Las citospinas de las células MCF-7 recuperadas se prepararon como se ha descrito anteriormente. Para detectar el ARNm *in situ*, se utilizaron balizas moleculares marcadas con fluorescencia y un microscopio confocal de barrido. Como se muestra en la Figura 3, el ARNm de c-fos (fluorescencia verde) y el ARNm de ciclina D1 (fluorescencia roja) se mantuvieron estables en la Composición A del Agente Protector hasta 4 días a temperatura ambiente. Sin embargo, en los tubos con K<sub>3</sub>EDTA, el ARNm de c-fos no se mantuvo estable tras 4 días de almacenamiento a temperatura ambiente, lo que indica que la expresión del ARNm de c-fos se degradó significativamente o disminuyó. El cambio en el nivel de ARNm de ciclina D1 en las células MCF-7 recuperadas del tubo K<sub>3</sub>EDAT fue mínimo tras 4 días de incubación a temperatura ambiente.

En el ejemplo con los resultados mostrados en la Figura 1, se sembraron 2000 células MCF-7 en cada tubo con K<sub>3</sub>EDTA y en los tubos que contenían las Composiciones de Agentes Protectores A y B y se enviaron desde Omaha

NE a Maryville, TN por envío nocturno para su análisis por el Sistema CellSearch™. Así pues, este ejemplo representa una combinación del efecto del transporte y del almacenamiento sobre las CTC en muestras de sangre. Como se muestra en la Figura 1, nuestro estudio de recuperación de CTC realizado con células MCF-7 sembradas y analizadas mediante el sistema CellSearch™ demostró que las composiciones de agentes protectores A y B son capaces de preservar las CTC durante el transporte y el almacenamiento a temperatura ambiente hasta 4 días. Estudios anteriores en los que se ha utilizado el sistema CellSearch™ han demostrado que la tasa de recuperación de células MCF-7 poco después de la extracción de sangre oscila entre el 62 y el 89%. Nuestros resultados muestran que en los tubos que contienen las Composiciones A y B del Agente Protector, las tasas de recuperación tras el envío en el día 1 y en el día 4 son del 61% y el 57% respectivamente. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos dos valores, lo que indica que las CTC son estables en las composiciones A y B del agente protector durante 4 días después del envío a temperatura ambiente. Sin embargo, en los tubos con K<sub>3</sub>EDTA, la tasa de recuperación de CTC fue muy baja en comparación con las composiciones de agentes protectores A y B. En los tubos con K<sub>3</sub>EDTA, las tasas de recuperación tras el envío el día 1 y el día 4 fueron del 32% y el 16% respectivamente. Hubo una disminución estadísticamente significativa de la recuperación de CTC en el tubo con K<sub>3</sub>EDTA en el día 1 y en el día 4 en comparación con las Composiciones A y B del Agente Protector. Como se muestra en la Figura 2, la tinción de inmunofluorescencia de las CTC recuperadas para EpCAM y CK mostró la estabilidad de estas proteínas en las CTC recuperadas de las Composiciones A y B del Agente Protector 4 días después del almacenamiento a temperatura ambiente. Sin embargo, las células recuperadas de los tubos con K<sub>3</sub>EDTA mostraron una degradación de las proteínas EpCAM y CK tras 4 días a la misma temperatura. La tinción con DAPI de las células mostró un núcleo y un contenido nuclear estables en las CTC recuperadas de las composiciones A y B del agente protector, mientras que las CTC recuperadas de los tubos con K<sub>3</sub>EDTA mostraron un núcleo y un contenido nuclear en degradación (Figura 2).

El ejemplo de la baliza molecular muestra que tanto el ARNm de c-fos como el del ciclo D1 son estables en la Composición A del Agente Protector a temperatura ambiente hasta 4 días (Figura 3). Sin embargo, las CTC recuperadas de los tubos con K<sub>3</sub>EDTA mostraron CTC con ARNm de c-fos y ciclina D1 en degradación, como se muestra en la Figura 3.

El análisis del reactivo estabilizante presente en las Composiciones A y B del Agente Protector mediante <sup>13</sup>C-NMR ha mostrado que el reactivo está libre de formaldehído. Se sabe que los productos químicos a base de aldehído utilizados tradicionalmente en la estabilización celular, como el formaldehído y el glutaraldehído, dañan el ADN y el ARN al provocar modificaciones químicas en los ácidos nucleicos y crear enlaces cruzados ácido nucleico-proteína que dificultan la extracción de los ácidos nucleicos. La aplicación de este tipo de productos químicos basados en aldehídos para la estabilización de CTC puede causar problemas en los estudios de caracterización de CTC. El reactivo estabilizador celular presente en las Composiciones de Agentes Protectores A y B tiene una ventaja sobre los agentes estabilizadores basados en aldehídos, ya que no tiene ningún efecto negativo ni en la extracción de ácidos nucleicos ni en la amplificación por PCR.

