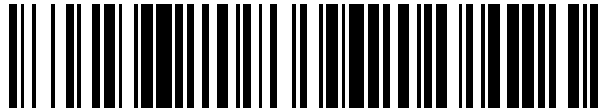


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 502**

51 Int. Cl.:

**A61B 5/15** (2006.01)

**A61B 5/157** (2006.01)

**A61B 5/153** (2006.01)

**A61B 5/154** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2011 E 11844851 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2645932**

54 Título: **Dispositivos de recogida de sangre que contienen un agente de estabilización de la sangre**

30 Prioridad:

**02.12.2010 US 419063 P**

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

**31.05.2016**

73 Titular/es:

**BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)  
1 Becton Drive  
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US**

72 Inventor/es:

**GELFAND, CRAIG, A.;  
MARCHIARULLO, DANIEL y  
MOSKOWITZ, KEITH**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 572 502 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

Dispositivos de recogida de sangre que contienen un agente de estabilización de la sangre

5 **Listado de secuencias**

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado en formato ASCII mediante EFS-Web y se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia en ASCII, creada el 30 de noviembre de 2011, se denomina Sequence Listing for Blood Collection Devices\_ST25.txt y tiene un tamaño de 6,18 kilobytes.

10

**Antecedentes de la invención**

La sangre humana se evalúa *in vitro* para una amplia serie de fines de diagnóstico. La sangre está compuesta de células sanguíneas y plasma. Las plaquetas, que son las más pequeñas de los tres tipos principales de células sanguíneas, tienen solo aproximadamente el 20% del diámetro de los glóbulos rojos, la célula más numerosa de la sangre. El recuento normal de plaquetas es de 150.000-350.000 por microlitro de sangre, pero como las plaquetas son tan pequeñas, constituyen solamente una minúscula fracción del volumen sanguíneo. Una función principal de las plaquetas es mantener la homeostasis de la sangre y evitar hemorragias. Por lo tanto, la función de las plaquetas es un indicador de la homeostasis de la sangre.

20

La homeostasis de la sangre se refiere a la conservación del torrente sanguíneo de una manera intacta y con funcionamiento normal. Esto incluye el mantenimiento de las propiedades químicas de la sangre, y la integridad de la sangre y el sistema vascular. En el caso de una interrupción de la integridad vascular, por ejemplo, por un corte, traumatismo, cirugía u otros acontecimientos que provocan típicamente "hemorragia", se inicia una cascada de procesos celulares y bioquímicos dentro de la sangre, con el objetivo último de evitar o minimizar la pérdida de sangre. Un punto de valoración visual de esta respuesta biológica es la formación de una costra. En un nivel molecular y celular, los procesos implican interacciones entre proteínas que normalmente se encuentran en circulación en la sangre y plaquetas. Varias proteínas presentes en la sangre, así como las propias plaquetas, reaccionan a la exposición a una proteína denominada "factor tisular" que está presente en muchos otros tejidos del cuerpo, pero está totalmente ausente en el interior de las venas y arterias que constituyen el sistema vascular normal. A través de rutas químicas directas e indirectas, las plaquetas responden a la presencia del factor tisular mediante la agregación, un proceso irreversible (o "de una sola vez") por el que cambian drásticamente de forma y se unen de forma activa entre sí. Este proceso se conoce como agregación plaquetaria. También reaccionan otras enzimas de la sangre y comienzan a alterar proteínas presentes en la sangre, que comienzan a formar masas fibrosas insolubles. De forma análoga al rellenado de un hueco con masilla, estas mezclas insolubles de proteínas, plaquetas y otros componentes sanguíneos cierran el "orificio" de la pared vascular y, en términos sencillos, "detienen la hemorragia".

25

30

35

40

45

50

Desde un punto de vista más científico, cuando se exponen a un vaso sanguíneo dañado, las plaquetas se adhieren a la matriz subendotelial expuesta. Después de la adhesión inicial, se liberan o se producen diversos factores en el sitio de la lesión (incluyendo trombina, ADP, factores de crecimiento y colágeno) que activan a las plaquetas. Una vez que se han activado las plaquetas, se produce un cambio conformacional en el receptor de la glucoproteína GPIIb/IIIa plaquetario que le permite unirse al fibrinógeno y/o al factor de von Willebrand. Se cree que esta unión de moléculas multivalentes de fibrinógeno y/o de factor de von Willebrand a receptores de GPIIb/IIIa presentes en plaquetas adyacentes da como resultado el reclutamiento de más plaquetas en el sitio de la lesión y su agregación para formar un tapón hemostático o trombo. La agregación plaquetaria es un término usado para describir la unión de plaquetas entre sí. La agregación plaquetaria también está asociada con la desgranulación, un proceso mediante el cual se liberan gránulos ("envolturas" que contienen proteínas y moléculas pequeñas) al plasma circundante. Este proceso se conoce como desgranulación. Estos contenidos de los gránulos actúan acelerando adicionalmente la restauración de la homeostasis y estimulando procesos de reparación celular (curación) en la pared vascular y cualquier tejido no vascular.

55

Sin un número suficiente de plaquetas, o en casos en los que la función plaquetaria normal esté alterada o incluso ausente, hay un riesgo significativo de hemorragia importante. A los pacientes que han experimentado un traumatismo grave, o en casos de cirugía de emergencia cuando ha habido una importante pérdida de sangre, se les administran transfusiones de plaquetas.

60

65

Es comprensible que las mediciones de la capacidad de las plaquetas para agregarse y, por lo tanto, para facilitar o acelerar la coagulación sanguínea puede ser importante en varias situaciones clínicas. Se sabe que la agregación plaquetaria desempeña un papel clave en la patogénesis de las trombosis y las arteriopatías coronarias agudas. Las pruebas sugieren que existe una variación significativa en la inhibición de la función plaquetaria en la respuesta a diversos agentes antiplaquetarios. También se ha demostrado que existe una variabilidad entre los individuos en la agregación plaquetaria cuando se usan antagonistas de P2Y12, tales como clopidogrel (Plavix), para el tratamiento de pacientes para conseguir un efecto antiagregante. Por ejemplo, los resultados de un estudio demostraron que al menos el 10% de los pacientes que recibieron el fármaco no conseguían la inhibición de agregación plaquetaria esperada (Muller *et al.*, *Thromb Haemost.* 89(5): 783-7 (2003)). Por lo tanto, dada la naturaleza aguda de los

acontecimientos cardiovasculares adversos, puede ser crítico saber que el primer enfoque terapéutico seleccionado para un paciente tendrá un efecto beneficioso inmediato, idealmente sin tener que supervisar a los pacientes y verse obligados a seleccionar terapias alternativas. Por lo tanto, antes de que los pacientes se sometan a dicha terapia, a menudo se les extraen muestras de sangre y se ensaya la función plaquetaria. Con frecuencia se emplean ensayos similares en una exploración prequirúrgica para descartar posibles efectos adversos de hemorragia durante la cirugía/recuperación.

También es deseable estabilizar las plaquetas en las muestras de sangre extraídas con el objetivo de realizar ensayos de biomarcadores de enfermedades. Las plaquetas contienen proteínas y metabolitos de interés diagnóstico. Sin embargo, la concentración de las formas en libre circulación de estos biomarcadores en plasma es mucho más relevante para diagnosticar estados patológicos. Se cree que la desgranulación de las plaquetas, especialmente tras la activación o agregación plaquetaria, puede conducir a niveles elevados de forma artificial de estos marcadores y representa un error preanalítico si no se controla. Los gránulos de las plaquetas también contienen enzimas que pueden catalizar la degradación de estos biomarcadores en circulación y, por lo tanto, dan como resultado niveles artificialmente bajos de los biomarcadores de interés.

Además, es deseable proporcionar plaquetas estables para su uso en aplicaciones terapéuticas. Para tratar ciertas heridas y una amplia serie de condiciones distintas que varían desde la curación de implantes dentales a inyecciones destinadas a reparar lesiones en los ligamentos, se usa la terapia de gel plaquetario autólogo (que implica el aislamiento del denominado "plasma rico en plaquetas"). Si las plaquetas se agregan o se activan de forma prematura, pueden perder su efecto terapéutico. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar plaquetas estabilizadas que puedan potenciar adicionalmente estos procesos.

Los resultados de la función plaquetaria *in vitro* pueden ser imprecisos si las plaquetas no se estabilizan en la muestra de sangre extraída, bien porque se permite que se agreguen antes del ensayo (por ejemplo, sin que "quede" ninguna función para ensayar), o quizás porque "mueran" o pierdan de otro modo la función natural antes del ensayo. Las plaquetas son intrínsecamente inestables en la sangre extraída, principalmente debido a que su papel natural es agregarse en respuesta a una alteración del sistema vascular. En una muestra de sangre extraída se producirá espontáneamente una estimulación química de la agregación plaquetaria a un nivel bajo. Después de extraerse la sangre, las plaquetas se agregan a lo largo del tiempo debido a esta estimulación espontánea y, por lo tanto, hay cada vez menos plaquetas en su estado original que aún sean capaces de estimularse cuando la muestra de sangre se vaya a ensayar finalmente. El patrón de referencia actual de la práctica clínica requiere realizar los ensayos de la función plaquetaria en una muestra de sangre anticoagulada con citrato en un periodo máximo de 2 a 4 horas después de la extracción de la sangre (Clinical Laboratory Standards Institute Guideline, "Platelet Function Testing by Aggregometry, H58-A (Vol. 28, n.º 31 (2008)). Después de este tiempo, la muestra habrá perdido gran parte de su función plaquetaria original por lo que ya no podrá utilizarse para mediciones clínicas. Este patrón operativo ampliamente aplicado limita la utilidad en el mercado general de los ensayos de la función plaquetaria. En la práctica actual, por ejemplo, muchas muestras de sangre se envían desde las consultas de los médicos a las instalaciones de ensayo regionales y no pueden ensayarse durante muchas horas o posiblemente incluso días después de extraerse.

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de estabilizar la sangre y componentes de la sangre tales como plaquetas en composiciones tales como las muestras de sangre recogidas, para que conserven mejor la función después de la recogida y durante el transporte o almacenamiento, antes de su análisis.

#### Breve resumen de la invención

Un aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo para recoger y estabilizar sangre (por ejemplo, una muestra de sangre completa) o una composición que contiene un componente de la sangre (por ejemplo, un componente celular tal como glóbulos blancos o plaquetas), que tiene un primer extremo y un segundo extremo y al menos una pared interior que define una parte de depósito para recibir la sangre o componente de la misma. El depósito contiene un agente de estabilización de la sangre que incluye variegina o un análogo de la misma, un disacárido polisulfatado (tal como octasulfato de sacarosa), o una combinación de los mismos, cada uno en una cantidad eficaz para estabilizar la sangre, por ejemplo, conservar la función plaquetaria tal como su capacidad para agregarse. Aunque algunas realizaciones de la presente invención describen la función plaquetaria como una medida de la estabilidad sanguínea, el experto en la materia apreciará que hay otras manifestaciones de la estabilidad o inestabilidad relativa de una muestra de sangre que se miden por otros parámetros sanguíneos (por ejemplo, niveles de analitos en el plasma o suero, recuento celular, estabilidad celular, integridad celular, hemólisis, etc.). En algunas realizaciones, el dispositivo está equipado con un cierre perforable por una aguja (por ejemplo, para aportar sangre al depósito) y es estéril y de vacío.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para recoger y estabilizar sangre o una composición que contiene un componente de la misma (por ejemplo, un componente celular tal como glóbulos blancos o plaquetas), que comprende introducir la sangre o la composición en un dispositivo que tiene un primer extremo y un segundo extremo y al menos una pared interior que define una parte de depósito para recibir la sangre o composición, y un agente de estabilización de la sangre dispuesto en el depósito, en el que el agente de

estabilización de la sangre incluye variegina o un análogo de la misma, un disacárido polisulfatado (por ejemplo, octasulfato de sacarosa) o una combinación de los mismos, cada uno en una cantidad eficaz para estabilizar la sangre, por ejemplo, conservar la función plaquetaria tal como su capacidad para agregarse. Después de la recogida y el almacenamiento, la sangre o la composición pueden utilizarse, por ejemplo, para análisis diagnóstico o fines terapéuticos.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para medir un parámetro de la función sanguínea (por ejemplo, la función plaquetaria) *in vitro*, que comprende: a) introducir sangre o una composición que comprende un componente de la sangre (por ejemplo, plaquetas) en un dispositivo para recoger y estabilizar plaquetas, en el que el dispositivo tiene un primer extremo y un segundo extremo y al menos una pared interior que define una parte de depósito para recibir la sangre o composición, en el que el depósito contiene un agente de estabilización de la sangre que comprende variegina que tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma, un disacárido polisulfatado, o una combinación del mismo, cada uno en una cantidad eficaz para estabilizar la sangre, por ejemplo, conservar la función plaquetaria tal como su capacidad para agregarse, y b) medir el parámetro sanguíneo. En algunas realizaciones en las que el parámetro sanguíneo está relacionado con la función plaquetaria, el método puede implicar además c) añadir a la composición un agonista plaquetario que estimula la agregación de las plaquetas, y c) medir el alcance de la agregación plaquetaria, en el que el alcance de la agregación plaquetaria inducida por el agonista es determinante de la función plaquetaria.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un envase o kit que incluye al menos uno de dichos dispositivos (y preferentemente una pluralidad de dichos dispositivos).

Aunque la variegina y los disacáridos polisulfatados tales como el octasulfato de sacarosa se han indicado para uso terapéutico basándose en su capacidad para inactivar la trombina *in vivo* (e *in vitro*), los presentes solicitantes han descubierto (como se muestra en los ejemplos de trabajo) que la actividad inhibidora de trombina no es en sí misma predictiva de la capacidad de un agente dado para estabilizar la sangre o sus componentes, y particularmente las plaquetas, contenidos en una muestra de sangre recogida, durante un periodo de tiempo prolongado, clínicamente significativo. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría particular de operación, los solicitantes plantean la hipótesis de que la actividad de un inhibidor de trombina dado *in vivo* no es predictiva de cómo se comportará en un entorno no fisiológico tal como una muestra de sangre recogida o una composición que contiene un componente de sangre tal como plaquetas (por ejemplo, un plasma rico en plaquetas (PRP)), y particularmente desde el punto de vista de su capacidad para conservar la función plaquetaria y, por lo tanto, conservar la integridad de la muestra para fines de almacenamiento y análisis posterior.

### Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista en perspectiva de un dispositivo adecuado para su uso en la presente invención.

La FIG. 2 muestra una serie de gráficos que representan la agregación plaquetaria en una realización de la invención frente a una realización comparativa que no es de la invención, medida por impedancia, como una medida arbitraria sin unidad, en el eje y, en función de un tiempo de proceso de 6 minutos (después de la introducción de un estimulante plaquetario) en el eje x.

La FIG. 3 es un gráfico que muestra la agregación plaquetaria (medida como el área bajo la curva (ABC)) en función del tiempo en muestras de sangre recogidas en una realización de la invención que contienen variegina (SEQ ID NO: 1), en combinación con los ensayos que usan el agonista plaquetario colágeno con o sin el antagonista plaquetario ácido acetilsalicílico (ASA, o aspirina), en comparación con dispositivos que no son de la invención que contienen citrato, y colágeno con o sin ASA.

La FIG. 4 es un gráfico de barras que muestra la agregación plaquetaria (medida en términos de porcentaje del valor inicial) en función del tiempo, en muestras de sangre recogidas en una realización de la invención que contiene variegina (SEQ ID NO: 1), en combinación con colágeno usado como agonista plaquetario, en comparación con un dispositivo que no es de la invención que contiene citrato y colágeno.