En estos ejemplos, las Composiciones de Agentes Protectores A y B proporcionan preservación y estabilización de las CTC en muestras de sangre hasta 4 días a temperatura ambiente. De este modo, las composiciones de agentes protectores apoyan el desarrollo de nuevas metodologías no invasivas de diagnóstico y pronóstico para la enumeración y caracterización de CTC.

Puede emplearse una única composición de agente protector que incluya una composición conservante y un agente de extinción. Dicha composición de agente protector puede precargarse en un dispositivo de recogida de muestras, como un tubo de recogida de sangre (que puede evacuarse a una presión inferior a la atmosférica tras la carga). Así, es posible que se tome una muestra de un sujeto directamente en el dispositivo de recogida de muestras (por ejemplo, un tubo de recogida de sangre), momento en el que entrará en contacto con la composición de agente protector. También es posible que se tome una muestra de un sujeto en un primer recipiente y que la muestra se transfiera posteriormente a uno o más segundos recipientes en los que esté presente la composición del agente protector.

La composición de agente protector sin aldehído (por ejemplo, sin formaldehído) puede incluir una composición conservante como una seleccionada del grupo que consiste en: diazolidinil urea, imidazolidinil urea, dimetiloil-5,5-dimetilhidantoína, dietil urea, 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, oxazolidinas, hidroximetil glicinato de sodio, 5-hidroximetoximetil-1-laza-3,7-dioxabicyclo [3.3.0] octano, 5-hidroximetil-1-laza-3,7-dioxabicyclo [3.3.0] octano, 5-hidroxipoli[metileno]metil-1-laza-3,7-dioxabicyclo [3.3.0] octano, adamantina cuaternaria y cualquier combinación de los mismos. Aunque la composición de agente protector sin aldehído (por ejemplo, sin formaldehído) puede liberar un aldehído (por ejemplo, formaldehído), las enseñanzas del presente documento prevén una etapa específica de extinción del aldehído para hacerlo inerte a las CTC.

La composición conservante se utiliza deseablemente en combinación con un agente de extinción para ayudar a asegurar que el ácido nucleico (por ejemplo, ADN) en la muestra evite ser sometido a aldehído libre (por ejemplo, formaldehído libre) que puede causar uno o más efectos deletéreos sobre el ácido nucleico. En consecuencia, las enseñanzas del presente documento contemplan el uso de al menos un agente de extinción de aldehídos, que se emplea en una cantidad y de una manera suficientes para que cualquier aldehído libre (por ejemplo, formaldehído) liberado de la composición de agente protector reaccione para formar un producto de reacción que es inerte para el ácido nucleico de la muestra biológica. Además, es preferible que la mezcla resultante no contenga ningún aldehído, y que los ácidos nucleicos de la muestra sean adecuados para la reacción en cadena de la polimerasa y la

secuenciación del ADN, y presenten una integridad estructural comparable a la de los ácidos nucleicos nativos (por ejemplo, el ADN presentará una elipticidad sustancialmente similar a la del ADN nativo no tratado, medida por espectroscopia de dicroísmo circular, o presentará una fluorescencia de tinte de ADN sustancialmente similar a la del ADN nativo no tratado, medida por espectroscopia de fluorescencia).

5 La concentración de la composición conservante tras el contacto con la muestra puede ser superior a unos 20 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2 mg/ml, inferior a unos 0,8 g/ml de la mezcla de composición de agente protector y muestra biológica (por ejemplo, sangre). La concentración de la composición conservante tras el contacto con la muestra puede ser superior a aproximadamente 0,1 g/ml de la mezcla de composición de agente protector y muestra biológica (por ejemplo, sangre). A modo de ejemplo, la concentración de la composición conservante tras el contacto con la muestra puede estar comprendida entre aproximadamente 0,1 g/ml y aproximadamente 0,8 g/ml de la mezcla de composición de agente protector y muestra biológica (por ejemplo, sangre). La concentración de la composición conservante tras el contacto con la muestra puede estar comprendida entre aproximadamente 0,3 g/ml y aproximadamente 0,6 g/ml de la mezcla de composición de agente protector y muestra biológica (por ejemplo, sangre). La concentración de la composición conservante antes y después del contacto con una muestra de sangre puede modificarse en función de los procedimientos de diagnóstico a los que se someta la muestra. A modo de ejemplo, la concentración puede modificarse en caso de que una muestra vaya a someterse a un análisis de citometría de flujo. Más concretamente, la concentración puede aumentarse en el caso de que una muestra vaya a someterse a un análisis de citometría de flujo. Así, la concentración de la composición conservante tras el contacto con la muestra puede ser superior a unos 15 mg/ml, superior a unos 25 mg/ml, o incluso superior a unos 30 mg/ml tras el contacto con la muestra. La formulación de la composición de agente protector (y la composición conservante contenida en ella) también puede modificarse de manera que una muestra que vaya a someterse a un análisis de citometría de flujo pueda contener diazolidinil urea. La composición del agente protector también puede incluir un agente de extinción. La composición del agente protector también puede incluir uno o más inhibidores metabólicos, uno o más inhibidores de nucleasas y EDTA.

El agente de extinción puede ser uno o más compuestos que incluyen al menos un grupo funcional capaz de reaccionar con un grupo funcional deficiente de electrones de un aldehído (por ejemplo, un compuesto de amina que reacciona con formaldehído para formar metilol y/o imina base de Schiff o un compuesto de cis-diol que reacciona con formaldehído para formar un acetal cíclico). El agente de extinción puede seleccionarse entre aminoácidos, alquilaminas, poliaminas, aminas primarias, aminas secundarias, sales de amonio, nucleobases o cualquier combinación de las mismas. El agente de extinción puede seleccionarse entre glicina, lisina, etilendiamina, arginina, urea, adinina, guanina, citosina, timina, espermidina o cualquier combinación de los mismos.

La concentración del agente de extinción es una cantidad suficientemente grande como para que, tras el contacto de la muestra con la composición de agente protector, haya una ausencia de aldehído libre (por ejemplo, una ausencia de formaldehído libre). Sin embargo, la concentración es lo suficientemente pequeña como para que la dilución de la muestra no afecte materialmente a ninguna característica analizada de la muestra. La concentración del reactivo de extinción de formaldehído tras la etapa de contacto con la muestra puede ser superior a unos 0,001 g/ml, 0,002 g/ml o incluso unos 0,004 g/ml de la mezcla de composición de agente protector y muestra biológica (por ejemplo, sangre). La concentración del reactivo de extinción de formaldehído después de la etapa de contacto con la muestra puede ser inferior a unos 0,03 g/ml, 0,01 g/ml o incluso unos 0,008 g/ml de la mezcla de composición de agente protector y muestra biológica (por ejemplo, sangre). A modo de ejemplo, la concentración del reactivo de extinción de formaldehído tras la etapa de contacto con la muestra puede estar comprendida entre 0,004 g/ml y 0,008 g/ml aproximadamente.

Al entrar en contacto con una muestra para formar una mezcla de la muestra y la composición de agente protector (por ejemplo, en el momento de una introducción de sangre en un dispositivo de extracción de sangre que contiene una composición de agente protector de las enseñanzas del presente documento), la composición de agente protector puede estar presente en una pequeña fracción global del volumen de la mezcla. Por ejemplo, puede estar presente en una cantidad inferior al 5%, 2%, 0,5% o incluso menos del 0,3% del volumen total de la mezcla. Por ejemplo, la composición de agente protector puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1:20 partes en volumen a aproximadamente 1:300 partes en volumen de la mezcla. La cantidad de la composición de agente protector puede estar presente desde aproximadamente 1:50 partes en volumen hasta aproximadamente 1:200 partes en volumen de la mezcla.

Durante al menos la etapa de contacto, la cantidad de la composición de agente protector está presente desde aproximadamente 1:20 (1 parte de composición de agente protector por 20 partes de mezcla total) partes en volumen hasta aproximadamente 1:300 partes en volumen de la mezcla total (que incluye tanto la composición de agente protector como la muestra biológica). Por ejemplo, durante al menos la etapa de contacto, la cantidad de la composición de agente protector está presente desde aproximadamente 1:100 partes en volumen hasta aproximadamente 1:200 partes en volumen de la mezcla.

La composición de agente protector puede incluir al menos una composición conservante seleccionada entre diazolidinil urea, imidazolidinil urea, dimetolil-5,5-dimetilhidantoína, dimetilol urea, 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, oxazolidinas, hidroximetilglicinato de sodio, 5-hidroximetoximetil-1-1 aza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, 5-hidroximetil-1-aza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, 5-hidroxipoli[metileno]metil-1-1 aza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, adamantina cuaternaria, ácido 2-aminoacético o cualquier combinación de los mismos. A título ilustrativo, la etapa de contacto