### Descripción detallada

En general, los dispositivos de recogida de la presente invención pueden abarcar cualquier dispositivo de recogida incluyendo tubos tales como tubos de ensayo y tubos de centrifuga; dispositivos de recogida de sangre de sistema cerrado, tales como bolsas de recogida; jeringas, especialmente jeringas precargadas; catéteres; placas de microtitulación y otras placas de múltiples pocillos; matrices; tubos; recipientes de laboratorio tales como matraces, matraces de agitación, frascos rotatorios, viales, portaobjetos de microscopio, ensamblajes de portaobjetos de microscopio, cubreobjetos, películas y sustratos y ensamblajes porosos; pipetas y puntas de pipeta; recipientes de recogida de tejidos y otras muestras biológicas; y cualquier otro recipiente adecuado para contener una muestra biológica, así como recipientes y elementos implicados en la transferencia de muestras. Se desvelan ejemplos e ilustraciones de varios de estos dispositivos en la Patente de Estados Unidos de propiedad común 7.309.468 de Stevens *et al.* El dispositivo puede ser de vacío y es estéril, e incluye un cierre perforable por una aguja. Como

alternativa, el dispositivo puede ser un sistema parcialmente de vacío o un sistema que no utiliza vacío para recoger sangre. Un ejemplo adecuado de un sistema de vacío es un tubo cerrado. Una extracción con jeringa manual es un ejemplo adecuado de un sistema tanto parcialmente de vacío como un sistema que no es de vacío. Los sistemas que no son de vacío también pueden incluir sistemas de extracción automática.

La Fig. 1, que también se ilustra en la Patente de Estados Unidos 7.309.468, muestra un dispositivo típico de recogida de sangre 10, útil en la presente invención, que incluye un recipiente 12 que define una cámara interna o depósito 14. En la realización ilustrada, el recipiente 12 es un tubo hueco que tiene una pared lateral 16, un extremo inferior cerrado 18 y un extremo superior abierto 20. Opcionalmente, se proporciona un miembro de separación 13 dentro de la cámara del recipiente 14. El miembro de separación 13 sirve para ayudar a separar componentes de la muestra de sangre, por ejemplo, por centrifugación. El recipiente 12 está dimensionado para recoger un volumen adecuado de sangre. Es necesario un medio de cierre 22 para cubrir el extremo abierto 20 para cerrar el recipiente 12 cuando se requiere un producto estéril. En algunas realizaciones, el tubo está configurado para un tapón de rosca. Preferentemente, el cierre 22 forma un sello capaz de cerrar eficazmente el recipiente 12 y retener una muestra biológica en la cámara 14. El cierre 22 puede ser de una de una diversidad de formas incluyendo, pero sin limitación, cierres de goma, cierres HEMOGUARD™, sellos metálicos, sellos de goma de banda metálica y sellos de diferentes polímeros y diseños. Un escudo protector 24 puede recubrir el cierre 22.

El recipiente 12 puede estar hecho de cualquier material adecuado para recipientes de laboratorio, incluyendo, por ejemplo, plásticos (por ejemplo, poliolefinas, poliamidas, poliésteres, siliconas, poliuretanos, epoxis, acrílicos, poliacrilatos, poliésteres, polisulfonas, polimetacrilatos, PEEK, poliimida y fluoropolímeros) y productos de vidrio incluyendo vidrio de sílice. Preferentemente, el envase 12 es transparente. Los ejemplos de materiales termoplásticos transparentes adecuados para el envase 12 incluyen policarbonatos, polietileno, polipropileno y polietilentereftalato. Los materiales plásticos pueden ser materiales impermeables al oxígeno o pueden contener una capa impermeable o semipermeable al oxígeno. Como alternativa, el envase 12 puede estar hecho de un material plástico permeable al agua y al aire.

La presión en la cámara 14 se selecciona para extraer un volumen predeterminado de muestra biológica al interior de la cámara 14. Preferentemente, el cierre 22 está hecho de un material elástico que es capaz de mantener el diferencial de presión interna entre la presión atmosférica y una presión menor que la atmosférica. El cierre 22 es de tal manera que puede perforarse por una aguja 26 u otra cánula para introducir una muestra biológica en un recipiente 12 como se conoce en la técnica. Preferentemente, el cierre 22 es resellable. Los materiales adecuados para el cierre 22 incluyen, por ejemplo, goma de silicona, goma natural, goma de estireno butadieno, copolímeros de etileno-propileno y policloropreno.

Los ejemplos adecuados del recipiente 12 incluyen tubos de una sola pared y de múltiples capas. En la Patente de Estados Unidos 5.860.937 se desvela un ejemplo más específico de un recipiente 12 adecuado.

El envase 12 también puede contener un separador 13 tal como un gel, un separador mecánico u otro tipo de miembro de separación (por ejemplo, papel de filtro o similares). Los separadores típicamente son útiles para la preparación de plasma sanguíneo, específicamente para separar el plasma de la sangre completa humana o de un animal. En algunas realizaciones, el separador tiene una densidad que es intermedia entre los glóbulos blancos y las plaquetas, y que puede ser útil en el aislamiento de PRP de los otros elementos celulares de una muestra de sangre completa. El gel es convenientemente una formulación de gel polimérico tixotrópico. El gel puede ser un homopolímero o un copolímero y puede incluir geles basados en silicona tales como, por ejemplo, polisiloxanos, o geles basados en hidrocarburo orgánico tales como, por ejemplo, poliacrílicos, poliésteres, poliolefinas, polibutadienos en cis oxidados, polibutenos, mezclas de aceite de soja epoxidado e hidrocarburos clorados, copolímeros de diácidos y propanodiolos, ciclopentadienos hidrogenados y copolímeros de alfa-olefinas con dialquilmaleatos. Se describen ejemplos de separadores mecánicos que pueden ser útiles en la presente invención en las Patentes de Estados Unidos 6.516.953; 6.406.671; 6.409.528; y 6.497.325.

El envase 12 también puede adaptarse para separar con centrifugación linfocitos y monocitos de fases más pesadas de una muestra de sangre completa. En dichas realizaciones, los dispositivos también pueden contener un medio líquido con gradiente de densidad y un medio para impedir la mezcla del medio líquido con gradiente de densidad con la muestra de sangre antes de la centrifugación. En la Patente de Estados Unidos 5.053.134 se desvela un ejemplo de un tubo de recogida de linfocitos/monocitos adecuado.

Aparte de la realización ilustrada en la FIG. 1, otros tubos de recogida de sangre disponibles en el mercado adecuados para su uso la presente invención incluyen los siguientes, todos ellos comercializados por Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ), perteneciendo todos los registros y marcas comerciales a Becton, Dickinson and Company: tubos de hematología VACUTAINER® (por ejemplo, n.º de catálogo 367650-1, 367661, 6405, 6385, 6564, 367653, 367665, 367658, 367669, 6450-8, 6535-37 y 367662); tubos de K<sub>2</sub>EDTA VACUTAINER® (por ejemplo, n.º de catálogo 367841-2, 367856 y 367861); y Tubos Microtainer® BD que no son de vacío con Cierre BD Microgard™ (por ejemplo, 365987, 365965 y 365974) o Tubos BD Microtainer® convencionales (por ejemplo, 365956, 365957, 365958, 365959, 365971 y 365973). Muchos tubos de recogida de sangre comerciales tienen volúmenes convencionales que varían típicamente de 250 microlitros hasta e incluyendo aproximadamente 10,0 ml,

y en algunos casos hasta 16 ml. Los volúmenes típicos incluyen 250, 400 y 500 microlitros, así como 2,0 ml, 3,5 ml, 4,0 ml, 5,0 ml, 8,0 ml, 8,5 ml y 10,0 ml.

5 En otras realizaciones, el dispositivo puede incluir un depósito integrado dentro de un cartucho de ensayo, siendo capaz el depósito de contener un volumen de sangre completa en el intervalo de 2 a 200 microlitros, más preferentemente 50-150 microlitros. Dichos cartuchos se venden, por ejemplo, con el nombre comercial i-STAT Point of Care System por Abbott Laboratories (Abbott Park, Illinois), y se pueden utilizar con un analizador portátil capaz de interactuar con el cartucho. Los ejemplos de dichos cartuchos y analizadores portátiles que pueden utilizarse con la presente invención incluyen el cartucho i-STAT CHEM8+ y el analizador portátil i-STAT® 1 respectivamente.  
10 Dichos dispositivos se enseñan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 5.096.669, 5.112.455, 5.821.399, 5.628.961, 7.419.821, 6.750.053 y en el documento US D337.164.

15 En algunas realizaciones, el dispositivo es una jeringa. Un ensamblaje de jeringa puede incluir un tambor que tiene un extremo proximal abierto, un extremo distal y una cámara hueca estéril entre los extremos proximal y distal para recibir la sangre; un émbolo localizado en el extremo proximal abierto; una aguja fijada al tambor; y un agente de estabilización de plaquetas dentro de la cámara.

20 Los dispositivos de la presente invención pueden prepararse o ensamblarse de acuerdo con materiales, reactivos y procesos conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, uno de dichos métodos implica añadir a una estabilización de plaquetas al menos un agente de estabilización de plaquetas (que, como se describe en el presente documento, puede estar en forma deshidratada o liofilizada) en una cantidad eficaz para estabilizar las plaquetas en el dispositivo; y después añadir opcionalmente un miembro de separación al dispositivo, y aplicar vacío y/o esterilizar el dispositivo.

25 Un proceso de liofilización/vacío representativo puede incluir las etapas de congelar el dispositivo a una temperatura de aproximadamente -40 °C a una presión de aproximadamente 760 mm durante aproximadamente 6 a 8 horas; secar el dispositivo a medida que la temperatura aumenta de -40 °C a aproximadamente 25 °C, a una presión de aproximadamente 0,05 mm, durante aproximadamente 8 a 10 horas; y después aplicar vacío en el dispositivo a una temperatura de aproximadamente 25 °C y una presión de aproximadamente 120 mm durante aproximadamente 0,1  
30 horas, y después esterilizar el dispositivo, por ejemplo, con radiación de cobalto 60. Pueden añadirse aditivos y anticoagulantes al tubo en una forma líquida, y posteriormente secarse de esta manera.

35 Como se usan en el presente documento, las expresiones “sangre” y “muestra de sangre” se refieren a sangre completa o a un componente de la misma (por ejemplo, una composición tal como otro tejido o fluido corporal que contiene un componente de la sangre), particularmente un componente celular de la misma, incluyendo, por ejemplo, concentrados de glóbulos rojos, concentrados de plaquetas (por ejemplo, plasma rico en plaquetas (PRP)), concentrados de leucocitos; o plasma y suero. Por lo tanto, en otras realizaciones, la muestra puede ser un fluido o tejido corporal que contiene células sanguíneas o células sanguíneas inmaduras, tal como médula ósea.

40 En algunas realizaciones, el agente de estabilización de la sangre es un péptido de origen natural o sintético extraído o derivado de las glándulas salivares de artrópodos hematófagos, preferentemente de las glándulas salivares de una garrapata, y más preferentemente de las glándulas salivares de *Amblyomma variegatum*. Dichos péptidos se desvelan en los documentos WO29017699, WO03091284 y WO28155658. Dichos péptidos también se desvelan en Cho, *et al.*, J. Biol. Chem. 282(40): 29101-13 (2007). La variegina y sus análogos son “inhibidores directos de trombina” lo cual, como se conoce en la técnica, hace referencia a agentes que se unen con el sitio activo de la trombina y, por lo tanto, pueden inactivar la trombina tanto soluble como unida a fibrina.  
45

50 En algunas realizaciones, el agente de estabilización de la sangre tiene la secuencia de 32 aminoácidos NH<sub>2</sub>-SDQGDVAEPKMHKTAPPFDFEAIPEEYLDDES-ácido, designada SEQ ID NO: 1 (y denominada en el presente documento variegina). En la presente invención también pueden ser útiles equivalentes funcionales o análogos de variegina que, para los fines de la presente invención, incluyen variantes, fragmentos (y variantes de los mismos) y derivados de la SEQ ID NO: 1, siempre que conserven la actividad de estabilización de plaquetas requerida. Los fragmentos de variegina típicamente serán idénticos a la SEQ ID NO: 1 excepto por la pérdida de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos del extremo N terminal y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o incluso más aminoácidos del extremo C  
55 terminal de la secuencia proteica de la variegina.

60 Las variantes de variegina típicamente contendrán sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con la SEQ ID NO: 1. Estas sustituciones típicas se encuentran entre Ala, Val, Leu y Ile; entre Ser y Thr; entre los restos ácidos Asp y Glu; entre Asn y Gln; entre los restos básicos Lys y Arg; o entre los restos aromáticos Phe, Trp y Tyr. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos están en las posiciones 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 22, 25 y 31 de la SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la variante de variegina difiere de la SEQ ID NO: 1 en relación con una o más de las siguientes sustituciones: Gly en la posición 4 se ha reemplazado por Ala o Ser; Asp en la posición 5 se ha reemplazado por Gly; Val en la posición 6 se ha reemplazado por Arg; Glu en la posición 8 se ha reemplazado por Gln; Lys en la posición 10 se ha reemplazado por Arg; Met en la posición 11 se ha reemplazado por Leu; His en la posición 12 se ha reemplaza por Pro; Lys en la posición 13 se ha reemplazado por Arg; Thr en la posición 14 se ha reemplazado por Asn; Pro en la posición 17 se ha reemplazado por Gln; Phe en la  
65

posición 18 se ha reemplazado por Gly; Ala en la posición 22 se ha reemplazado por Glu; Glu en la posición 25 se ha reemplazado por Asp; y Glu en la posición 31 se ha reemplazado por His.

En la Tabla 1 se presentan ejemplos representativos de fragmentos de variegina.

5

Tabla 1

Péptido	Secuencia		
SEQ ID NO. 1	NH <sub>2</sub> -SDQGDVAEPKMHKTAPPFDFEAIPEEYLDDDES-ácido		
SEQ ID NO. 2	NH <sub>2</sub> -SDQGDVAEPKMHKTAPPFDFEAIPEEYLD-ácido		
SEQ ID NO. 3	NH <sub>2</sub> -SDQGDVAEPKMHKTAPPFDFEAIPEE-ácido		
SEQ ID NO. 4	NH <sub>2</sub> -GDVAEPKMHKTAPPFDFEAIPEEYLDDDES-ácido		

10 Otro fragmento de variegina que puede ser útil en la presente invención es SDQGDVAEPKMHKTAPPFDFEAIPEEYL (SEQ ID NO: 5).

15 Los fragmentos de variegina también pueden contener sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones descritas anteriormente. Los ejemplos representativos de estos fragmentos incluyen fragmentos que tienen una secuencia de aminoácidos incluyendo: SDQGDVAEPAMHKTAPPFDFEAIPEEYLDDDES (K10A) (SEQ ID NO: 6), SDQADRAQPKLHRNAPQGDFAIPDEYL (SEQ ID NO: 7), SDQSGRAQPKLPRNAPQGDFAIPDEYL (SEQ ID NO: 8), SDQGDVAEPKMHKTAPPGDFEAIPEEYLD (SEQ ID NO: 9), SDQADVAEPKMHKTAPPGDFEAIPEEYLD (SEQ ID NO: 10), EPKMHKTAPPFDFEAIPEEYLDDDES (EP25) (SEQ ID NO: 11), EPKMHKTAPPFDFEAIPEEYLDDDES (EP25A22E) (SEQ ID NO: 12), EPKMHKTAPPFDFEAIPEEYL (EP21) (SEQ ID NO: 13), MHKTAPPFDFEAIPEEYL (MH1 8) (SEQ ID NO: 14), DVAEPKMHKTAPPFDFEAIPEEYL (DV24) (SEQ ID NO: 15) y DVAEPRMHKTAPPFDFEAIPEEYL (DV24, K10R) (SEQ ID NO: 16).

20 Por lo tanto, las variantes, fragmentos y variantes de fragmentos típicamente poseen al menos aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o aproximadamente un 97 % de similitud de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

25 En la práctica de la presente invención también pueden ser útiles derivados de variegina, y sus variantes y fragmentos. Los ejemplos representativos de dichos derivados incluyen formas modificadas de variegina y sus variantes y fragmentos que están modificadas por la adición de grupos de azúcares (por ejemplo, grupos glucosilo) o grupos poliméricos (por ejemplo, PEG) a restos de aminoácido de la secuencia de variegina. En algunas realizaciones, los derivados son formas glucosiladas de variegina en las que la Thr en la posición 14 de la SEQ ID NO: 1 está modificada por un resto de hexosa. Otras realizaciones pueden incluir otras modificaciones postraduccionales conocidas por los expertos en la materia, incluyendo fosforilación, con frecuencia incluida en restos de serina, treonina o tirosina, sumoilación, adición de diversas cadenas de ácidos grasos o lípidos, y todas ellas pueden estar solas o incluidas en combinaciones. Además, existen variaciones de aminoácidos naturales u obtenidas por ingeniería genética que pueden reemplazar restos de la secuencia, tales como citrulina como análogo sin carga de arginina, metil-lisina como análogo sin carga de lisina, hidroxiprolina como análogo estructural de prolina, entre muchas otras alternativas conocidas por los expertos en la materia.

40 La variegina y sus análogos pueden sintetizarse de acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo, química de síntesis de péptidos, incluyendo técnicas de química en fase líquida y sólida. Por ejemplo, la síntesis de péptidos puede realizarse mediante cualquiera de los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) (por ejemplo, enfoques de química de Fmoc o t-Boc), todos los cuales se conocen bien por los expertos en la materia. Típicamente, estas síntesis se realizan en instrumentos de síntesis de péptidos automática. En otras realizaciones, los péptidos pueden producirse en microorganismos u otros organismos no humanos modificados genéticamente (por ejemplo, por transformación) con un ácido nucleico que codifica variegina o su análogo.

45 Otros agentes de estabilización de la sangre útiles en la presente invención incluyen disacáridos polisulfatados. El componente de disacárido típicamente es lactosa, trehalosa, sacarosa, maltosa o celobiosa. En algunas realizaciones, el componente de disacárido es sacarosa o trehalosa. El número de grupos sulfato en los componentes de disacárido típicamente varía de 4 a 8. Por lo tanto, las realizaciones incluyen lactosa, sacarosa, maltosa y celobiosa tetra-sulfatadas, penta-sulfatadas, hexa-sulfatadas, hepta-sulfatadas y octasulfatadas. Véase, por ejemplo, Wall, *et al.*, Thromb. Res. 103: 325-35 (2001); Sarilla, *et al.*, J. Biol. Chem. 285 (11): 8278-89 (2010). En realizaciones ejemplares, el disacárido polisulfatado es octasulfato de sacarosa (SOS) u octasulfato de trehalosa. Los disacáridos polisulfatados son inhibidores indirectos de trombina que, como se conoce en la técnica, son agentes que actúan como parte de un complejo antitrombina y no interaccionan por sí mismos directamente con el sitio activo de la trombina de modo que solamente pueden inactivar trombina soluble pero no pueden reaccionar con

la trombina unida a fibrina. Se sabe que SOS actúa a través del cofactor de heparina II, de modo que el complejo SOS-HCII se une con la trombina y la inhibe.

5 El agente de estabilización de la sangre también puede incluir al menos otro inhibidor directo de trombina y/o al menos otro inhibidor indirecto de trombina: los ejemplos representativos de inhibidores directos de trombina que pueden ser útiles en la presente invención incluyen argatrobán (ácido ((2R, 4R)-1-[(2S)-5-(diaminometilidenamino)-2-[[[(3R)-3-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-8-il]-sulfonilamino]pentanoil]-4-metil-piperidin-2-carboxílico), hirudina y su análogo bivalirudina, derivados del pentapéptido RPPGF que contienen un Isómero D y/o un aminoácido poco habitual, por ejemplo, rOicPaF(*p*-Me)-NH<sub>2</sub> (conocido en la técnica como "FM-19"), rOicPsF (*p*-Me), rOicPaF (*p*-Br), rOicPaf (*p*-I), rOicPaF (*p*-NO<sub>2</sub>), F(*p*-Me)OicrPa, aPrOicF (*p*-Me), PaF(*p*-Me)rOic, PF(*p*-Me)Oicra y PraF(*p*-Me)Oic (en los que el Isómero D se designa por la letra minúscula y "Oic" representa el aminoácido sintético (ácido 2S,3aS,7aS)-octahidroindol-2-carboxílico)) (por ejemplo, Nieman *et al.*, J. Thrombosis Haemostasis 6:837-845 (2008)), aprotinina, un péptido con potencial de inhibición de trombina conocido (por ejemplo, Pintigny *et al.*, Eur. J. Biochem. 207: 89-95 (1992)) y D-fenilalanil-L-prolil-L-arginina clorometil cetona (PPACK), conocido como una alternativa a la heparina (por ejemplo, Lyon *et al.*, Clin. Chem. 41: 1038-1041 (1995)).

20 Los ejemplos representativos de inhibidores indirectos de trombina que pueden ser útiles en la presente invención incluyen heparina en sus diversas formas definidas por distribución de peso molecular de la preparación específica (por ejemplo, bajo peso molecular, no fraccionada (típicamente una fracción de 3-7 kilodalton), peso molecular ultra-bajo (típicamente 2-3 kilodalton) y subfracciones similares de tamaño específico). Las subfracciones terapéuticas de heparina, aisladas mediante diferentes métodos de desfraccionamiento basados bien en el tamaño o bien en diversos procesos de extracción química, incluyen dalteparina, enoxaparina, adreparina, parnaparina, reviparina, tinzaparina, bioparina, miniparina, sandoparina, semuloparina y nadroparina y otras moléculas similares.

25 El modo de purificación puede depender del método de síntesis. En general, la pureza del agente de estabilización de la sangre variará dependiendo del agente usado y su fuente. En general, la pureza del agente de estabilización de plaquetas es al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, o incluso mayor.

30 El agente de estabilización de la sangre está presente en el dispositivo de recogida en una cantidad eficaz para conservar la función ensayable en el laboratorio de la sangre y sus componentes. Por ejemplo, en el caso de las plaquetas, la cantidad es eficaz para conservar la función plaquetaria que puede incluir su capacidad para agregarse, y para evitar o inhibir la desgranulación plaquetaria que se produce cuando las plaquetas no se conservan y por lo tanto pierden su estado granulado nativo, y/o para estabilizar una o más proteínas endógenas que pueden estar presentes en una parte de plasma de la sangre o muestra de sangre o composición que contiene un componente sanguíneo. La elección del agente de estabilización de la sangre específico y de la cantidad o concentración a incluir en el dispositivo dependen de varios factores que incluyen la naturaleza de la muestra, la potencia de cada agente y su solubilidad en agua, el periodo de tiempo durante el que se desea la estabilización de la sangre, el volumen del dispositivo de recogida de sangre, el grado de hemólisis provocado por la adición del agente a la muestra, y la naturaleza y alcance de interacciones no específicas (por ejemplo, debido a la presencia de otras proteínas en la sangre tales como albúmina de suero). En consecuencia, para los fines de la presente invención, la cantidad del agente o los agentes de estabilización de la sangre que pueden estar presentes se expresa más convenientemente con un intervalo de concentraciones (a partir del que puede calcularse fácilmente la cantidad real del agente).

45 Con respecto a las plaquetas, la conservación de la función significa que las plaquetas se mantienen después de la recogida y antes del análisis en un estado en el que pueden activarse o reactivarse de modo que pueda medirse la agregación plaquetaria (como una medida de la función plaquetaria) *in vitro*. Activarse o reactivarse, como se usa en el presente documento en el contexto de las plaquetas, significa que se conserva la capacidad de las plaquetas para iniciar una cascada de unión plaquetaria y agregación para el análisis *in vitro* en un laboratorio, pero se inhibe la inducción de la agregación plaquetaria como un artefacto de la recogida, transporte y almacenamiento en dispositivos de recogida de sangre típicos para procedimientos de diagnóstico *in vitro*.

50 Por ejemplo, algunos agentes de estabilización de la sangre son más potentes que otros y, por lo tanto, requerirán una concentración menor por ml de muestra, dependiendo de la utilidad. Pueden ser necesarias diferentes cantidades de agentes de estabilización de la sangre para estabilizar componentes sanguíneos tales como plaquetas que pueden estar presentes en una composición enriquecida (tal como PRP) en comparación con el mismo volumen de una muestra de sangre completa (por ejemplo, que contendría menos componentes tales como plaquetas por unidad de volumen).

60 En general, dicho al menos un agente de estabilización de la sangre puede seleccionarse para conseguir al menos aproximadamente un 50 % de actividad de inhibición de la agregación plaquetaria a temperatura ambiente, preferentemente en el intervalo de al menos aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 75 % de actividad inhibidora, y más preferentemente al menos aproximadamente un 75 % de actividad inhibidora, durante el transcurso de la recogida y almacenamiento y/o transporte, hasta el momento del ensayo analítico o uso terapéutico. Dependiendo de la necesidad, puede conseguirse estabilización durante al menos 1 hora hasta aproximadamente 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 horas o más.



Los practicantes expertos apreciarán que las muestras hemolizadas son una pista visual obvia de que se han dañado las células sanguíneas durante la recogida, transporte o almacenamiento de las muestras de sangre. Aunque la hemólisis no es necesariamente perjudicial para ningún ensayo clínico, es una interferencia bien conocida para algunos ensayos y, por lo tanto, es preferible evitar provocar hemólisis. La hemólisis puede medirse por una escala visual (por ejemplo, leve o ligeramente rosa, moderada o notablemente rojo, o grave o rojo oscuro). La hemólisis también puede medirse por medición espectroscópica del color rojo de la propia hemoglobina, y puede indicarse por la concentración de hemoglobina liberada al suero o plasma (por ejemplo, de tal modo que una concentración de menos de aproximadamente 20 mg/dl de hemoglobina liberada, o cuando la concentración de hemoglobina no puede medirse visualmente o por espectroscopía, representa una hemólisis “minoritaria o insignificante”, de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg/dl representa una hemólisis “leve”, de aproximadamente 100 a aproximadamente 300 mg/dl representa una hemólisis “moderada”, o de más de aproximadamente 300 mg/dl representa una hemólisis “grave”).

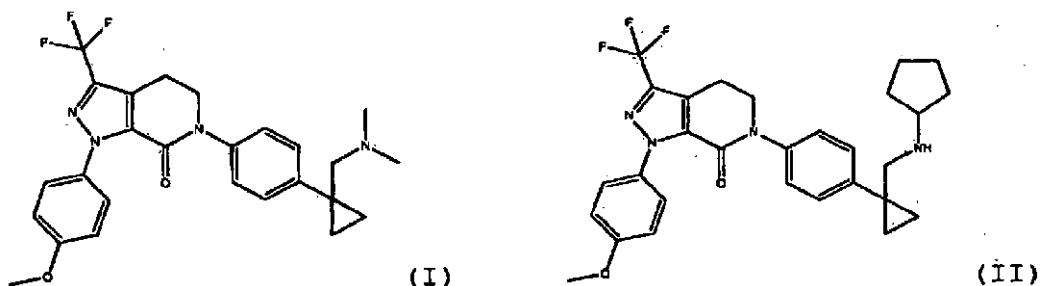
Teniendo cuenta lo anterior, la concentración de agente de estabilización de la sangre generalmente varía de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 50 mM, y en algunas realizaciones de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 10 mM, y en algunas realizaciones de aproximadamente 5  $\mu$ M a aproximadamente 5 mM, y en algunas realizaciones de aproximadamente 20  $\mu$ M a aproximadamente 3 mM, y en algunas realizaciones de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 2 mM.

Por ejemplo, la concentración de variegina o su análogo generalmente varía de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 10 mM. En otras realizaciones, la concentración de agente de estabilización de la sangre varía de aproximadamente 1  $\mu$ M a aproximadamente 10 mM. En otras realizaciones más, la concentración de variegina o su análogo varía de aproximadamente 10  $\mu$ M a aproximadamente 1 mM. En otras realizaciones adicionales, la concentración de variegina o su análogo varía de aproximadamente 25  $\mu$ M a aproximadamente 500  $\mu$ M. En otras realizaciones, la concentración de variegina o su análogo varía de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 300  $\mu$ M. En otras realizaciones adicionales, la concentración de agente de estabilización de la sangre es de aproximadamente 150  $\mu$ M, y en otras realizaciones es de aproximadamente 300  $\mu$ M.

La concentración de disacárido polisulfatado generalmente varía de aproximadamente 50  $\mu$ M a aproximadamente 50 mM. En otras realizaciones, la concentración de disacárido polisulfatado varía de aproximadamente 250  $\mu$ M a aproximadamente 25 mM. En otras realizaciones más, la concentración de disacárido polisulfatado varía de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, y en otras realizaciones más, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 3 mM. En otras realizaciones más, la concentración de disacárido polisulfatado es de aproximadamente 2 mM, y en otras realizaciones es de aproximadamente 3 mM. También se contemplan todos los subintervalos dentro de estos intervalos. El término “aproximadamente”, como se usa en relación con todos los valores de concentración desvelados en el presente documento, se refiere a la variabilidad (más/menos un valor) del 50 %.

El agente de estabilización de la sangre puede estar en cualquier forma adecuada incluyendo una solución, una suspensión u otro líquido, un microgránulo, un comprimido, una cápsula, un material secado por pulverización, un material secado por congelación, un polvo, una partícula, un gel, cristales o un material liofilizado. El agente de estabilización de la sangre se introduce preferentemente en el depósito del recipiente en tal forma que se optimice el periodo de caducidad del agente, es decir, que se prevenga la degradación del agente de estabilización de la sangre que daría como resultado una reducción de la eficacia. Es ventajoso proporcionar el agente en forma deshidratada, por ejemplo, liofilizada, ya que proporciona buena estabilidad y también permite la esterilización posterior, siendo ambas características claves desde el punto de vista de la automatización y la normalización. Además de disponerse en el depósito, el agente de estabilización de la sangre puede situarse en cualquier superficie del dispositivo. El agente de estabilización también puede disponerse en la pared interior, en tapones y sellos para cerrar dichos dispositivos o en insertos mecánicos u otros colocados dentro de dichos dispositivos.