5 puede incluir el empleo, como composición de agente protector, de una composición que incluya imidazolidinil urea en una cantidad de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 2,0% en peso de la mezcla total de la composición de agente protector más una muestra biológica; opcionalmente, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en una cantidad de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,75% en peso de la mezcla total de la composición de agente protector más una muestra biológica; y un agente de extinción en una cantidad suficiente para reaccionar con cualquier aldehído libre (por ejemplo, formaldehído) que pueda surgir de la imidazolidinil urea para formar un producto de reacción que no reaccionará para desnaturalizar ninguna proteína de la muestra biológica. La composición del agente protector (antes de entrar en contacto con cualquier muestra biológica) puede incluir entre un 20% y un 60% en peso de imidazolidinil urea. La composición del agente protector puede incluir al menos un 30% en peso de imidazolidinil urea. 10 La composición de agente protector puede incluir al menos aproximadamente un 40% en peso de imidazolidinil urea y menos de aproximadamente un 55% en peso de imidazolidinil urea. La composición del agente protector puede incluir entre un 1% y un 10% en peso del agente de extinción. La composición del agente protector puede incluir al menos un 2% en peso del agente de extinción. La composición de agente protector puede incluir al menos aproximadamente un 4% en peso del agente de extinción y menos de aproximadamente un 8% en peso del agente de extinción. La composición del agente protector puede incluir entre un 1% y un 20% en peso de EDTA. La composición del agente protector puede incluir al menos un 5% en peso de EDTA. La composición del agente protector puede incluir al menos un 7% en peso de EDTA y menos de un 10% en peso de EDTA.

20 La composición de agente protector puede precargarse en un tubo y puede precargarse en una cantidad de aproximadamente 50 a aproximadamente 400µl de composición de agente protector. La cantidad precargada puede ser de al menos unos 100µl y menos de unos 300µl. La cantidad precargada puede ser de al menos unos 150µl y menos de unos 250µl. Dentro de la composición precargada de agente protector, la composición de agente protector puede comprender al menos unos 80 mg y menos de unos 100 mg de la composición de agente protector. El agente de extinción puede comprender al menos aproximadamente 1 mg y menos de aproximadamente 15 mg de la composición del agente protector. El EDTA puede comprender al menos unos 10 mg y menos de unos 25 mg de la composición del agente protector. Para la composición del agente protector, puede incluir una cantidad de 10 partes en peso de imidazolidinil urea por 1 parte en peso de glicina. El agente de extinción puede incluir un compuesto que incluya al menos un grupo funcional capaz de reaccionar con un grupo funcional deficiente de electrones del formaldehído (por ejemplo, un compuesto de amina que reaccione con el formaldehído para formar una base de Schiff de metilol o imina o un compuesto de cis-diol que reaccione con el formaldehído para formar un acetal cíclico). El agente de extinción puede ser un ingrediente seleccionado entre aminoácidos, alquilaminas, poliaminas, aminas primarias, aminas secundarias, sales de amonio o una combinación de los mismos. Puede ser un ingrediente seleccionado entre glicina, lisina, etilendiamina, arginina, urea, adinina, guanina, citosina, timina, espermidina o cualquier combinación de los mismos. Puede ser un ingrediente seleccionado entre glicina, lisina, etilendiamina, urea o cualquier combinación de los mismos. La etapa de extinción puede incluir la reacción de cualquier aldehído libre (p. ej., formaldehído) para formar un metilol, una imina de base Schiff, un producto de reacción de reticulación de base Schiff-extintor, un dímero de base Schiff o cualquier combinación de los mismos.

El agente protector puede incluir uno o más agentes conservantes, uno o más inhibidores de nucleasas, uno o más inhibidores metabólicos, o cualquier combinación de los mismos. El uno o más inhibidores de nucleasas pueden seleccionarse del grupo que consiste en: pirocarbonato de dietilo, etanol, ácido aurintricarboxílico (ATA), gliceraldehídos, fluoruro sódico, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), formamida, complejos vanadil-ribonucleósido, macaloide, heparina, hidroxilamina-ión oxígeno-cúprico, bentonita, sulfato de amonio, ditiotreitrol (DTT), beta-mercaptoetanol, cisteína, ditiotreitrol, clorhidrato de tris (2-carboxietil) fosfeno, un catión divalente como  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y cualquier combinación de los mismos. El uno o más inhibidores metabólicos pueden seleccionarse del grupo que consiste en: gliceraldehído, dihidroxiacetona fosfato, gliceraldehído 3-fosfato, 1,3-bifosfoglicerato, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, piruvato y glicerato dihidroxiacetato, fluoruro de sodio,  $K_2C_2O_4$  y cualquier combinación de los mismos.

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

55 La composición de agente protector puede incluir opcionalmente un inhibidor de nucleasas seleccionado del grupo que consiste en: pirocarbonato de dietilo, etanol, ácido aurintricarboxílico (ATA), formamida, complejos vanadil-ribonucleósido, macaloide, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), proteinasa K, heparina, ion hidroxilamina-oxígeno-cúprico, bentonita, sulfato de amonio, ditiotreitrol (DTT), beta-mercaptoetanol (BME), cisteína, ditiotreitrol, clorhidrato de tris(2-carboxietil) fosfeno, un catión divalente como  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ , y cualquier combinación de los mismos. La composición del agente protector puede incluir una composición conservante, un agente de extinción de aldehídos y un anticoagulante. Según la invención, la composición de agente protector incluye imidazolidinil urea, glicina y ácido etilendiamino tetraacético.

Las enseñanzas del presente documento contemplan aplicaciones que incluyen pero no se limitan a la extracción de células tumorales circulantes para su uso en la detección del cáncer (incluyendo pero no limitándose a carcinomas, leucemia y/o linfoma). Por ejemplo, las enseñanzas del presente documento pueden emplearse para detectar metilación anormal en cáncer de mama, próstata, gástrico, ovario, colorrectal, vejiga, testículos, esófago, melanoma u otros tipos de cáncer.

Las explicaciones e ilustraciones aquí presentadas tienen por objeto familiarizar a otros expertos en la materia con la invención, sus principios y su aplicación práctica. Los expertos en la materia pueden adaptar y aplicar la invención en sus numerosas formas, según se adapte mejor a los requisitos de un uso particular. En consecuencia, las realizaciones específicas de la presente invención, tal como se exponen, no pretenden ser exhaustivas o limitativas de la invención. Por lo tanto, el alcance de la invención debe determinarse no sólo con referencia a la descripción anterior, sino también con referencia a las reivindicaciones adjuntas. También son posibles otras combinaciones, como se desprende de las reivindicaciones siguientes, que también se incorporan por referencia a la presente descripción escrita. En cuanto a todas las enseñanzas generales anteriores, tal como se utilizan en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, las enseñanzas prevén que cualquier miembro de un género (lista) puede ser excluido del género; y/o cualquier miembro de una agrupación Markush puede ser excluido de la agrupación.

A menos que se indique lo contrario, cualquier valor numérico aquí recitado incluye todos los valores desde el valor inferior hasta el valor superior en incrementos de una unidad siempre que haya una separación de al menos 2 unidades entre cualquier valor inferior y cualquier valor superior. A modo de ejemplo, si se indica que la cantidad de un componente, una propiedad o un valor de una variable de proceso como, por ejemplo, temperatura, presión, tiempo y similares es, por ejemplo, de 1 a 90, preferiblemente de 20 a 80, más preferiblemente de 30 a 70, se pretende que los valores de intervalo intermedio (por ejemplo, de 15 a 85, de 22 a 68, de 43 a 51, de 30 a 32, etc.) estén dentro de las enseñanzas de esta memoria descriptiva. Del mismo modo, los valores intermedios individuales también entran dentro de las presentes enseñanzas. Para los valores inferiores a uno, se considera que una unidad es 0,0001, 0,001, 0,01 o 0,1, según corresponda. Estos son sólo ejemplos de lo que se pretende específicamente y todas las posibles combinaciones de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados deben considerarse expresamente indicadas en esta solicitud de manera similar. Como puede observarse, la enseñanza de cantidades expresadas como "partes en peso" en el presente documento también contempla los mismos intervalos expresados en términos de porcentaje en peso y viceversa. Así, una expresión en la Descripción Detallada de la Invención de un intervalo en términos de "x" partes en peso de la composición de mezcla polimérica resultante" también contempla una enseñanza de intervalos de la misma cantidad recitada de "x" en porcentaje en peso de la composición de mezcla polimérica resultante."

A menos que se indique lo contrario, todos los intervalos incluyen ambos puntos finales y todos los números entre los puntos finales. El uso de "sobre" o "aproximadamente" en relación con un intervalo se aplica a ambos extremos del intervalo. Por lo tanto, "entre 20 y 30" se refiere a "entre 20 y 30", incluidos al menos los puntos finales especificados. Las concentraciones de los ingredientes identificados en las tablas pueden variar  $\pm 10\%$ , o incluso  $20\%$  o más, y permanecer dentro de los límites de las enseñanzas.

La expresión "que consiste esencialmente en" para describir una combinación incluirá los elementos, ingredientes, componentes o etapas identificados, y aquellos otros elementos ingredientes, componentes o etapas que no afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la combinación. El uso de los términos "que comprende" o "que incluye" para describir combinaciones de elementos, ingredientes, componentes o etapas en el presente documento también contempla realizaciones que consisten esencialmente en, o incluso consisten en los elementos, ingredientes, componentes o etapas. Un único elemento integrado, ingrediente, componente o etapa puede proporcionar varios elementos, ingredientes, componentes o etapas. Alternativamente, un único elemento integrado, ingrediente, componente o etapa podría dividirse en varios elementos, ingredientes, componentes o etapas separados. El uso de "un" o "una" para describir un elemento, ingrediente, componente o etapa no pretende excluir otros elementos, ingredientes, componentes o etapas. Todas las referencias que aquí se hacen a elementos o metales pertenecientes a un determinado Grupo se refieren a la Tabla Periódica de los Elementos publicada y protegida por derechos de autor por CRC Press, Inc., 1989. Cualquier referencia al Grupo o Grupos se hará al Grupo o Grupos tal y como se reflejan en esta Tabla Periódica de los Elementos utilizando el sistema de numeración de grupos de la IUPAC.