Además del agente de estabilización de la sangre, el dispositivo de la presente invención también puede contener un anticoagulante. La coagulación de la sangre no impide necesariamente de forma adversa la medición de la agregación plaquetaria, pero la formación de demasiado material insoluble con el tiempo evita el acceso a suficiente muestra líquida para ensayar. Las muestras completamente coaguladas son inútiles para estudios de plaquetas. De esta manera, un atributo preferible de una muestra de sangre destinada al ensayo de la función sanguínea es que se haya evitado la formación de material insoluble. El anticoagulante puede aumentar la anticoagulación, estabilización de la sangre y/o efectos antihemolíticos proporcionados por la variegina y/o el disacárido polisulfatado. Los ejemplos representativos de anticoagulantes que pueden ser útiles en la presente invención incluyen inhibidores del Factor de coagulación Xa, inhibidores del Factor VII, inhibidores del Factor IX, inhibidores del Factor XII y otros inhibidores de trombina (Factor II). Se describen varios ejemplos representativos de inhibidores del Factor Xa en Qiao *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 19: 462-468 (2009), siendo las estructuras de dos de ellos las siguientes:



I = 6-(4-{1-[(dimetilamino)metil]ciclopropil}fenil)-1-(4-metoxifenil)-3-(trifluorometil)-1,4,5,6-tetrahidropirazolo[3,4-c]piridin-7-ona; II = 1-(4-metoxifenil)-6-[4-[1-pirrolidin-1-ilmetil]ciclopropil]fenil]-3-(trifluorometil)-4,5-dihidropirazolo[3,4-c]piridin-7-ona. Las cantidades de estos anticoagulantes particulares generalmente varían de 100 µg/ml a 25 mg/ml, y en algunas realizaciones de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml.

En algunas realizaciones, el agente anticoagulante adicional es argatrobán y sus derivados (por ejemplo, Tamura *et al.*, *Circ. J.* 73(3): 540-8 (2009) y Kalb *et al.*, *Platelets* 20(1): 7-11 (2009)). La concentración de argatrobán generalmente varía de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 2 mM, y en algunas realizaciones de aproximadamente 10 µM a aproximadamente 1 mM, y en otras realizaciones más de aproximadamente 25 µM a aproximadamente 100 µM.

En otras realizaciones, el anticoagulante adicional es antistasina o un péptido relacionado con antistasina (un fragmento peptídico derivado de la proteína antistasina) (véase Ohta *et al.*, *Thromb Haemost.* 72(6): 825-30 (1994)). La concentración de antistasina generalmente varía de 100 nM a aproximadamente 2 mM, y en algunas realizaciones de aproximadamente 1 µM a aproximadamente 100 µM.

Los ejemplos de otros anticoagulantes más que pueden ser útiles en la presente invención incluyen Antitrombina III (Jorgensen *et al.*, *Biochem. J.* 231(1): 59-63 (1985)) y E-76, que es un péptido obtenido por selección de una biblioteca de fagos frente al complejo de factor tisular-VIIa (Dennis *et al.*, *Nature* 404(6777): 465-70 (2000)).

Los dispositivos de la presente invención también pueden incluir medios excipientes (por ejemplo, agua o alcohol), medios estabilizantes (polivinilpirrolidona, trehalosa, manitol, etc.) y/o uno o más aditivos adicionales para tratar la sangre o muestra de sangre. Los aditivos adecuados incluyen fenol, mezclas de fenol/cloroformo, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, sales de ácidos orgánicos, sales de haluros de metal alcalino, agentes quelantes orgánicos, colorantes fluorescentes, anticuerpos, agentes de unión (no agentes quelantes), agentes tamponantes y cualquier otro reactivo o combinación de reactivos normalmente usados para tratar muestras biológicas para su análisis.

Los aditivos y/o anticoagulantes pueden disponerse en el depósito y/o en otra parte del dispositivo siempre que entren en contacto con la muestra para proporcionar su efecto deseado. Por ejemplo, estos ingredientes también pueden disponerse en la pared interior, en tapones y sellos para cerrar dichos dispositivos o en insertos mecánicos o de otro tipo colocados dentro de dichos dispositivos.

Los métodos de la presente invención incluyen introducir sangre o una muestra de sangre en el dispositivo que contiene el agente de estabilización de la sangre. En algunas realizaciones, la muestra de sangre se extrae del paciente directamente en el recipiente sin ninguna etapa de proceso intermedia. En otras realizaciones, la muestra recogida se procesa adicionalmente para preparar una composición tal como una composición enriquecida que contiene un componente de la sangre tal como PRP.

La muestra puede después someterse a un ensayo analítico, por ejemplo, de diagnóstico, para medir un parámetro de la sangre. En algunas realizaciones, el parámetro que se mide es la función plaquetaria, que puede evaluarse por la capacidad de las plaquetas contenidas en la muestra para agregarse tras su estimulación. Dicho ensayo puede realizarse aunque la muestra (por ejemplo, PRP) esté destinada al uso terapéutico.

Hay varios ensayos de diagnóstico *in vitro* que pueden aplicarse para analizar la función plaquetaria en muestras de sangre extraídas y en composiciones en que contiene plaquetas. La agregometría de transmisión de la luz (LTA) es una técnica ampliamente usada. La LTA se basa en la medición de la cantidad de luz que puede pasar a través de una preparación de plasma rico en plaquetas (PRP). En la LTA, el alto número de plaquetas en el PRP dispersa los fotones, pero tras la agregación estimulada por la adición de un agonista plaquetario, las plaquetas se acumulan en masas que con el tiempo se hacen tan grandes que caen al fondo de la cámara de ensayo. A lo largo del proceso se reduce la dispersión de la luz, y la agregación se mide como un aumento de la cantidad de luz que puede pasar a través de la muestra. Otro método es la agregometría por impedancia en sangre completa (WBIA), como se describe en el Ejemplo 1 mostrado más adelante. Otra técnica relevante se realiza en el Sistema VerifyNow comercializado

por Accumetrics, que usa una variación de las mediciones de agregación que se basa en la agregación de plaquetas en la superficie de perlas de látex recubiertas con fibrinógeno, y la agregación se supervisa por cambios de la absorbancia en la señal. Un instrumento denominado PFA-100, comercializado por Siemens, mide de la función plaquetaria analizando el tiempo requerido para la formación de trombos en un sistema modelo. PFA-100 usa un cartucho que tiene una pequeña abertura a través de la que puede extraerse sangre y esta abertura se cierra cuando se induce la agregación plaquetaria, y la fuerza requerida para extraer sangre a través de la abertura aumenta en función de la agregación. PFA-100 representa un método “físico” en el que se mide un resultado macromolecular de la función plaquetaria, en este caso el cierre de una abertura en un dispositivo. Otro método físico es la tromboelastografía, en la que se mide la formación de coágulos, incluyendo la agregación de plaquetas como una parte integral de la masa de coágulos, mediante la cantidad de resistencia física para mover una aguja sumergida en la muestra, aumentando la resistencia a medida que aumenta la masa de coágulos. Por el contrario, pueden realizarse mediciones de citometría de flujo directamente en células plaquetarias individuales, en las que pueden medirse cambios moleculares específicos en las células. Al usar citometría de flujo pueden medirse muchos cambios específicos que se producen tras la activación plaquetaria, en ocasiones incluso como precursores de la caracterización más física de la agregación de las mediciones anteriores, tales como cambios en la forma y orientación de proteínas de superficie incluyendo proteínas que son receptores de la superficie celular, o cambios en el contenido iónico de las plaquetas (por ejemplo, se sabe que se produce un cambio en la concentración de calcio intracelular tras la activación plaquetaria). Además, la fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP), una proteína fosforilada dentro de las plaquetas, pierde fosforilación tras la activación del receptor de P2Y12 presente en la superficie de las plaquetas y, por lo tanto, un descenso de la fosforilación de VASP, que puede supervisarse por citometría de flujo, es indicativo de la activación plaquetaria (véase, por ejemplo, Geiger *et al.* (2005) Clin. Chem. 51(6): 957-965). Aunque el estado de fosforilación de VASP puede medirse dentro de las plaquetas usando citometría de flujo, también se han descrito métodos indirectos que usan métodos inmunoquímicos más típicos para hacer lo mismo.

Como se ilustra en los ejemplos de trabajo, la capacidad y grado de agregación de las plaquetas también puede medirse realizando “agregometría” en muestras de sangre. La agregometría puede medirse como “agregometría por impedancia en sangre completa” (WBIA), entre las varias maneras de realizar la agregometría. Una ventaja de la WBIA es que, aunque la LTA requiere la preparación del PRP como la muestra de ensayo, la WBIA puede actuar en una muestra de sangre completa pero también puede actuar con PRP. En la WBIA se sumergen dos cables dentro de un recipiente de muestra especial en una muestra de sangre preparada, con un espacio muy pequeño entre los cables, y se envía una corriente eléctrica pequeña entre los cables (la corriente se conduce a través de la sangre en el pequeño espacio). Tras la estimulación química producida por el operario, se inicia la agregación plaquetaria. Las plaquetas se acumulan preferentemente en las superficies de los cables a medida que se agregan y la acumulación creciente de plaquetas comienza a aislar frente a la corriente eléctrica provocando un aumento en la impedancia eléctrica, que se registra por el instrumento. Un experimento típico recoge datos de corriente eléctrica durante 6 minutos después de la introducción del estimulante químico.

Se pretende que estas mediciones sean sensibles al grado de agregación plaquetaria (también denominada, en este caso, función plaquetaria), y también en alguna medida simplemente al número de plaquetas en la muestra. En algunas realizaciones, puede ser beneficioso inducir la agregación plaquetaria en un momento específico después de la recogida. Por lo tanto, puede añadirse un agonista plaquetario a la muestra para inducir agregación. Los expertos en la materia habitualmente conocen agonistas y pueden incluir, por ejemplo, colágeno, adenosín difosfato (ADP), ácido araquidónico (AA), epinefrina, péptido activador del receptor de trombina (TRAP), péptido relacionado con colágeno (CRP), ristocetina, trombina (y análogos de trombina), agonistas del receptor de tromboxano (por ejemplo, U46619), propil galato catiónico y convulxina. En muchos casos, los agonistas de mayor interés son fármacos diseñados para prevenir la acumulación nociva de agregados plaquetarios, como se describirá con más detalle en algunos de los ejemplos que se presentan más adelante.

También hay varios antagonistas, o compuestos que pueden inhibir la respuesta plaquetaria, y sus efectos también pueden medirse. Por modo de acción, estos compuestos, conocidos por los expertos en la materia, incluyen inhibidores de ciclooxigenasa (por ejemplo, ácido acetilsalicílico (ASA, o “aspirina”), inhibidores del receptor de tromboxano (por ejemplo, terutobán, sulotrobán, ifetrobán), antagonistas del receptor de trombina (PAR-1, vorapaxar, atopaxar), inhibidores del receptor de GpIIb/IIIa (por ejemplo, abciximab, tirofiban, eptifibatida), antagonistas del receptor de P2Y12 (por ejemplo, clopidogrel (nombre comercial Plavix), ácido [dicloro-[[[(2R,3S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-[6-(2-metilsulfaniletilamino)-2-(3,3,3-trifluoropropilsulfanyl)purin-9-yl]oxolan-2-il)metoxi-hidroxifosforil]oxi-hidroxifosforil]metil]fosfónico (Cangrelor) o (1S,2S,3R,5S)-3-[7-[(1R,2S)-2-(3,4-difluorofenil)ciclopropilamino]-5-(propiltio)-3H-[1,2,3,]triazolo[4,5-d]pirimidin-3-yl]-5-(2-hidroxi-etoxi)ciclopentano-1,2-diol (Ticagrelor) y otros compuestos que pueden alterar la función bioquímica de las plaquetas.

Es ventajoso estabilizar las muestras de sangre extraídas y sus componentes para una amplia diversidad de ensayos de diagnóstico, así como para el uso terapéutico posterior. La siguiente divulgación ilustra ejemplos representativos de estas utilidades, particularmente en el contexto de la conservación de la función plaquetaria.

Dada la naturaleza aguda de los acontecimientos cardiovasculares adversos, puede ser de vital importancia saber que el primer planteamiento terapéutico seleccionado para un paciente tendrá un efecto beneficioso inmediato,

idealmente sin tener que supervisar a los pacientes y seleccionar terapias alternativas. Por lo tanto, antes de que los pacientes se sometan a dicha terapia, se les pueden extraer muestras de sangre y ensayarse con respecto a la función plaquetaria. Dichos ensayos también pueden recomendarse para la supervisión continua del efecto de los antitrombóticos recetados, ensayando con respecto a un exceso o defecto de inhibición de la función plaquetaria. Se emplean con frecuencia ensayos similares en la exploración prequirúrgica para descartar posibles efectos hemorrágicos adversos durante la cirugía/recuperación. Es importante indicar que el ensayo puede ser impreciso si la función de las plaquetas no está estabilizada en la muestra de sangre extraída, al permitirse su agregación antes del ensayo (por ejemplo, sin que “quede” función a ensayar), o quizás al “morir” o perder de otro modo la función natural antes del ensayo.

Por ejemplo, los fármacos antiplaquetarios se usan mucho en los Estados Unidos y en todo el mundo. Tomar una aspirina “infantil” diariamente para la salud cardiaca se ha convertido en una práctica habitual, tomando hasta 50 millones de americanos una dosis de aspirina diaria. Plavix (o clopidrogel, según el nombre químico) es una terapia antiplaquetaria de uso generalizado, usada tanto en situaciones agudas (por ejemplo, inmediatamente después de procedimientos de cardiología de intervención o en situaciones de urgencia relacionadas con un ataque cardíaco o ictus) como para el cuidado crónico de pacientes que han tenido complicaciones cardiopulmonares o circulatorias. El mecanismo de acción de Plavix y de la aspirina inhibe en última instancia la agregación plaquetaria, que se pretende, por ejemplo, que reduzca la probabilidad de bloqueo arterial debido a los agregados plaquetarios formados de forma espontánea, que puede ocasionar un ataque cardíaco o ictus. Se escriben anualmente más de 29 millones de recetas de Plavix. Éstos fármacos actúan bloqueando las rutas químicas que inducen la agregación plaquetaria y, por lo tanto, pueden ayudar a mitigar acontecimientos cardiovasculares peligrosos que pueden exacerbarse por agregados plaquetarios (trombos) que ocluyen de forma mecánica el flujo sanguíneo arterial o venoso. Quizás hasta el 50 % de los seres humanos no responden bien a estos fármacos, y este es un asunto que ha sido cada vez de mayor interés en la bibliografía médica y científica actual (por ejemplo, Tentzeris *et al.*, *Thromb Haemost.* 105 Supl. 1:S60-6 (2011)). Los pacientes que son “resistentes” a estos fármacos no experimentan esta inhibición plaquetaria y, por lo tanto, tienen un riesgo muy alto de acontecimientos adversos. La primera o única indicación de que estos fármacos no han funcionado como se pretendía puede producirse cuando el paciente experimenta en realidad el ataque cardíaco o ictus que se pretendía que la receta previniera.

De forma muy similar a Plavix y a la aspirina, a una muestra de sangre extraída se le pueden añadir inhibidores (agonistas) plaquetarios que imiten estos efectos para ensayar la eficacia sin que sea necesario que los pacientes tomen el fármaco (antes de la extracción de sangre). Como se ha descrito anteriormente, puede añadirse un agonista que imite las diversas señales químicas que podrían inducirse dentro del cuerpo al dañarse el sistema vascular, y pueden ensayarse los efectos de antagonistas plaquetarios con respecto a su capacidad para anular la respuesta a los agonistas.

En particular, la aspirina inhibe inmediatamente la función plaquetaria, de modo que la simple adición de una pequeña cantidad de aspirina directamente a una muestra de sangre antes de analizar la agregación plaquetaria puede permitir una determinación de si la aspirina sería beneficiosa. Algunos de los inhibidores de P2Y12, tales como cangrelor y ticagrelor, también pueden unirse directamente e inhibir las plaquetas y, por lo tanto, pueden añadirse directamente a una muestra de sangre antes de ensayar su eficacia como inhibidores plaquetarios.

Por otro lado, como Plavix es un “profármaco”, debe convertirse en una forma activa mediante procesamiento metabólico después de ingerirse. Los profármacos se procesan con frecuencia por enzimas en el hígado, dando como resultado formas activas que pueden después circular en la sangre. De esta manera, la adición de la forma ingerida (profármaco) de Plavix a una muestra de sangre extraída no dará como resultado la inhibición de la agregación plaquetaria. Sin embargo, de todas formas, las acciones de Plavix pueden imitarse para permitir el ensayo sin que el paciente haya tenido que tomar realmente primero el fármaco. Plavix y otros fármacos similares actúan inhibiendo la ruta que permite al ADP estimular, o ser agonista de, las plaquetas. El producto químico 2-metiltioadenosín 5'-monofosfato (2MeSAMP) inhibe las mismas dianas que inhiben Plavix y otros inhibidores de P2Y12 *in vivo* (Srinivasan *et al.*, *J. Biol. Chem.* 284(24): 16108-17 (2009)), pero puede actuar directamente sobre las plaquetas y, por lo tanto, puede añadirse a una muestra de sangre inmediatamente antes del ensayo. Por lo tanto, la adición de un antagonista plaquetario tal como 2MeSAMP a una muestra de sangre extraída antes del ensayo de la agregación plaquetaria permite determinar si Plavix sería terapéuticamente útil en un paciente. El antagonista 2MeSAMP también proporciona un mimético adecuado para los efectos de los fármacos Cangrelor y Ticagrelor.

Por lo tanto, el ensayo de la función plaquetaria puede proporcionar un modo directo de medir si estos fármacos han tenido o no su efecto deseado en el paciente, por ejemplo, extrayendo sangre y ensayando la función plaquetaria antes y después de iniciar la terapia farmacológica. Si el paciente responde de forma apropiada a los fármacos, la función plaquetaria medida se reduciría después de la dosificación. También puede realizarse una supervisión continuada de los pacientes con terapia a largo plazo para asegurarse de que la función plaquetaria se está inhibiendo hasta un nivel suficiente para ayudar a prevenir un ataque cardíaco o ictus, asegurándose al mismo tiempo de que la función plaquetaria no se haya inhibido en exceso. En este último caso, habría un riesgo mucho mayor de que el paciente experimentara acontecimientos hemorrágicos imparables (por ejemplo, un estado inducido por fármacos parecido a la hemofilia).

Un uso relacionado para estos ensayos está en el contexto de las exploraciones prequirúrgicas. Los ensayos de la función intrínseca de las plaquetas en pacientes antes de la cirugía pueden identificar a los pacientes predispuestos a acontecimientos hemorrágicos adversos, de modo que la cirugía podría posponerse o podría tratarse la afección antes de la cirugía (véase, por ejemplo, Bracey *et al.*, *Am. J. Cardiol.* 98(10A): 25N-32N (2006)). Por ejemplo, los pacientes se identificarían como “en riesgo” si su potencial de agregación plaquetaria intrínseca fuera anormalmente bajo, como se valora por ensayos de agregometría.

La función plaquetaria también puede conservarse para fines de ensayo de biomarcadores proteicos o de metabolitos. Las plaquetas contienen proteínas y metabolitos de interés diagnóstico, pero lo más probable es que el valor del ensayo esté en la medición de la concentración de las formas en libre circulación de estos biomarcadores en plasma. Se cree que la desgranulación de las plaquetas, especialmente tras la activación o agregación plaquetaria, puede conducir a niveles elevados artificialmente de estos marcadores y representa un error preanalítico si no se controla. De forma similar, los gránulos de las plaquetas también contienen enzimas que pueden dañar estos biomarcadores en circulación y, por lo tanto, dar como resultado niveles artificialmente bajos de los biomarcadores de interés. Aunque en un tubo de recogida de sangre podrían incluirse ciertos inhibidores para “interceptar” cualquier enzima que proceda de las plaquetas activadas, es deseable simplemente prevenir la activación plaquetaria en primer lugar proporcionando plaquetas estabilizadas para ensayar estos biomarcadores presentes en el plasma.

Otro uso más de la presente invención está relacionado con el uso de las plaquetas estabilizadas para su uso en ciertas aplicaciones terapéuticas. La terapia del gel plaquetario autólogo es un proceso para el tratamiento de ciertas heridas y una amplia serie de afecciones distintas que varían desde la curación de implantes dentales a inyecciones destinadas a reparar lesiones de ligamentos. La premisa implica extraer una muestra de plasma, aislar el “plasma rico en plaquetas” y después reintroducir la preparación en el paciente en el sitio en el que se desee la curación. Un método implica añadir trombina, u otro coagulante, para inducir la coagulación, obteniéndose un “pegamento” que se forma rápidamente y puede aplicarse a una posición para mejorar la curación. Se cree que la desgranulación plaquetaria, que liberará citocinas y ciertos factores de crecimiento, estimula la curación de heridas en este planteamiento de terapia autóloga. Si se pierde la función plaquetaria y, como resultado, las plaquetas se activan de forma prematura, pueden perder este efecto terapéutico. Por lo tanto, también desde este punto de vista, son ventajosos la recogida y/o almacenamiento de plaquetas en presencia de los agentes de estabilización de la sangre de la presente invención.

Además de los análisis de función plaquetaria, pueden medirse otros parámetros de la sangre clínicamente relevantes. Los parámetros de la sangre representativos incluyen mediciones de analitos portados en plasma tales como los habitualmente ensayados en química clínica, inmunoquímica, enzimología y otras mediciones de moléculas “fuera” de las células (en la parte plasmática de la sangre). Otros parámetros sanguíneos incluyen análisis celulares, tales como hematología, recuento sanguíneo completo (CBC), frotis de sangre y análisis microscópico de células sanguíneas, mediciones de granulación/desgranulación plaquetaria y caracterización bioquímica y metabólica de las células (medida con frecuencia, por ejemplo, mediante citometría de flujo, biología molecular o proteómica). La sangre y las muestras de sangre estabilizadas de la presente invención con esos agentes serán compatibles y, por lo tanto, útiles con cualquier ensayo clínico convencional en el que la anticoagulación sea un requisito básico de la muestra de sangre. Por ejemplo, los ensayos de hematología clínica convencionales tales como recuento de sangre completa (CBC), en los que se distinguen y recuentan las diversas células en una muestra de sangre, se basan en una muestra anticoagulada, de modo que todas las células permanecen en el estado de sangre completa suspendida/disuelta. Habitualmente, para fines de CBC rutinarios, la sangre se estabiliza usando EDTA. Cualquier ensayo realizado en plasma requiere obviamente anticoagulación (o la muestra se coagularía y se definiría por lo tanto como suero). Las mediciones de química clínica tradicionales (un menú de varias decenas a cientos de analitos típicos bien conocidos por los expertos en la materia) con frecuencia se realizan con muestras de plasma anticoagulado con heparina. De forma similar, la inmunoquímica, o cuantificación de analitos mediante el uso de unión de anticuerpos como mecanismo de detección, también se basa en muestras de plasma. Sin embargo, tanto el EDTA como las concentraciones usadas típicamente de heparina (por ejemplo, 13 U/ml) interfieren con la capacidad real para realizar ensayos de función plaquetaria. Por lo tanto, no existe reciprocidad de la aplicabilidad entre plataformas de las muestras. La presente invención supera esta limitación ya que estabiliza muestras de sangre para el ensayo de la función plaquetaria, así como estos otros ensayos hematológicos clínicos habituales.

Para facilitar el uso de la presente invención, uno o más de los dispositivos pueden envasarse en forma de un kit. En algunas realizaciones, el kit incluirá uno o una pluralidad de dispositivos, por ejemplo, dispuestos en rejillas abiertas o en un envase sellado. Los kits también pueden contener uno o más elementos que son útiles para la extracción y recogida de la sangre, por ejemplo, agujas, torniquetes, vendas, alcohol y toallitas, y lancetas. Los kits también pueden incluir otros tipos de dispositivos de recogida de sangre tales como tubos, que tienen dispuestos en los mismos agentes de estabilización de la sangre y/o anticoagulantes conocidos, de los que los ejemplos incluyen tubos de EDTA (por ejemplo, para recuentos de hematología rutinarios), tubos de heparina (para química clínica), tubos de citrato (para ensayos de coagulación), y otros tubos especializados (para uso en proteómica, genómica y similares). Los kits de la presente invención también pueden incluir instrucciones para su uso.

En algunas otras realizaciones, el kit puede incluir un dispositivo de recogida primario, por ejemplo, un tubo de plasma con un tubo de separación de plasma que tiene un elemento de separación en el mismo, y un tubo secundario para ensayo, por ejemplo, para verter o distribuir de otro modo el plasma recogido. El elemento de separación en el tubo primario puede ser de una densidad apropiada para permitir el aislamiento de plasma rico en plaquetas del otro contenido celular de la sangre. El tubo de ensayo secundario puede ser del mismo o diferente tamaño que el tubo primario, dependiendo del ensayo deseado. Ambos tubos pueden tener un agente de estabilización de las plaquetas dispuesto en los mismos. El kit puede incluir además un dispositivo de transferencia entre tubos para evitar la necesidad de verter o de realizar otras prácticas de transferencia inseguras, en cuyo caso el tubo secundario estaría a una presión reducida para extraer el plasma.

En otro aspecto de la invención, puede incluirse un antagonista plaquetario en el tubo de recogida de sangre primario, junto con el agente de estabilización de la sangre. El ensayo de la función plaquetaria de dicha muestra mediante estimulación con un agonista apropiado como parte de un ensayo de diagnóstico *in vitro*, puede reflejar directamente la eficacia del antagonista/fármaco en la sangre de ese paciente. En una realización preferida, un kit puede contener al menos dos tubos, en los que un tubo contiene el agente de estabilización de la sangre y otro tubo contiene el agente de estabilización de la sangre y el antagonista plaquetario, permitiéndose de este modo que el operario mida las plaquetas en los estados tanto inhibido como no inhibido sin tener que realizar ninguna otra manipulación de las muestras de sangre antes de realizar el ensayo de agregación.

La invención se describirá ahora en relación con los siguientes ejemplos no limitantes.

*Ejemplo 1: Estabilidad extendida de una muestra de sangre completa para el ensayo de la función plaquetaria, como se refleja por mediciones de la agregación plaquetaria.*

Muestras de sangre: Se extrajo sangre venosa de un sujeto humano en tubos que contenían citrato sódico (3,2 % o variegina (SEQ ID NO: 1) 150  $\mu$ M. La sangre se dejó en reposo a temperatura ambiente, en alícuotas intactas, hasta que se ensayó en los momentos indicados. Las muestras se invirtieron varias veces inmediatamente antes del ensayo, para resuspender las células sanguíneas que se sedimentan de forma natural a lo largo del tiempo.

Mediciones: el ensayo de la función plaquetaria (que en este experimento fue actividad de agregación) se realizó usando el instrumento Multiplate (Verum Diagnostics, Múnich, Alemania), que usa sangre completa como muestra y un aumento en la impedancia como medición de la agregación plaquetaria. El instrumento se usó según las instrucciones del fabricante. En resumen, se calentaron 300 microlitros de solución salina isotónica en cada cubeta de reacción, y a esto se le añadieron 300 microlitros de la muestra de sangre completa. En reacciones en las que se añadieron aspirina u otros antagonistas de plaquetas (inhibidores) *in vitro*, se añadieron 20 microlitros ( $\mu$ l) de una solución de reserva de aspirina a las muestras. La reacción de agregación se inició mediante la adición de un agonista plaquetario, en este caso colágeno, a 3,2  $\mu$ g/ml y volumen (20  $\mu$ l) según las instrucciones del fabricante. Tras la adición del colágeno, las mediciones de impedancia comenzaron automáticamente y continuaron durante 6 minutos, representando el ciclo completo a lo largo del eje x en las gráficas mostradas en la Fig. 2. Las gráficas muestran la agregación plaquetaria, indicada por impedancia, como una medición arbitraria sin unidad en el eje y, a lo largo de un tiempo de proceso de 6 minutos en el eje x. Los registros gráficos mostrados son datos de agregación plaquetaria sin procesar suministrados desde el instrumento. Los registros gráficos duplicados evidentes en algunas de las gráficas representan dos canales de medición por duplicado que siempre se procesan simultáneamente, para ayudar al significado estadístico de los datos, y con frecuencia se solapan tan estrechamente que parecen un único registro gráfico en algunas gráficas. Se muestran datos representativos para sangre que permanece a temperatura ambiente después de la extracción inicial durante 1 h, 24 h, 48 h y 72 h. Se muestran datos para sangre sola, así como para sangre pre-tratada con aspirina para inhibir la función plaquetaria inmediatamente antes del ensayo.

De acuerdo con cuerpos reguladores de diagnóstico tales como el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI), la sangre completa citratada se considera el patrón clínico para uso en el ensayo de la función plaquetaria. Por lo tanto, se comparó la realización de la invención frente a citrato. Como se muestra en la Fig. 2, las muestras de citrato y de la invención cuando estaban frescas, a una hora, actuaban de forma bastante similar. Ambas respondieron fuertemente a colágeno y mostraron antagonismo medible por aspirina. Sin embargo, la fuerza de la señal para la realización de la invención fue mayor que la muestra de referencia de citrato, incluso en la muestra "fresca", lo que demuestra las ventajas de la presente invención para el ensayo incluso dentro de las directrices clínicas actuales que recomiendan el ensayo de sangre citratada en un periodo máximo de 2-4 horas después de la extracción de la sangre. La exposición inmediata de la sangre a la química de la invención tiene un efecto beneficioso medible. En todos los tiempos mayores, está claro que la señal de sangre con citrato claramente se había perdido, dando como resultado una señal casi no medible, volviéndose de esta manera prácticamente imposible cualquier observación de una reducción adicional por antagonismo de aspirina. Por el contrario, a las 24 y 48 horas, la realización de la invención conservó la función plaquetaria sustancialmente al nivel de función medido en la muestra de 1 h, conservándose también la capacidad para medir el antagonismo de la aspirina. A las 72 h, la señal se redujo ligeramente pero aún era suficientemente fuerte para permitir la observación de reducción adicional cuando se había añadido aspirina. Por lo tanto, los resultados de este experimento demuestran los dos aspectos beneficiosos de la presente invención, concretamente una señal de función plaquetaria más fuerte con muestras frescas y también una función plaquetaria muy conservada hasta varios días después de la extracción, permitiendo

al mismo tiempo que la sangre se almacene simplemente a temperatura ambiente.

*Ejemplo 2: Extensión del tiempo de utilización de una muestra de sangre extraída para mediciones de la función plaquetaria*

5 La Fig. 3 ilustra las limitaciones de los métodos de medición de la función plaquetaria, y cómo la pérdida de función después de extraer una muestra afecta de forma adversa a la capacidad para generar datos de diagnóstico clínicos útiles. Los experimentos se realizaron como se ha descrito en Ejemplo 1. En este caso, los datos se representan en función del tiempo que la muestra de sangre permanece fuera del cuerpo (eje x) frente a la función plaquetaria mostrada como el área bajo la curva (ABC) como una representación de la señal de agregación plaquetaria. ABC es la señal integrada a partir de los registros gráficos de datos sin procesar mostrados en el Ejemplo 1, y también se indica como una medida sin unidad. El nivel de fondo eficaz del instrumento se dibuja como una línea discontinua a través de la parte inferior de la gráfica. Cualquier medición de ABC de la agregación en o por debajo de este nivel se consideró tan débil que no era presentable, representando esencialmente un nivel de datos “nulo”.

15 A las 24 h, resultó evidente que las plaquetas en la muestra de sangre citratada perdían suficiente función como para estar muy cerca del nivel eficaz nulo, y en presencia de aspirina ya habían alcanzado este nivel nulo. A las 48 h, incluso en ausencia de aspirina añadida, no se detectó ninguna agregación significativa para la muestra citratada. Por comparación, la realización de la invención estabilizó la función plaquetaria permitiendo mediciones significativas incluso a las 72 h después de la extracción de la sangre.