Incluso si no se indica expresamente, las enseñanzas de una descripción de una realización pueden combinarse con enseñanzas de otras realizaciones a menos que la descripción deje claro que dichas realizaciones son mutuamente excluyentes, o que la combinación resultante sería claramente inoperante en ausencia de experimentación irrazonable.

Se entiende que la descripción anterior pretende ser ilustrativa y no restrictiva. Muchas realizaciones así como muchos usos además de los ejemplos proporcionados serán evidentes para los expertos en la materia tras la lectura de la descripción anterior. Por lo tanto, el alcance de la invención no debe determinarse con referencia a la descripción anterior, sino con referencia a las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el tratamiento de muestras de sangre que comprende:
  - a. colocar de 50µl a 400µl de un agente protector en un tubo, incluyendo el agente protector imidazolidinil urea, EDTA y glicina;
  - 5 b. introducir una muestra de sangre con una primera concentración de células tumorales circulantes en el tubo, por lo que entra en contacto con el agente protector;
  - c. aislar células tumorales circulantes de la muestra de sangre contactada al menos 24 horas después de la extracción de sangre, teniendo la muestra de sangre contactada una segunda concentración de células tumorales circulantes, en el que la segunda concentración de células tumorales circulantes no es inferior ni superior a la primera concentración de células tumorales circulantes en ningún valor estadísticamente significativo;
  - 10 en el que la concentración de la imidazolidinil urea tras la etapa de contacto es superior a 5 mg/ml; en el que la concentración de glicina tras la etapa de contacto es inferior a 0,03 g/ml; en el que el agente protector está presente en una cantidad inferior al 5% del volumen total de la mezcla del agente protector y la muestra de sangre extraída;
  - 15 en el que el agente protector no contiene formaldehído, tal como muestra la <sup>13</sup>C-NMR; y en el que, como resultado de la inhibición metabólica de las células tumorales circulantes en la muestra de sangre tratada, se inhiben las vías apoptótica y necrótica y las células tumorales circulantes quedan protegidas de la degradación celular.
- 20 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las células tumorales circulantes se aíslan de la muestra al menos 3 días después de la extracción de sangre.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que las células tumorales circulantes se aíslan de la muestra al menos 7 días después de la extracción de sangre.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las células tumorales circulantes se aíslan de la muestra al menos 14 días después de la extracción de sangre.
- 25 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye una etapa de transporte, en el que la etapa de transporte se produce sin congelar la muestra de sangre a una temperatura inferior a -30°C.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el agente protector entra en contacto con las células tumorales circulantes de modo que tras un periodo de al menos 7 días desde el momento en que se extrae la muestra de sangre, la cantidad de células tumorales circulantes es al menos el 90% de la cantidad de células tumorales circulantes en el momento en que se extrae la muestra de sangre.
- 30 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el agente protector entra en contacto con las células tumorales circulantes de modo que tras un periodo de al menos 7 días desde el momento en que se extrae la muestra de sangre, la cantidad de células tumorales circulantes presentes en la muestra es aproximadamente el 100% de la cantidad de células tumorales circulantes presentes en la muestra en el momento en que se extrae la muestra de sangre.
- 35 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición de agente protector incluye una cantidad de 10 partes en peso de imidazolidinil urea por 1 parte en peso de glicina.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye una etapa de análisis, en el que la etapa de análisis incluye el análisis de las proteínas EpCAM en la muestra de sangre después de 4 días a temperatura ambiente y en la que no hay degradación significativa de las proteínas EpCAM.
- 40 10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye una etapa de análisis, en el que la etapa de análisis incluye el análisis de las proteínas de citoqueratina en la muestra de sangre después de 4 días a temperatura ambiente y en la que no hay degradación significativa de las proteínas de citoqueratina
- 45 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos el 40% de las células tumorales circulantes se recuperan para su aislamiento después del día 1.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos el 40% de las células tumorales circulantes se recuperan para su aislamiento después del día 4.
- 50 13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que al menos el 50% de las células tumorales circulantes se recuperan para su aislamiento después del día 1.
14. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que incluye una etapa de análisis, en el que la etapa de análisis incluye el análisis del ARNm de c-fos en las células tumorales circulantes después de 4 días a temperatura ambiente y en la que el ARNm de c-fos en las células tumorales circulantes permanece estable.