25 En la Fig. 4 se representa otra vista más de los datos, en la que la agregación plaquetaria medida para cada tipo de muestra se presenta como un porcentaje en relación con la agregación medida para la muestra de 1 h. Los datos en esta gráfica se presentan como un promedio de tres sujetos humanos, representando las barras de error una desviación típica del promedio. En esta vista, los datos muestran que, en un periodo de 24 h, las plaquetas recogidas y almacenadas con citrato perdieron bastante más de la mitad de su función, y a las 48 h, perdieron más del 80 % de su función. En comparación, a las 48 h, se mantuvo bastante más de la mitad de la señal para plaquetas recogidas y almacenadas con la realización de la invención.

30 **EJEMPLO 3: Efectos de diversas concentraciones de variegina sobre la conservación de la función plaquetaria y la anticoagulación.**

35 Se examinó la estabilidad relativa de plaquetas con respecto a una serie de concentraciones de variegina (SEQ ID NO: 1). Los experimentos se realizaron como se ha descrito anteriormente, usando colágeno o adenosín difosfato (ADP) como agonistas, según los protocolos recomendados por el fabricante. La Tabla 2 enumera una evaluación cualitativa de la estabilidad, concretamente cuánto tiempo después de extraer inicialmente la sangre se podía medir la agregación plaquetaria por encima de la línea basal eficaz del instrumento, el tiempo transcurrido hasta la primera observación visual de material coagulado, insoluble en la muestra de sangre completa, y también se registró una evaluación de la gravedad o grado de presencia de este material insoluble.

40 Tabla 2: Efecto de diversas concentraciones de variegina (SEQ ID NO: 1) sobre la estabilidad de las plaquetas y la calidad de las muestras de sangre

Realización de la invención	Tiempo después de la extracción sanguínea en el que la agregación aún era medible por encima de la línea basal	Inspección visual para material insoluble
Variegina 150 $\mu$ M	72 h o más	Rastros a las 48-72 h Coágulos sólidos a las 96 h
Variegina 75 $\mu$ M	48-72 h	Rastros de coágulos a las 32 h
Variegina 50 $\mu$ M	24 h	Moderado a las 24 h, coagulación extensiva a las 48 h
Variegina 15 $\mu$ M	24 h	Moderado a las 24 h, coagulación a las 48 h
Variegina 2 $\mu$ M	2 h	Coágulos sólidos a las 7 h

45 Los resultados muestran que los aumentos en las concentraciones de variegina tuvieron como resultado un efecto de conservación de la función general (estabilización) más largo, tanto con respecto a la existencia de señales de agregación plaquetaria medibles como al retraso en la aparición de material insoluble en la muestra de sangre completa.

50 Los resultados también demuestran que el uso de la presente invención puede adaptarse y ser apropiado para requisitos de uso específicos. Por ejemplo, en una situación en la que puede ser necesario recoger una muestra y ensayarla rápidamente, tal como en un departamento de urgencias hospitalarias, es posible conseguir varias horas de estabilidad usando concentraciones relativamente bajas (por ejemplo, 2  $\mu$ M) del agente de estabilización de la

sangre tal como variegina. Cuando son necesarios tiempos de estabilización más largos, tal como en situaciones en las que los ensayos posiblemente se realizarán varios días después de la recogida, los resultados muestran que es beneficioso el uso de concentraciones relativamente mayores (por ejemplo, 150  $\mu\text{M}$ ) del agente de estabilización de la sangre tal como variegina. Junto con los beneficios de la presente invención frente a citrato, la presente invención puede proporcionar las ventajas de una señal de agregación plaquetaria más fuerte a través de una serie de marcos temporales por selección de una concentración apropiada del agente de estabilización de la sangre.

*EJEMPLO 4: Efecto de variegina y otras variaciones del péptido variegina sobre la conservación de la función plaquetaria y otros aspectos de la calidad de muestras.*

Se realizaron experimentos que ensayaban varios análogos de variegina (SEQ ID NO: 1). La Tabla 3 enumera los péptidos que se ensayaron, todos los cuales se produjeron por síntesis de fase sólida típica.

Tabla 3: Secuencias de variegina y variantes

Péptido	Número de secuencia	Secuencia
Variegina (longitud completa de 32 restos)	1	SDQGDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEEYLDDDES
Variegina Nt29*	2	SDQGDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEEYLD
Variegina Nt26	3	SDQGDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEE
Variegina Ct29	4	GDVAEPKMHKTAPPDFEAIPEEYLDDDES
Variegina Ct22	17	MHKTAPPDFEAIPEEYLDDDES
Variegina K10A	6	SDQGDVAEP <u>A</u> KMHKTAPPDFEAIPEEYLDDDES

Nomenclatura: La abreviatura Nt representa aminoácidos amino-terminales, representando el número el recuento de restos comenzando en el extremo amino. Ct representa todos los aminoácidos carboxilo terminales numerados de forma similar desde el extremo amino. K10A es una variante de un solo resto, según la nomenclatura convencional de secuencias de proteínas.

Estos péptidos se usaron como agente de estabilización de la sangre, y se añadieron a la sangre inmediatamente después de la recogida en un tubo de recogida de sangre de vacío, vacío, consiguiendo una concentración final de 150  $\mu\text{M}$ . Se dejó que la sangre permaneciera en un estado de sangre completa a temperatura ambiente, hasta que se ensayó con respecto al potencial de agregación plaquetaria, todo como se describe en el Ejemplo 1. Los agonistas usados incluían colágeno y ADP, siguiendo las instrucciones del fabricante. La Tabla 4 enumera una evaluación cualitativa de la estabilidad, concretamente cuánto tiempo después de extraer inicialmente la muestra era medible la agregación plaquetaria por encima de la línea basal del instrumento eficaz. Adicionalmente, también se registró el tiempo hasta la primera observación visual de material insoluble, coagulado, en la muestra de sangre completa, y una evaluación de la gravedad o alcance de la presencia de este material insoluble. En algunos casos, solamente se presentó la caracterización visual de la cantidad de material insoluble, sin haberse realizado ninguna medición de la agregación plaquetaria.

Tabla 4: Variantes de variegina, y su efecto sobre la conservación de la función plaquetaria y estabilidad de solubilidad de la muestra (anticoagulación).

Péptido, concentración	Tiempo después de la extracción sanguínea en el que la agregación aún era medible por encima de la línea basal	Inspección visual con respecto a material insoluble
Variegina 150 $\mu\text{M}$ (SEQ ID NO: 1)	72 h	Rastros de material insoluble a las 48-72 h
Nt29 150 $\mu\text{M}$ (SEQ ID NO: 2)	n.d.	Rastros de material insoluble a las 32 h
Nt26 150 $\mu\text{M}$ (SEQ ID NO: 3)	n.d.	Rastros de material insoluble a las 7 h, coagulado de forma sólida a las 24 h
Ct29 150 $\mu\text{M}$ (SEQ ID NO: 4)	54-79 h	Rastros de material insoluble a las 48 h
Ct29 150 $\mu\text{M}$ + heparina 1,17 U/ml	48 h (no medido más allá de 48 h)	Nada o rastros de material insoluble a las 120 h
Ct22 150 $\mu\text{M}$ (SEQ ID NO: 5)	n.d.	Rastros hasta coagulación sólida en solamente 1 h



Péptido, concentración	Tiempo después de la extracción sanguínea en el que la agregación aún era medible por encima de la línea basal	Inspección visual con respecto a material insoluble
K10A 150 $\mu$ M (SEQ ID NO: 6)	n.d.	Coágulos sólidos a las 4 h

Como se indica por los datos, el acortamiento de la secuencia de variegina dio como resultado una duración más corta de la estabilidad de muestras, especialmente como se valora por el tiempo de permanencia a temperatura ambiente hasta que se formó una cantidad detectable visualmente de material insoluble en la muestra de sangre completa. No obstante, pueden usarse secuencias de variegina acortadas para conseguir la conservación de la función plaquetaria en situaciones en las que podrían ser suficientes tiempos más cortos para conseguir la estabilidad de la muestra general, tal como en situaciones hospitalarias o de departamentos de urgencias en las que pueden realizarse ensayos de plaquetas relativamente pronto después de la extracción de la sangre.

Se usaron dos de estos análogos de variegina (SEQ ID NO: 6 y 16) para examinar las capacidades de conservación de la función plaquetaria de los productos cuando la variegina se escinde en última instancia por trombina. La variegina compite por la unión del sitio activo de la trombina y, por lo tanto, se somete a escisión por trombina (Koh *et al.*, J. Biol. Chem. 282(40): 29101-13 (2007)). Además, la mutación del resto escindible, la lisina en la posición 10, a una alanina, bloquea la capacidad de la trombina para escindir el péptido designado SEQ ID NO: 6, por lo que se obtuvieron muestras que se coagulaban de forma sólida antes de que hubieran transcurrido 4 horas desde la extracción de la sangre. De forma similar, la adición de Ct22, que representa solamente los 22 restos carboxilo terminales que se obtienen después de que la trombina haya escindido la variegina, da como resultado una muestra casi inutilizable que se coagula de forma sólida en un periodo de una hora, esencialmente lo que sucedería si no se añadiera nada en absoluto a la sangre y se dejara coagular por sí sola después de la flebotomía.

Estos resultados son incoherentes con los hallazgos presentados en Koh, que indica que Ct22, en particular, es un inhibidor de trombina eficaz para fines terapéuticos, como se mide por experimentos enzimológicos tradicionales. Los presentes resultados tomados en este contexto subrayan la impredecibilidad de la técnica en el sentido de que el grado de inhibición de trombina para fines terapéuticos no es necesariamente predictivo de (o no se correlaciona necesariamente con) la inhibición de la trombina con el objetivo de estabilizar la sangre y sus componentes, tales como las plaquetas, en condiciones no fisiológicas tales como en una muestra de sangre recogida.

Los datos también muestran que la combinación de Ct29 y heparina 1,17 U/ml prolongó las horas de estabilidad de la muestra.

EJEMPLO 5: Examen de la conservación de la función plaquetaria proporcionada por otros inhibidores directos o indirectos de trombina.

Se evaluaron varios inhibidores directos o indirectos de trombina con respecto a su capacidad para estabilizar muestras de sangre, al conservar la función plaquetaria, bien solos o en combinación con otros inhibidores. Se realizaron mediciones de la agregación plaquetaria como se ha descrito en ejemplos previos, usando colágeno y/o ADP como agonista plaquetario, y siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante.

Además de variegina, los inhibidores directos de trombina examinados fueron argatrobán, FM-19, aprotinina y D-fenilalanil-L-prolil-L-arginina clorometil cetona (PPACK).

Los inhibidores indirectos de trombina examinados fueron heparina y octasulfato de sacarosa (SOS).

Todos los inhibidores se ensayaron con respecto a su capacidad para conservar la función plaquetaria en muestras de sangre recogidas, solos o en combinación con variegina (SEQ ID NO: 1).

Los resultados muestran en la Tabla 5 que enumera aditivos solos o en combinación que se añadieron a muestras de sangre completa recién extraídas. Se presentan tres parámetros de rendimiento en esa tabla, concretamente: 1) el mayor tiempo después de la extracción de la sangre en el que pudo realizarse una medición de la agregación plaquetaria fiable por encima de la línea basal del agregómetro; 2) el momento más temprano en el que se observó detección visual de material insoluble (que incluye una descripción cualitativa del grado de insolubilidad, como rastros (un bajo nivel de material detectable, que requiere una observación visual cuidadosa) o una cantidad moderada (se ve fácilmente tras una evaluación superficial), y finalmente muestras completamente coaguladas (solidificadas como ocurre con cualquier muestra de suero intacta, y en general no utilizable de ninguna manera para mediciones de la agregación plaquetaria); y 3) una estimación cualitativa de la hemólisis, como se determina visualmente, que es una práctica común y aceptada en laboratorios clínicos. Para algunas de las condiciones ensayadas, solamente se registró un subconjunto estos tres parámetros.

Tabla 5

	Receta de aditivos	Tiempo después de la extracción de sangre en el que la agregación aún era medible por encima de la línea basal	Inspección visual para material insoluble	Inspección visual para hemólisis
A	Variegina 150 $\mu$ M	72 h	Rastros a las 48-72 h. Coágulos sólidos a las 96 h	Ninguna-leve
D	Variegina 150 $\mu$ M + heparina no fraccionada 1,17 unidades USP/ml	72-96 h	Rastros a las 72-96 h.	Ninguna-leve
E	Variegina 150 $\mu$ M + SOS 1 mM		Rastros a las 72 h	Ninguna-leve
F	Variegina 150 $\mu$ M + SOS 1 mM + heparina 1,17 U/ml		Ninguno a las 72 h	Ninguna-leve
G	Trombostatina 30 $\mu$ M (FM-19)	No determinado	Coagulado de forma sólida a las 24 h	Ninguna-leve
H	Variegina 150 $\mu$ M + Trombostatina 30 $\mu$ M (FM-19)	72 h	Rastros a las 72 h	Ninguna-leve
I	SOS 2 mM	72 h	Ninguno a las 96 h	Ninguna-leve
J	Variegina 150 $\mu$ M + SOS 2 mM	72 h	Ninguno a las 96 h	Ninguna-leve
	Argatrobán, 100 $\mu$ M + Variegina 150 $\mu$ M	48 h	Rastros a las 48 h	Extensiva
	Argatrobán, 100 $\mu$ M	24 h	Moderado a las 24 h, coágulos sólidos que comienzan a las 32 h	Extensiva
	Argatrobán 50 $\mu$ M + variegina 150 $\mu$ M	48 h	Rastros a las 48 h	Ninguna
	Argatrobán, 50 $\mu$ M	30 h	Moderado o peor a las 30 h	Leve-moderada
	Argatrobán, 75 $\mu$ M + variegina 150 $\mu$ M	72 h	Rastros a las 72-96 h	Leve a las 32 h
	Argatrobán, 75 $\mu$ M	24 h	Moderado a las 24 h, coágulos sólidos que comienzan a las 32 h	Moderada-extensiva
	Aprotinina 500 KIU/ml + variegina 150 $\mu$ M	48 h	Rastros a moderado a las 24 h, coágulos sólidos a las 48 h	Ninguna-leve
	PPACK 75 $\mu$ M	n.d.	Coágulos sólidos a las 24 h	
	PPACK 75 $\mu$ M + variegina 150 $\mu$ M	48 h	Rastros a las 32 h, coágulos sólidos a las 48 h	

5 Como se muestra en la Tabla 5, la variegina 150  $\mu$ M y el SOS 2 mM, solos y en combinación, demostraron ser eficaces con respecto a las tres métricas de rendimiento. Estas realizaciones de la presente invención consiguieron marcos temporales largos para estabilidad (es decir, al menos 72 horas) y en gran medida en ausencia de los atributos menos deseables de formación de materia insoluble y hemólisis.

10 En claro contraste, varios de los inhibidores directos de trombina cuando se usan solos, a concentraciones recomendadas o a concentraciones presentadas como terapéuticamente útiles, proporcionaron poco o ningún efecto beneficioso de estabilización. En particular, FM-19, CTI y PPACK dieron como resultado cantidades considerables de material insoluble si no directamente coágulos sólidos en un periodo de 24 h después de la extracción de la sangre. De forma similar, el uso de una concentración relativamente alta de argatrobán dio como resultado una aparición más rápida de la coagulación, y menos tiempo para la estabilidad de la muestra para mediciones de agregación plaquetaria, así como cantidades considerables de hemólisis. Además, la heparina, usada sola a 1,17 U/ml, que es aproximadamente un treceavo (1/13) de la dosificación en una muestra de plasma heparinizado típico, tuvo un rendimiento relativamente bajo (datos no mostrados).