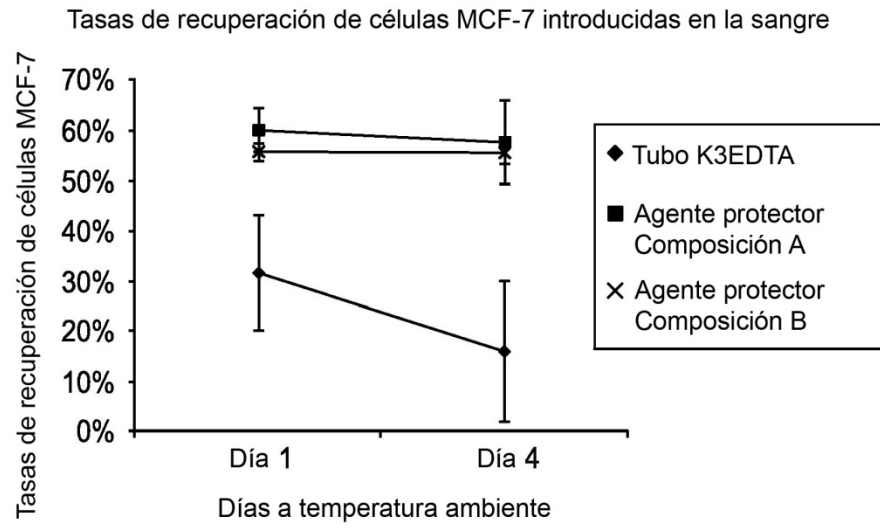
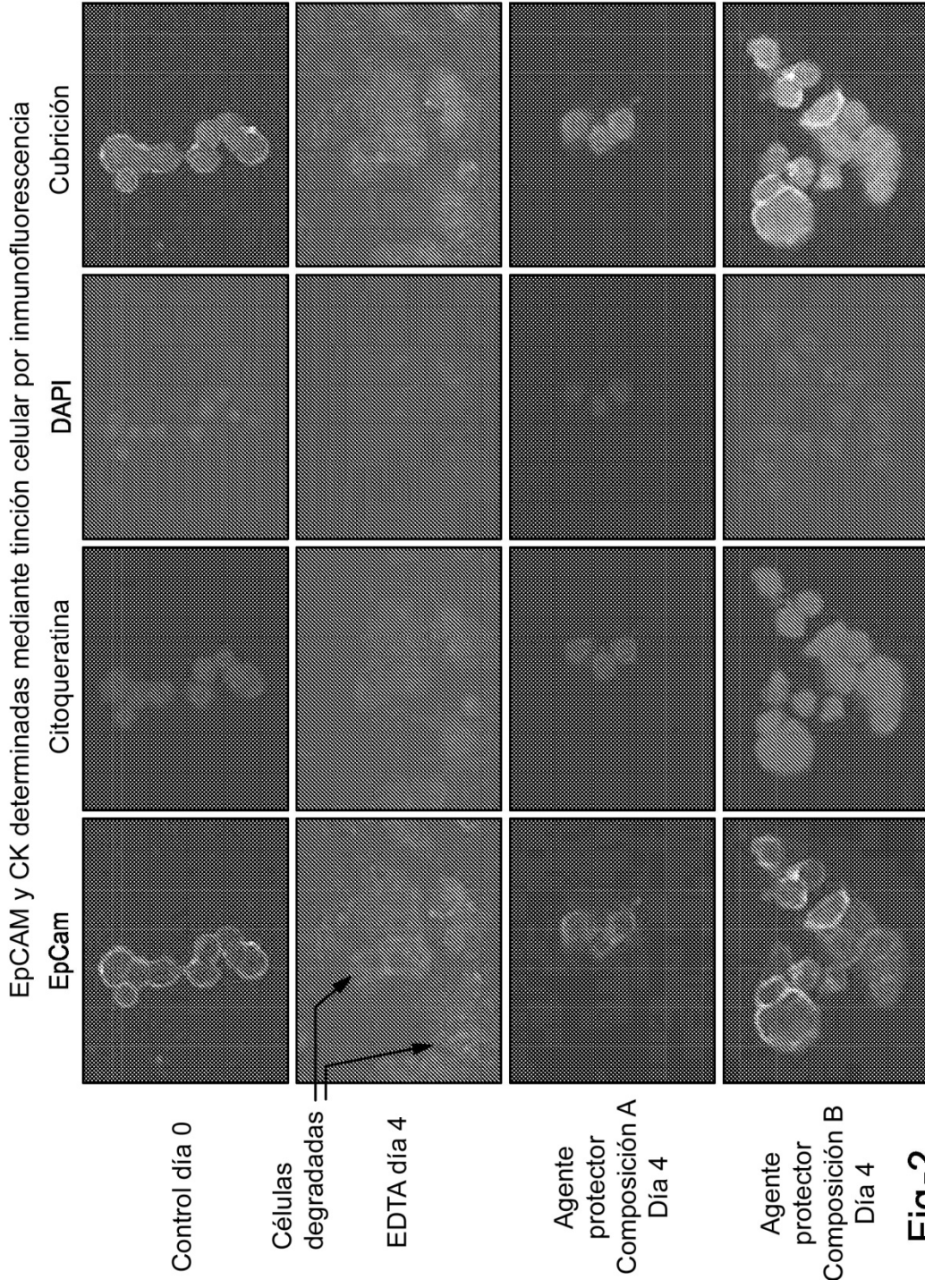