Estos resultados subrayan adicionalmente la impredecibilidad con respecto al uso de inhibidores de trombina y anticoagulantes conocidos para estabilizar la sangre (por ejemplo, conservar la función plaquetaria) *in vitro* y, por lo

tanto, son coherentes con las hipótesis de trabajo de los Solicitantes de que la estabilización de la sangre, y particularmente la coagulación sanguínea, al menos en el contexto de una muestra de sangre *in vitro*, tiene una serie de requisitos biológicos/bioquímicos diferentes y quizás más complicados en comparación con la evaluación de estos inhibidores frente a sistemas más sencillos tales como estudios de inhibición de trombina purificada sin la presencia del resto de los componentes sanguíneos. Además, mucho de lo que se ha estudiado acerca de los inhibidores directos de trombina se refiere a la eficacia terapéutica potencial para el tratamiento de trastornos de la coagulación, pero es importante indicar que dichos estudios y en última instancia los factores bioquímicos subyacentes asociados con la preparación de una dosis terapéutica satisfactoria no son necesariamente relevantes o pronósticos con respecto a su capacidad para estabilizar componentes sanguíneos tales como plaquetas en una muestra recogida, especialmente durante un periodo de muchas horas o días. Dicho de otro modo, solo porque se sepa que un agente se usa en medicina como un inhibidor de trombina, y se conozca tanto su identidad como las concentraciones apropiadas para conseguir eficacia, no significa necesariamente que actúe como un agente de estabilización de la sangre eficaz para fines de ensayos *in vitro*.

Por otro lado, los resultados muestran que incluso aunque estos otros agentes eran poco eficaces o casi ineficaces cuando se usaban solos, proporcionaban un efecto de estabilización de las plaquetas aditivo cuando se usaban en combinación con las realizaciones de la invención, variegina y SOS. Por ejemplo, en el caso de heparina con variegina, los inventores observaron tiempos más largos para la estabilidad para las mediciones de agregación y formación reducida o retardada de material insoluble en la muestra de sangre completa. Se realizaron observaciones similares con FM-19 en combinación con variegina. En el caso de FM-19 y SOS, también se vio que la combinación con variegina aumentaba ligeramente la señal de agregación plaquetaria global medida, a lo largo de todo el marco temporal de los experimentos. Por lo tanto, los resultados observados muestran que las actividades y, en última instancia, los efectos beneficiosos aditivos proporcionados por estos inhibidores (que en muchos casos se sabía que ejercían su efecto por unión a la misma región en la trombina), cuando se usaban *in vitro* para estabilizar muestras de sangre extraída, eran diferentes de su actividad en sistemas enzimológicos modelo diseñados para evaluar su potencial inhibidor real para fines terapéuticos.

EJEMPLO 6: Comparación entre la realización de la invención e hirudina.

Se examinó la estabilidad relativa de plaquetas en sangre que se recogió de 5 sujetos humanos diferentes usando un tubo de recogida de sangre de la invención que contenía variegina 150  $\mu$ M (SEQ ID NO: 1) + heparina no fraccionada 1,17 USP/ml y, como comparación, tubos de recogida de sangre que contenían hirudina, disponibles en el mercado en Verum Diagnostica (Catálogo n.º MP0600 para "tubo de recogida de sangre en vacío de hirudina"). Los experimentos se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, usando el agregómetro de impedancia en sangre completa, y usando una dosis baja de ADP (concentración final 1,25  $\mu$ M) como agonista.

Como se muestra en la Tabla 6, las mediciones de la función plaquetaria fueron más fuertes en el tubo de recogida de la invención que en las muestras de hirudina comparativas, que no son de la invención, tanto inmediatamente como después de 24 horas.

Tabla 6: Mediciones de agregación plaquetaria usando como agonista ADP de dosis baja

		Agregación, ABC Tubo de la invención	Hirudina
0 h	Sujeto 1	58	34
	Sujeto 2	51	18
	Sujeto 3	88	84
	Sujeto 4	120	113
	Sujeto 5	67	59
24 h	Sujeto 1	32	27
	Sujeto 2	26	15
	Sujeto 3	33	25
	Sujeto 4	32	22
	Sujeto 5	44	37

Con sangre reciente, ensayada en un periodo de una hora desde la extracción, la agregación plaquetaria inducida por ADP medible tuvo un resultado promedio un 56 % mayor para la sangre en el tubo de recogida de sangre de la invención en comparación con la sangre recogida en el tubo que contenía hirudina. Esas mismas muestras a las 24 horas mostraron un promedio un 38 % mayor de actividad para la misma comparación. Las muestras de hirudina también mostraron una distribución más amplia a tiempo cero que la formulación de la invención. Las 5 muestras de hirudina mostraron agregación de 62 +/- 38, lo que representa un error típico de aproximadamente un 61 % (38/62\*100). Por el contrario, la agregación en el tubo de la invención fue de 77 +/- 28, para un error típico de solamente un 36 %. Estos resultados demuestran que el uso de los dispositivos de recogida de sangre de la invención consiguieron una respuesta más uniforme en toda la población de muestras humanas y con una mejor

reproducibilidad del ensayo. Estas ventajas conducen a una mayor utilidad clínica para mediciones de la función plaquetaria. Por ejemplo, al realizarse un intervalo más pequeño de “normales” para una población sana, podrían ser más fáciles de detectar las muestras con agregación extrema, que pueden reflejar una enfermedad o poca respuesta a fármacos antiplaquetarios.

5 En la realización de la invención, la variegina, como la hirudina, es un péptido obtenido a partir de animales hematófagos. De nuevo, sin embargo, los datos demuestran que dichos inhibidores directos de trombina obtenidos de forma natural, como clase, no tiene una eficacia igual o en algunos casos, casi similar, a los aditivos sanguíneos, particularmente para el análisis de la función plaquetaria, y que sus capacidades a este respecto no son predecibles.

10 También es importante considerar modos adicionales en los que puedan utilizarse datos tales como los de la Tabla 6. Por ejemplo, sería de esperar que la introducción de antagonistas plaquetarios redujera extensivamente señales no antagónicas, tales como las presentadas en la Tabla 6, al menos en casos de pacientes que tienen una respuesta apropiada al fármaco/antagonista. Los antagonistas relevantes incluirían fármacos antiplaquetarios tales como aspirina, Plavix y los otros ya analizados. Como se sabe por experimentos previos, la adición de 2MeSAMP puede dar como resultado hasta un 50 % o más, por ejemplo, un 67 % (aproximadamente 2/3) de agregación plaquetaria inducida por agonista, lo que da como resultado una baja señal que puede ser difícil de medir con fiabilidad por encima del límite inferior de detección de un instrumento de agregación. Cualquier medición en presencia de 2MeSAMP que quede cerca o por debajo de este límite inferior operativo puede no ser medible. Con respecto al aparato usado en estos experimentos, el límite inferior de señal fiable está en el intervalo de 8 o 9 ABC. Por lo tanto, al menos para los fines del instrumento particular usado para realizar este experimento, una medición de agregación inducida por ADP sin antagonista de al menos aproximadamente 27 ABC puede considerarse la señal fiable mínima (un descenso del 67 % desde 27 ABC sería 9 ABC, que está en el límite de detección de ese instrumento particular). Por lo tanto, el umbral de 27 ABC es una medida frente a la que deberían valorarse los datos en la Tabla 6.

20 En una de las cinco muestras de hirudina, el área bajo la curva para la muestra de 1 h se midió como 18, quedando por debajo de este umbral funcional de 27 y, por lo tanto, daría como resultado una lectura clínicamente no medible en presencia de 2MeSAMP. A las 24 h, tres de las cinco muestras de hirudina descendieron por debajo de 27 ABC, y una cuarta era exactamente 27.

30 Por el contrario, las cinco muestras recogidas en el tubo de recogida de sangre de la invención mantuvieron la agregación plaquetaria bien por encima del umbral de 27 en el tiempo de 1 h, y cuatro de cinco a las 24 h. Estos resultados demuestran que la presente invención estabiliza las plaquetas durante la recogida y el posterior almacenamiento, lo cual facilita la determinación inequívoca de datos de función plaquetaria clínicamente relevantes, especialmente en casos en los que es importante medir con precisión bajos niveles de agregación, mejorando la probabilidad de medir los datos utilizables a lo largo del tiempo (tal como frente a hirudina tanto en muestras recientes como en muestras almacenadas durante 24 h).

40 Aunque la invención en el presente documento se ha descrito haciendo referencia a realizaciones particulares, debe entenderse que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios y aplicaciones de la presente invención. Debe entenderse por lo tanto que pueden realizarse numerosas modificaciones a las realizaciones ilustrativas y que pueden idearse otras disposiciones sin alejarse del alcance de la presente invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

45



ES 2 572 502 T3

**Ser Asp Gln Gly Asp Val Ala Glu Pro Lys Met His Lys Thr Ala Pro**  
**1 5 10 15**

**Pro Phe Asp Phe Glu Ala Ile Pro Glu Glu**  
**20 25**

5 <210> 4  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético: Fragmento de variegina  
 <400> 4

**Gly Asp Val Ala Glu Pro Lys Met His Lys Thr Ala Pro Pro Phe Asp**  
**1 5 10 15**

**Phe Glu Ala Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Asp Asp Glu Ser**  
**20 25**

15 <210> 5  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido sintético: Fragmento de variegina  
 <400> 5

**Asp Gln Gly Asp Val Ala Glu Pro Lys Met His Lys Thr Ala Pro Pro**  
**1 5 10 15**

**Phe Asp Phe Glu Ala Ile Pro Glu Glu Tyr Leu**  
**20 25**

25 <210> 6  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Péptido sintético: Fragmento de variegina  
 <400> 6

**Ser Asp Gln Gly Asp Val Ala Glu Pro Ala Met His Lys Thr Ala Pro**  
**1 5 10 15**

**Pro Phe Asp Phe Glu Ala Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Asp Asp Glu Ser**  
**20 25 30**

40 <210> 7  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido sintético: Fragmento de variegina

ES 2 572 502 T3

<400> 7

**Ser Asp Gln Ala Asp Arg Ala Gln Pro Lys Leu His Arg Asn Ala Pro**  
**1 5 10 15**

**Gln Gly Asp Phe Glu Ala Ile Pro Asp Glu Tyr Leu**  
**20 25**

5 <210> 8  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético: Fragmento de variegina

<400> 8

**Ser Asp Gln Ser Gly Arg Ala Gln Pro Lys Leu Pro Arg Asn Ala Pro**  
**1 5 10 15**

**Gln Gly Asp Phe Glu Ala Ile Pro Asp Glu Tyr Leu**  
**20 25**

15 <210> 9  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido sintético: Fragmento de variegina

25 <400> 9

**Ser Asp Gln Gly Asp Val Ala Glu Pro Lys Met His Lys Thr Ala Pro**  
**1 5 10 15**

**Pro Gly Asp Phe Glu Ala Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Asp**  
**20 25**

30 <210> 10  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Péptido sintético: Fragmento de variegina

<400> 10

**Ser Asp Gln Ala Asp Val Ala Glu Pro Lys Met His Lys Thr Ala Pro**  
**1 5 10 15**

**Pro Gly Asp Phe Glu Ala Ile Pro Glu Glu Tyr Leu Asp**  
**20 25**

40 <210> 11  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45

ES 2 572 502 T3

<220>

<223> Péptido sintético: Fragmento de variegina

<400> 11

5

**Glu Pro Lys Met His Lys Thr Ala Pro Pro Phe Asp Phe Glu Ala Ile**  
**1 5 10 15**

**Pro Glu Glu Tyr Leu Asp Asp Glu Ser**  
**20 25**

<210> 12

<211> 25

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético: Fragmento de variegina

15

<400> 12

**Glu Pro Lys Met His Lys Thr Ala Pro Pro Phe Asp Phe Glu Glu Ile**  
**1 5 10 15**

**Pro Glu Glu Tyr Leu Asp Asp Glu Ser**  
**20 25**

<210> 13

<211> 21

20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético: Fragmento de variegina

25

<400> 13

**Glu Pro Lys Met His Lys Thr Ala Pro Pro Phe Asp Phe Glu Ala Ile**  
**1 5 10 15**

**Pro Glu Glu Tyr Leu**  
**20**

30

<210> 14

<211> 18

35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético: Fragmento de variegina

40

<400> 14

**Met His Lys Thr Ala Pro Pro Phe Asp Phe Glu Ala Ile Pro Glu Glu**  
**1 5 10 15**

**Tyr Leu**

<210> 15

<211> 24

45

<212> PRT



ES 2 572 502 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético: Fragmento de variegina

5

<400> 15

**Asp Val Ala Glu Pro Lys Met His Lys Thr Ala Pro Pro Phe Asp Phe**  
**1 5 10 15**

**Glu Ala Ile Pro Glu Glu Tyr Leu**  
**20**

10

<210> 16

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido sintético: Fragmento de variegina

<400> 16

**Asp Val Ala Glu Pro Arg Met His Lys Thr Ala Pro Pro Phe Asp Phe**  
**1 5 10 15**

**Glu Ala Ile Pro Glu Glu Tyr Leu**  
**20**

20

<210> 17

<211> 22

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético: Fragmento de variegina