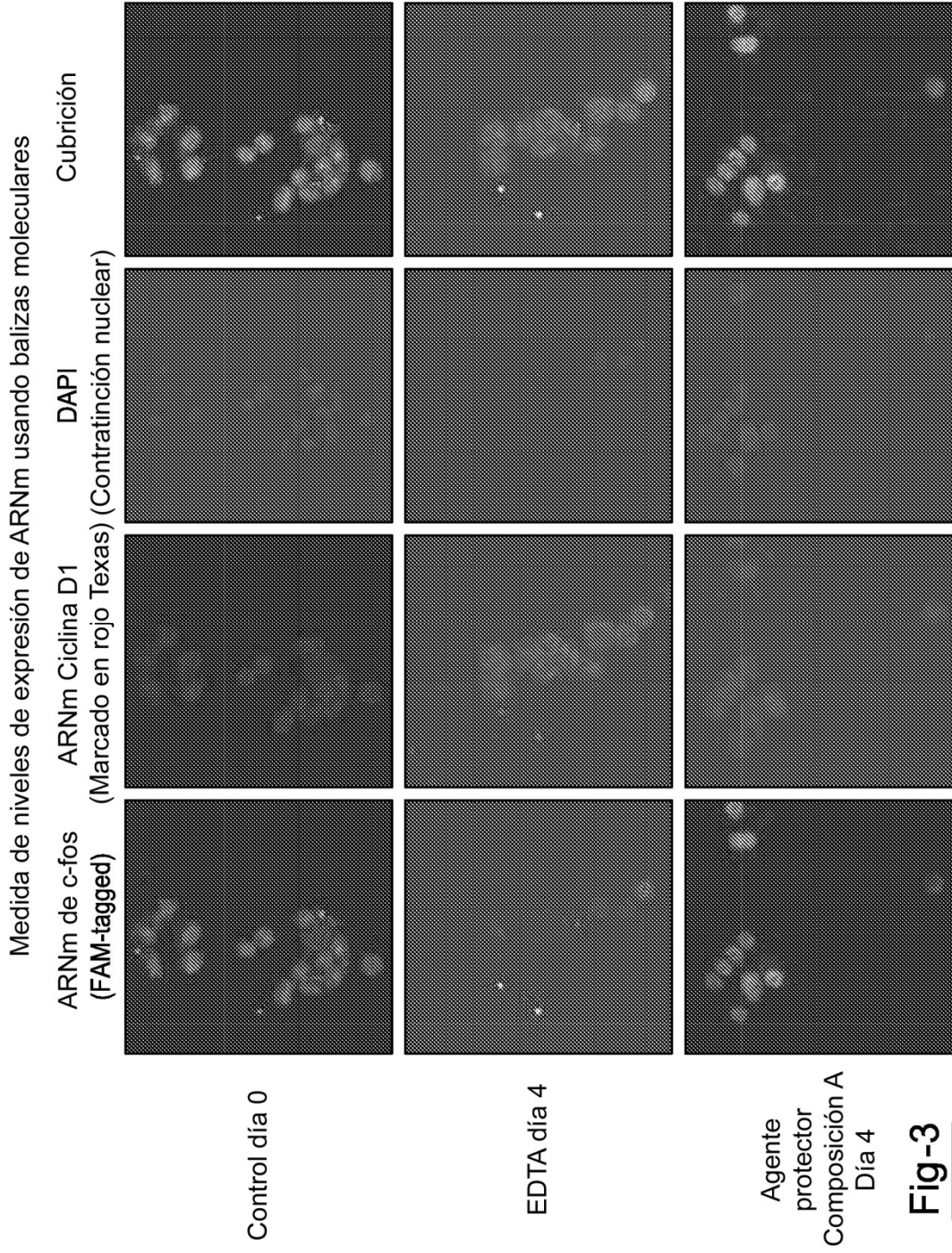


Fig-1





**Fig-3**