30

<400> 17

**Met His Lys Thr Ala Pro Pro Phe Asp Phe Glu Ala Ile Pro Glu Glu**  
**1 5 10 15**

**Tyr Leu Asp Asp Glu Ser**  
**20**

## REIVINDICACIONES

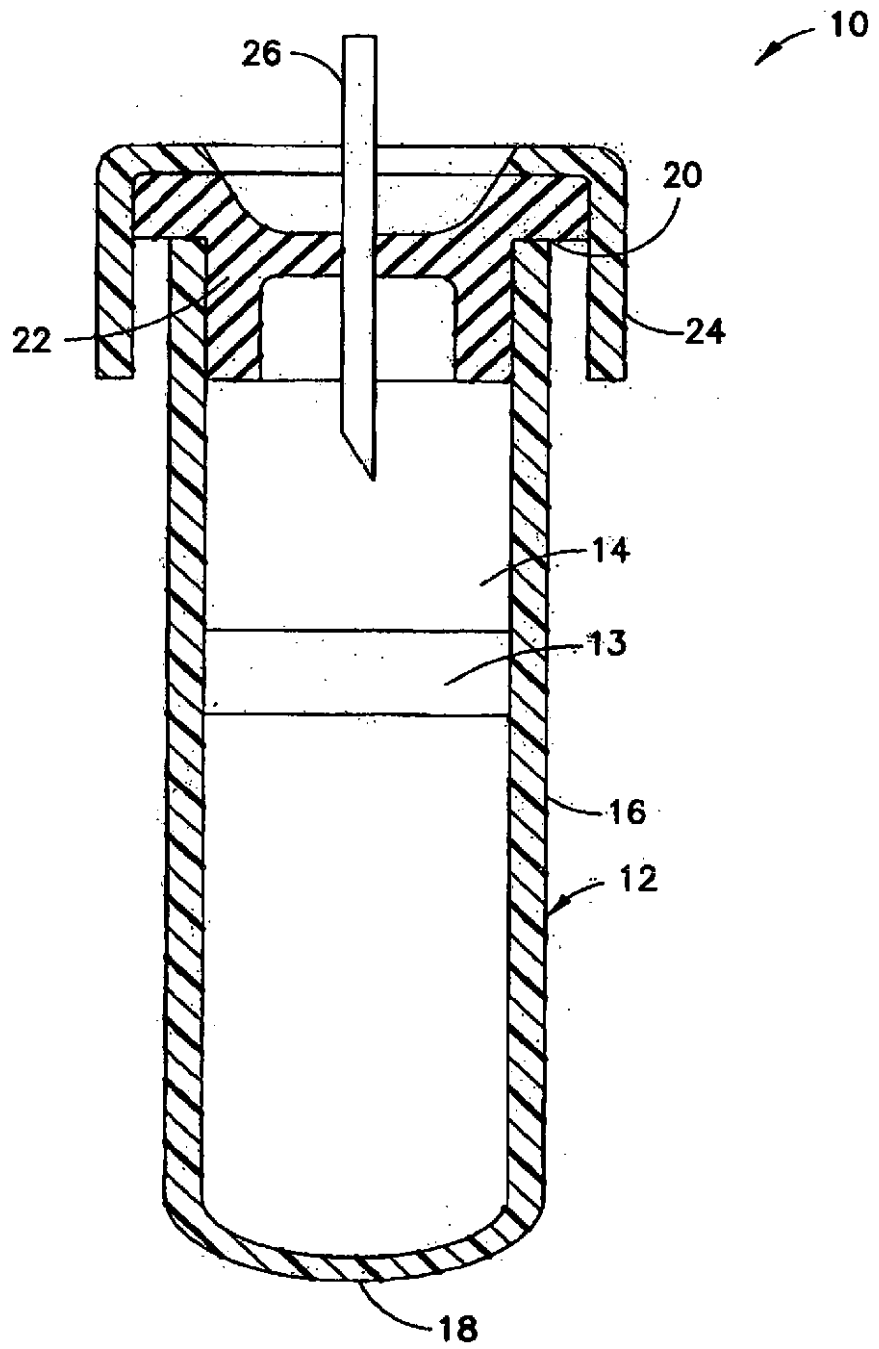
1. Un dispositivo para recoger y estabilizar sangre o un componente de la misma, donde el dispositivo tiene un primer extremo y un segundo extremo y al menos una pared interior que define una parte de depósito para recibir sangre, en el que el depósito contiene un agente de estabilización de la sangre que comprende a) variegina que tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma tal como el análogo de variegina que es un fragmento de la SEQ ID NO: 1 y que se selecciona de las SEQ ID NO: 2-5, o el análogo de variegina que se designa SEQ ID NO: 6; o b) un disacárido polisulfatado, preferentemente octasulfato de sacarosa, o una combinación de los mismos, cada uno en una cantidad eficaz para estabilizar la sangre o un componente de la misma, en el que la variegina designada SEQ ID NO: 1 o el análogo de la misma pueden estar presentes en el dispositivo en una concentración de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1 mM, y en el que el disacárido polisulfatado puede estar presente en el dispositivo en una concentración de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 50 mM.
2. El dispositivo de la reivindicación 1, que es estéril y de vacío, y comprende además un cierre perforable por una aguja.
3. El dispositivo de la reivindicación 2, que es un tubo.
4. El dispositivo de la reivindicación 3, que comprende además un separador.
5. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el agente de estabilización de la sangre comprende además un inhibidor directo de trombina tal como argatrobán, rOicPaF(p-Me)-NH<sub>2</sub>, hirudina, bivalirudina, aprotinina, D-fenilalanil-L-propil-L-arginina (PPACK), o combinaciones dos o más de los mismos.
6. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el agente de estabilización de la sangre comprende además un inhibidor indirecto de trombina tal como heparina y heparinas de bajo peso molecular.
7. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que el agente de estabilización de la sangre está en forma seca.
8. El dispositivo de la reivindicación 1, que comprende además un anticoagulante tal como anistasina; argatrobán; E-76; antitrombina III, inhibidores del Factor Xa (tales como 6-(4-{1-[(dimetilamino)metil]ciclopropil}fenil)-1-(4-metoxifenil)-3-(trifluorometil)-1,4,5,6-tetrahidro-7H-pirazolo[3,4-c]piridin-7-ona; 1-(4-metoxifenil)-6-[4-[1-pirrolidin-1-ilmetil]ciclopropil]fenil]-3-(trifluorometil)-4,5-dihidropirazolo[3,4-c]piridin-7-ona, o combinaciones de los mismos); inhibidores del Factor VII, inhibidores del Factor IX; inhibidores del Factor XII e inhibidores del Factor II, y combinaciones de dos o más de los mismos.
9. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la formulación comprende además un antagonista plaquetario tal como un inhibidor de ciclooxigenasa, un inhibidor de P2Y<sub>12</sub>, un anticuerpo antiplaquetario, y combinaciones de dos o más de los mismos.
10. Uso de un dispositivo para estabilizar sangre o un componente sanguíneo de la misma que se introduce en el dispositivo, en el que el dispositivo comprende un primer extremo y un segundo extremo y al menos una pared interior que define una parte de depósito para recibir la sangre o la composición, en el que el depósito contiene un agente de estabilización de la sangre que comprende a) variegina que tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma tal como el análogo de variegina que es un fragmento de la SEQ ID NO: 1 y que se selecciona de las SEQ ID NO: 2-5, o el análogo de variegina que se designa SEQ ID NO: 6; o b) un disacárido polisulfatado, preferentemente octasulfato de sacarosa, o una combinación de los mismos, cada uno en una cantidad eficaz para estabilizar la sangre o el componente sanguíneo de la misma, en el que la variegina designada SEQ ID NO: 1 o el análogo de la misma puede estar presente en el dispositivo en una concentración de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1 mM, y en el que el disacárido polisulfatado puede estar presente en el dispositivo en una concentración de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 50 mM.
11. El uso de la reivindicación 10, en el que la composición es una muestra de sangre extraída, o en el que la composición comprende plaquetas tales como plasma rico en plaquetas (PRP) o en el que la composición comprende glóbulos blancos.
12. Uso de un dispositivo para medir un parámetro de la sangre o un componente sanguíneo *in vitro* que se introduce en el dispositivo, en el que el dispositivo comprende un primer extremo y un segundo extremo y al menos una pared interior que define una parte de depósito para recibir sangre o una composición que comprende un componente sanguíneo, en el que el depósito contiene un agente de estabilización de la sangre que comprende a) variegina que tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma tal como el análogo de variegina que es un fragmento de la SEQ ID NO: 1 y que se selecciona de las SEQ ID NO: 2-5, o el análogo de variegina que se designa SEQ ID NO: 6; o b) un disacárido polisulfatado, preferentemente octasulfato de sacarosa, o una combinación de los mismos, cada uno en una cantidad eficaz para estabilizar la sangre, en el que la variegina designada SEQ ID NO: 1 o el análogo de la misma puede estar presente en el dispositivo en una

concentración de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1 mM, y en el que el disacárido polisulfatado puede estar presente en el dispositivo en una concentración de aproximadamente 50  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 50 mM.

5 13. El uso de la reivindicación 12, en el que el parámetro de la sangre es la función plaquetaria medida por agregación plaquetaria, y en el que el dispositivo comprende además un agonista plaquetario que estimula la agregación de las plaquetas, en el que el agonista puede comprender colágeno, adenosín difosfato (ADP), ácido araquidónico (AA), epinefrina, péptido activador del receptor de trombina (TRAP), trombina, péptido relacionado con el colágeno (CRP), ristocetina, trombina, análogos de trombina, agonistas del receptor de tromboxano, propil galato catiónico y convulxina, y combinaciones de dos o más de los mismos.

10 14. El uso de la reivindicación 13, en el que el dispositivo comprende además un antagonista plaquetario que inhibe la agregación de las plaquetas, en el que el antagonista plaquetario puede seleccionarse del grupo que consiste en ácido acetilsalicílico, clopidogrel, cangrelor, ticagrelor y 2-metiloadenosín 5'-monofosfato (2MeSAMP), y combinaciones de dos o más de los mismos.

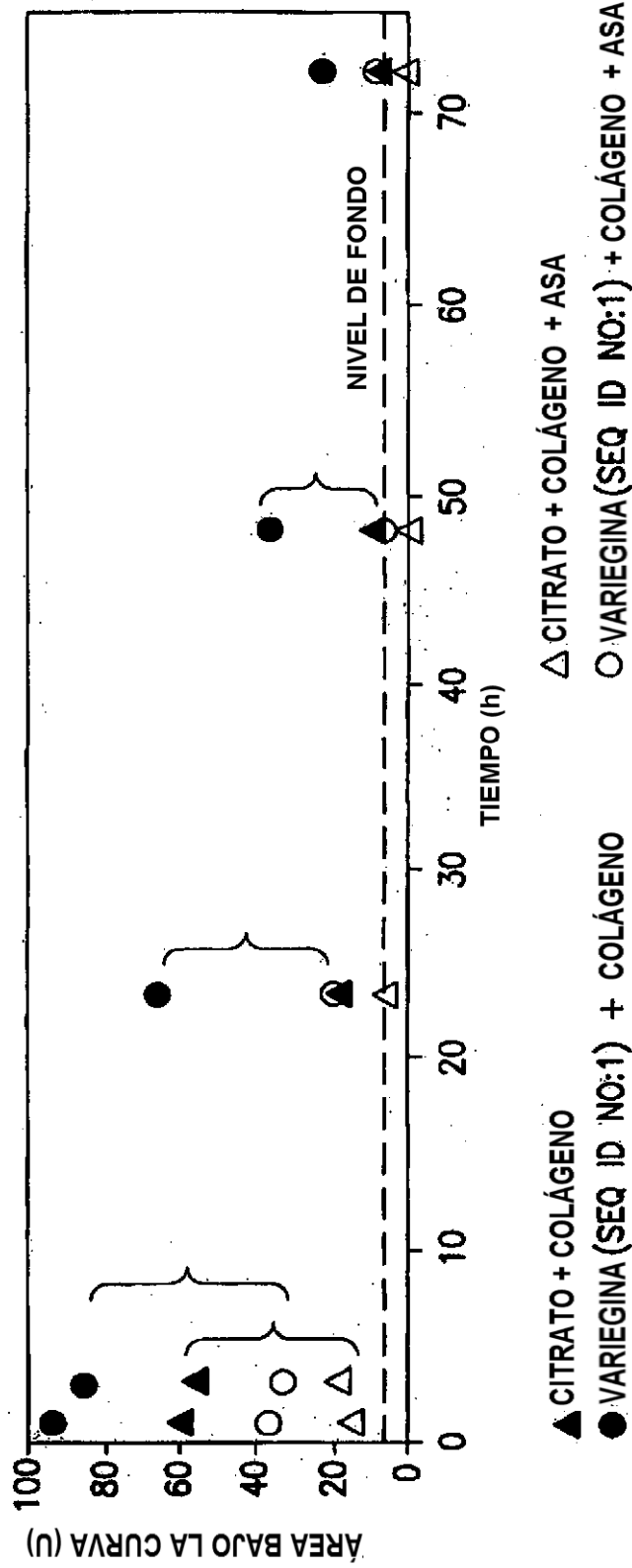
15 15. Un kit que comprende al menos un dispositivo para recogida y estabilización de la sangre o una composición que comprende un componente sanguíneo, en el que el dispositivo tiene un primer extremo y un segundo extremo y al menos una pared interior que define una parte de depósito para recibir la sangre o la composición, en el que el depósito contiene un agente de estabilización de la sangre que comprende a) variegina que tiene la secuencia de aminoácidos designada SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma tal como el análogo de variegina que es un fragmento de la SEQ ID NO: 1 y que se selecciona de las SEQ ID NO: 2-5, o el análogo de variegina que se designa SEQ ID NO: 6; o b) un disacárido polisulfatado, preferentemente octasulfato de sacarosa, o una combinación de los mismos, cada uno en una cantidad eficaz para estabilizar la sangre o el componente sanguíneo de la misma, en el que la variegina designada SEQ ID NO: 1 o el análogo de la misma pueden estar presentes en el dispositivo en una  
20 concentración de aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 1 mM, y en el que el disacárido polisulfatado puede estar presente en el dispositivo en una concentración de aproximadamente de 50  $\mu\text{M}$  a aproximadamente 50 mM, y en el que el kit comprende opcionalmente un segundo dispositivo que comprende además un antagonista  
25 plaquetario.



**FIG. 1**



FIG.2



FECHA DE AGREGACIÓN DE SUJETO 1

**FIG.3**

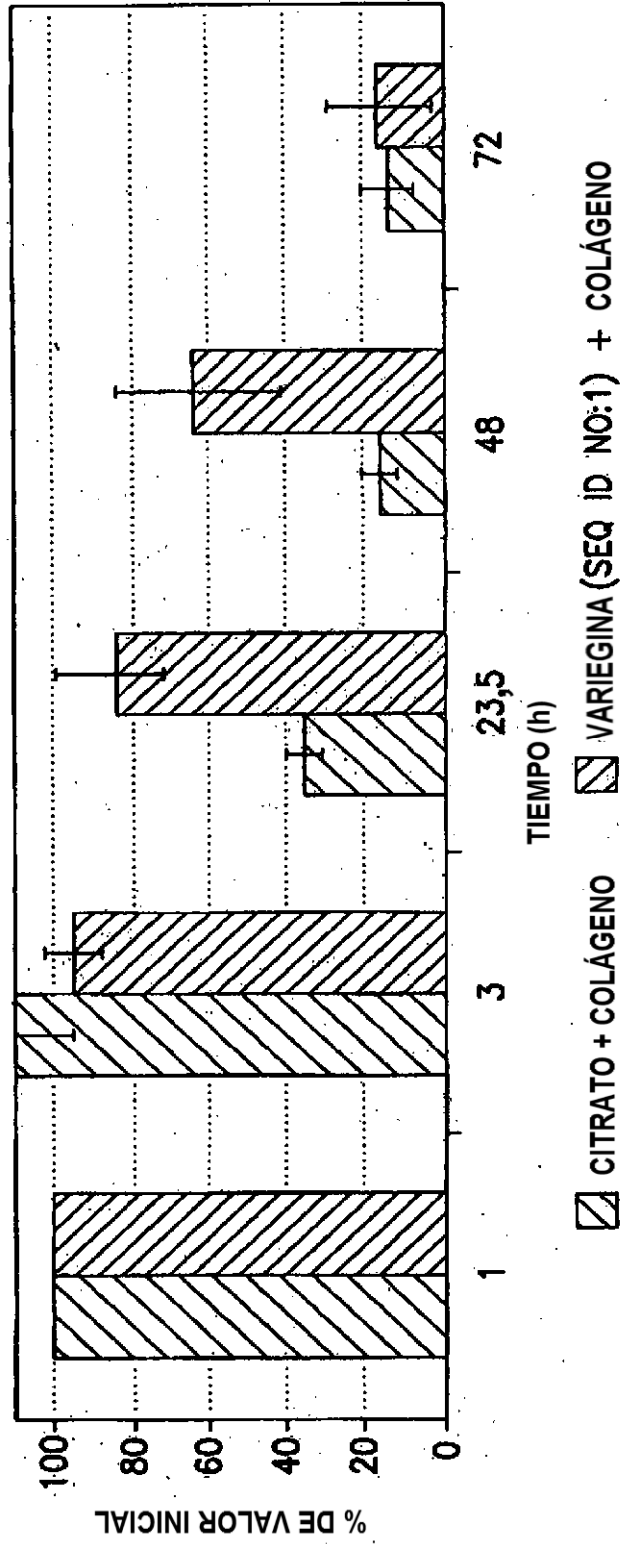


FIG.4